

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:**  
**FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA**

**Natália Ribeiro Cabacinha Nóbrega**

**Animais sobreviventes à sepse apresentam  
hiperreatividade aórtica e prejuízo da função cardíaca**

**Belo Horizonte**  
**2021**

Natália Ribeiro Cabacinha Nóbrega

## **Animais sobreviventes à sepse apresentam hiperreatividade aórtica e prejuízo da função cardíaca**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniella Bonaventura

Belo Horizonte

2021

043 Nóbrega, Natália Ribeiro Cabacinha.  
Animais sobreviventes à sepse apresentam hiperreatividade aórtica e prejuízo da função cardíaca [manuscrito] / Natália Ribeiro Cabacinha Nóbrega. – 2021.  
77 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Daniella Bonaventura.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Fisiologia. 2. Sepse. 3. Sobreviventes. 4. Doenças Cardiovasculares. 5. Aorta.  
I. Bonaventura, Daniella. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

**FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 341 DE NATÁLIA RIBEIRO CABACINHA NÓBREGA**

**"Animais Sobreviventes à Sepsis Apresentam Hiperreatividade Aórtica e Prejuízo da Função Cardíaca"**

**NATÁLIA RIBEIRO CABACINHA NÓBREGA**

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **08 de julho de 2021**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

**Profa. Dra. Ana Paula Couto Davel**, Instituto de Biologia/Universidade Estadual de Campinas  
**Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho**, CCB/Universidade Federal de Santa Catarina  
**Profa. Dra. Alice Valença Araújo**, CAV/Universidade Federal de Pernambuco  
**Prof. Dr. Stéfany Bruno de Assis Cau**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais  
**Profa. Dra. Daniella Bonaventura**, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais - Orientadora

Belo Horizonte, 08 de julho de 2021.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Alice Valença Araújo, Usuário Externo**, em 09/07/2021, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 29/07/2021, às 11:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 05/08/2021, às 11:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jamil Assereuy Filho, Usuário Externo**, em 05/08/2021, às 13:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Paula Couto Davel, Usuário Externo**, em 05/08/2021, às 14:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0818729** e o código CRC **4BAA7CE4**.

*Dedico este trabalho a meus pais, Marcelo e Virgínia, às minhas irmãs Isabela e Ana Beatriz, ao meu esposo e mais que companheiro Hebert e a nossa filha Beatriz por simplesmente fazerem parte da minha vida, por sempre me incentivar e apoiar em cada etapa desta jornada, dando mais sentido a cada passo dessa longa caminhada. Amo vocês!*

*“Façamos nosso FUTURO agora e façamos dos nossos sonhos a REALIDADE de amanhã.”*

*Malala Yousafzai  
(Ativista Paquistanesa)*

# *Agradecimientos*

Agradeço primeiramente a Deus! Àquele que sabe de todas as coisas, e que me conduz no caminho por Ele trilhado. Obrigado Senhor por toda essa caminhada, e principalmente por me permitir chegar até aqui durante essa fase difícil que estamos vivendo! Obrigado por essa chance e por confiar em mim!

À meus pais e irmãs, agradeço por serem tudo e mais um pouco pra mim. Obrigada por todo o apoio, e por estarmos cada vez mais unidos. Mãe, Pai, Bela e Aninha, vocês são a base de tudo na minha vida. Que a Beatriz possa viver intensamente ao lado de vocês, assim como eu amo viver.

À minha família, meu esposo Hebert e nossa filha Beatriz, agradeço por serem meu incentivo diário. Obrigado meu amor por sempre estar ao meu lado independente das circunstâncias, por ser meu companheiro, amigo, e incentivador nato. Agradeço a você filha, por ter chegado em nossas vidas e transformado para MUITO melhor nossos dias.

À todos meus familiares e amigos, que contribuíram direta ou indiretamente para que esse caminho fosse trilhado. A todos um enorme abraço!

À minha “chefe”, como carinhosamente eu adoro chamar, minha orientadora, Profa. Dra. Daniella Bonaventura, obrigada por estar comigo esses 9 anos e por me permitir ser sua filha científica. Aprendi, aprendo e ainda quero aprender muito com você. Obrigada por todos os ensinamentos e oportunidades! Obrigada por acreditar em mim, quando eu mesma duvidei.



Ao Laboratório de Farmacologia Vascular (LFV), minha casa na UFMG. Obrigado por todos esses anos. A família que construímos juntos nesse lugar tão especial vai estar comigo onde quer que eu esteja. Amo vocês!

À Daniela Reis, minha gata, obrigada por sua paz e calma em diversos momentos, e por ser tão dedicada e compromissada em tudo que faz. Saiba que você é uma inspiração diária para mim em vários aspectos, tanto pessoal quanto profissional. Vamos ficar longe fisicamente, mas carrego você comigo para onde for. Obrigada por tudo minha parceira de jornada. Amo você!

À Natália Araújo, minha little. Natiiiiii! Você é tão pequenina mas tão gigante ao mesmo tempo. Sua força e garra me motivam diariamente. Admiro muito sua personalidade forte, que defende o que acredita com unhas e dentes. Saiba que você me incentiva muito com seu jeitinho nada delicado de ser, mas o jeitinho mais companheiro que existe. Amo você!

À Naiara Assis, a Naizinha, que chegou a pouco, mas se encaixou tão bem ao lab que parece estar lá a 10 anos. Nos conhecemos a muito tempo, mas só agora nesses últimos quase 3 anos pude te conhecer da melhor forma possível. Obrigada por ser tão companheira, amável, parceira e prestativa. Você é aquela que pensa em todos os detalhes e sempre nos surpreende. Amo você!

Aos integrantes do Laboratório de Genética Funcional pela parceria nesses anos, agradeço a todas pelo apoio sempre que necessário, mas em especial agradeço ao Prof. Dr. Frederico Marianetti Soriani e sua aluna Jéssica Amanda, que

colaboraram de maneira extraordinária para a realização deste trabalho além de explicações, orientações e dicas. Muito obrigada!

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e da Inflamação, que considero irmãos de lab. Obrigado por todo o suporte que a mim concederam durante todo esse tempo. Agradeço em especial ao Prof. Dr Stéfany Bruno de Assis Cau e seu aluno Alexandre Bruno que contribuíram de forma brilhante para a execução deste trabalho. Obrigada por toda a dedicação.

Ao Laboratório de Hipertensão, em especial ao Prof. Robson Santos e seu aluno Marco Barrouin Melo. Agradeço a colaboração realizada para este trabalho. Os resultados que juntos obtivemos, foram cruciais para a condução deste estudo! Muito obrigada!

Ao Laboratório de Membranas Excitáveis e Biologia Cardiovascular, em especial ao Prof. Jader dos Santos Cruz, Arthur Miranda, José Evaldo e Alexandre Dantas Costa. À vocês meu muito obrigada por TODO apoio que vocês sempre nos proporcionaram, tanto no quesito experimental quanto no desenvolvimento do pensamento crítico. Vocês são parceiros inigualáveis!

Agradeço aos professores que fizeram parte da minha banca de qualificação, Profa. Danielle Souza, Prof. Jader Cruz e Prof. Stéfany Cau, muito obrigada por todas as considerações. Vocês contribuíram grandemente para a melhor condução deste estudo.

Aos amigos queridos do Laboratório de Biologia Vascular, obrigado por fazerem parte da minha trajetória.

À Universidade Federal de Minas Gerais agradeço pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente.

Aos novos amigos que a Pós-Graduação me trouxe, obrigado pela troca de ideias, parceria e convívio nesses anos.

Aos queridos Professores e colegas da Pós-Graduação muito obrigada por todo o conhecimento compartilhado durante a realização das disciplinas e participação em eventos científicos, muito obrigado pela disponibilidade e atenção.

À todos os animais que foram utilizados para realização de todos os experimentos desse estudo meu respeito e eterna gratidão.

*Resumo*

Doenças cardiovasculares (DCVs) são consideradas as principais causas de morte no mundo. Trabalhos recentes demonstram que há um aumento na incidência de DCVs em pacientes que sobrevivem a um quadro de infecção aguda como a sepse, entre o primeiro e o quinto ano após a infecção. A partir disso, o objetivo desse estudo foi avaliar a função cardiovascular dos animais sobreviventes à sepse. Para tal, em camundongos Balb/c machos foi realizada a ligação e perfuração do ceco para indução da sepse. Após 15 dias, foram avaliados o eletrocardiograma e ecocardiograma, experimentos de Langendorff, contratilidade de cardiomiócitos e reatividade vascular na aorta torácica. Nossos resultados demonstraram um aumento significativo do volume sistólico final associado a uma redução da fração de ejeção e do débito cardíaco no grupo sobrevivente à sepse. Além disso, nesse mesmo grupo, os resultados do eletrocardiograma demonstraram um prolongamento no tempo para iniciar a repolarização ventricular. Os experimentos de Langendorff confirmaram o prejuízo da função cardíaca basal nos sobreviventes à sepse, e esse prejuízo foi mantido quando submetido ao estresse farmacológico induzido por isoprenalina. Nos experimentos de reatividade vascular, o efeito contrátil induzido por fenilefrina em aortas torácicas dos animais sobreviventes à sepse foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle. Esse aumento na vasoconstrição foi relacionado à ativação de receptores  $AT_1$ , ânion superóxido e derivados da COX. Com isso, camundongos sobreviventes à sepse apresentaram aumento da contratilidade vascular e prejuízo da função cardíaca, onde o tratamento com propranolol foi capaz de impedir a hiperreatividade vascular aórtica, bem como reverteu alguns pontos do prejuízo cardíaco.

Palavras – chave: Sepse; Reatividade vascular; Aorta; Função cardíaca; Sobreviventes à sepse;

*Abstract*

Cardiovascular diseases (CVDs) are considered the leading cause of death in the world. Recent studies have shown an increase in the incidence of CVDs in patients with acute infection, such as sepsis. Sepsis survivors show an increase in the development of CVDs between 1 and 5 years after the previous infection. Thus, the aim of this study was to evaluate the cardiovascular parameters in animals surviving sepsis. For that, in male Balb/c mice was performed cecal ligation and a puncture to induce sepsis. After 15 days, electrocardiogram and echocardiogram, Langendorff experiments, cardiomyocytes contraction, and vascular reactivity in thoracic aorta were performed. Our results showed an increase in systolic volume, ejection fraction and cardiac output in the sepsis-survivor group (SSG). Besides that, the electrocardiogram showed an increase in time to initiate ventricular repolarization in SSG. Langendorff's experiments confirmed the impairment of cardiac function in the SSG group, and this impairment was not reversed in a stressful condition induced by isoprenaline. About vasomotor tonus, the contractile effect induced by phenylephrine in thoracic aortas from SSG was significantly higher when compared to the control group. This effect was associated with the activation of  $AT_1$  receptors, anions superoxide and COX derived prostanoids. Taken together, sepsis-surviving mice showed vascular contractility enhancement and impairment of cardiac function. Propranolol treatment was able to reverse the increased vascular resistance triggered by sepsis and some points of cardiac function.

Keywords: Sepsis; Vascular Reactivity; Aorta; Cardiac Function; Sepsis Survivor;

# *Lista de Abreviatura*



ACh	<i>Acetylcholine</i> - Acetilcolina
Ang II ou Ang 8	Angiotensina II
ANOVA	Análise de variância
AT <sub>1</sub>	Receptor do tipo I para Ang II
AVE	Acidente vascular encefálico
AH6809	Antagonista do receptor para prostaglandina E <sub>2</sub> e F <sub>2α</sub>
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CVDs	Cardiovascular Diseases
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase 2
DCVs	Doenças Cardiovasculares
dp	Derivada da pressão
dt	Derivada do tempo
dp/dt	Derivada da pressão/ Derivada do tempo
ECA	Enzima Conversora de Angiotensina
ECA II	Enzima Conversora de Angiotensina II
E <sub>max</sub>	Efeito máximo
eNOS	<i>Endothelium Nitric Oxide Synthase</i> - Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro padrão da média
EROS	Espécie Reativa de Oxigênio
ECG	Eletrocardiograma
G	Grama (unidade de peso)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio

ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL- (1)	Interleucina- (1)
INF- $\gamma$	Interferon Gama
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzida
KCl	Cloreto de potássio
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Fosfato de Potássio Monobásico Anidro
LPS	Lipopolissacarídeos
LFV	Laboratório de Farmacologia Vascular
LY-294,002	Inibidor da PI3K
mN	Milnewton (unidade de força)
NO	<i>Nitric Oxide</i> - Óxido nítrico
ONOO <sup>-</sup>	Peróxinitrito
O <sup>-</sup> <sub>2</sub>	Ânion superóxido
OMS	Organização Mundial de Saúde
p/v	Peso por volume
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão fosfato salino
PAMPs	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PRi	Intervalo PR
PDVE	Pressão Desenvolvida no Ventrículo Esquerdo
QTi	Intervalo QT
QTc	Intervalo QT corrigido
ROS	Reactive Oxygen Species
S.S	Sobreviventes à sepse
SSG	Sepsis-Survivor Group

SOD	<i>Superoxide Dismutase</i> - Superóxido dismutase
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
TLR	<i>Toll Like Receptors</i>
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor-alpha</i> - Fator de necrose tumoral alfa
TRAF6	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UFMG	Universidade de Minas Gerais

# *Lista de Figuras*

<b>Figura 1:</b> Ativação da cascata intracelular a partir do reconhecimento de LPS pelo TLR.....	2
<b>Figura 2:</b> Ativação da cascata intracelular a partir do LPS em monócito e amplificação da resposta pela liberação de citocinas que ativam demais componentes do sistema imune.....	3
<b>Figura 3:</b> Representação esquemática dos banhos para órgão isolado utilizados em estudos de reatividade vascular.....	22
<b>Figura 4:</b> Gráficos de morbimortalidade dos animais que passaram ou não pela indução da sepse. A- Porcentagem de sobrevivência. B- Escore clínico.....	29
<b>Figura 5:</b> Avaliação temporal da pressão sistólica dos grupos sham e sobreviventes à sepse.....	30
<b>Figura 6:</b> Avaliação da função cardíaca por ecocardiograma.....	31
<b>Figura 7:</b> Avaliação da função dos cardiomiócitos.....	33
<b>Figura 8:</b> Eletrocardiograma realizado no grupo sham e sobreviventes à sepse.....	34
<b>Figura 9:</b> Representação esquemática de um eletrocardiograma normal.....	35
<b>Figura 10:</b> Prejuízo da função ventricular esquerda tanto no estado basal quanto submetido ao estresse dos animais sobreviventes à sepse.....	37 e 38
<b>Figura 11:</b> Efeito da sepse sob a resposta vascular em aortas de camundongos.....	40
<b>Figura 12:</b> Participação do SRRA no aumento da resistência vascular aórtica de animais sobreviventes à sepse.....	42

<b>Figura 13:</b> Análise do envolvimento de $O_2^-$ e enzimas responsáveis por sua produção no aumento da resistência vascular aórtica de animais sobreviventes à sepse.....	44
<b>Figura 14:</b> Avaliação da participação da enzima COX e suas isoformas no aumento da resistência vascular aórtica de animais sobreviventes à sepse.....	46
<b>Figura 15:</b> Envolvimento de tromboxano e prostaglandina $E_2$ e $F2\alpha$ no aumento da resistência vascular aórtica de animais sobreviventes à sepse.....	48
<b>Figura 16:</b> Tratamento com captopril durante a fase aguda da sepse, não reverte hiperreatividade vascular encontrada nos sobreviventes à sepse.....	49
<b>Figura 17:</b> Tratamento com propranolol durante a fase aguda da sepse, impede a hiperreatividade vascular encontrada nos animais sobreviventes à sepse.....	50
<b>Figura 18:</b> Eletrocardiograma realizado no grupo sham e sobreviventes à sepse tratados com propranolol.....	52
<b>Figura 19:</b> Avaliação da função dos cardiomiócitos dos grupos sham e sobreviventes à sepse tratados com propranolol.....	53
<b>Figura 20:</b> Representação esquemática sugerindo o mecanismo que induz o prejuízo da função cardíaca via hiperreatividade vascular em sobreviventes à sepse.....	65

# *Sumário*

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Sepsis: definição e mecanismo .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Sepsis e o sistema cardiovascular.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3 Pós-sepsis e suas consequências .....</b>	<b>10</b>
<b>2. Objetivo.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1 Objetivos Específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1 Animais experimentais.....</b>	<b>15</b>
<b>3.2 Indução da Sepsis pelo método CLP (do inglês Cecal Ligation and Puncture) .....</b>	<b>15</b>
<b>3.3 Avaliação da morbimortalidade.....</b>	<b>16</b>
<b>3.4 Análise dos parâmetros hemodinâmicos e cardíacos .....</b>	<b>17</b>
3.4.1 Pressão Arterial.....	17
3.4.2 Ecocardiografia .....	17
3.4.3 Eletrocardiografia .....	17
3.4.4 Isolamento e contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares.....	18
3.4.5 Função cardíaca Ex-Vivo – Langendorff .....	20
<b>3.5 Análise da função vascular.....</b>	<b>21</b>
3.5.1 Avaliação da viabilidade da preparação, integridade endotelial e possíveis vias envolvidas.....	22
3.5.2 Investigação do efeito da sepsis na reatividade vascular em sobreviventes a esse quadro. ....	23
<b>3.6 Análise Estatística.....</b>	<b>27</b>
<b>4. Resultados.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Análise da morbimortalidade dos animais submetidos ou não à indução de sepsis.....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Alteração da pressão arterial sistólica dos animais submetidos à indução ou não de sepsis.....</b>	<b>30</b>
<b>4.3 Animais sobreviventes à sepsis apresentam prejuízo da função cardíaca.....</b>	<b>30</b>
<b>4.4 Cardiomiócitos dos animais sobreviventes à sepsis apresentam redução da contratilidade.....</b>	<b>32</b>
<b>4.5 Coração de animais sobreviventes à sepsis prolongam o tempo para início de repolarização ventricular.....</b>	<b>34</b>
<b>4.6 Prejuízo da função cardíaca dos animais sobreviventes à sepsis avaliada ex vivo. ....</b>	<b>36</b>
<b>4.7 Animais sobreviventes à sepsis apresentaram aumento da resistência vascular via ativação do SRAA e mediadores inflamatórios.....</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Avaliação da resposta vascular dos animais submetidos ou não à sepsis após o tratamento com Captopril ou Propranolol.....</b>	<b>48</b>
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>64</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>



# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

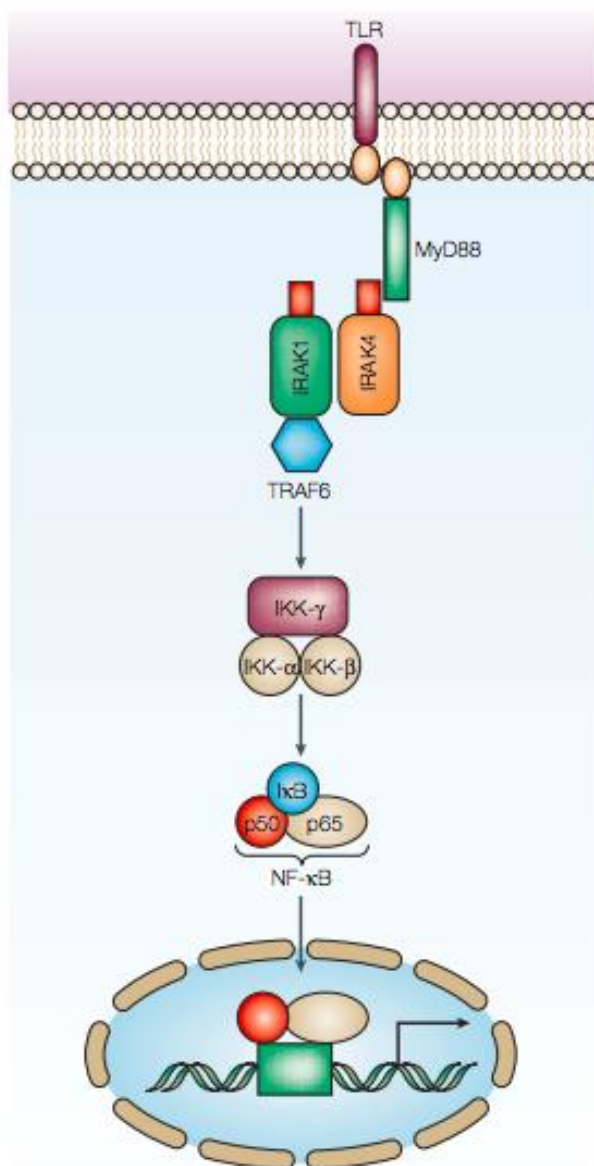
### 1.1 Sepses: definição e mecanismo

De acordo com o Terceiro Consenso Internacional para Sepses e Choque Séptico (SEPSIS-3), a sepsis é definida como uma disfunção ameaçadora à vida em decorrência de resposta desregulada à infecção (Singer et al., 2016). Esse novo conceito, indica que seja utilizado um score de disfunção/falência orgânica, denominado “Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)”, para que a sepsis seja diagnosticada, em que um paciente diagnosticado com sepsis, teria que apresentar uma variação maior ou igual a 2 pontos SOFA (Carneiro et al., 2017).

Mas como a sepsis acontece? A sepsis pode ser ocasionada por vírus, fungos ou bactérias, sejam estas gram-positivas ou gram-negativas. Utilizando de exemplo as bactérias gram-negativas, que apresentam em sua parede celular o lipopolissacarídeo (LPS), elas induzem a sepsis através da liberação desse LPS quando as bactérias se multiplicam ou morrem (H. Zhang et al., 1998). O LPS é reconhecido pelos receptores do tipo Toll (*TLR: Toll like receptors*), que foram identificados como receptores sensíveis a moléculas associadas a patógenos (PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*) (Creagh & O’Neill, 2006). O reconhecimento dos PAMPs por TRL dispara uma cascata de sinalização intracelular que é dependente do recrutamento molécula adaptadora MyD88. Ao ser recrutada, essa molécula interage com o receptor de interleucina 1 (IL-1), que é denominado IRAK. Esta interação promove a autofosforilação de IRAK permitindo a interação deste com a proteína adaptadora associada ao receptor do fator de necrose tumoral (TRAF6). Em seguida, ocorre a fosforilação do complexo IKK que por sua vez fosforila I $\kappa$ B, levando a sua degradação e liberação do fator

NF- $\kappa$ B. Essa liberação de NF- $\kappa$ B, que é um fator de transcrição nuclear, induz a produção de citocinas que darão início a resposta imune inflamatória (**Figura 1**) (Coelho, 2014; Janeway & Medzhitov, 2002; Opitz et al., 2009).

