Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Marcos Lopes de Miranda

Avaliação das alterações microcirculatórias secundárias ao uso de ivabradina em um modelo experimental de sepse em hamsters

Rio de Janeiro
2016

Marcos Lopes de Miranda

Avaliação das alterações microcirculatórias secundárias ao uso de ivabradina em um modelo experimental de sepse em hamsters

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Dra. Eliete Bouskela

Rio de Janeiro

2016

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

M672 Miranda, Marcos Lopes de.
Avaliação das alterações microcirculatórias secundárias ao uso de ivabradina em um modelo experimental de sepse em hamsters / Marcos Lopes de Miranda. – 2016.
156 f.

Orientadora: Eliete Bouskela.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental.

1. Microcirculação - Teses. 2. Sepse – Teses. I. Bouskela, Eliete. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 612.1

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Marcos Lopes de Miranda

Avaliação das alterações microcirculatórias secundárias ao uso de ivabradina em um modelo experimental de sepse em hamsters

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 27 de julho de 2016.

Banca Examinadora:

_____

Prof.ª Dra. Eliete Bouskela (Orientadora)

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

_____

Prof. Dr. Nivaldo Ribeiro Villela

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof. Dr. Mario Fritsch Toros Neves

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

_____

Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

Fundação Oswaldo Cruz

_____

Prof. Dr. Nils Erik Svensjö

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2016

DEDICATÓRIA

À minha família, sem a qual jamais teria chegado aqui.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

À minha família pelo amor, compreensão e suporte.

À professora Eliete Bouskela, por ter acreditado e me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho.

À Maria Carolina Santos, Lorena Paes e Daniela Signorelli Balthazar, pelo inestimável auxílio com os experimentos adicionais.

À Maria das Graças Coelho de Souza, pela paciência e assistência.

À Eliza Candida Ávila Freitas, pela presteza.

À Fátima Cyrino, pelo suporte técnico com os equipamentos.

Aos bioteristas Cláudio Natalino Ribeiro e Paulo José Ferreira Lopes, pelo cuidado dos animais.

Aos demais colegas do BioVasc e Fisclinex que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Que a importância de uma coisa não se mede com fita métrica nem com balanças nem barômetros etc. Que a importância de uma coisa há que ser medida pelo encantamento que a coisa produza em nós.

Manoel de Barros

RESUMO

MIRANDA, Marcos Lopes de. *Avaliação das alterações microcirculatórias secundárias ao uso de ivabradina em um modelo experimental de sepse em hamsters.* 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Ivabradina, uma droga inibidora da corrente I_f no nodo sinoatrial, já foi utilizada em pacientes sépticos, embora poucos estudos tenham examinado seus efeitos sobre a função da microcirculação. Dessa forma, o presente estudo experimental foi desenvolvido para caracterizar os efeitos microcirculatórios da ivabradina em um modelo murino de sepse abdominal que permite avaliações *in vivo* da microcirculação. Vinte e oito hamsters sírios dourados foram alocados em grupos: *sham*; animais sépticos não tratados; animais sépticos tratados com solução salina a 0,9%; animais sépticos tratados com ivabradina (2,0 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal, em bolus intravenoso, seguido de 0,5 $mg.kg^{-1}.h^{-1}$). A realização de microscopia intravital em preparações de dobras cutâneas (câmara dorsal) permitiu a análise quantitativa de diversas variáveis microvasculares. Pressão arterial, frequência cardíaca, escore de atividade, gasometria arterial e parâmetros hematológicos e bioquímicos também foram documentados. A indução de sepse acarretou diminuição da perfusão capilar e se associou com disfunção orgânica e acidose metabólica. O tratamento com ivabradina atenuou significativamente essas respostas: em comparação com os animais sépticos tratados com solução salina a 0,9%, aqueles tratados com ivabradina terminaram o experimento com menor comprometimento da função de órgãos, maior nível sérico de bicarbonato (26,7 ± 2,5 *versus* 15,7 ± 3,5, $p < 0,05$) e maior densidade capilar funcional (90,5 ± 4,3% em relação aos valores basais *versus* 71,0 ± 15,9%, $p < 0,05$). Dessa forma, a ivabradina foi eficaz na redução da acidose metabólica, da disfunção de órgãos e de distúrbios microvasculares evocados pela sepse experimental. Esses resultados sugerem que a ivabradina produz efeitos benéficos sobre a microcirculação de animais sépticos.

Palavras-chave: Ivabradina. Sepse. Microcirculação.

ABSTRACT

MIRANDA, Marcos Lopes de. *Assessment of microcirculatory changes related to the use of ivabradine in an experimental model of sepsis in hamsters.* 2016. 156 f. Tese (Doutorado em Fisiopatologia Clínica e Experimental) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2016.

Ivabradine, an I_f current inhibitor in the sinoatrial node, has already been used in septic patients although few studies have examined its effects on microcirculatory function. Therefore, we have designed a controlled experimental study to characterize the microcirculatory effects of ivabradine on a murine model of abdominal sepsis that allows *in vivo* studies of microcirculation. Twenty-eight golden Syrian hamsters were allocated in groups: sham-operated; non-treated septic animals; septic animals treated with saline; septic animals treated with ivabradine (2.0 $mg.kg^{-1}$ intravenous bolus + 0.5 $mg.kg^{-1}.h^{-1}$). Intravital microscopy of skinfold chamber preparations allowed quantitative analysis of microvascular variables. Arterial blood pressure, heart rate, activity score, arterial blood gases, and hematological and biochemical parameters were documented. Sepsis decreased capillary perfusion and was associated with organ dysfunction and metabolic acidosis. Ivabradine significantly attenuated these responses: compared with septic animals treated with saline, those treated with ivabradine had less organ dysfunction and higher bicarbonate level (26.7 ± 2.5 *vs.* 15.7 ± 3.5; $p<0.05$) and functional capillary density (90.5 ± 4.3% of baseline values *vs.* 71.0 ± 15.9%; $p<0.05$) at the end of the experiment. Ivabradine was effective in reducing microvascular derangements evoked by experimental sepsis, which was accompanied by less acidosis and organ dysfunction. These results suggest that ivabradine yields beneficial effects on septic animals' microcirculation.

Keywords: Ivabradine. Sepsis. Microcirculation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – O escore SOFA para diagnóstico de sepse..... 21

Figura 2 – Fisiopatologia das alterações microcirculatórias associadas à sepse..... 26

Figura 3 – Disfunção microcirculatória associada à sepse..... 29

Figura 4 – Desenho esquemático da câmara dorsal..... 34

Figura 5 – Fotografia da câmara dorsal e do material utilizado para a fixação..... 35

Figura 6 – A despolarização da membrana celular no nodo sinoatrial e a corrente I_f..... 40

Figura 7 – Bloqueio da corrente I_f pela ivabradina..... 41

Figura 8 – Ação da ivabradina sobre os canais *f*..... 42

Figura 9 – Implante da câmara dorsal..... 50

Figura 10 – Fixação dos cateteres à câmara dorsal..... 51

Figura 11 – Tubo de acrílico utilizado durante a microscopia intravital..... 54

Figura 12 – Delineamento de estudo utilizado nos experimentos principais..... 61

Figura 13 – Inclusão e exclusão de animais no estudo..... 68

Figura 14 – Formação de coágulos intracardíacos..... 91

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Evolução da frequência cardíaca durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo..... 71

Gráfico 2 – Evolução da pressão arterial média durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo..... 73

Gráfico 3 – Evolução da densidade capilar funcional durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo..... 75

Gráfico 4 – Evolução da velocidade média das hemácias nos capilares durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo..... 77

Gráfico 5 – Evolução do diâmetro arteriolar durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo..... 79

Gráfico 6 – Evolução da velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo..... 81

Gráfico 7 – Evolução do diâmetro venular durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo..... 83

Gráfico 8 – Contagem de unidades formadoras de colônias bacterianas na cultura de sangue arterial em animais sépticos e não sépticos..... 88

Gráfico 9 – Escore de atividade por grupo e momento de observação..... 89

Gráfico 10 – Análise de sobrevida após indução de sepse por CLP..... 153

Gráfico 11 – Correlação entre a frequência cardíaca e o fluxo arteriolar..... 154

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – O escore *quick*SOFA para diagnóstico de sepse..... 21

Tabela 2 – Medidas iniciais de acordo com o grupo..... 69

Tabela 3 – Evolução da frequência cardíaca durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo..... 70

Tabela 4 – Evolução da pressão arterial média durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo..... 72

Tabela 5 – Evolução da densidade capilar funcional durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo..... 74

Tabela 6 – Evolução da velocidade média das hemácias nos capilares durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo..... 76

Tabela 7 – Evolução do diâmetro arteriolar durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo..... 78

Tabela 8 – Evolução da velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo..... 80

Tabela 9 – Evolução do diâmetro venular durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo..... 82

Tabela 10 – Gasometria arterial e lactato de acordo com o grupo..... 85

Tabela 11 – Hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas de acordo com o grupo..... 86

Tabela 12 – Glicose, bilirrubina total, ureia e creatinina de acordo com o grupo..... 87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
Adren/nora	Adrenalina ou noradrenalina
ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BE	Excesso de bases
BioVasc-UERJ	Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro
bpm	Batimentos por minuto
CCD	*Charge-coupled device*
CEUA	Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais
cGMP	Guanosina monofosfato cíclico
CLP	Modelo de sepse abdominal por ligadura e perfuração cecal
cm	Centímetro
$cm.cm^{-2}$	Centímetros por centímetros quadrados
DCF	Densidade capilar funcional
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Enzima óxido nítrico sintase endotelial
EUA	Estados Unidos da América
FC	Frequência cardíaca
FIO_2	Fração inspirada de oxigênio
g	Grama
HCN	*Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide*
HCO_3	Bicarbonato
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
irpm	Incursões respiratórias por minuto
LPS	Lipopolissacarídeo
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
$µg.kg^{-1}$	Microgramas por quilo de peso corporal

$\mu g.kg^{-1}.min^{-1}$	Microgramas por quilo de peso corporal por minuto
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
$mg.dl^{-1}$	Miligramas por decilitro
$mg.kg^{-1}$	Miligramas por quilo
$mg.kg^{-1}.h^{-1}$	Miligramas por quilo de peso corporal por hora
ml	Mililitro
$ml.h^{-1}$	Mililitros por hora
$ml.kg^{-1}$	Mililitros por quilo
$ml.kg^{-1}.h^{-1}$	Mililitros por quilo de peso corporal por hora
mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercúrio
$mmol.l^{-1}$	Milimol por litro
$mm.s^{-1}$	Milímetros por segundo
N/A	Não se aplica
NaCl	Cloreto de sódio
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido
NADPH	Forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
$n.mm^{-3}$	Número de células por mililitro cúbico
$nmol.h^{-1}.mg\ ptn^{-1}$	Nanomoles por hora por miligrama de proteína
NO	Óxido nítrico
PAM	Pressão arterial média
PaO_2	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
pH	Potencial hidrogeniônico
pO_2	Pressão parcial de oxigênio
*q*SOFA	Escore *quick*SOFA
RV	Ressuscitação volêmica
SDF	*Sidestream dark field*
SOFA	*Sequential Organ Failure Assessment*
TCO_2	Dióxido de carbono total
$UFC.ml^{-1}$	Unidades formadoras de colônias por mililitro
$UI.ml^{-1}$	Unidades internacionais por mililitro
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
vs.	*Versus*

LISTA DE SÍMBOLOS

>	Maior que
<	Menor que
≥	Maior ou igual a
≤	Menor ou igual a
x	Vezes
±	Mais ou menos
n	Número de animais

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	**REFERENCIAL TEÓRICO**	19
1.1	**Nova Terminologia Relacionada à Sepse**	19
1.2	**Modelos Experimentais de Sepse**	22
1.2.1	Modelo experimental de sepse abdominal por ligadura e perfuração cecal	23
1.3	**A Sepse e a Microcirculação**	24
1.3.1	A microcirculação	25
1.3.2	Fisiopatologia das alterações microcirculatórias associadas à sepse	25
1.3.3	Importância da avaliação das alterações microcirculatórias na sepse	31
1.4	**Modelo Experimental para Avaliação da Microcirculação**	33
1.5	**Controle da Frequência Cardíaca na Sepse**	35
1.6	**Ivabradina**	39
1.6.1	A despolarização da membrana celular no nodo sinoatrial e a corrente I_f	39
1.6.2	Bloqueio da corrente I_f	40
1.6.3	Ivabradina na sepse	43
2	**OBJETIVOS**	45
2.1	**Objetivos Gerais**	45
2.2	**Objetivos Específicos**	45
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	47
3.1	**Considerações Éticas**	47
3.2	**Animais e Grupos**	47
3.3	**Procedimentos Cirúrgicos Iniciais – Implante da Câmara Dorsal, Cateterização Vascular e Implante de Eletrodos**	49

3.4 **Preparação para o Experimento – Avaliação do Escore de Atividade, Monitorização dos Sinais Vitais e Acomodação no Microscópio**..... 52
3.4.1 Avaliação do escore de atividade..... 52
3.4.2 Monitorização dos sinais vitais e acomodação no microscópio..... 53
3.5 **Avaliação da Microcirculação**..... 55
3.5.1 Equipamentos..... 55
3.5.2 Protocolo experimental..... 56
3.6 **Modelo Experimental de Sepse Abdominal por Ligadura e Perfuração Cecal**..... 57
3.7 **Avaliações Sequenciais**..... 58
3.8 **Avaliação Gasométrica do Sangue Arterial**..... 59
3.9 **Avaliações Laboratoriais do Sangue Arterial**..... 60
3.9.1 Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos..... 60
3.9.2 Hemocultura..... 60
3.10 **Necropsia**..... 62
3.11 **Grupo Controle Séptico Não Ressuscitado e Não Infundido (CLP-CONTROLE)**..... 62
3.12 **Cegamento do Estudo**..... 63
3.13 **Análise das Gravações – Variáveis Anatomofuncionais Relacionadas à Microcirculação**..... 64
3.14 **Elaboração dos Bancos de Dados e Análise Estatística**..... 65
4 **RESULTADOS**..... 67
4.1 **Inclusão e Exclusão de Animais**..... 67
4.2 **Valores Basais (*Baseline*)**..... 68
4.3 **Evolução dos Sinais Vitais**..... 70
4.3.1 Frequência cardíaca..... 70
4.3.2 Pressão arterial média..... 72
4.4 **Variáveis Anatomofuncionais da Microcirculação**..... 74
4.4.1 Densidade capilar funcional..... 74
4.4.2 Velocidade média das hemácias nos capilares..... 76

4.4.3 Diâmetro arteriolar..... 78
4.4.4 Velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar..... 80
4.4.5 Diâmetro venular..... 82
4.5 **Análises Laboratoriais do Sangue Arterial**..... 84
4.5.1 Gasometria arterial e lactato..... 84
4.5.2 Hemograma..... 85
4.5.3 Bioquímica..... 86
4.5.4 Hemocultura..... 87
4.6 **Escore de Atividade**..... 89
4.7 **Necropsia**..... 90
5 **DISCUSSÃO**..... 92
5.1 **O que Foi Novo e Digno de Nota**..... 92
5.2 **Sobre o Delineamento de Estudo**..... 92
5.3 **Sobre o Modelo de Sepse**..... 94
5.4 **Sobre o Modelo Experimental de Avaliação da Microcirculação**..... 96
5.5 **Sobre a Dose de Ivabradina**..... 97
5.6 **Sobre os Grupos Controle**..... 99
5.7 **Sobre o Número de Animais, Critérios de Inclusão e Exclusão, Cegamento e Valores Basais Encontrados**..... 100
5.8 **Sobre a Volemia**..... 102
5.9 **Sobre as Alterações Macro-hemodinâmicas**..... 104
5.9.1 Frequência cardíaca..... 104
5.9.2 Pressão arterial média..... 107
5.10 **Sobre as Alterações Microcirculatórias**..... 109
5.11 **Sobre as Alterações Hematológicas, Bioquímicas e Gasométricas**..... 113
5.11.1 Gasometria arterial..... 113
5.11.2 Lactato..... 116
5.11.3 Hemograma..... 118
5.11.4 Ureia e creatinina..... 121
5.11.5 Bilirrubina..... 123
5.11.6 Glicose..... 124

5.12 **Sobre a Hemocultura**..... 126
5.13 **Sobre as Alterações no Escore de Atividade**..... 127
5.14 **Sobre a Ação da Ivabradina Sobre o Estresse Oxidativo**……..…. 130
5.15 **Considerações Finais**..... 133
CONCLUSÕES..... 135
REFERÊNCIAS..... 136
APÊNDICE A – Padronização do modelo de sepse abdominal por ligadura e perfuração cecal em hamsters dourados..... 152
APÊNDICE B – Correlação entre a frequência cardíaca e o fluxo arteriolar..... 154
ANEXO – Parecer da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais..... 156

INTRODUÇÃO

Em fases iniciais da sepse, a redução da pré-carga ventricular desencadeia a ativação simpática, em uma tentativa de manter a perfusão de órgãos. Apresentada como uma das consequências mais importantes dessa resposta compensatória, a taquicardia é reconhecida como um mecanismo importante para a manutenção do débito cardíaco.[1] No entanto, alguns pacientes sépticos permanecem com a frequência cardíaca elevada, mesmo depois de adequada ressuscitação volêmica. O mecanismo subjacente dessa resposta cronotrópica alterada e não compensatória está relacionado ao comprometimento do sistema nervoso autônomo, resultando em hiperestimulação simpática mal-adaptativa, que excede o efeito compensatório benéfico e leva à disfunção cronotrópica. Percebe-se porque a taquicardia é considerada uma manifestação precoce da disfunção miocárdica associada à sepse.[2,3]

Alguns estudos clínicos sugeriram que a taquicardia está relacionada ao aumento da mortalidade em pacientes sépticos, indicando que a redução da frequência cardíaca poderia ser considerada como um alvo terapêutico no tratamento desses pacientes.[2,4,5] A ivabradina, um inibidor seletivo da corrente I_f no nodo sinoatrial, é capaz de reduzir a frequência cardíaca sem exercer efeitos inotrópicos negativos indesejados, o que torna essa droga uma opção atraente para o tratamento da taquicardia em pacientes instáveis do ponto de vista hemodinâmico. De fato, resultados preliminares sugeriram que seu uso poderia melhorar desfechos clínicos em pacientes críticos, apesar de diversos aspectos relacionados ao uso da ivabradina nessa população ainda carecerem de maior elucidação, como os seus efeitos sobre a função da microcirculação.[6]

Já foi demonstrado que a ivabradina exerce efeitos protetores sobre a função endotelial em modelos animais de lesão vascular não relacionados à sepse.[7,8] Posto isso, é possível a suposição de que a ivabradina também seja capaz de prevenir a disfunção endotelial na sepse experimental, levando à reversão de distúrbios da microcirculação, melhoria da perfusão tecidual e redução dos escores de falência orgânica. Com intuito de testar essa hipótese em um modelo murino de sepse, que permite a observação *in vivo* da microcirculação, realizou-se o presente estudo experimental controlado não aleatorizado.

1 **REFERENCIAL TEÓRICO**

1.1 **Nova Terminologia Relacionada à Sepse**

A sepse é um problema de saúde pública de elevado impacto econômico e social, afetando milhões de indivíduos ao redor do mundo todos os anos. Nas últimas décadas, apesar dos esforços e avanços tecnológicos investidos no seu diagnóstico e tratamento, a incidência da sepse aumentou e a mortalidade permaneceu elevada.[9,10,11,12]

Apesar da importância dessa patologia, a terminologia relacionada à sepse foi criada, evoluiu e se diversificou de uma forma não padronizada. Dessa forma, termos importantes como sepse, choque ou falência orgânica possuíam definições diferentes de acordo com a literatura estudada.[13,14]

Em 1991, uma Conferência de Consenso unificou e padronizou a terminologia relacionada à sepse.[13,15] Na famosa “Definição de Roger Bone” sobre a sepse, feita há mais de duas décadas, foram desenvolvidos os critérios de resposta inflamatória sistêmica e definidos os termos sepse, sepse grave, choque séptico e disfunção orgânica. Atualmente essa definição é nomeada no meio científico como “Sepse-1”.

Transcorrida uma década, as definições de 1991 foram revisadas por membros de diversas sociedades médicas europeias e americanas relacionadas aos cuidados de pacientes críticos reunidos em uma nova Conferência de Consenso. A definição de 2001, conhecida como “Sepse-2”, expandiu a lista de sinais e sintomas relacionados à sepse, mas não atualizou as definições criadas no primeiro consenso diagnóstico.[16]

Em 2016, uma nova definição de sepse foi publicada na literatura pautada pela necessidade de revisão dos critérios, já defasados em relação aos avanços no entendimento dos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pelas disfunções celulares e moleculares relacionadas à sepse. O “Sepse-3” foi proposto por grandes nomes da terapia intensiva mundial e endossado por diversas sociedades médicas ao redor do mundo.[17,18,19,20]

Além de adequar as definições de sepse aos novos conhecimentos, o consenso “Sepse-3” visou, claramente, aumentar a especificidade do diagnóstico, reduzindo

gastos desnecessários com o “sobrediagnóstico” e “sobretratamento” que advinham do uso de critérios simples, muito sensíveis e pouco específicos de resposta inflamatória sistêmica. Dessa forma, foram definidos os seguintes termos:

a) sepse – disfunção orgânica potencialmente fatal causada por resposta imune desregulada a uma infecção;
b) choque séptico – sepse acompanhada por profundas anormalidades circulatórias e metabólicas/celulares, capazes de aumentar substancialmente a mortalidade.

O termo sepse grave foi excluído da nova definição por ser considerado redundante. Além disso, o conceito de resposta inflamatória sistêmica perdeu espaço, tendo sido considerado inespecífico e confuso, refletindo apenas respostas normais do organismo e induzindo ao início equivocado de tratamento.

O Consenso “Sepse-3” também estabeleceu critérios clínicos e laboratoriais necessários ao diagnóstico de sepse, disfunção orgânica e choque séptico:

a) sepse – infecção suspeita ou documentada, acompanhada de disfunção orgânica;
b) disfunção orgânica – pontuação ≥ 2 no escore *quick*SOFA (*q*SOFA; Tabela 1) e aumento agudo em dois ou mais pontos no escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*; Figura 1). A simples presença de hiperlactatemia não é mais considerada critério de disfunção orgânica;
c) choque séptico – paciente séptico que após adequada ressuscitação volêmica apresenta lactato ≥ 2 mmol.l^{-1} e hipotensão persistente que requer o uso de vasopressores para manter pressão arterial média ≥ 65 mmHg.

A publicação do “Sepse-3” gerou intensa e heterogênea resposta da comunidade científica internacional com manifestações de elogios e críticas. Realmente, a nova definição de sepse possui prós e contras que devem ser levados em consideração durante o processo de adaptação dos protocolos institucionais de diagnóstico e tratamento. Essa discussão, no entanto, foge ao escopo da presente revisão.

Tabela 1 – O escore *quick*SOFA para diagnóstico de sepse

Escore *quick*SOFA
Pressão arterial sistólica < 100 mmHg
Alteração do nível de consciência (escala de coma de Glasgow < 15)
Frequência respiratória > 22 irpm

Legenda: O escore *q*SOFA é uma ferramenta para triar clinicamente, à beira do leito, pacientes com suspeita ou documentação de infecção que estejam sob maior risco de desfechos adversos. Cada variável conta um ponto no escore. O diagnóstico de disfunção orgânica exige pontuação ≥ 2. irpm, incursões respiratórias por minuto.
Fonte: SINGER, 2016, f. 805.

Figura 1 – O escore SOFA para diagnóstico de sepse

	Escore				
Sistema	0	1	2	3	4
Respiratório					
PaO_2/FIO_2	≥ 400	< 400	< 300	< 200 com suporte respiratório	< 100 com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas, $x10^3/\mu l$	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hepático					
Bilirrubina, $mg.dl^{-1}$	< 1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	> 12,0
Cardiovascular	PAM ≥ 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Dopamina < 5 ou qualquer dose de dobutamina	Dopamina 5,1-15 ou Adren/nora ≤ 0,1	Dopamina > 15 ou Adren/nora > 0,1
Sistema nervoso central					
Escala de coma de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Renal					
Creatinina, $mg.dl^{-1}$	< 1,2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	> 5,0
Débito urinário, ml/dia				< 500	< 200

Legenda: O escore SOFA gradua anormalidades em diferentes sistemas orgânicos, utilizando variáveis clínicas e valores de exames laboratoriais, para identificação de pacientes com maior probabilidade de óbito. Todas as doses de aminas são apresentadas em $\mu.kg^{-1}.min^{-1}$. PaO_2, pressão parcial de oxigênio; FIO_2, fração inspirada de oxigênio; PAM, pressão arterial média; Adren/nora, adrenalina ou noradrenalina.
Fonte: SINGER, 2016, f. 804.

1.2 **Modelos Experimentais de Sepse**

Embora não exista um modelo experimental capaz de reproduzir em sua totalidade a complexidade clínica e a heterogeneidade dos pacientes sépticos, esses modelos são essenciais para a pesquisa e entendimento dos mecanismos fisiopatológicos da sepse, fornecendo informações sobre componentes específicos ou pontuais do processo de adoecimento por essa patologia.

A história natural da sepse em animais de laboratório é geralmente distinta daquela vista na sepse humana, com os animais apresentando um rápido início de colapso circulatório e uma rápida evolução para a resolução do quadro ou para a morte. Na sepse clínica, a morte é mais comumente causada pelo desenvolvimento de disfunção de múltiplos órgãos, dias ou semanas após a apresentação inicial. Por esta razão, os modelos animais que levam à mortalidade significativa dentro de poucas horas, conhecidos como modelos agudos, podem não representar um desfecho que é relevante para os seres humanos: o da falência multiorgânica.[21]

A utilização destes modelos em pesquisas sobre novas terapias envolve desafios ainda maiores. Além das limitações intrínsecas aos modelos experimentais de sepse, os estudos de novos tratamentos possuem limitações próprias, muitas vezes relacionadas ao momento de administração do tratamento. As drogas em investigação são frequentemente administradas aos animais, antes ou imediatamente após a indução da sepse, condição que raramente pode ser obtida em humanos, mesmo em ensaios clínicos altamente controlados. Assim, é preciso ter cuidado na avaliação da eficácia clínica de novos agentes terapêuticos em modelos animais de sepse. Apesar dessas limitações, os modelos animais continuam a ser essenciais para o desenvolvimento de novas terapias para a sepse e choque séptico, pois fornecem informações fundamentais que não poderiam ser adquiridas de outras formas.[21]

Entre os modelos experimentais de sepse mais frequentemente utilizados estão incluídos: o da ligadura e perfuração cecal (CLP), o da administração intravenosa ou intraperitoneal de bactérias vivas e o da administração intravenosa ou intraperitoneal de produtos bacterianos (como o lipopolissacarídeo).[22]

1.2.1 Modelo experimental de sepse abdominal por ligadura e perfuração cecal

Introduzido em 1980 por Wichterman e colaboradores[23], o modelo de sepse abdominal por CLP consiste na ligadura de parte do ceco e perfuração do mesmo, levando à inflamação peritoneal e infecção da corrente sanguínea em decorrência da presença de fezes e tecido necrótico na cavidade abdominal. É reconhecido como um modelo de realização relativamente fácil e pouco dispendiosa do ponto de vista econômico, tendo se tornado o padrão-ouro para modelagem experimental de sepse polimicrobiana e o procedimento mais utilizado para esse fim.[24,25]

Assim como na sepse clínica, a infecção causada pelo CLP se inicia em um foco localizado (intra-abdominal), que se torna fonte de bactérias e componentes moleculares endotóxicos a serem lançados em áreas normalmente estéreis do hospedeiro ou translocados para a corrente sanguínea. Desta forma, a bacteremia é causada por patógenos da flora do hospedeiro, mimetizando aquilo que na maior parte das vezes é visto na sepse clínica. Além disso, o procedimento experimental necessário à realização de CLP engloba elementos frequentemente encontrados em pacientes cirúrgicos sépticos, como a realização de laparotomia e a presença de tecido inflamado (peritônio) ou necrótico (ceco).[25] Percebe-se que a indução de infecção intra-abdominal por CLP satisfaz diversos atributos levantados na literatura como essenciais a um modelo experimental de sepse de relevância clínica:[26]

a) a infecção é polimicrobiana, envolvendo patógenos Gram-positivos e negativos, aeróbios ou anaeróbios;
b) os patógenos originam-se da flora bacteriana do hospedeiro;
c) bactérias e produtos bacterianos são encontrados na corrente sanguínea;
d) mimetiza o curso clínico da sepse, ou seja, a infecção tem origem focal (localizada) evoluindo para infecção sistêmica com o avançar da doença.

Por seguir os passos da evolução natural da sepse, o modelo CLP permite que diversos aspectos do complexo curso clínico dessa patologia sejam avaliados. Deste modo, elementos importantes da resposta do hospedeiro encontrados na sepse clínica, como a evolução hemodinâmica, resposta cardiovascular, alterações

metabólicas, mudanças na resposta imunológica com apoptose de leucócitos específicos e no perfil de citocinas e anormalidades da coagulação, também são observados após a realização de CLP.[25] A presença desses elementos no modelo CLP aumenta a sua importância para realização de estudos pré-clínicos e o potencial de translação dos resultados.

Diversas etapas do protocolo experimental para realização de CLP podem ser modificadas com intuito de adequar o modelo às diversas condições clínicas encontradas na sepse. Assim, diferentes gravidades de doença e evoluções podem ser mimetizadas: desde um quadro de início rápido e catastrófico de resposta hiperinflamatória até quadros mais incipientes com franca imunossupressão. Incluem-se nas adaptações da técnica experimental, o número de perfurações do ceco, o calibre da agulha utilizada para perfuração e o percentual de ceco ligado. Existem resultados conflitantes sobre a participação de cada um desses elementos na modelagem experimental, mas aparentemente, o percentual de ceco ligado é o maior contribuinte para a mortalidade.[27,28]

Por fim, o modelo de sepse abdominal por CLP foi inicialmente desenvolvido para utilização em roedores, existindo extensa validação desse procedimento para uso em ratos e camundongos.[27,26] No entanto, a padronização do modelo para uso em hamsters dourados, espécie utilizada no presente estudo, ainda é precária.

