

ELISABETE REGINA BÓF

**DISFUNÇÃO CARDÍACA NA SEPSE EXPERIMENTAL
AVALIADA EM CORAÇÃO ISOLADO E PERFUNDIDO
DE CAMUNDONGO**

**FLORIANÓPOLIS
2010**

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

**DISFUNÇÃO CARDÍACA NA SEPSE EXPERIMENTAL
AVALIADA EM CORAÇÃO ISOLADO E PERFUNDIDO
DE CAMUNDONGO**

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

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Co-Orientador: Dra. Silvia Dal Bó

ELISABETE REGINA BÓF

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária da
Universidade Federal de Santa Catarina

B673d Bóf, Elisabete Regina

Disfunção cardíaca na sepse experimental avaliada em coração isolado e perfundido de camundongo [dissertação] / Elisabete Regina Bóf ; orientador, Jamil Assreuy. - Florianópolis, SC, 2010.

96 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Óxido Nítrico. 3. Coração. 4. Sepse. 5. Isoprenalina. 6. L-name. 7. L-arginina. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

CDU 615

"O importante é não parar de questionar"
(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a DEUS. Pelas oportunidades que tenho; por me dar sabedoria para realizar este trabalho; serenidade nos momentos difíceis e por colocar pessoas muito especiais no meu caminho, que foram pacientes comigo, me deram apoio, carinho e muito, muito amor.

Aos meus queridos pais, Luiz e Inês, por me concederem a vida, por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em todas as minhas decisões. Agradeço pelo amor, carinho, conselhos, bons exemplos e infinitas orações. Agradeço pelos agradáveis momentos que passamos juntos. Amo e admiro muito vocês.

Ao amor da minha vida, Daniel, pelo apoio e incentivo incondicionais. Agradeço muito pela sua paciência em todos os momentos e por ser tão carinhoso comigo. Agradeço porque eu jamais chegaria tão longe sem você. Obrigada por fazer de mim uma pessoa melhor. É uma alegria viver ao seu lado... Sou muito feliz com você!

À minha querida irmã e amiga Ana e ao meu amado sobrinho Matheus, por me encherem de amor e carinho! Agradeço por cuidarem de mim, por tantos momentos felizes, pelas risadas, pelas brincadeiras. Especialmente a Ana, por me ensinar a amar crianças. Especialmente ao Matheus, por ser tão especial e se tornar tão importante na minha vida.

Aos meus sogros, Ademar (*in memoriam*) e Marlisa, por me acolherem tão bem em sua família, pelo apoio e principalmente, por vibrarem comigo a cada conquista.

Aos meus cunhados, Guga e Júlia, Guto e Josi, e aos meus queridos sobrinhos, Julinha, Gabi e Lu, pelo apoio e por tantos momentos felizes que passamos juntos durante todos esses anos.

A todos os meus familiares e amigos, pelo incentivo e pelo carinho que sempre tiveram por mim.

Agradeço de forma muito especial ao meu orientador, Professor Jamil, por me aceitar em seu laboratório, pela confiança que depositou em mim, pela paciência, pelos valiosos ensinamentos, pelos conselhos,

pelos puxões de orelha, pelo carinho (especialmente nos últimos meses de trabalho) e pela atenção e disponibilidade em corrigir este trabalho.

À minha co-orientadora, Silvia, que me mostrou que tudo é possível! Agradeço por todos os ensinamentos, por estar sempre ao meu lado, pela paciência, pelo apoio, pela confiança e pela cobrança também. Agradeço por ser mais do que co-orientadora, por ser amiga. Sou muito grata a você.

Ao meu primeiro mestre, Professor José Eduardo, por me iniciar no pensamento científico, pelos ensinamentos (que foram muito além da ciência), pela paciência, pelo apoio e incentivo tão importantes para a minha formação profissional. Agradeço também, pelas ótimas conversas científicas e pelas importantes contribuições dadas a este trabalho.

Ao Professor Leandro José Bertoglio pela fundamental ajuda nas análises estatísticas do presente trabalho e também, pelo incentivo, motivação e boas conversas.

Ao Professor Giles Alexander Rae pelas informações fornecidas sobre o sistema de coração isolado e perfundido, tão importantes para a implementação e padronização deste sistema em nosso laboratório.

Ao Professor João Batista Calixto por disponibilizar equipamentos e reagentes importantes para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, pelos valiosos ensinamentos transmitidos durante todo esse período.

Agradeço a Professora Virgínia Soares Lemos, Professor Alvaír Pinto de Almeida e Professor Steyner de França Côrtes, por me acolherem tão bem em seus laboratórios e também, agradeço pela disponibilidade de seus alunos em me ensinar importantes técnicas, entre elas a de coração isolado e perfundido, imprescindível para a realização deste trabalho.

Agradeço aos colegas e amigos de laboratório:

Ao Gustavo, pelas valiosas contribuições dadas a este trabalho, pela ajuda em alguns experimentos e também na captação e análise de registros, pelas ótimas discussões sobre ciência, pelo apoio, pelo exemplo e pela amizade.

Ao Geisson, pelo carinho, amizade e ajuda na organização do sistema de aquisição de dados.

À Regina, agradeço muito pela ajuda intelectual e também na realização de muitos experimentos, mas principalmente, agradeço pelo apoio e amizade nos momentos mais difíceis.

À Karin, pela amizade e boas conversas. E ao Georges, agradeço pela ajuda na formatação deste trabalho.

À Daniela, agradeço pelo carinho, amizade, ajuda nos experimentos e por ser muito prestativa e estar sempre pronta a ajudar.

À Verônica, pela alegria e bom humor contagiantes! É sempre muito bom estar perto de você! Agradeço também pela ajuda nos experimentos.

Ao Lucas, Ana Maria, Thiago, Madlene, Edir, Ana Silvia, Eric e Geovana, pela amizade, troca de informações e pelos importantes momentos de descontração.

À Adriane, agradeço pelo suporte técnico, mas sobretudo, agradeço pelo carinho, apoio, amizade e por tornar o laboratório um lugar ainda mais agradável e harmonioso.

Aos amigos que já passaram pelo NO LAB: Daniel, Letícia, Ana Favero, Simone, Angela e Bettina, sou muito grata pela amizade, pelo carinho, pelo exemplo, pela ajuda intelectual e técnica, pelas agradáveis conversas e boas risadas.

A todos os colegas do Departamento de Farmacologia, sou grata por me ajudarem sempre que necessário, pela amizade, pelas conversas e pelo bom convívio.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia pela ajuda prestada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1.1 Sepses	2
1.1.1 Breve histórico	2
1.1.2 Definição e epidemiologia	3
1.1.3 Fisiopatogenia da sepsis	5
1.2 Fisiologia cardíaca	7
1.2.1 Aspectos gerais	7
1.2.2 Fisiologia do músculo cardíaco	10
1.2.3 Contração cardíaca	12
1.2.4 Elementos regulatórios locais e sistêmicos	17
1.3 Disfunção cardíaca na sepsis	20
OBJETIVOS	27
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Animais	30
3.2 Procedimentos experimentais	30
3.2.1 Modelo de septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP) ...	30
3.2.2 Avaliação da letalidade do modelo de ligadura e perfuração do ceco em camundongos	30
3.2.3 Avaliação da função cardíaca	31
3.2.4 Coleta das amostras de sangue	33
3.2.5 Dosagem plasmática de nitrato e nitrito (NO _x)	34
3.3. Protocolos experimentais	35
3.3.1 Avaliação da atividade cardíaca ao longo da sepsis experimental em camundongos	35
3.3.2 Avaliação da reatividade cardíaca	37
3.3.3 Avaliação do efeito da infusão de L-NAME sobre os parâmetros cardíacos basais e sobre a reatividade à isoprenalina, de corações de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) .	38
3.3.4 Avaliação do efeito da infusão de L-arginina sobre os parâmetros cardíacos de corações de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	39
3.4 Análise estatística	39
3.5 Compostos e reagentes	39
RESULTADOS	41
4.1 Avaliação do índice de mortalidade dos animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco	42
4.2 Avaliação da função cardíaca	43
4.3 Avaliação da reatividade cardíaca	51
4.4 Níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO _x)	64
4.5 Caracterização do envolvimento do óxido nítrico na disfunção cardíaca tardia e sua influência na reatividade à isoprenalina	64

4.6 Efeito da infusão de L-arginina sobre parâmetros cardíacos basais de corações de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco	66
DISCUSSÃO	69
5.1 Indução da sepse pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco.....	70
5.2 Avaliação da função cardíaca por meio da metodologia de coração isolado e perfundido	71
5.3 Avaliação da reatividade cardíaca	77
5.4 Dosagem plasmática de nitrato e nitrito (NOx)	81
5.5 Caracterização do envolvimento do óxido nítrico na disfunção e na reatividade cardíaca	83
REFERÊNCIAS	85

LISTA DE ABREVIÇÕES

AD	-	Átrio direito
AE	-	Átrio esquerdo
ATP	-	Trifosfato de adenosina
AV	-	Atrioventricular
bpm	-	Batimentos por minuto
Ca ²⁺	-	Íons cálcio
cAMP	-	3',5'-adenosina monofosfato cíclico
Canais I _f	-	f, do inglês <i>funny</i> , significa engraçados. Canais permeáveis aos íons Na ⁺ e K ⁺
CLP	-	Ligadura e perfuração do ceco
DI	-	Disco intercalar
EPM	-	Erro padrão da média
IL-1	-	Interleucina 1
IL-6	-	Interleucina 6
IRAK	-	Receptor de IL-1 associado à quinase
K ⁺	-	Íons potássio
L-NAME	-	L-nitro-arginina-metil-éster
LPS	-	Lipopolissacarídeo bacteriano
LTA	-	Ácido lipoteicóico
MODS	-	Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
mV	-	Milivolt
n	-	Número
N	-	Núcleo
NF-κB	-	Fator nuclear kappa B
NO	-	Óxido nítrico
NOD	-	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (do inglês, <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>)
Nodo AV	-	Nodo atrioventricular
Nodo SA	-	Nodo sinoatrial
NOS-1	-	Óxido nítrico sintase-1 ou neuronal
NOS-2	-	Óxido nítrico sintase-2 ou induzida
NOS-3	-	Óxido nítrico sintase-3 ou endotelial
PAF	-	Fator de ativação plaquetária
PBS	-	Salina tamponada com fosfato
Proteína Gs	-	Proteína G estimulatória
Proteína Gi	-	Proteína G inibitória
RS	-	Reticulo sarcoplasmático
SA	-	Sinoatrial

s.c.	-	Subcutâneo
SIRS	-	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF- α	-	Fator de necrose tumoral α
UTI	-	Unidade de terapia intensiva
VD	-	Ventrículo direito
VE	-	Ventrículo esquerdo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Principais etapas do desenvolvimento cardíaco.....	9
Figura 2:	Anatomia cardíaca e representação direcional do fluxo sanguíneo.....	10
Figura 3:	Corte histológico longitudinal de músculo cardíaco...	12
Figura 4:	(A) Sistema de condução elétrica do coração. (B) O sinal elétrico que inicia a contração começa quando o nodo SA dispara um potencial de ação.....	14
Figura 5:	Ciclo cardíaco.....	15
Figura 6:	Processo de contração cardíaca do ponto de vista molecular.....	17
Figura 7:	Efeito da estimulação simpática e parassimpática sobre a atividade cardíaca.....	19
Figura 8:	Deiscência das <i>gap junctions</i> e junções aderentes nos corações sépticos.....	25
Figura 9:	Foto do sistema de coração isolado e perfundido a fluxo constante, baseado no modelo de Langendorff..	31
Figura 10:	Trecho de um registro típico obtido durante um experimento com coração isolado e perfundido de camundongo demonstrando os parâmetros avaliados.	34
Figura 11 A:	Fluxograma do protocolo experimental aplicado aos animais submetidos à CLP na determinação da atividade cardíaca na sepse.....	35
Figura 11 B:	Fluxograma do protocolo experimental aplicado aos animais do grupo controle na determinação da atividade cardíaca na sepse.....	36
Figura 11 C:	Fluxograma do protocolo experimental de perfusão e avaliação cardíaca.....	36
Figura 12:	Curva de sobrevivência de camundongos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	43
Figura 13:	Distribuição da tensão sistólica em cada um dos horários de avaliação da função cardíaca durante a sepse.....	44
Figura 14:	Tensão sistólica apresentada por corações de animais submetidos à CLP e avaliados 3 (Painel A), 6 (Painel B), 12 (Painel C) e 24 horas (Painel D) após o procedimento cirúrgico por meio da metodologia de coração isolado e perfundido.....	46
Figura 15:	Velocidade de contração (+dT/dt) apresentada por corações de animais submetidos à CLP e avaliados 3	

	(Painel A), 6 (Painel B), 12 (Painel C) e 24 horas (Painel D) após o procedimento cirúrgico por meio da metodologia de coração isolado e perfundido.....	48
Figura16:	Velocidade de relaxamento (-dT/dt) apresentada por corações de animais submetidos à CLP e avaliados 3 (Painel A), 6 (Painel B), 12 (Painel C) e 24 horas (Painel D) após o procedimento cirúrgico por meio da metodologia de coração isolado e perfundido.....	50
Figura17:	Frequência cardíaca apresentada por corações de animais submetidos à CLP e avaliados 3 (Painel A), 6 (Painel B), 12 (Painel C) e 24 horas (Painel D) após o procedimento cirúrgico por meio da metodologia de coração isolado e perfundido.....	51
Figura 18:	Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo subfuncional cujos animais foram submetidos à CLP três horas antes da avaliação.....	53
Figura 19:	Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo subfuncional cujos animais foram submetidos à CLP vinte e quatro horas antes da avaliação.....	55
Figura 20:	Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo normofuncional cujos animais foram submetidos à CLP três horas antes da avaliação.....	57
Figura 21:	Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo normofuncional cujos animais foram submetidos à CLP vinte e quatro horas antes da avaliação.....	59
Figura 22:	Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo suprafuncional cujos animais foram submetidos à CLP três horas antes da avaliação.....	61
Figura 23:	Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo suprafuncional cujos animais foram submetidos à CLP vinte e quatro horas antes da avaliação.....	63
Figura 24:	Concentração plasmática de NOx de camundongos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	64
Figura 25:	Efeito do L-NAME em parâmetros cardíacos basais	

	e na reatividade à isoprenalina.....	66
Figura 26:	Efeito da infusão de L-arginina sobre parâmetros cardíacos basais.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definição de SIRS, sepse, sepse grave, choque séptico e MODS.....	4
Tabela 2: Composição da solução de Krebs-Ringer.....	32

Resumo

BÓF, E. R. “Disfunção cardíaca na sepse experimental avaliada em coração isolado e perfundido de camundongo”. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), quando associada a uma infecção pode evoluir para sepse e choque séptico, que são importantes causas de morte nas UTIs. Em geral, a morte é causada por um colapso cardiovascular e hipotensão refratária, que aparecem logo no início da sepse. A disfunção vascular é mais estudada e compreendida que a disfunção cardíaca, contudo a última é reconhecida como um importante mediador da disfunção de múltiplos órgãos na sepse. O objetivo do presente trabalho foi caracterizar a disfunção cardíaca na sepse experimental induzida pela ligadura e perfuração do ceco (CLP) em camundongos, utilizando a metodologia de coração isolado e perfundido (preparação de Langendorff), e também, avaliar a participação do óxido nítrico nesse processo. Os parâmetros cardíacos avaliados foram: Tensão sistólica e diastólica, $+dT/dt$ (velocidade de contração), $-dT/dt$ (velocidade de relaxamento), AUC (área sob a curva), pressão de perfusão das coronárias e frequência cardíaca. Observamos que durante a sepse severa (índice de mortalidade de 100% quarenta e oito horas após a CLP) o perfil de atividade apresentado pelos corações sépticos, apesar de variado, mostra que a sepse causa importantes alterações na funcionalidade cardíaca. O parâmetro tensão sistólica, três horas após os animais serem submetidos à CLP, mostrou que 38% dos corações apresentaram valores superiores aos apresentados pelos corações controle (e por isso denominados de suprafuncionais), 12% apresentaram valores inferiores (subfuncionais) e 50% apresentaram valores semelhantes aos apresentados pelos corações controle (normofuncionais). Seis horas após a CLP o subgrupo suprafuncional correspondeu a apenas 21% do total de corações avaliados, enquanto o subgrupo subfuncional correspondeu a 29%. Doze horas após a CLP o subgrupo normofuncional foi o mais numeroso, correspondendo a 77% do total de corações avaliados. Por fim, vinte e quatro horas após a CLP houve um aumento substancial no número de corações subfuncionais, representando 40% dos corações avaliados. Perfil semelhante foi encontrado em relação aos parâmetros velocidade de contração, velocidade de relaxamento e AUC. Quando estimulados com

isoprenalina para avaliação da capacidade contrátil e capacidade cronotrópica positiva, os corações dos animais submetidos à CLP vinte e quatro horas antes apresentaram importante redução no funcionamento das células auto-rítmicas do nodo sino-atrial, alterações no sistema de condução dos estímulos e ainda, o sistema contrátil destes corações encontrou-se parcialmente reduzido. Tanto os corações suprafuncionais avaliados três horas após a CLP quanto os corações suprafuncionais avaliados vinte e quatro horas após, apresentaram tensão sistólica superior à apresentada pelos corações controle em resposta à isoprenalina. A resposta cronotrópica e inotrópica positiva dos demais corações avaliados (subfuncionais três horas após a CLP, normofuncionais três e vinte e quatro horas após a CLP) foi semelhante à resposta apresentada pelos corações controle, sugerindo que a atividade beta-adrenérgica, atividade contrátil e o aspecto elétrico da frequência cardíaca estão preservados nestes corações. Observamos ainda que os níveis plasmáticos de NOx encontram-se elevados a partir de três horas após o procedimento cirúrgico, permanecendo assim até pelo menos quarenta e oito horas após a CLP. A infusão de um inibidor não-seletivo das enzimas NOS (L-NAME) não alterou a atividade basal dos corações controle e dos corações sépticos avaliados vinte e quatro horas após a CLP. Por outro lado, quando estimulados com isoprenalina, os corações controle infundidos com L-NAME apresentaram resposta cronotrópica e inotrópica positiva inferior à apresentada pelos corações controle que receberam apenas Krebs. Os corações sépticos que receberam L-NAME quando estimulados com isoprenalina apresentaram resposta concentração-dependente à isoprenalina, tanto no parâmetro tensão sistólica quanto no parâmetro frequência cardíaca, efeito este que não foi observado nos corações sépticos que receberam apenas Krebs. O substrato L-arginina não é um fator limitante para a produção de óxido nítrico, visto que não foram observadas diferenças em corações controle e corações sépticos avaliados vinte e quatro horas após a CLP e que tiveram arginina adicionada à solução de perfusão. Assim, nosso trabalho mostra que ocorrem importantes alterações cardíacas durante a sepse, as quais acometem tanto a maquinaria contrátil quanto as células auto-rítmicas, tendo início logo nas primeiras horas de instalação do quadro e perdurando até horários mais tardios. Demonstramos ainda, que o óxido nítrico parece estar envolvido nas alterações observadas.

Palavras-chave: Coração, sepse, óxido nítrico, isoprenalina, L-NAME, L-arginina.

Abstract

BÓF, E. R. “Cardiac dysfunction in experimental sepsis as assessed by the isolated and perfused mouse heart”. 2010. 96 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

The systemic inflammatory response syndrome (SIRS), when associated with an infection can progress to sepsis and septic shock, which are important causes of death in ICUs. Death is caused by a cardiovascular collapse and refractory hypotension, both appearing early in sepsis. The vascular dysfunction is mostly studied and better understood than the cardiac dysfunction, yet the latter is recognized as an important mediator of multiple organ dysfunction in sepsis. The aim of this study was to characterize cardiac dysfunction in experimental sepsis induced by ligation and perforation of the cecum (CLP) in mice, using the methodology of the isolated and perfused heart (Langendorff preparation), and also to evaluate the involvement of nitric oxide in this process. The cardiac parameters studied were: systolic and diastolic tension, $+dT/dt$ (rate of contraction), $-dT/dt$ (rate of relaxation), AUC (area under the curve), diastolic coronary perfusion and heart rate. We found that during severe sepsis (mortality rate of 100% forty-eight hours after CLP) the activity profile displayed by septic hearts, though varied, shows that sepsis causes significant changes in heart function. In relation to the systolic pressure parameter, three hours after the animals have been subjected to CLP, it showed that 38% of hearts had higher values than those presented by the control hearts (and therefore termed suprafunctional), 12% had lower values (sub-functional) and 50% had values similar to those presented by the control hearts (normofunctional). Six hours after CLP the suprafunctional subgroup amounted to only 21% of hearts evaluated, while the sub-functional subgroup represented 29% of the hearts. Twelve hours after the CLP surgery, the normofunctional subgroup was the most numerous, accounting for 77% of hearts studied. Finally, twenty-four hours after CLP there was a substantial increase in the number of sub-functional hearts, representing 40% of hearts studied. A similar profile was found for the parameters speed of contraction, speed of relaxation and AUC. When stimulated with isoprenaline for evaluation of the contractile capacity and chronotropism, the hearts of animals subjected to CLP twenty-four hours before had a significant reduction in the function of the self-rhythmic cells of the sino-atrial node, presenting changes in the

conduction system and partial reduction of the contractile system of these hearts. Suprafunctional hearts assessed three hours as well as twenty-four hours after CLP presented higher systolic tension when compared to control hearts in response to isoprenaline. The chronotropic and inotropic responses of other groups (subfunctional three hours after CLP and normofunctional three and twenty-four hours) were similar to the response of control hearts, suggesting that beta-adrenergic activity, contractile activity and the electric aspect of the heart rate were preserved in these hearts. We also observed that plasma levels of NO_x were elevated from three hours after surgery and remained so until at least forty-eight hours after. The infusion of a non-selective inhibitor of NOS enzymes (L-NAME) did not alter the basal activity of control and septic hearts evaluated twenty-four hours after CLP. Moreover, when stimulated with isoprenaline, the control hearts infused with L-NAME showed reduced inotropic and chronotropic responses when compared to control hearts that received only Krebs. The septic hearts receiving L-NAME and stimulated with isoprenaline showed a concentration-dependent parameter in both systolic pressure and heart rate and this effect was not observed in septic hearts receiving only Krebs. The substrate L-arginine is a limiting factor for NO production, but no differences were observed in control and septic hearts supplemented with arginine 24 after CLP. Thus, our study shows that significant cardiac abnormalities occur during sepsis, which affect both the contractile machinery and the auto-rhythmic cells, starting in the first few hours and lasting until later hour of sepsis. We also demonstrated that nitric oxide appears to be involved in the observed changes.

Key-words: Heart, sepsis, nitric oxide, isoprenaline, L-NAME, L-arginine.

INTRODUÇÃO

1.1 Sepses

1.1.1 Breve histórico

Há muitos anos, as doenças infecciosas são a principal causa de morte nos seres humanos. Exemplo disso são as inúmeras citações acerca do tema em manuscritos de Homero, Hipócrates, Galeno, entre outros escritores, filósofos e pesquisadores. Ainda podemos citar como exemplo, a morte de cerca de um terço de toda a população dos continentes Europeu e Asiático no início do século XV, vítimas da peste bubônica (Funk, Parrillo *et al.*, 2009).

A palavra “sepsis” deriva do grego, e refere-se à decomposição animal, vegetal ou orgânica causada na presença de bactéria (Geroulanos e Douka, 2006). A primeira vez que esta palavra foi utilizada no contexto médico foi há mais de 2.700 anos. A partir daí, surgiram as primeiras descrições e teorias sobre a etiologia das doenças infecciosas, tendo início em 1546 com Hieronymus Fracastorius, que descreveu algumas formas de contágio (o que ficou conhecido posteriormente como “Teoria dos Germes”). Em 1684 Francisco Redi contestou a teoria da geração espontânea proposta por Galeno, mas, alguns anos mais tarde, os resultados experimentais de Redi foram refutados. Em 1674 Leeuwenhoek fez importantes descobertas quanto às doenças infecciosas, descrevendo e desenhando pela primeira vez o que chamou de “animálculos”, que se tratava de cocos, bacilos e espiroquetas (Hurlbert, ; Funk, Parrillo *et al.*, 2009).

Foi então, no século XIX que houve um crescimento exponencial nas descobertas relacionadas à origem e transmissão das doenças infecciosas. Ainda neste mesmo século, alguns cientistas contribuíram de forma decisiva com as descobertas sobre a origem da sepsis. Ignaz Semmelweis, por volta de 1841, relacionou a falta de medidas simples de higiene, por parte dos médicos, com altas taxas de mortalidade de mulheres no puerpério. O médico Joseph Lister, em torno de 1852, sugeriu a teoria de que os agentes infecciosos atingiam o corpo humano por meio de rupturas na pele. Ao mesmo tempo, Louis Pasteur demonstrava que o processo de putrefação requer organismos vivos e finalmente derrubou a teoria da geração espontânea na transmissão de doenças. Robert Koch, outro cientista extremamente importante nesse contexto, formulou sua famosa teoria relacionada à identificação de agentes infecciosos (Baron, Baron *et al.*, 2006; Funk, Parrillo *et al.*, 2009).

A partir dessas descobertas e com a aceitação da Teoria dos Germes por grande parte da comunidade médica, as atenções se voltaram para a erradicação dos agentes infecciosos. Paul Erlich foi o primeiro a sugerir a existência de substâncias capazes de matar esses

agentes, sendo que em 1929, Alexander Fleming publicou um trabalho demonstrando as propriedades antibacterianas de uma substância que ele chamou de “penicilina”, o primeiro antibiótico utilizado com sucesso no tratamento de infecções, como a sepse (Funk, Parrillo *et al.*, 2009).

Desde as primeiras descrições sobre doenças infecciosas, sempre houve controvérsias acerca do mecanismo causador das mortes provocadas por elas. Depois de muitos terem pesquisado sobre o tema, Richard Pfeiffer concluiu por meio de seus experimentos que há uma substância na parede celular de diferentes tipos bacterianos, que é liberada após a replicação ou morte celular e é responsável pelos efeitos tóxicos observados. Ele chamou essa substância de endotoxina, devido ao fato de se originar dentro das bactérias. Anos mais tarde essas toxinas foram relacionadas à febre observada durante o processo infeccioso (Beutler e Rietschel, 2003).

