Clara Batista Lorigados

**Estudo da relação entre pressão de
perfusão coronariana e função cardíaca
em ratos endotoxêmicos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Ciências Médicas

Área de Concentração: Distúrbios do

Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da

Hemostasia

Orientador: Prof. Dr. Irineu Tadeu Velasco

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lorigados, Clara Batista

Estudo da relação entre pressão de perfusão coronariana e função cardíaca em ratos endotoxêmicos / Clara Batista Lorigados. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios do Crescimento Celular, Hemodinâmicos e da Hemostasia.

Orientador: Irineu Tadeu Velasco.

Descritores: 1.Ratos Wistar 2.Endotoxemia 3.Doenças cardiovasculares
4.Circulação coronária 5.Perfusão

USP/FM/DBD-166/14

Dedicatória

A meu Pai Dionisio e minha Mãe Minervina (in memoriam), pelo exemplo de dedicação, responsabilidade e honestidade. A eles eu devo tudo que sou.

A meus irmãos Wilson e Carla; se outrora ajudei a criá-los, hoje são meus guardiões. Vocês me enchem de orgulho.

A meus filhos, Victor e Felipe, inspiradores desta empreitada, luz e razão de tudo na minha vida; meus maiores e melhores “projetos”.

A meu esposo e professor Francisco, exemplo de dedicação e paixão pela ciência; seu entusiasmo pela pesquisa me contagiou.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. Irineu T. Velasco, por ser meu orientador e ter me dado a oportunidade de trabalhar no LIM.

Ao Professor Dr. Heraldo Possollo pelo acolhimento no laboratório e pela “torcida”.

A Suely, pela inestimável ajuda nos experimentos e pela parceria; a seus filhos e esposo, que tiveram que esperá-la algumas vezes até mais tarde.

Aos colegas do LIM 51, a Kelli, pelas horas agradáveis, festas, orientações, que tornaram a jornada menos difícil. Aos funcionários do LIM-51 e do biotério.

Ao Dr. Sergio (LIM 10) e Dra Wilma(LIM 17) pela colaboração com equipamento.

A Angélica e Rose, secretárias da pós-graduação, pelo zelo, pela atenção.

Aos colegas médicos, enfermeiros e fisioterapeutas da UTI-IOT do HCFMUSP pelo incentivo.

"As ciências têm as raízes amargas, porém os frutos são doces."

(Aristóteles)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver)*.

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª Edição São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de siglas

Resumo

Summary

1	Introdução.....	1
2	Revisão de Literatura.....	4
2.1	Incidência e mortalidade.....	4
2.2	Etiologia.....	5
2.3	Resposta Inflamatória.....	6
2.4	Diagnóstico	8
2.5	Quadro clínico.....	12
2.6	Alterações hemodinâmicas	13
2.7	Mecanismos da disfunção miocárdica.....	22
2.7.1	Energético.....	22
2.7.2	Fatores depressores do cardiomiócito	25
2.7.3	Alterações metabólicas	27
2.7.4	Desregulação autonômica	27
3	Objetivos.....	28
4	Materiais e Métodos.....	29
5	Resultados.....	39
6	Discussão.....	64
7	Conclusões.....	71
8	Referências.....	72

Lista de siglas e abreviações

ATP	Adenosina trifosfato
ARA	Araminol
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
CAP	Cateter de artéria pulmonar
CDC	Centro de controle de doenças
DAMP	Padrão molecular associado ao dano
DC	Débito cardíaco
dP/dt max	Velocidade máxima de elevação da pressão ventricular
dP/dt min	Velocidade máxima de queda da pressão ventricular
dp	Desvio-padrão
EDV	Volume diastólico final
FE	Fração de ejeção
FC	Frequência cardíaca
FiO ₂	Fração inspirada de oxigênio
FR	Frequência respiratória
Ees	Elastância sistólica final
IC	Índice cardíaco
IL	Interleucina
INR	<i>international normalized ratio</i>
Ip	Intraperitoneal
Iv	Intravenoso
LBP	Proteína ligadora de LPS

LPS	Lipopolissacarídeo
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
ME	Microesferas
min	Minuto
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintetase
NOR	Norepinefrina
PaO ₂	Pressão parcial de oxigênio arterial
PAD	Pressão arterial diastólica
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrão molecular associado ao patógeno
PAP	Pressão de artéria pulmonar
PAS	Pressão arterial sistólica
PCR	Proteína C reativa
PdfVE	Pressão diastólica final de ventrículo esquerdo
PPC	Pressão de perfusão coronariana
PP	Pressão de pulso
PsfVE	Pressão sistólica final de ventrículo esquerdo
PVC	Pressão venosa central
RPM	Rotações por minuto
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SF	Solução fisiológica 0,9%
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SW	Trabalho sistólico
TAU	Constante de tempo de relaxamento ventricular
TLR	Receptor <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TTPA	Tempo de tromboplastina parcial ativada
UTI	Unidade de terapia intensiva
VD	Ventrículo direito
VdfVE	Volume diastólico final de ventrículo esquerdo
VE	Ventrículo esquerdo
VS	Versus
VsfVE	Volume sistólico final de ventrículo esquerdo

Resumo

Lorigados, CB. Estudo da relação entre pressão de perfusão coronariana e função cardíaca em ratos endotoxêmicos [Tese]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Pacientes sépticos com disfunção miocárdica apresentam mortalidade significativamente superior comparados aos sépticos sem alteração cardiovascular. Vários mecanismos contribuem para disfunção orgânica na sepse, como diminuição de perfusão tecidual. A sepse está relacionada a alterações na microcirculação e na permeabilidade capilar que apresentam papel fundamental na fisiopatologia das disfunções orgânicas. O objetivo do estudo foi analisar o papel da pressão de perfusão coronariana como fator determinante do fluxo sanguíneo na microcirculação miocárdica e sua correlação com a função cardíaca sistólica e diastólica em ratos endotoxêmicos. Ratos machos, Wistar, 300g, receberam LPS 10 mg/kg ip. Após uma hora e meia da injeção, um cateter de pressão-volume foiocado no VE e um cateter pressórico na artéria femoral para aquisição dos parâmetros hemodinâmicos cardíacos e sistêmicos respectivamente. Foram estudados os ratos que apresentaram choque endotoxêmico ($PAM \leq 65$ mmHg). Um grupo foi tratado com norepinefrina iv e outro com araminol iv, para atingir PAM de 85 mmHg. Para o estudo do fluxo sanguíneo, microesferas amarelas (15 μ m) foram injetadas no VE para analisar a microcirculação cardíaca. O coração foi analisado em três partes: VD, região epicárdica e região subendocárdica do VE. O estudo demonstrou uma redução de 58% na PPC e de 50% no fluxo miocárdico nos ratos com choque endotoxêmico. Houve queda de 34% na dP/dt max e 15% na dP/dt min comparados ao controle. Os parâmetros de função cardíaca sistólica volume-independentes, Ees e $dP/dt_{max} / EDV$, também apresentaram redução. Nos ratos tratados com norepinefrina, observou-se aumento da PPC (38 ± 2 vs. 59 ± 3 mmHg, LPS vs. LPS+NOR) e do fluxo sanguíneo miocárdico ($2,0 \pm 0,6$ vs. $6,2 \pm 0,8$ mL/min.g tecido, LPS vs. LPS+NOR) e os índices de função cardíaca sistólica e diastólica mostraram recuperação. A PPC apresentou correlação significativa com o fluxo sanguíneo subendocárdico do VE. Os dados demonstraram que os animais em choque endotoxêmico e, portanto com PPC baixa, apresentaram redução no fluxo sanguíneo na microcirculação miocárdica, sobretudo no ventrículo direito e na região subendocárdica de VE. Isto se correlacionou com a disfunção cardíaca sistólica e diastólica. Ao elevar-se a PPC com a utilização de norepinefrina, houve aumento do fluxo sanguíneo miocárdico acompanhado de recuperação dos índices de função cardíaca.

Descritores: Ratos Wistar, endotoxemia, doenças cardiovasculares, circulação coronária, perfusão.

Summary

Lorigados, CB. Septic myocardial dysfunction: role of coronary driving pressure in the subendocardic perfusion [Thesis]. São Paulo. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014.

Septic patients with myocardial dysfunction have higher mortality compared to patients with no cardiovascular alteration. The aim of the present study was to investigate the role of coronary driving pressure as determinant factor of myocardial microcirculation blood flow and its correlation with the cardiac function in endotoxemic heart. Wistar rats, male, 300g were used. Endotoxemia was induced by the injection of 10 mg / kg ip LPS. After 1.5 h of injection, hemodynamic evaluation was performed. It was studied rats with MAP $\leq$ 65 mmHg. Norepinephrine and amlinor were used to handle MAP to 85 mmHg. Millar catheter was placed in the left ventricle to the acquisition of cardiac parameters. Microspheres were infused into the left ventricle with a pump and it was collected blood from femoral artery and tissue samples, to measure blood flow in the myocardium (RV, subendocardium LV e epicardium LV) and other organs. Left ventricle parameters demonstrated a reduction (34%) in dP/dt max and (15%) in dP/dt min. Load independent indexes, Ees and dP/dtmax/ EDV showed a reduction after LPS. The coronary driving pressure was (58%) reduced in the endotoxemic rats. We found a reduction in myocardial blood flow (80%) in animals with mean arterial blood pressure below 65 mmHg. Norepinephrine increased coronary driving pressure (38 ± 2 vs. 59 ± 3 mmHg LPS vs. LPS+NOR), and microcirculation perfusion (2.0 ± 0.6 vs. 6.2 ± 0.8 mL/min.g tissue, LPS vs. LPS+NOR). Coronary driving pressure presented a significant correlation with sub endocardium blood flow.

These data indicated that myocardial blood flow of left ventricle subendocardial region and right ventricle was decreased in endotoxemic rats in a coronary driving pressure dependent way. The reduced myocardial blood flow was determinant of cardiac dysfunction. Increasing systemic arterial blood pressures and consequently the coronary driving pressure, it succeeded to improve myocardial blood flow and cardiac function.

Key words: Rats, Wistar, endotoxemia, cardiovascular diseases, coronary circulation, perfusion.

1 Introdução

Sepse, sépsis ou sepsia, palavra de etimologia grega que significa putrefação. A primeira descrição de choque séptico encontrada na literatura foi de Hipócrates (460 a.C.): “Quando a febre é contínua e a superfície externa do corpo está fria, existe internamente uma sensação de calor e sede, a afecção é mortal”[1].

A teoria de Semmelweis, Pasteur e outros sobre a associação microrganismo-doença trouxe o conceito de que sepsé era uma infecção sistêmica, um “envenenamento do sangue”. Mais tarde, mesmo com o advento de potentes antibióticos, muitos pacientes ainda morriam e um novo entendimento se estabeleceu, de que era a resposta do hospedeiro e não o microrganismo que comandava a patogênese da sepsé [2]. Sepsé atualmente é definida como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) a um processo infeccioso suspeito ou documentado, causado por bactérias, vírus ou fungos. É uma síndrome muito complexa em sua apresentação clínica, assim, dois pacientes sépticos nunca serão idênticos [3]. Interessante também é o fato de que nos estudos experimentais, apesar do grupo ter as mesmas características (gênero, peso, idade, raça, ambiente) e sofrer o mesmo insulto (por exemplo, lipopolissacarídeo 10 mg/kg intraperitoneal), uns animais morrem enquanto outros não.

Anteriormente, a ausência de claros critérios de definição e diagnóstico dificultava os estudos epidemiológicos e a avaliação sobre as terapêuticas implantadas e impossibilitava a extrapolação dos resultados para a prática clínica. Em 1992, *American College of Chest Physicians / Society of*

CriticalCare Medicine (ACCP/SCCM) Consensus Conference estabeleceu os critérios de diagnóstico para sepse, sepse grave e choque séptico [4].

As estatísticas mostram aumento da incidência de sepse devido ao envelhecimento da população (imunosenescência e comorbidades [5]), pacientes imunossuprimidos, cirurgias prolongadas de alto risco e surgimento de microrganismos resistentes [6-8], mas provavelmente também pelo aprimoramento da nossa capacidade de diagnosticar e oferecer tratamento intensivo. Adhikari e colaboradores estimaram cerca de 19 milhões de casos por ano no mundo [9]. Sepse grave acomete mais crianças e idosos, mais o gênero masculino e a raça negra[10]. Há cerca de 30 anos, a mortalidade do choque séptico era maior que 80%. Atualmente, com a monitorização e o suporte intensivos, o diagnóstico e tratamento precoces, são observadas mortalidades de 20-30% em vários trabalhos [11]. Porém, esta não é a realidade dos países em desenvolvimento, cuja mortalidade é maior [12].

Apesar de inúmeros ensaios clínicos [13-16], nenhuma nova intervenção terapêutica foi bem sucedida e o tratamento continua fundamentado em suporte hemodinâmico, antibioticoterapia e remoção do foco infeccioso quando possível. No entanto, estudo necroscópico demonstrou falhas na identificação e resolução do foco infeccioso [17] e muitos pacientes desenvolvem infecção nosocomial durante a internação. Com o insucesso terapêutico, o paciente morre por choque ou falência de múltiplos órgãos. Vários mecanismos podem contribuir para a disfunção orgânica na sepse. Ela está associada a alterações de perfusão tecidual, especialmente em estágios precoces da doença, e a alterações no metabolismo celular. As diretrizes de tratamento do choque

séptico têm enfatizado a importância da correção das alterações de perfusão precocemente, o que demonstrou melhorar o prognóstico. No entanto, mesmo quando as medidas hemodinâmicas globais estão otimizadas, disfunções na microcirculação podem estar presentes e contribuir com as alterações perfusionais.