Figura 1: Ativação da cascata intracelular a partir do reconhecimento de LPS pelo TLR (Miller et al., 2005).



Dentre a citocinas que são produzidas nessa resposta inflamatória, podemos citar: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) interferon gama (INF- $\gamma$ ), interleucina 1 (IL-1), entre outras, que serão responsáveis por ativar outras células

do sistema imune, amplificando a resposta. Como exemplo dessa amplificação, pode haver também a ativação de linfócitos Th1, que apresentam uma resposta pró-inflamatória; linfócitos Th2, que apresentam uma resposta anti-inflamatória, linfócitos B, monócitos e as células endoteliais presentes nos vasos sanguíneos, em que esses dois últimos ativam fatores teciduais da cascata de coagulação no intuito de conter o microrganismo invasor (**Figura 2**) (Coelho, 2014).

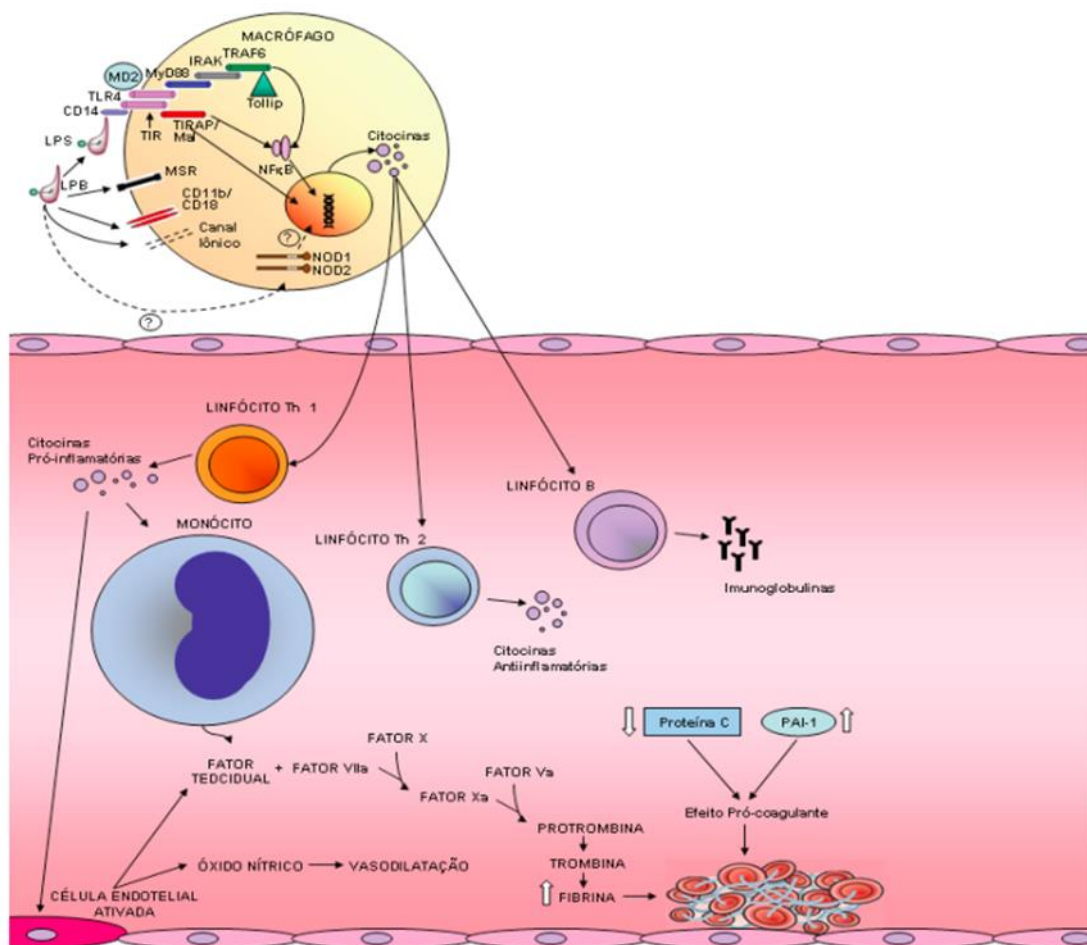


Figura 2: Ativação da cascata intracelular a partir do LPS em monócito e amplificação da resposta pela liberação de citocinas que ativam demais componentes do sistema imune (Coelho, 2014).

A produção dessas citocinas também induz o aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS), que é uma das enzimas responsáveis pela produção do óxido nítrico (NO). O NO apresenta um papel

importante durante a sepse, uma vez que ele apresenta uma função microbicida, capaz de conter diretamente o agente invasor, além de facilitar chegada das células do sistema imune no foco infeccioso (J. L. Vincent et al., 2000).

De acordo com o novo consenso, a sepse é dividida em três estágios: infecção, sepse e choque séptico, em que este último é caracterizado pela falência circulatória aguda, acompanhada por uma hipotensão arterial persistente (Singer et al., 2016)

A disfunção cardiocirculatória no choque séptico envolve diversas alterações cardíacas e vasculares, em que a redução da resistência vascular sistêmica é uma das mais relevantes características desse quadro, por ser um dos principais fatores que levam o paciente à óbito (Parrillo et al., 1990; Zimmerman & Dietrich, 1987). Estudos demonstram que pacientes com sepse, que apresentam maior resistência vascular periférica, têm um índice de sobrevivência aumentado quando comparados àqueles que apresentam baixa resistência vascular periférica (Parker et al., 1984).

A vasodilatação periférica que ocorre durante a sepse acontece devido a alguns fatores, dentre eles: uma redução na expressão de receptores responsáveis pela vasoconstrição, principalmente receptores  $\alpha$ -adrenérgicos (Parrat, 1988). Outra explicação seria o aumento da produção de substâncias vasodilatadoras circulantes, como por exemplo o NO (Parratt, 1988). Além disso, a vasodilatação periférica durante a sepse pode estar associada a uma baixa sensibilidade a agentes vasoconstritores, incluindo catecolaminas (Ichiro Wakabayashi et al., 1987) angiotensina II (Schaller et al., 1985; Virdis et al., 2007a), vasopressina (Schaller et al., 1985), serotonina e agentes despolarizantes (Ichiro Wakabayashi et al., 1987). Logo, caso haja a associação desses três

fenômenos: redução da expressão de receptores vasoconstritores, o aumento na produção de agentes vasodilatadores e diminuição da resposta à agentes vasoconstritores, a vasodilatação periférica durante esse quadro de sepse ocorre de maneira abrupta e persistente.

## **1.2 Sepse e o sistema cardiovascular**

Durante a sepse, o sistema cardiovascular é sobrecarregado no intuito de compensar, principalmente, a queda da resistência vascular periférica. O NO é o principal agente vasodilatador endógeno que influencia diretamente no fluxo sanguíneo basal e na homeostase vascular, atuando, portanto, na diminuição dessa resistência vascular periférica (Champion et al., 2004; Furchgott & Zawadzki, 1980).

A produção excessiva de NO, em um quadro de sepse, é bem documentada tanto em modelos experimentais de sepse, quanto em humanos (Feihl et al., 2001; *Ochoa1991.Pdf*, n.d.). Já foram identificadas concentrações de NO significativamente maiores que a concentração fisiológica em modelos animais de sepse, sugerindo que esse aumento excessivo se deve tanto a isoforma induzida (iNOS) quanto a neuronal (nNOS) da NOS (Nardi et al., 2014).

Wei et al. (1995) demonstraram que animais deficientes em iNOS apresentavam uma redução da resposta inflamatória não específica à carragenina, além de serem mais resistentes à mortalidade induzida por LPS (Wei et al., 1995). Além disso, Nardi et al. (2014), demonstraram que a sepse induzia ao aumento da expressão de nNOS, bem como sua associação com a guanilato ciclase, além de sua inibição seletiva ser capaz de restaurar a responsividade a vasoconstritores durante a sepse (Nardi et al., 2014) . Dessa forma, o NO tem sido

indicado como o principal agente envolvido no desenvolvimento de hipotensão e dano tecidual observados na sepse.

Além da vasodilatação intensa, já é bem descrito que a alta atividade de NOS, bem como a alta produção de NO no coração, culmina em uma redução da força de contração cardíaca caracterizando um efeito inotrópico negativo (Corrales-Medina et al., 2010). Além da iNOS, trabalhos demonstram que a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) é a principal isoforma atrelada ao desempenho cardíaco, e podemos ver isso também durante a sepse, uma vez que animais sépticos knockouts para eNOS apresentam pressão estável, fluxo coronariano e débito cardíaco preservados e com tempo de sobrevivência estendido, quando comparado ao grupo controle séptico (Champion et al., 2004; Ohlig, 2013).

Além desses efeitos diretos do NO no sistema cardiovascular durante a sepse, o NO também apresenta um efeito citotóxico, podendo levar a danos nucleares, inibição da respiração mitocondrial, bem como alteração de fosfolípidos e proteínas de membrana, em que essas alterações podem induzir um prejuízo funcional dos órgãos cruciais para a manutenção da sobrevivência durante a sepse (J. L. Vincent et al., 2000). Apesar de ser bem descrito que o NO, em grandes quantidades, apresenta um efeito tóxico celular, acredita-se que esse efeito se deve principalmente aos seus produtos de oxidação como, por exemplo, peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), que é formado pela reação entre o NO e o ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) (R. M. Touyz & Schiffrin, 2004). Esse produto de oxidação formado é extremamente tóxico, e pode levar à alteração de fatores de transcrição, quinases, síntese de proteínas, função endotelial, aumento da contratilidade vascular, crescimento celular e apoptose de células do músculo liso vascular, entre outros (Szabó & Ohshima, 1997). Portanto, o  $\text{ONOO}^-$  está diretamente relacionado ao

prejuízo da função vascular encontrada em situações patológicas como a sepse (R. M. Touyz & Schiffrin, 2004; Rhian M. Touyz et al., 2003).

Apesar de contribuir para geração de um produto extremamente deletério como o ONOO<sup>-</sup>, o NO apresenta ações positivas durante a sepse, tais como: a função microbicida, mencionada anteriormente, a prevenção da isquemia na circulação hepatoesplênica, além de contrabalançar a vasoconstrição renal que pode ocorrer durante a sepse, mantendo assim o fluxo sanguíneo, preservando a função desses órgãos (Corrales-Medina et al., 2010). Portanto, podemos incluir as espécies reativas de oxigênio (EROs) como fatores importantes na patogênese da sepse (Trautinger et al., 1991; B. P. Yu, 1994).

O O<sub>2</sub><sup>-</sup> é uma espécie reativa de oxigênio e também um radical livre, que tem a capacidade única de levar à formação de diversas outras espécies reativas, dentre as quais podemos citar o radical OH<sup>-</sup>, através de sua interação com metais pesados, e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela ação da superóxido dismutase (SOD), por exemplo (B. P. A. L. Yu, 2018). Já foi demonstrado que o O<sub>2</sub><sup>-</sup> é encontrado em níveis elevados em pacientes com sepse quando comparado a demais pacientes internados na unidade de terapia intensiva (UTI) (Durant et al., 2004). Boczkowski et al. (1999) já haviam demonstrado resultados semelhantes em modelos animais de sepse (Boczkowski et al., 1999).

As espécies reativas de oxigênio, tais como: O<sub>2</sub><sup>-</sup>, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ONOO<sup>-</sup>, são encontradas em baixas concentrações em condições fisiológicas normais, participando do controle do tônus vascular e do crescimento celular (Rhian M. Touyz & Schiffrin, 1999). Fisiologicamente, o controle da concentração dessas espécies reativas é feito por antioxidantes endógenos, como a enzima superóxido dismutase, a catalase, a glutatona, bem como vitaminas



antioxidantes, entre outros. Em condições fisiopatológicas, além da produção dessas espécies estar aumentada, o controle feito pelos antioxidantes endógenos e vias de excreção encontram-se prejudicados, levando assim ao status de estresse oxidativo (Landmesser & Harrison, 2001).

Além do NO e das ROS estarem envolvidas diretamente na resposta cardiovascular durante a sepse, outros mecanismos são ativados durante esse quadro, entre eles podemos destacar a vasopressina, peptídeo natriurético, catecolaminas, angiotensina e aldosterona. Para compensação da diminuição da resistência vascular periférica e volemia durante a sepse ocorre a liberação de vasopressina que promove a vasoconstrição via receptor V1 no músculo liso e induz o efeito antidiurético via ativação dos receptores V2 no ducto coletor renal, ambos na tentativa de aumentar a resistência vascular periférica e volume circulante (Holmes et al., 2001). Outro mecanismo de compensação durante a sepse envolve a inativação dos peptídeos natriuréticos atrial e cerebral, impedindo assim a redução do volume plasmático circulante. Além disso, há também o aumento da secreção de renina pelas células justaglomerulares do rim, que consequentemente induzem o aumento de angiotensina II (Ang II) circulante - que é um potente vasoconstritor - aumentando a resistência vascular periférica, e a secreção de aldosterona pelo córtex da glândula adrenal, o que, por sua vez, provoca o aumento da volemia. Logo, esta é considerada uma importante via ativada durante a sepse (Corrêa et al., 2015).

Juntamente com o aumento da produção de Ang II, já é muito bem descrito na literatura a ativação dos receptores do tipo 1 para Ang II (AT1), que culmina em respostas biológicas diretas em células do músculo liso vascular, como por exemplo, crescimento e proliferação celular, bem como lesões vasculares,

sugerindo o envolvimento da enzima ciclooxygenase 2 (COX-2). Isso foi confirmado pelo fato de que a inibição não seletiva da enzima ciclooxygenase (COX) foi capaz de abolir o dano tecidual e vascular induzido por Ang II. Enzima essa, que apresenta uma expressão aumentada durante a fase aguda da sepse (Bohm et al., 1995; McKenna et al., 2016; Rocha et al., 2002)

Já se sabe que o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) é ativado durante a sepse, porém a hipotensão persistente durante esse quadro ainda é visualizada. Estudos confirmam que a baixa atividade do SRAA está diretamente relacionada ao mau prognóstico da sepse. Portanto, a sua ativação, por menor que seja, é crucial para a sobrevivência de indivíduos com sepse (W. Zhang et al., 2014). Estudos têm proposto que, apesar da alta atividade do SRAA, tanto as citocinas quanto o NO presentes em um quadro de sepse estão envolvidos na redução da expressão dos receptores AT1 levando a uma atenuação da vasoconstrição induzida pela ativação desse receptor, bem como a redução na secreção de aldosterona (Bucher, Hobbhahn, et al., 2001; Bucher, Ittner, et al., 2001).

Além do papel já destacado do SRAA durante a sepse, é importante destacar a relevância desse sistema no controle da adesão leucocitária, estimulando a produção de moléculas de adesão endotelial como P-selectina, E-selectina e molécula de adesão celular vascular (VCAM), em que esses contribuem para o progresso da resposta inflamatória, induzindo a síntese de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) (Bodor et al., 2012; Jadhav & Sadaka, 2019). Associado a isso, a estimulação excessiva de AT<sub>1</sub>, acarreta o aumento do estresse oxidativo, crescimento celular e inflamação vascular, acelerando o desenvolvimento da rigidez e fibrose vascular,

fatores esses cruciais para o estabelecimento das doenças cardiovasculares (DCVs) que são relatadas em sobreviventes à sepse (Aroor et al., 2013a).

### **1.3 Pós-sepse e suas consequências**

Todo o processo inflamatório exacerbado e desenfreado que ocorre durante a sepse, com produção em massa de NO e citocinas pró-inflamatórias, culmina em disfunção cardiocirculatória e orgânica levando o paciente à morte (J. Vincent et al., 2000). Contudo, apesar de todos esses fatores, uma grande parte desses pacientes sobrevivem a esse quadro inflamatório sistêmico. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 30 milhões de pessoas são acometidas pela sepse por ano em todo o mundo, sendo que dessas, 6 milhões vêm a óbito. Sendo assim, cerca de 80% dos pacientes, em um quadro de sepse, sobrevivem (WHO, 2016).

Apesar da alta taxa de sobrevivência à sepse, relatos na literatura demonstram que pacientes que sobrevivem, retornam aos hospitais com maior frequência apresentando algum evento cardiovascular, como, por exemplo, infarto do miocárdio e/ou acidente vascular encefálico (AVE) (Mankowski et al., 2019; Yende et al., 2014). Além disso, evidências têm demonstrado um aumento no número de óbitos, dentre os sobreviventes à sepse, após o primeiro ano de alta hospitalar, relacionados ao desenvolvimento de eventos cardiovasculares (Contrin et al., 2013; Jafarzadeh et al., 2016; Ou et al., 2016).

As DCVs são, atualmente, consideradas as causas de morte número 1 no mundo. De acordo com a OMS, aproximadamente 17,9 milhões de pessoas morrem de DCVs por ano no mundo, o que corresponde a 31% das mortes globais, sendo que 85% de todas essas mortes são devido ao infarto do miocárdio e AVE (WHO, 2018). Estão caracterizadas como DCVs o grupo de fisiopatologias

que envolvem o coração e vasos sanguíneos, como, por exemplo: doenças coronarianas, doenças cerebrovasculares, doença cardíaca reumática, doença arterial periférica, cardiopatia congênita, trombose venosa profunda, embolia pulmonar, entre outras (WHO, 2018).

Já é bem conhecido que existem diversos fatores de risco para o desenvolvimento das DCVs, como, por exemplo, o uso do tabaco, inatividade física, obesidade, sobrepeso e uso abusivo do álcool (WHO, 2018). Além desses fatores, as infecções também são consideradas fatores que predisõem o desenvolvimento de DCVs (Smeeth et al., 2004).

Um estudo feito por Jafarzadeh et al., (2016) demonstrou que a proporção de pacientes que apresentaram um evento cardiovascular após passar por um quadro de bacteremia foi de 10,5% em comparação com 7,2% de pacientes que não passaram pela sepse anteriormente. Além disso, trabalhos também vêm demonstrando o aumento da mortalidade de pacientes por eventos cardiovasculares no período de 1 a 5 anos após uma infecção prévia (Jafarzadeh et al., 2016; Ou et al., 2016). Portanto, sabendo que as DCVs são as principais causas de morte em todo o mundo; que uma das causas para o desenvolvimento de DCVs são os quadros de infecção como a sepse; que sobreviventes à um quadro de sepse apresentam um aumento na reincidência hospitalar e do risco de mortalidade ocasionado principalmente por eventos cardiovasculares desenvolvidos no período de 1 a 5 anos após a infecção prévia; e que a sepse pode ser considerada uma das prioridades de saúde mundial, a hipótese do presente trabalho é que animais que sobrevivem à sepse apresentam alterações cardíacas e/ou vasculares em decorrência da infecção, tornando-os mais susceptíveis ao desenvolvimento de DCVs.

# *Objetivos*

## 2. Objetivo

Avaliar as alterações cardiovasculares em animais que sobreviveram a um quadro de sepse, 15 dias após a indução, simulando o período crônico no humano.

### 2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a função cardíaca; utilizando as técnicas de eletrocardiograma, ecocardiograma, Langendorff e contração de cardiomiócitos;
- Avaliar função vascular, *ex-vivo*, bem como as possíveis vias moleculares envolvidas, por experimentos de reatividade vascular;
- Avaliar se o tratamento dos animais com propranolol ou captopril são capazes de reverter as alterações cardíacas e vasculares encontradas;

## *Material e Métodos*

### 3. Material e Métodos

#### **3.1 Animais experimentais**

Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C machos, no período de 08 a 12 semanas de idade, obtidos do Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração, no ciclo claro-escuro, em uma estante ventilada para animais. Todos os procedimentos adotados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG sob protocolo de número 383/2016.

#### **3.2 Indução da Sepse pelo método CLP (do inglês *Cecal Ligation and Puncture*)**

Para a indução da sepse, foi utilizado o modelo CLP de sepse murina, método padrão ouro descrito por Wichterman e colaboradores em 1980 (Wichterman et al., 1980). Para o procedimento cirúrgico, os camundongos foram anestesiados com xilazina (5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) e após anestesia geral do animal, foi realizada a laparotomia mediana, o ceco foi exposto e submetido à ligadura frouxa (permitindo o fluxo sanguíneo e trânsito intestinal), distal à junção ileocecal, com fio de nylon 5-0. Em seguida, o ceco foi submetido a uma única perfuração transversal com agulha 26G e leve compressão que permitiu o extravasamento de conteúdo fecal. O ceco foi reintroduzido na cavidade peritoneal e em seguida foi realizada a laparorráfia com fio de nylon 4-0. Nos animais do grupo controle (falso operado), denominado grupo sham, foi feito a laparotomia, exposição e manipulação do ceco, seguida de laparorráfia. Após o término da cirurgia, os animais foram reidratados com uma única injeção



subcutânea de salina (1mL). Todos os experimentos, descritos a seguir, foram realizados 15 dias após a indução da sepse, em que esse período foi escolhido para análise dos efeitos crônicos da sepse, uma vez que já foi demonstrado previamente por Nascimento, D.C *et.al* que após 15 dias da indução da sepse por CLP os camundongos já não apresentavam bacteremia porém desenvolviam uma disfunção imunológica (Nascimento et al., 2017). Os animais não foram tratados com antibióticos ou analgésicos.

### **3.3 Avaliação da morbimortalidade**

Para verificar a porcentagem de sobrevivência dos animais que passaram pela indução da sepse ou não, estes foram observados durante um período de 15 dias de 12 em 12 horas.