A partir daí foram sugeridos e identificados inúmeros sistemas e moléculas envolvidos nos processos infecciosos. Especificamente durante a sepse, comprovou-se a ocorrência de coagulação intravascular disseminada. Comprovou-se ainda que diferentes tipos celulares são capazes de liberar moléculas com grande variabilidade de atividades biológicas relacionadas ao sistema imune, denominadas citocinas. Finalmente, logo após a descoberta do papel das citocinas pró-inflamatórias na sepse, um mediador central dos seus efeitos no sistema vascular foi encontrado, o óxido nítrico (Funk, Parrillo *et al.*, 2009). Inúmeras outras descobertas foram feitas posteriormente e continuam acontecendo até hoje.

1.1.2 Definição e epidemiologia

Infecções são definidas como processos patológicos causados pela invasão de tecidos normalmente estéreis, fluidos ou cavidades corporais, por agentes patogênicos ou potencialmente patogênicos (Levy, Fink *et al.*, 2003). A sepse, por sua vez, é uma condição clínica caracterizada por infecção grave associada à resposta inflamatória sistêmica com possibilidade de evolução para quadros clínicos cujos sinais e sintomas diferem muito à medida que a doença evolui. Com a finalidade de facilitar a identificação da fase de evolução da doença nos pacientes e também, possibilitar a intervenção terapêutica adequada, em 1991 foi realizada uma Conferência de Consenso feita pelo *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*. Esta conferência estabeleceu critérios para a classificação da sepse e doenças similares (Tabela 1), (Bone, Balk *et al.*, 1992).

Tabela 1 - Definição de SIRS, sepse, sepse grave, choque séptico e MODS.

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): Conjunto de manifestações clínicas do organismo frente a agressões graves, que ocorre necessariamente na ausência de infecção. A presença de dois ou mais dos seguintes sintomas definem SIRS: temperatura > 38 °C ou < 36 °C; b) frequência cardíaca > 90 bpm; c) frequência respiratória > 20 movimentos/minuto; d) leucometria > 12.000/mm ³ ou < 4.000/mm ³ , ou ainda, presença de > 10% de bastonetes.
Sepse: Síndrome caracterizada pela presença de SIRS secundária a um processo infeccioso.
Sepse grave: Quadro de sepse associado à disfunção orgânica (as principais disfunções orgânicas são: cardiovascular, respiratória, renal, hematológica e do sistema nervoso central), hipoperfusão tecidual e hipotensão responsiva à hidratação vigorosa.
Choque séptico: Situação em que o paciente com quadro de sepse grave desenvolve hipotensão arterial e alteração perfusional, refratárias à reposição volêmica. A hipotensão persiste mesmo com a utilização de agentes vasopressores.
Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS): Presença de função anormal de três ou mais órgãos em pacientes críticos, no qual a homeostasia não pode ser mantida sem intervenção médica.

A sepse é a principal causa de morte em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) não-coronarianas, sendo que anualmente ocorrem cerca de 18 milhões de casos de sepse grave no mundo (Sales, 2006). Uma pesquisa realizada por Angus e colaboradores (2001), estimou nos Estados Unidos da América 751.000 casos de sepse grave por ano, o que corresponde a 3 casos a cada 1.000 habitantes, com índice de mortalidade de 40% em pacientes com sepse e de 50% em pacientes com choque séptico. Em um estudo epidemiológico europeu, Alberti e colaboradores (2002) avaliaram 14.364 pacientes admitidos em 28 diferentes UTIs, sendo que destes, 8.353 permaneceram por mais de vinte e quatro horas nesses centros. Do total de pacientes admitidos, 21% apresentaram algum tipo de infecção no momento da internação e 18,9% dos que permaneceram por mais de vinte e quatro horas nas UTIs contraíram infecção hospitalar. Os pesquisadores observaram ainda, que 52% das infecções registradas evoluíram para um quadro de sepse, 30% evoluíram para choque séptico e 18% delas não foram classificadas. O índice de mortalidade nos hospitais foi de 17% em pacientes não-infectados e de 54% em pacientes que apresentavam algum tipo de

infecção no momento da admissão na UTI ou que adquiriram infecção hospitalar.

No Brasil os dados são igualmente alarmantes. Um estudo epidemiológico recente demonstrou que a incidência de sepse, sepse grave e choque séptico é de respectivamente 61, 36 e 30 casos a cada 1.000 pacientes atendidos por dia nas UTIs dos hospitais avaliados. O índice de mortalidade é de 34% em pacientes com sepse; 47% em pacientes com sepse grave e 52% em pacientes com choque séptico. Os dados demonstram que a sepse é um importante problema de saúde pública, com altos índices de incidência e mortalidade (Silva, Pedro Mde *et al.*, 2004).

Acredita-se que os altos índices de incidência de sepse ocorram devido ao aumento da expectativa de vida, que aumenta consequentemente o número de pacientes idosos e com enfermidades graves, ao emprego descontrolado de antibióticos, resultando em maior número de bactérias resistentes, e ainda, a um aumento substancial no número de procedimentos invasivos e ao crescente número de pacientes imunodeprimidos (Rangel-Frausto, 2005).

As fontes mais comuns de infecção são de origem pulmonar, abdominal, urinária, cutânea e cateteres vasculares. Os microrganismos causadores são na grande maioria bactérias, embora uma parcela dos casos seja originada por infecções virais ou fúngicas. O diagnóstico microbiológico é feito em aproximadamente 50% dos casos, apontando as bactérias gram-negativas como responsáveis por 60% do total de infecções. O choque séptico é uma complicação em pelo menos 50-60% de bacteremias gram-negativas e de 5-10% de bacteremias gram-positivas ou causadas por fungos (Parrillo, Parker *et al.*, 1990; Angus, Linde-Zwirble *et al.*, 2001; Alberti, Brun-Buisson *et al.*, 2002).

1.1.3 Fisiopatogenia da sepse

A sepse é uma condição que resulta de uma resposta excessiva do hospedeiro à infecção. Os sinais clínicos incluem: febre, confusão mental, hipotensão transitória, oligúria e trombocitopenia. Embora muitos pacientes morram nos estágios iniciais da doença, em um grande número de casos o quadro evolui e é observada falência respiratória ou renal, anormalidades na coagulação e hipotensão profunda e não-responsiva o que leva muitos pacientes a apresentar falência de múltiplos órgãos (Cohen, 2002).

Muitos mecanismos estão envolvidos na patogênese da sepse e do choque séptico. Uma lista incompleta inclui liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, como é o caso das citocinas, que levam à

ativação de neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais; ativação de reflexos neuroendócrinos; ativação de sistemas de cascatas de proteínas plasmáticas, como o sistema complemento e os sistemas de coagulação e fibrinolítico; produção e liberação de mediadores lipídicos (como eicosanóides), fator de ativação de plaquetas e radicais de oxigênio e nitrogênio (Beishuizen, Vermes *et al.*, 1998). Os responsáveis pela ativação celular, bem como por desencadear a cascata de eventos plasmáticos são principalmente os componentes da parede celular dos microrganismos, como é o caso do ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanas, derivados de bactérias gram-positivas (exotoxinas); ou o lipopolissacarídeo (LPS), derivado de bactérias gram-negativas (endotoxinas) (Opal, 2007).

O principal mecanismo pelo qual o LPS é reconhecido pelas células é através da formação de um complexo com a proteína ligadora de LPS (LBP), sendo que este complexo é apresentado aos receptores TLR-4 (da família de receptores *Toll-like*). A sinalização intracelular depende da ligação do domínio intracelular do receptor *Toll-like* (TIR – do inglês, *Toll/IL-1 receptor homology domain*) ao receptor IRAK (do inglês, *IL-1 receptor-associated kinase*), um processo que é facilitado por duas proteínas adaptadoras, MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation protein 88*) e TIRAP (do inglês, *TIR domain containing adapter protein*). Em seguida ocorre ativação do TRAF-6 (do inglês, *TNF-receptor activated factor-6*), que por sua vez ativa proteínas como p38, JNK e IKK α/β , cujas ações convergem para a ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). O NF- κ B por sua vez, induz a transcrição de inúmeros genes, particularmente os relacionados à atividade pró-inflamatória, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF), NOS-2 (óxido nítrico sintase-2), entre outros (Jean-Baptiste, 2007). É importante lembrar que outras moléculas da parede celular também são capazes de reconhecer o LPS, como o receptor MSR (do inglês, *macrophage scavenger receptor*), canais iônicos e mais recentemente descritos, os receptores intracelulares NOD (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*) (Cohen, 2002).

Foram descritos onze subtipos de receptores da família *Toll-like* e seus ligantes específicos, incluindo componentes bacterianos, de fungos e de leveduras. Como citado acima, o receptor TLR-4 reconhece LPS, já o receptor TLR-2 é predominantemente responsável por reconhecer estruturas encontradas na parede de bactérias gram-positivas (ácido lipoteicóico e peptidoglicanas). Essas estruturas quando reconhecidas pelos receptores TLR-2, através de um mecanismo semelhante ao

descrito para os receptores TLR-4, também desempenham atividade do tipo pró-inflamatória, embora menos proeminente do que a resposta provocada pelo LPS (Cohen, 2002).

Importantes alterações hemodinâmicas são observadas durante a sepse e contribuem sobremaneira para o agravamento do quadro. De forma geral, dois estágios cardiovasculares distintos são observados, a fase inicial (fase hiperdinâmica), que é caracterizada por aumento no débito cardíaco e baixa resistência vascular periférica; e a fase tardia (fase hipodinâmica), que é caracterizada por uma diminuição no desempenho cardíaco, com redução do débito cardíaco associado à hipotensão. Embora o organismo mobilize uma grande quantidade de agentes vasoconstritores e substâncias inotrópicas, estes não são capazes de compensar as alterações cardiovasculares (Assreuy, 2006).

A diminuição da resistência vascular periférica, resultado da perda do tônus vasomotor, tem como consequência a perda do controle da pressão arterial e a perda da regulação da distribuição do débito cardíaco. Na fase tardia, as alterações hemodinâmicas observadas levam ainda à disfunção microcirculatória com importantes consequências macro-hemodinâmicas, como o distúrbio no transporte de oxigênio e na utilização do mesmo pelos tecidos e a disfunção endotelial com formação de edema e infiltração de células inflamatórias. A resposta pressórica de pacientes sépticos à administração exógena de catecolaminas e outros vasoconstritores está significativamente reduzida, caracterizando o que é chamado de hiporresponsividade a vasoconstritores. As anormalidades hemodinâmicas e suas consequências são uma das maiores causas de mortalidade na sepse (Assreuy, 2006).

O tratamento utilizado para a sepse permanece essencialmente o mesmo há cerca de duas décadas, o que se deve principalmente às complexas interações que ocorrem entre os diferentes mediadores inflamatórios e às alterações hemodinâmicas. Consiste basicamente no combate a infecção, através do uso de antibióticos, e no suporte aos sistemas orgânicos através da reposição de fluidos, além da utilização de agentes inotrópicos e vasopressores na tentativa de manter a pressão arterial e o débito cardíaco (Hollenberg, Ahrens *et al.*, 2004).

1.2 Fisiologia cardíaca

1.2.1 Aspectos gerais

O coração é um órgão muscular que se localiza no centro da cavidade torácica, na porção ventral, entre os dois pulmões. O ápice do coração aponta para a extremidade inferior esquerda do corpo, enquanto

a base situa-se logo atrás do osso esterno. O coração é composto basicamente por músculo cardíaco, também chamado miocárdio, recoberto por finas camadas tanto na porção interna quanto na porção externa por epitélio e tecido conjuntivo. O coração é envolto por um saco membranoso denominado pericárdio (Silverthorn, 2003).

Entre os órgãos internos o coração é o primeiro a ser formado e a funcionar no embrião, sendo que todos os eventos subsequentes na vida do organismo dependem do funcionamento deste órgão. Nos vertebrados, o coração deriva de uma subpopulação de células precursoras mesodérmicas, sendo o início do processo de diferenciação celular dependente da sinalização de tecidos adjacentes. Ainda, durante o processo de diferenciação celular, ocorre a expressão de uma série de fatores de transcrição que iniciam a expressão de genes cardíacos responsáveis por eventos morfogenéticos envolvidos na formação de um coração multicavitário. Estudos sugerem que cada uma das quatro câmaras são formadas por programas genéticos distintos (Cripps e Olson, 2002; Olson, 2004).

Inicialmente, no embrião, os miócitos cardíacos são organizados em um tubo linear simétrico que em determinada fase do desenvolvimento sofre uma movimentação denominada *looping* (giro para trás sobre si mesmo) em resposta a um tipo específico de sinalização que a partir daí estabelece assimetria entre os eixos direito e esquerdo. Essa movimentação proporciona ainda, o posicionamento dos átrios acima dos ventrículos e o posicionamento das artérias na parte superior dos ventrículos. Ao longo do desenvolvimento as câmaras cardíacas vão sendo delimitadas, visto que, devido ao fato do átrio e ventrículo direitos apresentarem funções distintas do átrio e ventrículo esquerdos, estes são separados pelos septos interatrial e interventricular (Figura 1) (Olson, 2004).

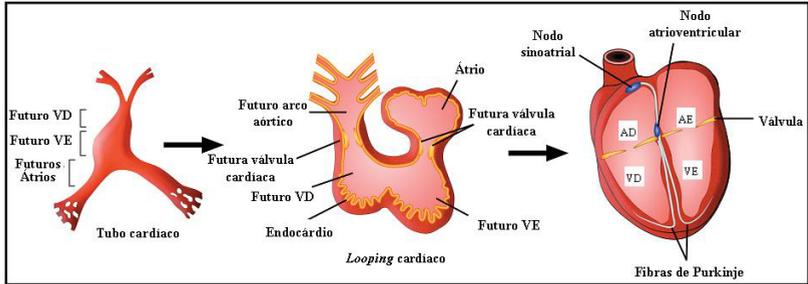


Figura 1 - Principais etapas do desenvolvimento cardíaco. O tubo cardíaco após o *looping* dá origem aos átrios e ventrículos. Componentes do sistema de condução são mostrados no coração já com as quatro câmaras delimitadas. Modificado de Olson (2004).

O sangue flui das veias cavas e pulmonares para os átrios direito e esquerdo, respectivamente. Dos átrios o sangue passa pelas válvulas atrioventriculares (AV) (tricúspide/lado direito; bicúspide/lado esquerdo) para os ventrículos, sendo que, do ventrículo direito o sangue deixa o coração pelo tronco pulmonar, chegando aos pulmões para que ocorram as trocas gasosas; e do ventrículo esquerdo, o sangue deixa o coração pela aorta para oxigenar e nutrir os tecidos, inclusive o músculo cardíaco, por meio das artérias e veias coronárias. Ao deixar os ventrículos, antes de atingir as artérias, o sangue passa pelas válvulas semilunares, também chamadas válvula aórtica e válvula pulmonar, devido as suas localizações (Figura 2). As válvulas têm como principal função, evitar o refluxo sanguíneo, seja para os átrios ou para os ventrículos (Silverthorn, 2003; Guyton, 2006).

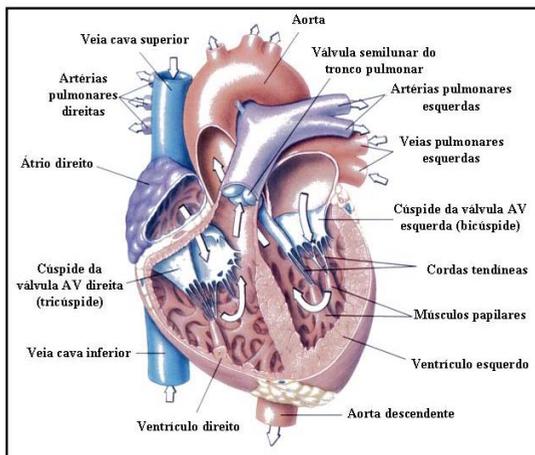


Figura 2 - Anatomia cardíaca e representação direcional do fluxo sanguíneo. As setas brancas indicam o caminho percorrido pelo sangue. As válvulas tricúspide e bicúspide podem ser observadas, bem como as estruturas responsáveis por conectá-las aos ventrículos, cordas tendíneas e músculos papilares. Figura extraída de Silverthorn (2003).

1.2.2 Fisiologia do músculo cardíaco

A maior parte das células que compõem o músculo cardíaco apresenta atividade contrátil, no entanto cerca de 1% do total de células deste músculo é especializada em gerar potenciais de ação espontaneamente, as chamadas células auto-rítmicas ou células do marca-passo. O nodo sinoatrial (SA), situado no átrio direito junto à entrada da veia cava, é o principal marca-passo cardíaco determinando a frequência dos batimentos, isso porque apresenta ritmo superior ao de outras células que também demonstram capacidade de marca-passo, como é o caso do nodo atrioventricular (AV), feixe de His e fibras de Purkinje (Kaupp e Seifert, 2001).

Em relação às células contráteis, o músculo cardíaco apresenta características tanto de músculo liso quanto de músculo esquelético. As fibras musculares contráteis são estriadas e possuem estrutura organizada em sarcômeros. São fibras relativamente curtas (quando comparadas com as fibras do músculo esquelético), possuindo um único núcleo, disposto centralmente (Figura 3). Cerca de um terço do volume dessas células é ocupado por mitocôndrias, reflexo da alta demanda de energia. As células auto-rítmicas por sua vez, apresentam diferenças em relação às células contráteis. Tratam-se de células menores, com poucas

fibras contráteis e por não possuírem sarcômeros organizados não auxiliam na contração cardíaca (Silverthorn, 2003; Kleber e Rudy, 2004).

As células que constituem as fibras contráteis conectam-se em série e em paralelo umas com as outras por meio de discos intercalares, que são importantes mantenedores da integridade estrutural do miocárdio e responsáveis pelo acoplamento mecânico e eletroquímico dos miócitos (Figura 3). Esses discos apresentam vários complexos juncionais: junções aderentes, desmossomos e junções comunicantes (*gap junctions*). As junções aderentes, constituídas principalmente pelas moléculas de caderina, promovem a ligação dos discos intercalares com o citoesqueleto de actina; já os desmossomos, compostos principalmente pela proteína desmoplauquina, fixam-se aos filamentos intermediários. Tanto as junções aderentes quanto os desmossomos estão associados a um complexo de proteínas (cateninas) que regulam a adesão célula-célula, bem como regulam a estrutura dos discos intercalares capacitando a transmissão da força contrátil através da membrana plasmática. As *gap junctions* por sua vez, são canais formados pela interação entre dois hemicanais ou conexons, presentes nas membranas de células opostas. Cada conexon é formado pela associação de seis subunidades polipeptídicas idênticas, as conexinas, que se estendem através das membranas celulares estabelecendo a comunicação intercelular via estímulos elétricos e transferência de íons entre as células miocárdicas vizinhas (Severs, 2000; Gutstein, Liu *et al.*, 2003). Desta forma, as ondas de despolarização se espalham rapidamente por toda a extensão muscular cardíaca, permitindo uma contração quase simultânea de todas as células, o que confere ao músculo cardíaco a característica de sincício (Kleber e Rudy, 2004).

Além das junções intercelulares, a interação entre proteínas ancoradoras do arcabouço celular, tais como distrofina e proteínas do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, com a matriz extracelular desempenham papel importante tanto na integridade estrutural quanto funcional do miocárdio e na transmissão da força contrátil (Katsumi, Orr *et al.*, 2004).

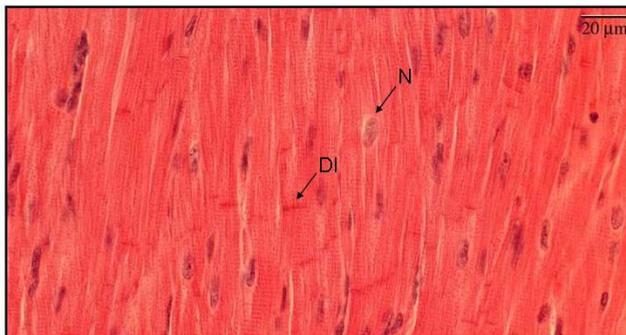


Figura 3 - Corte histológico longitudinal de músculo cardíaco. As setas indicam núcleo (N) e disco intercalar (DI). Aumento de 400 X. Modificado de Eroschenko (2004).

A integridade do sarcolema é mantida pela presença de proteínas estruturais do citoesqueleto celular: tubulina, desmina e actina; proteínas do sistema contrátil: actina, miosina, troponina e tropomiosina; e as proteínas do esqueleto sarcomérico: titina e α -actinina. Há ainda três grupos de proteínas estruturais que contribuem para a forma celular, resistência mecânica e transdução de sinal nos cardiomiócitos e permitem a interação entre o citoesqueleto intracelular, o sistema contrátil e a matriz extracelular conferindo estabilidade estrutural à membrana dos cardiomiócitos: a distrofina e o complexo de glicoproteínas associadas a ela; a ligação talina-vinculina-integrina e a ligação espectrina-face interna da membrana (Kostin, Scholz *et al.*, 1998; Hein, Kostin *et al.*, 2000; Kostin, Hein *et al.*, 2000; Lapidos, Kakkar *et al.*, 2004).

1.2.3 Contração cardíaca

O processo de contração cardíaca tem início quando uma célula auto-rítmica do nodo SA dispara um potencial de ação. Do nodo SA o potencial de ação segue por um sistema de condução especializado, que consiste de células auto-rítmicas não contráteis, que transmitem o potencial de ação rapidamente para todo o coração. Esse sistema de condução faz com que o potencial de ação atinja inicialmente as vias internodais, as quais permitem a transmissão do sinal para todas as fibras musculares atriais em velocidade de aproximadamente 0.3 m/seg., passando em seguida para o nodo AV, localizado na parede posterior do átrio direito, imediatamente atrás da válvula tricúspide. Do nodo AV o potencial de ação atinge os ventrículos por meio dos feixes AV, se

deslocando em seguida através de fibras conhecidas como feixe de His, sendo por fim conduzido às fibras de Purkinje, que são fibras largas que se deslocam em direção ao ápice e se espalham entre as células contráteis a velocidade de 1.5 - 4.0 m/seg, permitindo assim a transmissão quase instantânea do potencial de ação para toda a massa muscular das câmaras ventriculares (Figura 4 A) (Anderson, Yanni *et al.*, 2009).

À medida que o potencial de ação se desloca pelas fibras atriais encontra o tecido fibroso atrioventricular, septo responsável por separar átrios e ventrículos. Esse septo impede que os sinais elétricos sejam conduzidos diretamente aos ventrículos, sendo o nodo AV a única via através da qual os potenciais de ação podem alcançar as fibras contráteis destas câmaras. Sendo assim, a contração é direcionada do ápice para a base, permitindo que o sangue seja conduzido para fora do coração por meio das artérias (localizadas na porção superior). O arranjo espiral do músculo ventricular contribui de forma significativa com esse processo. O nodo AV juntamente com os feixes AV apresenta também, a função de atrasar a transmissão dos potenciais de ação, permitindo que os átrios terminem sua contração antes que os ventrículos comecem a se contrair (Figura 4 B) (Mazgalev, Ho *et al.*, 2001; Silverthorn, 2003).

Embora a condução elétrica coordene a contração, é importante salientar que cada um dos dois tipos de células cardíacas apresenta potenciais de ação distintos, sendo que em ambos os casos os íons cálcio desempenham importante papel. No caso das células contráteis, esses íons são responsáveis por potenciais de ação sustentados em platô, aumentando o tempo de duração do potencial de ação do miocárdio em relação ao potencial de ação de células contráteis do músculo esquelético ou neurônios, apresentando papel benéfico ao coração. As células auto-rítmicas por sua vez, apresentam algumas particularidades, como por exemplo, potencial de membrana (potencial de marcapasso) instável e presença de canais iônicos diferentes dos canais encontrados em outras células excitáveis. Nas células auto-rítmicas os íons cálcio são os grandes responsáveis pelo processo de despolarização (Kaupp e Seifert, 2001; Roden, Balsler *et al.*, 2002).

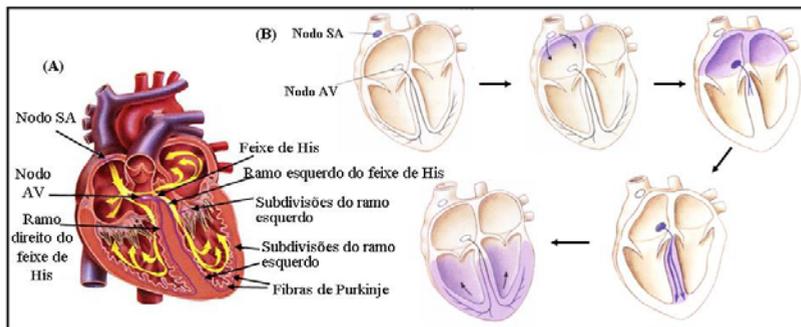


Figura 4 - (A) Sistema de condução elétrica do coração. (B) O sinal elétrico que inicia a contração começa quando o nodo SA dispara um potencial de ação. O sombreamento em lilás representa a despolarização. (A) modificado de Gordon (2000); (B) modificado de Silverthorn (2003).

O trabalho cardíaco mecânico, que ocorre devido ao trabalho cardíaco elétrico possui duas fases distintas: a diástole, período de tempo durante o qual o coração relaxa; e a sístole, período de tempo durante o qual o coração contrai. O conjunto de eventos que ocorre entre o início de um batimento cardíaco e o início do batimento cardíaco subsequente é denominado ciclo cardíaco (Guyton, 2006).

Este ciclo tem início em um breve momento durante o qual tanto átrios quanto ventrículos estão relaxados, logo após o término de uma contração ventricular. Neste momento o sangue vindo dos pulmões e demais órgãos periféricos enche os átrios, sendo que quando a pressão no interior dos átrios ultrapassa a pressão dentro dos ventrículos as válvulas AV se abrem, permitindo que o sangue flua de forma passiva para os ventrículos, aumentando o seu volume (Figura 5). Embora esta seja a forma mais eficiente de enchimento ventricular, os 20% de sangue necessários para encher os ventrículos completamente são impulsionados por meio da sístole atrial, dando origem ao que é chamado de volume diastólico final (Fukuta, 2009).

Quando a contração ventricular começa, as válvulas AV se fecham, visto que o sangue que agora está dentro dos ventrículos empurra a porção inferior dessas válvulas para cima. Neste momento a pressão dentro dos ventrículos não é suficientemente grande para promover a abertura das válvulas semilunares e, portanto, os ventrículos continuam a se contrair com a finalidade de aumentar a pressão dentro destas câmaras (contração ventricular isovolumétrica). Por fim, quando a pressão dentro dos ventrículos ultrapassa a pressão dentro das artérias as válvulas semilunares se abrem permitindo que o sangue seja ejetado

através das artérias. Os ventrículos não se esvaziam completamente a cada contração, o que resta de sangue nessas câmaras é chamado de volume sistólico final. Ao final de cada contração ventricular tem início o período de relaxamento destas câmaras, com redução da pressão no interior das mesmas. Quando a pressão dentro dos ventrículos apresenta-se menor do que a pressão dentro das artérias as válvulas semilunares se fecham (pressão retrógrada exercida pelo sangue). E quando a pressão dentro dos ventrículos cai a níveis inferiores da pressão encontrada nos átrios o ciclo se inicia novamente (Figura 5) (Silverthorn, 2003; Fukuta, 2009).