1.3 **A Sepse e a Microcirculação**[29]

Nas fases iniciais da sepse, citocinas pró-inflamatórias são liberadas na tentativa de eliminar o agente agressor, gerando uma resposta endógena intensa que acomete a função da microcirculação.[30,31] Praticamente todos os componentes celulares da microcirculação são afetados, incluindo células endoteliais, células musculares lisas, plaquetas, leucócitos, eritrócitos e as células do parênquima adjacente.[32] A resultante disfunção da microcirculação é caracterizada pelo aumento do número de capilares com fluxo interrompido e pela má distribuição do fluxo sanguíneo microvascular.[33,34,35] Essas alterações microcirculatórias já foram observadas em diferentes espécies, órgãos e modelos de sepse e parecem ter significado prognóstico na sepse humana, tendo em vista que a gravidade inicial dos

distúrbios microcirculatórios, em fases precoces do tratamento com volume, e a sua persistência ao longo do tempo têm sido associados com menor sobrevida.[35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45]

1.3.1 A Microcirculação

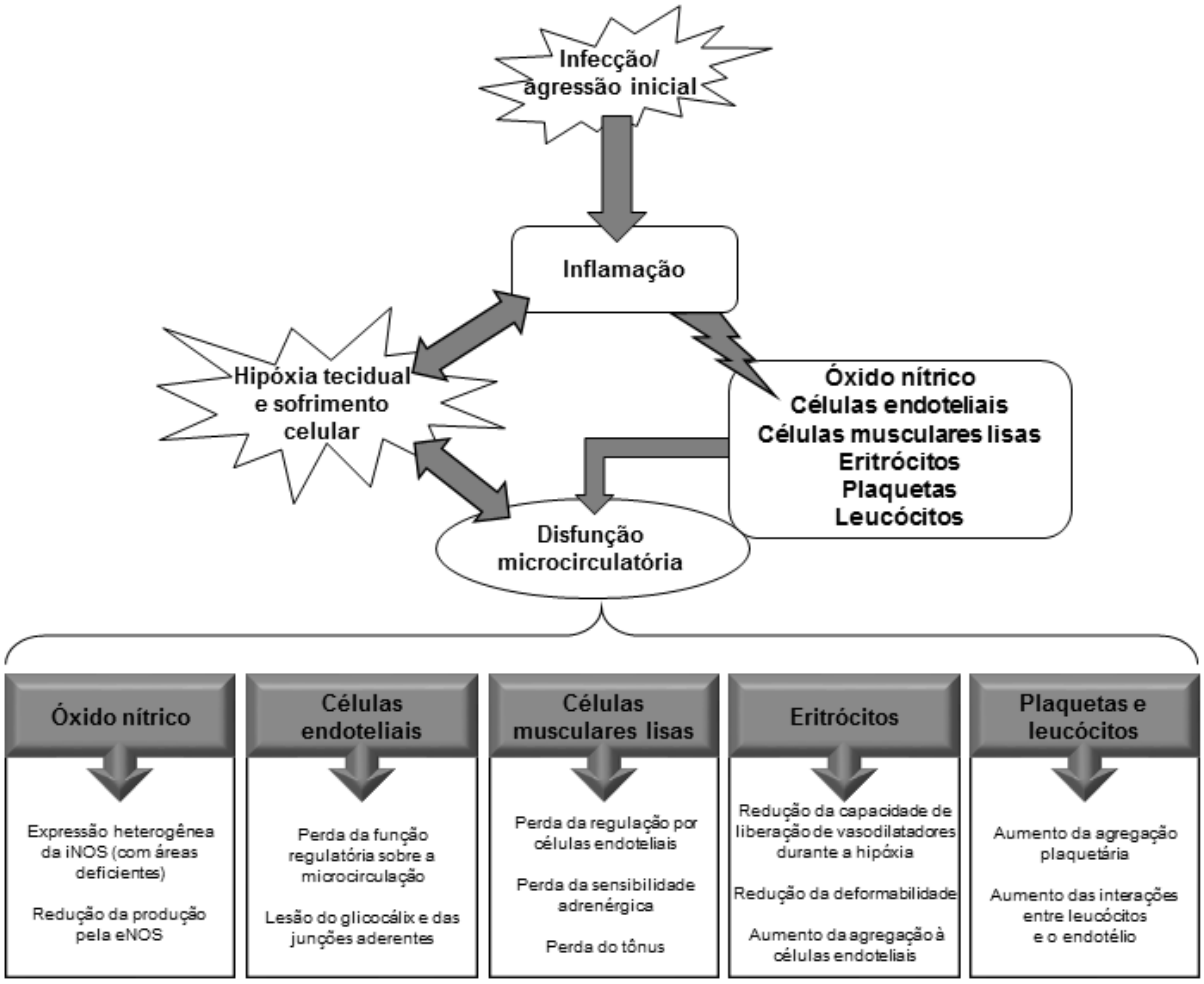
A microcirculação é composta por vasos com diâmetro médio inferior a 100 micrômetros (μm), ou seja, arteríolas, capilares, vênulas e microlinfáticos. É o principal sítio de liberação de oxigênio do sangue para os tecidos e funciona como um sistema integrado que garante a adequação da oferta tecidual de oxigênio à sua demanda celular. Os principais tipos celulares encontrados na microvasculatura são as células endoteliais (que revestem o interior dos vasos sanguíneos), células musculares lisas (presentes principalmente nas arteríolas), eritrócitos, leucócitos e plaquetas.[32] As células endoteliais desempenham um papel central no controle das funções da microcirculação, regulando a trombose e fibrinólise microvascular, a adesão e migração de leucócitos, o tônus vasomotor, o tráfego de células e nutrientes e a permeabilidade e recrutamento capilar.[46]

1.3.2 Fisiopatologia das alterações microcirculatórias associada à sepse

A distribuição local do fluxo sanguíneo para os tecidos é regulada pela microcirculação. Isto é possível porque, em condições fisiológicas, as células endoteliais são sensíveis a sinais metabólicos e físicos e respondem ajustando o fluxo microvascular através da liberação local de vasodilatadores capazes de modular o tônus da célula muscular lisa arteriolar, especialmente o óxido nítrico (NO). O NO é um ativador da enzima guanilato ciclase solúvel, responsável pela produção de guanosina monofosfato cíclico (cGMP), o mediador do relaxamento da célula muscular lisa. Por conseguinte, o NO é considerado um componente essencial para a manutenção e auto-regulação da homeostase e permeabilidade microvascular.[47,48]

Durante a sepse, sistema do NO é gravemente acometido: a enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) torna-se heterogeneamente expressa em diferentes leitos vasculares orgânicos, resultando em *shunt* patológico do fluxo sanguíneo microvascular (por meio de derivações arteriovenosas), desviando, inadequadamente, fluxo sanguíneo de unidades em sofrimento. Assim, áreas deficientes de iNOS, que são menos vasodilatadas, tornam-se hipoperfundidas.[48,49] Além disso, o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio durante a sepse interfere na formação de NO mediada pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e afeta o NO já formado, reduzindo ainda mais a sua concentração (Figura 2).[50]

Figura 2 – Fisiopatologia das alterações microcirculatórias associadas à sepse



Legenda: Diversos mecanismos foram implicados no desenvolvimento das alterações microvasculares associadas à sepse, como a desregulação do sistema do óxido nítrico e o comprometimento funcional de vários tipos celulares encontrados na microcirculação. eNOS: enzima óxido nítrico sintase endotelial; iNOS: enzima óxido nítrico sintase induzível.

Fonte: MIRANDA, 2016.

Além da desregulação do sistema do NO, a função de vários tipos celulares encontrados na microcirculação é comprometida na síndrome séptica.

As células endoteliais perdem a sua função reguladora, como consequência de alterações nas vias de transdução de sinal, perda da comunicação eletrofisiológica e perda do controle sobre as células musculares lisas arteriolares.[32,51,52,53] Além de perderem sua regulação por células endoteliais, as células musculares lisas arteriolares perdem sua sensibilidade adrenérgica e tônus, contribuindo para anormalidades perfusionais na microcirculação.[54,55] Esse comprometimento da reatividade vascular a estímulos parece ser secundário à excessiva produção de NO pela iNOS.[56]

Em condições fisiológicas, os eritrócitos atuam tanto como liberadores de oxigênio quanto como sensores dos gradientes locais desse gás, contribuindo para a auto-regulação da oferta tecidual de oxigênio e do fluxo sanguíneo microvascular.[57] A hemoglobina tem um papel ativo nesse processo, tendo em vista que o aumento dos gradientes locais de oxigênio induz alterações conformacionais na molécula de hemoglobina. Essa alteração de conformação facilita a liberação de nitrosotiol (um derivado do NO) e de trifosfato de adenosina (ATP) vasoativo, sinalizando a microvasculatura para vasodilatar.[58,59] Durante a sepse, os eritrócitos perdem sua capacidade de liberar vasodilatadores na presença de hipóxia, prejudicando um importante mecanismo fisiológico de regulação do fluxo sanguíneo microcirculatório.[33,59] Além disso, durante a sepse os eritrócitos tornam-se menos deformáveis e mais facilmente se aderem às células endoteliais, comprometendo o fluxo sanguíneo.[60,61,62]

A percentagem de neutrófilos ativados, com menor deformabilidade e maior agregabilidade, devido ao aumento da expressão de moléculas de adesão tanto em células endoteliais quanto em células do sistema imunológico, também está aumentada durante a sepse.[39,55,63] Estes leucócitos geram espécies reativas de oxigênio e outros mediadores inflamatórios que lesam diretamente estruturas microvasculares, como o glicocálix endotelial (uma complexa rede macromolecular envolvida em várias funções endoteliais).[64,65,66]

O estresse oxidativo resulta em mudanças na estrutura e fisiologia do glicocálix endotelial. A contínua degradação e descamação do glicocálix expõe as células endoteliais ao dano oxidativo, levando à perda de integridade das junções aderentes e aumento da permeabilidade paracelular, com subsequente compromisso da função

de barreira do endotélio.[67] Esse aumento da permeabilidade endotelial resulta em extravasamento de fluido a partir do espaço intravascular e em edema tecidual.[64,65,66] Por fim, o acúmulo de água nos tecidos leva à hipóxia tecidual devido ao aumento da distância de difusão do oxigênio entre capilares funcionais e células do tecido somado à baixa solubilidade e transporte desse gás na água presente nos tecidos.[68]

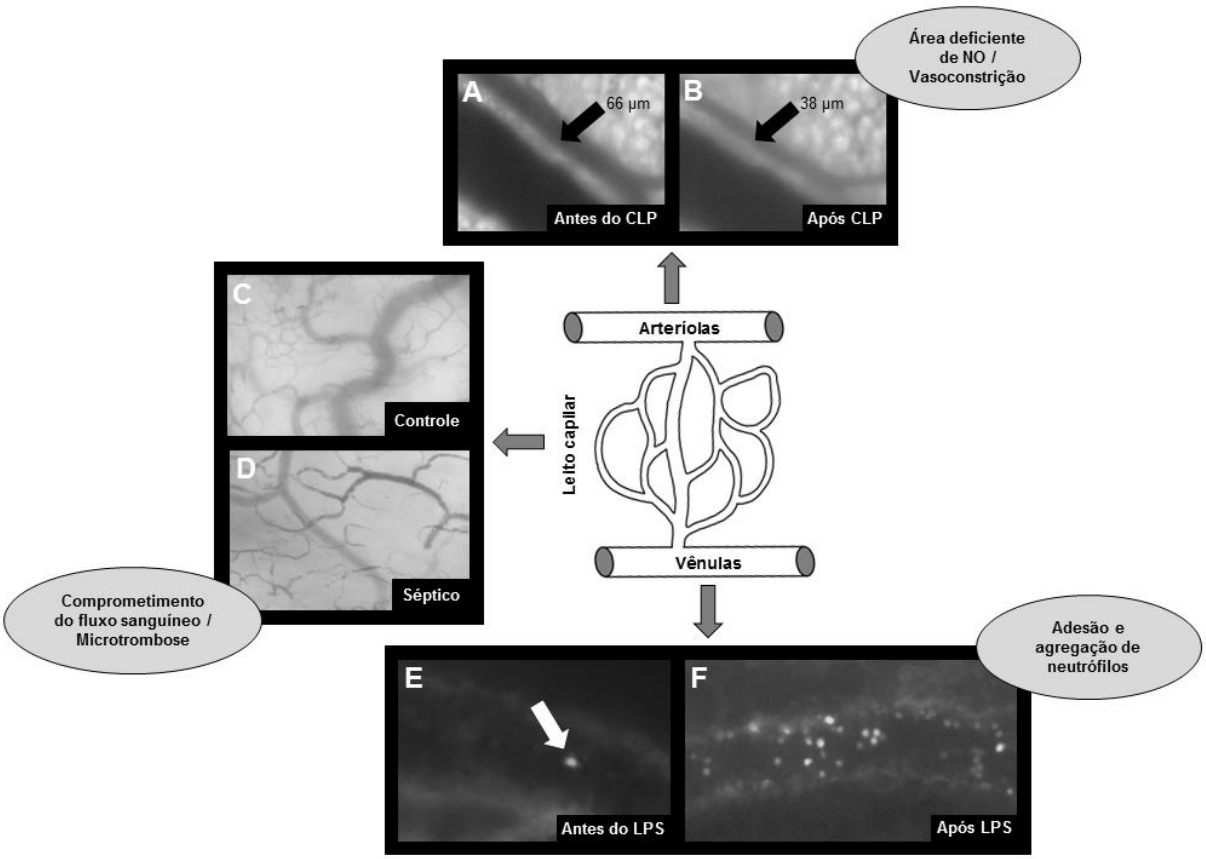
Durante a sepse, a degradação do glicocálix endotelial coincide com a disfunção microcirculatória e tem sido associada a várias condições clínicas relacionadas à sepse, incluindo lesão pulmonar aguda e disfunção cardiovascular.[67,69,70] Ainda mais importante, em pacientes em choque séptico, os níveis séricos de componentes do glicocálix são significativamente maiores em não sobreviventes do que nos sobreviventes, sugerindo que a descamação do glicocálix possa ter significado prognóstico na sepse humana.[69]

A lesão do glicocálix também contribui para maior expressão de moléculas de adesão, aumentando o tráfego de leucócitos, e para alterações na crase sanguínea em direção a um estado pró-coagulante.[71,72] O efeito pró-adesivo e pró-trombótico resultante estimula ainda mais a adesão de eritrócitos, plaquetas e leucócitos ao endotélio vascular, provocando microtrombose vascular, tamponamento capilar e maior comprometimento do fluxo capilar.[40,47,50,73,74,75] A ativação adicional de vias da coagulação resulta em obstrução capilar por agregados de plaquetas e coágulos de fibrina, formados secundariamente à coagulação intravascular disseminada, contribuindo para os distúrbios microcirculatórios.[40,47,76]

Em conjunto, todos os mecanismos anteriormente mencionados conduzem à redução do número de capilares perfundidos (Figura 3). A subsequente diminuição da densidade capilar funcional (número de capilares espontaneamente perfundidos por área de tecido analisada) resulta em aumento da distância de difusão do oxigênio para as células do parênquima circunjacente.[34,35,38,48] Assim, é razoável sugerir que transporte anormal de oxigênio aos tecidos e hipóxia tecidual podem advir do comprometimento da função microcirculatória encontrado na sepse. Favorecendo essa hipótese, Ellis e colaboradores[34] demonstraram que profunda má distribuição do fluxo sanguíneo microvascular ocorre em conjunto com alterações na extração de oxigênio em fases inicias da sepse experimental. Esses autores sugeriram que o comprometimento do transporte de oxigênio aos tecidos é, provavelmente, secundário à disfunção microcirculatória.[34] Em outro estudo experimental, Bateman e colaboradores[33] sugeriram que a perda da auto-regulação microvascular durante a

sepse desacopla a relação entre a oferta e a demanda local de oxigênio acarretando o aparecimento de regiões teciduais vulneráveis à hipóxia e incapazes de responder rapidamente a carência de oxigênio. Corroborando estes achados, demonstrou-se que, em condições experimentais, anormalidades microvasculares secundárias à sepse podem estar relacionadas à elevação de marcadores indiretos da hipóxia tecidual. Por exemplo, a heterogeneidade microvascular já foi associada a expressão do gene do fator induzível por hipóxia.[77] Além disso, a reversão de anormalidades microcirculatórias foi associada à melhoria proporcional dos níveis de lactato e NADH (nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido).[78,79] Por fim, modelos matemáticos de sepse experimental predizem que a redução da densidade capilar e o aumento da heterogeneidade de fluxo podem desempenhar papel na gênese da hipóxia tecidual, corroborando ainda mais o conceito de que a disfunção microcirculatória compromete a oxigenação dos tecidos.[80,81]

Figura 3 – Disfunção microcirculatória associada à sepse



Legenda: As alterações microcirculatórias asssociadas à sepse incluem o comprometimento da vasodilatação arteriolar induzida pelo óxido nítrico (NO) (A e B) e o aumento das interações entre leucócitos e o endotélio venular (E e F). Em conjunto, essas anormalidades contribuem para redução da densidade capilar funcional (C e D). A e B: microscopia intravital da câmara dorsal em hamster sírio dourado mostrando o diâmetro arteriolar antes (A) e depois (B) do

procedimento de ligadura e perfuração cecal (CLP) - diâmetro arteriolar caiu, quase pela metade, após CLP; C e D: fotomicrografia da microcirculação sublingual obtida pela técnica SDF (*sidestream dark field*) de paciente saudável (C - controle) e séptico (D) – o número de capilares perfundidos é consideravelmente menor no paciente séptico; E e F: microscopia intravital da câmara dorsal em hamster sírio dourado mostrando um único leucócito aderido à parede venular (E - seta branca) antes da administração de lipopolissacarídeo (LPS) e maciça adesão e agregação de leucócitos após a indução da endotoxemia.
Fonte: MIRANDA, 2016.

Além da disfunção microcirculatória, outros mecanismos a nível celular, como alterações metabólicas celulares, disfunção mitocondrial e apoptose desregulada, também ocorrem durante a sepse. Contudo, estas anormalidades celulares são consideradas respostas adaptativas tardias, podendo ser precedidas ou desencadeadas pela falência microcirculatória.[48,82] De fato, diversas evidências científicas sugerem que o surgimento de alterações microcirculatórias é o evento primário que conduz à disfunção celular, reforçando a importância da avaliação da microcirculação.[83] Por exemplo, Eipel e colaboradores[84] demonstraram que as anormalidades microvasculares são associadas à lesão celular durante a sepse experimental, conduzindo à apoptose. Em outro estudo experimental, Rosengarten e colaboradores[85] demonstraram que a disfunção microcirculatória precede distúrbios da função da célula neuronal induzidos pela sepse. Finalmente, estudos *in vitro* demonstraram que o NO inibe a respiração mitocondrial, reduzindo o consumo de oxigênio durante a sepse.[86,87,88] Esse achado suscita a hipótese de que a superprodução de NO induzida pela sepse (um elemento importante na fisiopatologia da disfunção microcirculatória) pode contribuir tanto para a hipóxia tecidual quanto para inibição mitocondrial.[57,86]

Caso não sejam corrigidos, a hipóxia tecidual, o acúmulo de metabólitos e a disfunção mitocondrial de células do parênquima desencadeiam uma cascata de mecanismos patogênicos que eventualmente leva à falência orgânica e à morte.[32,33] O processo subjacente que culmina na disfunção orgânica associada à sepse não é completamente compreendido, mas alterações microvasculares têm sido implicadas.[89] De fato, Doerschung e colaboradores[90] demonstraram que o comprometimento da reatividade microvascular está relacionado à disóxia tecidual e à disfunção de órgãos em pacientes sépticos. Sakr e colaboradores[44] também demonstraram a existência de associação entre as alterações microcirculatórias induzidas pela sepse e a disfunção orgânica em seres humanos. Ainda mais importante, a perfusão capilar foi relacionada à gravidade da falência orgânica após a

resolução do choque.[44] Ensaios clínicos posteriormente realizados corroboraram esses achados, demonstrando a existência de associação entre a gravidade da disfunção microvascular e o desenvolvimento de falência orgânica.[45,91,92] Todos estes estudos sugeriram a existência de uma conexão potencial entre as alterações da microcirculação e a falência de múltiplos órgãos relacionada à sepse. Entretanto, a simples associação estatística entre desfechos e distúrbios microcirculatórios não implica na existência de uma relação mecanicista. Na prática, uma relação de causa e efeito não pôde ser demonstrada até a presente data.[47]

A disfunção microcirculatória secundária à sepse é caracterizada pela heterogeneidade do fluxo sanguíneo, com alguns capilares sendo hipoperfundidos enquanto outros exibem fluxo de sangue normal ou, até mesmo, anormalmente elevado.[33,34,93,94] Algumas unidades microcirculatórias mais vulneráveis tornam-se hipóxicas, determinando o déficit de extração de oxigênio associado à sepse. Devido à heterogeneidade de perfusão microcirculatória, áreas de tecido hipóxico podem ser encontradas em estreita proximidade de outras melhor oxigenadas. Uma redução da capacidade de regulação da oferta local de oxigênio torna-se evidente, podendo contribuir ainda mais para o comprometimento da extração desse gás.[34,49,90,95]

Embora a disfunção microcirculatória possa ocorrer em diferentes graus na maioria das situações clínicas que levam ao choque circulatório, os mecanismos auto-reguladores da função microvascular são mais severamente comprometidos durante a sepse, indicando a disfunção microcirculatória como um marco fisiopatológico da síndrome séptica.[48,96]

1.3.3 Importância da avaliação das alterações microcirculatórias na sepse

Existe coerência hemodinâmica entre macro e a microcirculação quando intervenções terapêuticas adotadas para correção das variáveis hemodinâmicas sistêmicas também são eficazes na correção de parâmetros regionais e microcirculatórios.[68] A perda dessa coerência é frequentemente encontrada durante a sepse, quando o recrutamento microcirculatório é raramente observado, apesar de um tratamento adequado das anormalidades macro-hemodinâmicas.[44,68,92]

A disparidade entre a macro e a micro-hemodinâmica é explicada pela presença de *shunts* funcionais na microcirculação que "escondem" a disfunção microcirculatória da circulação sistêmica. A sepse é associada à desregulação da abertura desses *shunts*, pressionando a pressão parcial de oxigênio (pO_2) na microcirculação a um nível inferior àquele observado no sistema venoso, constituindo o "*pO_2 gap*" e determinando sofrimento tecidual, mesmo na presença de parâmetros hemodinâmicos sistêmicos adequados.[49] Esse defeito distributivo associado à sepse é caracterizado pela estagnação do fluxo sanguíneo capilar, reduzindo a densidade capilar funcional, na presença de fluxo praticamente normal em vasos sanguíneos microcirculatórios maiores.[32] Assim, a depressão do fluxo sanguíneo microvascular ocorre mais intensamente em vasos menores, afetando menor número de vasos maiores, o que explica, em parte, porque as variáveis hemodinâmicas sistêmicas não refletem, de forma confiável, as propriedades hemodinâmicas da microcirculação. Desta forma, mesmo quando o fluxo sanguíneo total para determinado órgão está preservado, podem ser encontrados tecidos hipóxicos, com grave déficit de extração de oxigênio.[97]

Além da heterogeneidade de fluxo sanguíneo, outras alterações microcirculatórias responsáveis pela perda da coerência hemodinâmica já foram identificadas, tais como anemia microvascular hemodilutional, estase do fluxo sanguíneo microcirculatório e aumento da permeabilidade capilar.[68] Essas alterações não podem ser detectadas por sistemas de monitorização hemodinâmica convencionais disponíveis na prática clínica. A simples monitorização da macrocirculação, falha na detecção de alterações nos parâmetros microcirculatórios e respostas aos tratamentos, tendo em vista que estes sistemas não avaliam eventos intrínsecos que ocorrem na microcirculação.[68,97]

Percebe-se que uma ferramenta diagnóstica confiável, capaz de avaliar a microcirculação é fundamental para o diagnóstico e tratamento da sepse. O método de monitorização ideal para uso em pacientes críticos deveria permitir a avaliação à beira do leito, além de ser capaz de avaliar o transporte local de oxigênio e alterações na permeabilidade vascular, resposta inflamatória e coagulação. Finalmente, o método deveria permitir a visualização direta e não invasiva das alterações microvasculares, como a redução da densidade capilar funcional, dos diâmetros vasculares e das velocidades de fluxo sanguíneo.[98] Infelizmente, não existe método único capaz de monitorizar todas estas funções relacionadas à microcirculação, sendo

comumente utilizado método de monitorização multimodal, englobando técnicas de videomicroscopia, biomarcadores, como o lactato, e exames laboratoriais abrangendo diversas funções orgânicas.

1.4 **Modelo Experimental para Avaliação da Microcirculação**

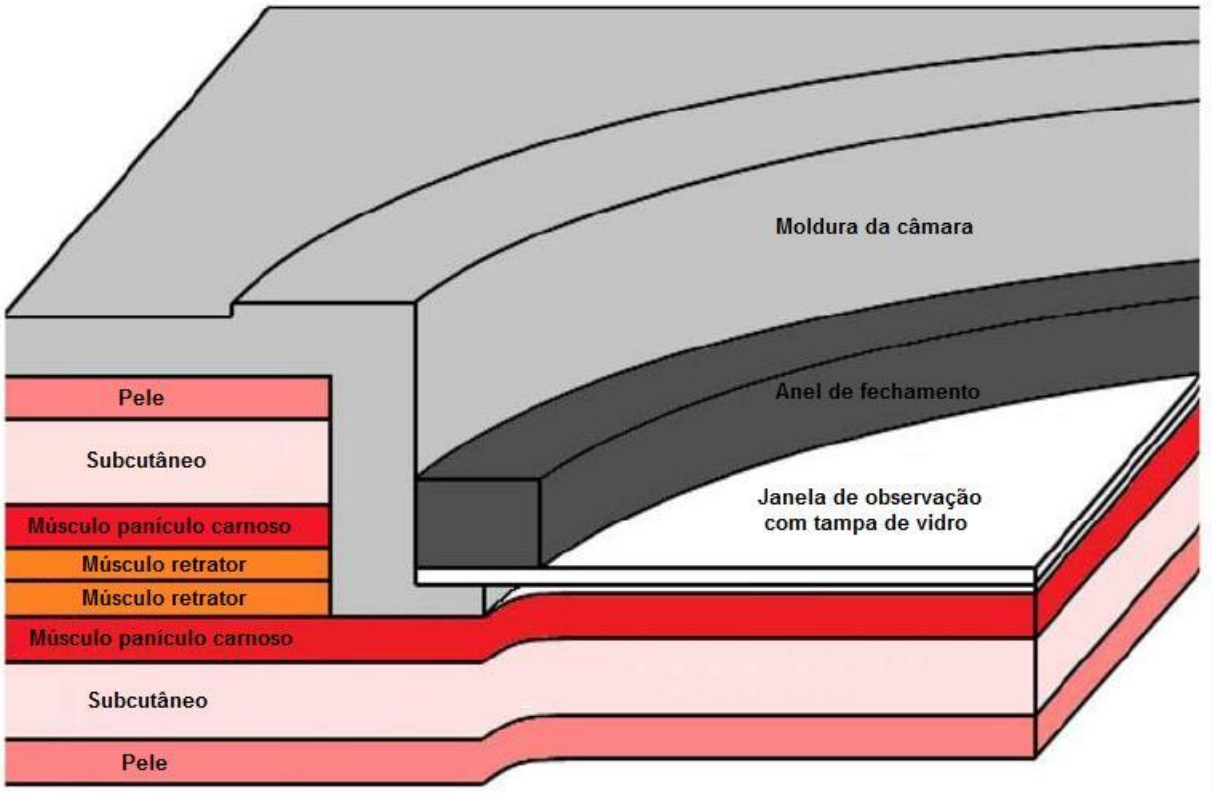
A microscopia intravital representa uma das técnicas de estudo da microcirculação, sendo seu uso possível tanto em animais saudáveis quanto em modelos experimentais de doenças. Embora a maioria das preparações utilizadas para a microscopia intravital seja de natureza aguda, a instalação de câmaras de microscopia em pregas de pele permite estudos com análises repetidas da microcirculação ao longo de um período de tempo mais prolongado. Estes modelos ditos crônicos já foram adaptados para estudos em algumas espécies de roedores como camundongos, ratos e hamsters, sendo a utilização do hamster preferida por razões anatômicas que facilitam a preparação microcirúrgica e melhoram a qualidade das imagens microscópicas.[99]

A utilização de câmara de microscopia instalada em prega de pele dorsal de hamsters, foi descrita por Endrich e colaboradores em 1980 e, desde então, foi utilizada em um número considerável de estudos experimentais versando sobre fisiologia da microcirculação, inflamação e sepse, isquemia e reperfusão e angiogênese, entre outros.[99]

No modelo da câmara dorsal, após a preparação microcirúrgica, restam uma camada de músculo estriado, o músculo panículo carnoso, e uma de pele e subcutâneo (Figura 4). Os vasos da microcirculação destas camadas são então examinados através da microscopia óptica. O modelo permite a quantificação de parâmetros micro-hemodinâmicos como a densidade capilar funcional, os diâmetros vasculares e a velocidade de fluxo das hemácias na microcirculação. Além disso, o modelo também permite, através do uso de microscopia de fluorescência com epi-iluminação associada à administração de rodamina 6G, o estudo da interação entre leucócitos e células endoteliais, através da quantificação de leucócitos rolantes e aderidos. Por fim, o extravasamento de macromoléculas, um marcador da perda da

integridade da barreira endotelial, pode ser determinado quantitativamente após a administração de dextrana marcada com isotiocianato de fluoresceína.[100,101]

Figura 4 – Desenho esquemático da câmara dorsal



Legenda: Desenho esquemático apresentando as diferentes camadas de tecido da prega cutânea e aquelas contidas na janela de observação.
Fonte: LASCHKE, 2011, f. 149.

O modelo permite que a instrumentação cirúrgica para o implante da câmara e as análises experimentais não ocorram no mesmo momento. Isto é importante para que as análises sejam realizadas em condições mais fisiológicas e não na fase aguda do trauma anestésico-cirúrgico. Para tanto, os animais devem se recuperar por no mínimo 48 a 72 horas a partir do trauma cirúrgico antes de se dar início aos experimentos. Este tempo permite plena recuperação do procedimento anestésico, além de também oferecer tempo para a melhora da resposta inflamatória inicial.[101]

Outra grande vantagem do modelo é permitir a observação *in vivo* das alterações microcirculatórias em um animal não anestesiado, visto que a própria anestesia afeta de maneira direta e indireta a microcirculação, sendo mais um fator de confundimento.[100]

Na fabricação da câmara é importante a sua indeformabilidade, sustentando o tecido e impedindo que este sofra alterações anatômicas que terminem por alterar a direção de fluxo e velocidade na microcirculação. Para tal, material metálico foi escolhido e pontos de fixação foram homogeneamente distribuídos.[102] Além disso, é necessário que os tecidos no interior da câmara não sejam afetados pelo próprio material da câmara implantada. Portanto, o material da câmara deve ser inerte do ponto de vista biológico. Originalmente foi utilizado o alumínio coberto com *Teflon S*, o que também oferecia baixo peso e baixa condutividade térmica. Atualmente, as câmaras são geralmente feitas de titânio (Figura 5), que apresenta propriedades melhoradas em relação àquelas das câmaras de alumínio e *Teflon S*.[101]

Figura 5 – Fotografia da câmara dorsal e do material utilizado para a fixação

Legenda: Fotografia da câmara de titânio e do material utilizado para a fixação de lamínula de vidro à câmara e para o implante da câmara na prega cutânea.
Fonte: APJ Trading Co Inc, 2016.

Após duas a três semanas, mesmo com o uso de materiais indeformáveis, a perda de elasticidade da prega de pele termina por comprometer a sustentação da câmara, que se inclina afetando a perfusão do tecido em avaliação. Desta forma, este intervalo de tempo é considerado a vida útil do modelo.[101]

1.5 **Controle da Frequência Cardíaca na Sepse**

Em fases precoces do choque séptico, uma avassaladora resposta inflamatória leva à vasodilatação e extravasamento capilar, alterando o débito cardíaco por

redução na pré-carga. Como resultado, estabelecem-se grave hipovolemia e hipotensão arterial, que desencadeiam ativação simpática maciça, em uma tentativa fisiológica de manter a perfusão orgânica. Essa ativação é tipicamente associada com elevação da frequência cardíaca e vasoconstrição, objetivando-se a compensação da vasodilatação sistêmica. Por conseguinte, a taquicardia observada na sepse é considerada o principal mecanismo compensatório utilizado pelo organismo para manter o débito cardíaco a despeito de redução da pré-carga.[103] Sendo assim, a maioria dos pacientes sépticos irá responder à ressuscitação volêmica com redução da frequência cardíaca, graças à preservação da atividade de baro e quimiorreceptores. Anemia, dor e agitação também podem contribuir para elevação da frequência cardíaca, no entanto, esses fatores são facilmente reconhecidos e tratados à beira do leito.[2,104]

Mesmo após a exclusão de hipovolemia e/ou outros fatores predisponentes, pacientes sépticos geralmente possuem uma frequência cardíaca elevada. Essa taquicardia é tipicamente resistente à ressuscitação volêmica agressiva, devido à presença de resposta cronotrópica alterada. Já o mecanismo fisiopatológico dessa disfunção cronotrópica está relacionado ao comprometimento do sistema nervoso autônomo, com alteração em interações orgânicas neuralmente mediadas. Como consequência, alguns pacientes em choque séptico sofrerão uma prolongada e exacerbada estimulação do sistema nervoso simpático, que excede a duração e o contexto de uma resposta compensatória benéfica, levando a diversos efeitos adversos, como a elevação da frequência cardíaca.[104,3]

A disfunção autonômica observada em pacientes sépticos é extremamente complexa, envolvendo tanto o componente simpático, quanto o parassimpático. Além de uma produção elevada de catecolaminas, já foi demonstrado que pacientes em choque séptico com elevação da frequência cardíaca possuem reduzida variabilidade dessa frequência, indicando importante atenuação do tônus vagal.[105] Entre os fatores responsáveis pelo comprometimento do sistema nervoso autônomo destacam-se mediadores inflamatórios e toxinas, ambos capazes de interferir com a neurotransmissão.[106]

Apesar do grande aumento da atividade simpática, a resposta adrenérgica se torna atenuada ao nível dos órgãos alvo. Esse comprometimento da resposta adrenérgica é mediado por citocinas e pelo NO, que causam regulação negativa de receptores alfa e beta-adrenérgicos e depressão de vias de sinalização pós-receptor.