Já para a avaliação da gravidade da sintomatologia à sepse, os animais foram submetidos à um escore clínico, conforme descrito por Shrum et al. (2014), em que os animais foram avaliados dentro de suas gaiolas, às cegas, por dois observadores nos períodos de 0 (antes da indução ou não da sepse), 24 e 48 horas, 7 e 15 dias após o procedimento cirúrgico para a indução ou não da sepse, respectivamente. A avaliação consistiu na classificação em níveis de gravidade de 0 a 4, onde 0 compreende a menor gravidade e 4 a maior gravidade, utilizando como parâmetro as seguintes variáveis: aparência (grau de piloereção); nível de consciência; atividade espontânea; resposta ao toque e a um estímulo auditivo; olhos (abertos ou fechados; com ou sem secreção); e qualidade e frequência respiratória (respiração difícil e ofegante) (Shrum et al., 2014).

Ao final da avaliação, os valores de classificação (0 a 4) admitidos para cada uma das variáveis foram somados e, posteriormente, foi realizada uma média das

somas totais das avaliações dos observadores e o valor médio obtido foi considerado para cada animal.

### **3.4 Análise dos parâmetros hemodinâmicos e cardíacos**

#### **3.4.1 Pressão Arterial**

A pressão arterial sistólica (PAS) dos animais controle e sépticos foram registrados de maneira indireta nos tempos 0 (antes da indução ou não da sepse), 24, 48 e 72 horas, e 15 dias após o procedimento cirúrgico de indução ou não da sepse, por meio da pletismografia de cauda, onde a cauda do animal foi inserida em um *cuff*, em que este foi inflado no intuito de captar a pressão sanguínea na artéria caudal do animal, caracterizando assim, uma medida indireta de pressão. Para tal, foi utilizado o pletismógrafo da Panlab Harvard Apparatus.

#### **3.4.2 Ecocardiografia**

Para avaliação da função cardíaca dos animais, foram realizados exames ecocardiográficos de alta resolução através do equipamento VEVO 2100 transducer (Visual sonics, Toronto, Canada), após 15 dias da indução da sepse. Sendo assim, os animais foram anestesiados com tribromoetanol, colocados em posição supina sobre plataforma apropriada e submetidos à tricotomia do tórax e abdômen. A plataforma foi equipada com eletrodos eletrocardiográficos para monitorização da FC e um sistema de aquecimento para a manutenção da temperatura corporal dos animais (do Carmo e Silva et al., 2016).

#### **3.4.3 Eletrocardiografia**

O eletrocardiograma (ECG) foi realizado através do posicionamento subcutâneo de eletrodos de agulha em cada membro, para os registros eletrocardiográficos na derivação DII. Primeiramente, os animais foram anestesiados com isoflurano 1,5% vaporizado através de um compressor de ar hidratado, mantidos em decúbito dorsal, e em seguida o ECG e a FC foram

monitorados durante um período contínuo de 30 min por um amplificador de ECG, digitalizados e armazenados em computador (DATAQ DI400, DI 205, Windaq PRO). A FC, intervalo PR (PRi), intervalo QT (QTi) e duração do complexo QRS foram medidos em 10 batimentos consecutivos. Uma vez que QTi varia inversamente com a frequência cardíaca, foi corrigido para o coração utilizando a fórmula de Bazett ( $QTc = QT / \sqrt{RR}$ ) (Roguin, 2011; Santos-Miranda et al., 2014).

#### 3.4.4 Isolamento e contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares

Conforme descrito por Shioya T (2007), os animais foram primeiramente heparinizados (50U, i.p.) e, após 10 minutos, foram eutanasiados, sendo o coração rapidamente dissecado e canulado em um sistema Langendorff de pressão constante através do tronco aórtico. Uma solução de nutrição de CIB (do inglês, *cell isolation buffer*, contendo, em mM: 130 NaCl; 5,4 KCl, 0,5 MgCl<sub>2</sub>; 0,33 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 22 glicose; 25 HEPES) isenta de cálcio pela adição de EGTA (0,4 mM) foi perfundida através do sistema coronário de maneira retrógrada de 2 a 5 minutos, no intuito de remover o sangue presente nas coronárias e nas câmaras cardíacas. Em seguida, o coração foi perfundido por 5 minutos com a solução CIB (sem EGTA) acrescida dos seguintes componentes: 0,3 mM de CaCl<sub>2</sub>; 0,8 mg/mL de 36 colagenase do tipo II (Worthington; lote: F8H18381); 0,06 mg/mL de proteinase tipo XXIII (Sigma Aldrich; lote: SLCF1513) e 0,06 mg/mL de tripsina (Sigma Aldrich; lote: SLCB7350) (Shioya, 2007).

Após essa etapa inicial denominada digestão enzimática, os corações foram seccionados, retirando apenas o ventrículo esquerdo, que foi imediatamente transferido para uma segunda solução de CIB (sem EGTA), com a mesma quantidade das enzimas supracitadas, porém contendo 0,7 mM de CaCl<sub>2</sub>, durante 7 minutos e mantida aquecida à 37°C.

O ventrículo esquerdo, presente na solução, foi mecanicamente agitado utilizando uma pipeta de transferência, sendo o sobrenadante filtrado através de uma malha 200  $\mu\text{m}$  e centrifugado a 1000 rpm por 20 segundos. O sobrenadante dessa solução, por sua vez, foi descartado e o pellet de células ressuspenso em solução CIB contendo 1,3 mM de  $\text{CaCl}_2$  e 2 mg/mL de albumina sérica bovina. Após 10 min em repouso, a solução foi novamente centrifugada e o pellet foi ressuspenso em solução de Tyrode (contendo, em mM: 140 NaCl; 5,4 KCl; 0,5  $\text{MgCl}_2$ ; 0,33  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ; 11 glicose; 5 HEPES e 1,8  $\text{CaCl}_2$ ), onde as células foram mantidas por até 5h a temperatura ambiente para realização dos experimentos (Shioya, 2007).

Conforme descrito por Joviano-Santos et al. (2016), os cardiomiócitos ventriculares isolados foram colocados em uma lamínula acoplada a uma câmara contendo um par de eletrodos paralelos. Esses eletrodos estimulavam eletricamente com 60V em pulsos bifásicos em 1Hz por 4ms, no intuito de promover a contração celular. Ao longo do experimento, as células foram mantidas em solução de Tyrode à temperatura ambiente ( $25^\circ\text{C}/30^\circ\text{C}$ ), sendo monitoradas através de uma câmera CCD MCS100 (IonOptix, Milton, MA, EUA), e as imagens adquiridas foram usadas para medir o encurtamento do cardiomiócito (índice de contratilidade) em resposta ao estímulo elétrico utilizando um sistema de vídeo detector de bordas (Ionoptix, Milton, MA, USA) previamente calibrado para a objetiva utilizada.

O encurtamento das células foi calculado com base na saída obtida do sistema IonWizard A/D do conversor analógico-digital de detecção de bordas. Foram utilizadas para realizar a média de contração de uma determinada célula, cerca de 5 a 10 contrações consecutivas (Joviano-Santos et al., 2016).

### 3.4.5 Função cardíaca Ex-Vivo – Langendorff

Para avaliar a função cardíaca, *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff (Skrzypiec-Spring et al., 2007). Para executar essa técnica, os animais foram eutanasiados por decapitação, 10 minutos após aplicação de heparina (1000 UI/kg; i.p.). Foi realizada a abertura da cavidade torácica, o coração foi retirado e conectado imediatamente a um sistema de perfusão retrógrada, via aorta por meio de uma agulha de aço inoxidável capaz de levar a solução nutritora de Krebs com a seguinte composição (em mmol/l): 135,0 NaCl; 5,0 KCl; 1,17 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,4 MgSO<sub>4</sub>; 20,0 NaHCO<sub>3</sub>; 11,0 glicose, às artérias coronarianas.

Os corações foram perfundidos com fluxo constante e aerados com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, White Martins, Brasil), a uma temperatura de 36,5°C. Para analisar os parâmetros de contratilidade, o átrio esquerdo foi retirado e um balão de látex, conectado a um transdutor de pressão, foi introduzido até a câmara do ventrículo esquerdo. Após introduzido, o balão foi inflado entre 90-100 mmHg a fim de captar a contratilidade do miocárdio. Cerca de 30 minutos de estabilização foi realizado e, então, os valores basais de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), a FC e as derivadas de pressão pelo tempo (dP/dt), máxima e mínima, foram registrados pelo transdutor de pressão acoplado ao balão inserido na câmara ventricular esquerda. Os registros foram realizados pelo software AQCAD 2.2.4. e interpretados pelo software ANCAD.

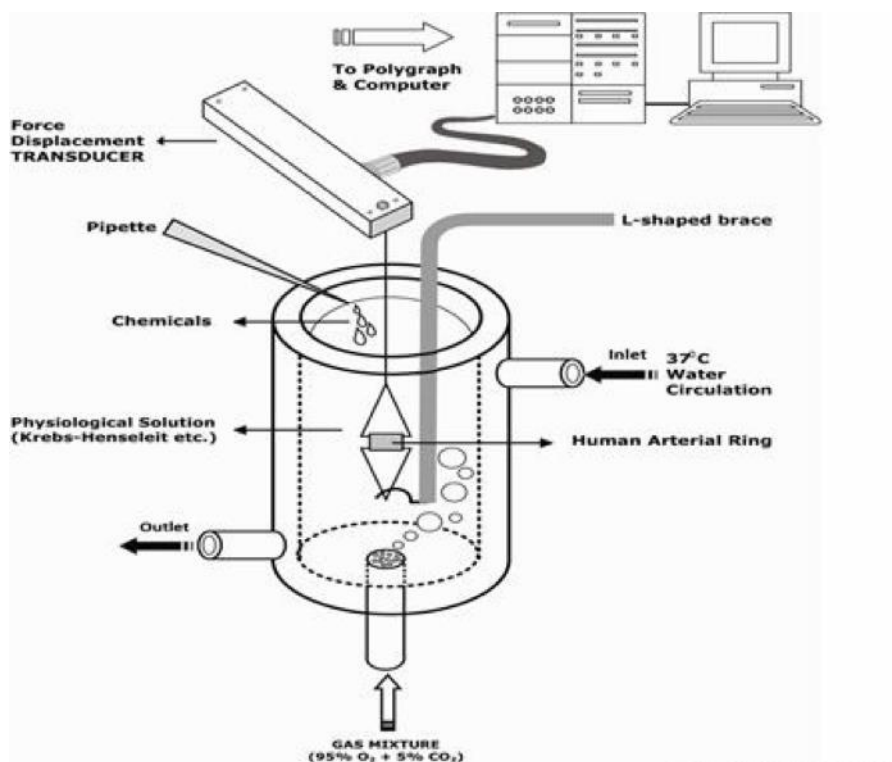
Após a realização do registro dos parâmetros basais supracitados, foi realizada uma curva dose-resposta para isoprenalina (10<sup>-10</sup> a 10<sup>-5</sup> M) a fim de

provocar desafio farmacológico nos corações, analisando assim, a função cardíaca submetida ao estresse.

### **3.5 Análise da função vascular**

Após 15 dias da indução da sepse, os animais foram eutanasiados por decapitação e a porção torácica da aorta foi isolada, sendo posteriormente limpa de todo o tecido adiposo perivascular e seccionada em quatro anéis de aproximadamente 3-4 mm de comprimento.

As aortas foram transferidas para uma placa de *Petri* contendo solução fisiológica de *Krebs*, com a seguinte composição (em mmol/l): 135,0 NaCl; 5,0 KCl; 1,17 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 2,5 CaCl<sub>2</sub>; 1,4 MgSO<sub>4</sub>; 20,0 NaHCO<sub>3</sub>; 11,0 glicose. Após a secção da aorta, inseriram-se dois ganchos metálicos triangulares no lúmen dos anéis para produzir tensão, conforme demonstrado na **Figura 3**. Um dos ganchos foi conectado a um suporte fixo e o outro a um ajustável que estava conectado a um transdutor para registro de força (tensão). A tensão foi registrada através de transdutor isométrico acoplado a um polígrafo. O sistema foi montado em banho para órgão isolado contendo 10ml de solução fisiológica de *Krebs*, sob pH 7,4 e temperatura de 37°C, aerados constantemente com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>, White Martins, Brasil). As preparações permaneceram em repouso por 60 minutos sob tensão basal constante de 3,9 milinewtons (mn), que equivale a 0,4 gramas (g), e durante este período foram lavadas com a solução fisiológica em intervalos de 15 minutos a fim de evitar o acúmulo de metabólitos e restaurar os níveis de glicose requeridos para o metabolismo vascular.



**Figura 3:** Representação esquemática dos banhos para órgão isolado utilizados em estudos de reatividade vascular (Yildiz et al., 2015).

### 3.5.1 Avaliação da viabilidade da preparação, integridade endotelial e possíveis vias envolvidas

Após o período de estabilização, os anéis foram estimulados com cloreto de potássio (KCl –  $9 \times 10^{-2}$  mol/l) com o objetivo de determinar se as preparações estavam viáveis. A presença de endotélio funcional, por sua vez, foi verificada pela adição de acetilcolina (ACh -  $EC_{50}$ :  $10^{-6}$  mol/l) após pré-contração induzida com fenilefrina (Phe –  $EC_{50}$   $10^{-7}$  mol/l). A integridade da camada endotelial foi considerada em preparações que apresentaram, no mínimo, 80% de relaxamento para ACh.

Posteriormente ao teste de viabilidade, foi avaliado o perfil de resposta vascular para todos os grupos, tanto perfil vasoconstritor (Phe –  $10^{-10}$  até  $10^{-4}$  mol/l/ KCl 0,01 à 0,12 mol/l), quanto vasodilatador (ACh –  $10^{-10}$  até  $10^{-4}$  mol/l) através de curvas concentração-resposta. Após a definição desse perfil, possíveis vias envolvidas na resposta foram avaliadas.

### 3.5.2 Investigação do efeito da sepse na reatividade vascular em sobreviventes a esse quadro.

- Avaliação do envolvimento de derivados da enzima conversora de angiotensina (ECA) na resposta vascular em camundongos sobreviventes à sepse.

Anéis de aortas de camundongos foram incubados por 30 minutos com captopril ( $10^{-5}$  mol/L), inibidor da ECA, e, em seguida, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L).

- Verificar a participação dos receptores AT<sub>1</sub> na hiperreatividade vascular em animais sobreviventes à sepse

Aortas de camundongos foram incubados ou não por 30 minutos com losartana ( $10^{-5}$  mol/L), antagonista seletivo do receptor AT<sub>1</sub>, e, em seguida, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L).



- Verificar o envolvimento de ânions superóxido ( $O_2^-$ ) na hiperreatividade induzida pela sepse

Anéis de aortas de camundongos incubados ou não por 30 minutos com tiron ( $10^{-3}$  mol/L), sequestrador seletivo de  $O_2^-$ , foram submetidos à curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L).

- Investigar o envolvimento da NADPH oxidase na hiperreatividade induzida em animais sobreviventes à sepse

Curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L) foram realizadas em anéis de aortas de camundongos, incubados ou não por 30 minutos com apocinina ( $10^{-4}$  mol/L), inibidor seletivo da enzima NADPH oxidase.

- Verificar o envolvimento da enzima xantina oxidase na hiperreatividade induzida em animais sobreviventes à sepse

Anéis de aortas de camundongos foram incubados ou não por 30 minutos com alopurinol ( $10^{-4}$  mol/L), inibidor seletivo da enzima xantina oxidase, e em seguida, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L).

- Avaliar o envolvimento de derivados da enzima Ciclooxygenase (COX) na hiperreatividade vascular induzida em animais sobreviventes à sepse

Para isso, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L), em aortas incubadas ou não por 30 minutos com ibuprofeno ( $10^{-5}$  mol/L), que é inibidor não-seletivo da COX.

- Avaliar qual isoforma da enzima COX estaria envolvida na hiperreatividade induzida em animais sobreviventes à sepse

Anéis de aortas de camundongos foram incubados ou não por 30 minutos com mofezolac ( $10^{-6}$  mol/L), inibidor seletivo da COX-1, ou nimesulida ( $10^{-6}$  mol/L) inibidor seletivo da COX-2 e, em seguida, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L).

- Verificar o envolvimento de receptores para tromboxano, para prostaglandina E<sub>2</sub> e F<sub>2α</sub> na hiperreatividade vascular induzida pela sepse

Curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L) foram realizadas em anéis de aorta incubados ou não por 30 minutos com seratrodaste ( $10^{-6}$  mol/L), antagonista do receptor para tromboxano, ou AH6809 ( $10^{-5}$  mol/L), antagonista do receptor para prostaglandina E<sub>2</sub> e prostaglandina F<sub>2α</sub>.

- Avaliar se o tratamento, in vivo, com captopril reverte a hiperreatividade vascular encontrada nos animais sobreviventes à sepse

Os animais foram tratados por 3 dias com uma dose diária de captopril (10 mg/kg), por gavagem, em que a primeira dose foi administrada imediatamente após a cirurgia de indução da sepse, e as demais doses foram administradas 24 e 48 horas depois. As doses foram administradas em ambos os grupos, sham e séptico.

Curvas cumulativas concentração- resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L), foram realizadas nas aortas dos animais tratados após 15 dias de indução da sepse.

- Verificar se o tratamento, in vivo, com propranolol é capaz de reverter as respostas cardiovasculares verificadas nos animais sobreviventes à sepse

Os animais foram tratados por 3 dias com uma dose diária de propranolol (10 mg/kg), via intraperitoneal, em que a primeira dose foi administrada 30 minutos após a cirurgia de indução da sepse, e as demais doses foram administradas 24 e 48 horas depois. As doses foram administradas em ambos os grupos, sham e séptico.

Após 15 dias de indução da sepse, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para fenilefrina ( $10^{-10}$  mol/L -  $10^{-4}$  mol/L), bem como a análise da função cardíaca através do eletrocardiograma e a contração de cardiomiócitos.

### **3.6 Análise Estatística**

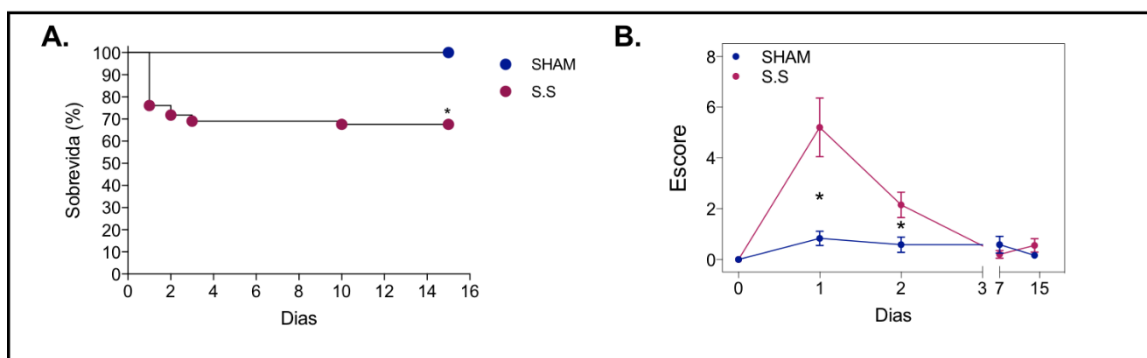
As análises dos resultados foram realizadas no programa Graphpad Prism 7 (Graphpad Software Corporation, versão 7). As determinações da EC50 (concentração que produz 50% da resposta máxima) e do efeito máximo (Emax) foram realizadas utilizando o método de regressão não linear dos mínimos quadrados (Meddings et al., 1989). Para a análise da potência, foi utilizado o valor de  $pD_2$  ( $-\log EC_{50}$ ). Tanto os valores de  $pD_2$  quanto de Emax foram expressos como média  $\pm$  erro padrão médio (EPM). A diferença entre as médias dos resultados encontrados neste estudo foi obtida utilizando a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do pós-teste de Holm-Sidak. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## *Resultados*

## 4. Resultados

### 4.1 Análise da morbimortalidade dos animais submetidos ou não à indução de sepse

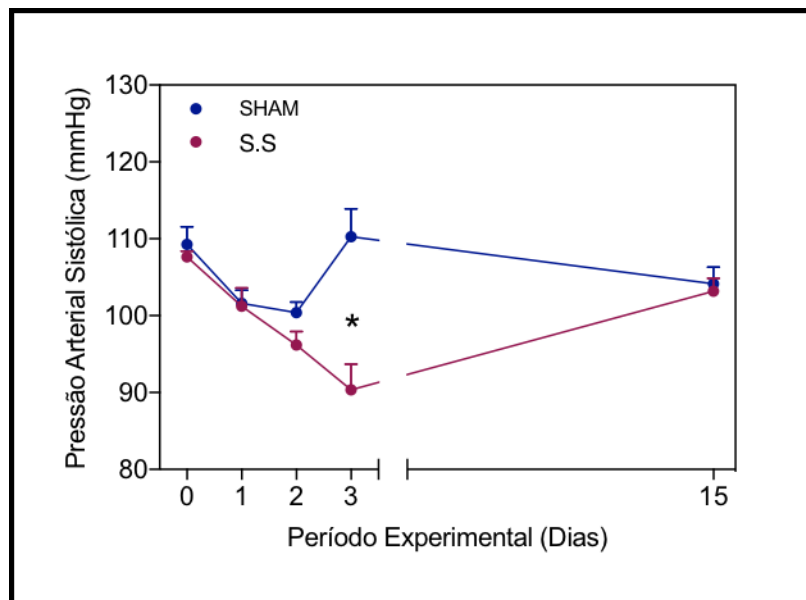
Podemos observar na **Figura 4A** que os animais que passaram pela indução da sepse, apresentaram uma taxa de sobrevivência de 66% enquanto os animais sham apresentaram sobrevivência de 100%. Dos 34% dos animais que morreram após a indução da sepse, 25% morreram nas primeiras 24 horas. Além disso, podemos observar na **Figura 4B**, através da análise do escore clínico dos animais, que aqueles que foram submetidos à sepse apresentam um escore clínico elevado nas primeiras 48 horas, quando comparado aos animais do grupo controle, escore esse que se iguala entre os grupos, após 7 dias de indução ou não da sepse.



**Figura 4: Gráficos de morbimortalidade dos animais que passaram ou não pela indução da sepse. A- Porcentagem de sobrevivência.** Análise da sobrevivência dos camundongos submetidos ou não à sepse. **B- Escore clínico.** Análise do nível de gravidade da sepse induzida em camundongos. (n= 45-71) \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado observado no grupo sham.