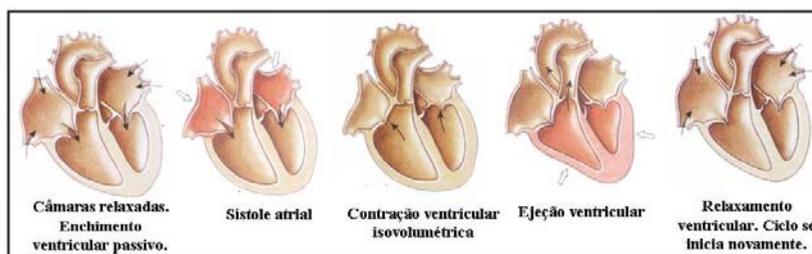


Figura 5 - Ciclo cardíaco. Modificado de Silverthorn (2003).

A contração cardíaca ocorre visto que durante o potencial de ação das células contráteis, na fase de despolarização, há a abertura de canais de cálcio voltagem-dependentes (principalmente do tipo L), encontrados na membrana destas células, permitindo que o cálcio do fluido extracelular penetre nas células por meio dos túbulos T, devido ao gradiente eletroquímico existente. Esses íons promovem a ativação de uma determinada via citosólica responsável por limitar o influxo de cálcio. No entanto, os íons que passaram para o meio intracelular contribuem com a formação do platô (anteriormente mencionado) e ainda, são suficientes para estimular a liberação dos íons cálcio que se encontram no retículo sarcoplasmático (RS), por meio da ativação dos receptores rianodínicos (liberação de cálcio induzida pelo cálcio) (Figura 6). A liberação do cálcio pelo RS também limita o influxo deste íon pelos canais encontrados na membrana celular, sendo o retículo sarcoplasmático responsável por fornecer cerca de 90% dos íons cálcio necessários para a contração cardíaca (Ferrier e Howlett, 2001; Bers, 2002).

Os íons cálcio que agora se encontram no citosol se difundem até os elementos contráteis onde se ligam aos miofilamentos da proteína troponina C, ativando a maquinaria contrátil, dando início ao processo de contração cardíaca (Figura 6). As fibras cardíacas são capazes de

gerar contrações graduadas, sendo que há duas formas principais de alterar a força de contração cardíaca: alterando o tempo de permanência dos íons cálcio no citosol e/ou alterando a sensibilidade dos filamentos contráteis ao cálcio. Essa sensibilidade é aumentada dinamicamente através da distensão das fibras musculares que resultam em maior estiramento do sarcômero e conseqüentemente maior interação entre os filamentos de actina e miosina, resultando no aumento da força de contração. Isso acontece, por exemplo, como um mecanismo autorregulatório do coração, que se ajusta a alterações na pré-carga, ou seja, no volume sanguíneo que retorna ao coração por meio da circulação venosa (lei de Frank-Starling), sendo que, quanto maior a força de contração maior será o volume de ejeção (Fukuda, Sasaki *et al.*, 2001; Bers, 2002).

O relaxamento muscular cardíaco por sua vez, depende da dissociação dos íons cálcio dos miofilamentos de troponina e ainda, do declínio da concentração deste íon no citosol. Foram descritas algumas vias de remoção do cálcio do citosol: i) através de uma enzima Ca^{2+} -ATPase responsável por transportar parte dos íons de volta ao RS (também conhecida como SERCA, enzima regulada por uma fosfolambam); ii) através da troca com íons sódio por meio de uma proteína de transporte Na^+ - Ca^{2+} encontrada na membrana das células contráteis; iii) por meio de uma enzima Ca^{2+} -ATPase, também encontrada na membrana celular; iv) parte do cálcio é removido pelas mitocôndrias e finalmente v) alguns íons se ligam à proteína regulatória calmodulina e também, a remoção pode ser feita via calmodulina quinase, que estimula o retorno dos íons ao RS (Bers, 2002) (Figura 6).

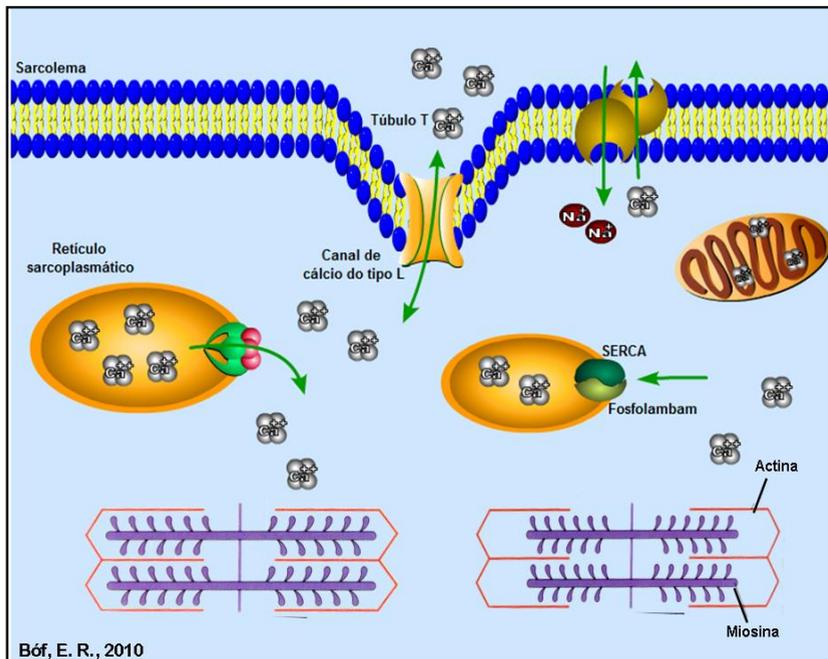


Figura 6 – Processo de contração cardíaca do ponto de vista molecular.

1.2.4 Elementos regulatórios locais e sistêmicos

A atividade cardíaca é regulada e sofre influência de diversos fatores, como é o caso do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático; hormônios; temperatura corporal; óxido nítrico, prostanoídes, endotelinas, etc (Guyton, 2006; Zardi, Zardi *et al.*, 2007).

O sistema parassimpático inerva principalmente os nodos SA e AV e de forma menos significativa a musculatura atrial e ventricular. Já o sistema simpático encontra-se distribuído de forma homogênea em todo o coração. Quando ocorre estimulação parassimpática a acetilcolina é liberada nas terminações vagais, resultando em dois principais efeitos cardíacos: redução da frequência de disparos de potenciais de ação pelas células auto-rítmicas do nodo SA, reduzindo consequentemente o número de batimentos cardíacos por minuto (efeito cronotrópico negativo) (Figura 7); e redução da excitabilidade dos feixes AV, atrasando ainda mais a transmissão dos impulsos elétricos que vão dos átrios para os ventrículos. Outro efeito que também pode ser observado é a redução da força de contração cardíaca (efeito inotrópico negativo) (Figura 7) (Herring, Danson *et al.*, 2002; Petrashevskaya, Koch *et al.*, 2002).

Os efeitos parassimpáticos são mediados por receptores muscarínicos do tipo M_2 , que atuam ao inibir a adenilato ciclase e, portanto, reduzindo o cAMP intracelular (Figura 7) promovendo a inibição de canais de cálcio e aumentando a condutância dos íons potássio, evento este que permite o rápido extravasamento dos íons potássio para fora das fibras de condução levando à hiperpolarização das mesmas, reduzindo conseqüentemente a excitabilidade das células. Geralmente o controle basal da frequência cardíaca é feito por este ramo do sistema nervoso autônomo (Rang, 2001; Herring, Danson *et al.*, 2002).

A estimulação simpática, mediada pelo hormônio noradrenalina, gera essencialmente efeitos opostos aos descritos quando o coração está sob estimulação parassimpática, ou seja, promove aumento da frequência de despolarização das células auto-rítmicas do nodo SA, aumentando assim, a frequência cardíaca (efeito cronotrópico positivo) (Figura 7), a velocidade de condução dos impulsos elétricos bem como o grau de excitabilidade celular, aumentando consideravelmente a força de contração de toda a musculatura cardíaca, tanto atrial quanto ventricular (efeito inotrópico positivo) (Figura 7). Efeitos semelhantes são observados quando o hormônio adrenalina, liberado pela medula supra-renal, atua sobre as células cardíacas (Petrashevskaya, Koch *et al.*, 2002).

Os efeitos simpáticos no coração são mediados por receptores do tipo beta-adrenérgicos (β_1), resultando em ativação da enzima adenilato ciclase e aumento da conversão de ATP em cAMP, produto este que ativa proteínas quinase A (Rang, 2001) (Figura 7). Essa quinase fosforila inúmeras proteínas, entre elas a proteína fosfolambam, responsável pelo aumento da disponibilidade dos íons cálcio no retículo sarcoplasmático; canais de cálcio do tipo L, aumentando a probabilidade de abertura dos mesmos; receptores rianodínicos e proteína troponina I (Li, Desantiago *et al.*, 2000; Bers, 2002). Acredita-se que os efeitos produzidos pela ativação simpática resultem ainda, do aumento da permeabilidade da membrana das fibras aos íons sódio, aumentando o influxo desse íon para o interior das células cardíacas (Petrashevskaya, Koch *et al.*, 2002).

A estimulação simpática é responsável também por acelerar o relaxamento cardíaco (efeito lusitrópico) (Figura 7), acelerando o declínio dos níveis citosólicos de cálcio. Esses efeitos são mediados pela fosforilação da proteína troponina I e da fosfolambam, responsáveis respectivamente pela dissociação dos íons cálcio dos miofilamentos de troponina C; e pelo aumento da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase no retículo sarcoplasmático, permitindo que mais cálcio se torne disponível para a liberação de cálcio induzida por cálcio (Bers, 2002).

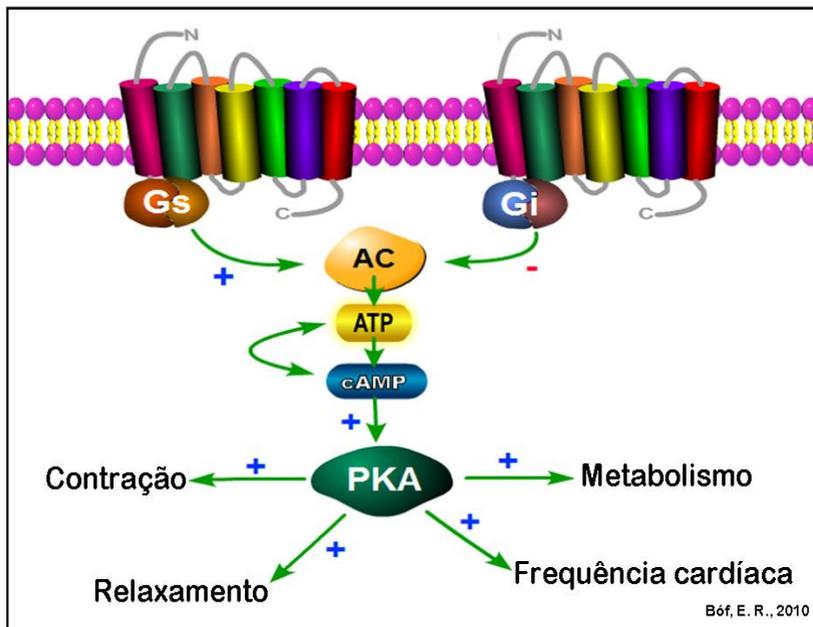


Figura 7 – Efeito da estimulação simpática e parassimpática sobre a atividade cardíaca.

A descoberta de que as três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS-1, NOS-2 e NOS-3) são expressas nos cardiomiócitos instigou questionamentos acerca do papel fisiológico do NO na regulação da função cardíaca (Massion, Feron *et al.*, 2003). O NO é sintetizado pelas NOS através da conversão da L-arginina e do oxigênio molecular em NO e L-citrulina. As enzimas NOS-1 e NOS-3 são denominadas enzimas constitutivas, ou seja, estão presentes em condições fisiológicas. Essa classe de isoformas é dependente de cálcio/calmodulina e libera NO em pequenas quantidades (na faixa de nanomolar) e por curtos períodos de tempo (segundos a minutos), em resposta à ativação de receptores ou por estímulos físicos. A NOS-2 por sua vez, é induzida por citocinas ou combinação destas com enzimas bacterianas tais como o LPS. Essa enzima requer concentração nanomolar de cálcio (100 nM, concentração equivalente ao nível basal intracelular) para seu funcionamento e por isso é classificada como sendo independente de cálcio. A NOS-2 produz e libera grandes quantidades de NO (na ordem de micromolar), durante longos períodos. Os efeitos do NO produzido por essa isoforma geralmente estão

associados aos efeitos citotóxicos e às ações que promovem efeitos patológicos (Fernandes, 2007).

Considerando a versatilidade bioquímica do NO; seus múltiplos alvos intracelulares e a diversidade de células que possuem a maquinaria necessária para sua produção no miocárdio, seus efeitos modulatórios no coração são sem dúvida complexos (Massion, Feron *et al.*, 2003). Cada uma das isoformas da NOS apresenta uma distribuição preferencial no miocárdio, dessa forma a NOS-1 está presente nas terminações simpáticas e parassimpáticas, assim como em neurônios intracardíacos. Nos cardiomiócitos a NOS-1 encontra-se no sarcolema do retículo sarcoplasmático. Baixos níveis dessa isoforma são detectados nos ventrículos direito e esquerdo. Em corações de ratos essa isoforma foi encontrada principalmente nos átrios. Está bem estabelecido que o NO produzido pela NOS-1 exerce efeito cronotrópico negativo através do aumento da liberação de acetilcolina (por vezes levando a bradicardia), além de inibir a transmissão adrenérgica, por meio da redução da liberação de noradrenalina. O NO produzido por essa isoforma apresenta também, efeito inotrópico negativo, por meio da inibição do influxo de cálcio; e efeito lusitrópico positivo tanto sob condições fisiológicas quanto sob estimulação adrenérgica (Schulz, Rassaf *et al.*, 2005).

Durante o 9º e o 14º dia do período embrionário pode-se observar a superexpressão da enzima NOS-2, sendo que esses níveis vão sendo reduzidos até desaparecerem completamente ao nascimento. Conforme já mencionado, em corações normais a NOS-2 está ausente, já em cardiomiopatias induzidas por LPS observa-se a expressão da NOS-2 principalmente no citosol, mas podendo também ser encontrada na região perinuclear; no complexo de Golgi; nas mitocôndrias; na membrana plasmática; ao longo das fibras contráteis; no endocárdio e endotélio arteriolar das coronárias (Schulz, Rassaf *et al.*, 2005).

Em condições fisiológicas a expressão da NOS-3 é abundante no coração, sendo claramente superior à expressão das demais isoformas. É predominantemente encontrada no átrio direito, nodo SA e ventrículo esquerdo (Brahmajothi e Campbell, 1999), localizada preferencialmente nas cavéolas (tanto na porção externa quanto no sarcolema dos túbulos T). Os efeitos cardíacos do NO produzido pela NOS-3 são: redução do trabalho cardíaco, e ainda, atenua a resposta inotrópica positiva normalmente produzida por agonistas beta-adrenérgicos; embora alguns trabalhos demonstrem exatamente o contrário (Schulz, Rassaf *et al.*, 2005).

1.3 Disfunção cardíaca na sepse

O sistema cardiovascular durante a sepse vem sendo estudado a mais de cinco décadas, tanto clínica quanto experimentalmente. Em 1951 Waisbren foi o primeiro a descrever alterações nesse sistema, secundárias à sepse. Ele reconheceu um estado hiperdinâmico em que os pacientes apresentavam pulso acelerado (taquisfigmia), febre, oligúria e hipotensão. Mais ainda, reconheceu um grupo menor de pacientes que apresentava redução da temperatura corporal, palidez e hipotensão com pulso reduzido (bradisfigmia), apresentando aparentemente uma condição clínica mais severa do que o primeiro grupo de pacientes (Merx e Weber, 2007).

A presença da disfunção cardiovascular na sepse está associada a um aumento significativo no índice de mortalidade, que neste caso é de 70-90% quando comparado ao índice de mortalidade de pacientes sépticos sem alterações nesse sistema, que é de aproximadamente 20% (Parrillo, Parker *et al.*, 1990). Foram identificados vários mediadores e sistemas envolvidos no desenvolvimento da disfunção cardíaca na sepse, no entanto as causas precisas ainda não foram estabelecidas (Merx e Weber, 2007).

Em 1981 Calvin e colaboradores demonstraram que a disfunção miocárdica observada em pacientes sépticos, mesmo que sob adequada reposição volêmica, promove a redução da fração de ejeção sanguínea e o aumento do volume diastólico final. Anos mais tarde, Parker e colaboradores ampliaram as observações nesse sentido, adicionando dois achados importantes: o primeiro é que, pacientes que sobrevivem ao choque séptico apresentam aumento do volume diastólico final e redução da fração de ejeção, enquanto os não-sobreviventes mantêm os volumes cardíacos normais; o segundo é que essas alterações são observadas apenas durante um determinado período de tempo, sendo posteriormente revertidas. Mais recentemente estudos ecocardiográficos demonstraram a ocorrência de alterações sistólicas e diastólicas nos ventrículos direito e esquerdo de pacientes sépticos (Calvin, Driedger *et al.*, 1981; Parker, Shelhamer *et al.*, 1984; Parker, McCarthy *et al.*, 1990). Estudos em humanos, juntamente com estudos experimentais realizados tanto em nível celular, coração isolado e modelos animais *in vivo*, apontam as alterações contráteis e na complacência cardíaca como as principais causas da disfunção miocárdica na sepse (Merx e Weber, 2007).

A disfunção cardíaca na sepse também foi analisada em relação ao seu valor prognóstico. Observou-se que no início do quadro de sepse, frequência cardíaca inferior a 106 batimentos por minuto (bpm) prediz efeitos favoráveis ao paciente. Ainda em relação à frequência cardíaca, observou-se que 24 horas após o início do processo valores

inferiores a 95 bpm ou redução da frequência cardíaca em aproximadamente 18 bpm são sugestivos de sobrevivência (Parker, Shelhamer *et al.*, 1987). Biomarcadores largamente utilizados para a identificação de isquemia miocárdica e falência cardíaca, como troponina tipo I e tipo T, foram usados com o mesmo intuito. Os estudos concluíram que elevados níveis deste marcador refletem o alto grau de severidade desta condição patológica, além de serem indicadores de disfunção miocárdica e de mau prognóstico (Lim, Qushmaq *et al.*, 2006).

De forma geral, os estudos indicam que as alterações cardíacas observadas durante a sepse são de origem multifatorial, contudo é importante identificar fatores individuais e mecanismos que contribuem para o aparecimento dessas anomalias. Como consequência disso, um grande número de mecanismos, vias e possíveis meios de interrupção da homeostase celular estão sendo investigados no miocárdio séptico (Merx e Weber, 2007).

Inicialmente acreditou-se que a isquemia miocárdica era a causa da redução do desempenho cardíaco, no entanto essa hipótese foi logo abandonada quando se tornou evidente que não ocorre isquemia global no coração de pacientes sépticos (Price, Anning *et al.*, 1999). Foi sugerida também, a existência de um fator depressor miocárdico produzido e/ou liberado durante a sepse, visto que a administração do soro de pacientes sépticos em ratos sadios provocou redução na extensão e na velocidade do encurtamento dos miócitos desses animais; efeito este que não foi observado quando da administração do soro de pacientes cuja atividade cardíaca já havia retornado a normalidade ou de pacientes acometidos por outras doenças (Parrillo, Burch *et al.*, 1985). Ampliando essas descobertas, o ultrafiltrado extraído de pacientes com sepse grave produziu a redução do trabalho ventricular esquerdo demonstrando efeitos citotóxicos e elevada concentração das interleucinas-1 e -8 e C3a. Desta forma, foram sugeridas como possíveis substâncias depressoras do miocárdio as citocinas (provavelmente uma mistura delas, agindo em conjunto umas com as outras); bem como prostanóides; endotelinas; desbalanço na produção ou no efeito do NO ou ainda, agressão oxidativa causada por espécies reativas de oxigênio (Merx e Weber, 2007).

Observou-se também, no miocárdio de ratos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP), o aumento da expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1) (Neviere, Guery *et al.*, 2000). Experimentos posteriores demonstraram que, o bloqueio da proliferação dessas moléculas em células vasculares previne a disfunção miocárdica e reduz o acúmulo de neutrófilos no tecido cardíaco, evento

este que normalmente é observado no coração de pacientes e animais sépticos. No entanto, comprovou-se que a depleção de neutrófilos no coração séptico não protege contra a cardiomiopatia, sugerindo que o potencial cardiotóxico do infiltrado neutrofilico no miocárdio não é tão importante nesse contexto (Neviere, Guery *et al.*, 2000; Raeburn, Calkins *et al.*, 2002).

Alguns trabalhos mostraram haver alterações estruturais no miocárdio séptico, tais como necrose miocitária e edema mitocondrial, ou ainda, prejuízo na contratilidade miocárdica na ausência de lesão tecidual (Piper, Li *et al.*, 1997; Zhou, Wang *et al.*, 1998). Contudo, a determinação dos mecanismos celulares diretamente dependentes da sepse/choque séptico que poderiam conduzir a mudanças estruturais miocárdicas tornou-se foco de poucos estudos. Sendo assim, Rossi e colaboradores (2007) desenvolveram um estudo focalizando predominantemente a maquinaria contrátil do miocárdio de pacientes sépticos, evidenciando quatro importantes achados. Primeiro, observou-se maior infiltração de macrófagos com característica de ativação e aumentada expressão de TNF- α , quando comparados com miocárdios de pessoas sãs ou de pacientes com pancreatite aguda necrosante (ambos utilizados como controle), o que segundo os autores, poderia favorecer a redução da função cardíaca nos corações sépticos. Segundo, os miocárdios sépticos apresentaram maior acúmulo intracelular de lipídeos quando comparados aos corações controle, refletindo provavelmente uma situação de lipotoxicidade celular, favorecendo também, o aparecimento de disfunção cardíaca. Terceiro, os miocárdios controle apresentaram expressão normal dos filamentos de actina e miosina, enquanto os miocárdios sépticos apresentaram focos dispersos de ruptura do aparelho contrátil de actina/miosina, representando lise de miofilamentos. Quarto, a expressão da enzima NOS-2 e nitrotirosina (marcador da produção de peroxinitrito) por cardiomiócitos e macrófagos intersticiais, foi marcadamente aumentada nos corações de pacientes sépticos em comparação com os corações controle. A expressão aumentada da NOS-2 e a evidência da presença significativa de peroxinitrito (através da imunorreação para nitrotirosina), sugerem que o estresse oxidativo possa ter um papel importante no rompimento das moléculas de actina/miosina nos corações de pacientes com sepse. Em suma, essas observações dão suporte à hipótese de que as alterações estruturais no miocárdio são responsáveis, pelo menos em parte, pela depressão cardíaca induzida pela sepse.

Em seguida foi realizado pelo mesmo grupo outro estudo, agora em roedores, com o objetivo de investigar as alterações morfológicas

que ocorrem no tecido cardíaco dos animais durante a sepse induzida pelo modelo de CLP. A avaliação feita vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico (CLP) mostrou claramente a presença de focos disseminados de miocitólise com ruptura das proteínas miofilamentares actina e miosina; edema intermiofibrilar; alterações mitocondriais caracterizadas por tumefação e diminuição da densidade da matriz; e formação de bandas de contratura e ruptura do sarcolema dos cardiomiócitos (Celes, Torres-Duenas *et al.*, 2007).

Nesse mesmo trabalho foi investigado também o remodelamento dos discos intercalares, através da análise qualitativa e quantitativa da expressão das proteínas conexina-43 (principal proteína constituinte das junções comunicantes) e N-caderina (principal proteína constituinte das junções aderentes) envolvidas com a formação dos discos intercalares, demonstrando diminuição significativa dos níveis destas proteínas nos corações dos animais sépticos (Celes, Torres-Duenas *et al.*, 2007). Baseados em experimentos *in vitro* com linhagem celular embriogênica de origem cardíaca (H9c2), Fernandez-Cobo e colaboradores (1999) sugerem que os níveis elevados de TNF- α detectados no soro de ratos tratados com LPS poderiam reduzir a atividade promotora do gene responsável pela conexina-43, reduzindo desta forma, os níveis desta proteína e contribuindo para a promoção da depressão cardíaca através da redução do acoplamento eletroquímico entre os cardiomiócitos.

Outra importante observação feita por Celes e colaboradores (2007) foi que aproximadamente 30 a 50% dos discos intercalares dos miócitos cardíacos dos animais submetidos à sepse grave apresentam-se parcialmente deiscientes ou separados. A deiscência das junções aderentes e das junções comunicantes estaria relacionada à perda das moléculas de conexina-43 e N-caderina, uma vez que estas proteínas são as mais abundantes e importantes componentes de tais estruturas (Kostetskii, Li *et al.*, 2005). A redução nos níveis de conexina-43 poderia causar alterações na organização estrutural das junções comunicantes devido à perda dos conexons, explicando a deiscência das junções comunicantes observada no estudo ultra-estrutural e, desse modo, perturbar a comunicação direta entre duas células miocárdicas adjacentes nos corações dos animais sépticos. Quanto à molécula de N-caderina, os níveis reduzidos dessa proteína no tecido cardíaco poderiam alterar estruturalmente o “zíper” de adesão das junções aderentes dos discos intercalares, podendo dessa forma explicar a deiscência observada no estudo ultra-estrutural dos discos intercalares (Figura 8).

Dessa forma, considerando que o sistema cardiovascular apresenta um importante papel no desenvolvimento da disfunção

orgânica durante a sepse (Marshall e Sweeney, 1990) e que as alterações cardíacas ainda não foram tão bem estudadas e compreendidas quanto as alterações vasculares, tornou-se interessante caracterizar as alterações cardíacas que ocorrem ao longo da sepse experimental induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco e avaliar a participação do óxido nítrico como agente depressor miocárdico.