Dentre as disfunções orgânicas, a cardiovascular é uma das manifestações-chave; apresenta papel crucial na fisiopatologia da sepse grave e choque séptico e contribui significativamente para o aumento da morbimortalidade dos pacientes na UTI. Trabalhos publicados nos últimos 50 anos têm apresentado evidências da disfunção miocárdica na sepse. No entanto, o coração como parte do sistema cardiovascular, responde constantemente às alterações na pré-carga, pós-carga e atividade neuro-humoral e torna complexa a avaliação específica da contratilidade e relaxamento miocárdico *in vivo*.

Graças aos grandes avanços tecnológicos, tanto na esfera experimental como clínica, muito foi elucidado. No entanto, estratégias terapêuticas precisam ser desenvolvidas visando alcançar o maior número de pacientes, mesmo em lugares menos favorecidos.

2 Revisão de Literatura

2.1 Incidência e mortalidade

Em 1990, o Centro de Controle de Doenças (CDC) estimou 415.000 casos de sepse por ano nos Estados Unidos (EUA) com cerca de 100.000 óbitos [18]. Estes números devem estar subestimados devido a metodologia empregada na época, mas o CDC já alertava para o crescimento dessas taxas. Angus e colaboradores publicaram em 2001 dados de 751.000 casos de sepse por ano resultando em cerca de 215.000 óbitos e um custo estimado de 16,7 bilhões de dólares nos EUA [8, 19].

O estudo Global Burden of Disease, conduzido pela Organização Mundial de Saúde e a Universidade de Harvard, a partir de dados da literatura, mostrou incidências de 300 casos por 100.000 pessoas por ano nos EUA; 123/100.000/ano na França e 38/100.000/ano na Noruega. Sobre os países subdesenvolvidos não havia dados de 1980 a 2008. A pesquisa englobou oito estudos, incluindo um do Brasil [20], que demonstraram grandes variações de incidências, mas com números em torno de 149-240/100.000 de sepse; 56-91/100.000 de sepse grave e 11/100.000 de choque séptico. As taxas de mortalidade foram de 30% para sepse, 50% para sepse grave e até 80% para choque séptico [21]. De acordo com National Vital Statistics Report [22], sepse foi a décima causa de morte nos EUA em 2007 (em 1990, era a décima terceira [23]). O estudo também mostrou que as internações por sepse (causa primária ou que a desenvolveram durante a hospitalização) aumentaram de 621.000 em 2000 para 1.141.000 em 2008. Pacientes sépticos têm estadias mais

prolongadas e mortalidades mais elevadas comparados a pacientes com outras enfermidades (por exemplo: pacientes com idade ≤ 65 anos, o tempo de internação foi maior que o dobro de outras enfermidades).

No Brasil, um estudo publicado em 2006, analisou dados de 75 unidades de terapia intensiva (UTI). Foram avaliados 65 hospitais de todas as regiões do país, mas com forte predomínio das regiões sul e sudeste, as mais desenvolvidas do país (73,8% dos hospitais e 85,8% dos pacientes do estudo). No período do estudo, 3128 pacientes foram admitidos em UTI, sendo que 521 (16,7%) apresentaram sepse. A mortalidade nos subgrupos sepse, sepse grave e choque séptico foi de 16,7%; 34,4% e 65,3% respectivamente [12].

Além da elevada mortalidade intra-hospitalar, vários estudos têm demonstrado risco aumentado de morte nos meses ou anos que se seguem a alta do paciente. Também ocorre diminuição da qualidade de vida, enfraquecimento físico, déficit cognitivo e alteração do humor. A determinação da sepse como fator causal destas alterações tem sido estudada[24].

2.2 Etiologia

A pneumonia é a causa mais comum de sepse, seguida por foco abdominal e infecção urinária [7]. Hemoculturas foram positivas em apenas um terço dos casos e as culturas de todos os sítios foram negativas em um terço dos pacientes. Em um estudo, em 62% das culturas positivas identificou-se bacilos Gram-negativos, em 47% bactérias gram-positivas e em 19% fungos [25]. Os agentes infecciosos mais frequentes foram *Staphylococcus aureus* e

Streptococcus pneumoniae entre as bactérias Gram-positivas, enquanto a *Escherichia coli*, *Klebsiella* e *Pseudomonas* predominaram entre os bacilos Gram-negativos [16].

2.3 Resposta Inflamatória

As bactérias Gram-positivas não têm endotoxinas, mas apresentam na parede celular peptideoglicanos e ácido lipoteicoico que podem ser reconhecidos por receptores de superfície das células imunológicas e são pró-inflamatórios. Entretanto, o mais importante é a produção de exotoxinas, como a toxina da síndrome do choque tóxico (TSST-1) do *Staphylococcus aureus*.

No caso das bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS ou endotoxina) apresenta o papel principal. A parede externa destas bactérias é formada de dupla camada lipídica, peptideoglicanos adjacente à membrana citoplasmática. A molécula de LPS está embebida na membrana externa e o lípide A, seu principal constituinte, funciona como uma âncora na parede celular e é responsável pela atividade biológica do LPS.

O LPS é um padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) que é reconhecido pela resposta imunológica inata celular mediada principalmente por neutrófilos, monócitos e células endoteliais. A figura 1 resume a sequência dos acontecimentos [15], do reconhecimento do LPS à produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias.

Figura1. Reconhecimento do lipopolissacarídeo (LPS): o principal mecanismo é via ligação da proteína ligadora de LPS (LBP)+ LPS e CD14 e apresentação ao receptor *Toll-like* 4 (TLR4) –MD2. A família Toll tem receptores dirigidos para diferentes PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno). No entanto, outras moléculas na superfície celular também reconhecem o LPS como o MSR (receptor do macrófago sequestrador), CD11b/CD18 e canais iônicos (K^+). A sinalização intracelular depende da ligação do domínio TLR intracelular, o TIR (domínio do receptor homólogo do *Toll/IL-1*), ao IRAK (quinase associada ao receptor de IL1) e associação ao TRAF 6 (receptor do fator de necrose tumoral). Este processo é facilitado por dois adaptadores proteicos MyD88 (proteína de mielodiferenciação 88) e TIRAP (domínio do *TIR* -contendo adaptador proteico, também chamado *MyD88*-proteína adaptadora-like), e inibido por Tollip (*Toll-interacting protein*). O I κ B (inibidor do NF- κ B) libera o fator (pela ação do IKK, complexo I κ B quinase) e ocorre a translocação nuclear do NF- κ B (fator de transcrição nuclear) e ativação dos promotores dos genes das citocinas. Há uma via de ativação do NF- κ B independente do MYD88: TIRAP/Mal sinaliza através de PKR (proteinoquinase *RNA-dependente*) e IRF-3 (fator regulador do *interferon*). Também há os receptores intracelulares, as proteínas NOD (domínio de oligomerização ligada ao nucleotídeo) que responderiam ao LPS. O NF- κ B é um dos muitos fatores de transcrição que são ativados na sepse e é de extrema importância. Ele é responsável pela transcrição de genes relacionados à atividade inflamatória como TNF- α , IL-6, IL-8, LPB e iNOS (óxido nítrico sintetase induzida). A via MAPK (*mitogen-activated protein-quinase*) também apresenta papel importante na resposta inata. Adaptado de Cohen, Nature 2002 [15].

O reconhecimento do LPS pelo hospedeiro deflagra a produção de mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios (componente humoral da resposta imunológica inata). A gravidade da resposta é definida pela resistência do hospedeiro e virulência do microrganismo. A virulência do microrganismo depende do tipo, número e sítio de invasão. A imunocompetência do hospedeiro inclui fatores como idade, gênero, predisposição genética, estado nutricional, comorbidades, medicamentos, abuso de drogas e/ou álcool [26].

Durante muito tempo se acreditou que o quadro séptico se devia a uma resposta inflamatória descontrolada. A detecção de citocinas elevadas como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina-1 β no paciente séptico levou ao conceito de “tempestade de citocinas”. Atualmente há evidências de que as respostas pró e anti-inflamatórias ocorrem concomitantemente. Dos vários estudos [27-32] com dosagens de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias pode-se resumir: alguns pacientes sépticos rapidamente produzem citocinas pró e anti-inflamatórias, enquanto outros têm predominância de citocinas anti-inflamatórias ou produção globalmente deprimida [26].

2.4 Diagnóstico

O diagnóstico da sepse baseia-se em critérios clínicos e laboratoriais. Assim, ainda hoje é difícil diagnosticá-la precocemente com alta sensibilidade e especificidade. Tem se utilizado as substâncias produzidas em resposta à infecção, os biomarcadores, como instrumentos diagnósticos. Diversos biomarcadores estão sendo avaliados como Proteína C Reativa (PCR), procalcitonina, receptor de gatilho solúvel expresso em células mieloides (*soluble*

triggering receptor expressed on myeloid cells-1, sTREM-1); mas até o momento, nenhuma dosagem mostrou ser adequada isoladamente. Outros estudos analisaram dosagens de três marcadores ou mais simultaneamente com melhores resultados (ex. procalcitonina e sTREM-1 séricos e expressão de CD64 nos neutrófilos) [33]. Também há pesquisas para biomarcadores de disfunções orgânicas, acompanhamento da terapêutica e prognóstico, sem sucesso estabelecido até o momento[34].

Os critérios de diagnóstico de sepse foram revistos [35] na *International Sepsis Definitions Conference*[36] e atualmente encontram-se assim estabelecidos como descrito no quadro um.

Quadro 1. Critérios diagnósticos de sepse, sepse grave e choque séptico.

1. Sepse: infecção suspeita ou documentada e alguns dos sinais a seguir:
Variáveis gerais
<ul style="list-style-type: none"> • Temperatura corpórea > 38.3°C ou <36.0°C
<ul style="list-style-type: none"> • Frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto
<ul style="list-style-type: none"> • Frequência respiratória > 20 incursões por minuto ou PCO₂ arterial <32 mm Hg ou necessidade de ventilação mecânica
<ul style="list-style-type: none"> • Alteração do nível de consciência
<ul style="list-style-type: none"> • Edema significativo ou balanço positivo (>20 mL/kg em + de 24 h)
<ul style="list-style-type: none"> • Hiperglicemia (glicemia >140mg/dL na ausência de diabetes mellitus)

Variáveis inflamatórias

- Leucócitos $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4000/\text{mm}^3$ ou formas imaturas $> 10\%$
 - Proteína C Reativa acima de dois dp acima do valor normal
 - Procalcitonina plasmática acima de dois dp acima do valor normal
-

Variáveis hemodinâmicas

- Hipotensão arterial (sistólica < 90 mmHg, média < 70 mmHg, ou queda da sistólica maior que 40 mmHg em adultos ou menos que dois dp abaixo da pressão normal para idade)
-

Variáveis de disfunção orgânica

- Hipoxemia ($\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 300$)
 - Oligúria aguda (débito urinário $< 0,5$ mL/kg/h por pelo menos duas horas a despeito de expansão volêmica)
 - Elevação da creatinina $> 0,5$ mg/dL
 - Alterações de coagulação (*international normalized ratio*, INR $> 1,5$ ou TTPA > 60 s)
 - Íleo
-

- Trombocitopenia ($<100.000/\text{mm}^3$)
- Hiperbilirrubinemia (bilirrubina total $>4\text{ mg/dL}$)

Variáveis de perfusão tecidual

- Hiperlactatemia ($> 1\text{ mmol/L}$)
- Reenchimento capilar diminuído

2. Sepses graves: sinais de hipoperfusão tecidual ou disfunção orgânica induzida pela sepsis

- Hipotensão
- Aumento do lactato
- Diminuição do débito urinário
- $\text{PaO}_2/\text{FIO}_2 < 250$ na ausência de pneumonia ou < 200 na presença de pneumonia
- Creatinina $> 2,0\text{ mg/dL}$
- Bilirrubina $> 2\text{ mg/dL}$
- Plaquetas $< 100.000/\text{mm}^3$

- Coagulopatia (INR >1,5)

3. Choque séptico: hipotensão induzida pela sepse persistente, a despeito da expansão volêmica.

2.5 Quadro clínico

A manifestação clínica da sepse pode ser variável; geralmente se apresenta como um quadro rapidamente evolutivo e exuberante (febre, leucocitose, choque, insuficiência respiratória), mas um paciente idoso, diabético, dialítico pode não manifestar nenhum sinal óbvio, e apresentar apenas alteração da glicemia e diminuição do nível de consciência. As disfunções orgânicas na sepse acometem mais comumente os sistemas respiratório, cardiovascular, nervoso central e renal. Outras manifestações frequentes são: íleo paralítico, alterações da coagulação e do controle glicêmico, etc. Nos quadros graves desenvolve-se hipotensão resultante da diminuição do tônus vascular, do aumento da permeabilidade e da cardiomiopatia, levando a redução da fração de ejeção, do volume sistólico, da pressão arterial sistêmica e prejuízo da perfusão tecidual. A hipoperfusão é agravada pelas alterações na microcirculação. A persistência deste quadro leva a lesão celular e liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), como proteínas mitocondriais, adenosina e ácido úrico. Assim como os PAMPs, os DAMPs são pró-inflamatórios e criam um ciclo vicioso[37].