## **4.2 Alteração da pressão arterial sistólica dos animais submetidos à indução ou não de sepse**

A pressão sistólica de ambos grupos, sham e sobreviventes à sepse, reduziu significativamente nas primeiras 24 horas após a cirurgia de indução ou não da sepse, sendo que a pressão dos animais do grupo sham começou a restaurar no segundo dia, enquanto a pressão dos animais sobreviventes à sepse (S.S) continuou a reduzir, sendo significativamente diferente no terceiro dia pós indução da sepse, quando comparado ao grupo controle. No 15º dia pós-cirurgia, a pressão de ambos os grupos se mostraram equivalentes (**Figura 5**).

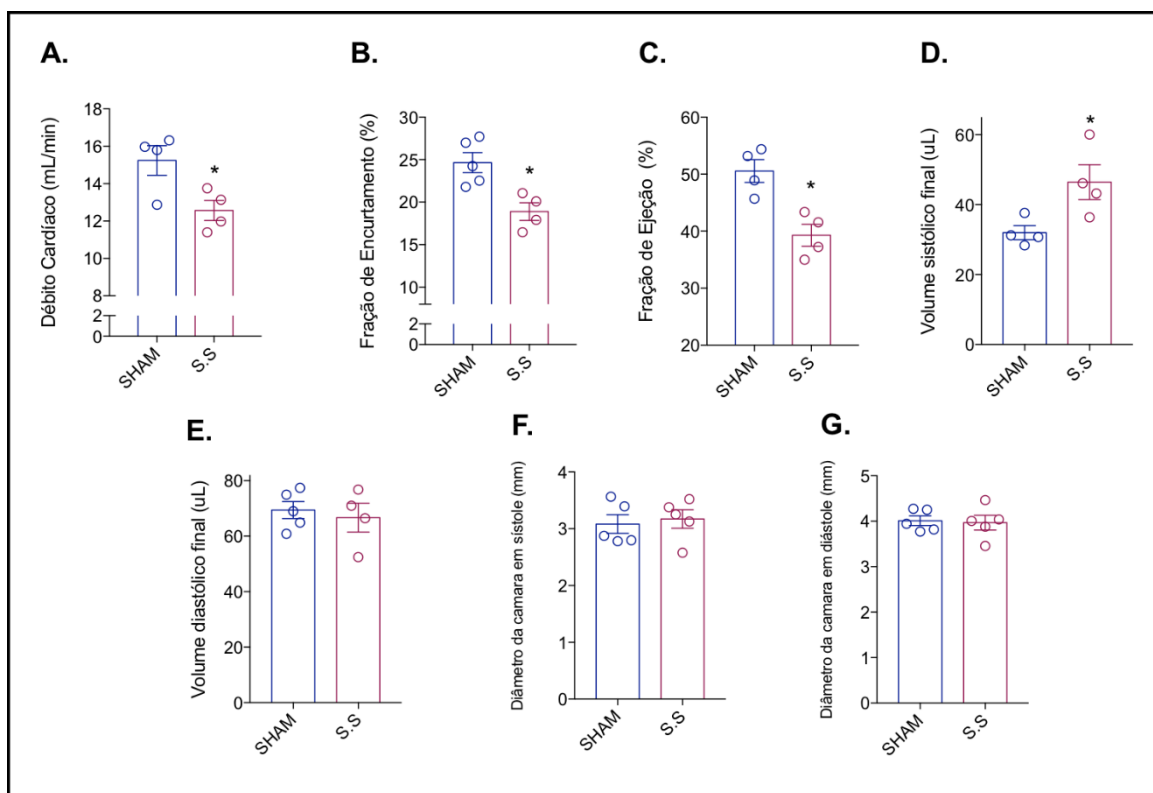


**Figura 5: Avaliação temporal da pressão arterial sistólica dos grupos sham e sobreviventes à sepse.** Pressão sistólica aferida durante a fase aguda (primeiras 72 horas) e no 15º dia após a indução ou não da sepse. Cada círculo/barras representam a média  $\pm$  EPM da pressão sistólica obtida para um n de sham e sobreviventes à sepse (n=5-9). \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo sham.

## **4.3 Animais sobreviventes à sepse apresentam prejuízo da função cardíaca**

As análises ecocardiográficas representadas graficamente na **Figura 6** demonstram que o animal sobrevivente à sepse apresenta uma redução do débito cardíaco (Figura 6A), bem como uma redução tanto na fração de encurtamento

(Figura 6B) quanto na fração de ejeção (Figura 6C) com aumento do volume sistólico final (Figura 6D) e sem alteração do volume diastólico final (Figura 6E). Em conjunto, esses resultados demonstram que há uma falha na ejeção de sangue do ventrículo esquerdo do coração dos sobreviventes à sepse, caracterizando assim, um prejuízo da função cardíaca. Além disso, esses achados mostram que não há alteração no tamanho das câmaras tanto na sístole, quanto na diástole (Figuras 6F e 6G).



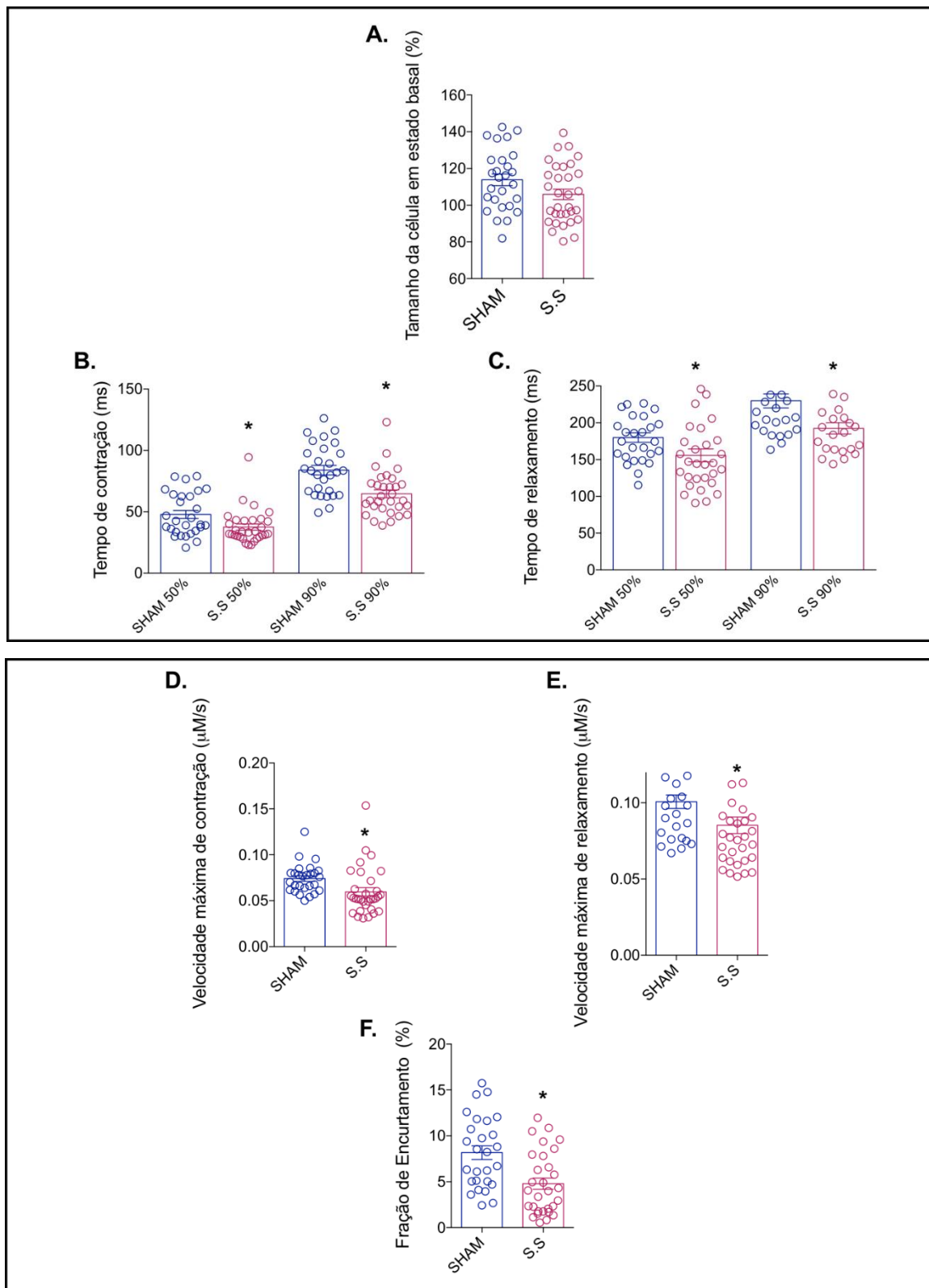
**Figura 6: Avaliação da função cardíaca de camundongos por ecocardiograma.** Análise ecocardiográfica da função cardíaca de animais sham e sobreviventes à sepse. **A.** Débito cardíaco; **B.** Fração de encurtamento; **C.** Fração de ejeção; **D.** Volume sistólico final; **E.** Volume diastólico final; **F.** Tamanho da câmara em diástole; **G.** Tamanho da câmara em sístole. (n=4-5) \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo sham.



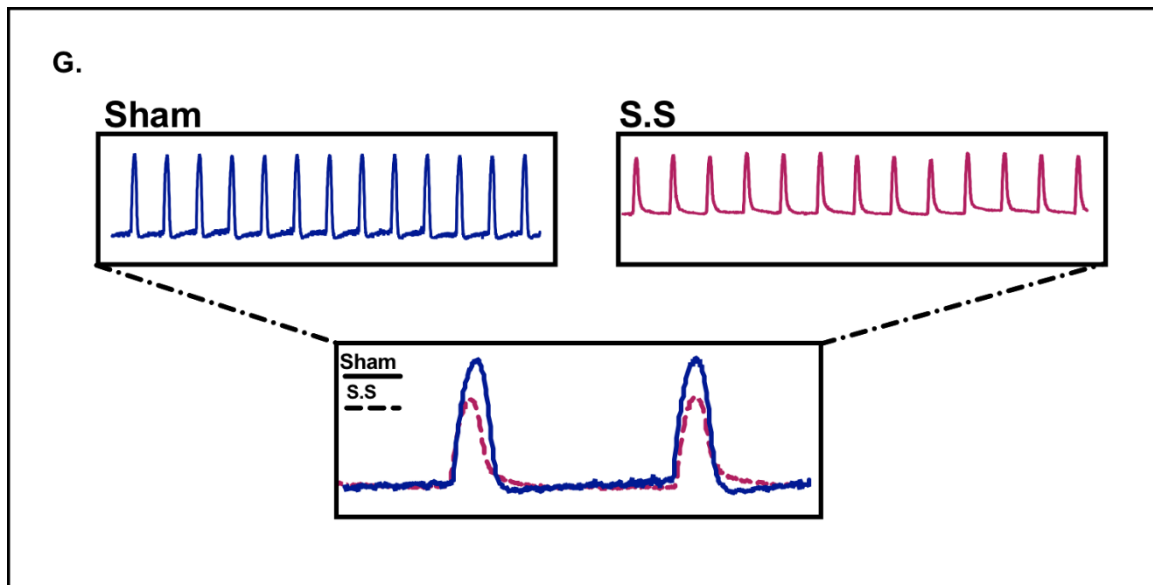
#### **4.4 Cardiomiócitos dos animais sobreviventes à sepse apresentam redução da contratilidade**

Uma vez identificado um prejuízo da função cardíaca registrada pelo ecocardiograma, será que essa insuficiência cardíaca estaria relacionada com a funcionalidade dos cardiomiócitos? (**Figura 7**). Verificamos que o tempo que a célula leva tanto para contrair quanto para relaxar, como mostrado nas Figuras 7B e 7C, respectivamente, é menor no grupo sobrevivente à sepse quando comparado ao grupo sham.

Além dessa redução do tempo de contração e relaxamento, foi também encontrado uma redução na fração de encurtamento dos cardiomiócitos dos animais sobreviventes à sepse em relação aos animais sham, o que indica que a contração da célula cardíaca visualizada no animal sobrevivente a sepse é menor do que a observada no grupo controle (Figura 7A). Esses resultados confirmam que a função cardíaca dos animais sobreviventes à sepse está prejudicada, e esse prejuízo está relacionado diretamente à funcionalidade do cardiomiócito.



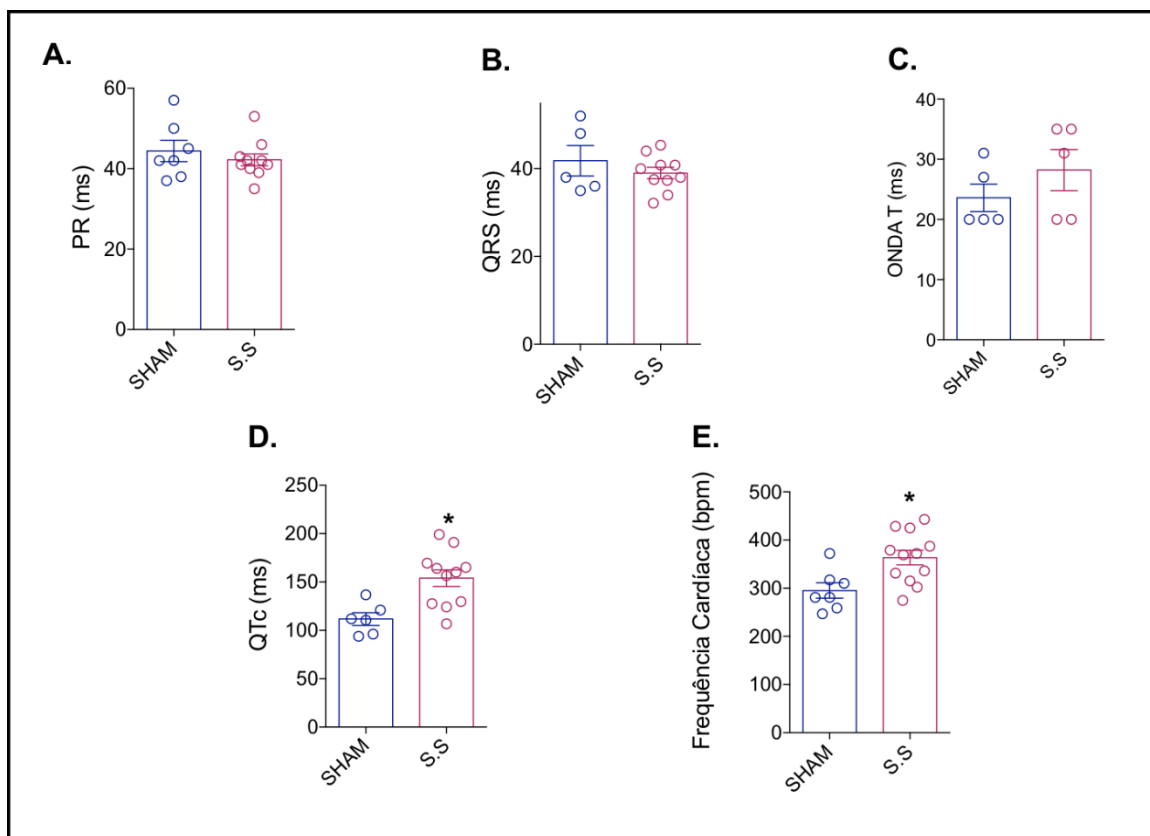
**Figura 7: Avaliação da função dos cardiomiócitos.** Análise da contração e relaxamento de cardiomiócitos. **A.** Tamanho da célula em estado basal; **B.** Tempo de contração do cardiomiócito; **C.** Tempo de relaxamento do cardiomiócito; **D.** Velocidade máxima de contração do cardiomiócito (50% e 90% de toda a contração do cardiomiócito); **E.** Velocidade máxima de relaxamento do cardiomiócito (50% e 90% de todo o relaxamento do cardiomiócito); **F.** Fração de encurtamento de cardiomiócito; (n=27-32) \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo sham.



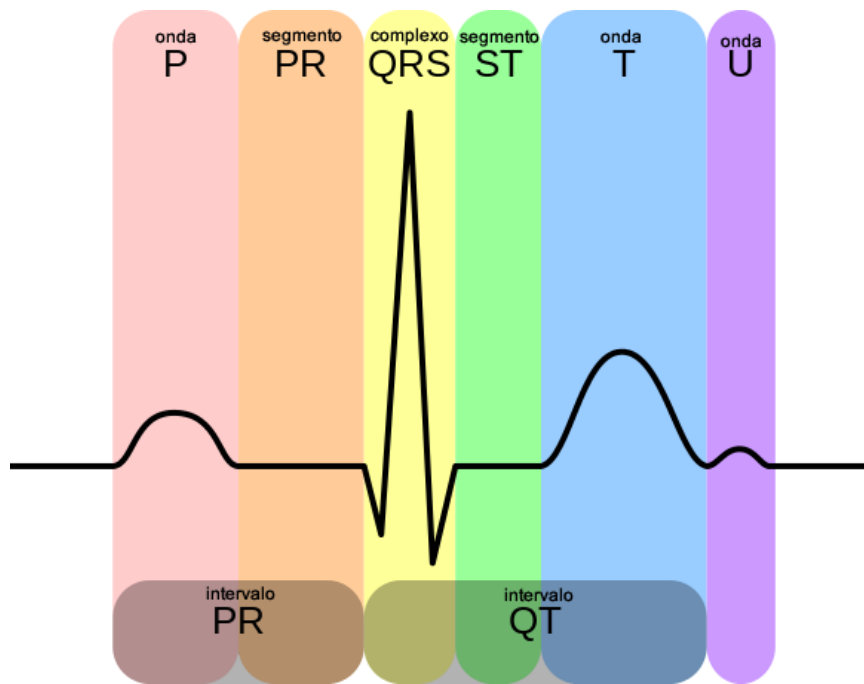
**Figura 7: Avaliação da função dos cardiomiócitos.** Análise da contração e relaxamento de cardiomiócitos. **G.** Traçado representativo da contração de cardiomiócito de ambos os grupos.

#### **4.5 Coração de animais sobreviventes à sepse prolongam o tempo para início de repolarização ventricular**

A análise do eletrocardiograma representada pela **Figura 8**, demonstrou que não houve alteração no período de contração atrial (Figura 8A), bem como não houve alteração no período de contração ventricular (Figura 8B) e no período de repolarização ventricular (Figura 8D) entre os grupos analisados. Apesar disso, houve um prolongamento do QT corrigido (Figura 8C) no coração dos animais sobreviventes à sepse, que pode se justificar por um aumento da região ST, representada na **Figura 9**, período que corresponde ao fim da sístole ventricular e início da repolarização. Além disso, o eletrocardiograma demonstrou um aumento da frequência cardíaca nos animais sobreviventes à sepse quando comparada ao grupo sham (Figura 8E).



**Figura 8: Eletrocardiograma realizado no grupo sham e sobreviventes à sepse.** Análise da condução elétrica do coração dos camundongos submetidos ou não à indução de sepse. **A.** Intervalo PR – Contração atrial; **B.** Complexo QRS – Contração ventricular; **C.** Curva T – Repolarização ventricular; **D.** Intervalo QT corrigido- corresponde ao período do início da contração ventricular até o final da repolarização ventricular; **E.** Frequência cardíaca; n=(5-12) \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo sham.



**Figura 9: Representação esquemática de um eletrocardiograma normal.** Fonte: [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EKG\\_Complex\\_pt.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:EKG_Complex_pt.png)

#### **4.6 Prejuízo da função cardíaca dos animais sobreviventes à sepse avaliada *ex vivo*.**

A **Figura 10** representa a avaliação da função cardíaca realizada a partir dos experimentos de Langendorff, onde é possível verificar, primeiramente, que a pressão de perfusão das coronárias no coração dos sobreviventes à sepse encontra-se reduzida quando comparada ao grupo controle (Figura 10A) bem como foi avaliada a frequência cardíaca desses animais, registrando que não há alteração desse parâmetro entre os grupos nesse experimento *ex vivo* (Figura 10B).

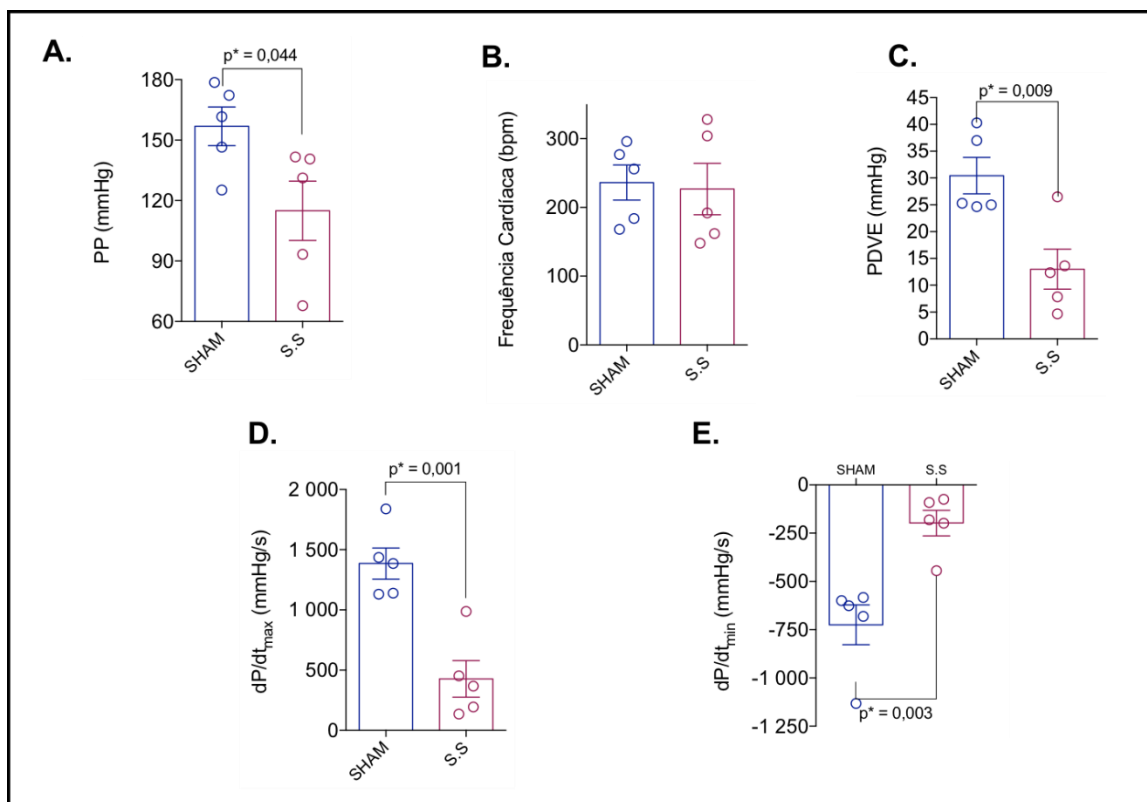
O próximo passo, foi avaliar a função do ventrículo esquerdo de ambos os grupos, sendo possível verificar, através das Figuras 10C, 10D e 10E, que a pressão máxima, mínima e a total desenvolvida pelo ventrículo esquerdo encontram-se reduzidas quando comparadas ao grupo sham, caracterizando um

prejuízo da função ventricular dos animais sobreviventes à sepse, corroborando com os resultados anteriores que demonstram o prejuízo da função cardíaca.