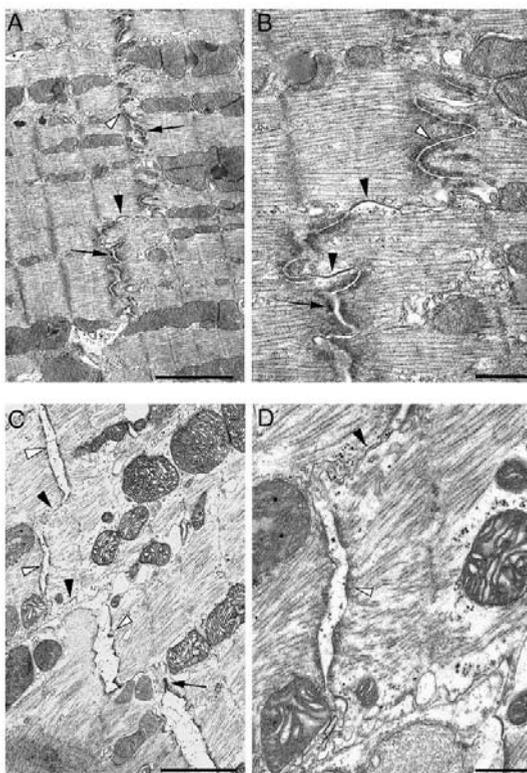


Figura 8 - Deiscência das *gap junctions* e junções aderentes nos corações sépticos. Os discos intercalares do miocárdio de animais falso-operados não apresentaram alterações estruturais (A, B). Os discos intercalares do miocárdio ventricular esquerdo dos animais sépticos se mostraram parcialmente deiscentes ou separados (C, D). As *gap junctions* estão indicadas pelas cabeças de seta pretas, as junções aderentes são indicadas pelas cabeças de seta brancas e os desmossomos são indicados pelas setas. Em A e C, a barra indica 2 μm , em B e D, a barra indica 0,5 μm . Modificado de Celes (2007).

OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Considerando que:

- I) Na sepse ocorrem importantes alterações cardiovasculares;
- II) O componente vascular encontra-se melhor caracterizado que o componente cardíaco;
- III) O coração tem papel crítico na manutenção do gradiente de pressão importante para a correta perfusão tecidual e;
- IV) A alta taxa de mortalidade do quadro séptico,

Este trabalho objetiva caracterizar a disfunção cardíaca na sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco em camundongos, utilizando a metodologia de coração isolado e perfundido, e ainda, avaliar a participação do óxido nítrico nesse processo.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade cardíaca ao longo da sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco em camundongos;
- Avaliar a reatividade cardíaca a um agonista beta-adrenérgico três e vinte e quatro horas após a indução da sepse em camundongos;
- Verificar a produção de óxido nítrico ao longo da sepse e o possível envolvimento deste nas alterações cardíacas observadas vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de ligadura e perfuração do ceco.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, com 3 meses de idade, pesando entre 30-40 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, acondicionados em gaiolas com livre acesso à ração e água, controle do ciclo claro e escuro (12/12 h) e da climatização do ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$), até atingirem a idade determinada para o estudo. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC), sob o protocolo número 23080.013796/2009-60 e estão de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde, dos Estados Unidos da América (NIH, USA).

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Modelo de septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A sepsé foi induzida nos animais através do modelo de ligadura e perfuração do ceco, conforme descrito por Benjamim e colaboradores (2000), adaptado às condições de nosso laboratório. Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina/tribromoetanol (25/375 mg/kg; i.p.), sendo em seguida submetidos a uma laparotomia com incisão de aproximadamente 1 cm, através da qual o ceco foi localizado e completamente exposto. Abaixo da válvula íleo-cecal foi feita uma ligadura não-obstrutiva e, a seguir, o ceco foi perfurado uma única vez de maneira transfixante com agulha 18G. Após a perfuração o ceco foi levemente pressionado para assegurar a saída do conteúdo cecal, e então recolocado na cavidade abdominal, sendo o músculo e a pele suturados em uma única camada. Imediatamente após a cirurgia os animais receberam 30 ml/kg de solução salina (s.c.) para reposição fluidica e foram mantidos em ambiente aquecido até a completa recuperação da anestesia (1-2 horas). Os animais controle não passaram por nenhum procedimento cirúrgico, ou seja, o grupo controle em todos os experimentos trata-se de animais *naïve*.

3.2.2 Avaliação da letalidade do modelo de ligadura e perfuração do ceco em camundongos

Os animais foram submetidos à cirurgia de CLP, conforme descrito no item 3.2.1, e foram observados em intervalos de no mínimo 3 e no máximo 12 horas, pelo período máximo de 3 dias, sendo a letalidade quantificada. Durante este período os animais foram mantidos em local com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de luz claro e escuro (12/12 h)

controlados automaticamente, com livre acesso à ração e água. Para fins de índice de letalidade não foram considerados os animais que morreram antes da completa recuperação da anestesia (Fernandes, 2006).

3.2.3 Avaliação da função cardíaca

Para avaliar a função cardíaca foi utilizada a preparação de coração isolado e perfundido de camundongo, a fluxo constante, baseando-se em adaptações do método originalmente descrito por Oscar Langendorff em 1897 (Skrzypiec-Spring, Grotthus *et al.*, 2007).

O aparato consiste em um tubo de vidro de aproximadamente 14 cm de diâmetro e 25 cm de altura, com uma serpentina interna (pela qual passa a solução de perfusão), envolta por uma jaqueta de água em circulação a temperatura de 37° C, necessária para o aquecimento da solução de perfusão. Na extremidade inferior deste tubo de vidro conecta-se a cânula contendo o coração. Imediatamente acima da extremidade inferior encontra-se uma abertura que permite a injeção de drogas e outra abertura na qual se conecta um transdutor de pressão (descrito a seguir). Há ainda, um reservatório contendo a solução de perfusão oxigenada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), que chega até o coração a um fluxo constante de 2 ml/min. mantido por uma bomba peristáltica (Castro, 2008) (Figura 9).

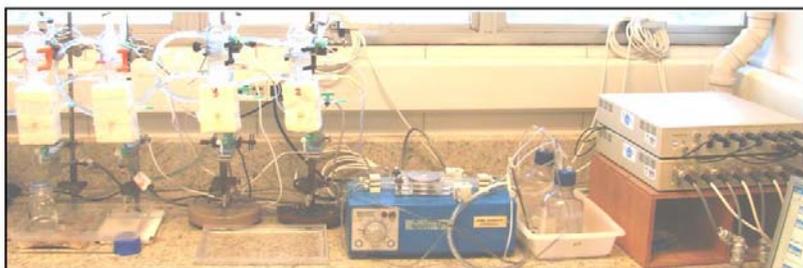


Figura 9 - Foto do sistema de coração isolado e perfundido a fluxo constante, baseado no modelo de Langendorff.

A composição da solução de perfusão (solução de Krebs-Ringer) está detalhada na tabela abaixo. Após diluição dos sais o pH sempre foi ajustado para 7.2 – 7.4 (Castro, Santos *et al.*, 2006):

Tabela 1 – Composição da solução de Krebs-Ringer

Composto	Concentração em mM
NaCl	118,4
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
CaCl ₂	2,5
Dextrose (glicose)	11,7
NaHCO ₃	26,5

Dez minutos antes de serem sacrificados por decapitação os animais receberam uma injeção intraperitoneal de heparina (200 UI), (Castro, Santos *et al.*, 2006), com o intuito de prevenir a coagulação sanguínea e consequentemente isquemia miocárdica durante o procedimento (Sill, Hammer *et al.*, 2009). Após a decapitação os animais foram exsanguinados e toracotomizados rapidamente, retirando-se o coração em bloco (juntamente com tecidos adjacentes). O coração e demais tecidos foram imediatamente colocados em um bêquer contendo Krebs-Ringer a temperatura de aproximadamente 4° C. O resfriamento tem por objetivo diminuir o metabolismo miocárdico e o consumo de oxigênio nos instantes anteriores a canulação do coração. Em seguida o material coletado foi transferido para uma placa de Petri, contendo Krebs-Ringer resfriado (\approx 4° C) e oxigenado, onde os restos de tecido pulmonar e vascular, traquéia e esôfago que acompanhavam o coração foram removidos e a aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação (tronco braquiocefálico) e fixada a uma agulha de aço inoxidável, tomando-se cuidado para não lesar a válvula aórtica. A agulha, já com o coração canulado via artéria aorta, foi conectada ao sistema de perfusão. Desta forma, a solução de perfusão percorria retrogradamente o coto aórtico remanescente, promovendo o fechamento da válvula aórtica, garantindo consequentemente que a solução perfundisse as artérias coronárias. Após perfundir as artérias coronárias, a solução de perfusão fluía para os capilares e então, para as veias coronárias, desembocando no átrio direito, no seio coronário. Do átrio direito a solução de perfusão fluía normalmente para o ventrículo direito, deixando o coração pelo tronco pulmonar. Uma pequena cânula (0,45 x 5,5 mm) foi introduzida no coração com o intuito de evitar o acúmulo da solução de perfusão nas câmaras com consequente perda de

funções (Skrzypiec-Spring, Grotthus *et al.*, 2007; Castro, 2008; Sill, Hammer *et al.*, 2009).

Um transdutor de força (Modelo FT -03; Grass Instrument Co., West Warwick, RI, USA) foi conectado ao ápice do coração para o registro das tensões sistólica e diastólica (em gramas). Por meio desse transdutor, no início do experimento, o coração foi submetido a uma tensão inicial (tensão basal) de 0,5 g, sendo esta ajustada durante todo o período de estabilização, porém não sofrendo intervenção alguma durante o período de registro (Castro, 2008). Para o registro da pressão de perfusão das coronárias (em mm Hg) foi utilizado um transdutor de pressão (Mikro-Tip[®], Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, USA), o qual foi acoplado ao sistema de perfusão através de uma abertura localizada imediatamente acima da extremidade inferior do tubo de vidro, onde se encontrava a cânula com o coração. A aquisição dos dados foi realizada por um sistema de conversão analógico-digital e enviados a um amplificador (Powerlab 8/30, AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Austrália), sendo em seguida registrados em um computador (sistema operacional Windows XP[®], Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração (Chart 5[®]) do fabricante. A frequência cardíaca (em batimentos por minuto); as derivadas da tensão: velocidade de contração (+dT/dt, em g/s) e velocidade de relaxamento (-dT/dt, em g/s); e a área sob a curva (em g.s – representando, aproximadamente, o trabalho cardíaco), foram calculados a partir da onda de tensão sistólica (Castro, 2008). Os parâmetros avaliados estão demonstrados na Figura 10.

3.2.4 Coleta das amostras de sangue

Inicialmente os animais receberam uma injeção intraperitoneal contendo uma mistura de anestésicos: cetamina (25 mg/kg) e tribromoetanol (375 mg/kg). Após completa anestesia os animais foram submetidos à abertura da cavidade torácica e aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado por punção cardíaca em tubo contendo heparina (5 UI/ml de sangue). O sangue coletado foi centrifugado por 20 minutos a 2.500 g para separação do plasma. O plasma coletado foi imediatamente congelado e armazenado no freezer -80° C até o momento da análise (Heckert, 2008).

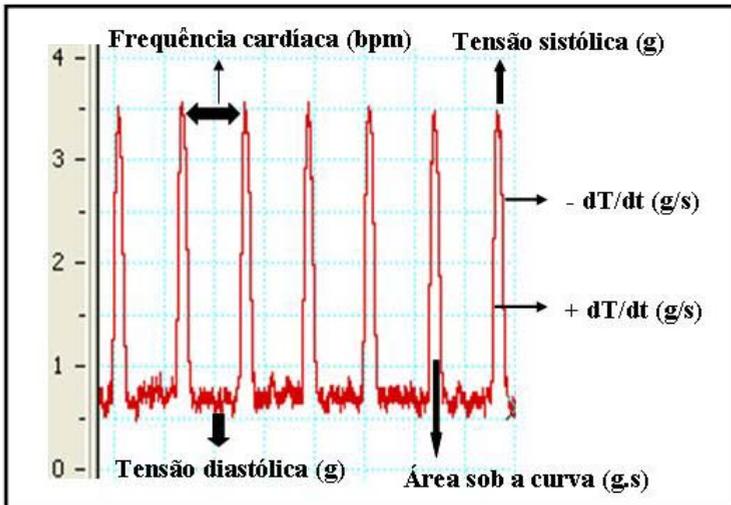


Figura 10 - Trecho de um registro típico obtido durante um experimento com coração isolado e perfundido de camundongo demonstrando os parâmetros avaliados.

3.2.5 Dosagem plasmática de nitrato e nitrito (NO_x)

A determinação da concentração plasmática de NO_x foi realizada através da redução enzimática de nitrato para nitrito pela enzima nitrato redutase, conforme descrito detalhadamente por Granger e colaboradores (1990). Os níveis de NO foram quantificados mensurando-se a soma das concentrações de nitrato + nitrito, utilizando o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q), que após a conversão enzimática do nitrato a nitrito, produz coloração lilás. Para o ensaio, as amostras de plasma foram diluídas 1:1 com água Milli-Q e desproteinizadas pela adição de sulfato de zinco (2%). Para a conversão do nitrato à nitrito, as amostras foram incubadas a 37° C durante 2 horas, na presença da enzima nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (para a remoção das bactérias) e 100 μL do sobrenadante foram misturados com o mesmo volume de reagente de Griess em placas de 96 poços para leitura em 540 nm em um leitor de microplacas (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). Curvas-padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 μM) foram realizadas simultaneamente. Como nestas condições a conversão de nitrato para nitrito foi sempre maior que 90%, não foram realizadas

correções dos resultados. Finalmente, por meio de regressão linear, os valores foram expressos como μM de NO_x (nitrato + nitrito).

3.3. Protocolos experimentais

3.3.1 Avaliação da atividade cardíaca ao longo da sepse experimental em camundongos

Três, seis, doze e vinte e quatro horas após a indução de sepse pelo modelo de CLP os animais foram heparinizados, sacrificados e tiveram seus corações coletados e canulados conforme descrito detalhadamente no item 3.2.3 (Figura 11 A). Os corações conectados ao sistema de perfusão passaram inicialmente por um período de estabilização de 30 minutos, necessário para o coração restaurar sua função e restabelecer o ritmo (Sill, Hammer *et al.*, 2009), seguindo-se o período de registro, que compreende o período onde foi feita a avaliação dos parâmetros cardíacos já mencionados a cada 5 minutos, durante 30 minutos (Figura 11 C). Os animais controle não passaram pelo procedimento cirúrgico de CLP, no entanto, os demais procedimentos foram os mesmos adotados para os animais que passaram por esta cirurgia (Figura 11 B).

ANIMAIS SUBMETIDOS AO CLP (GRUPOS CLP)

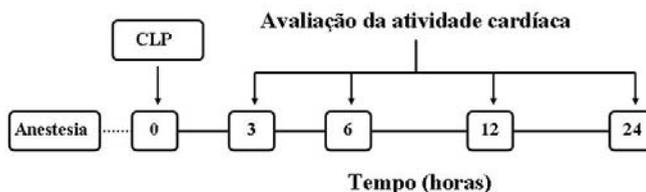


Figura 11 A - Fluxograma do protocolo experimental aplicado aos animais submetidos à CLP na determinação da atividade cardíaca na sepse.

GRUPO CONTROLE

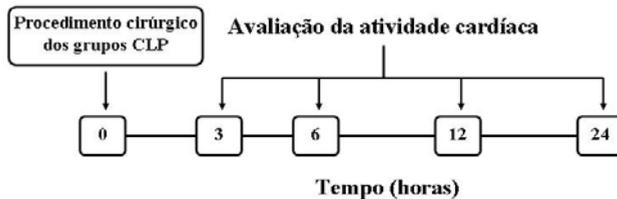


Figura 11 B - Fluxograma do protocolo experimental aplicado aos animais do grupo controle na determinação da atividade cardíaca na sepse.

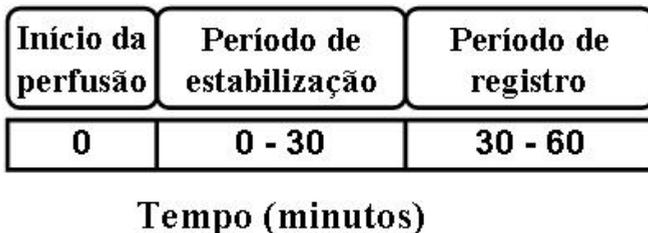


Figura 11 C - Fluxograma do protocolo experimental de perfusão e avaliação cardíaca.

Ainda, para melhor caracterizar a funcionalidade cardíaca ao longo da sepse, de acordo com o perfil de atividade apresentado pelos corações dos animais submetidos ao CLP e avaliados 3, 6, 12 e 24 horas após o procedimento cirúrgico, os corações foram subdivididos em: corações subfuncionais, que se trata de corações que apresentaram perfil de atividade inferior ao perfil apresentado pelos corações dos animais do grupo controle; corações normofuncionais, que são os corações que apresentaram perfil de atividade igual ou semelhante ao perfil apresentado pelos corações controle; e corações suprafuncionais, corações que apresentaram perfil de atividade superior ao perfil apresentado pelos corações controle.

A subdivisão foi feita com base no parâmetro tensão sistólica, ou seja, calculou-se a média e o desvio padrão da média da tensão sistólica do grupo controle nos 5 primeiros minutos do período de registro, sendo que os corações dos animais pertencentes ao subgrupo subfuncional são aqueles cujos animais foram submetidos ao CLP e que dentro dos horários de análise (3, 6, 12 e 24 horas após o CLP), nos 5 primeiros minutos do período de registro, os corações apresentaram tensão

sistólica inferior a média - 1 x desvio padrão da média do grupo controle. Os corações dos animais pertencentes ao subgrupo suprafuncional são aqueles cujos animais foram submetidos ao CLP e que dentro dos horários de análise, nos 5 primeiros minutos do período de registro, os corações apresentaram tensão sistólica superior a média + 1 x desvio padrão da média do grupo controle. Já os animais pertencentes ao subgrupo normofuncional são aqueles cujos animais foram submetidos ao CLP e que dentro dos horários de análise, nos 5 primeiros minutos do período de registro, os corações apresentaram tensão sistólica semelhante a média apresentada pelos corações dos animais do grupo controle, ou seja, a tensão sistólica apresentada pelos animais deste subgrupo se encontra no intervalo entre a tensão sistólica apresentada pelos corações do subgrupo subfuncional e a tensão sistólica apresentada pelos corações do subgrupo suprafuncional.

Essa subdivisão foi feita baseando-se no fato de que as manifestações da sepse não são uniformes e dependem muito da resposta de cada indivíduo ao processo inflamatório e infeccioso (Marshall e Sweeney, 1990). E ainda, visto que no choque séptico o sistema cardiovascular invariavelmente é afetado, embora o mesmo não ocorra durante a sepse, onde nem sempre esse sistema é acometido (Merx e Weber, 2007).

3.3.2 Avaliação da reatividade cardíaca

Com o intuito de avaliar a capacidade de resposta cronotrópica e inotrópica positiva dos corações dos animais submetidos ao CLP, três e vinte e quatro horas após a cirurgia de indução de sepse os corações foram coletados e conectados ao sistema de perfusão, conforme descrito anteriormente, sendo que após um período de estabilização de 30 minutos foram submetidos ao tratamento com oito doses crescentes de isoprenalina (10, 30, 100 e 300 fmol e 1, 3, 10 e 30 pmol), um agonista beta-adrenérgico não seletivo. Os corações que passaram pelo procedimento cirúrgico de CLP, seja três ou vinte e quatro horas antes, foram divididos nos três subgrupos (subfuncionais, normofuncionais e suprafuncionais) e avaliados separadamente.

A isoprenalina foi diluída em PBS (salina tamponada com fosfato) e injetada lentamente na abertura localizada imediatamente acima da abertura onde foi acoplada a cânula contendo o coração. O volume final de isoprenalina nunca excedeu 30 μ l e todas as injeções da droga foram seguidas de duas injeções lentas de 150 μ l de Krebs-Ringer aquecido a 37° C, sendo uma injeção logo após a administração da isoprenalina e outra, dois minutos após. As injeções de Krebs-Ringer

têm por objetivo garantir que nenhum resíduo da droga permanecesse no sistema, sem chegar ao coração. As injeções de isoprenalina foram feitas com intervalos de 5 minutos entre cada concentração. As injeções por si só, seja de isoprenalina ou Krebs-Ringer, não foram capazes de alterar nenhum dos parâmetros avaliados, o que nos garantiu que os efeitos observados foram resultado da ação da droga administrada. As alterações promovidas pela droga nos parâmetros cardíacos avaliados iniciavam-se logo após a administração da mesma, perdurando por poucos segundos.

3.3.3 Avaliação do efeito da infusão de L-NAME sobre os parâmetros cardíacos basais e sobre a reatividade à isoprenalina, de corações de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Visto que a produção excessiva de NO durante a sepse é considerada uma das possíveis causas do desenvolvimento da disfunção miocárdica (Merx e Weber, 2007), investigamos a influência de um inibidor não-seletivo da NOS, L-NAME (Fernandes, 2006), sobre a atividade cardíaca basal e sobre a reatividade à isoprenalina em corações de animais submetidos à CLP. Para isso a sepse foi induzida e vinte e quatro horas após os animais foram heparinizados e sacrificados, sendo os corações coletados e conectados ao sistema de perfusão, passando por um período de estabilização de vinte minutos. Após o período de estabilização os parâmetros cardíacos basais foram registrados durante cinco minutos, sendo que em seguida os corações foram submetidos ao tratamento com duas concentrações de isoprenalina (10 fmol e 30 pmol), a qual foi injetada lentamente na abertura localizada imediatamente acima da abertura onde foi acoplada a cânula contendo o coração (seguiram-se os mesmos critérios utilizados no experimento descrito no item 3.3.2, para a administração de isoprenalina). Em seguida o L-NAME foi adicionado à solução de Krebs-Ringer, na concentração de 100 μ M (Terluk, 2005), perfundindo os corações até o término do experimento. Completados quinze minutos de perfusão, agora contendo L-NAME, avaliou-se novamente os parâmetros cardíacos durante cinco minutos e os corações foram então submetidos à administração das duas concentrações de isoprenalina (10 fmol e 30 pmol). Neste experimento foram utilizados os animais cuja atividade cardíaca basal (tensão sistólica na primeira avaliação realizada) foi inferior à apresentada pelos corações dos animais do grupo controle, correspondendo assim, ao subgrupo subfuncional do grupo CLP analisado vinte e quatro horas após a cirurgia.

3.3.4 Avaliação do efeito da infusão de L-arginina sobre os parâmetros cardíacos de corações de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A L-arginina, juntamente com o oxigênio molecular, são substratos utilizados pelas enzimas NOS para a formação de NO (Alderton, Cooper *et al.*, 2001). Com base nisso este protocolo foi desenvolvido para investigar se a constante perfusão de Krebs-Ringer no coração, durante todo o período de estabilização e de registro, é responsável pela remoção do substrato L-arginina do tecido cardíaco, impedindo assim, a formação de novas moléculas de NO. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de indução da sepse os corações foram coletados e conectados ao sistema de perfusão, passando por um período de estabilização de trinta minutos. A L-arginina foi adicionada a solução de Krebs-Ringer na concentração de 100 μM , que corresponde, em condições fisiológicas, a concentração plasmática deste aminoácido (Durante, 2001) e perfundiu os corações durante todo o período de registro. O valor basal, que será encontrado nos gráficos, representa a atividade cardíaca antes do início do efeito da L-arginina, ou seja, a atividade medida ainda no período de estabilização (últimos 5 minutos). Para esta avaliação foram utilizados os animais cuja atividade cardíaca basal (tensão sistólica) foi igual ou semelhante à apresentada pelos corações dos animais do grupo controle, correspondendo assim, ao subgrupo normofuncional do grupo CLP analisado vinte e quatro horas após a cirurgia.

3.4 Análise estatística

Os resultados apresentados são expressos pela média \pm erro padrão da média (E.P.M.). Para as análises estatísticas utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma ou mais vias (na dependência do número de covariáveis em estudo), seguido pelo teste *post hoc* Dunnett no caso da avaliação da concentração plasmática de nitrato e nitrito, e para comparações múltiplas foram realizados testes *post hoc* Newman-Keuls, utilizando o programa STATISTIC[®] software package (StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA). Diferenças com valores de $p < 0,05$ foram consideradas significativas. A curva de sobrevivência foi expressa como porcentagem de animais vivos observados em um intervalo de no mínimo 3 e no máximo 12 horas, durante 3 dias.

3.5 Compostos e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho: cetamina (Parke Davis, São Paulo, SP, Brasil); tribromoetanol (Sigma

Chemical Co. St Louis, MO, EUA); heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP, Brasil); NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , NaHCO_3 , dextrose anidra (todos comprados da Merck, Brasil); L-arginina, Isoprenalina e L-NAME (todos comprados da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os sais utilizados para o preparo da solução de Krebs-Ringer foram dissolvidos em água destilada. Os demais compostos foram diluídos em PBS estéril.

RESULTADOS

4.1 Avaliação do índice de mortalidade dos animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

Inicialmente avaliou-se a letalidade do modelo de CLP em camundongos, com o principal objetivo de definir os horários de avaliação da funcionalidade cardíaca durante a sepse. Tanto os animais controle quanto os animais submetidos ao procedimento cirúrgico (CLP) foram observados a intervalos de no mínimo três e no máximo doze horas, sendo que as observações tiveram início três horas após o término da cirurgia. Nos primeiros horários de avaliação (3 e 6 horas) não foram observadas alterações físicas nos animais e também não ocorreram mortes em nenhum dos grupos. Doze horas após o procedimento cirúrgico ocorreu a primeira morte dentro do grupo CLP, sendo que vinte e quatro horas após a indução da sepse o índice de mortalidade deste grupo foi de aproximadamente 75%, atingindo 100% de mortalidade quarenta e oito horas após a cirurgia. Os animais do grupo controle não passaram por procedimentos cirúrgicos, desta forma, nenhum dos animais deste grupo morreu durante o período de avaliação (Figura 12). Nos horários mais tardios de observação os animais sépticos apresentaram sinais de instalação do estado de sepse, como piloereção, tremores, redução da temperatura corporal (sensível ao tato), sangramento periocular, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação.