2.6 Alterações hemodinâmicas

Vários estudos em diferentes modelos experimentais e clínicos de sepse demonstraram heterogeneidade perfusional, com capilares apresentando fluxo sanguíneo intermitente ou nulo ao lado de capilares com fluxo intenso. A intensidade das alterações microcirculatórias em pacientes sépticos correlacionou-se com a gravidade das disfunções orgânicas e foi preditivo de desfecho mais forte do que as variáveis hemodinâmicas [38]. A microcirculação consiste de pequenos vasos sanguíneos (< 100µm: arteríolas, capilares e vênulas pós-capilares) [39]; é responsável pela oferta de oxigênio e nutrientes às células e pela adaptação à demanda metabólica. A estrutura e função específicas da microcirculação diferem dependendo do órgão [40]. Na clínica, técnicas como *ortogonal polarization spectral and side-stream dark field imaging*, permitem a visualização direta da microcirculação sublingual [3], mas a avaliação das alterações na microcirculação a beira do leito ainda não é prática corrente.

De acordo com a lei de Poiseuille, o fluxo capilar é diretamente proporcional a pressão de perfusão (ΔP) e a quarta potência do raio (r) e inversamente proporcional ao comprimento do capilar (L) e a viscosidade sanguínea (η): $\text{Fluxo Capilar} = \pi r^4 \Delta P / 8 L \eta$

Na prática, o parâmetro de atuação seria principalmente a pressão de perfusão, que é a base do tratamento do choque séptico com drogas vasoativas.

Além dos distúrbios vasculares, ocorre a miocardiopatia séptica, com importante repercussão na morbimortalidade. Taxas de mortalidade tão elevadas quanto 70% são observadas nos quadros de choque séptico com disfunção cardíaca [41].

Estudos utilizando diferentes modelos experimentais e métodos de avaliação demonstraram diminuição de contratilidade miocárdica. O cardiomiócito de rato em cultura com soro de pacientes sépticos apresentou diminuição do encurtamento [42]. Esta observação foi posteriormente confirmada em cardiomiócitos em cultura com lipopolissacarídeo no meio, no modelo de coração perfundido de Langendorff e no músculo papilar isolado, para citar alguns modelos. Outros estudos experimentais foram realizados com cateteres de condutância e pressão, ecocardiografia, tomografia por emissão de pósitron, ressonância nuclear magnética, radionuclídeo, microscopia de luz e eletrônica, demonstrando a disfunção cardíaca na sepse [43].

Em pacientes, estudos utilizando termodiluição e ventriculografia observaram dilatação ventricular (elevação do volume diastólico final) e redução da fração de ejeção (FE) em 25% dos sépticos não chocados e em 50% dos pacientes em choque séptico [44]. No entanto, o débito cardíaco se encontrava normal ou aumentado, desde que a volemia estivesse adequada (figura 2). A redução da FE foi reversível, com completa recuperação em 7 a 10 dias (figura 3) [44].

Figura 2. Índice cardíaco (IC, L/min.m²) vs tempo (dias). À esquerda, todos os pacientes sépticos; à direita, sobreviventes e não sobreviventes. A área hachurada mostra a faixa de normalidade. Todos apresentaram elevado IC, sem diferença estatística entre os dois grupos. Adaptado de Parker M, 1984[44].

Figura 3. Fração de Ejeção (FE, %) do VE vs. tempo (dias). Pacientes em choque séptico apresentaram diminuição da FE de VE. A direita, observa-se a importante depressão miocárdica nos sobreviventes (FE 32%), com melhora a partir do quarto dia e retorno ao normal no sétimo ao décimo dia. A área hachurada mostra a faixa de normalidade. Adaptado de Parker M, 1984[44].

Outros trabalhos demonstraram as mesmas alterações no ventrículo direito, independente do aumento da resistência vascular pulmonar que pode ocorrer na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) [45, 46].

A avaliação da função diastólica na sepse também tem sido debatida. Os estudos realizados com Eco-Doppler utilizando parâmetros dependentes e independentes de carga mostraram diminuição do relaxamento ventricular em pacientes com sepse grave ou choque séptico. Foram observados pacientes sem alteração, pacientes com disfunção diastólica isolada ou associada à disfunção sistólica [47, 48].

Marcadores de lesão do cardiomiócito como troponina I e T estão elevados em 31% a 85% dos pacientes com sepse grave ou choque séptico. O aumento dos níveis séricos de troponina apresentou correlação com menor FE e maior mortalidade [49, 50]. Entretanto, necrose celular não é característica importante na histopatologia miocárdica. Autópsias revelaram importante infiltrado inflamatório miocárdico, mas mínima morte celular [49, 51]. A explicação é que a troponina citoplasmática pode vazar para circulação após uma lesão reversível ao aparato contrátil da célula [52]. O peptídeo natriurético tipo B (BNP) também se encontra elevado nos quadros de disfunção cardíaca séptica e este aumento se correlacionou com pior prognóstico [53].

As alterações cardiovasculares da sepse podem ser reproduzidas em modelos animais seja por injeção de LPS [54] ou de bactéria viva [55]. O LPS representa o mais proeminente fator patogênico das bactérias Gram-negativas.

O quadro dois resume os principais fatos científicos que contribuíram para o

entendimento da disfunção cardiovascular no choque séptico.

Quadro2. Marcos históricos na compreensão da disfunção cardiovascular na sepse[3]

1831-Laennec descreveu diminuição das bulhas cardíacas em pacientes com enfermidades febris agudas e atribuiu isto a insuficiência cardíaca[56].

1897-Boise discutiu os diagnósticos de choque, hemorragia e infecção [57].

1907- Janeway se referiu à insuficiência cardíaca nas doenças infecciosas agudas[58].

1930- Atchley se referiu à insuficiência cardíaca nos choques bacterêmicos[59].

1947- Wiggers postulou a presença de um fator circulante depressor do miocárdio em pacientes com choque hemorrágico [60].

1951- Waisbrein introduziu os conceitos de “choque séptico quente e frio”. Mais tarde, foi atribuído ser o estágio inicial e tardio da sepse [61, 62].

1960- Medido o débito cardíaco com a técnica colorimétrica (indocianina verde) [63].

1966- Clowes estudou pacientes com choque séptico devido a peritonite e descreveu uma resposta bifásica do choque: fase hiperdinâmica (choque quente) e fase hipodinâmica (choque frio) [64].

1970- O débito cardíaco foi medido por termodiluição utilizando cateter de artéria pulmonar (CAP)[65]. Com sua utilização tornou-se aparente que frequentemente os pacientes em choque séptico não recebiam adequada ressuscitação volêmica. A partir daí, os estudos mostraram que pacientes sépticos se apresentavam com débito cardíaco elevado e baixa resistência vascular sistêmica (RVS) se adequadamente ressuscitados[66].

1977- Weisel avaliou pacientes com choque séptico (CAP) e mostrou trabalho sistólico diminuído em resposta a expansão volêmica [67]. Diminuição de contratilidade e/ou de complacência? Esta questão não podia ser respondida pelo CAP isoladamente.

1979- Lefer documentou a existência do fator depressor do miocárdio primeiro

em choque hemorrágico, mais tarde no choque endotóxico, em animais [68].

1981- Calvin investigou a função do ventrículo esquerdo em pacientes sépticos com cineangiografia com radionucleotídeos combinado com CAP, medindo fração de ejeção e débito cardíaco[66].

1982- Burns e Menapace demonstraram a disfunção cardíaca aguda e reversível pela ecocardiografia bidimensional em paciente com choque tóxico [67].

1984- Parker e colaboradores demonstraram uma importante mas reversível depressão miocárdica ($FE \leq 0,40$ e elevada pressão diastólica final de VE nos sobreviventes) nos pacientes em choque séptico [44].

1985- Parrillo demonstrou que o soro de pacientes sépticos induzia importante diminuição da contratilidade de cardiomiócitos de rato em cultura [42].

1989- Raper e col. observaram menor FE e elevado volume diastólico e sistólico final, tanto em VE como VD, em pacientes sépticos não chocados comparados a pacientes com trauma com parâmetros hemodinâmicos semelhantes[69].

1998- Confirmando dados anteriores, com a utilização de ecocardiografia-doppler, Munt e col observaram relaxamento ventricular anormal em pacientes com sepse grave [47]. Estes resultados também foram relatados em vários modelos animais de sepse.

Em suma, existem muitas evidências da disfunção sistólica em pacientes sépticos e em choque séptico. A despeito do débito cardíaco se encontrar normal ou elevado, a depressão miocárdica é marcada pela redução da FE, dilatação ventricular com elevação do volume diastólico final e sistólico final e redução da resposta ventricular à oferta de volume (figura 4) [70].

Figura 4. Função ventricular (relação de Frank-Starling) nos grupos controle, séptico não chocado e choque séptico. Índice do volume diastólico final (EDVI, mL/m²) como índice de pré-carga e índice do trabalho sistólico de ventrículo esquerdo (LVSWI, g·m/m²). O grupo controle apresentou aumento do EDVI e LVSWI em resposta à infusão de volume; os pacientes sépticos apresentaram uma elevação menos pronunciada, mas a curva é semelhante à normal; nos sépticos chocados não houve significativo aumento do trabalho sistólico a despeito da elevação importante do EDVI, demonstrando o desvio da curva de Frank-Starling. Estudo realizado com termodiluição e radionucleotídeo. Adaptado de Ognibene, FP [70].

Nas últimas cinco décadas, foram publicados mais de 3000 estudos clínicos apresentando as complicações cardiovasculares na sepse. Não há dados epidemiológicos precisos da incidência desta disfunção e os mecanismos celular e molecular que levam à disfunção miocárdica na sepse ainda não estão completamente elucidados[41].

2.7 Mecanismos da disfunção miocárdica

2.7.1 Energético

Em condições normais, o miocárdio mantém de 70-75% de extração de oxigênio. Aumentos da demanda de oxigênio pelo miocárdio não podem ser totalmente alcançados pelo incremento da extração e sim pelo fluxo coronariano. O tônus vasomotor coronariano é autorregulado de forma que a oferta de oxigênio acompanhe a demanda. Por isso, o primeiro mecanismo sugerido para explicar a disfunção cardíaca foi a redução do fluxo coronariano no choque séptico causando uma isquemia miocárdica e consequente diminuição de contratilidade. No entanto, estudos utilizando cateter de termodiluição localizado no seio coronariano em pacientes com choque séptico e disfunção cardíaca demonstraram que o fluxo coronariano se encontrava normal ou até elevado e a diferença de oxigênio entre a artéria e o seio coronariano estava diminuída. Portanto, no choque séptico, a autorregulação do fluxo coronariano se encontra comprometida (figura 5) [71, 72].

Copyright © 2005 by Elsevier Inc.

Figura 5. O fluxo coronariano é autorregulado de maneira a acompanhar a demanda metabólica cardíaca; mas a sepse causa dano a autorregulação. A relação fluxo-pressão coronariana mostra uma larga faixa pressórica com manutenção do fluxo sanguíneo (autorregulação preservada), enquanto que na vasodilatação máxima ocorre o acoplamento pressão- fluxo. Adaptado Braunwald, Tratado de Doenças Cardiovasculares, 7ª Ed [73].

A teoria da isquemia global por diminuição do fluxo macrocirculatório foi esquecida, mas estudos sobre a microcirculação em diferentes modelos experimentais, em vários órgãos incluindo o coração têm demonstrado má distribuição do fluxo. A disfunção microcirculatória tem sido apontada como um importante fator na fisiopatologia da sepse e sua evolução. Vários mecanismos estão implicados na disfunção da microcirculação: alteração endotelial, desequilíbrio entre substâncias vasodilatadoras e constritoras, alteração do glicocálix, que é a camada de glicosaminoglicanos que recobre a superfície endotelial, responsável pela interação entre as células circulantes (hemácias, leucócitos e plaquetas) e o endotélio [74]. Estudos experimentais avaliaram fluxo sanguíneo sublingual e na mucosa intestinal na sepse grave e choque

séptico e mostraram diminuição da densidade capilar associada a um fluxo heterogêneo, intermitente ou ausente, ao lado de áreas bem perfundidas[75]. Estas alterações na microcirculação também têm sido demonstradas em pacientes sépticos e com choque séptico e não foram observadas em outros pacientes (não sépticos) graves da UTI [76]. Sakr e col. observaram melhora das alterações microcirculatórias nos sobreviventes enquanto que estas persistiram nos pacientes que evoluíram para choque refratário e/ou disfunção de múltiplos órgãos [77]. Outro estudo demonstrou que os pacientes com resposta precoce (dentro de 3 horas) às medidas terapêuticas de ressuscitação pressórica com recuperação do fluxo microcirculatório sublingual apresentaram melhora da função orgânica em 24 horas, enquanto a não resposta associou-se a piora do quadro (medido pelo *Sequential Organ Failure Assessment* – SOFA score) [78].