A resposta adrenérgica é ainda mais atenuada pela ocorrência de apoptose neuronal em centros autonômicos cardiovasculares e inativação de catecolaminas por espécies reativas de oxigênio.[3,106] Assim, a regulação negativa de receptores alfa e beta-adrenérgicos é considerada um dos mecanismos mais importantes da disfunção cardiovascular da sepse, explicando inclusive a necessidade de, por vezes, altas doses de catecolaminas exógenas para manter a pressão arterial e débito cardíaco.[3] No entanto, a administração de doses incrementais de catecolaminas exógenas está por si só relacionada à piora da taquicardia e elevação do risco de taquiarritmias, fechando um círculo de prejuízos cardiovasculares.

A elevação patológica da frequência cardíaca também pode advir da estimulação de fibras aferentes simpáticas periféricas ativadas por sinais metabólicos gerados por isquemia ou inflamação em tecidos periféricos.[3,107] Além disso, o efeito estimulatório direto de endotoxinas e do próprio NO sobre o sistema marcapasso cardíaco também já foi demonstrado.[108,109]

O aumento da demanda de oxigênio secundário à taquicardia termina levando à isquemia, tendo em vista que a frequência cardíaca é um dos maiores determinantes do consumo miocárdico de oxigênio e da demanda metabólica. Em situações de desequilíbrio entre a oferta e o consumo de oxigênio, como a encontrada na sepse, isso se torna mais um contribuinte para a deterioração da performance miocárdica, agravando ainda mais o estado de falência da função cardíaca.[107] O aumento da resistência vascular periférica relacionado ao uso de vasoconstritores necessários à manutenção da pressão arterial média eleva ainda mais o trabalho cardíaco. Por fim, o volume sistólico cai em virtude de déficit de relaxamento ventricular secundário à redução da capacidade de captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático. Como resultado, a elevação da frequência cardíaca deixa de se associar a um aumento de débito cardíaco.[110]

A redução do tempo de duração da diástole é outro evento relacionado à taquicardia que contribui para a disfunção cardíaca. A elevação da frequência cardíaca reduz o tempo de perfusão coronariana diastólico e o tempo de enchimento ventricular, reduzindo a oferta miocárdica de oxigênio e a pré-carga/eficiência ventricular. Isso se torna crucial em pacientes sépticos com doença arterial coronariana oclusiva. Ademais, o déficit de relaxamento ventricular associado à taquicardia leva à elevação da pressão intraventricular diastólica, aumentado o estresse da parede miocárdica e podendo levar à compressão subendocárdica,

comprometendo ainda mais a perfusão dessa região. Pacientes com déficit de relaxamento prévio ao episódio séptico podem desenvolver disfunção cardíaca diastólica piorando o prognóstico.[3]

Considerando todas as alterações fisiopatológicas expostas, entende-se porque a elevação da frequência cardíaca é considerada fator de risco para aumento da mortalidade em pacientes em choque séptico.[2,111] Embora não exista consenso, na maioria dos estudos o ponto de corte na frequência cardíaca acima do qual houve aumento da mortalidade nesses pacientes é de 95 batimentos por minuto (bpm).[2] De fato, em estudo de Morelli e colaboradores[2], a presença de frequência cardíaca ≥ 95 bpm em paciente sépticos com necessidades progressivamente maiores de catecolaminas foi associada à mortalidade de 88%.

Infelizmente, a conclusão inicial de que a redução da frequência cardíaca poderia estar relacionada a melhores desfechos clínicos em pacientes em choque séptico, reduzindo o trabalho miocárdico e elevando a perfusão coronariana diastólica, pode não ser verdade. Apesar do extenso referencial teórico que embasa essa conduta e de alguns estudos demonstrando resposta benéfica, ainda existe dúvida se a presença de taquicardia é apenas um marcador biológico da gravidade e não uma causa direta de pior desfecho. Além disso, o momento correto de intervenção e a redução na frequência cardíaca a ser alcançada ainda não foram definidos.

Tendo em vista que o aumento da atividade simpática está envolvido na disfunção cronotrópica observada no choque séptico, os betabloqueadores foram postulados na literatura como droga de escolha para esses casos.[2] Seus efeitos benéficos poderiam se estender para além do simples controle da frequência cardíaca, atuando também na modulação da coagulação, metabolismo e inflamação.[112] Por outro lado, seu efeito depressor da contratilidade miocárdica levanta dúvidas sobre a segurança de seu uso em pacientes instáveis do ponto de vista hemodinâmico. Dessa forma, alguns autores começaram a questionar a possibilidade de uso de outra droga com ação cronotrópica negativa, mas isenta dos efeitos deletérios dos betabloqueadores, a ivabradina.[113,6]

1.6 **Ivabradina**

1.6.1 A despolarização da membrana celular no nodo sinoatrial e a corrente I_f

A despolarização da membrana celular de células do nodo sinoatrial é um processo voltagem dependente. Dessa forma, na fase 0 do potencial de ação (despolarização) canais de cálcio do tipo L se abrem ao ser atingido o limiar de despolarização, entre -40 e -65 mV (Figura 6). Durante a despolarização também se abrem canais de sódio, que são ativados em níveis de potenciais mais próximos de zero.[114,115]

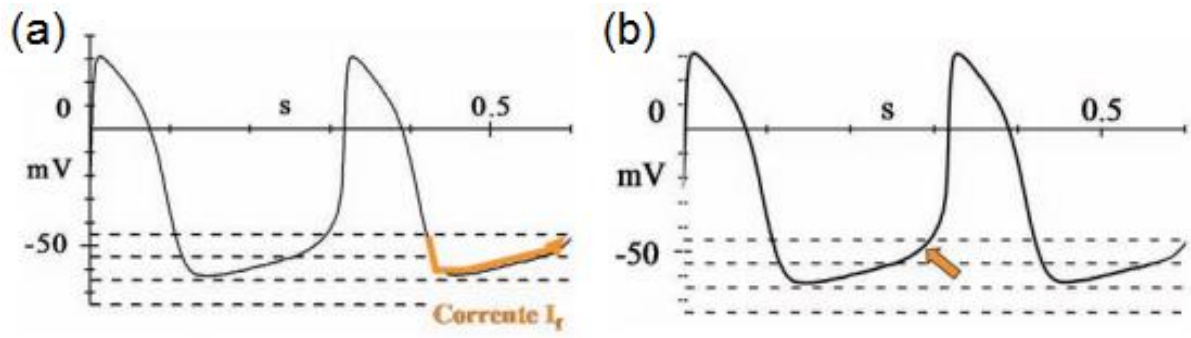
A fase 3 do potencial de ação (repolarização) é marcada pela ativação de diversos canais. Observa-se a entrada de potássio para o intracelular e a saída de sódio e cálcio para o extracelular, permitindo que o potencial de membrana celular retorne ao seu gradiente eletroquímico de repouso.[115]

Na fase 4 do potencial de ação (despolarização diastólica lenta) ocorre uma lenta e progressiva despolarização da membrana celular até que seja atingido novamente o limiar de despolarização, a partir do qual os canais de cálcio do tipo L novamente se ativam e a despolarização mais uma vez acontece (Figura 6). Curiosamente, a corrente responsável pelo evento espontâneo de despolarização da membrana é dependente de canais iônicos com correntes de sódio e potássio. Como as correntes de sódio são mais importantes na fase 0 de despolarização celular, a presença de uma corrente desse tipo na fase 4, ativada durante a hiperpolarização da membrana celular, fez com que ela fosse chamada de *funny*. E assim passou a ser conhecida como corrente I_f, I de corrente e f de *funny*. Diferentemente de outras correntes conhecidas, a corrente I_f ativa-se a partir de -40 a -45 mV e atinge o máximo de ativação entre -100 a -110 mV. É uma corrente de entrada de íons para o intracelular e sua velocidade de fluxo iônico aumenta, quanto mais negativa estiver a diferença de potencial da membrana.[114,115] Além da corrente I_f, uma corrente de entrada de cálcio (I_{Ca}) e outra de saída de potássio (I_k) também se encontram ativas durante a despolarização diastólica lenta.[116]

Ressalta-se que a despolarização espontânea da membrana celular de células do nodo sinoatrial durante a fase 4 do potencial de ação permite que essas células

tenham a capacidade de determinar a frequência cardíaca, funcionando como um marcapasso natural do coração.

Figura 6 – A despolarização da membrana celular no nodo sinoatrial e a corrente I_f



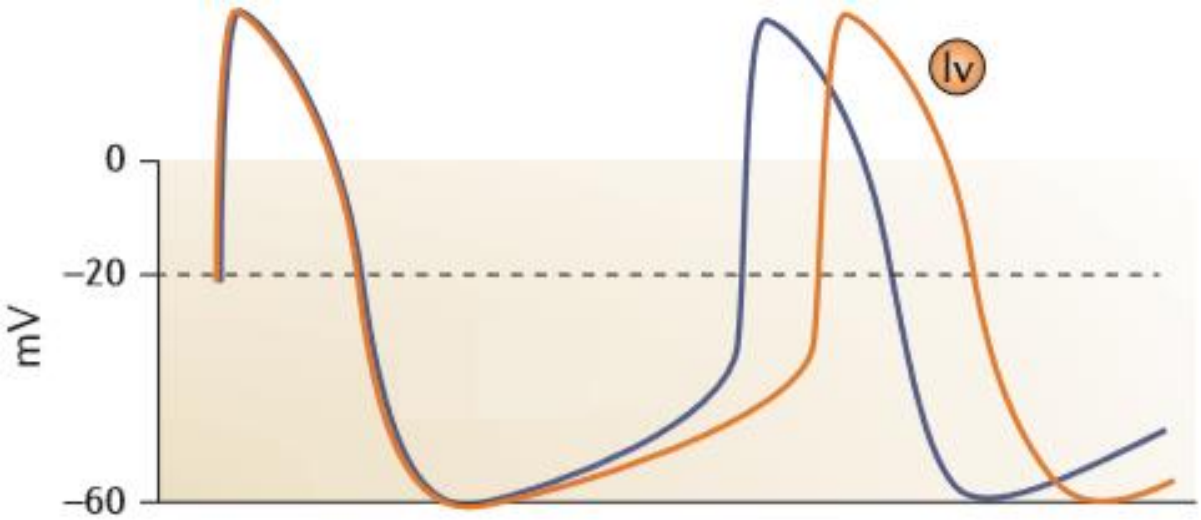
Legenda: (a) - na fase 4 do potencial de ação (despolarização diastólica lenta) ocorre uma lenta e progressiva despolarização da membrana celular (marcada em laranja) dependente da ativação da corrente I_f, até que seja atingido o limiar de despolarização; (b) - a fase 0 do potencial de ação (despolarização) tem início quando o limiar de despolarização, indicado pela seta laranja, é atingido.
Fonte: CÉSAR, 2007, f. e99.

1.6.2 Bloqueio da corrente I_f

Os canais responsáveis pela corrente I_f (ou canais *f*) foram identificados pelo acrônimo HCN (*Hyperpolarization activated Cyclic Nucleotide*), sendo conhecidas quatro isoformas (HCN 1-4). Entre as quatro isoformas, a HCN4 é a mais encontrada no nodo sinoatrial. O bloqueio desses canais é capaz de reduzir a frequência de despolarização da membrana celular das células do nodo sinoatrial e, portanto, a frequência cardíaca, sendo alvo potencial para ação farmacológica (Figura 7).[115,116]

De uma forma geral, as drogas disponíveis para controle da frequência cardíaca, como antagonistas de canais de cálcio e betabloqueadores, não são seletivos quanto à ação, agindo em outros sítios cardíacos e extra cardíacos, podendo resultar em efeitos colaterais indesejáveis. O entendimento da importância dos canais *f* para a geração e controle do ritmo cardíaco levou à procura de drogas capazes de controlar a função destes canais, reduzindo a frequência cardíaca, sem alterar outras funções cardíacas, como a contratilidade ventricular.

Figura 7 – Bloqueio da corrente I_f pela ivabradina



Legenda: Observa-se uma curva de potencial de ação sob o efeito da ivabradina (curva laranja), com evidente redução da ascensão dessa quando comparada com a esperada (curva azul). O bloqueio dos canais *f* pela ivabradina é capaz de reduzir a frequência de despolarização da membrana celular das células do nodo sinoatrial e, portanto, a frequência cardíaca. Iv, tratamento com ivabradina.
Fonte: POSTEA, 2011, f. 907.

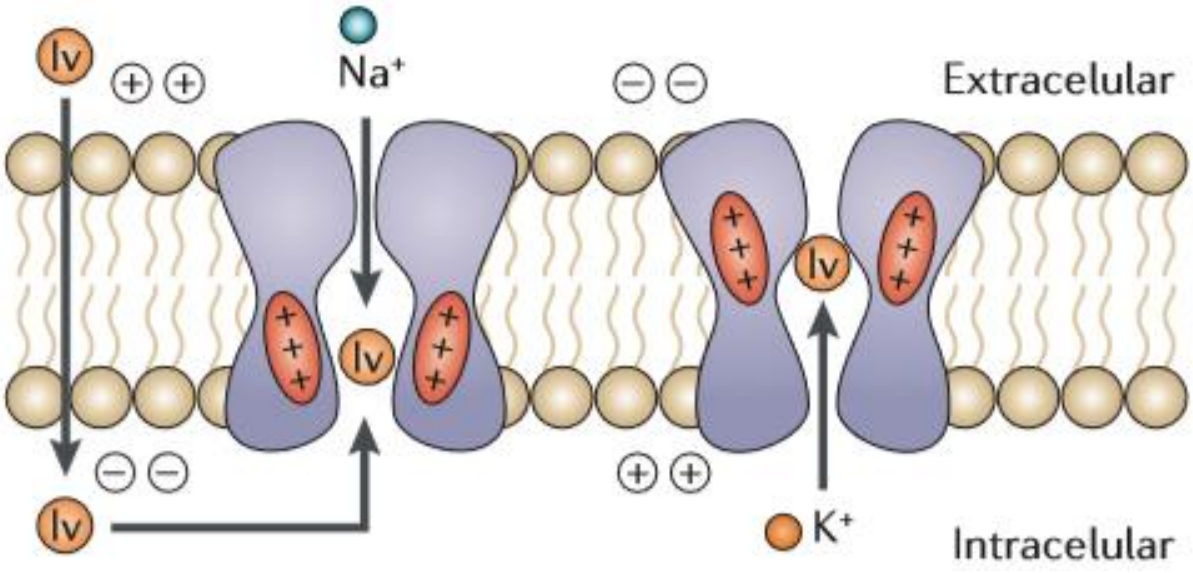
O precursor dessa nova classe de drogas redutoras da frequência cardíaca foi a alinidina, um derivado da clonidina com ação seletiva em canais *f*, mas inúmeros efeitos colaterais. A partir daí, análogos do verapamil, como o falipamil, a zatebradina e a cilobradina foram sintetizados com melhor perfil de controle da frequência cardíaca e de segurança, sendo a zatebradina mais intensamente estudada.[116]

Modificações químicas da molécula de zatebradina resultaram na síntese da ivabradina, uma droga com maior seletividade pelos canais *f* que suas predecessoras, necessitando de menor concentração para promover seu efeito de redução da frequência cardíaca. Além disso, o bloqueio dos canais *f* exercido pela ivabradina é capaz de modificar a condutância desses canais sem alterar propriedades biofísicas do poro e de estruturas circunjacentes, como canais voltagem dependentes. Essa especificidade de ação faz com que a ivabradina não apresente efeitos inotrópicos, nem qualquer outro efeito sistêmico hemodinâmico. Não há interferência da ivabradina sobre o aumento natural do débito cardíaco e da contratilidade durante exercício, e nem há alteração da capacidade de vasodilatação coronariana, diferentemente dos betabloqueadores.[114,115,116] A condução atrioventricular e a repolarização ventricular também não são afetadas pela ivabradina.[113]

Como a corrente I_f é apenas um dos determinantes da atividade marcapasso cardíaca, mesmo o seu completo bloqueio é capaz de reduzir a frequência cardíaca em até 20-30%. Esse efeito teto contribui para o perfil de segurança e ampla janela terapêutica da droga, evitando episódios de bradicardia sintomática.[116,117] Por sinal, a ivabradina é normalmente muito bem tolerada, sendo o efeito adverso mais comum relacionado a sintomas visuais transitórios, dose-dependentes e reversíveis. A alteração visual reportada em pacientes usuários de ivabradina está relacionada à presença de canais HCN na retina.[113,118]

De forma interessante, a intensidade do bloqueio dos canais *f* promovida pela ivabradina, varia com o potencial de membrana: o bloqueio é maior em voltagens mais negativas, exatamente quando é maior a corrente de influxo de íons, fazendo com que a capacidade de redução da frequência seja maior quando essa é maior, e vice-versa. Também está demonstrado que a ivabradina age na parte interna da membrana (Figura 8). Dessa forma, o bloqueio acontece somente quando os canais *f* estão abertos. Essa peculiaridade permite à ivabradina exercer maior efeito farmacológico em situações clínicas que cursam com elevação da frequência cardíaca.[115]

Figura 8 – Ação da ivabradina sobre os canais *f*



Legenda: A ivabradina penetra no poro dos canais *f* a partir da parte interna (intracelular) da membrana celular quando os canais se encontram no estado aberto (lado esquerdo da figura). Quando os potenciais de membrana se tornam mais positivos que -20 mV, as correntes iônicas mediadas por canais *f* são representadas principalmente por K^+ (potássio), tendo a direção do meio extracelular. As correntes iônicas de saída conduzem a ivabradina ao poro do canal, onde ela se liga firmemente ao seu sítio de ligação (lado direito da figura). Na^+, sódio; Iv, ivabradina.

Fonte: POSTEA, 2011, f. 907.

O efeito seletivo da ivabradina sobre os canais *f* despertou interesse para o seu uso em humanos, principalmente em situações clínicas onde a redução da frequência cardíaca é reconhecida como um objetivo terapêutico. O uso dessa droga na doença coronariana e na insuficiência cardíaca já foi extensamente estudado, possuindo indicações formais e aprovação por órgãos de controle competentes.[115,116]

1.6.3 Ivabradina na sepse

Diversos autores apontaram a ivabradina como uma alternativa terapêutica a ser utilizada em situações clínicas onde o uso de outras drogas com ação cronotrópica negativa é contraindicado ou demasiadamente perigoso, como em pacientes críticos instáveis do ponto de vista hemodinâmico.[113,119,6,120] Nesses casos, a ivabradina poderia dirimir os efeitos adversos relacionados à frequência cardíaca elevada, reduzindo o consumo miocárdico de oxigênio, elevando a perfusão coronariana diastólica e agindo beneficamente na relação força-frequência do coração em falência.[113]

Diferentemente daquilo que é observado com o uso de betabloqueadores e bloqueadores de canais de cálcio, o bloqueio dos canais *f* preserva a contratilidade miocárdica e o controle da reatividade vascular pelo sistema nervoso autônomo. Dessa forma, a ivabradina não interfere com a pressão sanguínea, resistência vascular periférica e coronariana e atividade miocárdica, não havendo qualquer efeito inotrópico negativo sobre o tecido miocárdico.[113,118,121]

O uso da ivabradina em pacientes sépticos ganhou novo impulso após a observação *in vitro* da existência de sensibilização dos canais HCN à estimulação simpática pela ação direta da endotoxina, elevando inapropriadamente a frequência cardíaca e reduzindo a sua variabilidade, ambos fatores de mau prognóstico na sepse.[122,123,124] Além disso, a corrente I_f também pode ser estimulada pela superprodução miocárdica de NO, comum no choque séptico.[109]

Além de seus efeitos sobre a frequência cardíaca, a ivabradina já demonstrou propriedades pleiotrópicas interessantes para seu uso durante a sepse, reduzindo o estresse oxidativo vascular e melhorando a função endotelial em modelos animais.[125,7,8] Com essas características, a ivabradina poderia prevenir a disfunção

endotelial secundária à sepse, revertendo as alterações microcirculatórias e melhorando a perfusão tissular. Ademais, a ivabradina preserva a vasodilatação mediada pelo endotélio em resposta ao estresse de cisalhamento, o que significa que as células endoteliais de sujeitos tratados com ivabradina são capazes de responder às forças físicas decorrentes da elevação do fluxo sanguíneo (como ocorre após ressuscitação volêmica) com aumento da produção, liberação e/ou atividade de fatores ligados à vasodilatação, como a óxido nítrico sintase endotelial.[126,127]

A ivabradina já foi utilizada com sucesso em séries de casos de pacientes sépticos com disfunção de múltiplos órgãos. Nesses pacientes, observou-se melhora hemodinâmica, com redução da dose de noradrenalina, e metabólica, com redução do lactato e recuperação do excesso de base, após a introdução da ivabradina.[6,120] O bloqueio de canais *f* também já foi utilizado em pacientes críticos com intuito de mitigar efeitos colaterais de outras drogas. Em um relato de caso de paciente com disfunção cardíaca aguda e taquicardia sinusal induzida pelo uso de dobutamina, a associação de ivabradina resultou na redução da frequência cardíaca e melhora hemodinâmica.[128]

A via de administração se constitui em um possível obstáculo ao uso da ivabradina em pacientes críticos. Atualmente a droga é disponível comercialmente apenas para administração oral, o que torna o seu nível plasmático errático e imprevisível, principalmente em pacientes instáveis hemodinamicamente ou com disfunção do trato gastrointestinal.[113] No entanto, o uso intravenoso da droga já foi testado com sucesso e segurança em humanos.[129]

Apesar de todo embasamento teórico e da existência de alguns estudos não controlados demonstrando efeitos benéficos da terapia com ivabradina em paciente sépticos, esse uso ainda é considerado *off-label* e experimental, carecendo de pesquisas com melhor qualidade metodológica. O primeiro grande estudo versando sobre o assunto foi o MODI (f)Y, uma pesquisa clínica de fase II que randomizou seu primeiro paciente em maio de 2010, mas até o momento não divulgou qualquer resultado.[120]

2 **OBJETIVOS**

2.1 **Objetivos Gerais**

Foram objetivos gerais do presente estudo:

a) Determinar os efeitos da ivabradina sobre as alterações microcirculatórias secundárias à sepse em hamsters sírios dourados submetidos ao modelo experimental de sepse por CLP e ressuscitados volemicamente (desfecho primário);
b) Determinar os efeitos da ivabradina sobre variáveis macro-hemodinâmicas, função orgânica e parâmetros laboratoriais metabólicos e perfusionais em hamsters sírios dourados submetidos ao modelo experimental de sepse por CLP e ressuscitados volemicamente (desfecho secundário).

2.2 **Objetivos Específicos**

Foram objetivos específicos do presente estudo:

a) Determinar os efeitos da ivabradina sobre variáveis anatomofuncionais da microcirculação (densidade capilar funcional, diâmetros microvasculares e velocidades de fluxo sanguíneo arteriolar e capilar) em hamsters sírios dourados submetidos ao modelo experimental de sepse por CLP e ressuscitados volemicamente;
b) Determinar os efeitos da ivabradina sobre variáveis macro-hemodinâmicas (frequência cardíaca e pressão arterial média) em hamsters sírios dourados submetidos ao modelo experimental de sepse por CLP e ressuscitados volemicamente;
c) Determinar os efeitos da ivabradina sobre as funções orgânicas incluídas no escore SOFA (respiratória, cardiovascular, neurológica,

hepática, renal e coagulação) em hamsters sírios dourados submetidos ao modelo experimental de sepse por CLP e ressuscitados volemicamente;

d) Determinar os efeitos da ivabradina sobre parâmetros laboratoriais metabólicos e perfusionais (glicemia, lactato e gasometria arterial) em hamsters sírios dourados submetidos ao modelo experimental de sepse por CLP e ressuscitados volemicamente.

3 **MATERIAL E MÉTODOS**

3.1 **Considerações Éticas**

A pesquisa foi realizada em laboratório que dispõe de meios e recursos para a manutenção de animais de forma a minimizar o sofrimento causado pela vida em cativeiro.

Os pesquisadores responsáveis por este projeto já possuíam experiência prévia no cuidado humanizado com animais e a pesquisa foi desenvolvida seguindo o "princípio dos três Rs de Russell e Burch" (apud Baumans[130]): *replacement*, *reduction* e *refinement*.

O uso de animais na pesquisa seguiu atentamente os princípios éticos e legais da experimentação animal.[131,132] Os modelos experimentais utilizados foram submetidos à apreciação da Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais (CEUA) do Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e aprovados (Protocolo número CEUA/021/2015, Anexo).

3.2 **Animais e Grupos**

Foram incluídos na pesquisa hamsters Sírios dourados (*Mesocricetus auratus*), machos, provenientes da empresa ANILAB, Animais de Laboratório (São Paulo, Brasil), que atenderam a exigência de pesar entre 120 e 150 gramas (g) no momento da sua inclusão no estudo. Esses animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Pesquisas Clínicas e Experimentais em Biologia Vascular da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (BioVasc-UERJ).

Após a inclusão, foram excluídos da pesquisa e da análise de dados os animais que apresentaram uma das seguintes características:

a) presença de extensa mancha cutânea dorsal localizada no sítio de implante da câmara, capaz de reduzir a transparência do tecido e, portanto, inviabilizar a microscopia intravital;
b) visualização de sangramento ativo ou prévio na câmara ou inflamação da mesma após o seu implante;
c) animais que em qualquer momento apresentaram complicações relacionadas à anestesia intraperitoneal, cateterização vascular ou laparotomia.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, 28 hamsters foram alocados em quatro grupos experimentais da seguinte forma:

a) grupo *SHAM*: sete hamsters previamente submetidos ao preparo da câmara dorsal, cateterização vascular e instalação de eletrodos cutâneos. Após as avaliações *baseline*, os animais foram submetidos à procedimento cirúrgico controle (sem indução de sepse; *sham*). Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais desse grupo foram ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% (cloreto de sódio a 0,9% [NaCl 0,9%]) e, em seguida, infundidos por quatro horas com salina a 0,9%;
b) grupo CLP-SALINA: sete hamsters previamente submetidos ao preparo da câmara dorsal, cateterização vascular e instalação de eletrodos cutâneos. Após as avaliações *baseline*, os animais foram submetidos à ligadura e perfuração cecal (indução de sepse). Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais desse grupo foram ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e, em seguida, infundidos por quatro horas com salina a 0,9%;
c) grupo CLP-IVABRADINA: sete hamsters previamente submetidos ao preparo da câmara dorsal, cateterização vascular e instalação de eletrodos cutâneos. Após as avaliações *baseline*, os animais foram submetidos à ligadura e perfuração cecal (indução de sepse). Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais desse grupo foram tratados com ivabradina (dose bolus de 2,0 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal), ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e, em seguida,

infundidos por quatro horas com solução de ivabradina (dose de manutenção de 0,5 $mg.kg^{-1}.h^{-1}$);

d) grupo CLP-CONTROLE: sete hamsters previamente submetidos ao preparo da câmara dorsal, cateterização vascular e instalação de eletrodos cutâneos. Após as avaliações *baseline*, os animais foram submetidos à ligadura e perfuração cecal (indução de sepse). Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais desse grupo foram submetidos a um protocolo experimental parcial, não sendo ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% ou infundidos por quatro horas com ivabradina ou salina a 0,9%.

Os grupos experimentais foram constituídos sequencialmente seguindo a ordem apresentada nas alíneas anteriores. Dessa forma, a alocação dos animais nos grupos foi realizada por conveniência.

O estudo foi desenvolvido no BioVasc-UERJ. Este laboratório possui biotério com estrutura adequada para a realização de pesquisas experimentais, permitindo que os animais sejam mantidos em ambiente com temperatura controlada (21,0±1,0 ºC), em ciclos de luz/escuridão de 12 horas controlados por temporizador.

Após a inclusão no estudo, todos os animais foram mantidos em gaiolas individuais, alimentados com ração padrão para a espécie (NUVILAB CR1, Quimtia, Brasil) e receberam água filtrada *ad libitum* até o início de cada etapa de intervenção experimental (sem período de jejum pré-operatório).

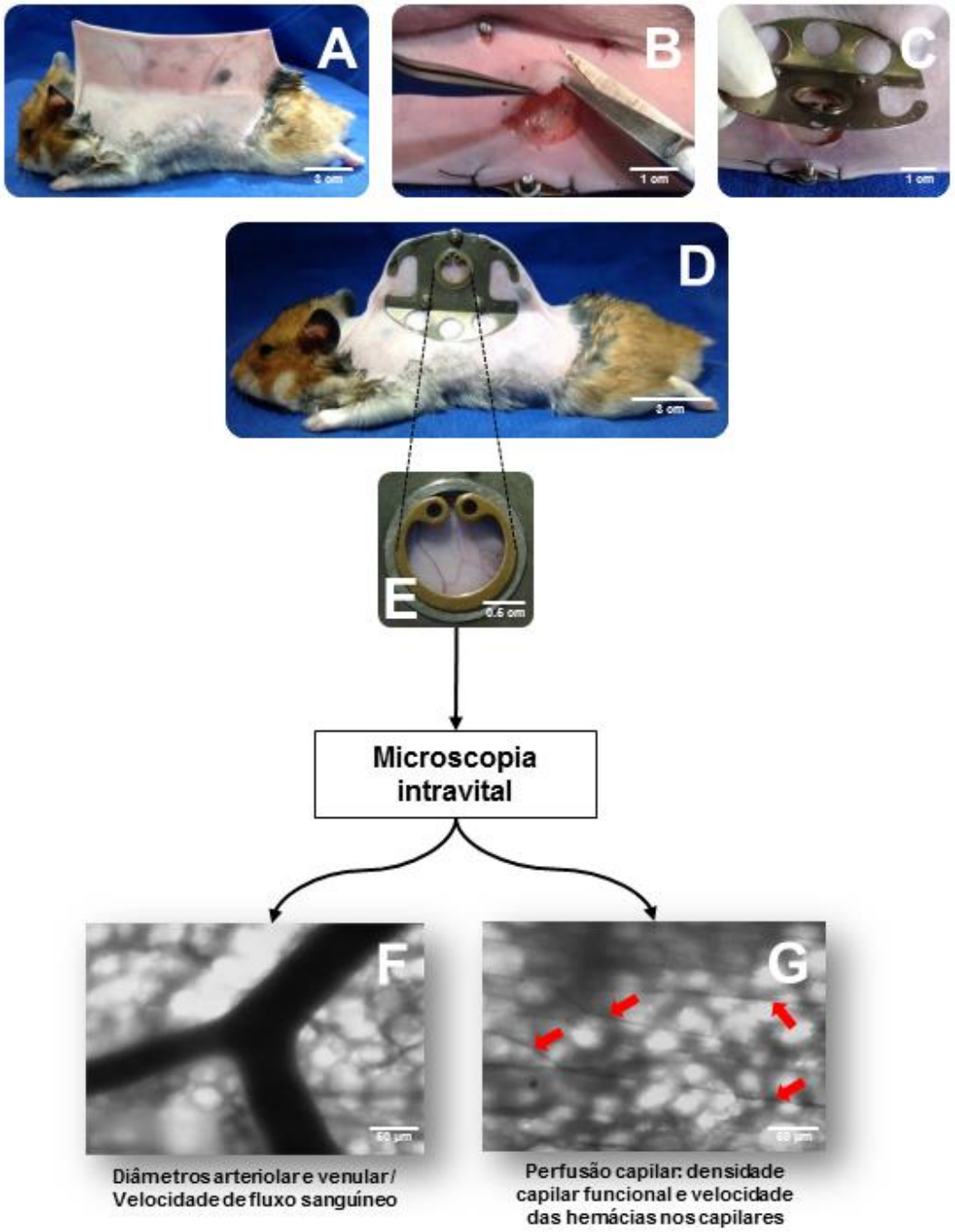
3.3 **Procedimentos Cirúrgicos Iniciais – Implante da Câmara Dorsal, Cateterização Vascular e Implante de Eletrodos**

Após a inclusão no estudo, todos os animais foram anestesiados através de injeção intraperitoneal de 100 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal de cetamina (Dopalen 10%, Ceva Santé Animale, Brasil) associados à 20 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal de xilazina (Anasedan 2%, Ceva Santé Animale, Brasil) para a remoção do pelo do dorso com tosqueador e aplicação de creme depilatório. Constatada a ausência de extensa

mancha cutânea dorsal, era implantada, com técnica cirúrgica asséptica, placa de titânio com lamínula de vidro no dorso do animal (câmara dorsal).

Para o implante da câmara dorsal foi utilizada técnica cirúrgica experimental previamente descrita por Endrich e colaboradores (apud Miranda[39]; Figura 9).

Figura 9 – Implante da câmara dorsal



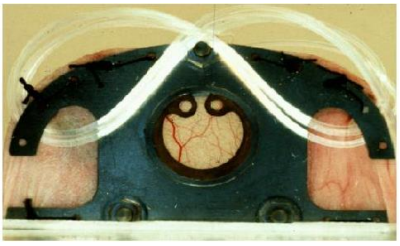
Legenda: Fotografias e fotomicrografias ilustrando algumas etapas da microdissecção da prega de pele (A, B e C), o aspecto final da câmara dorsal e da janela de visualização (D e E) e exemplos de imagens e parâmetros obtidos pela microscopia intravital (F e G). Em G, as setas vermelhas indicam capilares funcionantes.