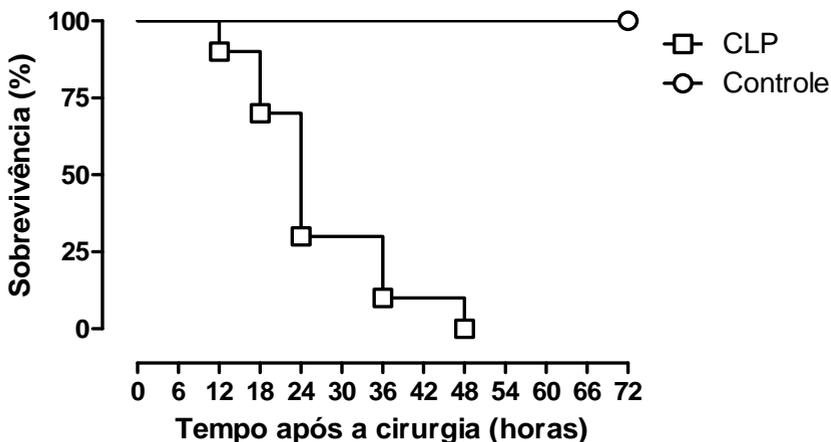


Figura 12 - Curva de sobrevivência de camundongos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco. Após a cirurgia e completa recuperação da anestesia os animais foram mantidos com livre acesso a água e ração. A sobrevivência foi avaliada ao longo de 3 dias. Os animais do grupo controle não passaram por procedimentos cirúrgicos. Curva representativa construída através da observação de 10 animais por grupo experimental.

4.2 Avaliação da função cardíaca

De acordo com o resultado obtido na avaliação da letalidade do modelo de CLP em camundongos (Figura 12), os horários escolhidos para avaliar a função cardíaca durante a sepse foram: três, seis, doze e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de ligadura e perfuração do ceco.

A Figura 13 ilustra a tensão sistólica apresentada por cada coração avaliado dentro de cada um dos horários pré-determinados de análise durante os cinco primeiros minutos do período de registro, através da metodologia de coração isolado e perfundido. Como não houve variação nos valores obtidos para os corações dos animais do grupo controle dentro dos diferentes horários de avaliação, os resultados desses corações foram unidos em um único grupo. O mesmo foi feito nas demais avaliações.

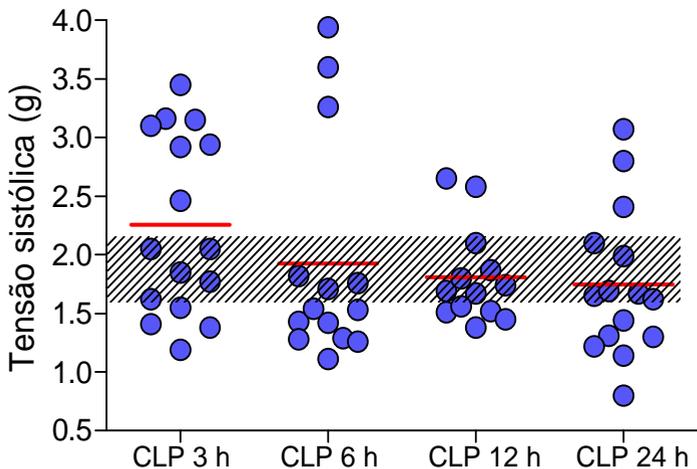


Figura 13 - Distribuição da tensão sistólica em cada um dos horários de avaliação da função cardíaca durante a sepse. Análise feita durante os cinco primeiros minutos do período de registro. Cada ponto representa a resposta de um coração. A área hachurada representa onde se localiza 95% dos valores do grupo controle. Traços vermelhos representam a média dos grupos. O número de animais variou entre 13 e 16 por grupo.

Quando avaliados três horas após os animais terem sido submetidos à CLP, grande parte dos corações apresentou tensão sistólica superior à tensão sistólica apresentada pelos corações do grupo controle, podendo representar a fase hiperdinâmica da sepse. Quando avaliados seis horas após o procedimento cirúrgico, os corações apresentaram em sua maioria tensão sistólica inferior à apresentada pelos corações do grupo controle. Na avaliação feita doze horas após o procedimento cirúrgico a maior parte dos corações sépticos apresentou tensão sistólica semelhante à apresentada pelos corações do grupo controle, e por fim, vinte e quatro horas após a CLP, grande parte dos corações avaliados apresentou tensão sistólica inferior a tensão apresentada pelos corações do grupo controle, podendo representar assim, o início da fase hipodinâmica da sepse.

Ainda por meio da Figura 13 pode-se observar que os resultados obtidos de tensão sistólica dentro de cada um dos horários de avaliação, com exceção do grupo controle, não são homogêneos. O mesmo foi observado nos demais parâmetros avaliados (dados não mostrados). Desta forma optou-se por subdividir cada um dos grupos (CLP 3, 6, 12 e 24 horas) em três diferentes subgrupos que compreendem: Corações

subfuncionais, que são corações que apresentaram perfil de atividade inferior ao perfil apresentado pelos corações do grupo controle; corações normofuncionais, que são corações que apresentaram perfil de atividade igual ou semelhante ao perfil apresentado pelos corações controle; e corações suprafuncionais, que se trata de corações que apresentaram perfil de atividade superior ao apresentando pelos corações controle (os critérios utilizados para a subdivisão podem ser encontrados no item 3.3.1 de Materiais e Métodos). A subdivisão feita com base no critério de tensão sistólica foi mantida para a análise de todos os demais parâmetros, mesmo que um determinado coração pudesse ser alocado em outro subgrupo com base em outro parâmetro que não a tensão sistólica.

Desta forma, na Figura 14 (Painéis A, B, C e D) são apresentados os resultados da tensão sistólica de cada um dos subgrupos dos quatro horários de avaliação da atividade cardíaca durante a sepse. A avaliação da tensão sistólica, como a dos demais parâmetros que serão mostrados a seguir, foi feita a cada cinco minutos, durante trinta minutos. Como pode ser verificado na Figura 14, na avaliação feita três horas após a CLP, 38% dos corações que passaram pelo procedimento cirúrgico apresentaram tensão sistólica superior à apresentada pelos corações controle, caracterizando o subgrupo suprafuncional, sendo esse perfil de atividade estatisticamente diferente do grupo controle. Dentro deste mesmo horário de avaliação o subgrupo normofuncional representou 50% dos valores encontrados. Seis horas após a CLP o subgrupo suprafuncional representou 21% do total dos corações avaliados, apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle. Embora esse subgrupo tenha se tornado menos expressivo em relação ao horário de avaliação de três horas, a tensão sistólica desse subgrupo seis horas após a CLP é superior, passando de aproximadamente 3,1 g (três horas após) para 3,55 g (seis horas após). O subgrupo subfuncional tornou-se mais expressivo, passando de 12% em três horas para 29% seis horas após a CLP. Doze horas após o procedimento cirúrgico 77% dos corações avaliados apresentaram tensão sistólica semelhante à apresentada pelos corações controle, caracterizando o subgrupo normofuncional. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico houve uma redução do subgrupo normofuncional em relação ao horário de doze horas, passando de 77% para 47%, sendo que neste último horário de avaliação houve um aumento substancial do subgrupo subfuncional que representou 40% do total dos corações avaliados, apresentando diferença estatística em relação ao grupo controle.

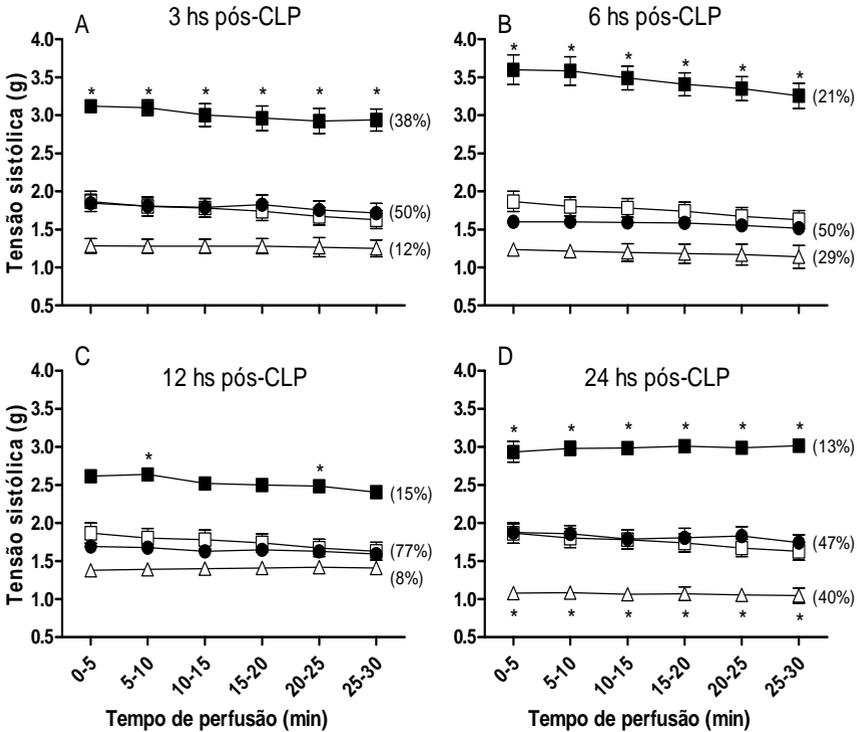


Figura 14 - Tensão sistólica apresentada por corações de animais submetidos à CLP e avaliados 3 (Painel A), 6 (Painel B), 12 (Painel C) e 24 horas (Painel D) após o procedimento cirúrgico por meio da metodologia de coração isolado e perfundido. No período de perfusão, a avaliação foi feita a cada cinco minutos durante trinta minutos. Porcentagem ao lado de cada subgrupo demonstra a representatividade do mesmo dentro do período de análise. Quadrados brancos representam o grupo controle, quadrados pretos o subgrupo suprafuncional, círculos o subgrupo normofuncional e triângulos o subgrupo subfuncional. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 1 a 10 corações por subgrupo experimental e 16 corações do grupo controle. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste de Newman-Keuls).

Quando avaliado o parâmetro tensão diastólica (dados não mostrados) não foram encontradas diferenças entre nenhum dos subgrupos avaliados quando comparados com o grupo controle, em nenhum dos horários de análise.

No parâmetro velocidade de contração ($+dT/dt$), calculada a partir da derivada da tensão, os subgrupos suprafuncionais apresentaram nos quatro horários de análise, velocidade superior à velocidade de contração apresentada pelo grupo controle, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Os demais subgrupos não apresentaram diferença na velocidade de contração quando comparados com o grupo controle, em nenhum dos horários avaliados, embora os subgrupos subfuncionais em seis e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico tenham demonstrado uma tendência em apresentar velocidade de contração menor do que a velocidade de contração apresentada pelo grupo controle nos primeiros minutos do período de avaliação (Figura 15).

A velocidade de contração, assim como os demais parâmetros avaliados, foram todos medidos nos mesmos corações cuja tensão sistólica foi demonstrada na Figura 14.

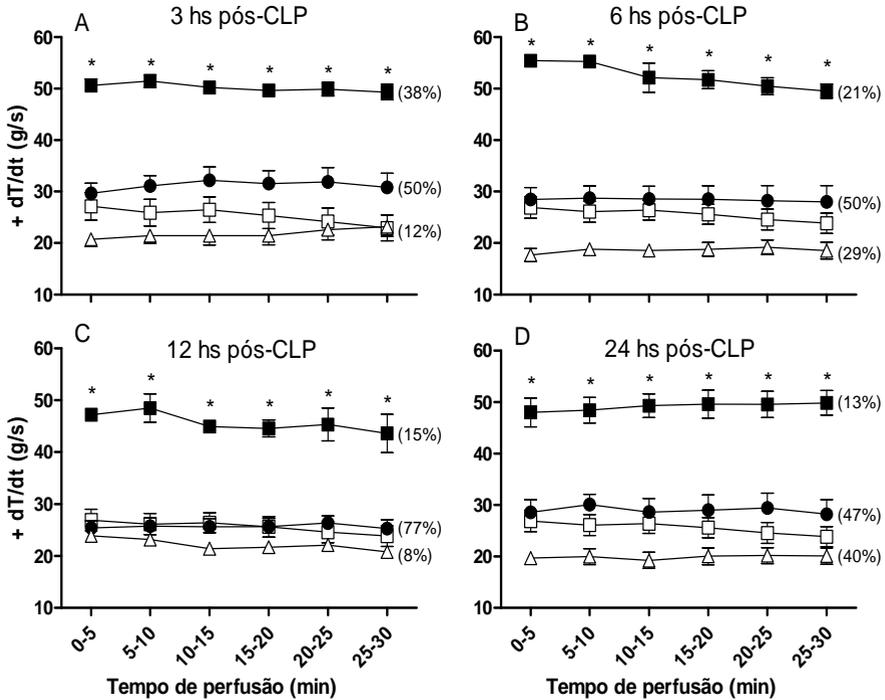


Figura 15 - 1 Velocidade de contração (+dT/dt) apresentada por corações de animais submetidos à CLP e avaliados 3 (Painel A), 6 (Painel B), 12 (Painel C) e 24 horas (Painel D) após o procedimento cirúrgico por meio da metodologia de coração isolado e perfundido. No período de perfusão, a avaliação foi feita a cada cinco minutos durante trinta minutos. Porcentagem ao lado de cada subgrupo demonstra a representatividade do mesmo dentro do período de análise. Quadrados brancos representam o grupo controle, quadrados pretos o subgrupo suprafuncional, círculos o subgrupo normofuncional e triângulos o subgrupo subfuncional. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 1 a 10 corações por subgrupo experimental e 16 corações do grupo controle. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste de Newman-Keuls).

Quando avaliada a velocidade de relaxamento (-dT/dt), parâmetro também calculado a partir da derivada da tensão, observou-se um resultado muito parecido com o encontrado para a velocidade de contração, ou seja, os subgrupos suprafuncionais apresentaram em todos os horários de análise velocidade de relaxamento superior à velocidade

apresentada pelo grupo controle, sendo esses valores diferentes estatisticamente. A velocidade de relaxamento dos subgrupos subfuncionais em três e vinte e quatro horas após a indução da sepse tendeu a ser menor em relação à velocidade de relaxamento desenvolvida pelo grupo controle (Figura 16).

Na avaliação do parâmetro área sob a curva (AUC) que é calculado a partir dos valores de tensão sistólica e diastólica e velocidades de contração e relaxamento, e que representa aproximadamente o trabalho cardíaco, observou-se valores superiores de AUC dos subgrupos suprafuncionais três, seis e vinte e quatro horas após a CLP quando comparados com o grupo controle, sendo essas diferenças estatisticamente significativas. Observou-se ainda, valor inferior de AUC do subgrupo subfuncional avaliado vinte e quatro horas após a CLP quando comparado com o grupo controle, apresentando diferença estatística (dados não mostrados).

Na Figura 17 são apresentados os resultados da avaliação da frequência cardíaca, sendo que não foram observadas diferenças entre os subgrupos avaliados quando comparados com o grupo controle, em nenhum dos horários de análise. Na avaliação da pressão de perfusão das coronárias (dados não mostrados) também não foram encontradas diferenças entre os subgrupos avaliados quando comparados com o grupo controle, em nenhum dos horários.

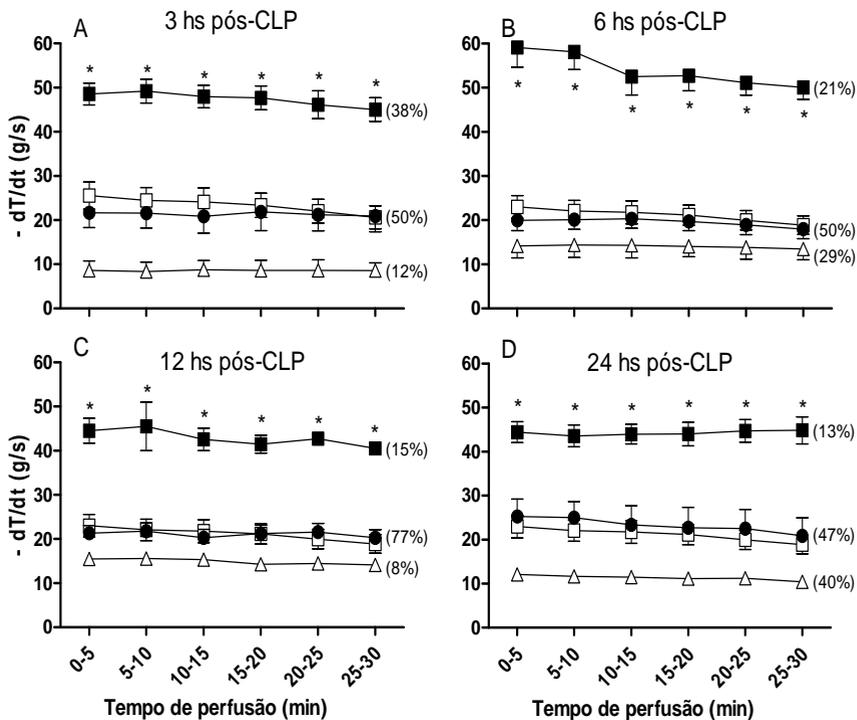


Figura 16 - Velocidade de relaxamento (-dT/dt) apresentada por corações de animais submetidos à CLP e avaliados 3 (Painel A), 6 (Painel B), 12 (Painel C) e 24 horas (Painel D) após o procedimento cirúrgico por meio da metodologia de coração isolado e perfundido. No período de perfusão, a avaliação foi feita a cada cinco minutos durante trinta minutos. Porcentagem ao lado de cada subgrupo demonstra a representatividade do mesmo dentro do período de análise. Quadrados brancos representam o grupo controle, quadrados pretos o subgrupo suprafuncional, círculos o subgrupo normofuncional e triângulos o subgrupo subfuncional. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 1 a 10 corações por subgrupo experimental e 16 corações do grupo controle. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste de Newman-Keuls).

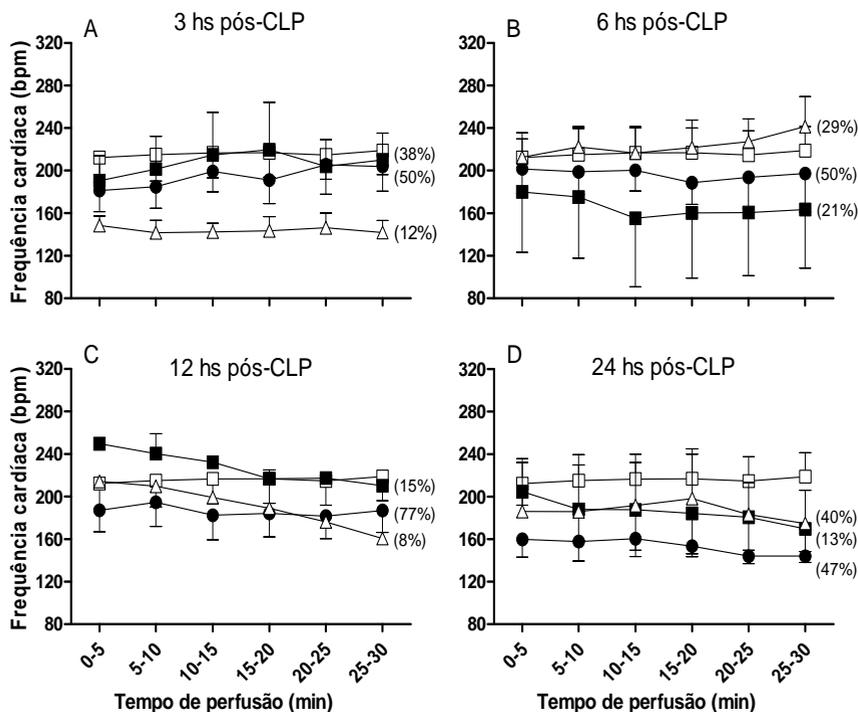


Figura 17 - Frequência cardíaca apresentada por corações de animais submetidos à CLP e avaliados 3 (Painel A), 6 (Painel B), 12 (Painel C) e 24 horas (Painel D) após o procedimento cirúrgico por meio da metodologia de coração isolado e perfundido. No período de perfusão, a avaliação foi feita a cada cinco minutos durante trinta minutos. Porcentagem em lado de cada subgrupo demonstra a representatividade do mesmo dentro do período de análise. Quadrados brancos representam o grupo controle, quadrados pretos o subgrupo suprafuncional, círculos o subgrupo normofuncional e triângulos o subgrupo subfuncional. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 1 a 10 corações por subgrupo experimental e 16 corações do grupo controle. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.3 Avaliação da reatividade cardíaca

A avaliação dos corações sépticos quanto à capacidade de resposta cronotrópica e inotrópica positiva foi realizada apenas no período que melhor representa o estágio inicial do quadro de sepse em camundongos, ou seja, em corações cujos animais doadores foram

submetidos à CLP três horas antes da avaliação. Também foi feita avaliação nos corações no período que melhor representa o estágio tardio do quadro de sepse em camundongos, aqueles cujos doadores foram submetidos à CLP vinte e quatro horas antes da avaliação. Os corações foram divididos nos subgrupos (subfuncionais, normofuncionais e suprafuncionais) e avaliados separadamente.

Da mesma forma como observado anteriormente o subgrupo subfuncional avaliado três horas após a CLP demonstrou uma tendência em apresentar tensão sistólica inferior à apresentada pelo grupo controle; sem apresentar diferença no parâmetro frequência cardíaca. Esses corações não apresentaram diferença na resposta à isoprenalina quando comparados com os corações do grupo controle, nos parâmetros tensão sistólica e frequência cardíaca (Figura 18).

Como pode ser observado através da figura, os corações do grupo controle apresentaram discreto aumento da tensão sistólica em resposta às menores concentrações de isoprenalina, sendo que em resposta às maiores concentrações desse agonista beta-adrenérgico os corações controle apresentaram aumento da frequência cardíaca de forma concentração dependente sendo estatisticamente diferente na concentração de 30 pmol quando comparado com o valor basal deste mesmo grupo.

Como não houve variação nos valores obtidos para os corações dos animais do grupo controle dentro dos dois diferentes horários de avaliação (três e vinte e quatro horas), os resultados desses corações foram unidos em um único grupo e desta forma os valores de tensão sistólica e frequência cardíaca do grupo controle serão sempre os mesmos em todos os gráficos que representam a avaliação da reatividade cardíaca à isoprenalina.

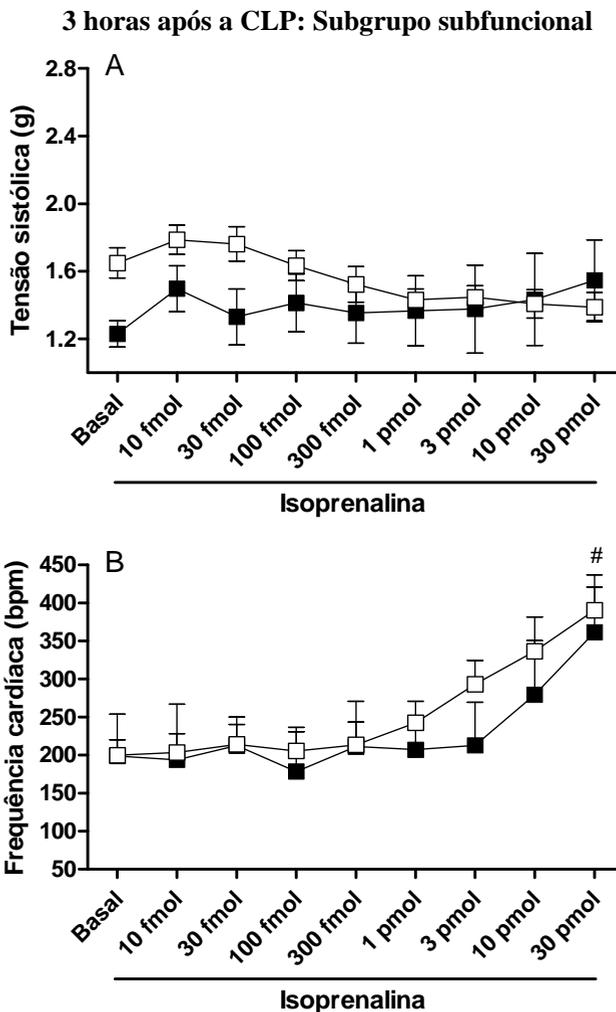


Figura 18 - Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo subfuncional cujos animais foram submetidos à CLP três horas antes da avaliação. Doses crescentes de isoprenalina foram administradas e a variação na tensão sistólica (Painel A) e na frequência cardíaca (Painel B) foram registradas. Os dados demonstram a resposta máxima apresentada pelos corações frente ao tratamento com isoprenalina. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 11 corações do grupo controle (quadrados brancos) e 3 corações do subgrupo subfuncional (quadrados pretos). # $p < 0,05$, em relação ao valor basal do mesmo grupo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

Os corações do subgrupo subfuncional, cujos animais foram submetidos à CLP vinte e quatro horas antes, apresentaram tensão sistólica basal inferior a apresentada pelos corações do grupo controle, sem apresentar diferença no parâmetro frequência cardíaca, conforme mostrado anteriormente.

Quando avaliados quanto à capacidade contrátil e resposta cronotrópica positiva, os corações do subgrupo subfuncional praticamente não apresentaram alteração do parâmetro tensão sistólica em resposta às concentrações de 10 e 30 fmol de isoprenalina, sendo essa resposta diferente estatisticamente quando comparada à resposta dos corações controle a essas mesmas concentrações. Ainda, os corações dos animais sépticos apresentaram em resposta a concentração de 30 pmol de isoprenalina, frequência cardíaca inferior a apresentada pelos corações do grupo controle, sendo essa diferença estatisticamente significativa (Figura 19).