Estudo em cães com choque endotoxêmico avaliou fluxo sanguíneo miocárdico e também observou áreas de isquemia ao lado de outras com perfusão de luxo, sem alteração do fluxo global. Este estudo reforça evidências de que a sepse e o choque séptico causam alterações também na microvasculatura cardíaca [79]. Outro mecanismo energético seria a disfunção mitocondrial. Cerca de 90% do consumo de oxigênio é utilizado pela mitocôndria para produção de adenosina trifosfato (ATP); portanto a mitocôndria deve ter um papel importante na disfunção orgânica na sepse. Alterações mitocondriais foram observadas em vários órgãos como fígado, músculo esquelético e coração, tanto em estudos experimentais [80] como em pacientes sépticos [49, 81]. A mitocôndria do miócito apresenta alterações

ultraestruturais na sepse [82]. As alterações mitocondriais no miocárdio séptico podem causar deficiência energética (inabilidade da célula em utilizar oxigênio e produzir ATP) e contribuir pelo menos em parte, com a depressão cardíaca.

2.7.2 Fatores depressores do cardiomiócito

Foi demonstrada em miócitos em cultura com soro de pacientes sépticos uma diminuição da velocidade e amplitude do encurtamento. Muitas substâncias, intrínsecas e extrínsecas, foram postuladas como fator depressor do miocárdio: fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina (IL) 1 β , IL6, Complemento 5 ativado (C5a) e lipopolissacarídeo (LPS), para citar algumas.

- TNF- α é uma importante citocina secretada precocemente por macrófagos ativados e também encontrada no cardiomiócito em resposta a sepse [83]. No entanto, estudos utilizando anticorpo monoclonal anti TNF- α ou contra seu receptor não demonstraram aumento da sobrevivência [84].

- IL1 é secretada por monócitos, macrófagos e neutrófilos em resposta a TNF- α e causa miocárdio depressão. Seu bloqueio também falhou em reduzir a mortalidade.

- IL6, uma citocina inflamatória que permanece na circulação por mais tempo que o TNF- α , também foi implicada na patogênese da sepse.

Apesar destas citocinas apresentarem papel fundamental na fase inicial, não se pode explicar a disfunção miocárdica prolongada observada na sepse a não ser pela liberação de outras substâncias.

Finkel e col. mostraram que a inibição da óxido nítrico sintetase (NOS)

preveniu os efeitos depressores miocárdicos do TNF- α e IL-1 *in vitro*. Os autores concluíram que a causa da depressão miocárdica é via óxido nítrico (NO) [85]. O óxido nítrico apresenta um papel complexo e multifacetado na fisiopatologia da sepse. Em condições normais ou patológicas, ele é um importante regulador da adesão dos leucócitos, agregação plaquetária, formação de microtrombos, permeabilidade microvascular e função cardiovascular [86]. Ele desempenha diversas ações cardiovasculares. Produzido no endotélio vascular pela enzima óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS), regula o tônus vasomotor, atuando na pré e pós-carga; na vasculatura coronariana, determina a perfusão cardíaca e em altas doses apresenta um efeito depressor sobre o cardiomiócito. O NO é produzido no cardiomiócito pela enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) em resposta a sepse. O radical livre peroxinitrito, formado a partir do NO e superóxido, leva ao produto nitrotirosina e ambos são cardiotóxicos [73]. De fato, trabalhos experimentais nos quais foi inibida a iNOS, observou-se melhora na contratilidade miocárdica [87]. Em pacientes sépticos, a administração de um inibidor inespecífico da NOS (azul de metileno) não melhorou o prognóstico, mas houve diminuição da necessidade de vasoconstritores, melhor trabalho sistólico e PAM [88]. Embora a sepse deflagre um aumento global na produção de NO, a expressão da enzima iNOS se apresenta heterogênea entre órgãos ou sistemas e o NO pode ser consumido por espécies reativas de oxigênio. Estes fatos podem levar a existência de áreas com deficiência de NO [89] e explicar em grande parte a heterogeneidade da perfusão sanguínea na sepse.

Há um vasto campo a ser explorado, visto as várias isoformas da NOS

(mitocondrial, eritrocitária, neuronal, além das citadas), suas interações modulatórias e os efeitos dose dependentes do NO.

2.7.3 Alterações metabólicas

Observa-se uma diminuição da captação de glicose, corpos cetônicos e ácidos graxos livres pelo miocárdio séptico. Os estudos também mostraram que ocorre extração de lactato pelo miocárdio evidenciado pela diferença entre o sangue arterial e o seio coronariano [72].

2.7.4 Desregulação autonômica

Alguns autores discutem que na sepse ocorre uma falência autonômica, provavelmente relacionada a apoptose de centros autonômicos cardiovasculares [90]. Taquicardia é uma manifestação típica da sepse e causa diversos efeitos deletérios como diminuição do tempo de enchimento cardíaco, aumento do consumo de oxigênio e possível cardiomiopatia taquicardia induzida. A frequência cardíaca se mostrou fator preditivo de mortalidade [91].

3 Objetivos

1. Avaliar a correlação entre a pressão de perfusão coronariana e o fluxo sanguíneo na microcirculação miocárdica em modelo experimental de choque endotoxêmico.
2. Avaliar a correlação do fluxo sanguíneo com a função cardíaca sistólica e diastólica.
3. Analisar o efeito de drogas vasoativas sobre o fluxo na microcirculação miocárdica e sobre a função cardíaca.

4 Materiais e Métodos

Modelo experimental

O estudo foi desenvolvido obedecendo às normas estabelecidas pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O projeto experimental foi aprovado pela CAPEPESQ (CAPEPESQ 0241/2009).

Foram utilizados ratos machos Wistar, com pesos entre 300-350 g, provenientes do biotério central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os animais receberam alimento e água *ad libitum* até o dia do experimento. Foi seguido o ciclo 12/12h claro/escuro.

O modelo experimental de choque endotoxêmico foi aplicado injetando-se lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* (Sigma, cepa 026:B6) 10 mg/kg ip uma hora e meia antes da avaliação hemodinâmica.

Foi utilizado um total de 130 ratos, divididos em dois grupos:

1. 40 animais controle: não sofreram nenhuma intervenção;
2. 90 animais LPS: receberam LPS e apresentaram choque endotoxêmico definido como PAM $\leq$ 65 mmHg.

Os 90 animais LPS foram divididos em:

1. Grupo LPS: n=54, com choque endotoxêmico definido como PAM $\leq$ 65 mmHg;
2. Grupo LPS+SF: n=8, com choque endotoxêmico tratado com solução fisiológica 30 mL/kg iv em bolus lento (15 minutos);
3. Grupo LPS+NOR: n=22, com choque endotoxêmico tratado com norepinefrina iv contínua para PAM = 85 mmHg;

4. Grupo LPS+ARA: n=6, com choque endotoxêmico tratado com araminol iv contínuo para PAM = 85 mmHg.

Avaliação Hemodinâmica

Após uma hora da injeção de LPS, os animais foram anestesiados com quetamina (80 mg/kg ip) e xylazina (12 mg/kg ip), mantidos em ventilação espontânea em ar ambiente. A artéria femoral direita (figura 6) foi dissecada e inseriu-se um cateter com micromanômetro na extremidade distal (Millar modelo SPR 407, tamanho 2F, EUA), o qual foi posicionado na aorta abdominal abaixo das artérias renais. Foram registradas as pressões arteriais sistêmicas sistólica e diastólica.

Para o registro das pressões e volumes de ventrículo esquerdo, foi inserido pela artéria carótida direita (figura 6) um cateter combinado de condutância e micromanômetro distal (Millar modelo SPR 869, tamanho 2F, EUA) cuja extremidade foi posicionada no VE. A carótida foi dissecada e sua extremidade proximal ligada. Os cateteres foram ligados ao sistema computadorizado de aquisição (PowerLab 4 canais/30 modelo ML 866, Austrália). As pressões arteriais sistêmicas e ventriculares foram registradas simultaneamente batimento a batimento, assim como os volumes sistólico e diastólico de VE. O Sistema Millar de Pressão e Volume (MVPS 300) foi ajustado segundo recomendações do fabricante; frequência do filtro de saída de 500 Hz. Foi realizada a aquisição dos sinais numa velocidade de 1.000 amostras/segundo (aproximadamente 110 amostras/ciclo cardíaco) utilizando software (BioBench, National Instruments, Austin, TX). O volume sistólico, trabalho sistólico, fração de ejeção e o débito cardíaco foram calculados de

acordo com a calibração do volume *in vitro*, utilizando o programa de análise de pressão-volume (PVAN version 3.2, Millar Instruments). A veia jugular externa direita (figura 6) foi dissecada e inserida uma cânula de polietileno (PE 50) para infusão contínua de norepinefrina ou araminol conforme o grupo (grupos LPS+NOR e LPS+ARA respectivamente) por bomba de infusão (Kd Scientiic modelo KDS 210,EUA). A menor dose foi utilizada para obter-se PAM de 85 mmHg: a norepinefrina foi de $0.3 \pm 0.05 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ e o araminol de $1.9 \pm 0.92 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. A cada alteração da dose, 15 minutos eram esperados para estabilização pressórica. No grupo LPS+SF, um bolus de 30 ml/kg de solução fisiológica foi injetado lentamente (15 minutos) pela cânula jugular.

Figura 6. Representação esquemática de um animal em posição supina demonstrando os procedimentos de monitorização invasiva. Adaptado do Software Anatomia Simplificada de Rato em 3D (biosphera.com.br).

Após uma hora e meia da injeção de LPS, os procedimentos invasivos estavam concluídos e o animal estabilizado para leitura das seguintes medidas pressóricas (mmHg): pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial média ($PAM = (1/3 \text{ PAS} + 2/3 \text{ PAD})$), pressão de pulso ($PP = \text{PAS} - \text{PAD}$), pressão diastólica final de ventrículo esquerdo (PdfVE), pressão sistólica final de ventrículo esquerdo (PsfVE), pressão de perfusão coronariana ($PPC = \text{PAD} - \text{PdfVE}$). Na avaliação da função sistólica de VE foram consideradas as medidas da velocidade máxima de elevação da pressão sistólica ventricular (dP/dt_{max} , mmHg/s, (figura 7); trabalho sistólico (SW, mmHg.μL) e fração de ejeção ($FE = (V_{df} - V_{sf}) / V_{df} \times 100, \%$); índices não dependentes de carga como elastância sistólica final (Ees), determinada a partir das coordenadas pressão-volume sistólico final de diferentes contrações cardíacas (figura 7) e $dP/dt_{\text{max}} / \text{EDV}$ (volume diastólico final de VE).

Figura 7. Os eventos mecânicos do ciclo cardíaco concebidos por Wiggers em 1915 e reunidos por Lewis em 1920. As áreas pintadas de rosa (b,e) representam as regiões de cálculo da derivada: dP/dt máxima (contração isovolúmica) e dP/dt mínima, relaxamento isovolúmico. AO=abertura da valva aórtica; MO=abertura da valva mitral; PVJ=pressão venosa jugular; ECG=eletrocardiograma. Adaptado de Braunwald, Tratado de Doenças Cardiovasculares 7ª Ed [73].

Copyright © 2005 by Elsevier Inc.

Figura 8. Alça de pressão-volume (P-V) do VE. Es é a inclinação da curva de relação P-V. a, b: período de contração isovolúmica; c,: período de ejeção sistólica; e: fase de enchimento diastólico. Observa-se o efeito positivo β -adrenérgico no inotropismo (contratilidade) e no efeito lusitrópico (muitas vezes, uma contratilidade aumentada é associada a razões de relaxamento elevadas). Com várias curvas P-V calcula-se a elastância sistólica (E_s). Adaptado de Braunwald, Tratado de Doenças Cardiovasculares, 7ª Ed [73].

A velocidade máxima de queda da pressão ventricular durante a diástole (dP/dt min, mmHg/s, figura 7), TAU (constante de tempo do relaxamento, ms) que descreve a razão da queda da pressão do VE durante o relaxamento isovolúmico; IRP (período de relaxamento isovolúmico) foram utilizados como índices de função diastólica do VE.

Avaliação da perfusão tecidual

Protocolo de microesferas coloridas

Os reagentes utilizados foram preparados:

- Reagente I (Triton X 100 a 10%): 900 mL de água destilada a 50° C + 6,06 g Tris base + 0,1 g azida sódica. Acertar o pH 8,5.

- Reagente II (Deoxicolato sódico): 1000 mL de água destilada a 50° C + 6,06 g Tris base+ 0,5 mL Tween 80 + 0,1 g azida sódica. Acertar o pH 8,5.
- NaOH 2M: 20 g de NaOH em 250 mL de água destilada.
- Salina Tween 80 0,01%: 50 mL de solução salina 0,9%+ 50 µL Tween 80.
- Reagente de hemólise: 100 mL de Triton X 100 a 10% + 20 mL de etanol absoluto.

O estudo de fluxo sanguíneo tecidual foi realizado nos grupos controle, LPS e LPS+NOR. Foram utilizadas cânulas de polietileno inseridas nas artérias carótida direita (PE 50, extremidade locada no VE) e femoral direita (PE 10, locada na artéria aorta, abaixo das artérias renais), preenchidas com solução salina Tween 80 0,01%. As curvas pressóricas arteriais e ventriculares foram registradas continuamente e tomadas as medidas após 15 minutos de estabilização de cada procedimento. O registro só foi interrompido durante a infusão das microesferas (ME).