Fonte: MIRANDA, 2015, f. 621.

Resumidamente, uma prega com duas camadas de pele era estendida (Figura 9 A) e uma placa de titânio era fixada por fios e parafusos à camada posterior de pele da prega; na camada anterior uma área circular de 15 mm de diâmetro era dissecada microcirurgicamente (Figura 9 B) de forma a deixar na prega apenas uma camada de pele, subcutâneo e músculo estriado (todas pertencentes à camada posterior da prega de pele). Terminada a microdissecção, uma segunda placa de titânio contendo uma lamínula de vidro (janela de visualização) era fixada (Figura 9 C). Após despertar da anestesia, os animais eram devolvidos ao biotério onde permaneciam em gaiolas individuais por mais sete dias.

Ao final do período de seis dias, a qualidade da preparação da câmara dorsal era avaliada em todos os animais, sendo excluídos aqueles que preenchessem os critérios de exclusão pré-definidos. Constatada a boa qualidade da preparação, o animal era novamente anestesiado através de injeção intraperitoneal de 100 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal de cetamina (Dopalen 10%, Ceva Santé Animale, Brasil) associados à 20 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal de xilazina (Anasedan 2%, Ceva Santé Animale, Brasil) para a remoção do pelo da região cervical anterior por aplicação de creme depilatório e para a dissecção microcirúrgica dos vasos cervicais. Com auxílio de microscópio cirúrgico (Leica M651, Leica Microsystems, Alemanha), eram canuladas, com cateter de polietileno, a artéria carótida esquerda (cateter PE10 com diâmetro interno de 0,28 mm e externo de 0,61 mm, BD Intramedic, EUA) e a veia jugular interna esquerda (cateter PE50 com diâmetro interno de 0,58 mm e externo de 0,965 mm, BD Intramedic, EUA). Após a canulação, os cateteres eram preenchidos com solução de heparina (na concentração de 40 unidades internacionais por mililitro [$UI.ml^{-1}$]), exteriorizados por contra-abertura no dorso do animal e, após o fechamento da pele da região cervical anterior, eram fixados à câmara dorsal, como apresentado na figura 10.

Figura 10 – Fixação dos cateteres à câmara dorsal



Legenda: Fotografia mostrando o detalhe da fixação dos cateteres de polietileno à câmara dorsal.
Fonte: Universidade da Califórnia, San Diego, 2016.

A veia jugular interna foi canulada a fim de ser utilizada para a infusão de solução salina a 0,9% e de ivabradina. A artéria carótida foi canulada para a monitorização contínua de parâmetros macro-hemodinâmicos e para a coleta de sangue arterial.

Terminada a cateterização vascular, três eletrodos metálicos eram implantados subcutaneamente no dorso dos animais, em bom contato com o músculo subjacente, para a realização de eletrocardiograma de superfície; dois eletrodos eram implantados próximos às patas dianteiras e um próximo à pata traseira esquerda.

Após despertar da anestesia, os animais eram mais uma vez devolvidos ao biotério onde permaneciam em gaiolas individuais por mais 24 horas com acesso irrestrito à água e ração.

3.4 **Preparação para o Experimento – Avaliação do Escore de Atividade, Monitorização dos Sinais Vitais e Acomodação no Microscópio**

Vinte e quatro horas após a cateterização vascular e implante de eletrodos, todos os animais eram submetidos à avaliação de parâmetros macro-hemodinâmicos (frequência cardíaca e pressão arterial média) e microcirculatórios basais (*baseline*). Além desses parâmetros, nesse momento também era realizada a avaliação basal do escore de atividade.

3.4.1 Avaliação do escore de atividade

Para avaliação do escore de atividade, todos os animais foram avaliados no período da manhã, utilizando-se uma escala de avaliação validada para o uso em roedores.[133] Resumidamente, os hamsters eram acomodados individualmente em caixa plástica de 15x30x15cm dotada de tampa transparente e forrada com maravalha. Após período de adaptação de cinco minutos dos animais ao novo ambiente, um observador treinado avaliava a presença ou ausência de indicadores de atividade, como abertura ou fechamento dos olhos, posição da cabeça, adoção de

posturas anormais para a espécie, alterações da mobilidade dos membros e atenção em relação ao ambiente.

A avaliação destes indicadores permitiu que o nível de atividade dos animais fosse determinado de acordo com uma escala ordinal: 5 - animais engajados em movimentos de locomoção e higienização do pelo, apresentando movimentação frequente da cabeça e adoção espontânea da posição em pé (sobre as patas traseiras); 4 – animais com olhos totalmente abertos, cabeça erguida e postura normal, apresentando mínima presença ou ausência de movimentos de locomoção e de higienização do pelo e mínima presença ou ausência de adoção espontânea da posição em pé (sobre as patas traseiras); 3 – animais com olhos parcialmente fechados e cabeça ligeiramente abaixada, apresentando comprometimento da locomoção com a presença de movimentos por arrasto, tropeços, postura anormal e/ou uso de apenas alguns membros; 2 – animais com olhos parcialmente fechados, cabeça quase totalmente ou totalmente abaixada, postura achatada e ausência de movimentos espontâneos; 1 – animais com olhos quase inteiramente fechados e perda do reflexo de rotação; 0 – animais “dormindo” com os olhos totalmente fechados e corpo relaxado.

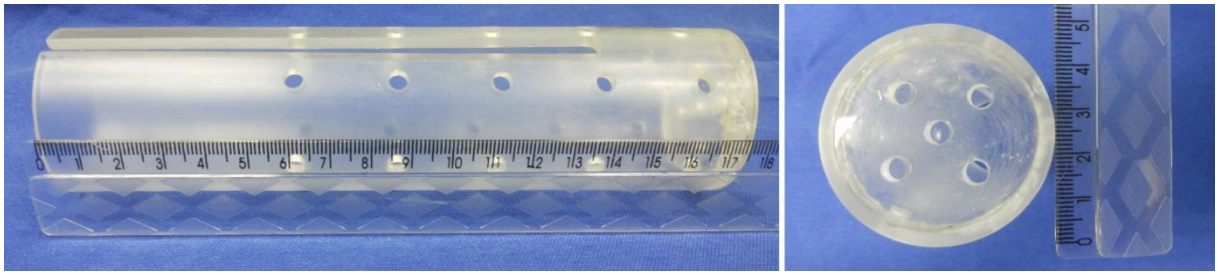
3.4.2 Monitorização dos sinais vitais e acomodação no microscópio

Terminada a avaliação do escore de atividade, os animais permaneciam acomodados na caixa plástica descrita anteriormente enquanto era obtido registro do eletrocardiograma de superfície. Para tanto, os eletrodos metálicos previamente implantados eram conectados por meio de cabos de eletrocardiografia próprios para pesquisa em animais (Micro-Hook Electrodes, MLA 1212, AD Instruments, Austrália) a um amplificador de sinais (Animal Bio Amp, FE 136, AD Instruments, Austrália) onde os sinais analógicos eram registrados. Os sinais eletrocardiográficos eram então digitalizados (PowerLab 8/35, AD Instruments, Austrália) e processados através de software de aquisição de dados adequado à realização de experimentos cardiovasculares em pequenos animais (LabChart Pro software v. 8, AD Instruments, Austrália).

Após a manipulação para conexão dos cabos de eletrocardiografia, era permitido aos animais um período de adaptação e acomodação de cinco minutos, sendo então realizado registro eletrocardiográfico contínuo, por seis minutos, em todos os animais. O período de adaptação e acomodação, no qual o animal era deixado em repouso, visava minimizar o estresse do animal pela manipulação, reduzindo possível influência externa sobre a frequência e ritmo cardíaco.

Terminado o registro eletrocardiográfico, os animais eram acomodados, sem uso de qualquer anestésico, em tubo de acrílico especialmente preparado para a observação da câmara dorsal ao microscópio. O tubo de acrílico foi desenvolvido com pequenos orifícios laterais para garantir a adequada respiração do animal e com uma grande fenda em seu maior eixo para a acomodação da câmara dorsal e restrição do animal (Figura 11).

Figura 11 – Tubo de acrílico utilizado durante a microscopia intravital



Legenda: Fotografia mostrando o tubo de acrílico utilizado para a acomodação dos animais. É possível observar os orifícios laterais de respiração e a fenda em seu maior eixo. Escala apresentada em centímetros.
Fonte: O autor, 2016.

Com o objetivo de preservar a temperatura corporal do animal, após a sua acomodação no tubo de acrílico, o tubo era envolvido por duas camadas de compressas de gaze hidrófila e, mais externamente, por uma camada de papel alumínio. A área onde se localizava a cabeça do animal era poupada desta cobertura de forma que os orifícios laterais de respiração permanecessem pérvios. O tubo de acrílico contendo o animal era então acoplado ao microscópio intravital para posterior observação. Além desta proteção passiva contra perda de calor, a temperatura corporal do animal era preservada através de uma placa aquecedora (LB750, Uppsala Processdata AB, Suécia) controlada por um termistor programado para manter uma temperatura de 36,0 °C na superfície do microscópio a qual o tubo de acrílico era acoplado. A temperatura retal e da pele da câmara dorsal do animal eram

constantemente aferidas com auxílio de termômetro de precisão (Wavetek 23XT, Wavetek Corporation, EUA) acoplado a uma sonda termopar adequada ao uso em pequenos animais (Termopar do tipo K, Wavetek Corporation, EUA).

Imediatamente após o acoplamento do tubo de acrílico contendo o animal ao microscópio intravital, o cateter arterial era conectado a um transdutor de pressão (TSD104A, BIOPAC Systems, EUA) acoplado a equipamento amplificador de sinal e conversor de sinal analógico em digital (MP100 Data Acquisition System, BIOPAC Systems, EUA). O sinal convertido era processado através de software de aquisição de dados adequado à realização de experimentos cardiovasculares em pequenos animais (AcqKnowledge software v. 3.5.7, BIOPAC Systems, EUA) e dividido em dois canais de monitorização, um para frequência de pulso e outro para pressão arterial média. A partir desse momento foi possível a aquisição contínua desses parâmetros macro-hemodinâmicos, sendo o primeiro registro válido realizado após período de adaptação e acomodação de quinze minutos. Conforme anteriormente descrito, esse período, no qual o animal era deixado em repouso, visava minimizar o estresse do animal pela manipulação, reduzindo possível influência externa sobre a pressão arterial média e parâmetros microcirculatórios (analisados em seguida).

Em intervalos regulares, a linha arterial era lavada com solução diluída de heparina (na concentração de 40 UI.ml^{-1}) para evitar a obstrução do cateter arterial. O volume total de solução de heparina utilizado foi controlado e não excedeu 0,5 ml em qualquer um dos animais.

Terminada a avaliação da pressão arterial média, todos os animais foram, finalmente, submetidos à avaliação da microcirculação.

3.5 **Avaliação da Microcirculação**

3.5.1 Equipamentos

A microcirculação foi avaliada pelo modelo experimental de microscopia intravital através da câmara dorsal. A microscopia foi realizada em microscópio intravital (Ortholux, E. Leitz-Wetzlar, Alemanha), sob transiluminação com lâmpada de

tungstênio-halogênio de 100 Watts, com auxílio de objetiva de 20x (CF SLWD Plan EPI 20x/0.35 Achromat Objective WD 20.5 mm, Nikon, Japão). O microscópio intravital estava acoplado a uma câmara de vídeo CCD (*charge-coupled device*) (SBC-320P B/W Camera, Samsung, Coreia do Sul) conectada por meio de placa de captura de imagens (XCapture USB, PixelView, EUA) a um computador portátil (Inspiron N5110, Dell Computadores, Brasil) onde as filmagens eram reproduzidas em tempo real e também gravadas para posterior análise (*software* PowerDirector 7, CyberLink, Taiwan). Essa montagem permitiu aumento total (óptico e digital) de 1.000 vezes das imagens obtidas na microscopia.

Complementando os equipamentos utilizados para microscopia, em diversas etapas da avaliação da microcirculação (descritas a seguir) foi utilizado filtro óptico de vidro colorido (modelo 51664, Oriel Corporation, EUA) para melhor visualização das hemácias.

A velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar foi medida pelo método *dual-slit*, uma técnica fotométrica validada para mensuração da velocidade de hemácias em microvasos. Para tanto, foi utilizado equipamento comercialmente disponível (IPM, EUA) modificado por Mesquita e colaboradores.[134]

3.5.2 Protocolo experimental

Logo em seguida ao registro da pressão arterial média, dava-se início à escolha e gravação dos campos arteriolares, venulares e capilares basais. A escolha dos campos foi baseada nos seguintes critérios:

a) o campo deveria poder ser bem focado e estar livre de inflamação ou hemorragia (microscópicas);
b) deveriam existir marcos anatômicos (adipócitos de formato marcante, cruzamentos ou bifurcações vasculares, proximidade de partes específicas da lamínula e da janela de visualização) que facilitassem o posterior retorno ao campo;
c) as arteríolas e vênulas deveriam possuir diâmetro entre 40 e 100 µm e fluxo basal compatível com a normalidade.

Em cada animal foram escolhidos dois campos arteriolares, com uma arteríola em cada um, dois campos venulares, com uma vênula em cada um, e dez campos capilares. Cada campo arteriolar foi gravado por 30 segundos com filtro de atenuação azul para a medição do diâmetro vascular e observação de fenômenos de vasodilatação e/ou vasoconstrição. Cada campo venular foi gravado seguindo-se o mesmo protocolo dos campos arteriolares. Cada campo capilar foi gravado por 30 segundos com filtro de atenuação azul para a medição da densidade capilar funcional e da velocidade das hemácias nos capilares.

Após a retirada do filtro, retornava-se a cada um dos dois campos arteriolares para realização da medição e registro da velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar.

Imediatamente após o término desse primeiro momento de observação (t0; *baseline*), os animais eram retirados do tubo de acrílico, anestesiados e submetidos à indução de sepse experimental por CLP.

3.6 **Modelo Experimental de Sepse Abdominal por Ligadura e Perfuração Cecal**

A indução de sepse por CLP foi realizada seguindo-se descrição da técnica publicada por Rittirsch e colaboradores.[27] Resumidamente, sob anestesia intraperitoneal com 100 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal de cetamina (Dopalen 10%, Ceva Santé Animale, Brasil) associados à 20 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal de xilazina (Anasedan 2%, Ceva Santé Animale, Brasil) e de forma estéril, a pele e musculatura da parede abdominal eram incisadas na linha mediana abrindo acesso cirúrgico à cavidade peritoneal com cerca de dois centímetros. Após cuidadosa exposição do ceco e dissecção de seu mesentério, o mesmo era ligado com fio cirúrgico (seda 4-0) na metade da distância entre o polo distal e a base do ceco. Após ligadura, era procedida perfuração única, com agulha 20 Gauge, da extremidade cecal localizada distalmente ao ponto de ligadura. Removida a agulha, a patência da perfuração era testada através da observação da saída de gases e fezes pelo orifício, sem ser realizada expressão cecal. O ceco era então reposicionado na cavidade peritoneal e a parede abdominal era fechada em dois planos com fio cirúrgico 4-0. Após a cirurgia, todos os hamsters eram injetados no subcutâneo com 50 $ml.kg^{-1}$ de peso corporal de salina a 0,9% pré-aquecida a 37 ºC. Terminados os procedimentos envolvidos na

realização de CLP e constatado o despertar da anestesia, os animais eram devolvidos às suas gaiolas individuais e acomodados no biotério por 24 horas com acesso irrestrito à água e ração.

Animais alocados no grupo *SHAM*, foram submetidos exatamente aos mesmos procedimentos, com exceção das etapas de ligadura e perfuração cecal, que foram omitidas, caracterizando o procedimento cirúrgico controle (sem indução de sepse; *sham*).

3.7 **Avaliações Sequenciais**

Vinte e quatro horas após a indução de sepse por CLP ou realização de procedimento cirúrgico controle, todo o processo de avaliação e registro do escore de atividade, frequência cardíaca e pressão arterial média e de avaliação e gravação dos campos arteriolares, venulares e capilares era repetido, retornando sempre aos mesmos campos microvasculares inicialmente gravados (campos basais).

Ao final desse segundo momento de observação (t1) era iniciada ressuscitação volêmica com 20 $ml.kg^{-1}$ de peso corporal de salina a 0,9% utilizando-se o cateter instalado na veia jugular interna. O volume total era administrado em 15 minutos com auxílio de bomba infusora microprocessada (Pump 22, Harvard Apparatus, EUA). Nesse momento, os animais alocados no grupo CLP-IVABRADINA foram tratados com 2,0 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal de ivabradina (Sigma-Aldrich, EUA), diluída na salina a 0,9% utilizada para ressuscitação volêmica.

Terminada a ressuscitação volêmica, era iniciada infusão venosa contínua de solução salina a 0,9% ou de solução de ivabradina diluída em salina a 0,9% de acordo com o grupo de alocação do animal:

a) grupos *SHAM* e CLP-SALINA: infusão venosa contínua de solução salina a 0,9%;
b) grupo CLP-IVABRADINA: infusão venosa contínua de solução de ivabradina diluída em salina a 0,9%.

Independente da solução utilizada, a velocidade de infusão foi programada na bomba de infusão a 0,1 $ml.h^{-1}$. A concentração da solução de ivabradina foi calculada

para que, nesta velocidade de infusão, a dose de ivabradina administrada fosse de 0,5 $mg.kg^{-1}.h^{-1}$.

Após o início da infusão venosa, todo o processo de avaliação e registro do escore de atividade, frequência cardíaca, pressão arterial média e de avaliação e gravação dos campos arteriolares, venulares e capilares, retornando sempre aos mesmos campos microvasculares inicialmente gravados (campos basais), foi repetido por mais duas vezes nos seguintes momentos de observação:

a) t2: quinze minutos após a ressuscitação volêmica;
b) t3: quatro horas após o início da infusão venosa.

Ressalta-se que a avaliação do escore de atividade e a eletrocardiografia de superfície não foram realizadas no momento de observação t2 por questões logísticas.

3.8 **Avaliação Gasométrica do Sangue Arterial**

Após o quarto momento de observação (t3), uma pequena alíquota de 0,1 ml de sangue arterial foi coletada de todos os animais para análise gasométrica. Para a coleta, o cateter arterial instalado na artéria carótida era desconectado do transdutor de pressão. O sangue era então coletado, sem aspiração, e depositado diretamente em um cartucho de testagem CG4+ (Abbott Laboratories, EUA) para imediata análise no aparelho i-STAT System (Abbott Laboratories, EUA). Dessa forma, foram obtidos e registrados os seguintes parâmetros: pH, pressão parcial de oxigênio no sangue (PaO_2), bicarbonato (HCO_3), excesso de base (BE), dióxido de carbono total (TCO_2) e lactato.

3.9 **Avaliações Laboratoriais do Sangue Arterial**

3.9.1 Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos

Após coleta de sangue para realização de gasometria do sangue arterial, os animais foram submetidos à coleta de sangue arterial para realização de hemograma completo e dosagem de parâmetros bioquímicos (glicose, ureia, creatinina e bilirrubina total).

Para a realização do hemograma, amostras de sangue foram coletadas em tubo próprio contendo EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético). Para as análises bioquímicas, amostras de sangue foram coletadas em tubo próprio contendo gel e ativador da coagulação e o soro foi separado por centrifugação a 750 g por 15 minutos. Ressalta-se que foram utilizados tubos de coleta preconizados para população neonatal (BD Vacutainer, BD, EUA), adequados aos diminutos volumes coletados em pequenos roedores.

As análises hematológicas e bioquímicas foram realizadas imediatamente após a coleta utilizando-se analisador automatizado (Pentra Hematology and Clinical Chemistry Analyzers, HORIBA Medical, Japão).

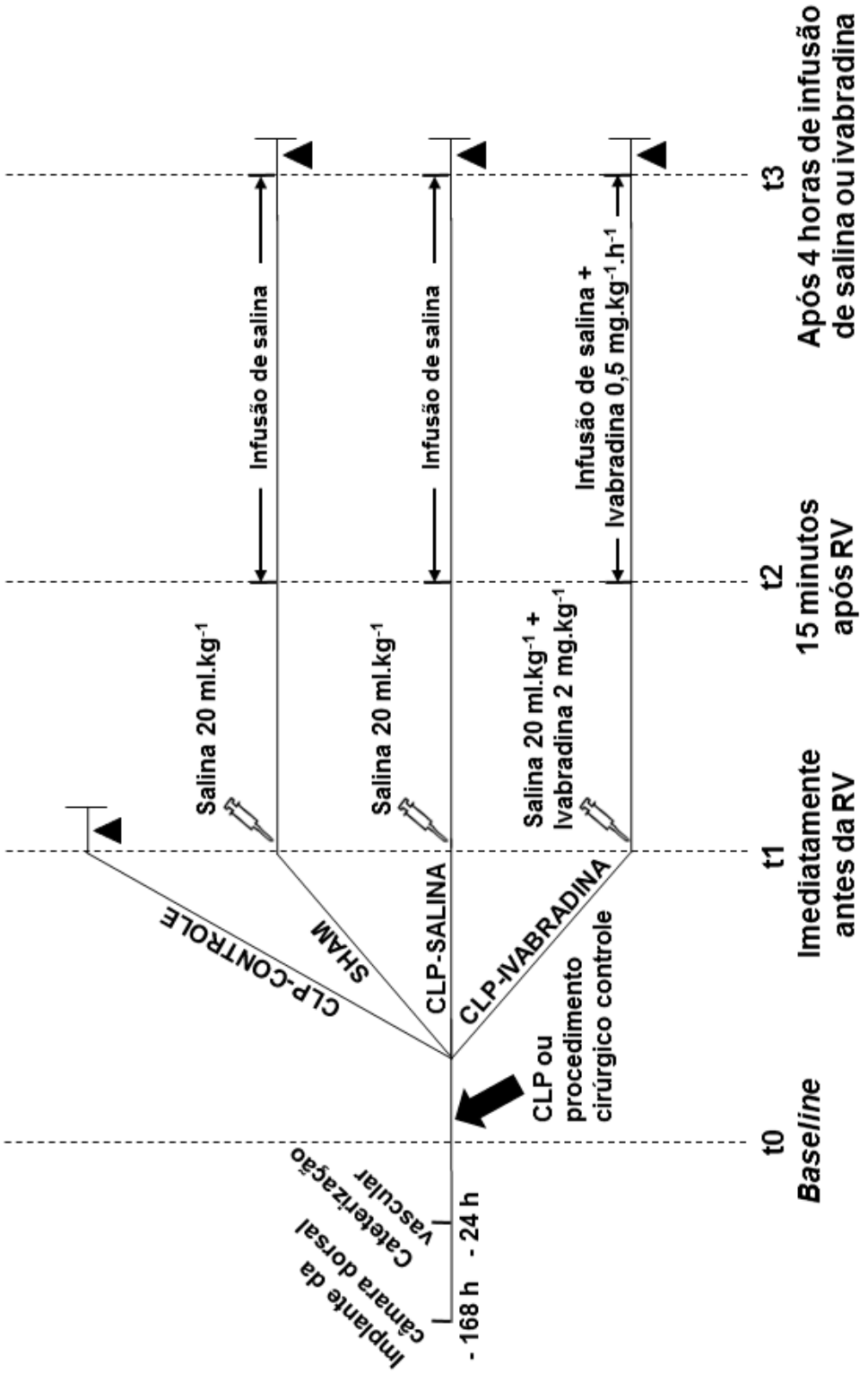
3.9.2 Hemocultura

Para a realização de hemocultura e contagem de colônias de bactérias no sangue, foram realizadas, de forma estéril, diluições seriadas de alíquotas de sangue aspiradas do cateter arterial (0,1 ml puro, 0,1 ml diluído em 1,0 ml de salina a 0,9% e 0,1 ml diluído em 10,0 ml de salina a 0,9%). Alíquotas de 10 µl de cada diluição foram semeadas em placas de Ágar MacConkey (PlastLabor, Brasil). A contagem de colônias foi realizada após 24 horas de incubação a 37 ºC.

Após a coleta de sangue para hemocultura, procedia-se ao sacrifício do animal por administração de dose intravenosa letal de cetamina/xilazina (>200/40 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal), dando início à próxima etapa do experimento, a necropsia do animal.

A figura 12 apresenta um diagrama esquemático do delineamento de estudo utilizado nos experimentos principais.

Figura 12 – Delineamento de estudo utilizado nos experimentos principais



Legenda: Diagrama esquemático do delineamento do estudo. Triângulos representam o momento da coleta de sangue para gasometria arterial, hemograma, bioquímica e hemocultura.
Fonte: O autor, 2016.

3.10 **Necropsia**

Após o óbito ou sacrifício, todos os animais foram submetidos à necropsia para avaliar a presença de complicações associadas aos cateteres vasculares (normalmente hemorrágicas) ou a existência de lesões intra-abdominais secundárias à anestesia intraperitoneal ou à laparotomia.

A necropsia envolvia o exame externo do animal e a abertura das cavidades torácica e abdominal. Em seguida, era realizada a retirada dos órgãos em monobloco com posterior separação em conjuntos. Continuando o procedimento, a calota craniana e as meninges eram abertas, os nervos cranianos cortados na base do encéfalo e o cérebro retirado inteiro da caixa craniana.

No presente estudo, não houve coleta de material para análises histopatológicas.

3.11 **Grupo Controle Séptico Não Ressuscitado e Não Infundido (CLP-CONTROLE)**

Sete animais foram incluídos no estudo para a realização de protocolo experimental parcial. Esses animais foram alocados no grupo CLP-CONTROLE, onde seguiram o protocolo experimental anteriormente descrito até o momento de observação t1. Dessa forma, foram realizados: implante da câmara dorsal, instalação de eletrodos de eletrocardiograma, cateterização vascular, avaliações *baseline* (excetuando-se a avaliação da microcirculação) e indução de sepse por CLP.

No momento de observação t1, os animais foram acomodados no microscópio, sendo respeitados os cuidados de preservação da temperatura corporal anteriormente descritos. Foram registradas a frequência cardíaca e a pressão arterial média. Ao final desses registros, a etapa de avaliação e gravação da microcirculação não foi iniciada. No lugar desta, os seguintes experimentos foram realizados:

a) coleta de sangue arterial para a obtenção de gasometria arterial pré-ressuscitação volêmica;

b) coleta de sangue arterial para a obtenção de valores hematológicos e bioquímicos pré-ressuscitação volêmica;
c) coleta de sangue arterial para a obtenção de hemocultura pré-ressuscitação volêmica.

Esses experimentos foram realizados na sequência apresentada e seguiram os mesmos protocolos experimentais anteriormente descritos, exceção feita ao momento de realização.

Após a última coleta de sangue, os animais foram sacrificados por administração de dose intravenosa letal de cetamina/xilazina (>200/40 $mg.kg^{-1}$ de peso corporal).

3.12 **Cegamento do Estudo**

Por questões técnicas relacionadas à preparação das soluções venosas para infusão contínua, o estudo não pôde ser cegado em sua fase de experimento. Dessa forma, a aferição e registro da frequência cardíaca e da pressão arterial média, a avaliação e registro do escore de atividade, a medição e registro da velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar e o processamento de amostras de sangue e registro dos resultados foram desempenhados por observador ciente da solução venosa em uso.

Após a ressuscitação volêmica com salina a 0,9% e infusão venosa contínua de salina a 0,9% ou ivabradina, o grupo de alocação do animal era registrado em local específico da folha de coleta de dados do animal. Imediatamente após o registro, esse local era lacrado e o animal passava a ser identificado apenas por uma combinação de letras e números (código do animal) não definidora do grupo do animal. Isso permitiu que as análises das filmagens obtidas por microscopia fossem realizadas de forma cega.

Os arquivos digitais contendo as gravações da avaliação da microcirculação foram identificados com o código do animal e na fase de análise dessas gravações não se tinha conhecimento de qualquer informação a respeito do grupo de alocação do animal.

No momento da análise estatística dos dados, era conhecida a informação de que um determinado animal pertencia a um determinado grupo identificado por letras

(A, B, C ou D). No entanto não existia a informação de que solução cada grupo havia recebido (salina a 0,9% ou ivabradina), ou mesmo se era um grupo séptico ou não.

O cegamento foi aberto apenas após a conclusão de toda a análise estatística. Após a abertura do estudo, a legenda dos gráficos e tabelas foi refeita para melhor entendimento.

3.13 **Análise das gravações - Variáveis Anatomofuncionais Relacionadas à Microcirculação**

Em momento oportuno, as gravações realizadas durante os experimentos foram revistas e as variáveis anatomofuncionais relacionadas à microcirculação foram analisadas com auxílio do programa ImageJ v. 1.49 (NIH, EUA), conforme protocolo já estabelecido na literatura.[39] Os dados pertinentes ao estudo foram registrados. Resumidamente, a análise realizada pode ser descrita da seguinte forma:

a) o diâmetro vascular, de arteríolas e vênulas, foi aferido pela distância perpendicular entre as paredes do vaso, sendo apresentado em μm;
b) a densidade capilar funcional foi calculada através da divisão do somatório do comprimento dos capilares espontaneamente perfundidos, ou seja, aqueles em que se encontrava trânsito de hemácias, pela área de observação, sendo apresentada em centímetros por centímetros quadrados ($cm.cm^{-2}$);
c) a velocidade das hemácias nos capilares foi calculada pela razão entre a distância capilar percorrida por uma hemácia e o período de tempo necessário para este deslocamento, em $mm.s^{-1}$. A velocidade das hemácias nos capilares foi calculada para um capilar em cada um dos quatro quadrantes de cada campo capilar gravado, num total de 40 capilares analisados a cada momento de observação. O capilar escolhido em cada quadrante foi selecionado seguindo os seguintes critérios: qualidade da imagem (nitidez) e representatividade da velocidade média daquele quadrante. Da divisão simples entre o somatório de todas as velocidades capilares individuais encontradas por momento de observação e o número de capilares estudados a

cada momento de observação (40) foi calculada a variável velocidade média das hemácias nos capilares.

3.14 **Elaboração dos Bancos de Dados e Análise Estatística**

Todos os dados adquiridos em todas as fases do experimento foram registrados em folha de coleta de dados especialmente confeccionada para o projeto. Os registros constantes nestas folhas serviram de base para elaborar um banco de dados digital com auxílio do programa EpiData Entry v.3.1 (EpiData Association, Dinamarca). Finalizada a confecção do banco de dados, procedeu-se a uma fase de checagem quanto à inconsistência dos dados e possíveis erros de digitação. Após essa fase, os dados foram exportados para o pacote estatístico Stata 10.1 SE (StataCorp, EUA) e organizados/preparados para análise.

As análises estatísticas e apresentações gráficas dos resultados foram realizadas após a inserção dos dados no programa GraphPad Prism 6.03 (GraphPad Software, EUA), sendo adotado nível de significância bicaudal de 5% (p <0,05) para todas as análises. Dessa forma, todos os resultados do presente estudo foram apresentados apenas como significante ou não em relação a esse valor crítico.

Considerando a pequena amostra utilizada, o teste de Shapiro-Wilk foi escolhido para a verificação da suposição de normalidade dos dados durante o processo de análise das variáveis quantitativas.

Os valores basais das variáveis estudadas (*baseline*) foram comparados entre os grupos utilizando-se, de acordo com a variável analisada, o teste paramétrico Análise de variância (*Analysis of variance*, ANOVA) ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para análise *post-hoc* do teste ANOVA, foi empregado o método de Bonferroni. Para análise *post-hoc* do teste de Kruskal-Wallis, foi empregado o teste de comparações múltiplas de Dunn.

Após a confirmação da suposição de normalidade, os dados relacionados à frequência cardíaca, pressão arterial média, densidade capilar funcional, velocidade média das hemácias nos capilares, diâmetros arteriolar e venular e velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar foram analisados de forma longitudinal (evolução intragrupo ao longo do tempo) e de forma transversal (comparação entre os grupos [intergrupo], a

cada momento de observação) pelo teste paramétrico *two-way* ANOVA para medidas repetidas. Na modelagem do teste, a evolução das variáveis dependentes, ao longo dos momentos de observação, foi adotada como a variável longitudinal repetida (*within subjects*) e o grupo de alocação dos animais foi adotado como a variável transversal (*between subjects*). Na análise intragrupo, assumindo uma violação da suposição de esfericidade dos resíduos, os valores de significância estatística encontrados foram corrigidos pela correção de Greenhouse-Geisser. Após a confirmação da significância estatística longitudinal e/ou transversal, aplicou-se o método de Bonferroni para a detecção de diferenças entre pares de médias. Os dados referentes às variáveis microcirculatórias foram transformados em percentagens em relação ao valor basal, ou seja, foram normalizados para o *baseline*, com intuito de facilitar a apresentação dos dados.