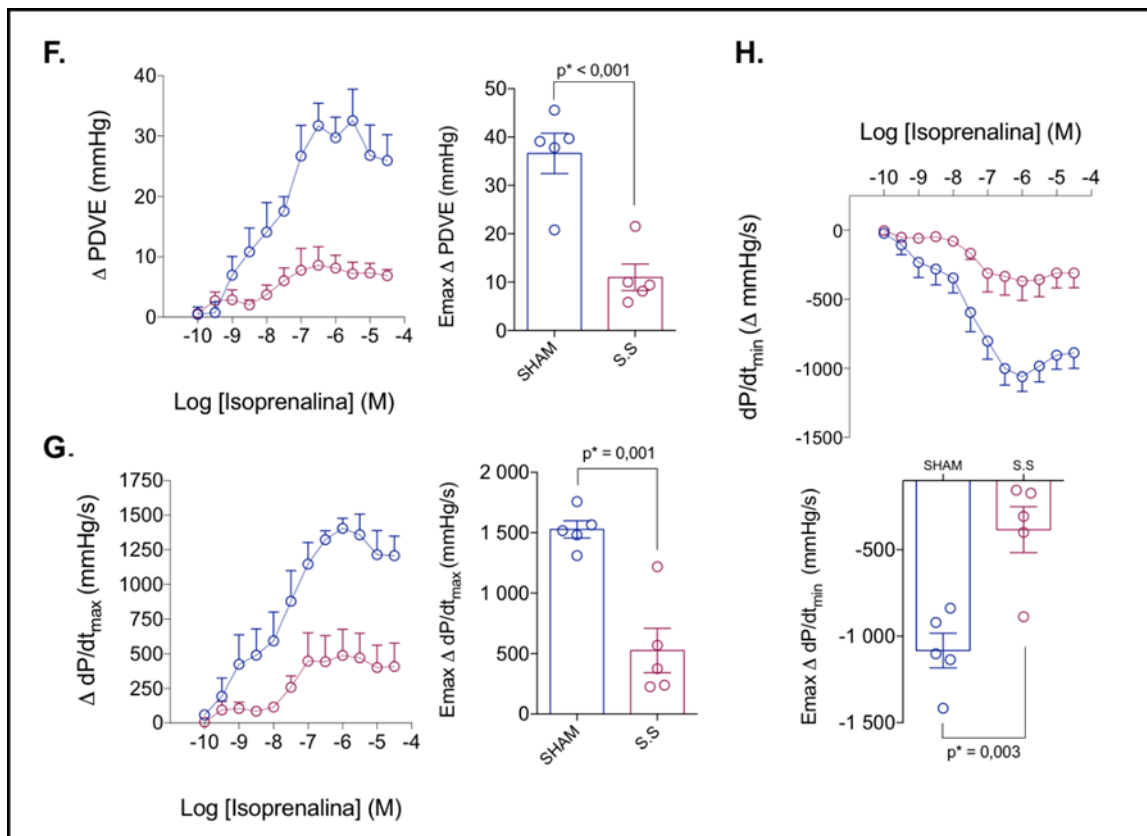
Quando foi avaliada a derivada da pressão (dP) pela derivada do tempo (dT), ou seja, a pressão exercida pelo ventrículo esquerdo em um determinado intervalo de tempo, tanto a dP/dT máxima quanto mínima representada pela Figura 10F, demonstram um prejuízo da função do ventrículo esquerdo dos animais sobreviventes à sepse, quando comparados aos animais do grupo controle.

Uma vez confirmado que em situação fisiológica basal, o coração do animal sobrevivente à sepse apresenta um prejuízo de sua função quando comparado ao coração dos animais do grupo controle, o próximo passo foi verificar como o coração de ambos os grupos responderiam quando fossem submetidos ao estresse.

Para tal, as Figuras 10G, 10H e 10I representam, respectivamente, a pressão total desenvolvida pelo ventrículo esquerdo e a dP/Dt máxima e mínima em uma situação de estresse farmacológico induzido pela isoprenalina. Podemos confirmar então, que quando os corações são submetidos ao estresse, a redução da função do ventrículo esquerdo que era observada no basal permanece no grupo sobrevivente à sepse, quando comparada ao grupo controle, deixando claro que o coração do animal sobrevivente à sepse não consegue responder de maneira eficiente quando o coração é submetido a uma situação em que é necessário um maior trabalho cardíaco.



**Figura 10: Prejuízo da função ventricular esquerda tanto no estado basal quanto submetido ao estresse dos animais sobreviventes à sepse.** Análise da função cardíaca avaliada *ex vivo* nos corações dos camundongos submetidos ou não a indução da sepse. **A.** Pressão de perfusão do coração. **B.** Frequência cardíaca. **C.** Pressão máxima desenvolvida pelo ventrículo esquerdo. **D.**  $dP/dT$  máxima desenvolvida pelo ventrículo esquerdo. **E.**  $dP/dT$  mínima desenvolvida pelo ventrículo esquerdo.



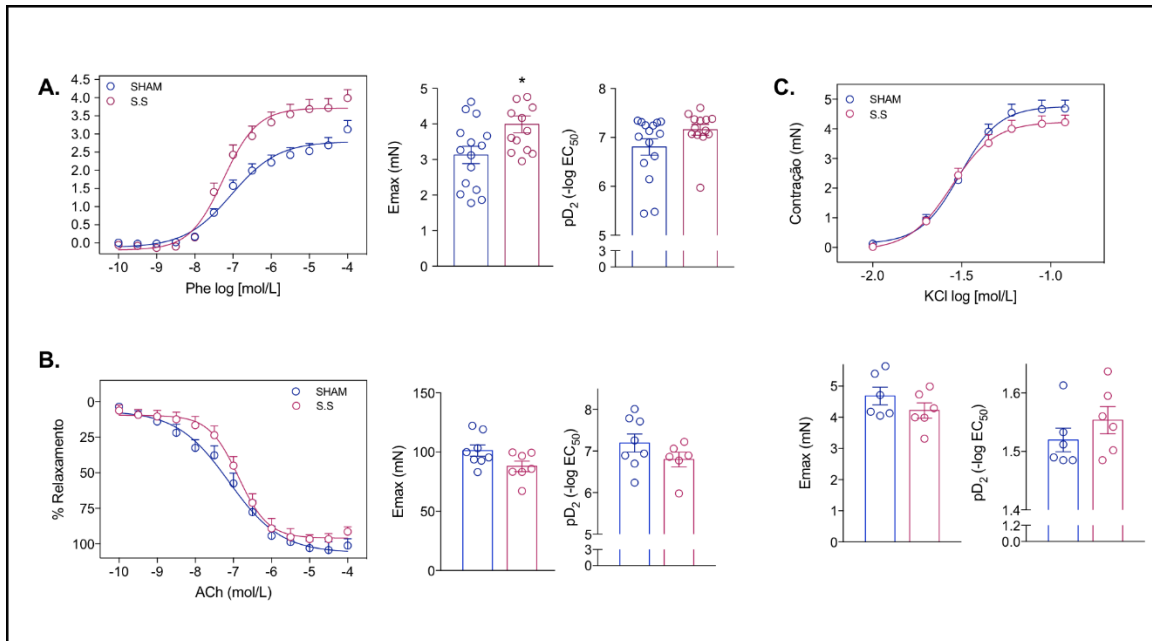
**Figura 10: Prejuízo da função ventricular esquerda tanto no estado basal quanto submetido ao estresse dos animais sobreviventes à sepse.** Análise da função cardíaca avaliada *ex vivo* nos corações dos camundongos submetidos ou não a indução da sepse. **F.** Pressão máxima desenvolvida pelo ventrículo esquerdo sob desafio com isoprenalina. **G.** dP/dT máxima desenvolvida pelo ventrículo esquerdo sob desafio com isoprenalina. **H.** dP/dT mínima desenvolvida pelo ventrículo esquerdo sob desafio com isoprenalina. (n=5) \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo sham.

#### **4.7 Animais sobreviventes à sepse apresentaram aumento da resistência vascular via ativação do SRAA e mediadores inflamatórios**

A resposta de contração induzida por fenilefrina (Phe), vasoconstritor dependente de receptor, em anéis de aorta, foi maior para os animais do grupo sobrevivente à sepse quando comparados aos do grupo sham, apresentando um aumento significativo dos valores de  $E_{max}$  sem alteração de  $pD_2$  (**Figura 11A e 11B** - Sham –  $E_{max}$ :  $3.1 \pm 0.24$  /  $pD_2$ :  $6.8 \pm 0.17$  n=15. S.S -  $E_{max}$ :  $4.0 \pm 0.23$  /  $pD_2$ :  $7.2 \pm 0.11$  n=13). Já para a resposta de contração induzida por KCl, vasoconstritor independente de receptor, não há alteração de  $E_{max}$  e  $pD_2$  (**Figura 11C e 11D** -



Sham – Emax:  $4.6 \pm 0.3$  /  $pD_2$ :  $1.5 \pm 0.02$  (n=6). S.S - Emax:  $4.2 \pm 0.2$  /  $pD_2$ :  $1.6 \pm 0.02$  (n=6). Logo, esse aumento da resposta vasoconstritora encontrada no sobrevivente à sepse é uma resposta receptor-dependente, uma vez que só houve alteração do perfil de contração para Phe e não para KCl.



**Figura 11: Efeito da sepse sob a resposta vascular em aortas de camundongos.** Análise da função vascular em camundongos submetidos ou não a indução de sepse. **A-B-C.** Curvas concentração-resposta para Phe, KCl e ACh, realizadas em aortas de camundongos e valores de Emax e pD<sub>2</sub> obtidos respectivamente, em aortas isoladas. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM obtida em preparações independentes. (n= 6-15). \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado observado no grupo sham.

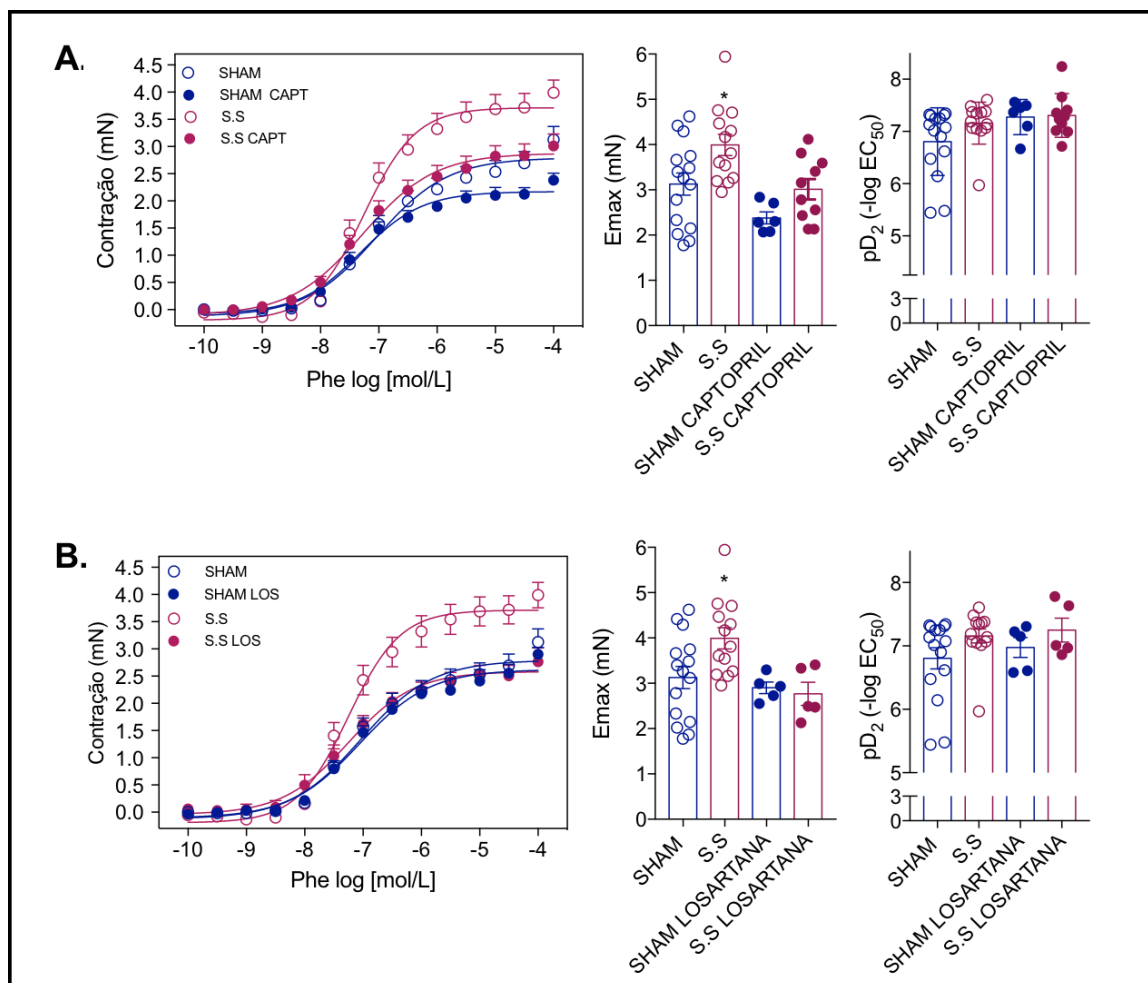
As curvas para ACh representadas na Figura 11B, confirmam que os animais sobreviventes à sepse não apresentam disfunção endotelial, uma vez que não houve diferença significativa de Emax e pD<sub>2</sub> entre os grupos (Sham – Emax:  $101.2 \pm 4.7$  / pD<sub>2</sub>:  $7.2 \pm 0.22$  n=6. S.S - Emax:  $91.4 \pm 3.3$  / pD<sub>2</sub>:  $6.8 \pm 0.18$  n=8).

Avaliando a participação do SRAA no aumento da contração vascular nas aortas dos animais sobreviventes à sepse, incubamos esses vasos com captopril,

**D.**

inibidor não seletivo da ECA. Os resultados demonstrados pelas **Figuras 12A e 12B**, confirmam que os derivados ECA estão envolvidos nesse aumento de resistência, pois na presença de captopril esse aumento é revertido a uma resposta de contração semelhante à do grupo sham (Sham Captopril – Emax:  $2.4 \pm 0.13$  /  $pD_2$ :  $7.2 \pm 0.13$  n=6. S.S Captopril- Emax:  $3.0 \pm 0.22$  /  $pD_2$ :  $7.3 \pm 0.13$  n=10).

Uma vez que derivados da ECA estão envolvidos no aumento da resistência vascular nos animais sobreviventes à sepse, o próximo passo foi avaliar a participação dos receptores  $AT_1$  nessa resposta. Para isso, foi utilizado um antagonista seletivo desses receptores (losartana). Na presença de losartana, assim como para captopril, o aumento da resposta de contração induzida por Phe foi abolido, confirmando a participação dos receptores  $AT_1$  nessa resistência vascular aumentada dos animais sobreviventes à sepse (Sham Losartana– Emax:  $2.9 \pm 0.13$  /  $pD_2$ :  $6.98 \pm 0.16$  n=5. S.S Losartana - Emax:  $2.8 \pm 0.25$  /  $pD_2$ :  $7.25 \pm 0.19$  n=5).



**Figura 12: Participação do SRAA no aumento da resistência vascular aórtica de animais sobreviventes à sepse.** Análise da via envolvida na hiperreatividade vascular encontrada em camundongos sobreviventes à sepse **A-B**- Curvas concentração-resposta para Phe na presença e ausência de captopril e losartana e valores de Emax e pD<sub>2</sub> obtidos para Phe, na presença e ausência de captopril e losartana, respectivamente, em aortas isoladas. Cada barra representa a média ± EPM obtida em preparações independentes. (n= 5-15) \*representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado observado no grupo sham, post-séptico captopril e losartana.

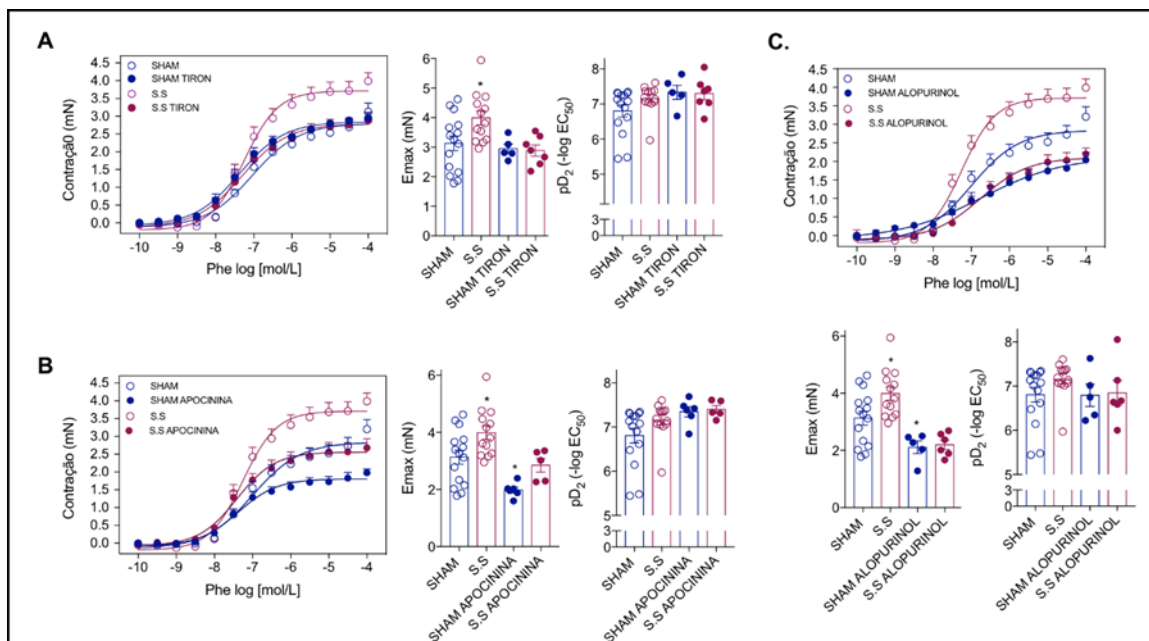
Confirmada a participação do SRAA e dos receptores AT<sub>1</sub> no aumento da resistência vascular dos animais sobreviventes à sepse, e sabendo também que a ativação de receptores AT<sub>1</sub> pode levar ao aumentando a produção de EROs, como por exemplo ânions superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) que são potentes vasoconstritores, o próximo passo foi verificar o envolvimento do O<sub>2</sub><sup>-</sup> na resposta verificada nos animais sobreviventes à sepse (Lassègue et al., 2001). Podemos confirmar através da **Figura 13A**, que O<sub>2</sub><sup>-</sup> está envolvido no aumento da resistência vascular

nos sobreviventes à sepse, pois na presença de tiron, sequestrador de  $O_2^-$ , a contração induzida para Phe é revertida, sendo semelhante à do grupo sham + tiron (Sham Tiron – Emax:  $2.6 \pm 0.24$  /  $pD_2$ :  $7.5 \pm 0.12$  n=5. S.S Tiron - Emax:  $2.88 \pm 0.19$  /  $pD_2$ :  $7.3 \pm 0.18$  n=7).

Visto que o  $O_2^-$  está envolvido na hiperreatividade vascular encontrada no sobrevivente à sepse, investigamos qual enzima poderia ser a responsável pela sua produção. Sabendo que a NADPH oxidase é uma das enzimas que levam a produção de  $O_2^-$ , e, além disso, a ativação de receptores  $AT_1$  pode levar consequentemente a ativação desta enzima, incubamos as aortas com apocinina, inibidor da NADPH oxidase. Nós verificamos, como demonstrado na **Figura 13B**, que a atividade dessa enzima não estava envolvida na hiperreatividade vascular encontrada no sobrevivente à sepse, uma vez que sua inibição não foi capaz de reverter essa hiperreatividade (Sham Apocinina – Emax:  $1.98 \pm 0.11$  /  $pD_2$ :  $7.34 \pm 0.12$  n=6. S.S Apocinina - Emax:  $2.85 \pm 0.24$  /  $pD_2$ :  $7.4 \pm 0.09$  n=5).