Foram injetadas 300.000 ME (15 µm, amarelas, Triton Technology, San Diego, CA, USA) em solução salina 0,9% contendo Tween 80 a 0,01%, utilizando-se uma bomba de infusão (Kd Scientific modelo KDS210, EUA). A diluição de microesferas foi sonicada (Sonic Dismembrator modelo 100, Fisher Scientific, EUA) por 5 minutos antes da infusão. Uma cânula PE 50 com 75 cm de extensão foi preenchida com 180 µL da diluição de microesferas e interposta entre o cateter da artéria carótida e uma seringa (1 mL) contendo 0,5 mL de solução salina 0,9% pré-aquecida (40° C). A infusão durava 50 segundos num fluxo de 0,36 mL/min. Utilizando-se uma bomba de aspiração

(Kd Scientific, modelo KDS 210, EUA), uma amostra de sangue foi extraída pelo cateter da artéria femoral começando 10 segundos antes do início da infusão das ME, num fluxo de 0,5 mL/min em seringa heparinizada. A coleta continuava até completar 75 segundos. A seringa foi pesada cheia e vazia e medido o volume de sangue coletado. A este se acrescentou 4 mL de solução de hemólise. O tubo de sangue foi centrifugado a 4000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente. Após centrifugação (Centrifuge 5810 R Eppendorf, Alemanha), foi descartado o sobrenadante e acrescido 4 mL de NaOH 2M e colocado em banho-maria 70° C até o dia seguinte.

Após a coleta de sangue, o animal foi eutanaziado com superdose de pentobarbital e os seguintes órgãos removidos: coração, rins, 2 cm de íleo terminal e músculos da perna esquerda (soleus e gastrocnêmio), para determinar o fluxo sanguíneo regional. O coração foi dividido em ventrículo direito (VD) e ventrículo esquerdo (VE) e a parede do VE em um terço interno, denominado região subendocárdica, e dois terços externos, região epicárdica. O VE era aberto, a parede posicionada entre duas presilhas, medido um terço interno e cortado com uma lâmina. Cada amostra foi pesada, cortada em pequenos pedaços e colocada em tubos falcon com 4 mL de NaOH 2M em banho-maria (Fisher Scientific Isotemp, EUA) a 70° C.

No segundo dia, os tubos foram colocados no Vórtex (Genie 2, Scientific Industries, EUA) várias vezes ao dia até que não houvesse mais fragmentos de tecido. Então, foi adicionado 9 mL do Reagente I de digestão. A solução foi misturada por inversão e centrifugada a 4000 rpm por 30 minutos em temperatura ambiente; o sobrenadante foi desprezado e adicionado 10 mL do Reagente II de digestão. Colocado em banho-maria até o dia seguinte.

No terceiro dia, os tubos foram ao Vórtex várias vezes até que não houvesse mais *pellet* ou tecido. Centrifugados a 4000 rpm por 30 minutos, temperatura ambiente. Desprezado o sobrenadante e adicionado 2 mL de etanol absoluto gelado. Cada tubo foi ao Vórtex duas vezes, centrifugados a 4000 rpm por 15 minutos em temperatura de 4° C. O sobrenadante foi desprezado e os tubos colocados na estufa (Quimis Aparelhos Científicos, Brasil) até o dia seguinte. Estes procedimentos visavam remover todos os tecidos e líquidos deixando apenas as microesferas.

No quarto dia, acrescentou-se 300 µL de dimetilformamida (DMF) aos tubos, que foram ao Vórtex por 30 segundos. Esta etapa visava romper a membrana das microesferas. Depois, centrifugou-se a 2000 rpm por 10 minutos em temperatura ambiente. O sobrenadante, um líquido amarelo, foi colocado em cuvetas de cristal e levado para análise no espectrofotômetro (Spectronic Genesys 2, EUA) (448 nm).

Cálculos realizados segundo o protocolo:

- Débito Cardíaco (DC)

$$DC = \frac{\text{número de ME injetadas} \times 0,5\text{mL/min}}{\text{número de ME da amostra de sangue}}$$

0,5 mL/min é o fluxo de retirada da amostra de sangue.

- $Q_t = A_t (Q_b / A_b)$

Qt e Qb são os fluxos tecidual e sanguíneo respectivamente; At e Ab são os picos de absorbância tecidual e sanguíneo respectivamente. A menor absorbância aceita foi de 0,01 A.

- $$Qb = \frac{\text{peso da amostra sanguínea} \div 1,05 \text{ g/mL}}{\text{volume da amostra sanguínea} \div 0,5 \text{ mL/min}}$$

1,05 g/mL é a densidade do sangue e 0,5 mL/min é o fluxo de retirada da amostra de sangue. Os resultados dos fluxos sanguíneos foram divididos pelo peso dos tecidos analisados (mL.min⁻¹. g⁻¹).

Análise estatística

Os resultados foram expressos em médias $\pm$ desvio padrão (DP). Na comparação de dois grupos foi utilizado o Teste t de Student; para comparação de mais de dois grupos, utilizou-se ANOVA e pós-teste de Bonferroni. A correlação de Pearson foi aplicada no teste das correlações entre PPC e fluxos sanguíneos subendocárdico e epicárdico e entre o fluxo sanguíneo subendocárdico e os índices de função cardíaca sistólica, dP/dtmax /EDV e Ees. Os dados passaram pelo teste de normalidade. A significância estatística foi estabelecida para $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando *Sigma Stat statistical software* (versão 1, Jandel Scientific Software, San Rafael, CA, USA).

5 Resultados

As alterações hemodinâmicas puderam ser observadas 1,5 h após a injeção de LPS. As medidas de pressão arterial sistêmica apresentaram significativa redução da pressão arterial sistólica (23%), diastólica (40%) e média (32%). A pressão de pulso apresentou-se caracteristicamente alargada, como observado nos pacientes sépticos com volemia adequada.

Uma significativa redução na pressão sistólica do ventrículo esquerdo (22%) foi observada comparada com as condições basais. Por outro lado, houve importante elevação da pressão diastólica final de ventrículo esquerdo. Os parâmetros do ventrículo esquerdo demonstraram uma redução de 34% da dP/dt máxima e 15% da dP/dt mínima. Observou-se também uma significativa redução da pressão de perfusão coronariana (58%) nos ratos endotoxêmico chocados. A tabela 1 mostra os parâmetros hemodinâmicos dos animais controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, que representa os dados de base e grupo LPS, que recebeu 10 mg/kg LPS ip.

Tabela 1. Dados hemodinâmicos basais e com choque endotoxêmico.

	Basal	LPS
PAS (mmHg)	121±13	93±10
PAD (mmHg)	93±10	55±6
PAM (mmHg)	107±10	62±5
FC (bat·min ⁻¹)	386±5	389±16
PP (mmHg)	28±2	38±3
PSVE (mmHg)	120±5	94±8
PdfVE (mmHg)	7±1	19±4
dP/dt max (mmHg·s ⁻¹)	6256±372	4122±579
dP/dt min (mmHg·s ⁻¹)	5352±155	4536±579
PPC (mmHg)	86±4	36±3

Parâmetros hemodinâmicos após 1,5 h da injeção de LPS ip. PAS pressão arterial sistólica; PAD pressão arterial diastólica; PAM pressão arterial média; FC frequência cardíaca; P Pulsopressão de pulso; PSVE pressão sistólica de ventrículo esquerdo; PdfVE pressão diastólica final de ventrículo esquerdo; dP/dt max máxima variação de pressão do VE durante a sístole; dP/dt min máxima variação de pressão do VE durante a diástole; PPC pressão de perfusão coronariana. Os dados mostram significativas alterações após 1,5 h da injeção de LPS ip. *p<0,05 vs controle. Os valores representam a média ±DP; n=10.

Experimentos de expansão volêmica foram realizados em ratos com choque endotoxêmico a fim de assegurar que algumas das alterações hemodinâmicas observadas não fossem devido à hipovolemia (figura 9). A infusão intravenosa de 30 mL/kg de solução fisiológica não foi eficiente em elevar a pressão de perfusão coronariana (38± 9 vs. 40± 8 mmHg, LPS vs.

LPS+SF), dP/dt max (4012 ± 934 vs. 4645 ± 483 mmHg s⁻¹, LPS vs. LPS+SF), dP/dt min (4212 ± 627 vs. 4462 ± 671 mmHg.s⁻¹, LPS vs. LPS+SF), LVEDP (17 ± 7 vs. 15 ± 6 mmHg, LPS vs. LPS+SF) nem a pressão arterial sistêmica. Estes dados descartam a hipovolemia no modelo experimental utilizado.

Figura 9A Pressão Arterial Sistólica

Figura 9B Pressão Arterial Diastólica

Figura 9C Pressão Arterial Média

Figura 9D Pressão de Perfusão Coronariana

Figura 9E Pressão Sistólica de VE

Figura 9F Pressão Diastólica Final de VE

Figura 9G/H dP/dt

Figura 9. Efeito da expansão volêmica nos parâmetros hemodinâmicos. A hemodinâmica dos três grupos foi avaliada: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+SF, recebeu LPS 10mg/kg ip. e 30 ml/kg de NaCl 0,9% iv. Comparados ao grupo controle, os grupos LPS e LPS+SF mostraram importante redução na (A) pressão arterial sistólica; (B) pressão arterial diastólica; (C) pressão arterial média; (D) pressão de perfusão coronariana. Por outro lado, a (E) pressão sistólica de VE não se alterou com o LPS; (F) a pressão diastólica final de VE elevou-se nos grupos LPS e LPS+SF; (G) dP/dtmax se mostrou significativamente reduzida no grupo LPS e (H) dP/dt min estava reduzida no grupo LPS. Os valores representam a média $\pm$ DP * $p < 0,05$ vs. Controle (ANOVA seguido do teste de Bonferroni); $n=8$.

A figura 10 apresenta os parâmetros hemodinâmicos observados nos ratos endotoxêmicos chocados antes e depois da infusão intravenosa de norepinefrina. Pode-se observar a eficiência da norepinefrina em elevar a pressão arterial sistêmica e a pressão de perfusão coronariana (38 ± 2 vs. 59 ± 3 mmHg LPS vs. LPS+NOR). A dP/dt_{max} se recuperou (4038 ± 424 vs. 6952 ± 636 mmHg.s⁻¹ LPS vs. LPS+NOR) e interessante, também houve recuperação da dP/dt_{min} (4867 ± 562 vs. 6824 ± 423 mmHg.s⁻¹ LPS vs. LPS+NOR) com a norepinefrina.

Figura 10A Pressão Arterial Sistólica

Figura 10B Pressão Arterial Diastólica

Figura 10C Pressão Arterial Média

Figura10D Pressão Diastólica Final de VE

Figura 10E Pressão de Perfusão Coronariana

Figura 10F/G dP/dt

Figura 10. Efeito da norepinefrina nos parâmetros hemodinâmicos. A hemodinâmica dos três grupos foi avaliada utilizando-se cateter de Millar: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+NOR, que recebeu LPS 10mg/kg ip e norepinefrina iv para manter PAM de 85 mmHg. (A) pressão arterial sistólica; (B) pressão arterial diastólica; (C) pressão arterial média; (D) pressão diastólica final de VE; (E) pressão de perfusão coronariana; (F) dP/dtmax e (G) dP/dt min. No grupo LPS, houve redução das pressões arteriais sistêmicas e da pressão de perfusão coronariana; elevação da pressão diastólica final de VE. A norepinefrina recuperou todos os parâmetros, exceto a PdfVE, e também recuperou a dP/dtmax e dP/dt min. *p<0,05 vs. controle; #p<0,05 vs LPS (ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Os valores representam as médias ±DP; n=10.

Os estudos de perfusão tecidual com microesferas demonstraram redução do fluxo sanguíneo miocárdico nos animais com pressão arterial média ≤ 65 mmHg. Os animais endotoxêmicos chocados comparados ao grupo controle apresentaram menor fluxo sanguíneo particularmente no ventrículo direito (0.8 ± 0.2 vs. 2.7 ± 0.3 mL/min/g de tecido, LPS vs. controle) e na região subendocárdica do ventrículo esquerdo (0.7 ± 0.2 vs. 2.5 ± 0.4 mL/min/g de tecido, LPS vs. controle). A região epicárdica do ventrículo esquerdo não apresentou diferença (figura 11). Os animais endotoxêmicos chocados tratados com norepinefrina apresentaram importante recuperação do fluxo sanguíneo miocárdico (Figura 11). O ventrículo direito (4.72 ± 0.37 mL/min.g de tecido) e a região subendocárdica do ventrículo esquerdo (6.85 ± 1.62 mL/min.g de tecido) foram as regiões mais beneficiadas. O intestino apresentou uma recuperação para valores regulares (1.47 ± 0.76 mL/min.g de tecido).

Figura 11A Fluxo Sanguíneo do VD

Figura 11B Fluxo Sanguíneo do VE

Figura 11C Fluxo Sanguíneo do VE

Figura 11D Débito Cardíaco

Figura 11. Fluxo sanguíneo miocárdico nos animais em choque endotoxêmico tratados com norepinefrina. O fluxo sanguíneo miocárdico foi medido utilizando-se infusão de microesferas. Três grupos foram avaliados: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+NOR, que recebeu LPS 10mg/kg ip e norepinefrina iv para manter PAM de 85 mmHg. Os fluxos sanguíneos foram analisados separadamente em (A) ventrículo direito; (B) região subendocárdica do VE; (C) região epicárdica do VE. Houve redução do fluxo sanguíneo no ventrículo direito e região subendocárdica do VE no grupo LPS comparado ao controle. O grupo LPS+NOR mostrou aumento do fluxo em relação ao grupo LPS. (D) Débito cardíaco não se alterou no grupo LPS. * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs LPS (ANOVA seguido do teste Bonferroni). Os valores representam a média $\pm$ DP; $n=10$.