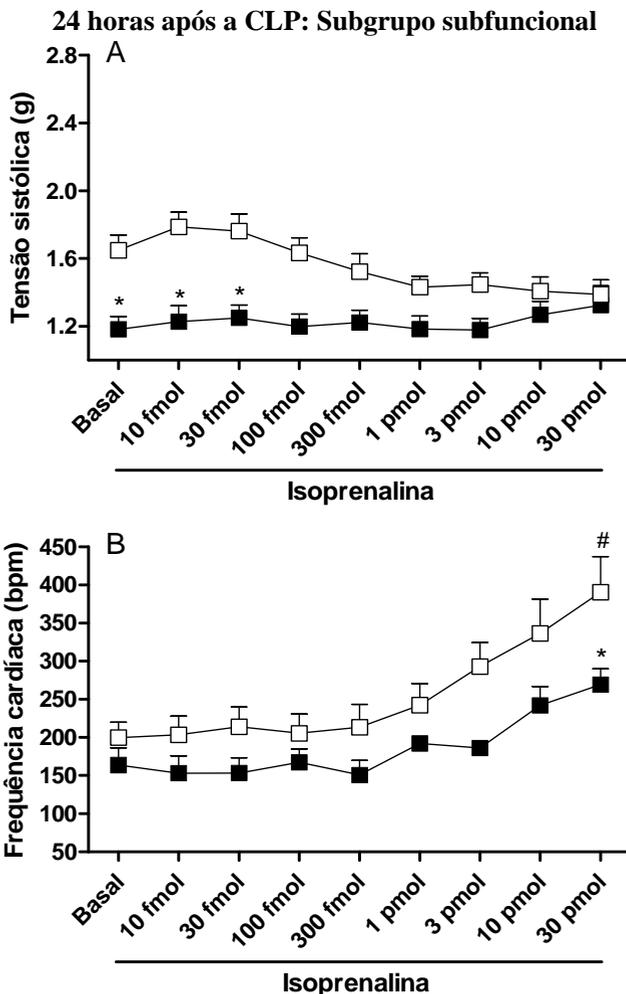


Figura 19 - Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo subfuncional cujos animais foram submetidos à CLP vinte e quatro horas antes da avaliação. Doses crescentes de isoprenalina foram administradas e a variação na tensão sistólica (Painel A) e na frequência cardíaca (Painel B) foram registradas. Os dados demonstram a resposta máxima apresentada pelos corações frente ao tratamento com isoprenalina. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 11 corações do grupo controle (quadrados brancos) e 6 corações do subgrupo subfuncional (quadrados pretos). * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$, em relação ao valor basal do mesmo grupo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

Os corações do subgrupo normofuncional, avaliados três horas após o procedimento cirúrgico de CLP, apresentaram valores basais de tensão sistólica e frequência cardíaca semelhantes aos valores basais apresentados pelos corações do grupo controle, confirmando os dados já mostrados. Da mesma forma, quando submetidos ao tratamento com isoprenalina, os corações do subgrupo normofuncional apresentaram valores de frequência cardíaca semelhantes aos valores apresentados pelos corações do grupo controle; no entanto, na avaliação do parâmetro tensão sistólica, nas maiores concentrações de isoprenalina esses corações demonstraram uma tendência em apresentar valores superiores aos apresentados pelos corações do grupo controle (Figura 20).

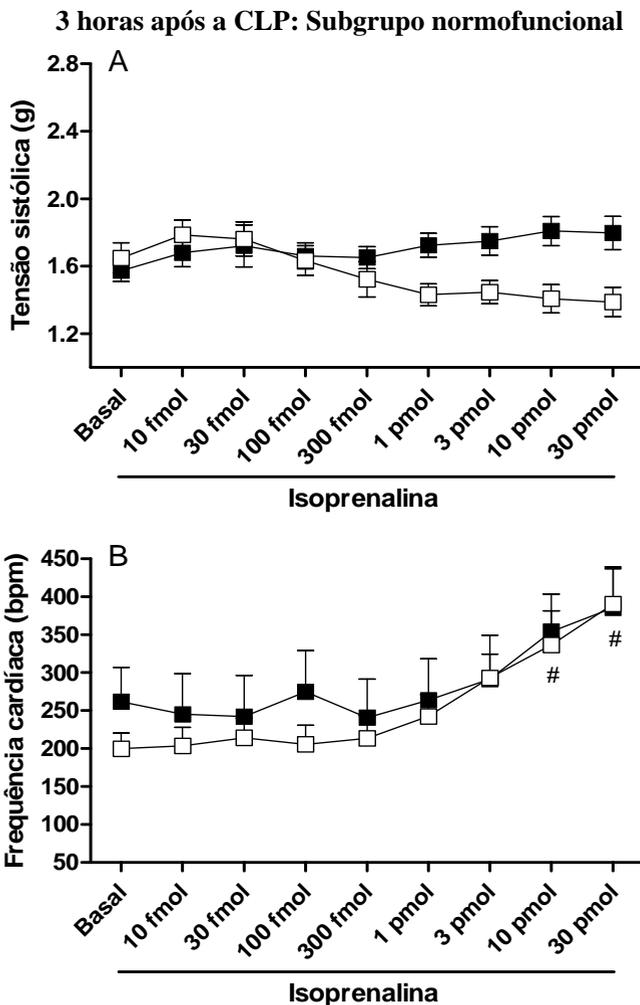


Figura 20 - Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo normofuncional cujos animais foram submetidos à CLP três horas antes da avaliação. Doses crescentes de isoprenalina foram administradas e a variação na tensão sistólica (Painel A) e na frequência cardíaca (Painel B) foram registradas. Os dados demonstram a resposta máxima apresentada pelos corações frente ao tratamento com isoprenalina. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 11 corações do grupo controle (quadrados brancos) e 7 corações do subgrupo normofuncional (quadrados pretos). # $p < 0,05$, em relação ao valor basal do mesmo grupo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

Quando avaliados vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de CLP, os corações pertencentes ao subgrupo normofuncional apresentaram valores basais de tensão sistólica e frequência cardíaca semelhantes aos valores basais apresentados pelos corações do grupo controle, conforme mostrados anteriormente.

Submetidos ao tratamento com isoprenalina, os corações dos animais sépticos do subgrupo normofuncional apresentaram valores de tensão sistólica e frequência cardíaca semelhantes aos valores apresentados pelos corações do grupo controle, sendo os corações deste subgrupo capazes de apresentar resposta cronotrópica positiva frente ao tratamento com isoprenalina (Figura 21).

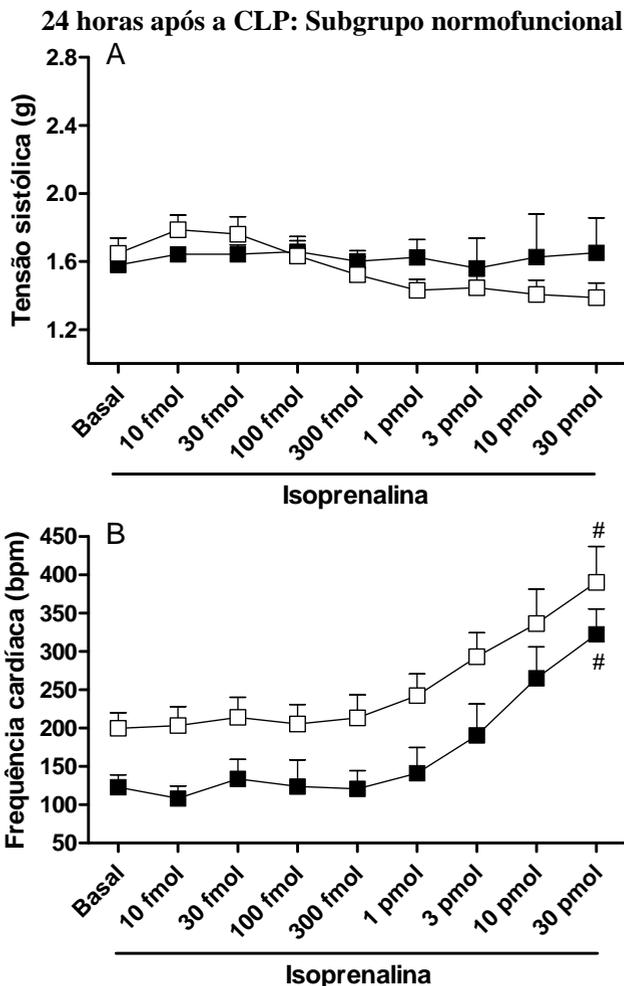


Figura 21 - Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo normofuncional cujos animais foram submetidos à CLP vinte e quatro horas antes da avaliação. Doses crescentes de isoprenalina foram administradas e a variação na tensão sistólica (Painel A) e na frequência cardíaca (Painel B) foram registradas. Os dados demonstram a resposta máxima apresentada pelos corações frente ao tratamento com isoprenalina. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 11 corações do grupo controle (quadrados brancos) e 4 corações do subgrupo normofuncional (quadrados pretos). # $p < 0,05$, em relação ao valor basal do mesmo grupo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

Na Figura 22 está demonstrada a resposta de corações do subgrupo suprafuncional de animais submetidos à CLP três horas antes. Como descrito anteriormente, a tensão sistólica basal dos corações suprafuncionais neste horário de análise é estatisticamente diferente da tensão sistólica basal apresentada por corações controle, sem haver diferença entre esses grupos no parâmetro frequência cardíaca.

Os corações suprafuncionais apresentaram um pequeno aumento na tensão sistólica em resposta à concentração de 10 fmol de isoprenalina, assim como em resposta às concentrações mais altas desta droga, em relação ao valor basal apresentado por este mesmo subgrupo. Ainda, a tensão sistólica apresentada pelos corações suprafuncionais em resposta à isoprenalina, foi diferente estatisticamente em todas as concentrações, quando comparada com a resposta gerada pelos corações controle. Observou-se também, aumento na frequência dos batimentos dos corações suprafuncionais em resposta às maiores concentrações de isoprenalina, em relação ao valor basal apresentado por este subgrupo, resposta esta que também foi desenvolvida pelos corações do grupo controle, não havendo desta forma, diferença estatística entre os grupos.

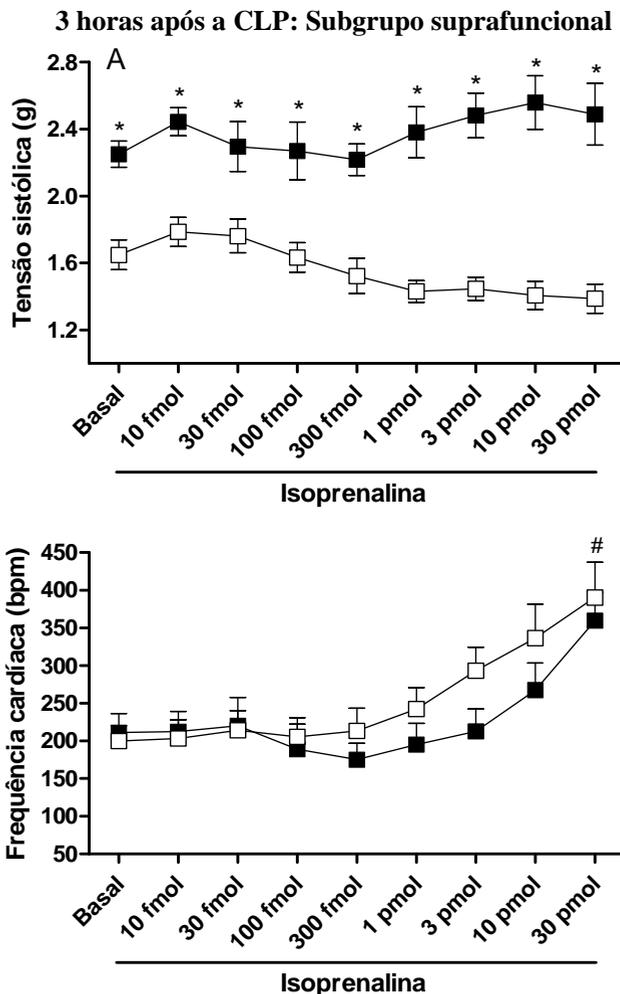


Figura 22 - Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo suprafuncional cujos animais foram submetidos à CLP três horas antes da avaliação. Doses crescentes de isoprenalina foram administradas e a variação na tensão sistólica (Painel A) e na frequência cardíaca (Painel B) foram registradas. Os dados demonstram a resposta máxima apresentada pelos corações frente ao tratamento com isoprenalina. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 11 corações do grupo controle (quadrados brancos) e 7 corações do subgrupo suprafuncional (quadrados pretos). * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$, em relação ao valor basal do mesmo grupo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

Os corações do subgrupo suprafuncional, avaliados vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de CLP, apresentaram diferença estatística na avaliação de tensão sistólica basal quando comparados com o grupo controle. No parâmetro frequência cardíaca não houve diferença basal entre os grupos. Esses resultados estão de acordo com os resultados observados anteriormente.

Quando avaliada a reatividade cardíaca, no parâmetro tensão sistólica os corações suprafuncionais apresentaram resposta superior à isoprenalina nas concentrações de 10, 30 e 100 fmol, quando comparada à resposta dos corações controle a essas mesmas concentrações, sendo essa diferença estatisticamente significativa. A resposta às demais concentrações de isoprenalina foi semelhante entre os dois grupos experimentais. Em resposta às concentrações de isoprenalina administradas a partir de 300 fmol, os corações sépticos apresentaram tensão sistólica mais baixa em relação aos valores apresentados às concentrações anteriormente administradas, o que pode ter ocorrido devido ao aumento da frequência cardíaca. Quando avaliado o parâmetro frequência cardíaca, observou-se que os corações sépticos apresentam aumento deste parâmetro em resposta à isoprenalina, assim como os corações controle, não havendo diferença entre os grupos (Figura 23).

Além dos parâmetros tensão sistólica e frequência cardíaca os parâmetros tensão diastólica, velocidades de contração e relaxamento e pressão de perfusão das coronárias também foram avaliados nos dois horários (três e vinte e quatro horas) e em todos os corações dos três subgrupos (subfuncional, normofuncional e suprafuncional), no entanto não houve alteração desses parâmetros frente ao tratamento com isoprenalina (dados não mostrados).

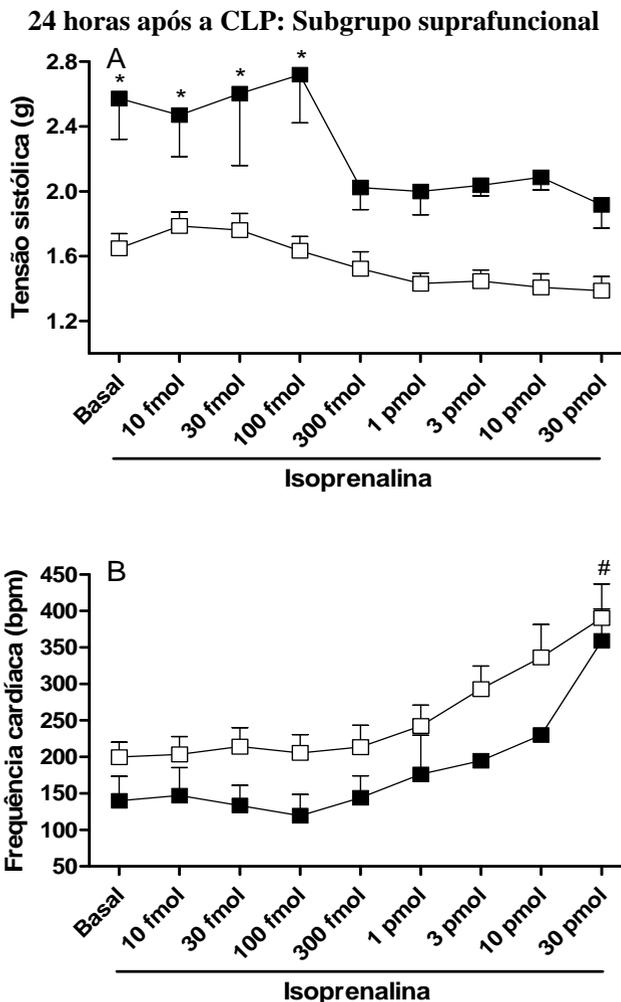


Figura 23 - Avaliação da reatividade cardíaca de corações pertencentes ao subgrupo suprafuncional cujos animais foram submetidos à CLP vinte e quatro horas antes da avaliação. Doses crescentes de isoprenalina foram administradas e a variação na tensão sistólica (Painel A) e na frequência cardíaca (Painel B) foram registradas. Os dados demonstram a resposta máxima apresentada pelos corações frente ao tratamento com isoprenalina. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 11 corações do grupo controle (quadrados brancos) e 3 corações do subgrupo suprafuncional (quadrados pretos). * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$, em relação ao valor basal do mesmo grupo; & $p < 0,05$, em relação ao valor basal do mesmo grupo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.4 Níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NOx)

Os animais sépticos apresentaram elevados níveis plasmáticos de NOx logo nos primeiros horários de avaliação. Vinte e quatro horas após a CLP o nível plasmático de NOx aumentou cerca de 2,5 vezes em relação ao valor basal, sendo essa diferença estatisticamente significativa. Os valores permaneceram altos por pelo menos quarenta e oito horas após o procedimento cirúrgico (Figura 24). Para esta avaliação os animais sépticos não foram divididos em subgrupos.

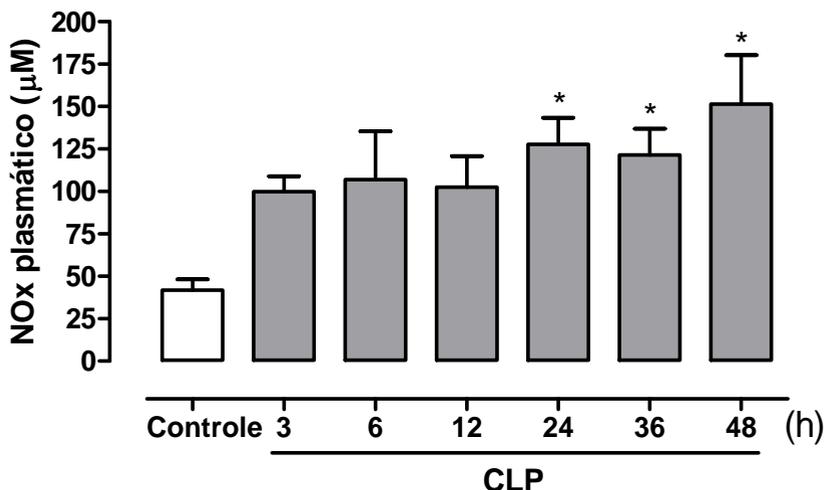


Figura 24 - Concentração plasmática de NOx de camundongos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco. Amostras de sangue foram coletadas 3, 6, 12, 24, 36 e 48 horas após a CLP e processadas para a quantificação da concentração de NOx pelo método de Griess. Grupo controle representado pela barra branca; grupos CLP representados pelas barras cinza. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 4 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett).

4.5 Caracterização do envolvimento do óxido nítrico na disfunção cardíaca tardia e sua influência na reatividade à isoprenalina

A Figura 25 (Painéis A e B) mostra que tanto corações controle quanto corações submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP pertencentes ao subgrupo subfuncional (avaliação vinte e quatro horas após ao CLP) quando infundidos com um inibidor não seletivo das enzimas óxido nítrico sintases, o L-NAME, não apresentam diferenças nos valores basais de tensão sistólica e frequência cardíaca quando

comparados com corações que não receberam esse tratamento. Nos demais parâmetros avaliados (tensão diastólica, velocidades de contração e relaxamento e pressão de perfusão das coronárias) também não foram encontradas diferenças (dados não mostrados).

A análise da Figura 25 mostra ainda que a resposta à isoprenalina dos corações tratados com L-NAME, sejam eles corações controle ou CLP, é semelhante à resposta apresentada pelos corações que não receberam L-NAME, tanto no parâmetro tensão sistólica quanto no parâmetro frequência cardíaca.

As diferenças anteriormente descritas entre corações controle e corações sépticos do subgrupo subfuncional avaliados vinte e quatro horas após a CLP que receberam apenas Krebs, tanto na tensão sistólica basal quanto na resposta à isoprenalina foram novamente observadas.

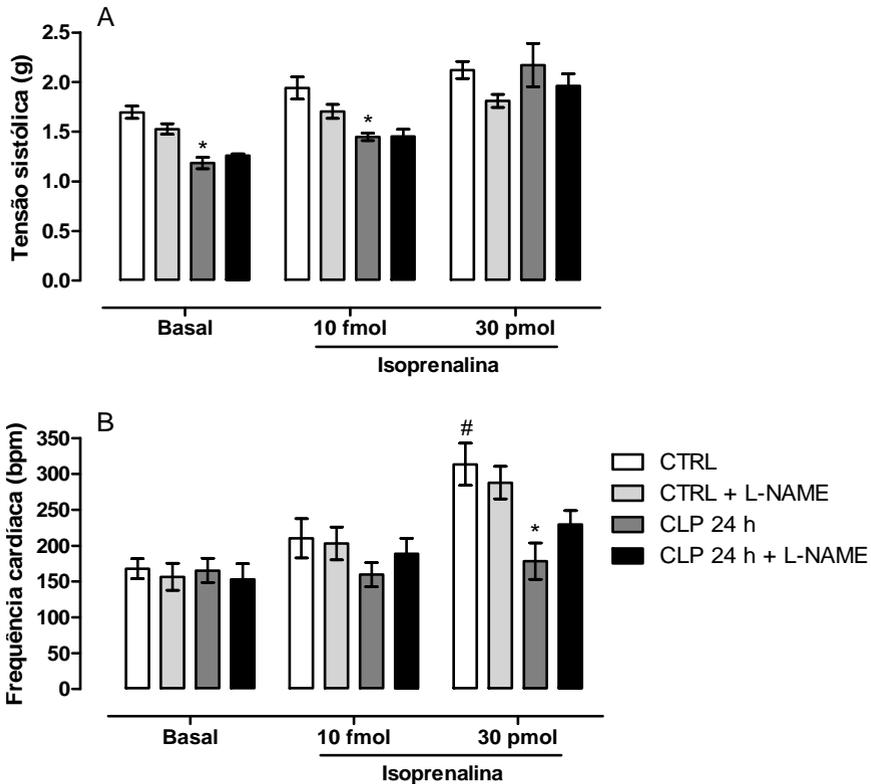


Figura 25 - Efeito do L-NAME em parâmetros cardíacos basais e na reatividade à isoprenalina. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de CLP avaliou-se a tensão sistólica e a frequência cardíaca basais de corações controle (barras brancas) e corações sépticos (subgrupo subfuncional) (barras cinza escuro) perfundidos com Krebs; e de corações controle (barras cinza claro) e corações sépticos (subgrupo subfuncional) (barras pretas) perfundidos com L-NAME. Em seguida, nos mesmos corações foi avaliada a capacidade de resposta à isoprenalina. A avaliação dos parâmetros cardíacos foi feita através da metodologia de coração isolado e perfundido. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 5 a 10 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle. # $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (basal). (ANOVA de três vias seguida pelo teste de Newman-Keuls).

4.6 Efeito da infusão de L-arginina sobre parâmetros cardíacos basais de corações de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

Quando a L-arginina, um dos substratos das enzimas óxido nítrico sintase para a formação de NO, foi infundida em corações sépticos vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico (corações do subgrupo normofuncional) não foram observadas diferenças em nenhum dos parâmetros avaliados quando comparados com os corações sépticos (subgrupo normofuncional) que não receberam esse tratamento. Da mesma forma, a infusão de L-arginina não alterou o perfil de atividade dos corações controle que receberam esse tratamento em relação aos corações controle que receberam apenas Krebs (Figura 26). Nos demais parâmetros avaliados, tensão diastólica e pressão de perfusão das coronárias, também não foram encontradas diferenças (dados não mostrados).

A semelhança no perfil de atividade observada anteriormente entre corações do grupo controle e corações sépticos do subgrupo normofuncional avaliados vinte e quatro horas após a CLP foi novamente observada.

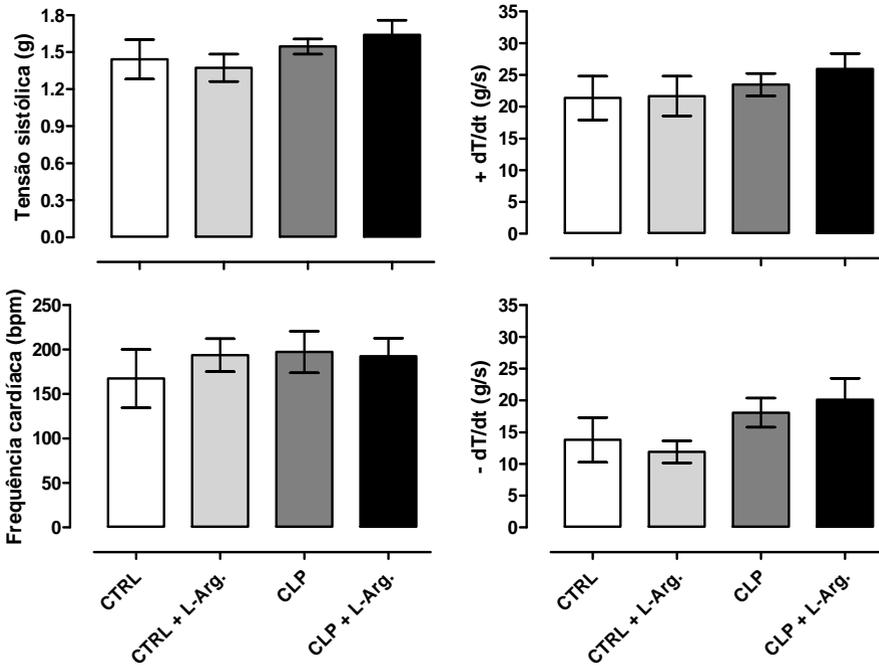


Figura 26 - Efeito da infusão de L-arginina sobre parâmetros cardíacos basais. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de CLP foram avaliados parâmetros cardíacos basais de corações controle (primeiras barras brancas) e corações sépticos (subgrupo normofuncional) (segundas barras brancas) perfundidos com Krebs; e de corações controle (primeiras barras cinza) e corações sépticos (subgrupo normofuncional) (segundas barras cinza) perfundidos com L-arginina. A avaliação dos parâmetros cardíacos foi feita através da metodologia de coração isolado e perfundido. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 5 a 8 animais por grupo experimental (ANOVA de duas vias).

DISCUSSÃO

5.1 Indução da sepse pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco

A sepse e a disfunção de múltiplos órgãos, uma de suas principais consequências, continuam sendo um dos maiores desafios da atualidade tanto para cientistas quanto para a comunidade médica. Apesar das extensivas pesquisas e descobertas realizadas nos últimos anos, a fisiopatologia da sepse continua pouco compreendida. Por outro lado, as hospitalizações e o índice de mortalidade de pacientes sépticos têm aumentado significativamente (Rittirsch, Huber-Lang *et al.*, 2009). Com o intuito de contribuir principalmente com o entendimento dos mecanismos de resposta do hospedeiro à infecção, bem como descobrir e elucidar a participação de moléculas e sistemas envolvidos nas alterações observadas durante a sepse, foram desenvolvidos alguns modelos experimentais, os quais tentam mimetizar alterações tipicamente observadas em pacientes sépticos.

Dentre os modelos desenvolvidos, o de ligadura e perfuração do ceco (CLP) é o mais utilizado para indução da sepse em roedores, sendo considerado o padrão ouro na pesquisa desse estado patológico. A descrição original do modelo data do ano de 1980. A CLP simula uma ruptura do apêndice ou perfuração intestinal, sendo que a técnica envolve a laparotomia, a ligação abaixo da válvula íleo-cecal e a perfuração do ceco. Este procedimento leva ao extravasamento do conteúdo cecal no peritônio, gerando uma infecção polimicrobiana local sendo que as bactérias se deslocam também para o sistema circulatório sanguíneo provocando uma infecção sistêmica associada a uma resposta inflamatória também sistêmica (Wichterman, Baue *et al.*, 1980). Quando não há resolução do processo o quadro evolui para choque séptico, disfunção de múltiplos órgãos e em grande parte dos casos, resulta na morte do paciente (para detalhes ver (Buras, Holzmann *et al.*, 2005).