Os dados relacionados ao escore de atividade foram analisados de forma longitudinal e de forma transversal. O teste não paramétrico de Friedman seguido, quando necessário, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn foi aplicado para a análise longitudinal. Na análise transversal, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis seguido, quando necessário, pelo teste de comparações múltiplas de Dunn.

Os valores das variáveis hematológicas, bioquímicas e gasométricas do sangue arterial, além dos dados relacionados à hemocultura, foram comparados entre os grupos utilizando-se, de acordo com a variável analisada, o teste paramétrico ANOVA ou o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Na análise *post-hoc* do teste ANOVA foi empregado o método de Bonferroni e na análise *post-hoc* do teste de Kruskal-Wallis foi empregado o teste de comparações múltiplas de Dunn.

4 **RESULTADOS**

4.1 **Inclusão e Exclusão de Animais**

Quarenta e sete animais foram incluídos no estudo para realização dos experimentos principais, sendo submetidos ao implante da câmara dorsal. Desses animais, cerca de 23% foram excluídos por má qualidade da preparação experimental (presença de inflamação e/ou hemorragia após o implante da câmara dorsal).

Quatro animais foram excluídos do estudo antes de serem alocados em grupos, dois por hemorragia maciça durante a cateterização vascular e dois por evisceração durante fechamento da laparotomia mediana.

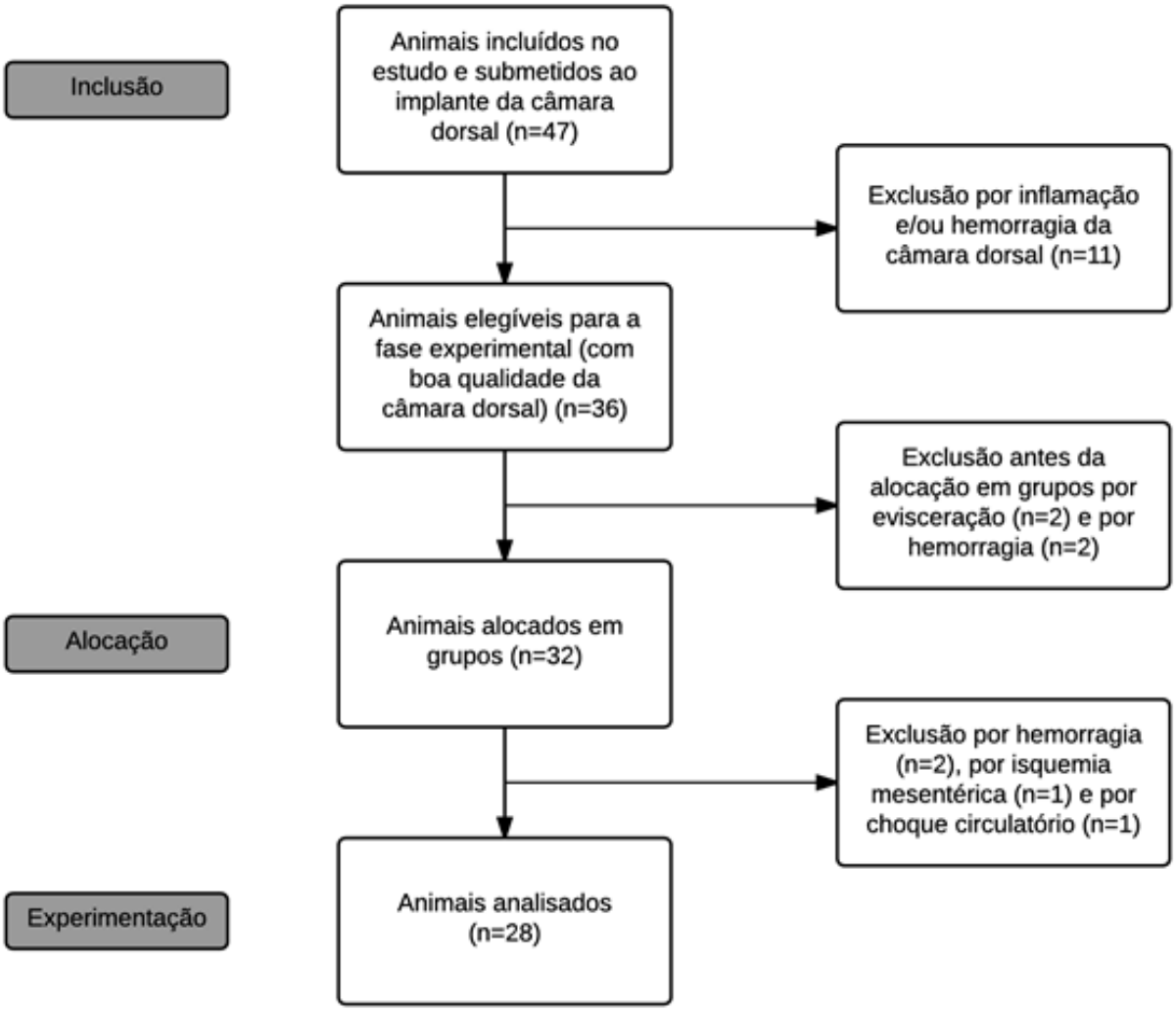
Após o início da monitorização hemodinâmica, um animal foi excluído do estudo por apresentar choque circulatório (PAM <50 mmHg, com intensa bradicardia) no momento de observação inicial (basal). A necropsia revelou hemoperitonio de origem indeterminada. Associou-se este sangramento a complicações relacionadas à anestesia intraperitoneal ou à discrasia sanguínea.

Três animais submetidos a todas as etapas experimentais previstas no estudo foram excluídos do mesmo após a realização da necropsia:

a) em um animal a necropsia revelou extensa isquemia enteromesentérica associada a hematoma mesentérico. Associou-se esse achado a complicações relacionadas à anestesia intraperitoneal;
b) em dois animais a necropsia revelou volumoso hematoma, um na ferida operatória abdominal (hematoma de parede) e outro no túnel subcutâneo utilizado para tunelização dos cateteres vasculares. Associou-se esses achados a complicações relacionadas à discrasia sanguínea

Nenhum animal foi excluído do estudo por morte durante o experimento. A figura 13 resume a aplicação dos critérios de inclusão e de exclusão.

Figura 13 – Inclusão e exclusão de animais no estudo



Legenda: Diagrama de fluxo ilustrando a inclusão e exclusão de animais no estudo.
Fonte: O autor, 2016.

4.2 **Valores Basais (*Baseline*)**

Conforme já descrito, as variáveis anatomofuncionais da microcirculação não foram avaliadas no grupo CLP-CONTROLE. Todas as demais variáveis *baseline* foram avaliadas em todos os grupos.

Os grupos não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre as suas medidas iniciais. Os valores basais encontrados são apresentados na tabela 2, de acordo com o grupo.

Tabela 2 – Medidas iniciais de acordo com o grupo

Variável	Grupo				*p*
	SHAM	**CLP-CONTROLE**	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**	
Peso (g)	135,7±7,2	138,1±5,6	133,7±5,9	133,4±9,0	0,6
Escore de atividade	5(5/5)	5(5/5)	5(5/5)	5(5/5)	.
PAM (mmHg)	109,0±8,2	110,3±9,7	110,8±10,7	108,3±11,7	0,9
FC (bpm)	373,2±31,5	379,0±27,3	363,7±23,3	370,6±33,0	0,8
DCF ($cm.cm^{-2}$)	129,8±6,9	N/A	131,2±7,4	135,3±5,6	0,3
Velocidade - capilares ($mm.s^{-1}$)	0,30±0,01	N/A	0,31±0,01	0,30±0,01	0,1
Diâmetro arteriolar (µm)	65,7±3,8	N/A	66,8±3,4	66,7±3,3	0,8
Velocidade - arteríolas ($mm.s^{-1}$)	12,3±2,0	N/A	11,3±3,0	12,3±2,2	0,7
Diâmetro venular (µm)	73,2±4,4	N/A	75,4±3,3	71,5±3,7	0,2

Legenda: Os valores estão representados pela média ± DP ou pela mediana e, entre parênteses, pelos percentis 25%/75%. Todas as medidas foram realizadas no *baseline* (t0). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-CONTROLE, animais sépticos, não ressuscitados volemicamente e não tratados com salina a 0,9% ou ivabradina (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). Os valores de *p* apresentados se referem às diferenças intergrupo encontradas. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; DCF, densidade capilar funcional; N/A, não se aplica.

Fonte: O autor, 2016.

4.3 **Evolução dos Sinais Vitais**

4.3.1 Frequência cardíaca

A frequência cardíaca foi medida de forma contínua através da monitorização eletrocardiográfica e da análise da curva de pressão arterial invasiva. Todos os animais apresentaram ritmo sinusal durante todo o experimento, sendo raramente registradas extrassístoles. Dessa forma, não foram observadas diferenças clinicamente significativas entre as duas formas de medição da frequência cardíaca. Para fins estatísticos, os dois dados foram utilizados de forma combinada (média aritmética).

Os valores de frequência cardíaca encontrados são apresentados na tabela 3 e no gráfico 1. As diferenças intragrupo estatisticamente significativas são apresentadas na tabela 3. As diferenças intergrupo estatisticamente significativas, por momento de observação, são apresentadas no gráfico 1.

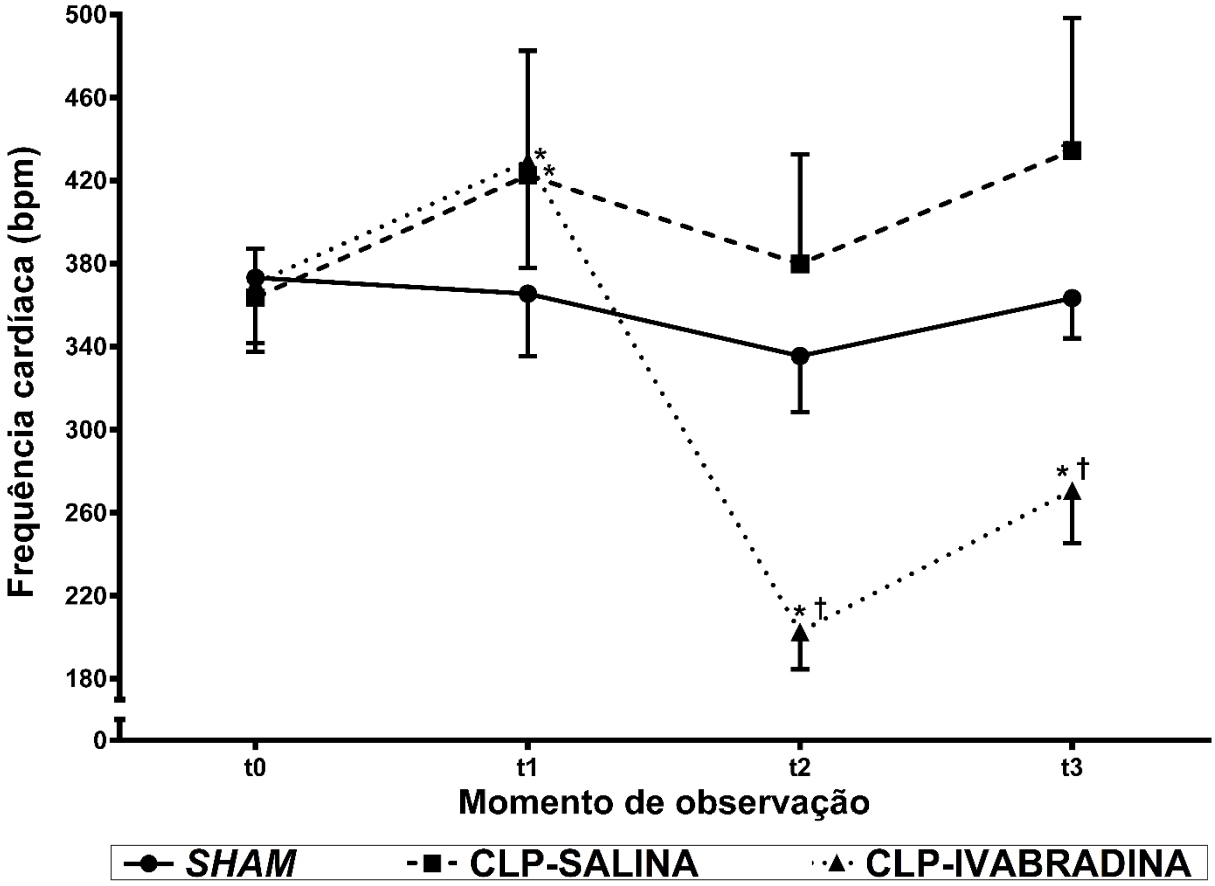
Tabela 3 – Evolução da frequência cardíaca durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo

	Grupo		
	SHAM	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Momento de observação:			
t0	373,2±31,5	363,7±23,3	370,6±33,0[b]
t1	365,5±30,1	422,6±60,0[a]	429,6±51,7[b]
t2	335,5±27,0	379,8±53,0	202,6±18,0[b]
t3	363,4±19,4	434,5±64,0[a]	270,7±25,3[b]

Legenda: Os valores são apresentados em bpm e representados pela média ± DP. As medidas foram realizadas no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). [a] p <0,05 em comparação ao momento de observação t0; [b] p <0,05 em comparação a qualquer outro momento de observação.

Fonte: O autor, 2016.

Gráfico 1 – Evolução da frequência cardíaca durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo



Legenda: Os marcadores e barras de erro inseridos no gráfico representam os valores da média e do desvio padrão, respectivamente. Os valores, apresentados em bpm, foram medidos no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*, no mesmo momento de observação; † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA, no mesmo momento de observação.

Fonte: O autor, 2016.

A frequência cardíaca dos animais do grupo *SHAM* não variou de forma significativa durante o experimento. Nos grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), a indução de sepse determinou um aumento estatisticamente significativo da frequência cardíaca em relação ao valor basal medido para o grupo (t1). A ressuscitação volêmica reduziu momentaneamente a frequência cardíaca no grupo CLP-SALINA (t2; não significativo vs. t1). No entanto, a frequência cardíaca final desse grupo foi significativamente maior que o valor basal medido para o grupo (t3). O tratamento com ivabradina determinou queda expressiva e mantida da frequência

cardíaca, sendo o valor mais baixo observado após a dose bolus (t2). Essa importante redução da frequência cardíaca no grupo CLP-IVABRADINA determinou diferença estatisticamente significativa entre as frequências cardíacas observadas nos dois grupos sépticos em t2 e t3.

4.3.2 Pressão arterial média

A pressão arterial média foi medida de forma contínua, não tendo sido observadas grandes flutuações de seu valor entre os períodos de observação, ou seja, a evolução do valor de um ponto de observação ao outro ocorreu de forma gradual.

Os valores de pressão arterial média encontrados são apresentados na tabela 4 e no gráfico 2. As diferenças intragrupo estatisticamente significativas são apresentadas na tabela 4. As diferenças intergrupo estatisticamente significativas, por momento de observação, são apresentadas no gráfico 2.

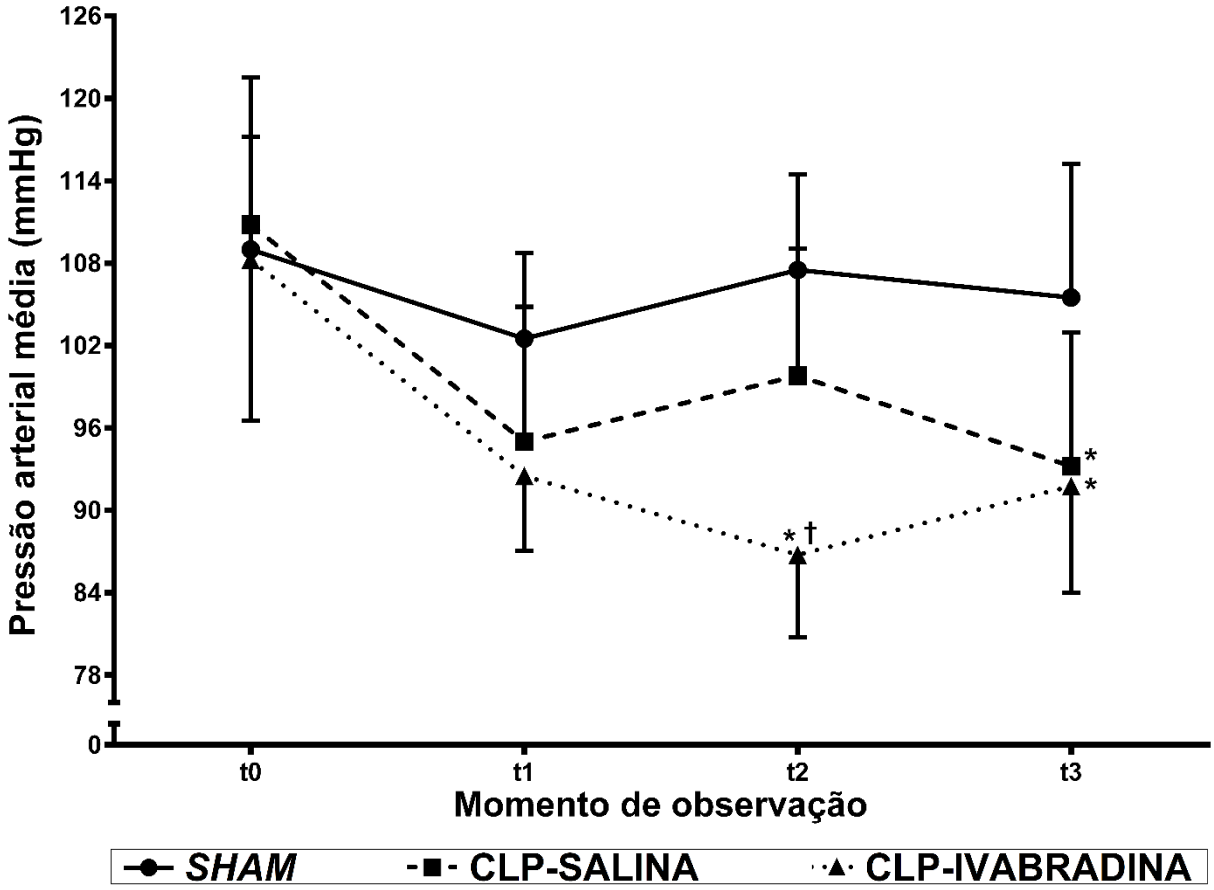
Tabela 4 – Evolução da pressão arterial média durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo

	Grupo		
	SHAM	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Momento de observação:			
t0	109,0±8,2	110,8±10,7	108,3±11,7
t1	102,5±6,2	95,0±9,8[a]	92,5±5,4[a]
t2	107,5±7,0	99,8±9,3	86,8±6,0[a]
t3	105,5±9,7	93,2±9,8[a]	91,8±7,8[a]

Legenda: Os valores são apresentados em mmHg e representados pela média ± DP. As medidas foram realizadas no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). [a] p <0,05 em comparação ao momento de observação t0.

Fonte: O autor, 2016.

Gráfico 2 – Evolução da pressão arterial média durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo



Legenda: Os marcadores e barras de erro inseridos no gráfico representam os valores da média e do desvio padrão, respectivamente. Os valores, apresentados em mmHg, foram medidos no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*, no mesmo momento de observação; † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA, no mesmo momento de observação.

Fonte: O autor, 2016.

A pressão arterial média dos animais do grupo *SHAM* não variou de forma significativa durante o experimento. Nos grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), a indução de sepse determinou uma redução estatisticamente significativa da pressão arterial média em relação ao valor basal medido para o grupo (t1). A ressuscitação volêmica elevou momentaneamente a pressão arterial média no grupo CLP-SALINA (t2; não significativo vs. t1). No entanto, a pressão arterial média final desse grupo foi significativamente menor que o valor basal medido para o grupo (t3). O tratamento com ivabradina obstou o aumento da pressão arterial média após a

ressuscitação volêmica no grupo CLP-IVABRADINA, o que determinou diferença estatisticamente significativa entre as pressões arteriais médias observadas nos dois grupos sépticos em t2.

4.4 **Variáveis Anatomofuncionais da Microcirculação**

4.4.1 Densidade capilar funcional

Para fins de estatística e apresentação de resultados dessa variável foram utilizados valores percentuais em relação ao valor basal do grupo. Esses percentuais são apresentados na tabela 5 e no gráfico 3.

As diferenças intragrupo estatisticamente significativas são apresentadas na tabela 5. As diferenças intergrupo estatisticamente significativas, por momento de observação, são apresentadas no gráfico 3.

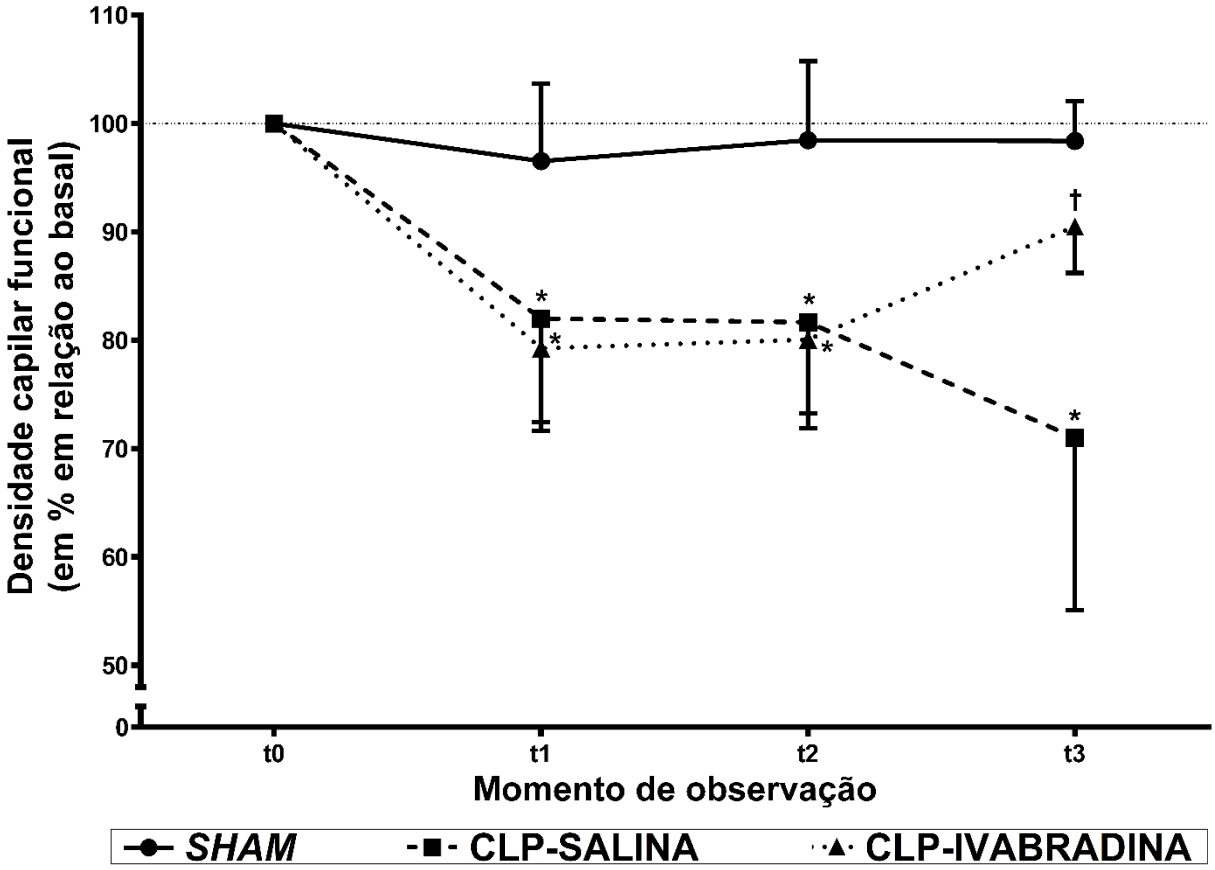
Tabela 5 – Evolução da densidade capilar funcional durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo

	Grupo		
	SHAM	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Momento de observação:			
t0	100,0	100,0	100,0
t1	96,5±7,1	82,0±9,6[a]	79,3±7,6[a]
t2	98,4±7,3	81,6±9,8[a]	80,0±6,8[a]
t3	98,4±3,6	71,0±15,9[a,b]	90,5±4,3[b]

Legenda: Os valores são apresentados em % em relação ao basal e representados pela média ± DP. As medidas foram realizadas no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). [a] p <0,05 em comparação ao momento de observação t0; [b] p <0,05 em comparação ao momento de observação t1.

Fonte: O autor, 2016.

Gráfico 3 – Evolução da densidade capilar funcional durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo



Legenda: Os marcadores e barras de erro inseridos no gráfico representam os valores da média e do desvio padrão, respectivamente. Os valores, apresentados em % em relação ao basal, foram medidos no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*, no mesmo momento de observação; † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA, no mesmo momento de observação.

Fonte: O autor, 2016.

A densidade capilar funcional dos animais do grupo *SHAM* não variou de forma significativa durante o experimento. Nos grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), a indução de sepse determinou uma redução estatisticamente significativa da densidade capilar funcional em relação ao valor basal medido para o grupo (t1). A ressuscitação volêmica não determinou alterações significativas na densidade capilar funcional medida em t2. Em t3, foi observada recuperação da densidade capilar funcional nos animais tratados com ivabradina e piora dessa variável naqueles tratados apenas com salina a 0,9%. Esse padrão de resposta

determinou diferença estatisticamente significativa entre as densidades capilares funcionais observadas nos dois grupos sépticos em t3.

4.4.2 Velocidade média das hemácias nos capilares

Para fins de estatística e apresentação de resultados dessa variável foram utilizados valores percentuais em relação ao valor basal do grupo. Esses percentuais são apresentados na tabela 6 e no gráfico 4.

As diferenças intragrupo estatisticamente significativas são apresentadas na tabela 6. As diferenças intergrupo estatisticamente significativas, por momento de observação, são apresentadas no gráfico 4.

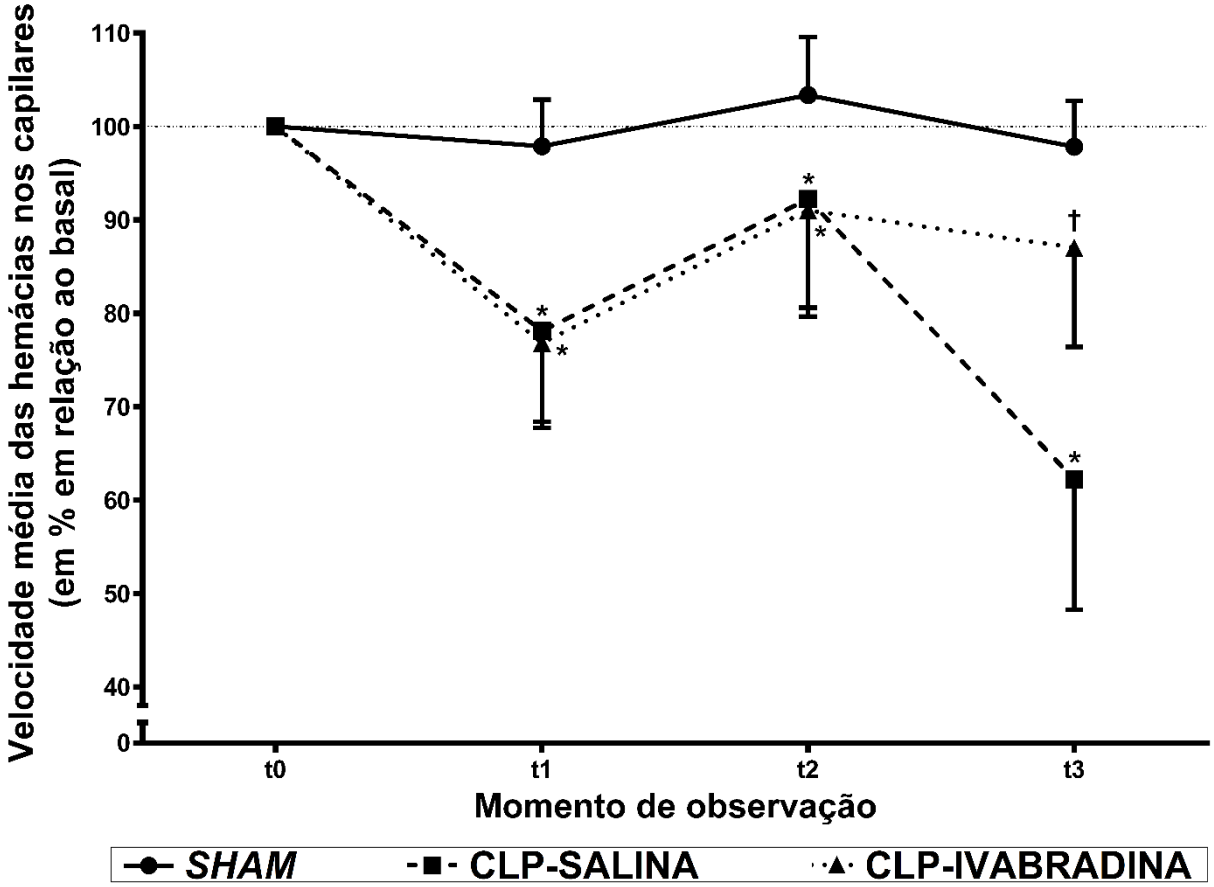
Tabela 6 – Evolução da velocidade média das hemácias nos capilares durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo

	Grupo		
	SHAM	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Momento de observação:			
t0	100,0	100,0	100,0
t1	97,9±5,0	78,1±9,7[a]	76,8±9,1[b]
t2	103,4±6,2	92,2±11,6	91,0±11,4[c]
t3	97,8±4,9	62,2±14,0[a]	87,0±10,7[b]

Legenda: Os valores são apresentados em % em relação ao basal e representados pela média ± DP. As medidas foram realizadas no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). [a] p <0,05 em comparação a qualquer outro momento de observação; [b] p <0,05 em comparação ao momento de observação t0; [c] p <0,05 em comparação ao momento de observação t1.

Fonte: O autor, 2016.

Gráfico 4 – Evolução da velocidade média das hemácias nos capilares durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo



Legenda: Os marcadores e barras de erro inseridos no gráfico representam os valores da média e do desvio padrão, respectivamente. Os valores, apresentados em % em relação ao basal, foram medidos no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*, no mesmo momento de observação; † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA, no mesmo momento de observação.

Fonte: O autor, 2016.

A velocidade média das hemácias nos capilares dos animais do grupo *SHAM* não variou de forma significativa durante o experimento. Nos grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), a indução de sepse determinou uma redução estatisticamente significativa da velocidade média das hemácias nos capilares em relação ao valor basal medido para o grupo (t1). A ressuscitação volêmica aumentou de forma estatisticamente significativa a velocidade média das hemácias nos capilares nos grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA (t2). No entanto, a velocidade média

final das hemácias nos capilares do grupo CLP-SALINA foi significativamente menor que o valor basal medido para o grupo (t3). Essa redução da velocidade média das hemácias nos capilares em t3 não foi observada nos animais tratados com ivabradina (o valor permaneceu relativamente estável em relação àquele observado em t2). Esse padrão de resposta determinou diferença estatisticamente significativa entre as velocidades médias das hemácias nos capilares observadas nos dois grupos sépticos em t3.

4.4.3 Diâmetro arteriolar

Para fins de estatística e apresentação de resultados dessa variável foram utilizados valores percentuais em relação ao valor basal do grupo. Esses percentuais são apresentados na tabela 7 e no gráfico 5.

As diferenças intragrupo estatisticamente significativas são apresentadas na tabela 7. As diferenças intergrupo estatisticamente significativas, por momento de observação, são apresentadas no gráfico 5.