Os fluxos sanguíneos dos rins, íleo terminal e músculos esqueléticos da perna também foram estudados nos mesmos animais (figura 12). A comparação entre os fluxos do rim direito e esquerdo foi utilizada como medida de controle de qualidade do método. O fluxo sanguíneo para os rins não foi comprometido neste período do estudo (1.3 ± 0.2 vs. 1.2 ± 0.2 mL/min.g de tecido, LPS vs. controle), assim como não houve alteração no fluxo para os músculos esqueléticos (0.6 ± 0.2 vs. 0.8 ± 0.2 mL/min.g de tecido, LPS vs. controle). O fluxo sanguíneo para o intestino apresentou significativa redução no grupo LPS ($0,4 \pm 0.1$ vs. $1,3 \pm 0.2$ mL/min.g de tecido, LPS vs. controle) e aumento do fluxo nos animais tratados com norepinefrina.

Figura 12A Fluxo Sanguíneo

Figura 12B Fluxo Sanguíneo

Figura 12C Fluxo Sanguíneo

Figura 12. Fluxo sanguíneo nos animais em choque endotoxêmico tratados com norepinefrina. O fluxo sanguíneo de outros órgãos foi medido utilizando-se infusão de microesferas. Três grupos foram avaliados: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+NOR, que recebeu LPS 10mg/kg ip e norepinefrina iv para manter PAM de 85 mmHg. Os fluxos sanguíneos foram analisados em (A) intestino; (B) músculo esquelético; (C) rins. Houve redução do fluxo sanguíneo intestinal no grupo LPS comparado ao controle, e o grupo LPS+NOR mostrou aumento do fluxo em relação ao grupo LPS. * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs LPS (ANOVA seguido do teste Bonferroni). Os valores representam a média $\pm$ DP; $n=10$.

A figura 13 mostra resultados do tamanho da câmara ventricular esquerda, volume sistólico e fração de ejeção. A norepinefrina foi efetiva em elevar o volume ejetado (36 ± 14 vs. 74 ± 12 μ L, LPS vs. LPS+NOR, $p < 0.05$) e a fração de ejeção ($15 \pm 2\%$ vs. $22 \pm 1\%$, LPS vs. LPS+NOR, $p < 0.05$). Observou-se um aumento significativo da PdfVE (7 ± 1 vs. 19 ± 4 mmHg, controle vs. LPS, $p < 0.05$) sem alteração do VdfVE (280 ± 42 vs. 275 ± 50 μ L, LPS vs. LPS+NOR).

Figura 13A Volume Diastólico Final de VE

Figura 13B Volume Sistólico de VE

Figura 13C Volume Ejetado do VE

Figura 13D Fração de Ejeção Do VE

Figura 13. Efeito da norepinefrina nos parâmetros hemodinâmicos.

Volumes do ventrículo esquerdo foram medidos utilizando-se cateter pressão-volume (Millar). Foram analisados três grupos: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+NOR, que recebeu LPS 10mg/kg ip e norepinefrina (NOR) iv para manter PAM de 85 mmHg. (A) volume diastólico final de VE; (B) volume sistólico de VE; (C) volume ejetado de VE; (D) fração de ejeção de VE. No grupo LPS, houve redução significativa do volume ejetado e fração de ejeção. A norepinefrina recuperou estes parâmetros. * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs LPS (ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Os valores representam as médias $\pm$ DP; $n=10$.

Outros índices de função sistólica do ventrículo esquerdo foram avaliados: trabalho sistólico do ventrículo esquerdo (2806 ± 103 vs. 19053 ± 302 mmHg· μ L, controle vs. LPS, $p < 0.05$) e a dP/dt_{max} / EDV, Ees (figura 14). A função diastólica foi avaliada pela constante de tempo de relaxamento (TAU) (figura 14D). Houve redução significativa em todos estes índices pós-injeção de LPS e recuperação dos índices com norepinefrina.

Figura 14A Função Cardíaca Sistólica

Figura 14B Função Cardíaca Sistólica

Figura 14C Função Cardíaca Sistólica

Figura 14D Função Cardíaca Diastólica

Figura 14. Efeito da norepinefrina sobre a função cardíaca. As pressões e volumes de VE foram medidas utilizando-se cateter de pressão-volume (Millar). A hemodinâmica dos três grupos foi avaliada: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+NOR, que recebeu LPS 10mg/kg ip e norepinefrina (NOR) iv para manter PAM de 85 mmHg. (A) elastância sistólica final (Ees); (B) dP/dt Max /EDV; (C) trabalho sistólico (SW); (D) constante de tempo de relaxamento (TAU). No grupo LPS, houve queda dos índices de função cardíaca sistólica (Ees, $DP/dt_{max}/EDV$, SW) e diastólica (TAU) comparados ao grupo controle. A norepinefrina foi eficaz em recuperar estes parâmetros. * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs LPS (ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Os valores representam a média $\pm$ DP; $n=10$.

Os parâmetros hemodinâmicos foram medidos em animais com choque endotoxêmico tratados com araminol intravenoso (para PAM de 85 mmHg) (figura 15). Os dados confirmaram que mesmo um fármaco não beta adrenérgico ao elevar a PPC (42 ± 2 vs. 72 ± 3 mmHg, LPS vs. LPS+ARA, $p < 0.05$) levou a melhora da função cardíaca sistólica e diastólica: dP/dt máxima (4738 ± 536 vs. 8122 ± 536 mmHg·s⁻¹, LPS vs. LPS+ARA, $p < 0.05$) e a dP/dt mínima (4844 ± 232 vs. 7562 ± 562 mmHg·s⁻¹, LPS vs. LPS+ARA, $p < 0.05$). O enchimento ventricular foi analisado pelas medidas de pressão diastólica final de ventrículo esquerdo e volume diastólico final de ventrículo esquerdo, indicadores de pré-carga.

Figura 15A Pressão Arterial Sistólica

Figura 15B Pressão Arterial Diastólica

Figura 15C Pressão Diastólica Final de VE

Figura 15D Pressão de Perfusão Coronariana

15. Efeito do araminol sobre os parâmetros hemodinâmicos As pressões de VE foram medidas utilizando-se cateter de pressão (Millar). A hemodinâmica dos três grupos foi avaliada: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+ARA, que recebeu LPS 10mg/kg ip e araminol (ARA) iv para manter PAM de 85 mmHg. (A) pressão arterial sistólica; (B) pressão arterial diastólica; (C) pressão diastólica final de VE; (D) pressão de perfusão coronariana; Houve redução da pressão arterial sistêmica e da pressão de perfusão coronariana; elevação da pressão diastólica final de VE. O tratamento com araminol recuperou todos os parâmetros. * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs LPS (ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Os valores representam a média $\pm$ DP; $n=10$.

O índice de contratilidade, o trabalho sistólico, dP/dt Max, índices de função sistólica carga-dependentes, foram analisados (figura 16), assim como dP/dt min, período de relaxamento (IRP) e TAU para estudo da função diastólica (figura 16). O índice de constante de tempo durante o relaxamento (TAU) apresentou valores médios de 14.5 ± 0.6 ms (controle), 13.0 ± 1.1 ms (LPS), e 39.7 ± 1.7 ms (LPS+NOR) (figure 14D) e 19.2 ± 0.89 ms (LPS+ARA)(figura 16F).

Figura 16A Função Cardíaca Sistólica

Figura 16 B/C Função Cardíaca Sistólica e Diastólica

Figura 16D/E Função Cardíaca Sistólica e Diastólica

Figura 16F Função Cardíaca Diastólica

Figura 16. Índices cardíacos nos animais com choque endotoxêmico tratados com araminol. A pressão e o volume do VE foram medidos com cateter pressão-volume (Millar). A hemodinâmica dos três grupos foi avaliada: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+ARA, que recebeu LPS 10mg/kg ip e araminoliv para manter PAM de 85 mmHg. (A) trabalho sistólico (SW) reduzido no grupo LPS comparado aos grupos controle e LPS+ARA; (B) índice de contratilidade; (C) período de relaxamento isovolumétrico (IRP) médio; (D) dP/dt_{max} ; (E) dP/dt_{min} e (F) constante de tempo de relaxamento (TAU) reduzidos no grupo LPS, apresentaram recuperação com araminol. * $p < 0,05$ vs controle; # $p < 0,05$ vs LPS (ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Os valores representam a média $\pm DP$; $n=10$.

Para analisar o inotropismo de VE, foram também utilizados dois índices carga-independentes de contratilidade. Primeiro, Ees, calculado a partir das curvas de pressão-volume, analisa contratilidade ventricular na fase isovolumétrica do ciclo cardíaco. Como ilustrado na figura 17, Ees foi significativamente menor no grupo com choque endotoxêmico (LPS). Os valores médios de Ees foram 3.8 ± 0.1 mmHg· μL (controle), 2.0 ± 0.1 mmHg· μL (LPS), e 3.5 ± 0.2 mmHg· μL (LPS+NOR) (figure 14A) e 3.6 ± 0.27 mmHg· μL (LPS+ARA) (figura 17). O outro índice utilizado, $dP/dt_{max} / EDV$, também se encontrava significativamente reduzido (figure 17). Os valores médios da $dP/dt_{max} / EDV$ (mmHg· μL^{-1}) foram 46.2 ± 2.2 mmHg· μL^{-1} (controle), 17.0 ± 2.1 mmHg· μL^{-1} (LPS), e 94.6 ± 11.2 mmHg· μL^{-1} (LPS+NOR) (figure 14B) e 63.3 ± 4.2 mmHg· μL^{-1} (LPS+ARA) (figure 17). Estes índices carga-independentes confirmaram a disfunção cardíaca no modelo estudado e a utilização de norepinefrina ou araminol permitiu a recuperação da função sistólica.

Figura 17A Função Cardíaca Sistólica

Figura 17B Função Cardíaca Sistólica

Figura 17. Índices cardíacos independentes de carga nos animais com choque endotoxêmico tratados com araminol. A pressão e o volume do VE foram medidos com cateter pressão-volume (Millar). A hemodinâmica dos três grupos foi avaliada: controle, grupo que não recebeu qualquer intervenção, representa os dados de base; grupo LPS, recebeu 10 mg/kg LPS ip.; grupo LPS+NOR, que recebeu LPS 10mg/kg ip e araminoliv para manter PAM de 85 mmHg. Houve redução no grupo LPS do (A) Ees e (B) (A) dP/dtmax / EDV comparado ao grupo controle. O tratamento com araminol recuperou ambos os parâmetros.*p<0,05 vs controle; #p<0,05 vs LPS (ANOVA seguido do teste de Bonferroni). Os valores representam a média $\pm$ DP; n=10

Pode-se observar uma importante relação entre a PPC e o fluxo sanguíneo miocárdico. Nos animais controle, houve uma correlação positiva ($r=0,73$) entre

PPC e fluxo subendocárdico, $r=0,38$ da PPC e o fluxo epicárdico e $r=0,48$ da PPC e o fluxo sanguíneo do VD. Nos animais endotoxêmicos chocados, houve correlação entre a PPC e os fluxos sanguíneos da região subendocárdica ($r=0,77$) e do VD ($r=0,94$). Além disto, houve correlação positiva entre o fluxo sanguíneo subendocárdico e as dP/dt máxima e mínima. A figura 18 mostra o gráfico PPC e fluxo sanguíneo, com regressão linear de $R^2=0,67$. Utilizando a regressão exponencial, observou-se $R^2=0,81$. O fluxo sanguíneo subendocárdico apresentou regressão linear para dP/dt max / EDV ($R^2=0,81$) e Ees ($R^2=0,60$) (figura 19).

Figura 18 Fluxo Miocárdico e PPC

Figura 18. Relação entre a pressão de perfusão coronariana e o fluxo sanguíneo subendocárdico. O gráfico representa a relação da pressão de perfusão coronariana com o fluxo sanguíneo subendocárdico, $R^2=0,67$ linear.

Figura 19 A Fluxo Miocárdico e Função Sistólica

Figura 19 B Fluxo Miocárdico e Função Sistólica

Figura 19. Relação entre o fluxo sanguíneo subendocárdico e a função cardíaca. Os gráficos representam a relação entre o fluxo sanguíneo subendocárdico com (A) Ees e (B) dP/dt max / EDV. Análise estatística: regressão linear.

6 Discussão

A depressão miocárdica é uma disfunção orgânica bem reconhecida na sepse. O grau de dano estrutural ou funcional se correlaciona com a gravidade da doença. Como os pacientes geralmente recebem drogas vasoativas, o comprometimento cardíaco pode estar mascarado. Vários mecanismos podem explicar o desenvolvimento da disfunção cardíaca na sepse. Este estudo demonstrou que o fluxo sanguíneo miocárdico foi dependente de pressão de perfusão coronariana no choque endotóxico ($PAM \leq 65$ mmHg). A redução do fluxo sanguíneo ocorreu de forma mais acentuada no ventrículo direito e na região subendocárdica do VE. Foi observado que a função cardíaca sistólica e diastólica se correlacionou com a PPC e o fluxo sanguíneo miocárdico. As medidas terapêuticas utilizadas para elevar a PAM para 85 mmHg e consequentemente a PPC foram efetivas em aumentar o fluxo sanguíneo miocárdico e restaurar a função cardíaca.