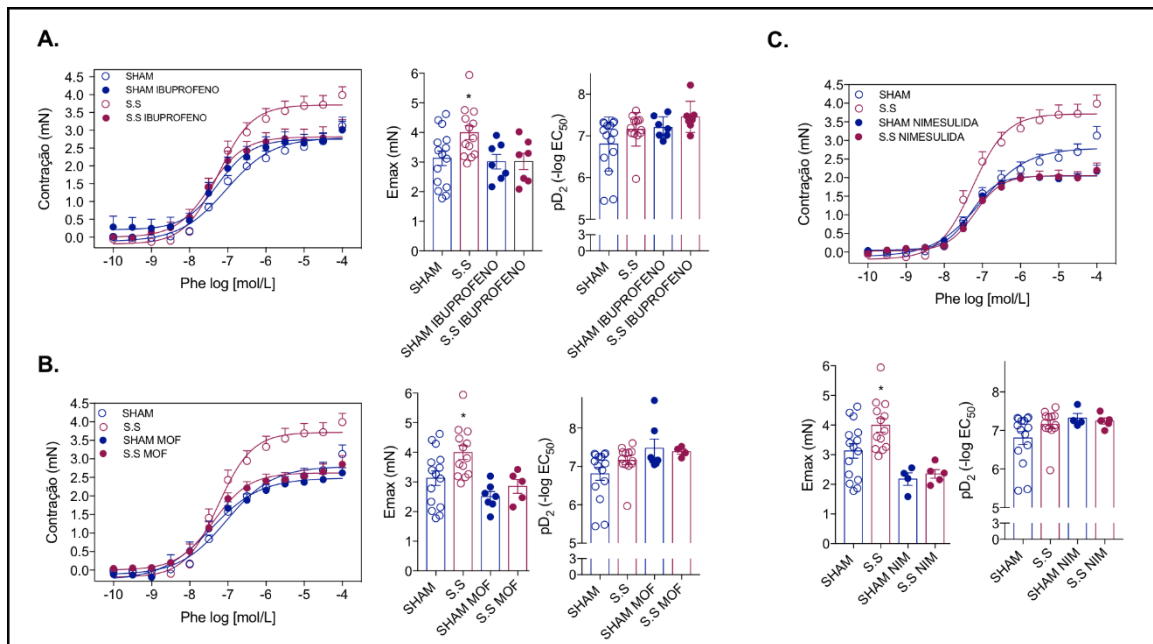
Como a NADPH oxidase não é a responsável pelo envolvimento do  $O_2^-$  na hiperreatividade encontrada no sobrevivente à sepse, avaliamos outra enzima que também leva a produção de  $O_2^-$ , a xantina oxidase. Para tal, incubamos as aortas com Alopurinol, inibidor dessa enzima. A partir dessa incubação, podemos confirmar o envolvimento desta enzima na hiperreatividade vascular dos animais sobreviventes à sepse, uma vez que, como pode ser visualizado na **Figura 13C**, na presença de Alopurinol, a hiperreatividade observada no grupo sobrevivente à

sepsé é revertida (Sham Alopurinol – Emax:  $2.1 \pm 0.2$  /  $pD_2$ :  $6.79 \pm 0.25$  n=5. S.S Alopurinol - Emax:  $2.2 \pm 0.2$  /  $pD_2$ :  $6.85 \pm 0.3$  n=6).



**Figura 13: Análise do envolvimento de  $O_2^-$  e enzimas responsáveis por sua produção no aumento da resistência vascular aórtica de animais sobreviventes à sepsé.** Análise da via envolvida na hiperreatividade vascular encontrada em camundongos sobreviventes à sepsé. **A-B-C** - Curva concentração-resposta para Phe na presença e ausência de tiron/apocinina/allopurinol realizadas em aortas de camundongos e valores de Emax e  $pD_2$  obtidos para Phe, respectivamente. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM obtida em preparações independentes. (n=5-15) \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado observado no grupo sham e sobrevivente à sepsé tiron/apocinina/allopurinol.

Sabendo que a ativação de receptores  $AT_1$  e o  $O_2^-$  estão envolvidos no aumento da resposta de contração dos animais sobreviventes à sepsé, e que ambos podem promover a ativação da enzima ciclooxigenase (COX), levando a produção de fatores vasoconstritores, investigamos a participação da COX nesse efeito (Virdis et al., 2007). Logo, na presença de ibuprofeno, inibidor não seletivo da COX, o aumento da contração visualizada nos animais sobreviventes à sepsé é revertida, se igualando a resposta do grupo sham também na presença de ibuprofeno, confirmando o envolvimento de derivados da COX nesse aumento da resistência vascular (**Figura 14A** - Sham Ibuprofeno– Emax:  $3.0 \pm 0.22$  /  $pD_2$ :  $7.2 \pm 0.11$  n=7. S.S Ibuprofeno - Emax:  $3.0 \pm 0.27$  /  $pD_2$ :  $7.5 \pm 0.14$  n=7).

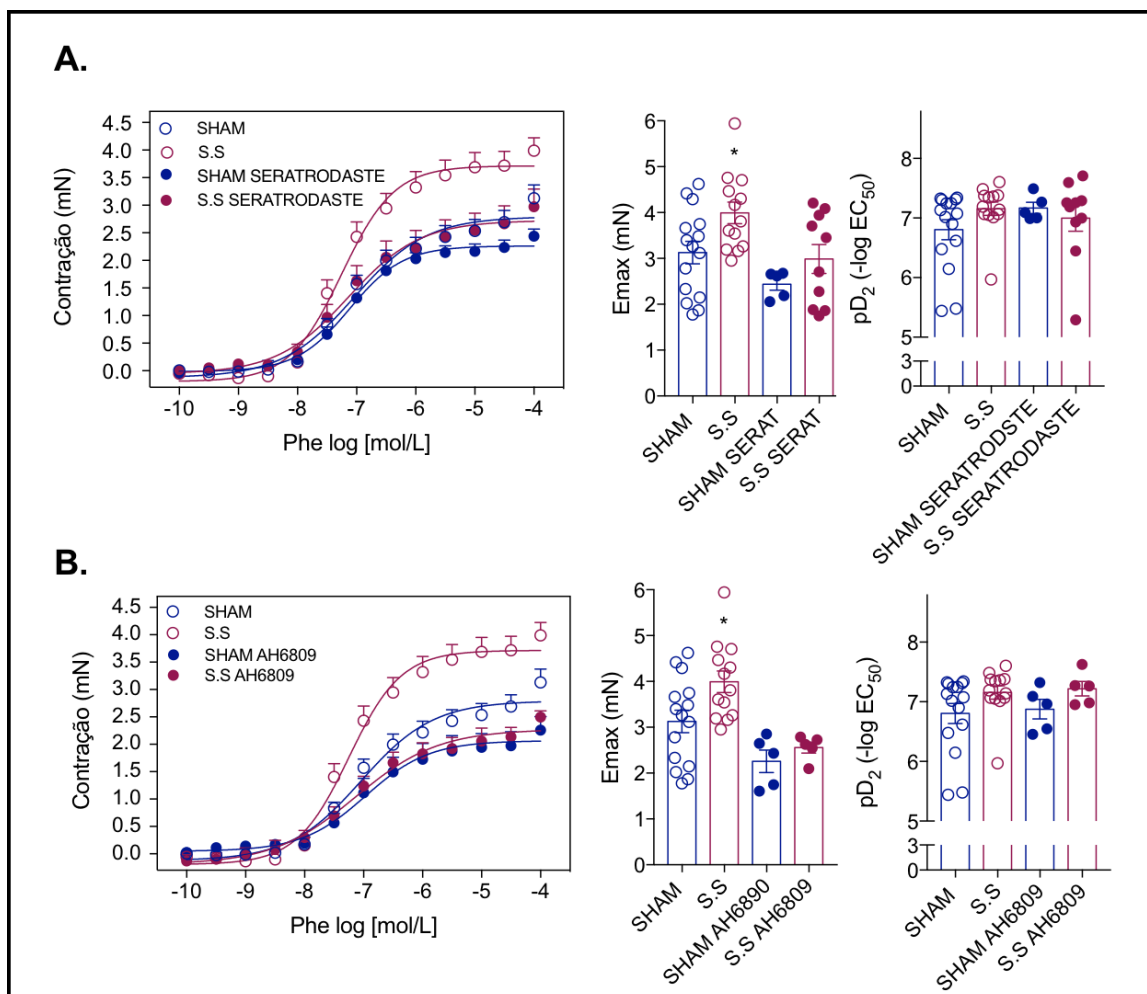


**Figura 14: Avaliação da participação da enzima COX e suas isoformas no aumento da resistência vascular aórtica de animais sobreviventes à sepse. A-B-C.** Análise da via envolvida na hiperreatividade vascular encontrada em camundongos sobreviventes à sepse Curva concentração-resposta para Phe na presença e ausência de ibuprofeno/mofesolac/nimesulida, realizadas em aortas de camundongos e valores de Emax e pD<sub>2</sub> obtidos respectivamente. Cada barra representa a média ± EPM obtida em preparações independentes. (n=5-15) \*representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao resultado observado no grupo sham e S.S ibuprofeno/mofesolac/nimesulida.

Após confirmado o envolvimento da COX, partimos para a investigação de qual isoforma da enzima estaria envolvida nessa resposta encontrada no sobrevivente à sepse, e para isso incubamos as aortas com inibidores seletivos da COX-1 (Mofesolac) e COX-2 (Nimesulida). Conforme demonstrado na **Figura 14**, confirmamos o envolvimento de ambas as isoformas COX-1 e COX-2, respectivamente, uma vez que o aumento da resposta contrátil encontrada no sobrevivente à sepse é revertida em ambas as incubações (**Figura 14B** - Sham Mofesolac— Emax: 2.5±0.14 / pD<sub>2</sub>: 7.5±0.27 n=6. S.S Mofesolac - Emax: 2.9±0.2 / pD<sub>2</sub>: 7.4±0.01 n=4/5; **Figura 14C** - Sham Nimesulida— Emax: 2.2±0.16 / pD<sub>2</sub>: 7.31±0.1 n=5. S.S Nimesulida - Emax: 2.2±0.2 / pD<sub>2</sub>: 7.23±0.07 n=6).

Até o momento, conseguimos comprovar o envolvimento do SRAA na hiperreatividade vascular nos sobreviventes à sepse, derivados da ECA e receptores  $AT_1$ , bem como comprovamos o envolvimento de ânions superóxido, enzima xantina oxidase e das enzimas COX-1 e COX-2. Por fim, a última parte dessa via que fomos investigar foram os possíveis fatores derivados da COX, que estariam envolvidos nessa hiperreatividade vascular dos animais sobreviventes à sepse. Para isso, as aortas foram incubadas com antagonistas seletivos dos receptores para tromboxano (seratrodaste) e para prostaglandinas  $E_2$  e  $F2\alpha$  (AH6809).

Após a incubação com esses antagonistas seletivos, podemos confirmar, como mostrado na **Figura 15**, que a hiperreatividade vascular encontrada nos sobreviventes à sepse depende tanto da ativação dos receptores para tromboxano, quanto da ativação dos receptores para prostaglandina  $E_2$  e  $F2\alpha$ , uma vez que, na presença desses antagonistas, a hiperreatividade antes visualizada para o grupo sobrevivente à sepse, é revertida (**Figura 15A** - Sham Seratrodaste– Emax:  $2.44\pm 0.1$  /  $pD_2$ :  $7.2\pm 0.1$  n=5. S.S Seratrodaste - Emax:  $2.7\pm 0.3$  /  $pD_2$ :  $7.0\pm 0.22$  n=10; **Figura 15B** - Sham AH6809– Emax:  $2.3\pm 0.2$  /  $pD_2$ :  $6.8\pm 0.2$  n=5. S.S AH6809 - Emax:  $2.5\pm 0.1$  /  $pD_2$ :  $6.8\pm 0.4$  n=6).

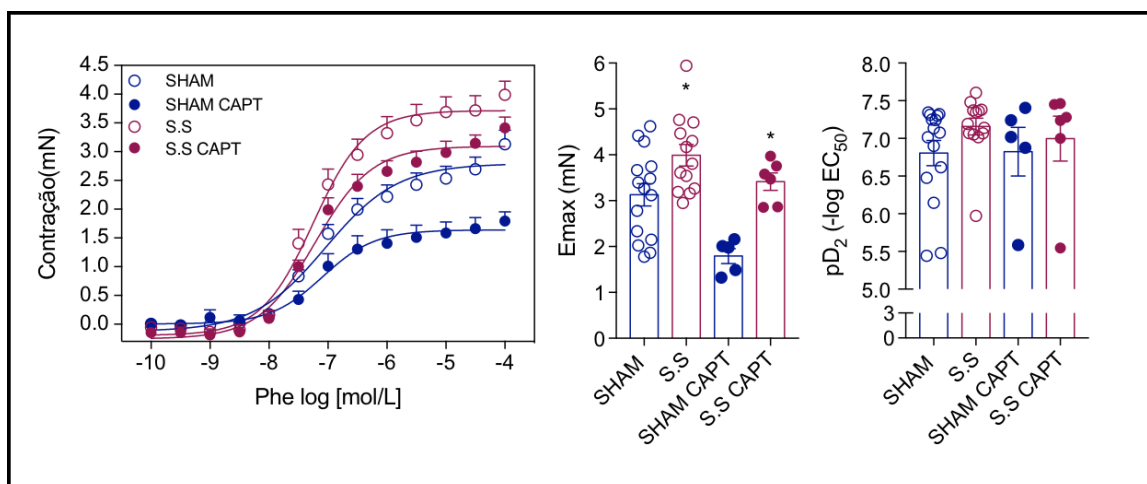


**Figura 15: Envolvimento de tromboxano e prostaglandina E<sub>2</sub> e F<sub>2</sub> $\alpha$  no aumento da resistência vascular aórtica de animais sobreviventes à sepse. A-B. Análise da via envolvida na hiperreatividade vascular encontrada em camundongos sobreviventes à sepse. Curva concentração-resposta para Phe na presença e ausência de seratrodaste/AH6809, realizadas em aortas de camundongos e valores de Emax e pD<sub>2</sub> obtidos para Phe respectivamente. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM obtida em preparações independentes. (n=5-15). \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado observado no grupo sham e S.S seratrodaste/AH6809.**



#### **4.8 Avaliação da resposta vascular dos animais submetidos ou não à sepse após do tratamento com Captopril ou Propranolol**

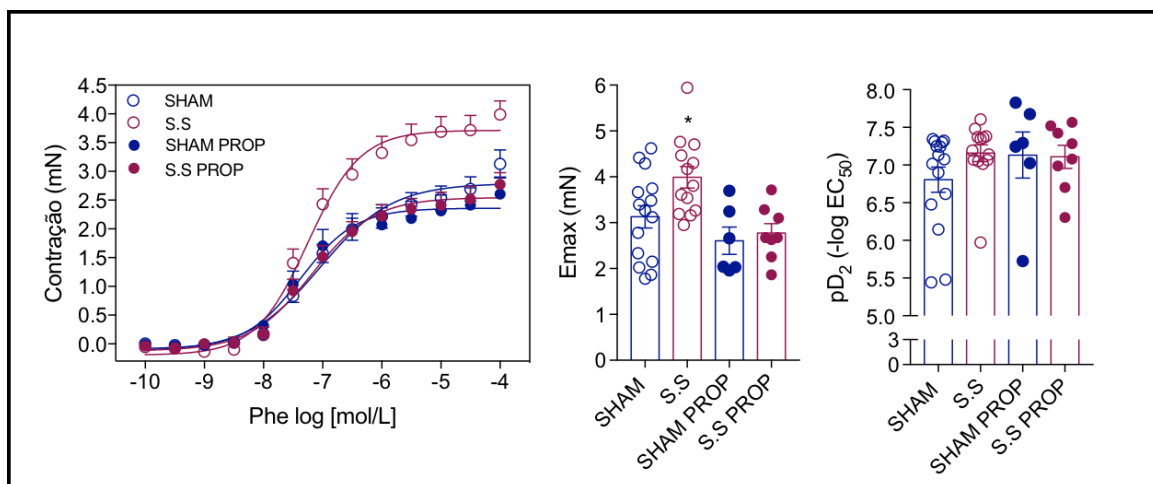
Após a confirmação dos fatores envolvidos na hiperreatividade vascular, sendo que um desses fatores é o envolvimento do SRAA, investigamos se o tratamento dos animais durante a fase aguda com um inibidor da ECA, seria capaz de impedir essa hiperreatividade vascular nos animais sobreviventes à sepse. Podemos verificar na **Figura 16** que o tratamento com captopril não foi capaz de impedir a hiperreatividade vascular encontrada nos animais que sobreviveram à sepse (**Figura 16** - Sham Tratado com Captopril– Emax:  $1.8 \pm 0.16$  /  $pD_2$ :  $6.8 \pm 0.3$  n=5. S.S Tratado com Captopril - Emax:  $3.4 \pm 0.2$  /  $pD_2$ :  $7.0 \pm 0.3$  n=6).



**Figura 16: Tratamento com captopril durante a fase aguda da sepse, não reverte hiperreatividade vascular encontrada nos sobreviventes à sepse.** Avaliação do tratamento com captopril na reversão da hiperreatividade vascular encontrada em camundongos sobreviventes à sepse. Curva concentração-resposta para Phe realizadas em aortas de camundongos tratados com captopril e valores de Emax e  $pD_2$  obtidos respectivamente. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM obtida em preparações independentes. (n=5-15). \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado observado no grupo sham e sham tratado com captopril.

Uma vez que o tratamento com captopril não foi capaz de reverter a hiperreatividade, resolvemos investigar se o uso de um antagonista beta não-seletivo, no caso o propranolol, era capaz de evitar a hiperreatividade encontrada

nas aortas dos sobreviventes à sepse, bem como evitar o prejuízo da função cardíaca encontrada nestes animais. Podemos confirmar na **Figura 17** que o tratamento com propranolol durante a fase aguda da sepse, foi capaz de impedir o aumento da contratilidade vascular encontrada nos animais sobreviventes a esse quadro (**Figura 17- Sham Tratado com Propranolol – Emax:  $2.6 \pm 0.29$  / pD<sub>2</sub>:  $7.1 \pm 0.3$  n=6. S.S Tratado com Propranolol - Emax:  $2.7 \pm 0.2$  / pD<sub>2</sub>:  $7.1 \pm 0.15$  n=8).**

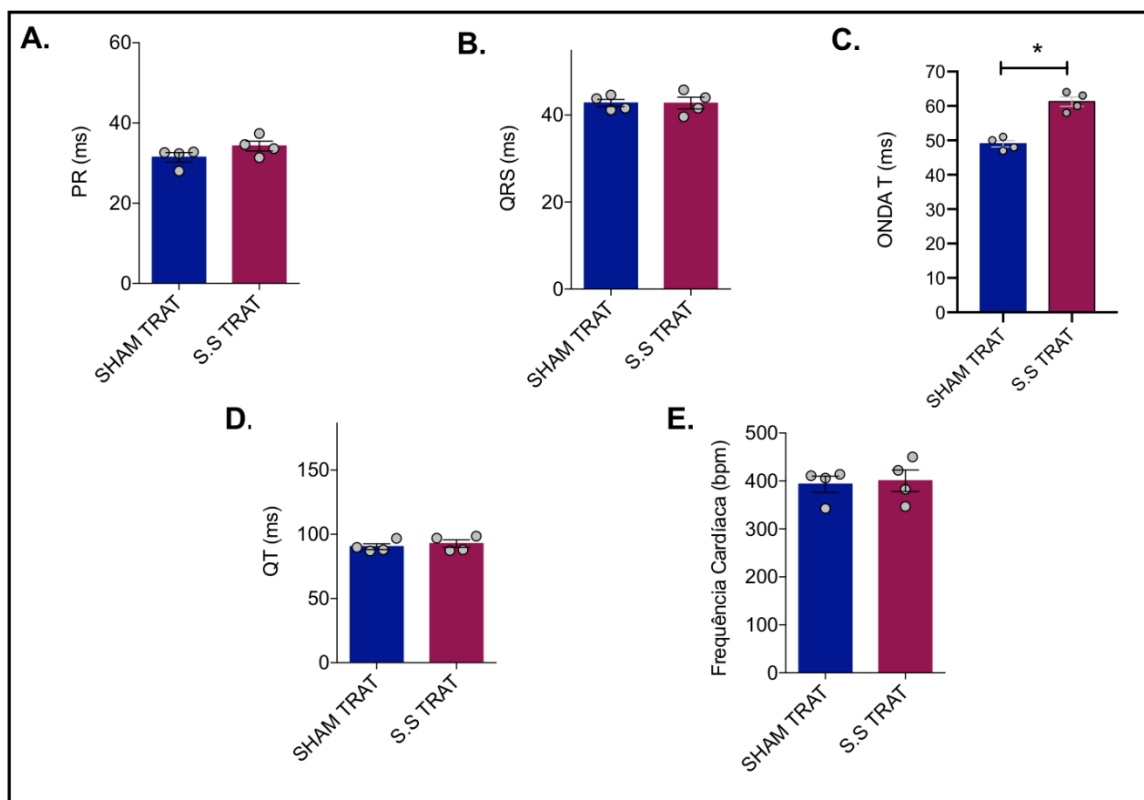


**Figura 17: Tratamento com propranolol durante a fase aguda da sepse, impede a hiperreatividade vascular encontrada nos animais sobreviventes à sepse.** Avaliação do tratamento com propranolol na reversão da hiperreatividade vascular encontrada em camundongos sobreviventes à sepse. Curva concentração-resposta para Phe realizadas em aortas de camundongos tratados com propranolol e valores de Emax e pD<sub>2</sub> obtidos respectivamente. Cada barra representa a média  $\pm$  EPM obtida em preparações independentes. (n=6-15). \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado observado no grupo sham e sham tratado com propranolol.