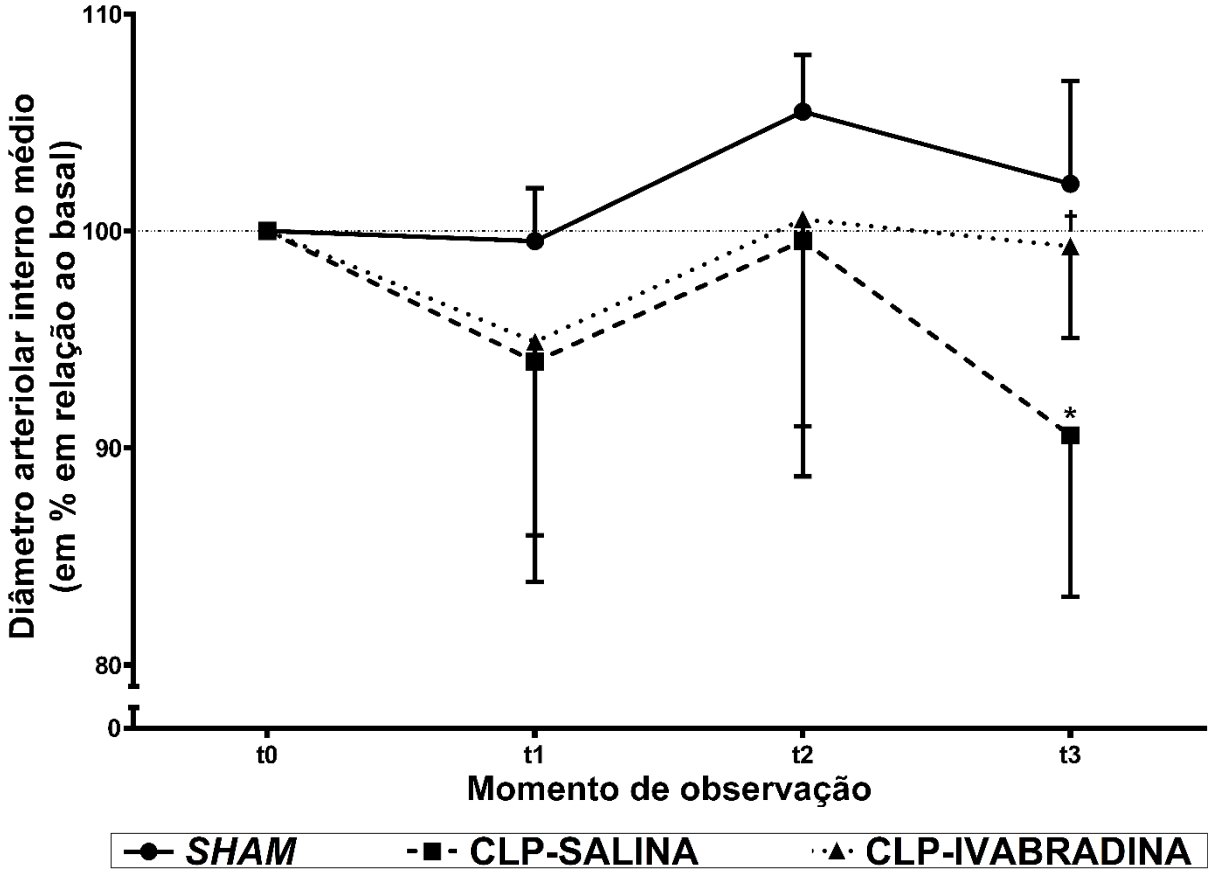
Tabela 7 – Evolução do diâmetro arteriolar durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo

	Grupo		
	SHAM	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Momento de observação:			
t0	100,0	100,0	100,0
t1	99,5±2,4	94,0±10,2	94,9±8,9
t2	105,5±2,6	99,5±10,9	100,5±9,5
t3	102,2±4,7	90,6±7,4[a]	99,3±4,2

Legenda: Os valores são apresentados em % em relação ao basal e representados pela média ± DP. As medidas foram realizadas no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). [a] p <0,05 em comparação ao momento de observação t0.

Fonte: O autor, 2016.

Gráfico 5 – Evolução do diâmetro arteriolar durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo



Legenda: Os marcadores e barras de erro inseridos no gráfico representam os valores da média e do desvio padrão, respectivamente. Os valores, apresentados em % em relação ao basal, foram medidos no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*, no mesmo momento de observação; † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA, no mesmo momento de observação.

Fonte: O autor, 2016.

O diâmetro arteriolar dos animais do grupo *SHAM* não variou de forma significativa durante o experimento. Nos grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), a indução de sepse determinou uma redução não significativa do diâmetro arteriolar em relação ao valor basal medido para o grupo (t1). Assim como observado no grupo *SHAM*, a ressuscitação volêmica aumentou de forma não significativa o diâmetro arteriolar nos grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA (t2). No entanto, o diâmetro arteriolar final do grupo CLP-SALINA foi significativamente menor que o valor basal medido para o grupo (t3). Essa redução do diâmetro arteriolar

em t3 não foi observada nos animais tratados com ivabradina (o valor permaneceu relativamente estável em relação àquele observado em t2). Esse padrão de resposta determinou diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros arteriolares observados nos dois grupos sépticos em t3.

4.4.4 Velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar

Para fins de estatística e apresentação de resultados dessa variável foram utilizados valores percentuais em relação ao valor basal do grupo. Esses percentuais são apresentados na tabela 8 e no gráfico 6.

As diferenças intragrupo estatisticamente significativas são apresentadas na tabela 8. As diferenças intergrupo estatisticamente significativas, por momento de observação, são apresentadas no gráfico 6.

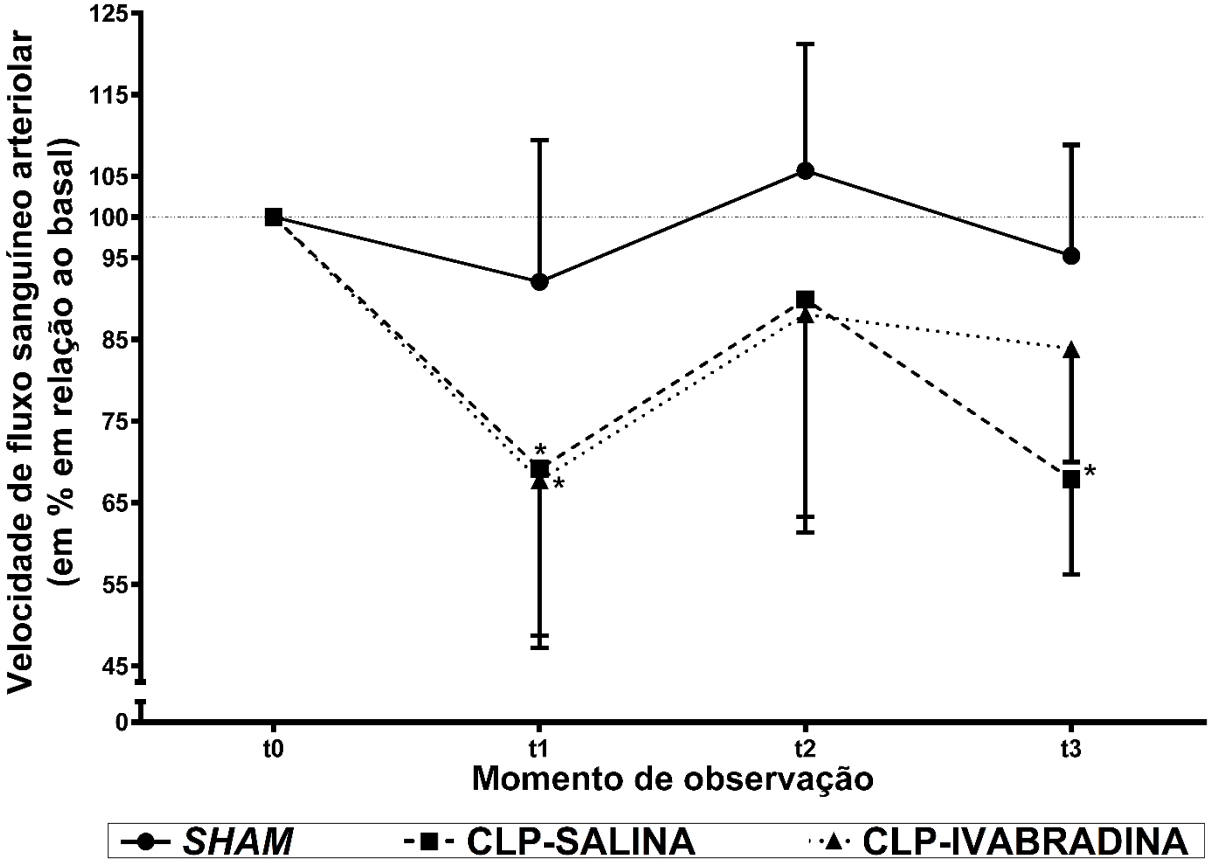
Tabela 8 – Evolução da velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo

	Grupo		
	SHAM	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Momento de observação:			
t0	100,0	100,0	100,0
t1	92,1±17,3	69,2±20,5[a]	67,7±20,6[a]
t2	105,7±15,5	89,9±26,6	88,1±26,7
t3	95,3±13,6	67,8±11,7[a]	83,9±13,9

Legenda: Os valores são apresentados em % em relação ao basal e representados pela média ± DP. As medidas foram realizadas no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). [a] p <0,05 em comparação ao momento de observação t0.

Fonte: O autor, 2016.

Gráfico 6 – Evolução da velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo



Legenda: Os marcadores e barras de erro inseridos no gráfico representam os valores da média e do desvio padrão, respectivamente. Os valores, apresentados em % em relação ao basal, foram medidos no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*, no mesmo momento de observação.

Fonte: O autor, 2016.

A velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar dos animais do grupo *SHAM* não variou de forma significativa durante o experimento. Nos grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), a indução de sepse determinou uma redução estatisticamente significativa da velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar em relação ao valor basal medido para o grupo (t1). A ressuscitação volêmica aumentou a velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar nos grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA (t2; não significativo vs. t1). No entanto, a velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar final do grupo CLP-SALINA foi significativamente menor que o valor basal

medido para o grupo (t3). Essa redução da velocidade de fluxo sanguíneo arteriolar em t3 não foi observada nos animais tratados com ivabradina (o valor permaneceu relativamente estável em relação àquele observado em t2). Apesar desse padrão de resposta, não houve diferença estatisticamente significativa entre as velocidades de fluxo sanguíneo arteriolar observadas nos dois grupos sépticos em t3.

4.4.5 Diâmetro venular

Para fins de estatística e apresentação de resultados dessa variável foram utilizados valores percentuais em relação ao valor basal do grupo. Esses percentuais são apresentados na tabela 9 e no gráfico 7.

As diferenças intragrupo estatisticamente significativas são apresentadas na tabela 9. As diferenças intergrupo estatisticamente significativas, por momento de observação, são apresentadas no gráfico 7.

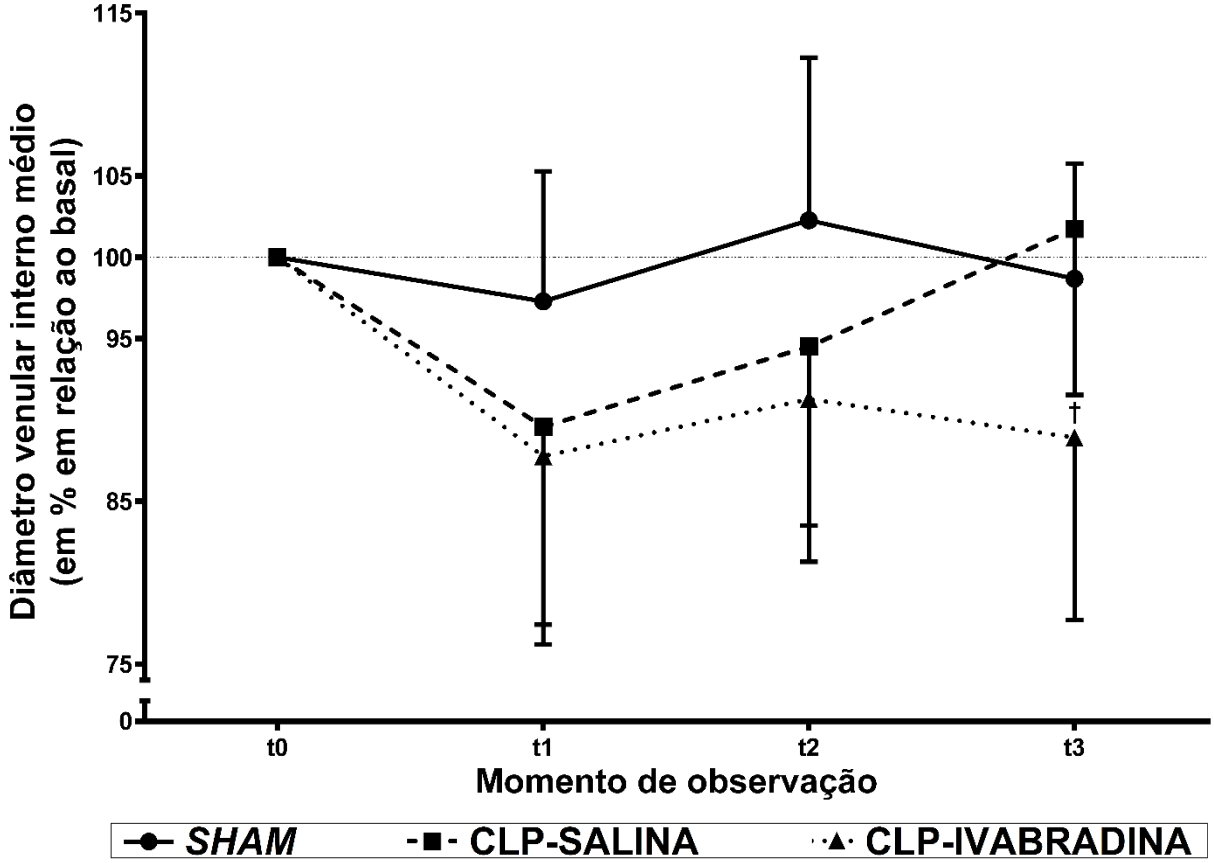
Tabela 9 – Evolução do diâmetro venular durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intragrupo

	Grupo		
	SHAM	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Momento de observação:			
t0	100,0	100,0	100,0
t1	97,3±8,0	89,6±12,2	87,8±11,6
t2	102,3±10,0	94,5±11,0	91,3±10,0
t3	98,7±7,1	101,7±10,2	88,9±11,2

Legenda: Os valores são apresentados em % em relação ao basal e representados pela média ± DP. As medidas foram realizadas no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7).

Fonte: O autor, 2016.

Gráfico 7 – Evolução do diâmetro venular durante o experimento de acordo com o grupo e momento de observação: análise intergrupo



Legenda: Os marcadores e barras de erro inseridos no gráfico representam os valores da média e do desvio padrão, respectivamente. Os valores, apresentados em % em relação ao basal, foram medidos no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1), 15 minutos após a ressuscitação volêmica (t2) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA, no mesmo momento de observação.

Fonte: O autor, 2016.

O diâmetro venular dos animais do grupo *SHAM* não variou de forma significativa durante o experimento. Nos grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), a indução de sepse determinou uma redução não significativa do diâmetro venular em relação ao valor basal medido para o grupo (t1). Assim como observado no grupo *SHAM*, a ressuscitação volêmica aumentou de forma não significativa o diâmetro venular nos grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA (t2). Em t3, foi observado no grupo CLP-SALINA um diâmetro venular final maior que o valor medido para o grupo em t2 (diferença intragrupo não significativa vs. t2). Esse aumento do diâmetro venular em t3 não foi observado nos animais tratados com

ivabradina (o valor permaneceu relativamente estável em relação àquele observado em t2). Esse padrão de resposta determinou diferença estatisticamente significativa entre os diâmetros venulares observados nos dois grupos sépticos em t3.

4.5 **Análises Laboratoriais do Sangue Arterial**

4.5.1 Gasometria arterial e lactato

Os resultados das análises laboratoriais referentes à gasometria arterial e lactato e as diferenças intergrupo estatisticamente significativas são apresentados na tabela 10.

Comparando-se o grupo *SHAM* com o grupo CLP-CONTROLE, observou-se que a indução de sepse determinou aumento significativo na concentração de lactato. Comparando-se os três grupos sépticos (CLP-CONTROLE, CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), observou-se que a ressuscitação volêmica foi capaz de reduzir significativamente os níveis de lactato nos grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA, sendo que a maior redução foi observada em animais tratados com ivabradina.

Comparando-se o grupo *SHAM* com o grupo CLP-CONTROLE, observou-se que a indução de sepse determinou redução significativa do HCO_3, BE e TCO_2 arteriais, sem alteração no pH. Analisando-se os três grupos sépticos, foi observada redução acentuada do pH, HCO_3 e BE arteriais no grupo de CLP-SALINA, o que determinou diferenças estatisticamente significativas entre esse grupo e qualquer outro grupo.

Comparando-se o grupo *SHAM* com os demais grupos, observou-se que a indução de sepse determinou aumento significativo da PO_2.

Tabela 10 – Gasometria arterial e lactato de acordo com o grupo

Variável	Grupo			
	SHAM	**CLP-CONTROLE**	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Lactato ($mmol.l^{-1}$)	1,2±0,3	2,7±0,7*	2,0±0,4*#	1,4±0,1#
pH	7,40±0,03	7,39±0,07	7,22±0,02§	7,35±0,04
HCO_3 ($mmol.l^{-1}$)	33,3±4,0	23,3±6,2*	15,7±3,5§	26,7±2,5*
BE ($mmol.l^{-1}$)	8,5±4,5	-1,4±6,1*	-12,0±3,1§	1,0±2,9*
TCO_2 ($mmol.l^{-1}$)	33,7±7,2	24,0±8,3*	16,0±5,2*	28,4±3,0†
PaO_2 (mmHg)	61,8±6,2	89,8±6,8*	103,5±18.3*	81,2±12,3*†

Legenda: Os valores são representados pela média ± DP. A coleta de sangue arterial para realização de gasometria e dosagem de lactato ocorreu imediatamente após t4. *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-CONTROLE, animais sépticos, não ressuscitados volemicamente e não tratados com salina a 0,9% ou ivabradina (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). pH, potencial hidrogeniônico; HCO_3, bicarbonato; BE, excesso de bases; TCO_2, dióxido de carbono total; PaO_2, pressão parcial de oxigênio no sangue arterial. * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*; # p <0,05 em comparação ao grupo CLP-CONTROLE; † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA; § p <0,05 em comparação a qualquer outro grupo.

Fonte: O autor, 2016.

4.5.2 Hemograma

Os resultados das análises laboratoriais referentes ao hemograma e as diferenças intergrupo estatisticamente significativas são apresentados na tabela 11.

O hematócrito foi significativamente maior nos grupos CLP-CONTROLE e CLP-SALINA em comparação aos demais grupos.

Comparando-se os três grupos sépticos (CLP-CONTROLE, CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA) ao grupo *SHAM*, observou-se que a indução de sepse determinou

redução significativa da leucometria. Na comparação entre os três grupos sépticos, observou-se que a maior redução do número total de leucócitos ocorreu no grupo CLP-SALINA, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa.

A contagem de plaquetas foi significativamente maior no grupo CLP-CONTROLE em comparação aos grupos *SHAM* e CLP-IVABRADINA.

Tabela 11 – Hematócrito, leucometria e contagem de plaquetas de acordo com o grupo

Variável	Grupo			
	SHAM	**CLP-CONTROLE**	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Hematócrito (%)	44,0±0,9	48,4±3,6*	49,5±2,6*	42,8±2,8#†
Leucometria ($n.mm^{-3}$)	12.475±4.232	4.840±1.242*	2.475±1.431*	5.200±1.219*
Contagem de plaquetas ($n.mm^{-3}$)	269.750 ±46.557#	369.200 ±45.882	295.000 ±65.054	266.750 ±45.110#

Legenda: Os valores são representados pela média ± DP. A coleta de sangue arterial para realização de hemograma ocorreu ao final do período de experimentação. *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-CONTROLE, animais sépticos, não ressuscitados volemicamente e não tratados com salina a 0,9% ou ivabradina (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*; # p <0,05 em comparação ao grupo CLP-CONTROLE; † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA.

Fonte: O autor, 2016.

4.5.3 Bioquímica

Os resultados das análises laboratoriais referentes à bioquímica e as diferenças intergrupo estatisticamente significativas são apresentados na tabela 12.

Comparando-se os três grupos sépticos (CLP-CONTROLE, CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA) ao grupo *SHAM*, observou-se que a indução de sepse determinou redução significativa da glicose sérica. Na comparação entre os três grupos sépticos,

observou-se que a maior redução da glicemia ocorreu no grupo CLP-SALINA, apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa.

A bilirrubina total, ureia e creatinina séricas foram significativamente maiores no grupo CLP-SALINA em comparação aos demais grupos.

Tabela 12 – Glicose, bilirrubina total, ureia e creatinina de acordo com o grupo

	Grupo			
Variável	***SHAM***	**CLP-CONTROLE**	**CLP-SALINA**	**CLP-IVABRADINA**
Glicose ($mg.dl^{-1}$)	121,3±46,0	40,2±17,1*	13,3±3,5*	42,4±11,0*
Bilirrubina total ($mg.dl^{-1}$)	0,05±0,01	0,09±0,05	0,14±0,03§	0,08±0,01
Ureia ($mg.dl^{-1}$)	36,8±8,6	43,6±15,3	193,5±64,2§	37,4±10,7
Creatinina ($mg.dl^{-1}$)	0,3±0,1	0,3±0,1	0,6±0,4§	0,2±0,1

Legenda: Os valores são representados pela média ± DP. A coleta de sangue arterial para realização das análises bioquímicas ocorreu ao final do período de experimentação. Todas as dosagens foram realizadas no soro. *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-CONTROLE, animais sépticos, não ressuscitados volemicamente e não tratados com salina a 0,9% ou ivabradina (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*; § p <0,05 em comparação a qualquer outro grupo.

Fonte: O autor, 2016.

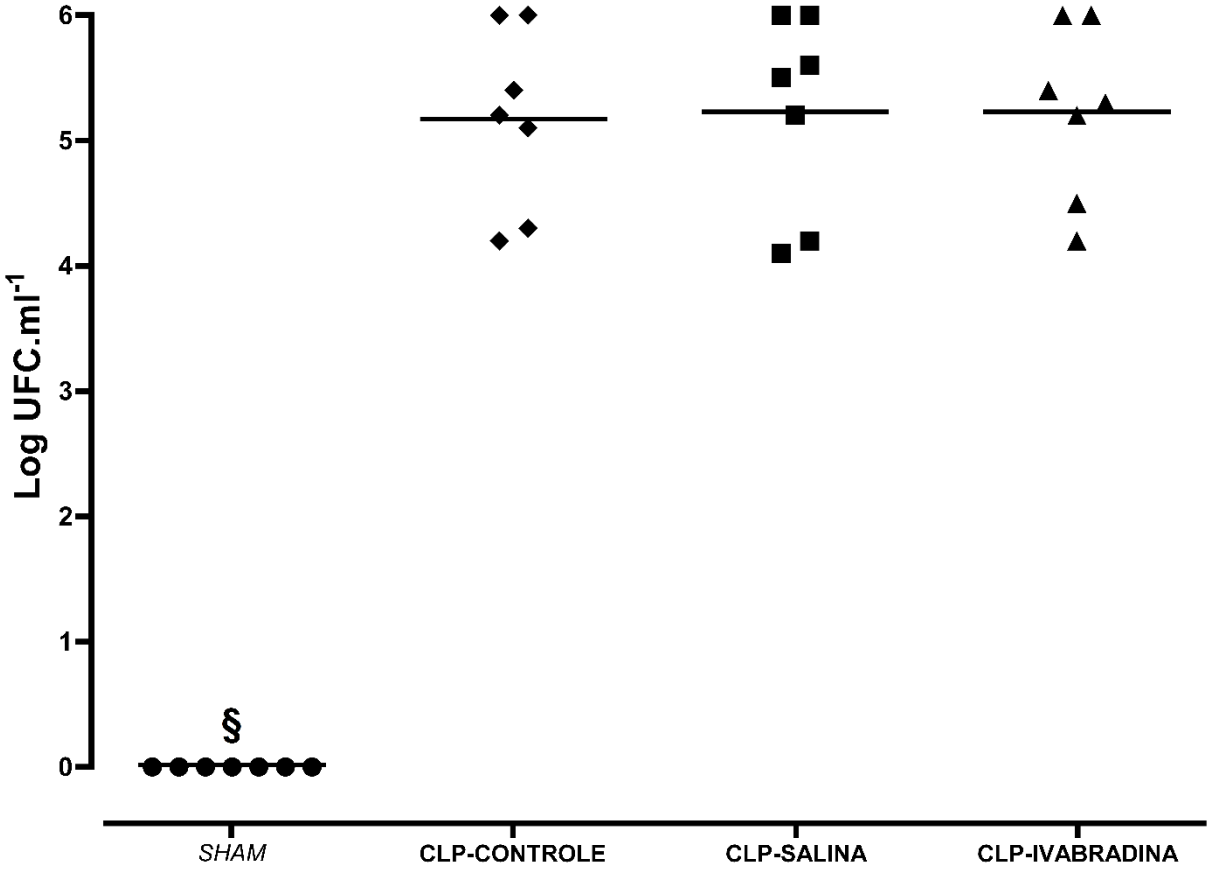
4.5.4 Hemocultura

Os resultados das análises laboratoriais referentes à hemocultura e as diferenças intergrupo estatisticamente significativas são apresentados no gráfico 8.

A quantidade de unidades formadoras de colônias bacterianas observada em amostras de sangue de animais sépticos (grupos CLP-CONTROLE, CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA) foi significativamente maior do que aquela observada no grupo

SHAM. Por outro lado, na comparação entre os três grupos sépticos não foram observadas diferenças significativas nessa variável.

Gráfico 8 – Contagem de unidades formadoras de colônias bacterianas na cultura de sangue arterial em animais sépticos e não sépticos



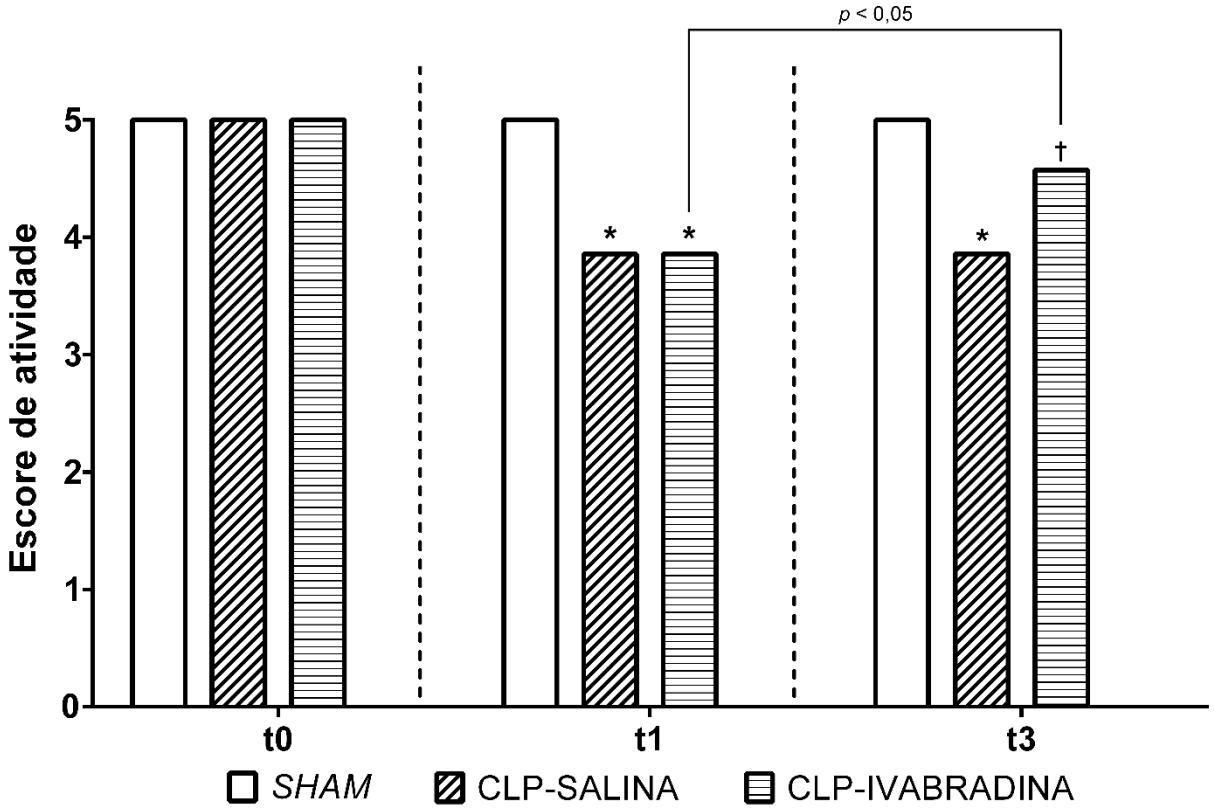
Legenda: Os valores são apresentados em escala logarítmica. Cada símbolo representa um animal individualmente e a barra representa a média do grupo. A coleta de sangue arterial para realização de hemocultura ocorreu ao final do período de experimentação. *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-CONTROLE, animais sépticos, não ressuscitados volemicamente e não tratados com salina a 0,9% ou ivabradina (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). UFC.ml^{-1}, unidades formadoras de colônias por mililitro. § p <0,05 em comparação a qualquer outro grupo.

Fonte: O autor, 2016.

4.6 **Escore de Atividade**

Os valores do escore de atividade encontrados e as diferenças intergrupo estatisticamente significativas, por momento de observação, são apresentados no gráfico 9. A diferença intragrupo estatisticamente significativa representada no gráfico foi apresentada por ser considerada de interesse clínico para o presente estudo; as demais estão relacionadas a redução dessa variável após a indução de sepse e foram intencionalmente omitidas.

Gráfico 9 – Escore de atividade por grupo e momento de observação



Legenda: As barras representam os valores das medianas. Os valores foram medidos no *baseline* (t0), imediatamente antes da ressuscitação volêmica (t1) e após 4 horas de infusão de salina a 0,9% ou ivabradina (t3). *SHAM*, animais sem indução de sepse, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-SALINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (n=7); CLP-IVABRADINA, animais sépticos, ressuscitados volemicamente com salina a 0,9% e tratados com ivabradina (n=7). * p <0,05 em comparação ao grupo *SHAM*; † p <0,05 em comparação ao grupo CLP-SALINA.
Fonte: O autor, 2016.

O escore de atividade dos animais do grupo *SHAM* não variou de forma significativa durante o experimento. Nos grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-

IVABRADINA), a indução de sepse determinou uma redução significativa desse escore em relação ao valor basal medido para o grupo (t0 vs. t1). O tratamento com ivabradina aumentou o escore de atividade no grupo CLP-IVABRADINA (diferença intragrupo significativa na análise t1 vs. t3). Esse aumento do escore em t3 não foi observado nos animais sépticos tratados com salina a 0,9% (o valor permaneceu estável em relação àquele observado em t1). Esse padrão de resposta determinou diferença estatisticamente significativa entre os escores de atividade observados nos dois grupos sépticos em t3.

4.7 **Necropsia**

Conforme anteriormente mencionado, três animais foram excluídos do estudo por apresentarem alterações na necropsia:

a) em um animal a necropsia revelou extensa isquemia enteromesentérica associada a hematoma mesentérico;
b) em dois animais a necropsia revelou volumoso hematoma, um na ferida operatória abdominal (hematoma de parede) e outro no túnel subcutâneo utilizado para tunelização dos cateteres vasculares.

Todos os animais sépticos apresentaram isquemia e necrose do segmento cecal ligado. Também foi comum a observação de ascite e coleções intra-abdominais após a indução de sepse por CLP.

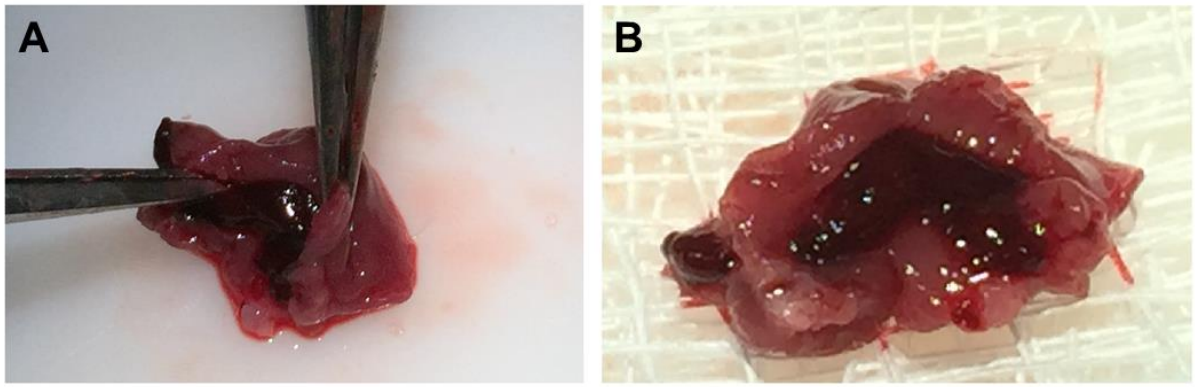
Foi observada a formação de derrame pleural volumoso (não quantificado) na maioria dos animais alocados no grupo CLP-SALINA. Esse derrame não foi observado em animais dos grupos *SHAM* e CLP-CONTROLE e foi raramente observado em animais do grupo CLP-IVABRADINA.