Perfusão cardíaca na endotoxemia

Trabalhos demonstraram que o fluxo sanguíneo coronariano e o lactato no seio coronariano se encontram normais nos pacientes em choque séptico e argumentam que a disfunção cardíaca não pode ser atribuída a isquemia miocárdica[92]. Entretanto, a microcirculação não foi diretamente estudada, como foi objeto importante do nosso estudo [93, 94]. As alterações da microcirculação na sepse são caracterizadas pela presença de áreas de hipofluxo ao lado de hiperfluxo no mesmo tecido ou órgão [95]. A heterogeneidade das alterações microcirculatórias na sepse indica que as

medidas que envolvem análises globais ou macrocirculatórias podem não ser efetivas em detectar hipoperfusão regional. Além disso, o fluxo sanguíneo na microcirculação não se correlaciona diretamente com a macrocirculação na sepse [96]. Um ponto de destaque em relação à literatura é que o nosso estudo pôde analisar a perfusão separadamente de diferentes áreas do coração: VD e regiões subendocárdica e epicárdica do VE. Ficou demonstrado que houve redução do fluxo sanguíneo, sobretudo no VD e região subendocárdica do VE. A perfusão cardíaca ocorre durante a diástole [73], portanto o fluxo sanguíneo miocárdico fica sujeito a dois fatores: a PPC e a frequência cardíaca. Em condições normais há autorregulação da microcirculação de forma a adequar o fluxo à demanda de oxigênio. Foi demonstrado que no choque séptico a autorregulação se encontra prejudicada, por isso o fluxo se torna dependente da PPC e associado a este fato, o paciente geralmente se encontra taquicárdico, reduzindo o tempo diastólico.

Na literatura há estudos utilizando PET *scan* que avaliaram perfusão coronariana em humanos, em situação normal e sob estresse farmacológico (adenosina), contudo os pacientes em choque séptico não foram avaliados. Em pessoas saudáveis, o PET *scan* demonstrou que avaliando as medidas globais de fluxo não se consegue mostrar as diferenças entre subendocárdico e epicárdico [97]. O estudo também observou uma correlação inversa entre perfusão miocárdica e PdfVE. Nosso trabalho observou elevação da PdfVE após injeção de LPS, o que pode levar ao aumento do estresse sobre a parede do ventrículo e compressão subendocárdica durante a diástole. A importante diferença de perfusão entre as regiões subendocárdica e epicárdica demonstra a baixa sensibilidade dos métodos que fazem avaliações globais não

distinguindo estas áreas. A região epicárdica representa dois terços da espessura da parede do VE, portanto pode encobrir as alterações que ocorrem na região subendocárdica. PET scan confirmou em humanos nossos achados experimentais; entretanto, este não é um método que possa ser utilizado na beira do leito em pacientes graves.

Nosso estudo demonstrou uma forte correlação entre a PPC e o fluxo sanguíneo subendocárdico. A redução da PPC (consequente a elevação da PdfVE e diminuição da PAD) foi uma alteração precoce, seguida do desenvolvimento da disfunção ventricular esquerda sistólica e diastólica. Vários outros trabalhos apresentaram dados consistentes com nossos resultados de diminuição do inotropismo de VE em animais endotoxêmicos. Ratos que receberam endotoxina 10mg/kg ip apresentaram redução da Ees, que foi atribuída à diminuição marcante da oxigenação [98-100].

A contratilidade é a capacidade intrínseca do músculo cardíaco de gerar força e se encurtar. Não existe um índice livre de críticas para avaliar esta função e não há uma forma não invasiva aceitável de fazê-lo, pois os fatores carga e frequência cardíaca estão intrinsecamente relacionados à função contrátil. O método mais confiável para analisar a contratilidade ventricular esquerda representa a relação pressão-volume sistólico final (elastância sistólica final, Ees) e pode-se aumentar a precisão da dP/dt max utilizando a sua relação com o volume diastólico final (dP/dt max /EDV) [73]. No entanto, fração de ejeção, trabalho e volume sistólicos são índices muito empregados na prática clínica e também foram aqui analisados.

Nosso estudo mostrou redução da contratilidade miocárdica nos ratos com choque endotoxêmico baseado em índices dependentes de carga

(trabalho sistólico, fração de ejeção e dP/dt max) e “independentes” ($E_{\text{e}} = dP/dt \text{ max} / \text{EDV}$). Estes últimos índices reforçam que as alterações observadas não têm como causa a hipovolemia. O relaxamento do VE (função diastólica) também se encontrava comprometido, como demonstrado pelos índices TAU, o parâmetro mais comumente utilizado para avaliar o relaxamento ventricular [73], período de relaxamento isovolumétrico (IRP) e dP/dt min. O relaxamento miocárdico é um processo de consumo ativo de energia, pela captação dos íons cálcio do citosol pelo retículo sarcoplasmático (bomba de cálcio). Um dos determinantes do relaxamento é o fluxo coronariano. Mais recentemente, verificou-se que a função diastólica tem um importante papel na morbimortalidade cardíaca e exerce influência na pré e pós-carga [73].

O papel do volume circulante adequado para se manter o débito cardíaco foi analisado em estudos prévios [101]. É importante enfatizar que no nosso modelo experimental, as medidas hemodinâmicas foram obtidas precocemente (1,5h após LPS) e o quadro já se apresentava com PdfVE elevada. Os parâmetros hemodinâmicos nos animais endotoxêmicos tratados com solução salina 0,9% iv não apresentaram melhora da PdfVE, pressão arterial sistêmica e PPC nem dos índices de contratilidade e relaxamento comparados aos animais que não receberam fluido.

A utilização de norepinefrina e araminol permitiu o manejo da pressão arterial sistêmica, conseqüentemente da PPC, levando ao aumento da perfusão miocárdica e melhora da função cardíaca sistólica e diastólica. O araminol, um fármaco α adrenérgico, foi utilizado para confirmar que os resultados obtidos fossem devido ao efeito vasoconstritor e aumento da PAM e não ao efeito inotrópico. A adrenalina foi primeiramente utilizada, mas

apresentou efeito arritmogênico frequente no nosso estudo, sendo substituída por araminol. A noradrenalina é a droga de escolha no tratamento do choque séptico, por isso a continuidade do estudo se focou nesta droga (estudo dos fluxos sanguíneos). Outros estudos experimentais mostraram importante distúrbio na regulação do oxigênio no coração, resultando em disfunção contrátil [93, 94]. Nossos resultados são consistentes com a literatura, que mostrou efeito benéfico da norepinefrina só em situações de dano à microcirculação [102].

É importante salientar as medidas de fluxo sanguíneo miocárdico empregadas no nosso estudo em relação aos descritos na literatura. Investigadores têm utilizado técnicas tais como Doppler das artérias coronarianas que analisam macrocirculação [103]. O emprego de microesferas permite avaliar o fluxo sanguíneo da microcirculação [104, 105]. O diâmetro da microesfera é de 15 μm e o diâmetro da microvasculatura é de 10-100 μm [39, 106]. Métodos como microscopia da microcirculação *in vivo* e fluxometria com laser Doppler só podem ser aplicados em órgãos estáticos e se limitam a superfície de um segmento. Em nosso estudo, o coração foi dividido em VD e VE e este em região subendocárdica e epicárdica e todo o tecido foi analisado.

Limitações do estudo

A limitação do estudo foi a impossibilidade de manter os ratos endotoxêmicos, anestesiados, em ventilação espontânea, recebendo norepinefrina ou araminol iv por 4 horas, como era a proposta inicial. Há também o problema do volume infundido pelas drogas vasoativas por períodos

prolongados e coletas sanguíneas para estudo do estresse oxidativo e o perfil inflamatório. Para isto, animais de maior porte seriam mais apropriados.

Ressaltamos a brevidade de tempo entre o insulto e a avaliação hemodinâmica, fato não observado na prática clínica, mas que nos forneceu dados de quão precoces são as alterações cardiovasculares.

Pressão de Perfusão Coronariana como objetivo hemodinâmico em pacientes com choque séptico

Potenciais implicações clínicas foram levantadas por este estudo. Ficou demonstrado a diminuição da perfusão, da contratilidade e do relaxamento miocárdicos e estas alterações tiveram correlação com a PPC. Sob a perspectiva clínica, a PPC poderia ser um importante instrumento para guiar a terapêutica no paciente em choque séptico. Um estudo recente mostrou que a PAD e a PPC estavam independentemente associadas com mortalidade de 28 dias em pacientes com choque cardiogênico [107].

Nosso estudo definiu choque como $PAM \leq 65$ mmHg, a qual se associou a hipoperfusão miocárdica. A pressão arterial média é o maior componente da PPC, então utilizamos PAM de 85 mmHg como objetivo, para obter maior fluxo sanguíneo miocárdico.

Trabalho recente analisou PAM de 65 a 70 mmHg vs 80 a 85 mmHg em pacientes com choque séptico, com objetivo primário de avaliar mortalidade de 28 dias. Não houve diferença estatística de mortalidade entre os dois grupos; mas a análise de necessidade de terapia substitutiva renal mostrou que os hipertensos prévios se beneficiaram de PAM 80-85 mmHg (embora sem

implicação na mortalidade?). Os autores colocam a possibilidade de uma maior PAM ter resultado em uma melhor perfusão do órgão [108]. Também há estudos em pacientes com choque séptico, nos quais os autores analisaram diferentes PAM (65, 75,85 mmHg) e não encontraram risco clínico na utilização de maiores doses de norepinefrina [108, 109]. Nestes estudos, a conduta terapêutica foi aplicada a todos os pacientes de forma indistinta, não diferenciando os pacientes com PPC baixa e/ou disfunção cardíaca. Este seria o grupo que poderia se beneficiar de uma maior PAM; assim como ocorreu com os hipertensos em relação à terapia substitutiva renal.

Estudos em animais de maior porte para podermos avaliar por longos períodos o efeito da PPC mais elevada sobre a mortalidade, sobre mediadores inflamatórios e marcadores cardíacos serão importantes para confirmar estes resultados. Finalmente, deverão ser realizados estudos clínicos com foco em pacientes com PPC baixa e disfunção cardíaca

7 Conclusões

1. O estudo demonstrou correlação positiva entre a pressão de perfusão coronariana e o fluxo sanguíneo na microcirculação, sobretudo no ventrículo direito e região subendocárdica do ventrículo esquerdo.
2. Observou-se correlação entre o baixo fluxo sanguíneo miocárdico no choque endotoxêmico e a disfunção cardíaca sistólica e diastólica.
3. Demonstrou-se que ao elevar a pressão de perfusão coronariana com a utilização de drogas vasoativas como norepinefrina, houve aumento do fluxo sanguíneo na microcirculação miocárdica acompanhado de melhora da função cardíaca sistólica e diastólica.

8 Referências

1. Cairus, H.R.J., *Textos Hipocráticos: o doente, o médico e a doença*. História e Saúde, ed. Fiocruz. Vol. 1. 2005, Rio de Janeiro. 252.
2. Angus, D.C. and T. van der Poll, *Severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med. **369**(9): p. 840-51.
3. Hochstadt, A., Y. Meroz, and G. Landesberg, *Myocardial dysfunction in severe sepsis and septic shock: more questions than answers?* J Cardiothorac Vasc Anesth. **25**(3): p. 526-35.
4. Bone, R.C., W.J. Sibbald, and C.L. Sprung, *The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure*. Chest, 1992. **101**(6): p. 1481-3.
5. Reber, A.J., et al., *Immunosenescence and Challenges of Vaccination against Influenza in the Aging Population*. Aging Dis. **3**(1): p. 68-90.
6. Martin, G.S., et al., *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000*. N Engl J Med, 2003. **348**(16): p. 1546-54.
7. Lagu, T., et al., *Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007*. Crit Care Med. **40**(3): p. 754-61.
8. Angus, D.C., et al., *Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1303-10.
9. Adhikari, N.K., et al., *Critical care and the global burden of critical illness in adults*. Lancet. **376**(9749): p. 1339-46.
10. Mayr, F.B., et al., *Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis*. Jama. **303**(24): p. 2495-503.
11. Kumar, G., et al., *Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007)*. Chest. **140**(5): p. 1223-31.
12. Sales, J.A.L., *Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de terapia intensiva Brasileiras*. Revista Brasileira de Terapia Intensiva, 2006. **18**: p. 9-16.
13. Williams, S.C., *After Xigris, researchers look to new targets to combat sepsis*. Nat Med. **18**(7): p. 1001.
14. Wenzel, R.P. and M.B. Edmond, *Septic shock--evaluating another failed treatment*. N Engl J Med. **366**(22): p. 2122-4.
15. Cohen, J., *The immunopathogenesis of sepsis*. Nature, 2002. **420**(6917): p. 885-91.
16. Angus, D.C., *The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board?* Jama. **306**(23): p. 2614-5.
17. Torgersen, C., et al., *Macroscopic postmortem findings in 235 surgical intensive care patients with sepsis*. Anesth Analg, 2009. **108**(6): p. 1841-7.
18. *From the Centers for Disease Control. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia--United States, 1979-1987*. Jama, 1990. **263**(7): p. 937-8.
19. Angus, D.C. and R.S. Wax, *Epidemiology of sepsis: an update*. Crit Care Med, 2001. **29**(7 Suppl): p. S109-16.