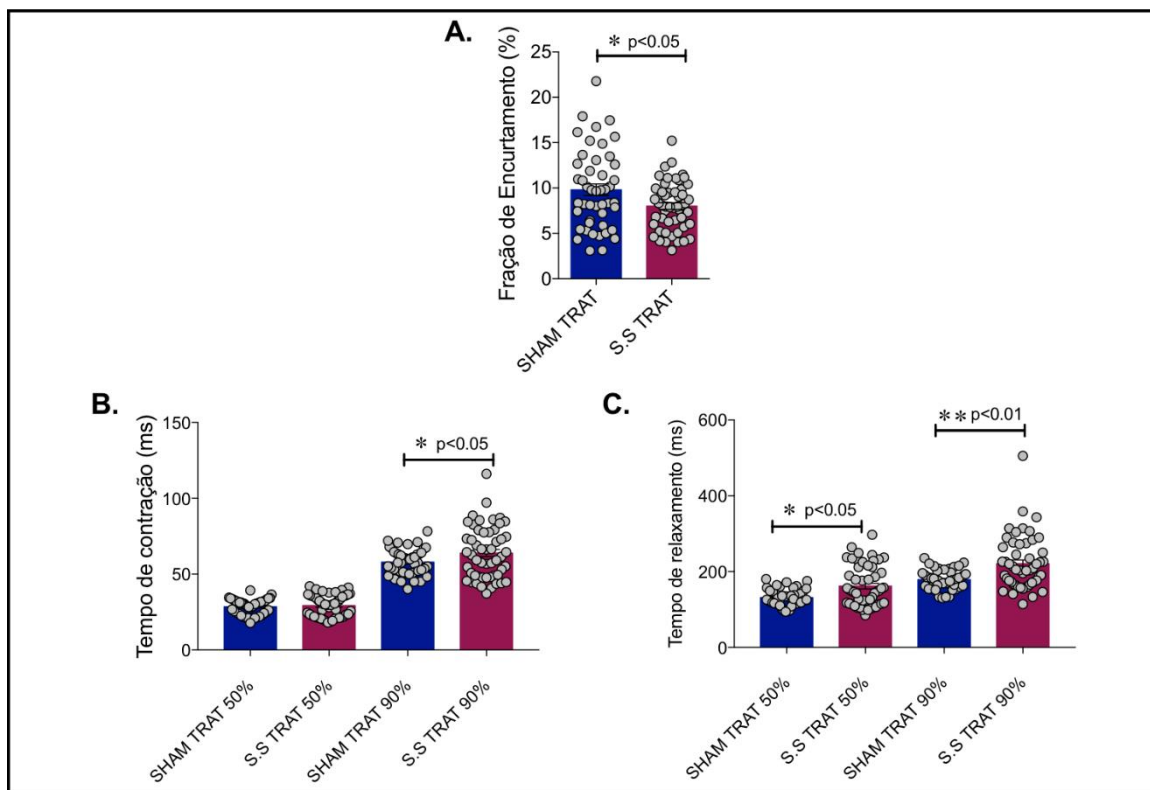
Uma vez confirmado, que o tratamento com propranolol foi capaz de impedir a hiperreatividade vascular anteriormente encontrada nos animais sobreviventes à sepse, partimos para investigação da função cardíaca nos animais sobreviventes à sepse tratados com o antagonista dos receptores beta. Primeiramente avaliamos o eletrocardiograma desses animais, e confirmamos que o tratamento com propranolol foi capaz de impedir as alterações anteriormente (**Figura 8D e 8E**) encontradas no eletrocardiograma dos animais

sobreviventes à sepse. Tanto o QT corrigido quanto a frequência cardíaca (**Figura 18D e 18E**) não foram alteradas quando comparadas aos animais controle tratados com propranolol, confirmando assim a função preventiva do tratamento.

Além disso, o tratamento com propranolol foi capaz não só de reverter o tempo de contração e relaxamento do cardiomiócito (**Figura 19**), como aumentou esse tempo quando comparado ao grupo sham. Apesar dessa melhora, o tratamento com propranolol não foi capaz de melhorar a fração de encurtamento do cardiomiócito do grupo sobrevivente à sepse quando comparado ao grupo sham (Figura 19 A).



**Figura 18: Eletrocardiograma realizado no grupo sham e sobreviventes à sepse tratados com propranolol.** Avaliação do tratamento com propranolol na reversão das alterações encontradas no ECG de camundongos sobreviventes à sepse. **A.** Intervalo PR – Contração atrial; **B.** Complexo QRS – Contração ventricular; **C.** Curva T – Repolarização ventricular; **D.** Intervalo QT corrigido - corresponde ao período do início da contração ventricular até o final da repolarização ventricular; **E.** Frequência cardíaca; (n=4) \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado observado no grupo sham tratado.



**Figura 19: Avaliação da função dos cardiomiócitos dos grupos sham e sobreviventes à sepse tratados com propranolol.** Avaliação do tratamento com propranolol na reversão das alterações encontradas na contração dos cardiomiócitos de camundongos sobreviventes à sepse. **A.** Fração de encurtamento do cardiomiócito **B.** Tempo de contração do cardiomiócito (50% e 90% de toda a contração do cardiomiócito); **C.** Tempo de relaxamento do cardiomiócito (50% e 90% de todo o relaxamento do cardiomiócito); \*representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao resultado observado no grupo sham tratado.

## *Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

Recentemente, a sepse foi incluída pela OMS como prioridade de saúde mundial por causar em média 6 milhões de óbitos por ano, sendo a maioria dos casos passíveis de prevenção (WHO, 2016). Apesar do alto número de óbitos, uma grande parcela dos pacientes sobrevive ao quadro de sepse. Trabalhos recentes demonstraram que pacientes que sobrevivem à sepse apresentam maiores riscos para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares (DCVs) entre o primeiro e quinto ano após a infecção. Além disso, esses trabalhos também demonstram um aumento na mortalidade desses pacientes durante esse período pós-infecção, tendo os eventos cardiovasculares como a principal causa-morte (Jafarzadeh et al., 2016; Mankowski et al., 2019; Ou et al., 2016).

Podemos verificar neste estudo, que os animais que passaram a indução da sepse, apresentaram uma sobrevida de 66% quando comparado aos animais controle. Esses resultados corroboram com dados da literatura em que modelos de sepse CLP em camundongos fêmeas mostraram uma sobrevida de aproximadamente 60% (Steinhauser et al., 1999). Além da mortalidade, avaliamos também o grau de infecção dos animais através da análise do escore clínico previamente estabelecido por Shrum *et al.* (2014), possibilitando uma análise semi-quantitativa do estado clínico e a gravidade da sepse nos animais submetidos a sepse polimicrobiana (Shrum et al., 2014)

Os resultados demonstraram que os animais que passaram pela indução da sepse apresentaram um maior escore clínico nas primeiras 48 horas quando comparado aos animais do grupo sham, o que faz todo o sentido, uma vez que é durante a fase aguda que acontece uma resposta inflamatória intensa no intuito de conter o microorganismo invasor.

Outro parâmetro importante e característico de um quadro de sepse, é a queda da pressão arterial durante a fase aguda como demonstrado em ratos Wistar por Araújo e colaboradores (2012) (Araújo et al., 2012). Os resultados apresentados no presente estudo, demonstram que o grupo sobrevivente à sepse apresentou uma queda da pressão arterial sistólica, em que esta foi significativamente diferente do grupo controle nas primeiras 72 horas após a indução da sepse, sendo que no 15º dia a pressão já havia sido restabelecida. Esses resultados encontrados durante a fase aguda dos animais sépticos, principalmente nas primeiras 48 horas, corroboram com trabalhos na literatura que demonstraram a queda da pressão arterial média, sistólica e diastólica e aumento dos batimentos cardíacos em humanos com sepse, nas primeiras 6 horas pós-infecção (Shashikumar et al., 2017), bem como a queda da pressão arterial em cães com sepse induzida por pseudomonas nas primeiras 48 horas pós-infecção (Esrig & Fulton, 1975). Até o presente momento, não foram encontrados dados referentes à pressão arterial em modelos crônicos de sepse que corroborassem com os resultados encontrados neste estudo.

Após confirmarmos a ocorrência da sepse nesses animais e sabendo que sobreviventes apresentam maior probabilidade de desenvolver DCVs, avaliamos suas funções cardiovasculares (Contrin et al., 2013; Jafarzadeh et al., 2016; Ou et al., 2016). De maneira extraordinária demonstramos nos resultados discutidos a seguir, pela primeira vez de acordo com a pesquisa literária, que um dos efeitos crônicos da sepse nos animais que sobreviveram a esse quadro é o prejuízo da função cardíaca.

Através do ecocardiograma confirmamos esse prejuízo nos animais sobreviventes à sepse, uma vez que foi verificada uma redução do débito

cardíaco, fração de encurtamento e da fração de ejeção, resposta que está associada ao aumento do volume sistólico final encontrado. Logo, esses resultados confirmam que há um prejuízo da função cardíaca dos animais sobreviventes a sepse, e associado a isso há um prejuízo na ejeção de sangue do ventrículo esquerdo do coração desses animais. Trabalhos da literatura demonstram que há um prejuízo da função cardíaca em humanos, porém esse prejuízo é visualizado durante a fase aguda da sepse, em que pacientes em choque séptico apresentam redução da fração de ejeção do ventrículo esquerdo (Vieillard-Baron et al., 2008).

Esse conjunto de resultados confirmam, que o coração dos sobreviventes à sepse apresenta uma insuficiência, uma vez que o órgão não responde de forma adequada como responde o animal controle, e associado a isso, há uma ausência de alteração do tamanho das câmaras durante a sístole e diástole, que nos faz acreditar em uma possível disfunção das células cardíacas. A ausência de alteração do tamanho das câmaras, tanto em sístole quanto em diástole, difere de alguns resultados encontrados em humanos, porém estes foram visualizados na fase aguda da sepse (Jafri et al., 1990; Munt et al., 1998; Poelaert et al., 1997).

A partir dos resultados discutidos anteriormente, partimos para a investigação da função das células cardíacas. Podemos confirmar pelos resultados obtidos, que há um prejuízo funcional das células cardíacas nos animais sobreviventes à sepse, uma vez que partindo de um mesmo tamanho em repouso, os cardiomiócitos apresentaram há uma redução na máxima resposta contrátil celular, denominada fração de encurtamento, bem como no tempo e na velocidade que essa célula leva para contrair e relaxar. Esses resultados, juntamente com os resultados do ecocardiograma, confirmam que os animais



sobreviventes à sepse, apresentam uma disfunção cardíaca ocasionada, até então, por uma perda da função do cardiomiócito.

Uma vez que a maquinaria contrátil do coração estava prejudicada nos sobreviventes à sepse, nos perguntamos se poderia haver uma alteração na condução elétrica no coração desses animais e para tal, foi realizado o eletrocardiograma. Com os resultados do ECG, foi possível observar que o coração dos animais sobreviventes à sepse, apresentam um aumento do intervalo QT corrigido (QTc). O intervalo QT compreende o complexo QRS (despolarização ventricular), o segmento ST (final da despolarização ventricular e início da repolarização ventricular) e a onda T (repolarização ventricular). Desta forma, como o aumento do intervalo QTc não foi acompanhado por alteração do complexo QRS e muito menos da onda T, inferimos que há um prolongamento do segmento ST, confirmando assim que esses corações apresentam um atraso no início da repolarização ventricular. Esses dados são opostos aos resultados encontrados em suínos durante a fase aguda da sepse, 22 horas após a indução, em que há uma redução do intervalo QT e não um aumento como foi visto no presente estudo durante a fase crônica da sepse (Stengl et al., 2010). Isso pode ser justificado, principalmente, porque o eletrocardiograma realizado em suínos avaliou a resposta cardíaca no período agudo da sepse e não crônico, além disso, a diferença de animal experimental também pode justificar a diferença entre os nossos resultados e os obtidos por Stengl e colaboradores (2010). Guimarães e colaboradores (2003) descrevem na “Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso”, que um aumento da duração do segmento ST / aumento do QTc é característica de um quadro de hipocalcemia (deficiência de cálcio) (Guimarães et al., 2003). Dentro desse estudo, seria necessário a

realização de outros experimentos para a confirmação de uma possível hipocalcemia.

Avaliando ainda a função cardíaca, foram realizados experimentos de Langendorff, onde foi verificado que os corações dos animais sobreviventes à sepse apresentam uma redução de todos os parâmetros avaliados, sendo eles: pressão de perfusão das coronárias, pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo e derivada da pressão pelo tempo, tanto durante a sístole (máxima) quanto durante a diástole (mínima), quando comparados aos animais controles. Nesse experimento, não observamos alteração na frequência cardíaca dos animais sobreviventes à sepse como foi observado no ECG, o que é totalmente justificado, uma vez que Langendorff contamos apenas com a ação do marca-passo.

Esses resultados corroboram com os resultados encontrados nos experimentos anteriores, confirmando mais uma vez, porém agora em experimentos *ex vivo*, que os corações dos animais sobreviventes à sepse apresentam uma perda de função quando comparado aos animais controle. Esses achados vão na contramão dos encontrados na literatura, onde a sepse CLP induzida em ratos, foi capaz de prevenir a redução da pressão desenvolvida no ventrículo esquerdo após isquemia e reperfusão (Walshe et al., 2015).

Em seguida, verificamos se o coração dos animais sobreviventes à sepse, seria capaz de recuperar sua função se submetidos a um desafio farmacológico. A ação gerada pela isoprenalina, um agonista  $\beta$  não-seletivo, demonstrou que quando o coração do sobrevivente à sepse é desafiado, ele não é capaz de responder de maneira eficiente.

Contudo, até o presente momento, podemos concluir pela primeira vez, que animais sobrevivente à sepse apresentam um prejuízo da função cardíaca, uma vez que na literatura existem diversos trabalhos que demonstram esse mesmo prejuízo funcional, porém durante a fase aguda da sepse (Munt et al., 1998; Stengl et al., 2010; Vieillard-Baron et al., 2008).

De acordo com Repessé e colaboradores (2013), a fração de ejeção do ventrículo esquerdo é influenciada diretamente pela soma de dois fatores: a capacidade contrátil do ventrículo esquerdo, que confirmamos estar comprometida nos animais sobreviventes à sepse, e a pós-carga do ventrículo esquerdo, em que este último fator é influenciado diretamente pela resistência vascular periférica e pela complacência aórtica (Repressé et al., 2013). Baseados nestes achados avaliamos como estaria a resposta da aorta torácica nos animais sobreviventes à sepse.

Nos experimentos de reatividade vascular, confirmamos também de forma inédita, que há um aumento na resistência aórtica dos animais que sobreviveram à sepse, quando comparada ao grupo controle, e que esse aumento é dependente da ativação de receptores, uma vez que não houve alteração significativa da contração induzida por um vasoconstritor que age independentemente de receptor, no caso o cloreto de potássio. Já a função de relaxamento vascular avaliada em resposta a ACh, não apresenta alteração quando comparada ao grupo controle. Esses resultados diferem dos encontrados durante a fase aguda da sepse, onde é muito bem caracterizado um quadro de hiporreatividade vascular (Brown et al., 2014).

Após confirmar a hiperreatividade encontrada no grupo sobrevivente à sepse, investigamos quais seriam as possíveis vias envolvidas nesse aumento da

vasoconstrição. A primeira via avaliada foi a do SRAA, uma vez que esse sistema participa ativamente durante o quadro de sepse, além de apresentar um papel crucial na resposta vascular. Vimos que a incubação das aortas com captopril e losartana, separadamente e respectivamente foi capaz de impedir o aumento da vasoconstrição encontrada no grupo sobrevivente à sepse, confirmando assim o envolvimento de derivados da ECA e ativação dos receptores AT<sub>1</sub> na hiperreatividade aórtica (Mortensen et al., 2005; Yong et al., 1996).

Sabendo que a ativação dos receptores AT<sub>1</sub> culmina na produção de ânions superóxido via NADPH oxidase, investigamos tanto o envolvimento dessas espécies reativas de oxigênio, como a enzima NADPH oxidase nessa hiperreatividade vascular nos animais sobreviventes à sepse. A incubação com tiron confirmou o envolvimento de ânions superóxido no aumento da vasoconstrição, porém, o ânion superóxido não é produzido via NADPH oxidase, uma vez que a incubação com apocinina não foi capaz de reverter esse quadro de hiper-reatividade (Griendling et al., 1994; Wassmann & Nickenig, 2006).

Em sequência fomos investigar se a enzima xantina oxidase estaria envolvida na hiperreatividade verificada, uma vez que a ANG II é capaz de ativar essa enzima, levando a produção de ânions superóxido. A partir da incubação das aortas com alopurinol, confirmamos que a enzima xantina oxidase está diretamente relacionada ao aumento da vasoconstrição nos sobreviventes à sepse (Landmesser et al., 2007).

É muito bem descrito na literatura, que a ativação dos receptores AT<sub>1</sub> culminam na ativação da enzima ciclooxigenase, levando a produção de seus derivados, que poderiam estar diretamente relacionados ao aumento da vasoconstrição (Viridis et al., 2007b). A incubação das aortas com ibuprofeno,

confirmou o envolvimento desta via na hiperreatividade vascular dos sobreviventes à sepse. Além disso, a incubação com mofesolac e nimesulida também confirmou, que ambas as isoformas da enzima COX, COX-1 e COX - 2, respectivamente, estão envolvidas diretamente nesse aumento da vasoconstrição nos sobreviventes à sepse.

Após confirmar que ambas as isoformas estão envolvidas, partimos para a investigação de quais fatores derivados dessas enzimas poderiam estar relacionados. A incubação das aortas com seratrodate e AH6809 confirma que tanto a ativação dos receptores para tromboxano, quanto dos receptores para prostaglandinas estão envolvidos na hiperreatividade encontrada. Em conjunto, esses resultados confirmam dados presentes na literatura, em que a estimulação excessiva de receptores AT<sub>1</sub>, acarreta em produção de estresse oxidativo, e ambos culminam na ativação de COX, influenciando no desenvolvimento da rigidez e fibrose vascular (Aroor et al., 2013b; Viridis et al., 2007b). Além disso, também já se sabe que o inverso acontece, uma vez que a ativação de COX-2 por si só acarreta na produção de EROs através da co-oxidação (Hernanz et al., 2014).

Assim sendo, baseado nos resultados de reatividade vascular, podemos inferir que o aumento da resistência vascular aórtica, gerado pela ativação de receptores AT<sub>1</sub>, ativação da xantina oxidase via Ang II, produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, ativação da enzima ciclooxigenase, tanto COX-1 quanto COX-2, e ativação dos receptores para tromboxano A<sub>2</sub> e receptores para prostaglandinas, levam a um aumento da resistência vascular aórtica, podendo influenciar diretamente no desenvolvimento da rigidez e fibrose vascular, levando, por sua vez, a um aumento da pós-carga,

e esse aumento de pós-carga faz com que o coração se esforce mais para conseguir ejetar todo o sangue do ventrículo esquerdo.

Desta forma, baseado nos resultados que obtivemos até o presente momento, podemos sugerir que a insuficiência cardíaca encontrada nos animais sobreviventes à sepse pode ocorrer devido ao aumento da pós-carga gerada pela hiperreatividade aórtica. O coração necessita, portanto, de um esforço excessivo para realizar a ejeção de sangue pelo ventrículo esquerdo de forma eficiente e com isso, esse excesso de esforço da maquinaria cardíaca pode induzir ao comprometimento funcional desse órgão.

Uma vez confirmado o envolvimento do SRAA na hiperreatividade vascular aórtica, investigamos se o tratamento dos animais com captopril seria capaz de impedir a vasoconstrição encontrada nos sobreviventes à sepse. Confirmamos, nos resultados encontrados, que o tratamento com captopril não foi capaz de impedir que a hiperreatividade vascular acontecesse no grupo sobrevivente à sepse.

Trabalhos na literatura demonstram, que o uso do propranolol (inibidor não seletivo dos receptores beta) em um modelo de sepse em cão induzida com lipopolissacarídeo (LPS) melhorou significativamente a sobrevivência dos animais quando foi iniciado 60 minutos após a administração de LPS. Além disso, o propranolol também evitou a hipotensão e reduziu a necessidade de reposição de líquidos (Berk et al., 1969). Além disso, curiosamente, outro trabalho também demonstrou que o tratamento com propranolol em indivíduos queimados, previne a incidência de infecção por sepse (Jeschke et al., 2007).

Partindo da análise positiva desses achados na literatura sobre o tratamento com propranolol, e sabendo que este age não só diminuindo o trabalho

cardíaco, como também reduz a secreção de renina pelas células justaglomerulares do rim, o que reduziria a ativação do SRAA, resolvemos tratar os animais, durante a fase aguda da sepse, com este fármaco (Bortolotto & Consolim-Colombo, 2009).

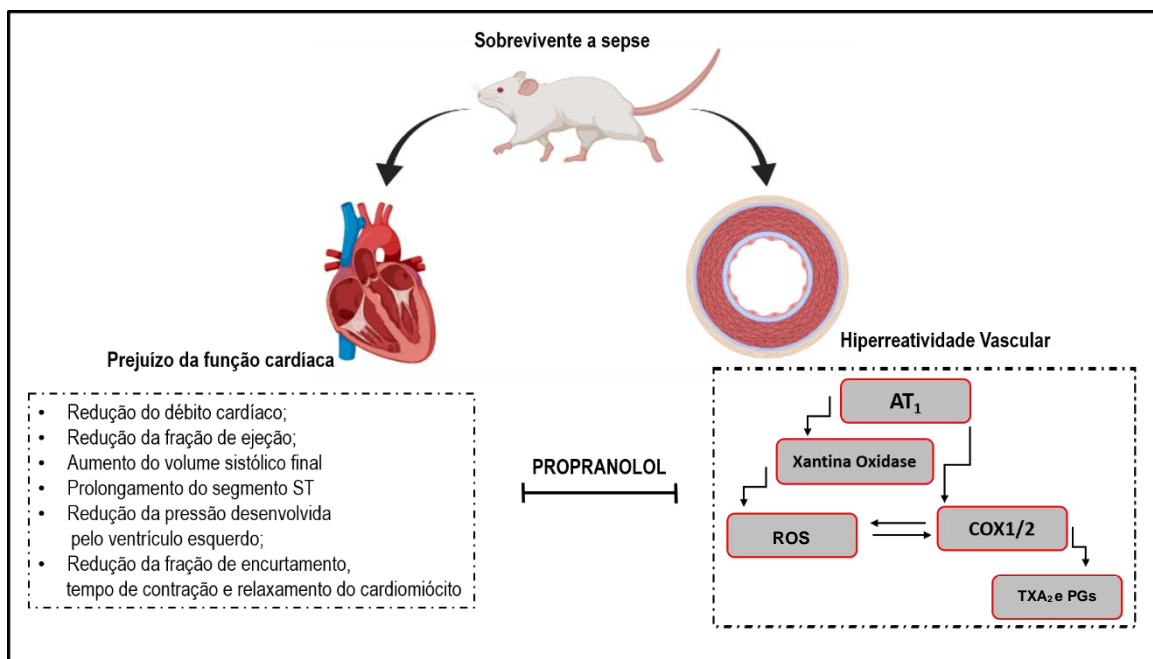
Pela primeira vez demonstrado, de acordo com literatura, o tratamento dos animais durante a sepse aguda com propranolol foi capaz de impedir não só a hiperreatividade vascular aórtica encontrada nos sobreviventes à sepse, como também foi capaz de reverter as alterações encontradas no eletrocardiograma. Além disso, os resultados de contração dos cardiomiócitos também confirmam uma reversão no tempo de contração e relaxamento dessas células, e uma reversão parcial da fração de encurtamento.