Nos animais do grupo CLP-SALINA, o estudo macroscópico do cérebro demonstrou evidente alteração da consistência desse órgão. Na avaliação subjetiva, o cérebro desses animais era mais amolecido e friável que o dos demais.

Após a abertura do ventrículo esquerdo, o estudo macroscópico do coração demonstrou a presença de coágulos intracardíacos na quase totalidade dos animais dos grupos *SHAM*, CLP-CONTROLE e CLP-IVABRADINA (Figura 14). Todos os

animais do grupo CLP-SALINA apresentaram ausência completa de formação desses coágulos.

Figura 14 – Formação de coágulos intracardíacos



Legenda: As fotografias mostram a presença de coágulo intracardíaco (vermelho escuro) em coração de animal do grupo *SHAM*. Em A, o coágulo pode ser observado durante a abertura microcirúrgica do ventrículo esquerdo. Em B, a cavidade ventricular esquerda, com o coágulo em seu interior, foi posicionada em destaque.
Fonte: O autor, 2016.

5 **DISCUSSÃO**

5.1 **O que Foi Novo e Digno de Nota**

No presente estudo experimental controlado, o modelo de sepse abdominal por CLP induziu padrão micro-hemodinâmico compatível com uma circulação hipodinâmica e hipovolêmica na câmara dorsal de hamsters dourados.

Como esperado, a ressuscitação volêmica reverteu ou atenuou grande parte dos distúrbios microcirculatórios provocados pela sepse experimental, mas um efeito benéfico sustentado apenas foi observado em animais sépticos tratados com ivabradina (grupo CLP-IVABRADINA). Além disso, esses animais apresentaram menor número de disfunções orgânicas e melhores resultados de parâmetros metabólico-perfusionais que aqueles tratados com salina a 0,9% (grupo CLP-SALINA).

Portanto, o principal resultado do presente estudo, considerado uma novidade entre as ações por ora relatadas para a ivabradina, foi que o tratamento com essa droga exerceu efeitos protetores sobre a microcirculação de hamsters sépticos ressuscitados volemicamente, melhorando a perfusão tecidual e reduzindo a disfunção orgânica.

5.2 **Sobre o Delineamento de Estudo**

Na fase de elaboração do presente estudo procurou-se a construção de um delineamento simples e direto (*straightforward*) que ao mesmo tempo permitisse a extração do maior número de informações com o menor uso de animais possível. Outra preocupação, sempre presente, foi a de mimetizar experimentalmente a abordagem terapêutica proposta para a sepse clínica, aumentando o caráter translacional do presente estudo.

Na descrição original do modelo de sepse abdominal por CLP, Wichterman e colaboradores[23] observaram que 10 horas após a realização de CLP os ratos

demonstravam padrão hemodinâmico compatível com a fase hiperdinâmica da sepse, apresentando fluxo sanguíneo elevado para órgãos e tecidos; no entanto, após 16-24 horas do procedimento cirúrgico, os animais apresentavam redução do fluxo sanguíneo e níveis elevados de lactato, caracterizando padrão hipodinâmico. De forma semelhante, na sepse clínica o quadro inicial de elevação do débito cardíaco, redução da resistência vascular periférica e de elevado consumo de oxigênio é revertido à medida que a sepse progride. Percebe-se que a resposta hemodinâmica observada no modelo CLP se correlaciona com aquela apresentada por pacientes sépticos. Posto isso, o momento de análise da microcirculação utilizado no presente estudo - 24 horas após a indução de sepse por CLP - foi escolhido com intuito de observar a ação da ivabradina na fase hemodinâmica apresentada por grande parte dos pacientes sépticos ao serem admitidos nas unidades de emergência ou de terapia intensiva: a fase hipodinâmica.

Em pacientes sépticos, a recuperação dos parâmetros hemodinâmicos e perfusionais pode ocorrer após a ressuscitação volêmica, fazendo desta um elemento-chave do tratamento da sepse. Torna-se evidente um dos motivos da inclusão da ressuscitação volêmica no protocolo experimental: reproduzir o manejo da sepse utilizado em humanos. Outros determinantes da ressuscitação volêmica no presente estudo são discutidos adiante.

A duração da infusão venosa contínua de ivabradina, mantida por 4 horas, foi escolhida com base em estudo prévio de Miranda e colaboradores[39] que sugeriu esse tempo de tratamento como suficiente para a reversão de desarranjos microcirculatórios induzidos pela sepse experimental. Cabe ressaltar que a droga utilizada nesse estudo, a dexmedetomidina, também possui ação cronotrópica negativa.

Por fim, postula-se que a maior limitação do delineamento de estudo adotado esteja relacionada à interpretação dos dados obtidos no grupo CLP-CONTROLE. O protocolo experimental parcial a que esse grupo foi submetido impôs importantes diferenças em termos de tempo de jejum e grau de hidratação em relação aos demais grupos. Essas diferenças podem ter interferido sobretudo nos resultados de bioquímica e devem ser levadas em conta na análise crítica dos resultados.

5.3 **Sobre o Modelo de Sepse**

No presente estudo, a opção por um estudo experimental em detrimento de uma pesquisa clínica baseou-se no grande número de variáveis que teriam que ser controladas em um estudo versando sobre a sepse em humanos. O uso de modelos animais possibilita a restrição desse número de variáveis, facilitando a análise estatística e crítica dos resultados. Além disso, por questões éticas, algumas avaliações não poderiam ser realizadas em seres humanos.

Modelos de sepse tradicionalmente utilizados, como o modelo de endotoxemia e o de inóculo de bactérias, não são capazes de mimetizar as complexas alterações que ocorrem na sepse clínica. Dessa forma, diversas perturbações e/ou adaptações cardiovasculares, respiratórias, metabólicas, hormonais, inflamatórias e imunológicas presentes em pacientes sépticos não são suficientemente reproduzidas.[25] Esses modelos são caracterizados pela rápida elevação de citocinas inflamatórias a níveis muito maiores que aqueles observados na sepse clínica, o que levou alguns autores a retratá-los como verdadeiras intoxicações.[135,26] Dessa forma, são melhor definidos como modelos de choque endotóxico e não como modelos de sepse. Além disso, o perfil de elevação de citocinas é claramente diferente daquele observado em pacientes sépticos. Especificamente, a injeção de lipopolissacarídeo é extremamente dependente de sinalização pelo TLR4, representando apenas um aspecto da resposta imune. Todas essas limitações reduzem a relevância clínica desses modelos.[25]

Além da dificuldade de translação dos resultados, outra desvantagem dos modelos de endotoxemia ou de inóculo de bactérias é a sua natureza aguda, permitindo a avaliação microcirculatória ideal apenas nas primeiras horas após a exposição ao agente indutor, não refletindo os aspectos fisiopatológicos relacionados à liberação periódica de bactérias e/ou endotoxinas que ocorre em períodos de avaliação mais prolongados, como o utilizado no presente estudo.[100]

Conforme previamente apresentado na revisão sobre o modelo CLP, observam-se nesse modelo de sepse diversos aspectos da fisiopatologia e evolução da sepse clínica, constituindo um modelo adequado para utilização em pesquisas com intuito translacional, sendo essa uma razão suficiente para utilização desse modelo no presente estudo.[25]

Devido à pouca padronização na literatura e experiência prévia da equipe com a aplicação do modelo de CLP na espécie estudada, hamsters dourados, inicialmente foi realizado um estudo piloto (Apêndice A). Nesse, foi possível definir o protocolo experimental a ser adotado (ligadura de 50% do ceco e perfuração única do mesmo por agulha 20 Gauge) e as consequências clínicas do mesmo, como alterações hemodinâmicas e mortalidade. De maneira interessante, os resultados obtidos no presente estudo indicam que a padronização experimental do modelo de CLP utilizada mimetizou adequadamente um quadro de sepse conforme definição estabelecida pela terminologia “Sepse-3”: infecção documentada, acompanhada de disfunção orgânica (no caso, renal, hepática e neurológica).[17] Além disso, os animais sépticos apresentaram alterações significativas das variáveis anatomofuncionais da microcirculação e dos parâmetros gasométricos e metabólicos arteriais, pouca repercussão na pressão arterial média, o que é ótimo para realização de estudos microcirculatórios, e taquicardia pouco responsiva à ressuscitação volêmica, permitindo o estudo da ivabradina em cenário clínico similar àquele proposto para seu uso.

A principal limitação do modelo CLP encontrada na literatura está relacionada à dificuldade de reprodutibilidade do procedimento entre diferentes grupos de pesquisadores. Muitas vezes, a descrição do método experimental utilizado é falha ou incompleta, além de não conseguir expressar elementos de difícil avaliação, como a diferença de trauma cirúrgico entre pesquisadores mais ou menos experientes em relação à técnica. Diferenças no tamanho e flora bacteriana cecal entre animais, no conteúdo de fezes no ceco no momento da cirurgia e/ou no conteúdo de fezes liberada para cavidade abdominal após a expressão do ceco também podem gerar importante inconsistência metodológica.[27,28,136]

Objetivando-se reduzir o número de variáveis que poderiam enviesar os resultados, todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados por um único pesquisador, após 18 meses de aprendizado e treino da técnica. Para a realização do CLP seguiu-se atentamente protocolo publicado por Rittirsch e colaboradores[27], reconhecido como padrão técnico para pesquisas com o modelo. Além disso, não foi realizada expressão do ceco para extrusão de fezes, limitando o número de variáveis possivelmente confundidoras. Finalmente, apesar da prescrição de período pré-operatório de jejum já ter sido descrita na literatura como forma de reduzir diferenças no conteúdo cecal de fezes entre os animais, preferiu-se evitar tal prática no presente

estudo, dada possível interferência em parâmetros metabólicos, como na glicemia (discutido adiante).

5.4 **Sobre o Modelo Experimental de Avaliação da Microcirculação**

Modelos experimentais de avaliação da microcirculação que envolvam preparações agudas exigem, por razões éticas, que o animal esteja anestesiado, impossibilitando a avaliação sem a interferência de drogas anestésicas e/ou sedativas. Isto é bastante importante em estudos que versam sobre drogas com efeito cronotrópico negativo, pois o uso concomitante de sedativos ou anestésicos pode determinar alterações fisiológicas ou fisiopatológicas que impossibilitem a avaliação do efeito farmacológico da droga em estudo. Esta interferência pode ser ainda maior em estudos sobre inflamação e sepse, dado o já conhecido efeito da sedação sobre a resposta autonômica, imunológica e inflamatória.[137]

Por esses motivos, a utilização de um modelo crônico, em animais não anestesiados, foi primordial para o presente estudo. Por ser um modelo já bastante utilizado há três décadas e validado pela literatura, o modelo da câmara dorsal foi escolhido.[99] A boa adaptação do animal acordado à câmara implantada e a ausência de sofrimento são reconhecidas pela observação de um padrão normal de alimentação, higiene e sono nos animais. Outra vantagem do modelo que foi considerada é a possibilidade de avaliação da microcirculação com menor interferência da manipulação cirúrgica prévia, visto que é permitido ao tecido examinado tempo de recuperação após o implante da câmara.[101]

Na escolha da espécie foi considerado que o uso de roedores como modelo animal para estudos de alterações na microcirculação por microscopia intravital é tido como ideal.[138] Apesar de já ter sido descrito em ratos e camundongos, espécies de roedores de menor custo e com maior definição genética, o modelo da câmara dorsal é, por razões anatômicas, mais utilizado em hamsters. Entre as diferenças anatômicas que facilitam a preparação da câmara dorsal em hamsters, cita-se a fraca ligação entre o músculo retrator e o músculo subjacente, o panículo carnoso, sem muitas interligações vasculares entre as duas camadas musculares. Por conseguinte, o músculo retrator pode ser facilmente removido com menor trauma cirúrgico. Além

disso, a prega cutânea em hamsters é caracterizada por uma maior translucidez em relação a outros roedores, devido a uma camada mais fina de músculo panículo carnoso, resultando em melhor qualidade de imagem microscópica.[101] Essas vantagens no uso de hamsters foram consideradas na escolha da espécie animal para o estudo.

Numa primeira análise, o estudo da microcirculação na pele e no músculo subcutâneo pode não ser necessariamente representativo das alterações microcirculatórias encontradas em outros órgãos, como os órgãos esplâncnicos. Tal fato poderia ser considerado uma grande limitação do modelo experimental de avaliação da microcirculação utilizado, pois em estudos que versam sobre a ação de drogas na microcirculação durante a sepse, a avaliação do efeito da droga em estudo na perfusão do território da circulação esplâncnica é importante, tendo em vista que a hipoperfusão intestinal é um dos determinantes da ocorrência de translocação bacteriana, sendo esse fenômeno um dos responsáveis pelo agravamento do quadro séptico e da falência de órgãos e, portanto, pela morte dos pacientes.[139] Além disso, a hipoperfusão esplâncnica é clinicamente importante por ser um dos primeiros indicadores da hipoperfusão sistêmica no choque circulatório.[48]

Apesar desta aparente limitação, já foi demonstrado que as respostas microcirculatórias à indução de sepse parecem ser ubíquas, além de possuírem mecanismos fisiopatológicos comuns, sendo comparáveis em diferentes tecidos e órgãos.[83] De forma complementar, também já foi demonstrada uma boa correlação entre as alterações induzidas pela sepse na microcirculação da mucosa do intestino delgado e do músculo estriado da câmara dorsal.[100] Finalmente, no presente estudo, disfunções orgânicas, renal e hepática, foram observadas majoritariamente nos animais com pior perfusão na microcirculação da câmara dorsal (animais sépticos tradados com salina a 0,9%; grupo CLP-SALINA). No entanto, nenhuma inferência estatística foi realizada a esse respeito.

5.5 **Sobre a Dose de Ivabradina**

A pesquisa acerca do efeito de drogas em pequenos animais oferece desafios relacionados à dificuldade de extrapolação de doses de drogas já definidas para

animais maiores ou para humanos e à relativa falta de estudos científicos sobre a eficácia dessas drogas em roedores, sobretudo na espécie estudada, hamsters dourados.[140,141]

Durante a revisão da literatura para a elaboração do projeto de pesquisa, não foi possível definir a dose de ivabradina a ser utilizada em hamsters, em bolus ou em infusão contínua intravenosa, para obtenção do efeito macro-hemodinâmico desejado: um animal normotenso e com frequência cardíaca reduzida em cerca de 20-30% em relação à frequência pré-intervenção.

Por essa limitação, a dose bolus intravenosa utilizada no presente estudo, de 2,0 $mg.kg^{-1}$, foi obtida por extrapolação daquela estudada por Sprenger e colaboradores[142] em ratos anestesiados. Essa dose foi escolhida por ter comprovada segurança de uso em murinos. Já a dose de manutenção, de 0,5 $mg.kg^{-1}.h^{-1}$, foi arbitrariamente definida, com base em cálculos farmacocinéticos simples, com intuito de manter a concentração sérica constante.

Com essas doses, os animais tratados com ivabradina incluídos no estudo apresentaram importante redução da frequência cardíaca, sem alterações significativas da pressão arterial média, excetuando-se o momento de observação t2 (15 minutos após o bolus de ivabradina; Gráficos 1 e 2). Mesmo em t2, a queda da pressão arterial média foi considerada pouco significativa do ponto de vista clínico.

As doses de ivabradina encontradas na literatura para uso em roedores são, de uma forma geral, extremamente altas quando comparadas àquelas preconizadas para uso em humanos (dose bolus intravenosa em humanos: 0,1 $mg.kg^{-1}$).[129] Farmacologicamente, esta diferença é explicada pelos eventos fisiológicos relacionados à absorção, distribuição e eliminação de drogas no organismo de animais de menor porte, que são diferentes daqueles observados em animais de maior porte. Por terem elevadas taxas metabólicas, animais de menor porte tendem a ter necessidade de maiores doses de drogas, em relação à sua massa corporal. Em animais menores, as drogas tendem a ter absorção, distribuição e excreção mais rápidas que nos maiores. Isto significa que, para manter níveis séricos efetivos de uma determinada droga, a dose e a frequência de administração devem ser maiores que aquelas utilizadas em animais de maior porte.[140,141]

Considerando possíveis alterações farmacocinéticas secundárias à sepse e disfunções orgânicas associadas, acredita-se que a dosagem do nível sérico de ivabradina poderia complementar os resultados e as análises realizadas no presente

estudo. Desta forma, a ausência deste dado pode ser entendida como uma limitação do estudo.

5.6 **Sobre os Grupos Controle**

A comparação dos resultados encontrados no grupo séptico tratado com ivabradina com aqueles encontrados em animais *sham* ou sépticos ressuscitados volemicamente e tratados com salina a 0,9% (grupos *SHAM* e CLP-SALINA) foi capaz de auxiliar, em parte, no estudo das ações microcirculatórias da ivabradina.

Afirma-se que o auxílio foi parcial, pois, na verdade, o resultado de qualquer estudo que tenha como objetivo a avaliação das alterações decorrentes do uso de um determinado fármaco com atividade cronotrópica negativa deveria ser comparado com aquele obtido quando outra droga de atividade semelhante, mas de classe diferente, é utilizada. Isto é importante para que os resultados obtidos possam ser associados à ação do fármaco *per se* e não a um efeito puramente hemodinâmico relacionado à própria redução da frequência cardíaca.

O esmolol é um fármaco betabloqueador comumente utilizado em pesquisas que versam sobre o controle da frequência cardíaca na sepse e, por esta razão, poderia ter sido utilizado como a droga cronotrópica negativa à qual a ivabradina deveria ser comparada. No entanto, seu uso não foi previsto no projeto, exatamente por já ser uma droga extremamente estudada, inclusive em humanos, com diversos artigos publicados sobre seus efeitos na microcirculação e perfusão orgânica. Dessa forma, mesmo sem a constituição de um grupo controle tratado com esmolol, é possível a comparação dessa droga com a ivabradina com base na literatura disponível. Ressalta-se, no entanto, que na maioria das comparações os resultados devem ser extrapolados para a espécie estudada no presente estudo, hamsters sírios dourados.

O uso de marcapasso cardíaco para elevação da frequência cardíaca dos animais tratados com ivabradina poderia ter auxiliado na diferenciação entre efeitos não cardíacos (pleitrópicos) da droga e efeitos relacionados à redução da frequência cardíaca. A ausência desse grupo pode ser reconhecida como uma das principais limitações do presente estudo, impedindo maior definição dos efeitos farmacológicos

da ivabradina sobre a microcirculação. No entanto, a instalação do marcapasso exigiria a constituição de novos grupos experimentais, o que fugiria à proposta inicial do estudo.

Estudos prévios realizados no laboratório BioVasc-UERJ apontaram para a futilidade na constituição de grupo *sham* tratado com ivabradina, tendo em vista que, nesse cenário experimental, a única alteração de interesse clínico observada foi a redução da frequência cardíaca.

Como a coleta de sangue em pequenos roedores implica em grande alteração da homeostase, ou mesmo na morte do animal, não foi possível a avaliação dos valores pré-ressuscitação volêmica de variáveis gasométricas, hematológicas e bioquímicas para os animais alocados nos grupos *SHAM*, CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA. Dessa forma, o grupo CLP-CONTROLE (grupo séptico não ressuscitado) foi incluído no delineamento do estudo para obtenção dos valores pré-ressuscitação volêmica dessas variáveis, considerados importantes para o entendimento de fenômenos associados ao tratamento com volume e que de outra forma não seriam conhecidos. Os resultados do presente estudo transparecem a importância da inclusão desse grupo, todavia, como anteriormente discutido, é possível que o protocolo experimental modificado ao qual esses animais foram submetidos tenha enviesado a informação oferecida e as conclusões.

5.7 **Sobre o Número de Animais, Critérios de Inclusão e Exclusão, Cegamento e Valores Basais Encontrados**

O laboratório BioVasc-UERJ possui experiência prévia com um tamanho amostral de 5-12 animais por grupo em estudos que utilizaram o modelo da câmara dorsal e a indução de sepse por administração de lipopolissacarídeo. No entanto, a introdução do modelo de sepse por CLP adicionou um novo elemento ao presente estudo. À vista disso, o número de animais alocados em cada grupo no presente estudo foi definido de forma arbitrária e não com base em cálculos de tamanho amostral. Esta decisão foi fundamentada no ineditismo da avaliação realizada, não havendo dados na literatura que seriam necessários ao cálculo do tamanho amostral, e nas questões éticas envolvidas, não sendo eticamente adequado o uso de um

número excessivo de animais em estudo piloto ou na pesquisa em si. A opção por alocar sete animais por grupo foi baseada nos valores mínimos necessários para a realização do teste estatístico de verificação da suposição de normalidade, considerando também a possibilidade de perda de animais, por morte, durante o experimento (o que não ocorreu). A possível perda de poder estatístico ocasionada pela ausência de cálculo do tamanho amostral e os problemas estatísticos inerentes ao tratamento matemático de amostras pequenas podem ser entendidos como limitações do presente estudo.

O amplo critério de inclusão utilizado, limitado apenas pelo peso e sexo dos animais, é aceito em pesquisas experimentais devido à grande similaridade encontrada entre os animais. No entanto, apesar de bastante parecidos, os animais não são isogênicos e apresentam diferentes respostas à manipulação cirúrgica para preparação do modelo da câmara dorsal ou indução da sepse. Esse fato é corroborado pela grande incidência de inflamação da câmara dorsal observada em algumas ninhadas e pequena em outras.

A taxa de perda de animais por inflamação/hemorragia da câmara, de cerca de 23%, é menor do que aquela normalmente encontrada em outros estudos realizados no mesmo laboratório (cerca de 50%; dados não publicados) e provavelmente se deve a implementação de diversos cuidados técnicos durante o implante microcirúrgico da câmara. Isso contribuiu para maior homogeneidade entre os grupos e para o uso de menor número de animais.

É fato que problemas inerentes à manipulação experimental podem afetar a saúde dos animais, gerando grande desvio da normalidade. Desta forma, acredita-se que, no presente estudo, a aplicação de critérios de exclusão tenha sido fundamental para garantir a homogeneidade entre os grupos, excluindo animais impróprios para a análise, *outliers* e/ou doentes.

Além da aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, acredita-se que a randomização teria contribuído para o fortalecimento metodológico do estudo. A realização simultânea de animais tratados com salina a 0,9% ou com ivabradina teria sido capaz de distribuir entre os grupos eventuais diferenças entre ninhadas ou problemas metodológicos não esperados ou detectados. Infelizmente, aspectos práticos relacionados à operacionalização da randomização impossibilitaram a realização da mesma.

Finalmente, o cegamento dos dados durante a fase de análise das gravações permitiu grande isenção do avaliador reduzindo o risco de viés.

Os valores basais de todas as variáveis estudadas foram bastante homogêneos entre os grupos, não sendo observadas diferenças estatísticas. Cabe salientar que esses valores também foram comparáveis àqueles descritos na literatura como padrão de normalidade para hamsters sírios dourados.[100]

5.8 **Sobre a Volemia**

Todos os animais incluídos no estudo foram alimentados e receberam água filtrada *ad libitum* até o início de cada etapa do protocolo experimental (sem período de jejum pré-operatório ou pré-experimento). A ausência deste período de jejum pode ser justificada da seguinte forma:

a) A possibilidade de regurgitação/broncoaspiração durante o ato anestésico não justifica o jejum pré-operatório visto que pequenos roedores não apresentam regurgitação durante a indução ou recuperação da anestesia;[143]
b) Em animais de pequena massa corpórea e alta taxa metabólica como os roedores, o período de jejum pré-operatório ou pré-experimento leva rapidamente à desidratação;[144]
c) A oferta de água filtrada *ad libitum* possibilita, de forma fácil e reprodutível, uma uniformidade de hidratação pré-experimento entre os animais, visto que a ingesta de água estaria associada à sede do animal, ou seja, seria controlada por mecanismos fisiológicos bastante eficazes.

Além da atenção à ingesta de água, todos os animais incluídos no estudo foram submetidos às mesmas condições de temperatura e umidade durante todo o período de preparação e de realização dos experimentos.

Após despertarem da anestesia para realização de CLP ou procedimento cirúrgico controle os animais são capazes de ingerir água espontaneamente.[26] Apesar disso, foi procedida etapa de ressuscitação volêmica com salina a 0,9% subcutânea

ao final desses procedimentos cirúrgicos. Essa etapa faz parte da maioria dos protocolos experimentais descritos na literatura e visa repor as perdas hídricas decorrentes do trauma cirúrgico e exposição de alças intestinais, para manter adequada função cardiocirculatória.[27] A ausência dessa etapa de ressuscitação determina o surgimento de perfil hemodinâmico e metabólico extremamente desfavorável com alta mortalidade nas primeiras 24 horas, o que seria indesejável ao delineamento experimental proposto para o presente estudo.

Apesar de todos esses cuidados, acredita-se que os animais do grupo *SHAM*, menos inflamados, possam ter consumido mais água e praticado mais atividade física que os animais sépticos nas 24 horas seguintes à realização de CLP ou procedimento cirúrgico controle, tendo um balanço hídrico diferente dos demais. Mesmo assim, considera-se que qualquer diferença pré-experimento na ingesta de água ou na sua perda tenha sido mínima e homogeneamente distribuída entre os grupos (principalmente entre os grupos sépticos), o que não justificaria as alterações macro e micro-hemodinâmicas encontradas.

Para realização dos experimentos microcirculatórios, os animais foram mantidos em tubos de acrílico e, portanto, sem acesso à água. A partir da sua acomodação nos tubos, a hidratação dos animais foi realizada somente por via parenteral, de forma estritamente controlada e semelhante entre todos os animais. Segundo Lester e colaboradores[145], roedores requerem uma maior quantidade de líquido para a manutenção da hidratação que os animais de maior porte, sendo normal uma necessidade diária em torno de 100 $ml.kg^{-1}$ de peso corporal. Apesar dessa alta necessidade hídrica, a manipulação da sobrecarga volêmica é precária e uma taxa de infusão parenteral igual ou superior a 10 $ml.kg^{-1}.h^{-1}$ por período maior que 2 horas pode levar à hemodiluição e importante edema intersticial. Desta forma, é indicada uma taxa de hidratação venosa entre 5,0 e 8,0 $ml.kg^{-1}.h^{-1}$.[145]

No presente estudo, respeitando-se a taxa de hidratação recomendada e sem levar em conta eventuais aumentos na necessidade hídrica decorrentes da sepse, o volume total administrado deveria situar-se idealmente entre 3,6 e 7,2 ml. No entanto, somando-se todo o volume administrado por via parenteral obter-se-ia um volume inferior à 2,0 ml, ou seja, abaixo do necessário. Com base nesses dados, caso nenhuma outra medida terapêutica fosse tomada, os animais seriam considerados hipovolêmicos ao final do período de experimentação ao microscópio, o que poderia ser considerado uma limitação do estudo para a extrapolação de seus resultados.

Dessa forma, objetivando-se a diferenciação entre as alterações microcirculatórias relacionadas à sepse e aquelas secundárias à hipovolemia, foi realizada uma segunda etapa de ressuscitação volêmica com salina a 0,9%. Além de mimetizar o tratamento inicial proposto para a sepse clínica, aumentando o caráter translacional do presente estudo, essa etapa induziu marcantes alterações no perfil micro-hemodinâmico dos animais e nos exames laboratoriais coletados, adicionando informações importantes ao estudo das ações microcirculatórias da ivabradina. Finalmente, todos os estudos versando sobre o uso de drogas com ação cronotrópica negativa na sepse preconizam seu início somente após a exclusão de hipovolemia. Esse cuidado é justificado pela grave repercussão hemodinâmica que a redução da frequência cardíaca ocasionaria em indivíduo hipovolêmico, no qual a taquicardia ainda pode ser entendida como apropriada ou compensatória (discutido adiante).

Analisando-se criticamente todos os dados, percebe-se claramente a importância da segunda etapa de ressuscitação volêmica para os resultados obtidos no presente estudo. Todavia, existe dúvida se o volume administrado, de 20 $ml.kg^{-1}$, não tenha sido excessivo, potencializando e evidenciando, de forma não translacional, os efeitos benéficos observados com o uso da ivabradina.

5.9 **Sobre as Alterações Macro-hemodinâmicas**

5.9.1 Frequência cardíaca

Antes de ser tentado o controle da frequência cardíaca é crucial a distinção entre a taquicardia compensatória, muitas vezes relacionada à hipovolemia, e a não compensatória (ou inapropriada). A inadvertida redução da frequência cardíaca antes da correção de déficits volêmicos pode comprometer a resposta fisiológica adaptativa do organismo, levando a queda do débito cardíaco. Dessa forma, entende-se que a segunda etapa de ressuscitação volêmica administrada no presente estudo foi fundamental para realização dessa distinção. A pouca resposta ao tratamento com volume observada no grupo CLP-SALINA (Gráfico 1) praticamente excluiu hipovolemia como causa da elevação da frequência cardíaca. Na sepse, a taquicardia

que não responde a adequada ressuscitação volêmica indica resposta cronotrópica alterada sendo então considerada uma manifestação precoce da disfunção miocárdica.[104]

Além de representar um sinal clínico da alteração da função cardíaca, a taquicardia por si só contribui para o comprometimento dessa, podendo ser reconhecida, ao mesmo tempo, como causa e consequência da disfunção cardíaca.[107] Nesse contexto, o seu controle poderia trazer benefícios macro e micro-hemodinâmicos aos animais sépticos.[2] A redução da frequência cardíaca leva à redução do consumo miocárdico de oxigênio e do trabalho cardíaco com elevação paralela do fluxo sanguíneo coronariano. Na presença de adequada pré-carga, a redução da frequência cardíaca permite a otimização do enchimento ventricular durante a diástole, resultando em aumento do volume sistólico. A fração de ejeção também se eleva, mesmo sem alterações na contratilidade miocárdica.[107]

Para que esses efeitos hemodinâmicos benéficos ocorram, é necessário que o volume diastólico final seja passível de aumento, pois na ausência de elevação desse volume, a redução da frequência cardíaca também reduz o débito cardíaco.[107] Posto isso, é possível a especulação de que o débito cardíaco dos animais do grupo CLP-IVABRADINA tenha sido comprometido pela redução da frequência cardíaca, dada a aparente incapacidade que pequenos roedores possuem de homeostase volêmica.

A primeira ideia que se deve ter ao analisar o binômio frequência cardíaca/débito cardíaco é a de que a quantidade de massa contrátil por grama de tecido cardíaco é determinante para a capacidade de manipulação da contratilidade miocárdica e para a complacência ventricular. Pequena massa contrátil determinaria uma limitada estirabilidade ou complacência do ventrículo, o que significaria limitada capacidade de aumento do volume sistólico e um coração pouco capaz de manipular alterações de volume ou pressão. Desta forma, qualquer aumento do débito cardíaco seria realizado por aumento da frequência cardíaca (o débito cardíaco seria dependente da frequência cardíaca). Por analogia, qualquer diminuição da frequência cardíaca se refletiria em redução do débito cardíaco.[146]

O diminuto tamanho do órgão associado à já discutida intolerância à sobrecarga hídrica parece apontar para uma reduzida complacência do coração de roedores.[145] Neste caso, a redução da frequência cardíaca observada no grupo CLP-IVABRADINA estaria associada a uma importante queda do débito cardíaco, o que

por si só poderia ser determinante para as análises posteriores, sobretudo para as análises relacionadas à microcirculação e à perfusão orgânica.

No entanto, já foi demonstrado por estudos ecocardiográficos que, apesar de pequeno, o coração de ratos é suficientemente complacente e capaz de alterar seu volume sistólico e diastólico final. Durante a bradicardia, a alteração destes volumes se faz por manipulação da fração de encurtamento e por aumento do enchimento diastólico.[147] Pelo exposto, pode-se inferir que a pouca tolerância dos animais à sobrecarga de soluções cristaloides se dá muito mais por questões relacionadas à osmolaridade do que por questões relacionadas à complacência cardíaca.