20. Silva, E., et al., *Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study)*. Crit Care, 2004. **8**(4): p. R251-60.
21. Jawad, I., I. Luksic, and S.B. Rafnsson, *Assessing available information on the burden of sepsis: global estimates of incidence, prevalence and mortality*. J Glob Health. **2**(1): p. 010404.
22. Xu, J., *Deaths: Final Data for 2007*, in *National Vital Statistics Report*. 2010, CDC.
23. Sharma, A.C., *Sepsis-induced myocardial dysfunction*. Shock, 2007. **28**(3): p. 265-9.
24. Angus, D.C. and J. Carlet, *Surviving intensive care: a report from the 2002 Brussels Roundtable*. Intensive Care Med, 2003. **29**(3): p. 368-77.
25. Vincent, J.L., et al., *International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units*. Jama, 2009. **302**(21): p. 2323-9.
26. Hotchkiss, R.S., G. Monneret, and D. Payen, *Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach*. Lancet Infect Dis. **13**(3): p. 260-8.
27. Weighardt, H., et al., *Sepsis after major visceral surgery is associated with sustained and interferon-gamma-resistant defects of monocyte cytokine production*. Surgery, 2000. **127**(3): p. 309-15.
28. van Dissel, J.T., et al., *Anti-inflammatory cytokine profile and mortality in febrile patients*. Lancet, 1998. **351**(9107): p. 950-3.
29. Sinistro, A., et al., *Downregulation of CD40 ligand response in monocytes from sepsis patients*. Clin Vaccine Immunol, 2008. **15**(12): p. 1851-8.
30. Rigato, O. and R. Salomao, *Impaired production of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha but not of interleukin 10 in whole blood of patients with sepsis*. Shock, 2003. **19**(2): p. 113-6.
31. Munoz, C., et al., *Dysregulation of in vitro cytokine production by monocytes during sepsis*. J Clin Invest, 1991. **88**(5): p. 1747-54.
32. Ertel, W., et al., *Downregulation of proinflammatory cytokine release in whole blood from septic patients*. Blood, 1995. **85**(5): p. 1341-7.
33. Gibot, S., et al., *Combination biomarkers to diagnose sepsis in the critically ill patient*. Am J Respir Crit Care Med. **186**(1): p. 65-71.
34. Singer, M., *Biomarkers in sepsis*. Curr Opin Pulm Med. **19**(3): p. 305-9.
35. Dellinger, R.P., et al., *Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012*. Crit Care Med. **41**(2): p. 580-637.
36. Levy, M.M., et al., *2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference*. Intensive Care Med, 2003. **29**(4): p. 530-8.
37. Rudiger, A. and M. Singer, *The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management*. Curr Vasc Pharmacol. **11**(2): p. 187-95.
38. De Backer, D., et al., *Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome*. Crit Care Med. **41**(3): p. 791-9.
39. Hernandez, G., A. Bruhn, and C. Ince, *Microcirculation in sepsis: new perspectives*. Curr Vasc Pharmacol. **11**(2): p. 161-9.
40. Ince, C., *The microcirculation is the motor of sepsis*. Crit Care, 2005. **9 Suppl 4**: p. S13-9.

41. Court, O., et al., *Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock*. Crit Care, 2002. **6**(6): p. 500-8.
42. Parrillo, J.E., 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, 1985. **76**(4): p. 1539-53.
43. Rudiger, A. and M. Singer, *Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction*. Crit Care Med, 2007. **35**(6): p. 1599-608.
44. Parker, M.M., et al., *Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock*. Ann Intern Med, 1984. **100**(4): p. 483-90.
45. Kimchi, A., et al., *Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study*. J Am Coll Cardiol, 1984. **4**(5): p. 945-51.
46. Parker, M.M., et al., *Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans*. Chest, 1990. **97**(1): p. 126-31.
47. Munt, B., et al., *Diastolic filling in human severe sepsis: an echocardiographic study*. Crit Care Med, 1998. **26**(11): p. 1829-33.
48. Poelaert, J., et al., *Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock*. Intensive Care Med, 1997. **23**(5): p. 553-60.
49. Nogueira, A.C., et al., *Changes in plasma free fatty acid levels in septic patients are associated with cardiac damage and reduction in heart rate variability*. Shock, 2008. **29**(3): p. 342-8.
50. ver Elst, K.M., et al., *Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock*. Clin Chem, 2000. **46**(5): p. 650-7.
51. Hotchkiss, R.S., et al., *Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction*. Crit Care Med, 1999. **27**(7): p. 1230-51.
52. Rossi, M.A., et al., *Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction*. Shock, 2007. **27**(1): p. 10-8.
53. Rudiger, A., et al., *Comparable increase of B-type natriuretic peptide and amino-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in patients with severe sepsis, septic shock, and acute heart failure*. Crit Care Med, 2006. **34**(8): p. 2140-4.
54. Natanson, C., et al., *Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock*. J Exp Med, 1989. **169**(3): p. 823-32.
55. Natanson, C., et al., *Cardiovascular performance with E. coli challenges in a canine model of human sepsis*. Am J Physiol, 1988. **254**(3 Pt 2): p. H558-69.
56. Hunter, J.D. and M. Doddi, *Sepsis and the heart*. Br J Anaesth. **104**(1): p. 3-11.
57. Zanotti-Cavazzoni, S.L. and S.M. Hollenberg, *Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock*. Curr Opin Crit Care, 2009. **15**(5): p. 392-7.
58. Maclean, L.D., et al., *Studies on the circulatory changes in the dog produced by endotoxin from gram-negative microorganisms*. J Clin Invest, 1956. **35**(11): p. 1191-8.

59. Hinshaw, L.B., et al., *Mechanism of decreased venous return. Subhuman primate-administered endotoxin*. Arch Surg, 1970. **100**(5): p. 600-6.
60. Wiggers, C.J., *Myocardial depression in shock; a survey of cardiodynamic studies*. Am Heart J, 1947. **33**(5): p. 633-50.
61. MacLean, L.D., et al., *Patterns of septic shock in man--a detailed study of 56 patients*. Ann Surg, 1967. **166**(4): p. 543-62.
62. Teule, G.J., et al., *Effect of volume loading and dopamine on hemodynamics and red-cell redistribution in canine endotoxin shock*. Circ Shock, 1983. **10**(1): p. 41-50.
63. Carroll, G.C. and J.V. Snyder, *Hyperdynamic severe intravascular sepsis depends on fluid administration in cynomolgus monkey*. Am J Physiol, 1982. **243**(1): p. R131-41.
64. Clowes, G.H., Jr., M. Vucinic, and M.G. Weidner, *Circulatory and metabolic alterations associated with survival or death in peritonitis: clinical analysis of 25 cases*. Ann Surg, 1966. **163**(6): p. 866-85.
65. Rabuel, C. and A. Mebazaa, *Septic shock: a heart story since the 1960s*. Intensive Care Med, 2006. **32**(6): p. 799-807.
66. Winslow, E.J., et al., *Hemodynamic studies and results of therapy in 50 patients with bacteremic shock*. Am J Med, 1973. **54**(4): p. 421-32.
67. Weisel, R.D., et al., *Myocardial depression during sepsis*. Am J Surg, 1977. **133**(4): p. 512-21.
68. *4th Vienna Shock Forum in Association with the European Shock Society*. Vienna, Austria, May 9-13, 1993. Abstracts. Circ Shock, 1993. **Suppl 1**: p. 1-65.
69. Raper, R., *Relative myocardial depression in normotensive sepsis*. J Crit Care, 1989. **4**: p. 9-18.
70. Ognibene, F.P., et al., *Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock*. Chest, 1988. **93**(5): p. 903-10.
71. Cunnion, R.E., et al., *The coronary circulation in human septic shock*. Circulation, 1986. **73**(4): p. 637-44.
72. Dhainaut, J.F., et al., *Coronary hemodynamics and myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock*. Circulation, 1987. **75**(3): p. 533-41.
73. Braunwald, R.O.B.D.P.Z.P.L.E., *Tratado de Doenças Cardiovasculares*. 7 ed, ed. Elsevier. 2006, Rio de Janeiro.
74. De Backer, D., et al., *Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy*. Ann Intensive Care. **1**(1): p. 27.
75. Verdant, C.L., et al., *Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis*. Crit Care Med, 2009. **37**(11): p. 2875-81.
76. De Backer, D., et al., *Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(1): p. 98-104.
77. Sakr, Y., et al., *Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock*. Crit Care Med, 2004. **32**(9): p. 1825-31.
78. Trzeciak, S., et al., *Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ*

- failure at 24 h in patients with sepsis. Intensive Care Med*, 2008. **34**(12): p. 2210-7.
79. Groeneveld, A.B., et al., *Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. Cardiovasc Res*, 1991. **25**(1): p. 80-8.
 80. Watts, J.A., et al., *Metabolic dysfunction and depletion of mitochondria in hearts of septic rats. J Mol Cell Cardiol*, 2004. **36**(1): p. 141-50.
 81. Singer, M., *The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. Virulence*. **5**(1): p. 66-72.
 82. Crouser, E.D., *Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. Mitochondrion*, 2004. **4**(5-6): p. 729-41.
 83. Horton, J.W., et al., *Nitric oxide modulation of TNF-alpha-induced cardiac contractile dysfunction is concentration dependent. Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000. **278**(6): p. H1955-65.
 84. Abraham, E., et al., *Double-blind randomised controlled trial of monoclonal antibody to human tumour necrosis factor in treatment of septic shock. NORASEPT II Study Group. Lancet*, 1998. **351**(9107): p. 929-33.
 85. Scharf SM, P.M., Magder S, *Heart Lung Interactions in Health and Disease* 2ed. 2001, New York. 763-792.
 86. Trzeciak, S., et al., *Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. Acad Emerg Med*, 2008. **15**(5): p. 399-413.
 87. Barth, E., et al., *Role of inducible nitric oxide synthase in the reduced responsiveness of the myocardium to catecholamines in a hyperdynamic, murine model of septic shock. Crit Care Med*, 2006. **34**(2): p. 307-13.
 88. Kirov, M.Y., et al., *Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. Crit Care Med*, 2001. **29**(10): p. 1860-7.
 89. Morin, M.J., et al., *Differential expression of inducible nitric oxide synthase messenger RNA along the longitudinal and crypt-villus axes of the intestine in endotoxemic rats. Crit Care Med*, 1998. **26**(7): p. 1258-64.
 90. Sharshar, T., et al., *Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. Lancet*, 2003. **362**(9398): p. 1799-805.
 91. Azimi, G. and J.L. Vincent, *Ultimate survival from septic shock. Resuscitation*, 1986. **14**(4): p. 245-53.
 92. Grandel, U., et al., *Endotoxin-induced myocardial tumor necrosis factor-alpha synthesis depresses contractility of isolated rat hearts: evidence for a role of sphingosine and cyclooxygenase-2-derived thromboxane production. Circulation*, 2000. **102**(22): p. 2758-64.
 93. Hersch, M., et al., *Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. Surgery*, 1990. **107**(4): p. 397-410.
 94. Ince, C. and M. Sinaasappel, *Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. Crit Care Med*, 1999. **27**(7): p. 1369-77.

95. Kumar, A., et al., *Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum*. J Exp Med, 1996. **183**(3): p. 949-58.
96. Andersson, A., et al., *Gut microcirculatory and mitochondrial effects of hyperdynamic endotoxaemic shock and norepinephrine treatment*. Br J Anaesth. **108**(2): p. 254-61.
97. Rimoldi, O., et al., *Quantification of subendocardial and subepicardial blood flow using 15O-labeled water and PET: experimental validation*. J Nucl Med, 2006. **47**(1): p. 163-72.
98. Tokunaga, C., et al., *Albumin resuscitation improves ventricular contractility and myocardial tissue oxygenation in rat endotoxemia*. Crit Care Med, 2007. **35**(5): p. 1341-7.
99. Ichinose, F., et al., *Cardiomyocyte-specific overexpression of nitric oxide synthase 3 prevents myocardial dysfunction in murine models of septic shock*. Circ Res, 2007. **100**(1): p. 130-9.
100. Davani, E.Y., et al., *Cardiac ICAM-1 mediates leukocyte-dependent decreased ventricular contractility in endotoxemic mice*. Cardiovasc Res, 2006. **72**(1): p. 134-42.
101. Rivers, E., et al., *Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1368-77.
102. Dubin, A., et al., *Increasing arterial blood pressure with norepinephrine does not improve microcirculatory blood flow: a prospective study*. Crit Care, 2009. **13**(3): p. R92.
103. Morelli, A., et al., *Effects of levosimendan on systemic and regional hemodynamics in septic myocardial depression*. Intensive Care Med, 2005. **31**(5): p. 638-44.
104. Hakkinen, J.P., et al., *Measurement of organ blood flow with coloured microspheres in the rat*. Cardiovasc Res, 1995. **29**(1): p. 74-9.
105. De Angelis, K., et al., *Blood flow measurements in rats using four color microspheres during blockade of different vasopressor systems*. Braz J Med Biol Res, 2005. **38**(1): p. 119-25.
106. Hiller, K.H., et al., *Study of microcirculation by coloured microspheres and NMR-microscopy in isolated rat heart: effect of ischaemia, endothelin-1 and endothelin-1 antagonist BQ 610*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(11): p. 3115-22.
107. Rigamonti, F., et al., *The short-term prognosis of cardiogenic shock can be determined using hemodynamic variables: a retrospective cohort study**. Crit Care Med. **41**(11): p. 2484-91.
108. Asfar, P., et al., *High versus Low Blood-Pressure Target in Patients with Septic Shock*. N Engl J Med.
109. Thooft, A., et al., *Effects of changes in arterial pressure on organ perfusion during septic shock*. Crit Care. **15**(5): p. R222.