O modelo de CLP ganhou popularidade devido a sua maior similaridade com a sepse humana em relação aos demais modelos. Notavelmente, o perfil de citocinas observado nos animais submetidos à CLP é semelhante ao observado em pacientes sépticos, recriando as fases hemodinâmicas e metabólicas observadas na prática clínica. É observada também semelhança na variação de temperatura corporal e progressiva bacteremia (Remick, Newcomb *et al.*, 2000).

Neste trabalho não foram realizados ensaios específicos caracterizando o quadro de sepse, ou ainda, diferenciando o quadro entre sepse e choque séptico, sendo considerados sépticos todos os animais que apresentavam sinais clínicos da doença, como piloereção, alteração da temperatura corporal e prostração e também, baseando-se em dados de um trabalho realizado recentemente em nosso laboratório que

padronizou e caracterizou a sepse em camundongos induzida pelo modelo de CLP (Heckert, 2008). Embora as dosagens de citocinas e de marcadores bioquímicos fossem extremamente úteis para a identificação do estado patológico dos animais, e para determinar a probabilidade destes desenvolverem alterações cardíacas [visto que as alterações cardíacas estão sempre presentes em quadros de choque séptico, no entanto não são observadas em todos os casos de sepse (Merx e Weber, 2007)], não seria possível realizar todas as dosagens nos mesmos animais devido à quantidade de sangue que é obtida de animais de pequeno porte, principalmente animais sépticos. Mais ainda, as dosagens não poderiam ser realizadas em animais cujos corações foram submetidos à metodologia de ligadura e perfuração do ceco, devido ao procedimento. Neste caso, a utilidade dos referidos testes estaria limitada.

Uma das vantagens do modelo de CLP é que pequenas alterações na metodologia permitem graduar a severidade da sepse (Xiao, Siddiqui *et al.*, 2006). Por meio da curva de sobrevivência pode-se observar que neste trabalho os animais foram submetidos a um estímulo séptico de alta severidade, visto que o índice de mortalidade quarenta e oito horas após o procedimento cirúrgico é de 100%. Alguns trabalhos relatam mortalidade de aproximadamente 90% setenta e duas horas após a CLP (Heckert, 2008), enquanto outros relatam mortalidade de apenas 50% neste mesmo horário (Celes, 2008). Infelizmente, essa vantagem é também uma das limitações do modelo de CLP. Devido às variáveis intrínsecas torna-se difícil a comparação entre resultados obtidos por diferentes experimentadores, mesmo seguindo os mesmos procedimentos, o que pode ser evidenciado através dos diferentes índices de mortalidade (Buras, Holzmann *et al.*, 2005). Uma das variáveis intrínsecas mais difíceis de ser controlada e padronizada é a quantidade de conteúdo cecal extravasado. Em vista disso, o modelo precisa ser bem padronizado pelo experimentador, garantindo que o menor número de variáveis influencie no processo.

O grau de severidade da sepse depende do foco de interesse do estudo e no presente trabalho não estivemos interessados em reproduzir a situação clínica completamente, mas sim em observar aspectos da disfunção cardíaca desenvolvida durante o processo.

5.2 Avaliação da função cardíaca por meio da metodologia de coração isolado e perfundido

A metodologia de coração isolado e perfundido foi originalmente descrita por Oscar Langendorff em 1897. Embora antiga, ainda hoje é

muito utilizada por pesquisadores no mundo todo, o que se deve às importantes contribuições desta técnica não apenas às pesquisas voltadas para o estudo da fisiologia cardíaca, mas também para o desenvolvimento de novas terapias para o tratamento de processos patológicos, como é o caso das isquemias e arritmias. É uma técnica simples, de baixo custo, alta reprodutibilidade, que permite a avaliação de vários parâmetros com precisão, entre outros benefícios (Skrzypiec-Spring, Grothaus *et al.*, 2007).

Foram analisados neste estudo alguns dos inúmeros parâmetros que esta metodologia permite mensurar, como a função contrátil e frequência cardíaca. O primeiro parâmetro avaliado foi a tensão sistólica apresentada pelos corações dos animais sépticos, três, seis, doze e vinte quatro horas após o procedimento cirúrgico de CLP e pelos corações dos animais do grupo controle. Quando os dados de tensão sistólica foram mostrados antes da subdivisão dos grupos, na análise feita durante os cinco primeiros minutos do período de registro, pudemos observar a heterogeneidade de resposta dentro de cada um dos grupos, com exceção do grupo controle.

A explicação para o perfil de resposta observado pode estar no *background* genético dos animais, o que faz com que cada animal responda de forma diferente e única aos processos inflamatório e infeccioso (Hubbard, Choudhry *et al.*, 2005). Outros trabalhos também demonstraram grande variabilidade quando avaliada a resposta imunológica de animais submetidos a processos alérgicos, transplantes, defesa antimicrobiana e auto-imunidade (Palmer, 2001; Bell, 2002; Keen, 2002).

Outra possível explicação para o resultado encontrado é a influência das variáveis intrínsecas do modelo de CLP que, juntamente com a variabilidade de resposta individual podem ter levado alguns animais a desenvolverem um quadro de choque séptico aumentando a probabilidade destes apresentarem alterações cardíacas, enquanto outros animais desenvolveram apenas um quadro de sepse. Observamos que a variabilidade fica mais evidente quando avaliada a atividade cardíaca de camundongos submetidos à CLP, quando comparada com a variabilidade observada durante a avaliação da pressão arterial (Heckert, 2008), ou ainda, quando comparada com a variabilidade observada durante a avaliação da reatividade vascular (Liaudet, Mabley *et al.*, 2001), ambas realizadas em camundongos submetidos à CLP. A utilização de animais isogênicos tornaria a resposta biológica mais homogênea, no entanto, pacientes com sepse e choque séptico também apresentam elevado grau de variabilidade de resposta.

Em virtude desta grande variabilidade, optamos por dividir cada um dos grupos avaliados em subgrupos. Para tanto, tivemos que escolher um dos parâmetros analisados, que foi a tensão sistólica. Com o objetivo de manter a constância da divisão, todos os demais parâmetros foram mantidos em função da divisão baseada na tensão sistólica.

Quando os grupos foram divididos pudemos observar que em todos os horários de avaliação o subgrupo mais numeroso foi aquele que apresentou tensão sistólica semelhante à apresentada pelo grupo controle (subgrupo normofuncional). É importante mencionar que nos demais parâmetros avaliados, os corações dos subgrupos normofuncionais de todos os horários de avaliação também apresentaram perfil de atividade semelhante ao perfil apresentado pelos corações do grupo controle.

Nos subgrupos suprafuncionais, como em todos os demais subgrupos, houve diferença no número de ocorrências em função do tempo após a CLP. Em alguns casos, somente 15% do total de animais do grupo puderam ser alocados a um determinado subgrupo. Embora o número de ocorrências tenha sido distinto em cada um dos quatro períodos de avaliação, todos apresentaram perfil de atividade semelhante entre si. Os corações dos subgrupos suprafuncionais apresentaram em todos os períodos de avaliação valores de tensão sistólica e velocidades de contração e relaxamento superiores aos valores apresentados pelos corações do grupo controle, sem apresentar diferença entre si e em relação ao grupo controle, nos demais parâmetros avaliados.

Os altos valores de tensão sistólica (parâmetro que representa a força de contração cardíaca), e os altos valores das velocidades de contração e relaxamento apresentados pelos corações dos subgrupos suprafuncionais podem ser explicados, pelo menos em parte, pelo aumento da fosforilação da proteína fosfolambam, alteração esta que já foi observada e descrita durante a sepse (Wu, Tang *et al.*, 2002). Conforme comentado anteriormente, essa proteína é encontrada na membrana do retículo sarcoplasmático e quando fosforilada, aumenta a atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase, permitindo que mais íons cálcio se tornem disponíveis para a liberação de cálcio induzida por cálcio, dessa forma aumentando a força de contração. A fosforilação da fosfolambam promove também a dissociação dos íons cálcio dos miofilamentos de troponina C que, juntamente com o aumento da atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase, acelera o relaxamento cardíaco. Foi demonstrado por Wu e colaboradores (2002) aumento de 153% na fosforilação da fosfolambam durante horários iniciais da sepse induzida em ratos por CLP.

O aumento da tensão sistólica no período inicial da sepse poderia representar também o aumento da estimulação beta-adrenérgica mediado por catecolaminas, visto que inúmeros trabalhos descrevem níveis elevados de catecolaminas, tanto em pacientes quanto em animais sépticos durante todo o processo (Hahn, Wang *et al.*, 1995; Annane, Trabold *et al.*, 1999) e aumentada capacidade de ligação dos receptores beta-adrenérgicos encontrados no retículo sarcoplasmático nos horários iniciais da sepse (Tang e Liu, 1996). No entanto, os corações suprafuncionais não apresentaram aumento da frequência cardíaca.

Na avaliação feita vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de CLP, o subgrupo subfuncional apresentou valores de tensão sistólica inferiores e estatisticamente diferentes dos valores apresentados pelos corações do grupo controle. As velocidades de contração e relaxamento apresentadas pelos corações desse subgrupo tenderam a ser mais baixas quando comparadas com as velocidades apresentadas pelos corações controle. Nos demais parâmetros não foram encontradas diferenças entre os grupos. Os corações subfuncionais avaliados três, seis e doze horas após a CLP, embora não tenham apresentado diferença estatística em relação ao grupo controle, em nenhum dos parâmetros avaliados, apresentaram valores de tensão sistólica e de velocidades de contração e relaxamento abaixo dos valores apresentados pelos corações do grupo controle.

O perfil de atividade apresentado pelos corações subfuncionais, sobretudo quando a avaliação foi feita vinte e quatro horas após a CLP, pode ser explicado principalmente por alterações em diferentes níveis da movimentação intracelular dos íons cálcio. Foi demonstrado que citocinas e endotoxinas bacterianas alteram a atividade dos canais de cálcio voltagem-dependentes do tipo L, encontrados na membrana dos cardiomiócitos, reduzindo o influxo de cálcio durante o processo de contração (Liu e Schreur, 1995; Zhong, Hwang *et al.*, 1997). As endotoxinas bacterianas promovem ainda a abertura de canais de potássio ATP-dependentes, reduzindo a duração do potencial de ação e consequentemente, diminuindo a quantidade de íons cálcio que é armazenada nos compartimentos intracelulares (Buckley, Singer *et al.*, 2006). Essas alterações levam à redução da força de contração cardíaca, o que foi observado neste trabalho através da redução da tensão sistólica.

Alteração na funcionalidade dos receptores de rianodina é outra possível explicação para os valores de tensão sistólica e velocidade de contração apresentados pelos corações subfuncionais serem mais baixos em relação aos valores apresentados pelos corações controle. Esses

receptores estão localizados na membrana do retículo sarcoplasmático e são responsáveis pela liberação dos íons cálcio que ficam armazenados nesse compartimento durante o processo de liberação de cálcio induzida por cálcio. Essa hipótese foi confirmada por Cohen e colaboradores (2006). Eles mostraram que a atividade dos receptores rianodínicos está reduzida em cardiomiócitos de ratos avaliados vinte e quatro horas após a indução da endotoxemia e que a atividade contrátil do músculo papilar desses animais está igualmente reduzida. Ao fazer a mesma avaliação quatro horas após a indução da endotoxemia, a alteração nos receptores rianodínicos e na contração muscular não foi observada. Justificam-se assim, em parte, os dados mostrados neste estudo em relação aos corações normofuncionais avaliados três horas após a CLP, os quais não apresentaram redução da força de contração cardíaca (tensão sistólica) em relação ao grupo controle. Como os corações subfuncionais avaliados três horas após a CLP apresentaram valores de tensão sistólica inferiores aos apresentados pelos corações controle, é possível que essa alteração nos horários iniciais da sepse seja mediada por outros mecanismos que não a redução da funcionalidade dos receptores rianodínicos.

A diminuição da velocidade de relaxamento apresentada pelos corações subfuncionais em relação ao grupo controle pode ocorrer devido à redução da atividade das proteínas encontradas na membrana do retículo sarcoplasmático, alterando a remoção dos íons cálcio e fazendo com que esses permaneçam por mais tempo no citoplasma. A alteração na atividade dessas proteínas é mais pronunciada nos horários tardios da sepse (Wu, Tang *et al.*, 2002).

Outras importantes alterações observadas durante a sepse e que justificam os valores de tensão sistólica apresentados pelos corações subfuncionais, principalmente os avaliados vinte e quatro horas após a CLP, é a redução da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio, alteração esta que foi observada em modelos animais (Takeuchi, Del Nido *et al.*, 1999) e que levaram à redução da contratilidade do músculo papilar isolado (Tavernier, Mebazaa *et al.*, 2001) e também à destruição parcial dos miofilamentos de actina e miosina (Rossi, Celes *et al.*, 2007). De acordo com Gao e colaboradores (2003), o dano causado ao aparato contrátil ocorre devido ao aumento da atividade de enzimas metaloproteinases.

Outros mecanismos também foram descritos como tendo participação no desenvolvimento das alterações cardíacas observadas durante a sepse. Entre eles está a disfunção mitocondrial, que leva à redução na produção de ATP (trifosfato de adenosina), molécula imprescindível para a realização do trabalho cardíaco. Sabe-se ainda,

que ocorrem alterações no sistema circulatório logo no início do processo de sepse e que essas alterações reduzem o desempenho cardíaco (Rudiger e Singer, 2007). Foi demonstrado por Chagnon e colaboradores (2006) que o infiltrado inflamatório é responsável pela redução da complacência e da funcionalidade cardíaca durante a sepse.

Grande parte das alterações cardíacas discutidas até aqui são causadas pela excessiva produção de óxido nítrico pela NOS-2. O NO apresenta diferentes funções na fisiologia cardíaca, tanto em condições normais quanto em processos patológicos e embora na sepse pareça desempenhar apenas funções deletérias, muitos pesquisadores defendem que o NO apresenta efeitos protetores ao coração séptico, principalmente nos períodos tardios. Entre os efeitos benéficos do NO na sepse estão a redução do gasto de energia pelos miócitos, através da redução do trabalho cardíaco, visto que se trata de uma condição na qual a produção de energia está prejudicada devido a disfunção mitocondrial e problemas microcirculatórios (Rudiger e Singer, 2007). Outro efeito é a captação e/ou prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio ainda mais tóxicas (Wink, Hanbauer *et al.*, 1993) e, finalmente a biogênese mitocondrial é mediada pelo NO (Nisoli, Clementi *et al.*, 2003).

Esse conjunto de dados sugere que as alterações cardíacas que ocorrem durante a sepse afetam principalmente o sistema contrátil, tendo início logo nos primeiros períodos do processo e se prolongando até períodos tardios. Observamos que o perfil de atividade dos corações sépticos é bem variado, visto que alguns corações apresentam características da fase hipodinâmica da sepse logo nos primeiros horários de avaliação, enquanto vinte e quatro horas após a indução da sepse outros corações apresentam características da fase hiperdinâmica. Isso pode indicar que as duas fases descritas para a sepse (hiperdinâmica e hipodinâmica) não podem ser delimitadas em todos os casos como sendo fase inicial e fase tardia. É possível que os corações que apresentaram características hiperdinâmicas nos horários iniciais da sepse seriam aqueles que apresentariam características hipodinâmicas no final do processo, enquanto que os corações que apresentaram características hipodinâmicas logo nos primeiros horários de avaliação poderiam ser de animais que não sobreviveriam até vinte e quatro horas após a indução da sepse.

Durante a padronização da metodologia de coração isolado e perfundido de camundongos em nosso laboratório, observamos que o período total de perfusão (considerando o período de estabilização e o período de registro) desses corações não deve exceder 90 minutos. Isso porque embora a metodologia simule a condição fisiológica, a

deterioração cardíaca é inevitável visto que esta preparação como qualquer outra, apresenta limitações. Exemplo do início do processo de deterioração cardíaca é a redução gradual dos valores de tensão sistólica ao longo do período de perfusão, apresentados pelos corações suprafuncionais avaliados seis horas após a CLP (Figura 13, Painel B). O mesmo perfil foi apresentado por outros subgrupos, inclusive pelo grupo controle e também, nos demais parâmetros avaliados. Observação semelhante foi feita por Ferdinandy e colaboradores (1999), que descreveram a perda significativa da função cardíaca de corações isolados e perfundidos de ratos 120 minutos após o início da perfusão.

Na metodologia de coração isolado e perfundido existem pelo menos dois fatores limitantes. Primeiro, a ausência de agentes antioxidantes e glicocorticóides, que em condições fisiológicas estão presentes no sangue e conferem proteção ao tecido cardíaco, sendo que neste caso o tecido fica vulnerável à ação de agentes ambientais como as bactérias, resultando na indução da enzima NOS-2 e consequente formação de peroxinitrito. Outro fator é que, embora a solução de Krebs-Ringer seja aerada com mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂), a oxigenação do tecido é inferior à oxigenação oferecida pelo sangue quando em condições fisiológicas (Skrzypiec-Spring, Grotthus *et al.*, 2007).

5.3 Avaliação da reatividade cardíaca

Após observarmos importantes diferenças entre a atividade cardíaca de animais submetidos à sepse e de animais controle, nos perguntamos se nos corações sépticos haveria reserva cardíaca suficiente para aumentar o trabalho destes corações (força e frequência cardíaca) e se a estimulação beta-adrenérgica seria capaz de mobilizá-la.

Os corações foram submetidos à administração de doses crescentes de isoprenalina, um potente agonista beta-adrenérgico não-seletivo. No tecido cardíaco a isoprenalina produz aumento da força de contração e da frequência cardíaca através da estimulação dos receptores β_1 -adrenérgicos (Gupta, Westfall *et al.*, 2005). A isoprenalina é largamente utilizada na experimentação animal, especialmente em experimentos *ex vivo* e *in vitro*, com finalidades muito parecidas com a deste trabalho (Jones e Romano, 1990; Matsuda, Hattori *et al.*, 2000; Price, Evans *et al.*, 2002).

A avaliação foi feita apenas em dois horários, três e vinte e quatro horas após os animais serem submetidos à CLP, representando o início do quadro de sepse em camundongos e o estágio mais tardio. Antes da

avaliação os corações foram classificados e divididos nos subgrupos anteriormente descritos.

Observamos que os corações normofuncionais, independente do horário de avaliação, além de apresentarem atividade basal apresentam atividade cronotrópica e inotrópica positiva em resposta à isoprenalina semelhante à apresentada pelos corações do grupo controle. Esse resultado sugere que, nos corações normofuncionais, a atividade beta-adrenérgica está preservada, bem como o sistema contrátil, incluindo a atividade dos canais de cálcio voltagem-dependente do tipo L e canais de potássio ATP-dependente, atividade dos receptores de rianodina e sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio. O resultado sugere ainda, que o aspecto elétrico da frequência cardíaca destes corações também está preservado, visto que houve aumento da frequência dos disparos sino-atriais em resposta à isoprenalina.

Os corações suprafuncionais, tanto os avaliados três horas após a CLP quanto os avaliados vinte e quatro horas após, apresentaram tensão sistólica basal superior a apresentada pelos corações do grupo controle, confirmando o dado mostrado anteriormente, sem apresentar diferença no parâmetro frequência cardíaca. Quando submetidos à estimulação com isoprenalina os corações suprafuncionais, nos dois horários de avaliação, apresentaram resposta cronotrópica positiva semelhante à resposta apresentada pelos corações controle, o que representa que o aspecto elétrico da frequência cardíaca destes corações está preservado, sendo as células auto-rítmicas do nodo sino-atrial capazes de aumentar o ritmo de despolarização em resposta à estimulação beta-adrenérgica, bem como todo o sistema de condução permanece capaz de propagar o estímulo gerado.

Quando avaliados quanto à capacidade contrátil, os corações suprafuncionais analisados três horas após a CLP apresentaram resposta inotrópica positiva, sendo esta mais evidente quando as maiores concentrações de isoprenalina foram administradas, representando integridade do sistema contrátil nestes corações. Este perfil de resposta pode ser novamente explicado pelo aumento da fosforilação da proteína fosfolambam, disponibilizando maior quantidade de íons cálcio durante o processo de contração e conseqüentemente, aumentando a força de contração cardíaca (tensão sistólica), e também, devido à aumentada capacidade de ligação dos receptores beta-adrenérgicos encontrados no retículo sarcoplasmático nos horários iniciais do quadro de sepse.

Os corações suprafuncionais avaliados vinte e quatro horas após a CLP apresentaram resposta inotrópica positiva às menores concentrações de isoprenalina, sendo que quando administradas as

maiores concentrações deste agonista beta-adrenérgico houve redução da força de contração (em comparação a atividade basal destes mesmos corações e a resposta às menores concentrações de isoprenalina), no entanto esta resposta ainda foi superior a apresentada pelos corações controle. Isso pode ter ocorrido devido ao aumento da frequência cardíaca. O resultado sugere que a atividade contrátil destes corações também está preservada.

Os corações subfuncionais avaliados três horas após a CLP apresentaram valor basal de tensão sistólica inferior ao valor apresentado pelos corações controle, sem apresentar diferença no parâmetro frequência cardíaca, reproduzindo os resultados obtidos anteriormente. Surpreendentemente, quando avaliados quanto à capacidade contrátil e resposta cronotrópica, os corações subfuncionais (avaliação três horas após CLP) responderam à isoprenalina de forma semelhante aos corações do grupo controle, sugerindo que estes corações apresentam reserva cardíaca. O resultado sugere ainda, que a resposta beta-adrenérgica está preservada e que, pelo menos em parte, as células auto-rítmicas do nodo sino-atrial e o sistema de condução dos potenciais de ação gerados por estas células permanecem funcionais, assim como a maquinaria contrátil destes corações.

A diferença de tensão sistólica basal observada entre corações subfuncionais avaliados três horas após a CLP e corações controle, pode representar um mecanismo encontrado pelos corações sépticos para redução do trabalho cardíaco e conseqüente redução do consumo de oxigênio e nutrientes frente à instalação do processo inflamatório e infeccioso e início das alterações microcirculatórias que levam à diminuição do fluxo sanguíneo. A redução do trabalho cardíaco também foi descrita em corações humanos com isquemia, sendo chamada hibernação cardíaca. Este processo serve como um evento regulatório que mantém a integridade e viabilidade miocárdica (Heusch, Schulz *et al.*, 2005). Evidências sugerem que a redução do trabalho cardíaco durante processos inflamatórios é um evento mediado em parte pelo NO (Oddis e Finkel, 1997).

Os corações subfuncionais avaliados vinte e quatro horas após a CLP apresentaram, como visto anteriormente, valor basal de tensão sistólica inferior e estatisticamente diferente ao apresentado pelos corações do grupo controle, sem apresentar diferença no parâmetro frequência cardíaca. Em resposta às menores concentrações de isoprenalina os corações subfuncionais não apresentaram resposta inotrópica positiva, sendo esta resposta diferente estatisticamente quando comparada a apresentada pelos corações do grupo controle. Da

mesma forma, maiores concentrações de isoprenalina não induziram resposta cronotrópica positiva, sendo a resposta à última concentração diferente estatisticamente quando comparada à resposta apresentada pelos corações controle. Uma observação importante, é que embora não tenham apresentado aumento da frequência cardíaca, os corações subfuncionais apresentaram aumento da força de contração em resposta às maiores concentrações de isoprenalina, em relação ao valor basal apresentado por este mesmo subgrupo.

Os resultados encontrados para os corações subfuncionais avaliados vinte e quatro horas após a CLP sugerem que estes corações apresentam reserva cardíaca no que diz respeito à atividade contrátil, mas que esse sistema está parcialmente afetado. Esses corações apresentam ainda importantes alterações no funcionamento das células auto-rítmicas do nodo sinoatrial e/ou alterações no sistema de condução dos estímulos.

O perfil de resposta apresentado pelos corações subfuncionais avaliados vinte e quatro horas após a CLP pode ser explicado, pelo menos em parte, pela refratariedade à estimulação beta-adrenérgica, evento este que ocorre durante a sepse e contribui com a evolução da disfunção cardíaca (Rudiger e Singer, 2007). A refratariedade resulta da dessensibilização de receptores (Jones e Romano, 1990), mediada em parte por proteínas citosólicas conhecidas como arrestinas (Ungerer, Parruti *et al.*, 1994) e ocorre também devido à internalização de receptores. Foi observado por Tang e colaboradores (1996), redução da densidade de receptores beta-adrenérgicos no coração de ratos submetidos à sepse. No entanto, outros pesquisadores demonstraram densidade normal de receptores, apesar da resposta contrátil estar prejudicada (Gulick, Chung *et al.*, 1989). A dessensibilização e a internalização de receptores podem representar mecanismos adaptativos do coração séptico frente aos elevados níveis de catecolaminas que são produzidos durante a sepse (Rudiger e Singer, 2007).

Outro mecanismo identificado como responsável por provocar alterações semelhantes às observadas na resposta dos corações subfuncionais à isoprenalina, é a interrupção da transdução do sinal através das membranas celulares. Isso se deve à redução dos níveis de proteína Gs (estimulatória), processo demonstrado em corações de coelhos endotoxêmicos, ou ainda, se deve ao aumento dos níveis de proteína Gi (inibitória), conforme demonstrado em corações de pacientes que não sobreviveram a sepse (Rudiger e Singer, 2007). Essas alterações resultam na diminuição da ativação da enzima adenilato ciclase e conseqüentemente, à redução na produção de cAMP. Como o

cAMP é responsável por ativar proteínas quinase A que fosforilam outras proteínas como as responsáveis pela contração (células contráteis) e frequência cardíaca (células excitáveis), com a menor produção de cAMP o aumento da força e da frequência cardíaca ficam prejudicados.

Conforme observamos, o aumento da tensão sistólica só ocorreu em resposta às maiores doses de isoprenalina, o que pode representar também, redução da sensibilidade dos miofilamentos de actina e miosina aos íons cálcio.

Em um trabalho muito interessante, Zorn-Pauly e colaboradores (2007) demonstraram pela primeira vez alterações nos canais I_f (f, do inglês *funny*, significa engraçados) durante a sepse. Esses canais estão localizados nas células auto-rítmicas do nodo sino-atrial e são permeáveis aos íons Na^+ e K^+ se abrindo quando o potencial de membrana destas células é de -60 mV, dando início ao processo de despolarização. Os pesquisadores demonstraram que em miócitos atriais cardíacos submetidos à endotoxemia, a ativação dos canais I_f ocorre de forma retardada, tendo início apenas quando o potencial de membrana das células atinge -80 mV. Esse fenômeno também pode ter participação nas alterações cardíacas observadas durante a sepse, no que diz respeito à atividade cronotrópica em resposta à isoprenalina.