## *Conclusão*



## 6. CONCLUSÃO

Sumarizando os resultados encontrados, podemos concluir de forma inédita, que os animais que sobrevivem a um quadro de sepse apresentam um prejuízo significativo da função cardíaca, que pode estar associado a um aumento do trabalho cardíaco gerado pelo aumento da pós-carga, devido a hiperreatividade vascular aórtica verificada. Esta hiperreatividade aórtica se deve a ativação do SRAA, produção de estresse oxidativo e ativação da via da ciclooxygenase dependente de receptores para tromboxano e prostaglandinas.



**Figura 20: Representação esquemática sugerindo o mecanismo que induz o prejuízo da função cardíaca via hiper-reatividade vascular em sobreviventes à sepse.** Ativação de receptores AT<sub>1</sub> culmina na produção de ânion superóxido via xantina oxidase, em que esta produção de EROs também pode ser advinda de COX 1 e 2, bem como ânion superóxido pode levar a ativação desta enzima. A produção de derivados da COX culmina na ativação de vias vasoconstritoras via receptores de TXA<sub>2</sub> e prostaglandinas. A hiperreatividade aórtica gera um aumento de pós-carga, o que induz a um maior trabalho cardíaco no intuito de vencer essa pós-carga. Esse esforço excessivo do coração pode ser a causa do prejuízo funcional do órgão. O tratamento com propranolol, durante a fase aguda da sepse, foi capaz de impedir as alterações anteriormente encontradas nos sobreviventes à sepse.

## *Referências Bibliográficas*

## 7. REFERÊNCIAS

- Araújo, A. V., Ferezin, C. Z., C. Pereira, A. de, Rodrigues, G. J., Grandó, M. D., Bonaventura, D., & Bendhack, L. M. (2012). Augmented nitric oxide production and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase during cecal ligation and perforation. *Nitric Oxide*, 27(1), 59–66.  
<https://doi.org/10.1016/j.niox.2012.04.005>
- Aroor, A. R., DeMarco, V. G., Jia, G., Sun, Z., Nistala, R., Meininger, G. A., & Sowers, J. R. (2013a). The Role of Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Development of Endothelial Dysfunction and Arterial Stiffness. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00161>
- Aroor, A. R., DeMarco, V. G., Jia, G., Sun, Z., Nistala, R., Meininger, G. A., & Sowers, J. R. (2013b). The Role of Tissue Renin-Angiotensin-Aldosterone System in the Development of Endothelial Dysfunction and Arterial Stiffness. *Frontiers in Endocrinology*. <https://doi.org/10.3389/fendo.2013.00161>
- Berk, J. L., Hagen, J. F., Beyer, W. H., Gerber, M. J., & Dochat, G. R. (1969). The treatment of endotoxin shock by beta adrenergic blockade. *Annals of Surgery*. <https://doi.org/10.1097/00000658-196901000-00007>
- Boczkowski, J., Lisdero, C. L., Lanone, S., Samb, A., Carreras, M. C., Boveris, A., Aubier, M., & Poderoso, J. J. (1999). Endogenous peroxynitrite mediates mitochondrial dysfunction in rat diaphragm during endotoxemia. *The FASEB Journal*, 13(12), 1637–1646. <https://doi.org/10.1096/fasebj.13.12.1637>
- Bodor, C., Nagy, J. P., Végh, B., Németh, A., Jenei, A., Mirzahosseini, S., Sebe, A., & Rosivall, L. (2012). Angiotensin II increases the permeability and PV-1 expression of endothelial cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00138.2011>
- Bohm, H., Lee, M., Kreutz, R., Kim, S., Schinke, M., Djavidani, B., Wagner, J., Kaling, M., Wienen, W., Bader, M., & Ganten, D. (1995). Angiotensin II receptor blockade in TGR(mREN2)27: Effects of renin-angiotensin-system gene expression and cardiovascular functions. *Journal of Hypertension*. <https://doi.org/10.1097/00004872-199508000-00010>
- Bortolotto, L. a., & Consolim-Colombo, F. M. (2009). Betabloqueadores adrenérgicos. *Rev Bras Hipertens*.
- Brown, N. K., Zhou, Z., Zhang, J., Zeng, R., Wu, J., Eitzman, D. T., Chen, Y. E.,

- & Chang, L. (2014). Perivascular adipose tissue in vascular function and disease: A review of current research and animal models. In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*.  
<https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303029>
- Bucher, M., Hobbhahn, J., & Kurtz, A. (2001). Nitric oxide-dependent down-regulation of angiotensin II type 2 receptors during experimental sepsis. *Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1097/00003246-200109000-00016>
- Bucher, M., Ittner, K., Hobbhahn, J., Taeger, K., & Kurtz, A. (2001). *During Sepsis*.
- Carneiro, A. H., Póvoa, P., & Gomes, J. A. (2017). Dear Sepsis-3, we are sorry to say that we don't like you. In *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*.  
<https://doi.org/10.5935/0103-507X.20170002>
- Champion, H. C., Georgakopoulos, D., Takimoto, E., Isoda, T., Wang, Y., & Kass, D. A. (2004). Modulation of In Vivo Cardiac Function by Myocyte-Specific Nitric Oxide Synthase-3. *Circulation Research*.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.0000119323.79644.20>
- Coelho, J. C. É. (2014). *Sepse : uma visão atual Sepsis : current aspects. November*.
- Contrin, L. M., Paschoal, V. D., Beccaria, L. M., Cesarino, C. B., & Lobo, S. M. A. (2013). Qualidade de vida de sobreviventes de sepse grave após alta hospitalar. *Rev Latino-Am Enfermagem*.
- Corrales-Medina, V. F., Madjid, M., & Musher, D. M. (2010). Role of acute infection in triggering acute coronary syndromes. In *The Lancet Infectious Diseases*. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70331-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70331-7)
- Corrêa, T. D., Takala, J., & Jakob, S. M. (2015). *Angiotensin II in septic shock*. 1–6. <https://doi.org/10.1186/s13054-015-0802-3>
- Creagh, E. M., & O'Neill, L. A. J. (2006). TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. *Trends in Immunology*.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2006.06.003>
- do Carmo e Silva, C., Queiroz de Almeida, J. F., Macedo, L. M., Melo, M. B., Pedrino, G. R., Alcantara dos Santos, F. C., Biancardi, M. F., Souza dos Santos, R. A., Valladão de Carvalho, A. A., Mendes, E. P., Colugnati, D. B., Mazaro-Costa, R., & Henrique de Castro, C. (2016). Mas receptor contributes to pregnancy-Induced cardiac remodelling. *Clinical Science*.

- <https://doi.org/10.1042/CS20160095>
- Esrig, B. C., & Fulton, R. L. (1975). Sepsis, resuscitated hemorrhagic shock and “shock lung”: an experimental correlation. *Annals of Surgery*.  
<https://doi.org/10.1097/00000658-197509000-00005>
- Feihl, F., Waeber, B., & Liaudet, L. (2001). Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacology and Therapeutics*, 91(3), 179–213. [https://doi.org/10.1016/S0163-7258\(01\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0163-7258(01)00155-3)
- Furchgott, R. F., & Zawadzki, J. V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288(5789), 373–376. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6253831>
- Griendling, K. K., Minieri, C. A., Ollerenshaw, J. D., & Alexander, R. W. (1994). Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation Research*.  
<https://doi.org/10.1161/01.RES.74.6.1141>
- Guimarães, J. I., Nicolau, J. C., Polanczyk, C. A., Pastore, C. A., Pinho, J. A., De Carvalho Bacellar, M. S., Ribeiro, D. G. L., Darwich, R. N., Ribeiro, A. L. P., Dunda, M. M. E., Germiniani, H., França, F. F., Saraiva, L., Ribeiro, C. M. R., Ginefra, P., Gus, I., Fernandes, E., Riera, A., Pedrosa, A., ... Nishioka, S. (2003). Diretriz de interpretação de eletrocardiograma de repouso. In *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2003000800001>
- Hernanz, R., Briones, A. M., Salaices, M., & Alonso, M. J. (2014). New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. In *Clinical Science*.  
<https://doi.org/10.1042/CS20120651>
- Holmes, C. L., Patel, B. M., Russell, J. A., & Walley, K. R. (2001). Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. In *Chest*.  
<https://doi.org/10.1378/chest.120.3.989>
- Ichiro Wakabayashi, Katsuhiko Hatake, Eizo Kakishita, & Kiyoyasu Nagai. (1987). Diminution of contractile response of the aorta from endotoxin-injected rats. *European Journal of Pharmacology*, 141(1), 117–122.  
[https://doi.org/10.1016/0014-2999\(87\)90417-1](https://doi.org/10.1016/0014-2999(87)90417-1)
- Jadhav, A. P., & Sadaka, F. G. (2019). Angiotensin II in septic shock. In

- American Journal of Emergency Medicine.*  
<https://doi.org/10.1016/j.ajem.2019.03.026>
- Jafarzadeh, S. R., Thomas, B. S., Warren, D. K., Gill, J., & Fraser, V. J. (2016). Longitudinal study of the effects of bacteremia and sepsis on 5-year risk of cardiovascular events. *Clinical Infectious Diseases.*  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw320>
- Jafri, S. M., Lavine, S., Field, B. E., Bahorozian, M. T., & Carlson, R. W. (1990). Left ventricular diastolic function in sepsis. *Critical Care Medicine.*  
<https://doi.org/10.1097/00003246-199007000-00005>
- Janeway, C. A., & Medzhitov, R. (2002). *Nate immune ecognition.* 2, 197–216.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Jeschke, M. G., Norbury, W. B., Finnerty, C. C., Branski, L. K., & Herndon, D. N. (2007). Propranolol does not increase inflammation, sepsis, or infectious episodes in severely burned children. *Journal of Trauma - Injury, Infection and Critical Care.* <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e318031afd3>
- Joviano-Santos, J. V., Santos-Miranda, A., Joca, H. C., Cruz, J. S., & Ferreira, A. J. (2016). New insights into the elucidation of angiotensin-(1–7) in vivo antiarrhythmic effects and its related cellular mechanisms. *Experimental Physiology.* <https://doi.org/10.1113/EP085884>
- Landmesser, U., & Harrison, D. G. (2001). Oxidative stress and vascular damage in hypertension. In *Coronary Artery Disease.*  
<https://doi.org/10.1097/00019501-200109000-00004>
- Landmesser, U., Spiekermann, S., Preuss, C., Sorrentino, S., Fischer, D., Manes, C., Mueller, M., & Drexler, H. (2007). Angiotensin II induces endothelial xanthine oxidase activation: Role for endothelial dysfunction in patients with coronary disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000258415.32883.bf>
- Mankowski, R. T., Yende, S., & Angus, D. C. (2019). Long-term impact of sepsis on cardiovascular health. *Intensive Care Medicine.*  
<https://doi.org/10.1007/s00134-018-5173-1>
- McKenna, S., Eckman, M., Parker, A., Bok, R., Hurt, K. J., & Wright, C. J. (2016). Perinatal Endotoxemia Induces Sustained Hepatic COX-2 Expression through an NFκB-Dependent Mechanism. *Journal of Innate Immunity.*  
<https://doi.org/10.1159/000445541>

- Mortensen, E. M., Restrepo, M. I., Anzueto, A., & Pugh, J. (2005). The impact of prior outpatient ACE inhibitor use on 30-day mortality for patients hospitalized with community-acquired pneumonia. *BMC Pulmonary Medicine*. <https://doi.org/10.1186/1471-2466-5-12>
- Munt, B., Jue, J., Gin, K., Fenwick, J., & Tweeddale, M. (1998). Diastolic filling in human severe sepsis: An echocardiographic study. *Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1097/00003246-199811000-00023>
- Nardi, G. M., Scheschowitsch, K., Ammar, D., De Oliveira, S. K., Arruda, T. B., & Assreuy, J. (2014). Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. *Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000301>
- Nascimento, D. C., Melo, P. H., Piñeros, A. R., Ferreira, R. G., Colón, D. F., Donate, P. B., Castanheira, F. V., Gozzi, A., Czaikoski, P. G., Niedbala, W., Borges, M. C., Zamboni, D. S., Liew, F. Y., Cunha, F. Q., & Alves-Filho, J. C. (2017). IL-33 contributes to sepsis-induced long-Term immunosuppression by expanding the regulatory T cell population. *Nature Communications*. <https://doi.org/10.1038/ncomms14919>
- ochoa1991.pdf*. (n.d.).
- Ohlig, J. (2013). *Endothelial NOS ( NOS3 ) impairs myocardial function in developing sepsis*. <https://doi.org/10.1007/s00395-013-0330-8>
- Opitz, B., Eitel, J., Meixenberger, K., & Suttorp, N. (2009). *Role of Toll-like receptors , NOD-like receptors and RIG-I-like receptors in endothelial cells and systemic infections*. <https://doi.org/10.1160/TH09-05-0323>
- Ou, S. M., Chu, H., Chao, P. W., Lee, Y. J., Kuo, S. C., Chen, T. J., Tseng, C. M., Shih, C. J., & Chen, Y. T. (2016). Long-term mortality and major adverse cardiovascular events in sepsis survivors a nationwide population-based study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/rccm.201510-2023OC>
- Parker, M. M., Shelhamer, J. H., Bacharach, S. L., Green, M. V., Natanson, C., Frederick, T. M., Damske, B. A., & Parrillo, J. E. (1984). Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Annals of Internal Medicine*, 100(4), 483–490. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-100-4-483>

- Parratt, J. R. (1988). Pathophysiology of myocardial ischemia: Importance of platelet-vessel wall interactions. *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 2(1), 35–40. <https://doi.org/10.1007/BF00054250>
- Parrillo, J. E., Discussants, ;, Parker, M. M., Natanson, C., Suffredini, A. F., Danner, R. L., Cunnion, R. E., Ognibene, F. P., & Herrick, J. B. (1990). Septic Shock in Humans Advances in the Understanding of Pathogenesis, Cardiovascular Dysfunction, and Therapy. *Annals of Internal Medicine*, 113(3), 227–242. <http://annals.org/pdfaccess.ashx?url=/data/journals/aim/19709/>
- Poelaert, J., Declerck, C., Vogelaers, D., Colardyn, F., & Visser, C. A. (1997). Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. *Intensive Care Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s001340050372>
- Repressé, X., Charron, C., & Vieillard-Baron, A. (2013). Evaluation of left ventricular systolic function revisited in septic shock. In *Critical Care*. <https://doi.org/10.1186/cc12755>
- Rocha, R., Martin-Berger, C. L., Yang, P., Scherrer, R., Delyani, J., & McMahon, E. (2002). Selective aldosterone blockade prevents angiotensin II/salt-induced vascular inflammation in the rat heart. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220120>
- Roguin, A. (2011). Henry cuthbert bazett (1885-1950)-the man behind the QT interval correction formula. *PACE - Pacing and Clinical Electrophysiology*. <https://doi.org/10.1111/j.1540-8159.2010.02973.x>
- Santos-Miranda, A., Gondim, A. N., Menezes-Filho, J. E. R., Vasconcelos, C. M. L., Cruz, J. S., & Roman-Campos, D. (2014). Pharmacological evaluation of R(+)-pulegone on cardiac excitability: Role of potassium current blockage and control of action potential waveform. *Phytomedicine*, 21(10), 1146–1153. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.05.007>
- Schaller, M. D., Waeber, B., Nussberger, J., & Brunner, H. R. (1985). Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 18(6). <https://doi.org/10.1152/ajpheart.1985.249.6.h1086>
- Shashikumar, S. P., Stanley, M. D., Sadiq, I., Li, Q., Holder, A., Clifford, G. D., & Nemati, S. (2017). Early sepsis detection in critical care patients using multiscale blood pressure and heart rate dynamics. *Journal of*



- Electrocardiology*. <https://doi.org/10.1016/j.jelectrocard.2017.08.013>
- Shioya, T. (2007). A simple technique for isolating healthy heart cells from mouse models. *Journal of Physiological Sciences*.  
<https://doi.org/10.2170/physiolsci.RP010107>
- Shrum, B., Anantha, R. V., Xu, S. X., Donnelly, M., Haeryfar, S. M. M., McCormick, J. K., & Mele, T. (2014). A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Research Notes*.  
<https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-233>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Coopersmith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubinfeld, G. D., Poll, T. Der, Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). In *JAMA - Journal of the American Medical Association*.  
<https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Skrzypiec-Spring, M., Grotthus, B., Szelag, A., & Schulz, R. (2007). Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*.  
<https://doi.org/10.1016/j.vascn.2006.05.006>
- Smeeth, L., Thomas, S. L., Hall, A. J., Hubbard, R., Farrington, P., & Vallance, P. (2004). Risk of myocardial infarction and stroke after acute infection or vaccination. *The New England Journal of Medicine*, 351(25), 2611–2618.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa041747>
- Steinhauser, M. L., Hogaboam, C. M., Kunkel, S. L., Lukacs, N. W., Strieter, R. M., & Standiford, T. J. (1999). IL-10 is a major mediator of sepsis-induced impairment in lung antibacterial host defense. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*.
- Stengl, M., Bartak, F., Sykora, R., Chvojka, J., Benes, J., Krouzecky, A., Novak, I., Svirglerova, J., Kuncova, J., & Matejovic, M. (2010). Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from pigs with hyperdynamic septic shock. *Critical Care Medicine*.  
<https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e3181cb0f61>
- Szabó, C., & Ohshima, H. (1997). DNA damage induced by peroxynitrite: Subsequent biological effects. In *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*.

- <https://doi.org/10.1006/niox.1997.0143>
- Touyz, R. M., & Schiffrin, E. L. (2004). Reactive oxygen species in vascular biology: Implications in hypertension. In *Histochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1007/s00418-004-0696-7>
- Touyz, Rhian M., & Schiffrin, E. L. (1999). Ang II-stimulated superoxide production is mediated via phospholipase D in human vascular smooth muscle cells. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.34.4.976>
- Touyz, Rhian M., Tabet, F., & Schiffrin, E. L. (2003). Redox-dependent signalling by angiotensin II and vascular remodelling in hypertension. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2003.03930.x>
- Trautinger, F., Hammerle, A. F., Poschl, G., & Micksche, M. (1991). Respiratory burst capability of polymorphonuclear neutrophils and TNF- $\alpha$  serum levels in relationship to the development of septic syndrome in critically ill patients. *Journal of Leukocyte Biology*, 49(5), 449–454. <https://doi.org/10.1002/jlb.49.5.449>
- Vieillard-Baron, A., Caille, V., Charron, C., Belliard, G., Page, B., & Jardin, F. (2008). Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. *Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318174db05>
- Vincent, J. L., Zhang, H., Szabo, C., & Preiser, J. C. (2000). Effects of nitric oxide in septic shock. In *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.161.6.9812004>
- Vincent, J., Zhang, H., Szabo, C., & Preiser, J. (2000). *Clinical Commentary Effects of Nitric Oxide in Septic Shock*.
- Virdis, A., Colucci, R., Fornai, M., Duranti, E., Giannarelli, C., Bernardini, N., Segnani, C., Ippolito, C., Antonioli, L., Blandizzi, C., Taddei, S., Salvetti, A., & Del Tacca, M. (2007a). Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice. *Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000253085.56217.11>
- Virdis, A., Colucci, R., Fornai, M., Duranti, E., Giannarelli, C., Bernardini, N., Segnani, C., Ippolito, C., Antonioli, L., Blandizzi, C., Taddei, S., Salvetti, A., & Del Tacca, M. (2007b). Cyclooxygenase-1 is involved in endothelial dysfunction of mesenteric small arteries from angiotensin II-infused mice.

- Hypertension*. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000253085.56217.11>
- Walshe, C. M., Laffey, J. G., Kevin, L., & O'Toole, D. (2015). Sepsis protects the myocardium and other organs from subsequent ischaemic/reperfusion injury via a MAPK-dependent mechanism. *Intensive Care Medicine Experimental*. <https://doi.org/10.1186/s40635-014-0035-9>
- Wassmann, S., & Nickenig, G. (2006). Pathophysiological regulation of the AT1-receptor and implications for vascular disease. *Journal of Hypertension*. <https://doi.org/10.1097/01.hjh.0000220402.53869.72>
- Wei, X. Q., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G. J., Huang, F. P., Xu, D., Mullers, W., Moncada, S., & Liew, F. Y. (1995). Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. In *Nature*. <https://doi.org/10.1038/375408a0>
- Wichterman, K. A., Baue, A. E., & Chaudry, I. H. (1980). Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(80\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0022-4804(80)90037-2)
- Yende, S., Linde-Zwirble, W., Mayr, F., Weissfeld, L. A., Reis, S., & Angus, D. C. (2014). Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. <https://doi.org/10.1164/rccm.201307-1321OC>
- Yildiz, O., Seyrek, M., Polat, G. G., Macit, E., & Akgun, O. M. (2015). Dental Polymers: Vascular Tone Effects. *Encyclopedia of Biomedical Polymers and Polymeric Biomaterials*, April, 2536–2548. <https://doi.org/10.1081/e-ebpp-120050809>
- Yong, J., Xiaoyan, R., Yuntao, Z., Linwang, D., Liling, W., & Jingyi, S. (1996). Role of intracardiac angiotensin II in cardiac dysfunction of rat during septic shock. *Chinese Medical Journal*.
- Yu, B. P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. In *Physiological Reviews*. <https://doi.org/10.1152/physrev.1994.74.1.139>
- Yu, B. P. A. L. (2018). *Cellular Defenses Against Damage From Reactive Oxygen Species*. 74(1).
- Zhang, H., Niesel, D. W., Peterson, J. W., & Klimpel, G. R. (1998). *Lipoprotein Release by Bacteria : Potential Factor in Bacterial Pathogenesis*. 66(11), 5196–5201.

- Zhang, W., Chen, X., Huang, L., Lu, N., Zhou, L., Wu, G., & Chen, Y. (2014). Severe sepsis: Low expression of the renin-angiotensin system is associated with poor prognosis. *Experimental and Therapeutic Medicine*.  
<https://doi.org/10.3892/etm.2014.1566>
- Zimmerman, J. J., & Dietrich, K. A. (1987). Current perspectives on septic shock. *Pediatric Clinics of North America*, *34*(1), 131–163.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(16\)36186-7](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(16)36186-7)