Alguns trabalhos como o de Oddis e colaboradores (1997) demonstram que o pré-tratamento de cardiomiócitos com citocinas pró-inflamatórias bloqueia completamente o efeito cronotrópico positivo produzido pela estimulação beta-adrenérgica com isoprenalina. Embora em nosso trabalho o efeito cronotrópico positivo não tenha sido bloqueado completamente, a redução da resposta pode ter sido mediada por agentes inflamatórios. Mais ainda, em pacientes e camundongos sépticos que apresentaram diminuição da função ventricular esquerda, a redução da resposta beta-adrenérgica estava associada a elevados níveis de NO (Rudiger e Singer, 2007).

5.4 Dosagem plasmática de nitrato e nitrito (NOx)

Conforme mencionado anteriormente, muitos estudos relacionam as alterações cardíacas observadas durante a sepse com a excessiva produção de NO (principalmente pela NOS-2), desta forma investigamos a produção de NO em camundongos induzidos à sepse pelo modelo de CLP e em camundongos do grupo controle por meio da mensuração dos níveis plasmáticos dos metabólitos estáveis do NO (nitrato e nitrito).

Observamos que os níveis plasmáticos de nitrato e nitrito de camundongos sépticos apresentam-se elevados logo no início do

processo (três horas após a CLP) permanecendo assim pelo menos até quarenta e oito horas após a CLP, no entanto, apenas as dosagens feitas a partir de vinte e quatro horas após a indução da sepse foram estatisticamente superiores quando comparadas com a dosagem do grupo controle.

É importante lembrar que os altos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito não representam necessariamente a presença de altos níveis de NOS-2 produzindo NO ativamente. Nosso laboratório demonstrou recentemente que o nível máximo de expressão da enzima NOS-2 em camundongos induzidos à sepse ocorre entre seis e doze horas após a CLP (Heckert, 2008). Assim, os altos níveis de nitrato e nitrito observados nos tempos mais tardios devem ser interpretados com cautela.

Sabe-se que o NO reage facilmente com grupamentos tióis formando os S-nitrosotióis (Hogg, 2002). É possível que a grande quantidade de NO produzida pela NOS-2 durante as primeiras horas da sepse interaja com tióis endógenos formando estoques intracelulares de nitrosotióis. Em períodos posteriores, quando não há mais uma alta produção de NO (a julgar pela pequena quantidade de NOS-2 encontrada), o NO pode ser liberado pelos nitrosotióis.

Mais recentemente, alguns trabalhos têm mostrado que o nitrato não é um metabólito tão estável como se imaginava, podendo ser convertido em NO novamente. Várias vias distintas têm sido implicadas neste processo de reciclagem. Interessantemente todas estas reações são enormemente acentuadas em condições de hipóxia. Portanto, durante a sepse, uma condição invariavelmente associada a uma má perfusão tecidual, este processo de reciclagem de NO pode ser fundamental para a manutenção dos efeitos do NO, mesmo na ausência de altos níveis da enzima NOS-2 (Fernandes, 2006).

Outra explicação para o resultado encontrado é que devido à disfunção renal que ocorre nos animais submetidos à sepse pelo modelo de CLP (Buras, Holzmann *et al.*, 2005), os metabólitos do NO (nitrato e nitrito) não são excretados ficando acumulados no sangue.

Infelizmente, apenas a dosagem de NOx não nos permite avaliar qual a significância da produção de NO para os achados deste trabalho, sendo necessária a avaliação de outros parâmetros, como por exemplo a mensuração da atividade da NOS-2, ou ainda, a quantificação da expressão das três isoformas da enzima NOS por meio da técnica de *Western blotting*.

5.5 Caracterização do envolvimento do óxido nítrico na disfunção e na reatividade cardíaca

A infusão de um inibidor não-seletivo das enzimas óxido nítrico sintases (L-NAME) não alterou os valores basais de tensão sistólica e frequência cardíaca dos corações controle e dos corações subfuncionais avaliados vinte e quatro horas após a CLP. Da mesma forma, quando esses corações foram estimulados com isoprenalina, o L-NAME não alterou a capacidade contrátil e a capacidade cronotrópica positiva dos corações de ambos os grupos.

Esses resultados são preliminares, de modo que são necessários experimentos adicionais, utilizando inibidores seletivos de cada uma das três isoformas da enzima NOS, ou ainda, utilizando animais geneticamente modificados, para determinarmos qual é exatamente o papel do NO produzido por cada uma das isoformas nas alterações cardíacas observadas em camundongos induzidos à sepse pelo modelo de CLP. Outro ponto interessante é investigar especificamente em quais células e estruturas o NO atua para gerar essas alterações e se a redução ou completa inibição da produção desta molécula pela NOS-2 é capaz de reverter e/ou restaurar as funções cardíacas perdidas.

Finalmente, embora a disponibilidade do substrato L-arginina tenha sido sugerida como um fator limitante para a produção de NO durante a preparação de coração isolado e perfundido, não observamos diferença na atividade de corações controle e de corações sépticos normofuncionais avaliados vinte e quatro horas após a CLP quando este substrato foi adicionado à solução de perfusão. A infusão do substrato L-arginina também não alterou a atividade de corações sépticos subfuncionais e suprafuncionais avaliados vinte e quatro horas após a CLP (dados não mostrados).

Da mesma forma, Price e colaboradores (2003) mostraram não haver diferença na atividade de corações de ratos do grupo controle quando perfundidos com solução de Krebs-Ringer enriquecida com o substrato L-arginina (na mesma concentração que utilizamos neste trabalho), no entanto, nos corações de ratos endotoxêmicos a infusão de L-arginina alterou o funcionamento destes corações, aumentando o desempenho cardíaco.

Em resumo, os principais achados deste trabalho foram que: i) corações de animais sépticos não apresentam todos o mesmo perfil de atividade quando avaliados aspectos da função cardíaca, no entanto, ainda assim são observadas importantes alterações na funcionalidade destes corações; ii) as alterações cardíacas tem início logo nos primeiros estágios de instalação do quadro de sepse, ficando mais evidentes em

horários tardios; iii) tanto o sistema contrátil quanto as células autorítmicas do nodo sino-atrial e/ou do sistema de condução são afetados, em maior ou menor grau; iv) o óxido nítrico parece ser um dos principais mediadores das alterações cardíacas observadas. Apesar destes resultados terem sido obtidos em animais e, portanto de difícil transposição direta para humanos, acreditamos que poderão contribuir para a melhor compreensão do quadro séptico e do seu tratamento.

REFERÊNCIAS

Alberti, C., C. Brun-Buisson, *et al.* Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. Intensive Care Med, v.28, n.2, Feb, p.108-21. 2002.

Alderton, W. K., C. E. Cooper, *et al.* Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. Biochem J, v.357, n.Pt 3, Aug 1, p.593-615. 2001.

Anderson, R. H., J. Yanni, *et al.* The anatomy of the cardiac conduction system. Clin Anat, v.22, n.1, Jan, p.99-113. 2009.

Angus, D. C., W. T. Linde-Zwirble, *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med, v.29, n.7, Jul, p.1303-10. 2001.

Annane, D., F. Trabold, *et al.* Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. Am J Respir Crit Care Med, v.160, n.2, Aug, p.458-65. 1999.

Assreuy, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, v.6, n.2, Jun, p.165-73. 2006.

Baron, R. M., M. J. Baron, *et al.* Pathobiology of sepsis: are we still asking the same questions? Am J Respir Cell Mol Biol, v.34, n.2, Feb, p.129-34. 2006.

Beishuizen, A., I. Vermes, *et al.* Endogenous mediators in sepsis and septic shock. Adv Clin Chem, v.33, p.55-131. 1998.

Bell, J. I. Single nucleotide polymorphisms and disease gene mapping. Arthritis Res, v.4 Suppl 3, p.S273-8. 2002.

Benjamin, C. F., S. H. Ferreira, *et al.* Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. J Infect Dis, v.182, n.1, Jul, p.214-23. 2000.

Bers, D. M. Cardiac excitation-contraction coupling. Nature, v.415, n.6868, Jan 10, p.198-205. 2002.

Beutler, B. e E. T. Rietschel. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. Nat Rev Immunol, v.3, n.2, Feb, p.169-76. 2003.

Bone, R. C., R. A. Balk, *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest

Physicians/Society of Critical Care Medicine. Chest, v.101, n.6, Jun, p.1644-55. 1992.

Brahmajothi, M. V. e D. L. Campbell. Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart : implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. Circ Res, v.85, n.7, Oct 1, p.575-87. 1999.

Buckley, J. F., M. Singer, *et al.* Role of KATP channels in sepsis. Cardiovasc Res, v.72, n.2, Nov 1, p.220-30. 2006.

Buras, J. A., B. Holzmann, *et al.* Animal models of sepsis: setting the stage. Nat Rev Drug Discov, v.4, n.10, Oct, p.854-65. 2005.

Calvin, J. E., A. A. Driedger, *et al.* An assessment of myocardial function in human sepsis utilizing ECG gated cardiac scintigraphy. Chest, v.80, n.5, Nov, p.579-86. 1981.

Castro, C. H. Avaliação dos efeitos da angiotensina-(1-7) e do seu receptor MAS no controle da função cardíaca utilizando animais geneticamente modificados. (Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Fisiologia). Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais). 2008. 114 p.

Castro, C. H., R. A. Santos, *et al.* Effects of genetic deletion of angiotensin-(1-7) receptor Mas on cardiac function during ischemia/reperfusion in the isolated perfused mouse heart. Life Sci, v.80, n.3, Dec 23, p.264-8. 2006.

Celes, M. R., D. Torres-Duenas, *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. Crit Care Med, v.35, n.9, Sep, p.2176-85. 2007.

Celes, M. R. N. Remodelamento do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, do disco intercalar e das proteínas contráteis no coração de camundongos submetidos à sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco. Tese Doutorado em Ciências Médicas. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo. 111 p.2008.

Chagnon, F., M. Bentourkia, *et al.* Endotoxin-induced heart dysfunction in rats: assessment of myocardial perfusion and permeability and the role of fluid resuscitation. Crit Care Med, v.34, n.1, Jan, p.127-33. 2006.

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. Nature, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.885-91. 2002.

Cohen, R. I., D. Wilson, *et al.* Nitric oxide modifies the sarcoplasmic reticular calcium release channel in endotoxemia by both guanosine-3',5' (cyclic) phosphate-dependent and independent pathways. Crit Care Med, v.34, n.1, Jan, p.173-81. 2006.

Cripps, R. M. e E. N. Olson. Control of cardiac development by an evolutionarily conserved transcriptional network. Dev Biol, v.246, n.1, Jun 1, p.14-28. 2002.

Durante, W. Regulation of L-arginine transport and metabolism in vascular smooth muscle cells. Cell Biochem Biophys, v.35, n.1, p.19-34. 2001.

Eroschenko, V. P. di Fiore's Atlas of Histology with Functional Correlations. 10 ed. Lippincott Williams & Wilkins. Disponível em: <http://www.cord.edu/faculty/todt/336/lab/muscle/>. Acesso em 14 de Novembro de 2009. 2004.

Ferdinandy, P., D. Panas, *et al.* Peroxynitrite contributes to spontaneous loss of cardiac efficiency in isolated working rat hearts. Am J Physiol, v.276, n.6 Pt 2, Jun, p.H1861-7. 1999.

Fernandes, D. Dinâmica da guanilato ciclase solúvel na sepse: Uma janela de oportunidade. (Tese Doutorado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina). 2006. 132 p.

Fernandes, D., Assreuy, J. Óxido Nítrico e Sepse. In: Cid Marcos David; Hugo Castro Faria Neto. (Org.). Sepse: da bancada à beira do leito. Rio de Janeiro: REVINTER, v.1. 2007

Fernandez-Cobo, M., C. Gingalewski, *et al.* Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. Cytokine, v.11, n.3, Mar, p.216-24. 1999.

Ferrier, G. R. e S. E. Howlett. Cardiac excitation-contraction coupling: role of membrane potential in regulation of contraction. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.280, n.5, May, p.H1928-44. 2001.

Fukuda, N., D. Sasaki, *et al.* Length dependence of tension generation in rat skinned cardiac muscle: role of titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. Circulation, v.104, n.14, Oct 2, p.1639-45. 2001.

Fukuta, H. L., W. C. The cardiac cycle and the physiological basis of left ventricular contraction, ejection, relaxation, and filling. NIH - PA Author Manuscript. 2009

Funk, D. J., J. E. Parrillo, *et al.* Sepsis and septic shock: a history. Crit Care Clin, v.25, n.1, Jan, p.83-101, viii. 2009.

Gao, C. Q., G. Sawicki, *et al.* Matrix metalloproteinase-2 mediates cytokine-induced myocardial contractile dysfunction. Cardiovasc Res, v.57, n.2, Feb, p.426-33. 2003.

Geroulanos, S. e E. T. Douka. Historical perspective of the word "sepsis". Intensive Care Med, v.32, n.12, Dec, p.2077. 2006.

Gordon, M. Medical Pharmacology and Disease-Based Integrated Instruction. Chapter 43: Adult Cardiac Procedures: Anesthesia Considerations - Cardiovascular Physiology. Disponível em: http://www.pharmacology2000.com/Cardio/Cardio_risk/adult_cardiac_procedures/physiol1.htm. Acesso em: 13 de Novembro de 2009. 2000.

Granger, D. L., J. B. Hibbs, Jr., *et al.* Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. J Clin Invest, v.85, n.1, Jan, p.264-73. 1990.

Gulick, T., M. K. Chung, *et al.* Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. Proc Natl Acad Sci U S A, v.86, n.17, Sep, p.6753-7. 1989.

Gupta, S., T. C. Westfall, *et al.* Teaching principles of cardiovascular function in a medical student laboratory. Adv Physiol Educ, v.29, n.2, Jun, p.118-27. 2005.

Gutstein, D. E., F. Y. Liu, *et al.* The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. J Cell Sci, v.116, n.Pt 5, Mar 1, p.875-85. 2003.

Guyton, A. C. H., J. E. Textbook of medical physiology. Pensilvânia: Elsevier. 2006

Hahn, P. Y., P. Wang, *et al.* Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. Shock, v.4, n.4, Oct, p.269-73. 1995.

Heckert, B. T. Curso temporal de alterações fisiopatológicas em um modelo de sepse experimental em camundongos: Perfil de expressão das enzimas óxido nítrico sintases. (Dissertação Mestrado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina). 2008. 70 p.

Hein, S., S. Kostin, *et al.* The role of the cytoskeleton in heart failure. Cardiovasc Res, v.45, n.2, Jan 14, p.273-8. 2000.

Herring, N., E. J. Danson, *et al.* Cholinergic control of heart rate by nitric oxide is site specific. News Physiol Sci, v.17, Oct, p.202-6. 2002.

Heusch, G., R. Schulz, *et al.* Myocardial hibernation: a delicate balance. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.288, n.3, Mar, p.H984-99. 2005.

Hogg, N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.42, p.585-600. 2002.

Hollenberg, S. M., T. S. Ahrens, *et al.* Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. Crit Care Med, v.32, n.9, Sep, p.1928-48. 2004.

Hubbard, W. J., M. Choudhry, *et al.* Cecal ligation and puncture. Shock, v.24 Suppl 1, Dec, p.52-7. 2005.

Hurlbert, R. Chapter 1: a brief history of microbiology: Microbiology 101/102 internet text [online]. Disponível em:<http://www.slic2.wsu.edu:82/hurlbert/micro101/pages/Chap1.html>. Acesso em 26 de Outubro de 2009. p. 1999.

Jean-Baptiste, E. Cellular mechanisms in sepsis. J Intensive Care Med, v.22, n.2, Mar-Apr, p.63-72. 2007.

Jones, S. B. e F. D. Romano. Myocardial beta adrenergic receptor coupling to adenylate cyclase during developing septic shock. Circ Shock, v.30, n.1, Jan, p.51-61. 1990.

Katsumi, A., A. W. Orr, *et al.* Integrins in mechanotransduction. J Biol Chem, v.279, n.13, Mar 26, p.12001-4. 2004.

Kaupp, U. B. e R. Seifert. Molecular diversity of pacemaker ion channels. Annu Rev Physiol, v.63, p.235-57. 2001.

- Keen, L. J. The extent and analysis of cytokine and cytokine receptor gene polymorphism. Transpl Immunol, v.10, n.2-3, Aug, p.143-6. 2002.
- Kleber, A. G. e Y. Rudy. Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. Physiol Rev, v.84, n.2, Apr, p.431-88. 2004.
- Kostetskii, I., J. Li, *et al.* Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. Circ Res, v.96, n.3, Feb 18, p.346-54. 2005.
- Kostin, S., S. Hein, *et al.* The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. Heart Fail Rev, v.5, n.3, Oct, p.271-80. 2000.
- Kostin, S., D. Scholz, *et al.* The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. Cell Tissue Res, v.294, n.3, Dec, p.449-60. 1998.
- Lapidos, K. A., R. Kakkar, *et al.* The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. Circ Res, v.94, n.8, Apr 30, p.1023-31. 2004.
- Levy, M. M., M. P. Fink, *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Intensive Care Med, v.29, n.4, Apr, p.530-8. 2003.
- Li, L., J. Desantiago, *et al.* Phosphorylation of phospholamban and troponin I in beta-adrenergic-induced acceleration of cardiac relaxation. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.278, n.3, Mar, p.H769-79. 2000.
- Liaudet, L., J. G. Mabley, *et al.* Inosine reduces systemic inflammation and improves survival in septic shock induced by cecal ligation and puncture. Am J Respir Crit Care Med, v.164, n.7, Oct 1, p.1213-20. 2001.
- Lim, W., I. Qushmaq, *et al.* Elevated cardiac troponin measurements in critically ill patients. Arch Intern Med, v.166, n.22, Dec 11-25, p.2446-54. 2006.
- Liu, S. e K. D. Schreur. G protein-mediated suppression of L-type Ca²⁺ current by interleukin-1 beta in cultured rat ventricular myocytes. Am J Physiol, v.268, n.2 Pt 1, Feb, p.C339-49. 1995.

Marshall, J. e D. Sweeney. Microbial infection and the septic response in critical surgical illness. Sepsis, not infection, determines outcome. Arch Surg, v.125, n.1, Jan, p.17-22; discussion 22-3. 1990.

Massion, P. B., O. Feron, *et al.* Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. Circ Res, v.93, n.5, Sep 5, p.388-98. 2003.

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

Mazgalev, T. N., S. Y. Ho, *et al.* Anatomic-electrophysiological correlations concerning the pathways for atrioventricular conduction. Circulation, v.103, n.22, Jun 5, p.2660-7. 2001.

Merx, M. W. e C. Weber. Sepsis and the heart. Circulation, v.116, n.7, Aug 14, p.793-802. 2007.

Neviere, R., B. Guery, *et al.* Inhaled NO reduces leukocyte-endothelial cell interactions and myocardial dysfunction in endotoxemic rats. Am J Physiol Heart Circ Physiol, v.278, n.6, Jun, p.H1783-90. 2000.

Nisoli, E., E. Clementi, *et al.* Mitochondrial biogenesis in mammals: the role of endogenous nitric oxide. Science, v.299, n.5608, Feb 7, p.896-9. 2003.

Oddis, C. V. e M. S. Finkel. Cytokines and nitric oxide synthase inhibitor as mediators of adrenergic refractoriness in cardiac myocytes. Eur J Pharmacol, v.320, n.2-3, Feb 12, p.167-74. 1997.

Olson, E. N. A decade of discoveries in cardiac biology. Nat Med, v.10, n.5, May, p.467-74. 2004.

Opal, S. M. The host response to endotoxin, antilipopolsaccharide strategies, and the management of severe sepsis. Int J Med Microbiol, v.297, n.5, Sep, p.365-77. 2007.

Palmer, L. J. Linkages and associations to intermediate phenotypes underlying asthma and allergic disease. Curr Opin Allergy Clin Immunol, v.1, n.5, Oct, p.393-8. 2001.

Parker, M. M., K. E. McCarthy, *et al.* Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. Chest, v.97, n.1, Jan, p.126-31. 1990.

Parker, M. M., J. H. Shelhamer, *et al.* Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. Ann Intern Med, v.100, n.4, Apr, p.483-90. 1984.

_____. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. Crit Care Med, v.15, n.10, Oct, p.923-9. 1987.

Parrillo, J. E., C. Burch, *et al.* A circulating myocardial depressant substance in humans with septic shock. Septic shock patients with a reduced ejection fraction have a circulating factor that depresses in vitro myocardial cell performance. J Clin Invest, v.76, n.4, Oct, p.1539-53. 1985.

Parrillo, J. E., M. M. Parker, *et al.* Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. Ann Intern Med, v.113, n.3, Aug 1, p.227-42. 1990.

Petrashchevskaya, N. N., S. E. Koch, *et al.* Calcium cycling, historic overview and perspectives. Role for autonomic nervous system regulation. J Mol Cell Cardiol, v.34, n.8, Aug, p.885-96. 2002.

Piper, R. D., F. Y. Li, *et al.* Structure-function relationships in the septic rat heart. Am J Respir Crit Care Med, v.156, n.5, Nov, p.1473-82. 1997.

Price, S., P. B. Anning, *et al.* Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications. Eur Heart J, v.20, n.10, May, p.715-24. 1999.

Price, S., T. W. Evans, *et al.* Nitric oxide supports atrial function in sepsis: relevance to side effects of inhibitors in shock. Eur J Pharmacol, v.449, n.3, Aug 9, p.279-85. 2002.

Price, S., J. A. Mitchell, *et al.* Type II nitric oxide synthase activity is cardio-protective in experimental sepsis. Eur J Pharmacol, v.472, n.1-2, Jul 4, p.111-8. 2003.

Raeburn, C. D., C. M. Calkins, *et al.* ICAM-1 and VCAM-1 mediate endotoxemic myocardial dysfunction independent of neutrophil accumulation. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.283, n.2, Aug, p.R477-86. 2002.

Rang, H. P. D., M. M.; Ritter, J. M. . Farmacologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 4.ed. 2001

Rangel-Frausto, M. S. Sepsis: still going strong. Arch Med Res, v.36, n.6, Nov-Dec, p.672-81. 2005.

Remick, D. G., D. E. Newcomb, *et al.* Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. Shock, v.13, n.2, Feb, p.110-6. 2000.

Rittirsch, D., M. S. Huber-Lang, *et al.* Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. Nat Protoc, v.4, n.1, p.31-6. 2009.

Roden, D. M., J. R. Balsler, *et al.* Cardiac ion channels. Annu Rev Physiol, v.64, p.431-75. 2002.

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

Rudiger, A. e M. Singer. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. Crit Care Med, v.35, n.6, Jun, p.1599-608. 2007.

Sales, J. A. L. J. D., C. M.; Hatum, R.; Souza, P. C. S. P.; Japiassu, A.; Pinheiro, C.T.S.; Friedman,G.; Silva, O.B; Dias, M.D.; Koterba, E.; Dias, F.S.; Piras, C. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. . Rev. bras. ter. intensiva [online]. v. vol.18, n.1, p.pp. 9-17. 2006.

Schulz, R., T. Rassaf, *et al.* Recent advances in the understanding of the role of nitric oxide in cardiovascular homeostasis. Pharmacol Ther, v.108, n.3, Dec, p.225-56. 2005.

Severs, N. J. The cardiac muscle cell. Bioessays, v.22, n.2, Feb, p.188-99. 2000.

Sherwood, E. R. e T. Toliver-Kinsky. Mechanisms of the inflammatory response. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, v.18, n.3, Sep, p.385-405. 2004.

Sill, B., P. E. Hammer, *et al.* Optical mapping of Langendorff-perfused rat hearts. J Vis Exp, n.30. 2009.

Silva, E., A. Pedro Mde, *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care, v.8, n.4, Aug, p.R251-60. 2004.

Silverthorn, D. U. O., W. C.; Garrison, C. W.; Silverthorn, A. C. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. São Paulo: Manole. 2003

Skrzypiec-Spring, M., B. Grotthus, *et al.* Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium. J Pharmacol Toxicol Methods, v.55, n.2, Mar-Apr, p.113-26. 2007.

Takeuchi, K., P. J. Del Nido, *et al.* Increased myocardial calcium cycling and reduced myofilament calcium sensitivity in early endotoxemia. Surgery, v.126, n.2, Aug, p.231-8. 1999.

Tang, C. e M. S. Liu. Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. Am J Physiol, v.270, n.1 Pt 2, Jan, p.R254-63. 1996.

Tavernier, B., A. Mebazaa, *et al.* Phosphorylation-dependent alteration in myofilament ca²⁺ sensitivity but normal mitochondrial function in septic heart. Am J Respir Crit Care Med, v.163, n.2, Feb, p.362-7. 2001.

Terluk, M. R. Respostas vasculares mediadas pelo óxido nítrico: Efeitos de agentes oxidantes na hiporeatividade à fenilefrina e no relaxamento induzido por tióis. (Tese Doutorado em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina). 2005. 142 p.

Ungerer, M., G. Parruti, *et al.* Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart. Circ Res, v.74, n.2, Feb, p.206-13. 1994.

Waisbren, B. A. Bacteremia due to gram-negative bacilli other than the Salmonella; a clinical and therapeutic study. AMA Arch Intern Med, v.88, n.4, Oct, p.467-88. 1951.

Wichterman, K. A., A. E. Baue, *et al.* Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. J Surg Res, v.29, n.2, Aug, p.189-201. 1980.

Wink, D. A., I. Hanbauer, *et al.* Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. Proc Natl Acad Sci U S A, v.90, n.21, Nov 1, p.9813-7. 1993.

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

Xiao, H., J. Siddiqui, *et al.* Mechanisms of mortality in early and late sepsis. Infect Immun, v.74, n.9, Sep, p.5227-35. 2006.

Zardi, E. M., D. M. Zardi, *et al.* Prostacyclin in sepsis: a systematic review. Prostaglandins Other Lipid Mediat, v.83, n.1-2, Feb, p.1-24. 2007.

Zhong, J., T. C. Hwang, *et al.* Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from endotoxemic guinea pigs. Am J Physiol, v.273, n.5 Pt 2, Nov, p.H2312-24. 1997.

Zhou, M., P. Wang, *et al.* Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late, hypodynamic stage of sepsis. Shock, v.9, n.5, May, p.352-8. 1998.

Zorn-Pauly, K., B. Pelzmann, *et al.* Endotoxin impairs the human pacemaker current If. Shock, v.28, n.6, Dec, p.655-661. 2007.