Estudando a função cardíaca de ratos submetidos a diferentes drogas com ação cardiovascular, Stein e colaboradores[147] afirmaram que a função sistólica do ventrículo esquerdo não se correlacionou com a frequência cardíaca, indicando que o efeito dessas drogas sobre a função do ventrículo esquerdo é independente da frequência cardíaca. Esses autores sugerem que, em ratos, a alteração da função cardíaca observada após o uso de drogas com ação cardiovascular é causada por efeitos intrínsecos dessas drogas sobre a função miocárdica, não obedecendo a uma simples relação com a frequência cardíaca. Vale notar que a ivabradina não foi utilizada neste estudo.

Como a ivabradina não possui efeitos diretos sobre a contratilidade miocárdica, a princípio não podemos afirmar que o débito cardíaco tenha se alterado no presente estudo. Por outro lado, não se pode excluir que alterações da resistência vascular periférica e da demanda metabólica secundárias à sepse tenham determinado alterações do débito cardíaco, mas caso presentes, essas alterações se distribuíram homogeneamente entre os grupos sépticos.

Recentemente, Wei e colaboradores[148] observaram uma redução não significativa do volume sistólico e do débito cardíaco em ratos Wistar sépticos tratados com 5 $mg.kg^{-1}$ de ivabradina enteral quando os animais foram comparados à grupo séptico não tratado. Nesse estudo, no entanto, não houve etapa de ressuscitação volêmica pré-experimentação, apenas sendo instalada hidratação venosa contínua. Em humanos, a administração de 10 mg de ivabradina enteral determinou a redução do índice cardíaco de pacientes sépticos com falência de múltiplos órgãos.[6]

Em contraste, Mulder e colaboradores[149] demostraram que o tratamento com ivabradina foi capaz de melhorar a disfunção diastólica de ratos submetidos à modelo experimental de insuficiência cardíaca congestiva. De forma semelhante, estudando

animais dislipidêmicos, Drouin e colaboradores[8] demostraram que a ivabradina atenuou o aumento patológico de parâmetros hemodinâmicos relacionados à função diastólica, como a pressão diastólica final do ventrículo esquerdo e o tempo de relaxamento isovolumétrico. Os dois estudos apontam para uma ação benéfica da ivabradina sobre a função cardíaca, sobretudo sobre a função diastólica.

Apesar das alterações relacionadas ao débito cardíaco serem desconhecidas no presente estudo, como os efeitos microcirculatórios e metabólico-perfusionais da droga foram considerados significativos e positivos, pode-se especular que a ação benéfica da droga é capaz de suplantar eventual prejuízo ao débito cardíaco relacionado ao seu uso. Paralelamente, análise *post hoc* dos dados do presente estudo indica uma tendência de melhora do fluxo arteriolar com a redução da frequência cardíaca, sugerindo que o débito cardíaco também possa ter melhorado (Apêndice B).

A falta de informação com relação ao débito cardíaco é reconhecidamente uma limitação do presente estudo. Os dados relacionados à função cardíaca poderiam ser obtidos através da instalação de um cateter específico. No entanto, a instalação do cateter exigiria a constituição de novos grupos experimentais, o que fugiria à proposta inicial do estudo.

5.9.2 Pressão arterial média

O grupo *SHAM* apresentou redução não significativa da pressão arterial média após realização do procedimento cirúrgico controle (t0 vs. t1). A recuperação dos níveis basais de pressão após ressuscitação volêmica sugere que essa queda possa ter se relacionado, ao menos em parte, à sub-hidratação no período pós-operatório.

Em contraste, os animais alocados em grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA) apresentaram queda significativa da pressão arterial média após indução de sepse por CLP. Dados relacionados ao diâmetro arteriolar sugerem que essa redução da pressão arterial média não tenha sido determinada por vasodilatação periférica, o que é condizente com o provável estado hemodinâmico hipodinâmico e hipovolêmico desses animais. Apesar de estatisticamente significativa, a redução pressórica não foi clinicamente importante, ficando dentro dos limites esperados para

a espécie[145], o que sugere que alterações da pressão arterial média não tenham sido determinantes para os graves desarranjos microcirculatórios observados. Essa perda de coerência entre a macro e microcirculação é característica da disfunção microcirculatória na sepse.[29,44,68,92]

A ressuscitação volêmica foi capaz de recuperar transitoriamente os níveis pressóricos basais em animais do grupo CLP-SALINA, no entanto, ao final dos experimentos (momento de observação t3) uma nova queda da pressão arterial média foi observada. Outros resultados do presente estudo, como dados de hematócrito e de diâmetro microvascular, a presença de derrame pleural na necropsia desses animais e resultados relacionados ao edema de vísceras abdominais, sugerem que a redução da pressão arterial média em t3 esteja relacionada ao extravasamento vascular de líquido e/ou ao seu sequestro no sistema venoso (*pooling*).

No grupo CLP-IVABRADINA, a análise conjunta da evolução da pressão arterial média e do diâmetro arteriolar de t1 até t3 sugere a retenção vascular prolongada, no sistema arterial, do volume administrado durante a ressuscitação volêmica. Dados de hematócrito e de diâmetro venular e resultados relacionados ao edema de vísceras abdominais corroboram essa hipótese. Postula-se que o cisalhamento vascular consequente ao aumento do fluxo sanguíneo, secundário à ressuscitação volêmica, tenha persistido até o final do experimento, mantendo a dilatação arteriolar e a pressão arterial média.

Comparando-se os dois grupos sépticos (CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA), não obstante a queda da frequência cardíaca, a pressão arterial média dos animais tratados com ivabradina não variou de forma significativa em relação àquela medida nos animais tratados com salina a 0,9% (CLP-SALINA), excetuando-se o momento de observação t2. Esse resultado vem ao encontro daquele esperado para uma droga com ação cronotrópica negativa sem outras ações cardiovasculares importantes. Essa similaridade de evolução temporal da pressão arterial média entre os dois grupos sépticos permitiu que as comparações microcirculatórias e perfusionais-metabólicas fossem realizadas sem que diferentes medidas de pressão arterial média fossem implicadas como responsáveis pelas diferenças encontradas entre os grupos.

Por fim, a redução transitória da pressão arterial média observada em t2 no grupo CLP-IVABRADINA coexistiu com marcante queda da frequência cardíaca após o bolus de ivabradina. Postula-se que o limite de compensação inotrópica para redução da frequência cardíaca tenha sido alcançado, determinando queda do débito

cardíaco e da pressão arterial média. No entanto, vale destacar que a redução pressórica não foi clinicamente significativa, ficando dentro dos limites esperados para a espécie.[145]

5.10 **Sobre as Alterações Microcirculatórias**

Apesar da importância e da complexidade relacionada ao tema, até a realização do presente estudo nenhum outro trabalho havia pesquisado os efeitos da ivabradina sobre a microcirculação de animais ou pacientes sépticos. Desta forma, não foi possível a comparação com outros resultados encontrados na literatura. No entanto, é razoável a especulação de que alguns dos achados microcirculatórios observados no presente estudo tenham como explicação um efeito hemodinâmico puramente mecânico, secundário à redução da frequência cardíaca induzida pela ivabradina. De fato, no coração séptico um estado de desequilíbrio entre a oferta e a demanda de oxigênio deteriora a eficiência cardíaca, reduzindo o volume sistólico. Nesse contexto, uma frequência cardíaca elevada não só representa um sinal clínico da função cardíaca alterada, mas também contribui para a disfunção cardíaca, por exacerbar o desequilíbrio da oxigenação miocárdica. Assim, a redução da frequência cardíaca seria capaz de reduzir o consumo miocárdico de oxigênio e o trabalho cardíaco, elevando em paralelo o fluxo sanguíneo coronariano durante a diástole. Além disso, na presença de uma pré-carga adequada, a redução da frequência cardíaca permite um melhor enchimento ventricular diastólico, resultando em volume sistólico mantido ou mesmo aumentado, devido ao aumento do volume diastólico final. Todos esses efeitos levam à melhora do desempenho miocárdico e, provavelmente, ao aumento da perfusão tecidual sistêmica.[107]

Um aumento do débito cardíaco em animais tratados com ivabradina poderia explicar a maior parte dos resultados arteriolares e capilares, enquanto a disfunção cardíaca poderia explicar a retenção venular de volume sanguíneo (*pooling* venular) no grupo CLP-SALINA. Essa hipótese é corroborada por análise *post hoc* dos dados do presente estudo que indica uma tendência de melhora do fluxo arteriolar com a redução da frequência cardíaca, sugerindo que tenha ocorrido elevação do débito cardíaco com frequências cardíacas mais baixas (Apêndice B). O *pooling* venular

também já foi descrito como consequência da disfunção da reatividade microvascular em indivíduos sépticos.[90]

Tendo como base os mecanismos fisiopatológicos da disfunção cronotrópica da sepse, os betabloqueadores têm sido sugeridos como drogas apropriadas para o tratamento da taquicardia não compensatória em pacientes sépticos e a sua utilização já foi associada a melhores desfechos clínicos.[2] Contudo, apesar de todo embasamento teórico e prático para o uso dessa classe de drogas em pacientes sépticos, o bloqueio de receptores beta adrenérgicos pode precipitar efeitos adversos, especialmente no contexto de instabilidade cardiovascular, onde o bloqueio simpático pode ser potencialmente prejudicial.

Em um estudo experimental recente, foi observado efeito meramente marginal do esmolol sobre a reversão de alterações da microcirculação sublingual e intestinal.[150,151] Após o bloqueio beta-adrenérgico, a perfusão desses leitos microcirculatórios permaneceu deprimida, apesar da redução da frequência cardíaca. Este resultado contrasta com o do presente estudo e pode ser explicado pelo fato de os betabloqueadores estarem associados à redução do índice cardíaco, levantando questões sobre os seus efeitos negativos sobre a microcirculação e perfusão orgânica durante a sepse.[150] Além disso, a ivabradina reduz a frequência cardíaca prolongando a diástole, enquanto os betabloqueadores o fazem prolongando a diástole e a sístole. Assim, a ivabradina produz tempos diastólicos mais longos que os betabloqueadores para uma mesma redução na frequência cardíaca.[6] Como consequência, a ivabradina pode ser associada à maior fluxo sanguíneo coronariano e enchimento ventricular diastólico que os betabloqueadores.

Em um estudo comparativo entre os efeitos do metoprolol e da ivabradina sobre a função endotelial de camundongos dislipidêmicos, Drouin e colaboradores[8] observaram que o betabloqueador foi tão eficaz quanto a ivabradina na prevenção da taquicardia, no entanto, diferentemente da ivabradina, o tratamento com metoprolol não foi capaz de prevenir a disfunção endotelial. Os autores sugeriram que a ineficácia do metoprolol possa estar relacionada com o acoplamento entre os receptores beta-adrenérgicos endoteliais e a eNOS, pois a inibição dessa via pode contrabalançar os efeitos benéficos associados à redução da frequência cardíaca na árvore arterial. Dada a importância do sistema do NO para a disfunção microcirculatória associada à sepse, postula-se que mecanismo semelhante possa ocorrer com o uso de betabloqueadores na sepse, limitando seus efeitos protetores sobre a microcirculação.

Como no presente estudo não existiu um grupo experimental controle, no qual a frequência cardíaca fosse corrigida por estimulação através de marcapasso, não foi possível descartar a possibilidade de que propriedades pleiotrópicas da ivabradina, além da simples redução da frequência cardíaca, tenham tido papel como potenciais mecanismos dos achados microcirculatórios.[125]

De forma interessante, no presente estudo o recrutamento capilar levou mais tempo para ocorrer que as outras alterações da microcirculação e não foi observado em t2. Esse fenômeno pode ser explicado pelo fato de que as mudanças da perfusão capilar não são inteiramente relacionadas a alterações macro-hemodinâmicas ou no fluxo arteriolar, tendo em vista que a obstrução capilar por microtrombos ou *plugs* leucocitários e o aumento da presença de leucócitos rolantes ou aderidos em vênulas também são cruciais para perfusão capilar e podem impedir o fluxo capilar adequado.[29] Considerando que o endotélio desempenha várias ações moduladores sobre a atividade dos leucócitos e plaquetas, pode-se supor que ações protetoras da ivabradina sobre o endotélio tenham contribuído para o recrutamento capilar tardio. De fato, a ivabradina já foi associada à proteção da função das células endoteliais em diversos modelos de lesão endotelial.

Drouin e colaboradores[8] sugeriram que a elevação da frequência cardíaca esteja relacionada de forma independente ao surgimento de disfunção endotelial em camundongos dislipidêmicos. Esses autores demonstraram que o tratamento crônico desses animais com ivabradina foi capaz de melhorar significativamente a reatividade vascular de artérias de médio calibre e alegaram que esse efeito benéfico foi secundário à redução da frequência cardíaca.

O mecanismo de ação pelo qual a redução da frequência cardíaca estaria relacionada à melhora da função endotelial ainda não foi totalmente esclarecido. A hipótese defendida por alguns autores se baseia no conceito de que a elevação aguda da frequência cardíaca está associada à redução da complacência e distensibilidade arterial.[152] Dessa forma, postula-se que a redução da distensão da parede vascular como consequência da redução da frequência cardíaca, resulte em menor fadiga mecânica sobre o endotélio, melhorando sua função.[8] Além da redução da frequência cardíaca, a proteção endotelial associada ao uso de ivabradina pode ser secundária a outros efeitos da droga, como sua ação sobre o estresse oxidativo (discutido adiante) ou sobre o sistema do NO.[8,125]

Contra a participação do sistema do NO na ação microcirculatória da ivabradina pesa estudo de Custodis e colaboradores[7] que não observou qualquer associação entre o metabolismo da eNOS e os efeitos benéficos da ivabradina sobre a função endotelial. Esses autores também demonstraram que a ação da ivabradina sobre o estresse oxidativo é independente da eNOS. Corroborando esses achados, Wei e colaboradores[148] também não observaram efeitos da ivabradina sobre a expressão de eNOS em ratos sépticos.

De forma interessante, Drouin e colaboradores[8] observaram que as alterações da função endotelial associadas ao uso de ivabradina ocorreram sem alteração na contratilidade do músculo liso vascular ou potencial vasodilatador máximo. De fato, a reatividade do músculo liso arterial à ação de vasoconstritores ou vasodilatadores não é afetada pela ivabradina, sugerindo que a ivabradina não possua qualquer interação funcional com canais de cálcio ou com os mecanismos intracelulares reguladores da reatividade do músculo liso.[8] A ausência de efeito direto da ivabradina sobre a reatividade vascular foi corroborada por experimentos microcirculatórios realizados no BioVasc-UERJ em hamsters dourados, utilizando o modelo da câmara dorsal e o da bolsa de bochecha, que não demonstraram qualquer ação vasodilatadora intrínseca da ivabradina, podendo inclusive existir efeito vasoconstritor em concentrações mais elevadas da droga (dados próprios não publicados). Por fim, a ausência de efeito direto da ivabradina sobre células vasculares também já foi observada por Custodis e colaboradores[7]. Esses autores demonstraram que a exposição de anéis aórticos isolados à ivabradina não alterou a vasodilatação dos mesmos. Além disso, a ivabradina não induziu qualquer efeito sobre culturas de células endoteliais ou de células musculares lisas vasculares. Com base nesses achados, os autores concluem sobre a importância da redução da frequência cardíaca para os efeitos microvasculares da ivabradina.

5.11 **Sobre as Alterações Hematológicas, Bioquímicas e Gasométricas**

5.11.1 Gasometria arterial

Sabe-se que a administração de grandes volumes de salina a 0,9% é capaz de causar acidose hiperclorêmica e afetar os valores do BE, HCO_3 e pH.[153,154] No entanto, acredita-se que no presente estudo a sobrecarga de cloro secundária à ressuscitação volêmica tenha sido homogeneamente distribuída entre os três grupos ressuscitados (*SHAM*, CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA). Por outro lado, a ausência da etapa de ressuscitação volêmica no grupo CLP-CONTROLE pode ter levado a grande desvio dos resultados de gasometria arterial desse grupo em relação aos demais, dificultando a interpretação desses resultados.

Os valores de pH, HCO_3 e BE encontrados no grupo *SHAM* (7,40, 33,3 e 8,5 $mmol.l^{-1}$, respectivamente) foram próximos daqueles descritos como normais na literatura (7,38, 32,3 e 7,0 $mmol.l^{-1}$, respectivamente)[39], demonstrando a mínima repercussão clínica associada ao procedimento cirúrgico controle.

Em comparação ao grupo *SHAM*, observou-se queda significativa do HCO_3 no grupo CLP-CONTROLE. A redução da concentração sanguínea desse íon pode ser explicada pelos déficits perfusionais associados à sepse experimental, visto que o HCO_3 funciona como um sistema tampão plasmático fisiológico para íons hidrogênio liberados durante o metabolismo anaeróbico. Paralelamente à queda do HCO_3, observou-se também a redução do BE nesse grupo. Um BE reduzido (mais negativo) é indicativo da presença de ácidos não medidos. Em situações clínicas associadas à baixa perfusão tecidual, o principal ácido não medido é o lactato.[155] No entanto, além do lactato existem diversos outros ácidos não medidos que contribuem para a acidose metabólica e, portanto, para a negativação do BE.[156]

Os valores de pH, HCO_3 e BE encontrados no grupo CLP-SALINA indicam a existência de acidose metabólica nesse grupo. Já a elevação do nível de lactato em comparação ao grupo *SHAM* indica a presença de acidose metabólica associada ao lactato, configurando um quadro metabólico de alto risco de morte.[157,158] Por outro lado, no grupo CLP-IVABRADINA essas variáveis metabólico-perfusionais

apresentaram melhora em relação ao valor medido no grupo CLP-CONTROLE (mesmo que estatisticamente não significativa).

A significativa diferença observada entre os grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA em relação aos valores de pH, HCO_3 e BE pode ser explicada pela(s):

a) diferenças microcirculatórias encontradas entre os dois grupos: a melhor perfusão observada no grupo CLP-IVABRADINA estaria associada ao melhor perfil ácido-básico encontrado neste grupo;
b) preservação da função renal no grupo CLP-IVABRADINA, fundamental ao equilíbrio ácido-básico e preservação renal de HCO_3: a excreção do cloro é um mecanismo importante na adaptação renal à acidose metabólica (a maior excreção deste íon leva a alterações da diferença de íons fortes que, em última análise, culminam com a elevação do HCO_3);
c) preservação da função hepática no grupo CLP-IVABRADINA, fundamental ao metabolismo do lactato.

Apesar de plausíveis, o presente estudo não possuiu poder metodológico para a confirmação de qualquer uma dessas hipóteses.

O aumento do valor do BE após início de tratamento com ivabradina já foi observado em pacientes sépticos com disfunção de múltiplos órgãos por De Santis e colaboradores[6]. Esses autores observaram, em uma avaliação longitudinal, elevação dos valores dessa variável em conjunto com a melhora de parâmetros macro-hemodinâmicos e perfusionais. Não foram oferecidas explicações para o fenômeno.

Os resultados encontrados para a variável TCO_2 reforçam aqueles encontrados para o HCO_3: durante a acidose, o TCO_2 e o HCO_3 do sistema tampão gás carbônico/HCO_3 são reduzidos pelo desvio da reação de ionização do ácido carbônico para a esquerda. O gás carbônico produzido pela ação da anidrase carbônica é facilmente eliminado pelo pulmão, reduzindo o TCO_2 do sistema. Desta forma, o encontro de um TCO_2 significativamente menor no grupo CLP-SALINA, ou seja, no grupo em que foi observado maior consumo de HCO_3 não foi uma surpresa.

Analisando-se criticamente os resultados de variáveis metabólico-perfusionais da gasometria arterial é possível postular que, por mecanismo indeterminado, o tratamento com ivabradina tenha sido capaz de atenuar a queda do valor de pH, HCO_3 e BE secundária à ressuscitação volêmica, ou seja, tenha sido capaz de atenuar o

grau de acidose. Considerando a estreita faixa de normalidade do pH e as graves consequências dos distúrbios do equilíbrio ácido-básico, esse efeito pode ser considerado como bastante interessante do ponto de vista clínico. De fato, a piora do prognóstico de pacientes críticos secundária ao desenvolvimento de acidose já foi extensamente estudada em diversas condições clínicas de baixa perfusão tecidual. Por exemplo, Smith e colaboradores[159] correlacionaram um valor de BE mais negativo na admissão na unidade de terapia intensiva à maior mortalidade. Nesse mesmo estudo, a manutenção de um menor valor de BE após 24 horas de internação também foi associada à maior mortalidade. Em outro estudo, Palma e colaboradores[156] demonstraram que a melhora do valor do BE (ascensão evolutiva) foi capaz de predizer um melhor prognóstico em termos de morbimortalidade em pacientes com sepse e choque séptico. Resultado semelhante também foi observado por Park e colaboradores[160] e por Rivers e colaboradores[161].

O resultado mais contraditório encontrado no presente estudo está relacionado à PaO_2. Sendo ponto de comparação para os demais grupos, o valor de PaO_2 encontrado no grupo *SHAM* (61,8 mmHg) foi próximo daquele descrito como normal na literatura (69,6 mmHg).[39] No entanto, ao contrário daquilo que se esperava, essa variável foi significativamente maior nos três grupos sépticos (CLP-CONTROLE, CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA). Uma elevação da PaO_2 em hamsters dourados sépticos já havia sido observada por Hoffmann e colaboradores[100], mas não foi discutida pela ausência de significância estatística (81,4 mmHg ± 9,2 mmHg [grupo séptico] vs. 55,9 mmHg ± 6,0 mmHg [controles]). Em outro estudo, Cabrales e colaboradores[162] observaram significativa elevação da PaO_2 arterial de hamsters dourados submetidos a um modelo experimental de choque hemorrágico (57,1 mmHg ± 5,1 mmHg [pré-choque] vs. 86,8 mmHg ± 9,8 mmHg [pós-choque]). Resultado parecido já havia sido observado por este grupo de autores em outros dois estudos.[163,164] Mais recentemente, Miranda e colaboradores[39] também observaram significativa elevação da PaO_2 de hamsters dourados submetidos à sepse experimental (106,7 mmHg ± 31,9 mmHg [grupo séptico] vs. 69,6 mmHg ± 9,7 mmHg [controles]). Para esses autores, o achado é justificado pela grande capacidade adaptativa dos hamsters dourados a diferentes situações de consumo de oxigênio.[39] Um maior consumo determinaria alterações fisiológicas da mecânica ventilatória suficientes para a elevação da PaO_2. No entanto, seu estudo não possuiu poder metodológico para comprovar essa hipótese.

Infelizmente, no presente estudo a avaliação da função pulmonar pelo cálculo da relação PaO_2/FIO_2 foi prejudicada por esse viés fisiológico.

5.11.2 Lactato

O valor de lactato encontrado no grupo *SHAM* (1,2 $mmol.l^{-1}$) foi próximo daquele descrito como normal na literatura (1,54 $mmol.l^{-1}$)[39], corroborando as demais variáveis que demonstram mínima repercussão clínica associada ao procedimento cirúrgico controle.

A elevação do lactato observada em animais do grupo CLP-CONTROLE em comparação ao valor medido no grupo *SHAM* pode indicar hipoperfusão tecidual, com aumento da produção de lactato por metabolismo anaeróbico. Como a troca de oxigênio ocorre na microcirculação, é possível postular que alterações da perfusão microvascular secundárias aos desarranjos microcirculatórios associados à sepse possam ter se associado à oferta insuficiente de oxigênio às células, com consequente elevação dos níveis de lactato.[158] Como outros mecanismos não relacionados à hipóxia celular e metabolismo anaeróbico podem explicar a elevação da concentração de lactato, a comprovação dessa hipótese demandaria a medida de marcadores teciduais do equilíbrio oferta/demanda de oxigênio mais diretos.

Como esperado, a ressuscitação volêmica determinou redução do lactato arterial nos grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA em comparação àquele medido no grupo CLP-CONTROLE.[165] No entanto, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os níveis de lactato medidos nos grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA, apesar dos animais sépticos tratados com ivabradina terem apresentado melhor perfusão microvascular que os animais sépticos tratados com salina a 0,9%.

É plausível que a ausência de significância estatística na diferença de concentração de lactato observada entre os grupos CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA esteja relacionada à “Erro tipo II”. Por outro lado, não se pode excluir que o fator tempo de análise tenha sido crucial para os resultados obtidos, visto que:

a) na fase de recuperação o lactato é reconvertido em piruvato pela ação da enzima lactato desidrogenase. O piruvato sofre metabolismo

oxidativo resultando em gás carbônico, sendo esse um processo saturável mesmo em condições ótimas de oxigenação e função mitocondrial devido à saturação do ciclo do ácido tricarboxílico e da fosforilação oxidativa;[158]

b) o acúmulo de piruvato, por aumento da taxa de glicólise e por saturação da sua oxidação, observado nas situações de estresse orgânico como a sepse pode reduzir em muito a reconversão do lactato, atrasando a sua depuração plasmática;
c) a inibição da enzima piruvato desidrogenase secundária à síndrome séptica pode dificultar ainda mais a depuração do lactato.[166]

Desta forma, é possível que o curto tempo existente entre o início de tratamento com ivabradina e a coleta do sangue arterial para análise (cerca de quatro horas) tenha sido insuficiente para a observação de maior queda do lactato, tornando a diferença significativa. A comprovação dessa hipótese demandaria a coleta seriada de gasometrias arteriais e/ou a existência de um maior período de observação.

Favorecendo a hipótese de “Erro tipo II”, De Santis e colaboradores[6] observaram a queda do valor do lactato após início de tratamento com ivabradina em pacientes sépticos com disfunção de múltiplos órgãos. Esses autores observaram, em uma avaliação longitudinal, redução dos valores dessa variável em conjunto com a melhora de parâmetros macro-hemodinâmicos e perfusionais. Por outro lado, Wei e colaboradores[148] não observaram alteração da concentração de lactato em ratos Wistar submetidos à indução de sepse por CLP e tratados com ivabradina quando os animais foram comparados à grupo séptico não tratado. Nesse estudo, no entanto, não houve etapa de ressuscitação volêmica pré-experimentação, apenas sendo instalada hidratação venosa contínua. Isso pode corroborar a importância da ressuscitação volêmica para os efeitos benéficos da ivabradina e o prejuízo hemodinâmico da redução da frequência cardíaca em indivíduos ou animais hipovolêmicos.

Apesar da medição do lactato sanguíneo ser amplamente utilizada na avaliação da perfusão tecidual em estados de choque circulatório, esse é um teste diagnóstico com baixa sensibilidade e especificidade para alterações perfusionais. Infelizmente, no presente estudo, outros parâmetros metabólicos marcadores da perfusão tecidual, como a saturação de oxigênio venosa central e a diferença arteriovenosa de gás

carbônico, que poderiam auxiliar no melhor entendimento da evolução do lactato, não foram medidos. A não medição desses parâmetros decorreu da impossibilidade de coleta de sangue venoso central através do cateter venoso instalado na veia jugular. Postula-se que o diminuto calibre do cateter associado à pequena pressão da cavidade atrial direita tenha contribuído para a ausência de refluxo na aspiração do cateter.

5.11.3 Hemograma

Os resultados de hematócrito do presente estudo proporcionam evidência de que a lesão endotelial possa ter sido decisiva para os achados microcirculatórios, sobretudo aqueles relacionados à densidade capilar funcional, e para os resultados do experimento de quantificação do edema em vísceras abdominais.

O valor de hematócrito é comumente utilizado na literatura como marcador indireto do extravasamento vascular de plasma no contexto de patologias potencialmente lesivas ao endotélio.[165,167] De posse dessa informação e tendo como base de comparação os resultados observados em animais dos grupos *SHAM* e CLP-CONTROLE (grupo não séptico e grupo não ressuscitado volemicamente, respectivamente), é possível postular que o valor de hematócrito encontrado no grupo CLP-SALINA esteja associado ao aumento do extravasamento capilar após a ressuscitação volêmica. Como corolário, o valor de hematócrito encontrado no grupo CLP-IVABRADINA pode estar associado à retenção vascular do volume administrado.

Postula-se que os resultados observados no grupo CLP-IVABRADINA sejam secundários à possíveis efeitos protetores da ivabradina sobre a função de barreira endotelial vascular, reduzindo o extravasamento capilar. Como o aumento do extravasamento de líquido do compartimento intravascular para os tecidos resulta em edema, foram realizados experimentos adicionais no BioVasc-UERJ para reforçar essa hipótese. De fato, nesses experimentos observou-se comportamento semelhante durante as medições da variação entre o peso úmido e o peso seco de vísceras da cavidade abdominal, parâmetro utilizado como marcador indireto do edema tecidual (dados não publicados).

A redução do número total de leucócitos observada em animais dos três grupos sépticos (CLP-CONTROLE, CLP-SALINA e CLP-IVABRADINA) em comparação ao valor medido no grupo *SHAM* pode ser explicada por alterações evolutivas no valor dessa variável típicas do modelo de sepse adotado. Nas primeiras duas horas após a indução de sepse por CLP, a leucometria total e o número de polimorfonucleares e linfócitos se eleva rapidamente. No entanto, essa elevação é seguida, entre duas e quatro horas após a realização do CLP, por importante redução no valor dessas variáveis. Ao final, observa-se intensa leucopenia caracterizada por neutropenia e linfopenia.[168]

A queda da leucometria após a indução de sepse pode ser justificada pela ativação e migração de neutrófilos para fora do leito vascular e pelo acúmulo de leucócitos em órgãos como o pulmão e o fígado (sequestro leucocitário).[39,100] Desta forma, apesar de não ter sido estatisticamente significativo, o menor número de leucócitos observado no grupo CLP-SALINA (Tabela 11) pode ser resultado da pior evolução clínica desses animais, com maior grau de inflamação e sequestro leucocitário. Sendo assim, a ausência de significância estatística na diferença de leucometria observada entre os animais dos três grupos sépticos pode estar relacionada à “Erro tipo II”.

Alguns estudos já demonstram efeitos da ivabradina sobre a inflamação e migração leucocitária em modelos experimentais não associados à sepse. Por exemplo, Walcher e colaboradores[169] observaram que a ivabradina inibiu, *in vitro*, a migração de linfócitos CD4+ induzida por quimiocinas, um processo importante na fisiopatologia da aterogênese. Em outro estudo, Becher e colaboradores[170] demonstraram que a ivabradina reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina 1β, interleucina 6 e fator de necrose tumoral-α, reduzindo a migração leucocitária em camundongos submetidos à modelo experimental de insuficiência cardíaca. Nesse mesmo estudo, a ivabradina também foi capaz de reduzir a expressão da molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1). De forma consistente com esses achados, Custodis e colaboradores[7] observaram em camundongos dislipidêmicos que o tratamento com ivabradina foi capaz de reduzir a expressão da proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), conhecida por sua ação indutora de sequestro leucocitário e migração transendotelial. Por fim, efeito semelhante também já foi demonstrado por Yue-Chun e colaboradores[171] em um modelo experimental de sepse. Esses autores observaram que em camundongos

submetidos à miocardite viral por *coxsackie B3*, o tratamento com ivabradina atenuou significativamente a elevação dos níveis de MCP-1, interleucina 6 e fator de necrose tumoral-α.[171] Em contraposição, Wei e colaboradores[148] não observaram qualquer impacto do tratamento com ivabradina na produção de interleucina 10, interleucina 6 e fator de necrose tumoral-α em ratos Wistar submetidos à indução de sepse por CLP quando esses animais foram comparados a grupo séptico não tratado. É possível que essa divergência de resultados esteja relacionada à situação fisiopatológica de uso. Isto falaria mais a favor de um efeito protetor indireto que de um efeito farmacológico direto da droga. Também não se pode descartar que esse efeito dependa da espécie animal estudada.

Fica evidente a necessidade de maior investigação dos efeitos da ivabradina sobre a inflamação e migração leucocitária em modelos experimentais de sepse. De forma semelhante, parece claro que a realização de dosagens plasmáticas de citocinas e de estudo da cinética de migração leucocitária teriam sido de grande auxílio para interpretação dos resultados do presente estudo. No entanto, esses experimentos não foram realizados por problemas metodológicos associados aos modelos e espécie animal utilizados.

A redução da contagem de plaquetas nos grupos *SHAM* e CLP-IVABRADINA em comparação ao grupo CLP-CONTROLE provavelmente reflete efeito dilucional da ressuscitação volêmica. Dessa forma, o maior valor encontrado no grupo CLP-SALINA em comparação com aquele observado em animais sépticos tratados com ivabradina pode corroborar a hipótese de maior extravasamento capilar nesse grupo, apesar da diferença não ter sido significativa do ponto de vista estatístico.

As alterações dilucionais no valor da contagem de plaquetas tornaram esse parâmetro de pouca utilidade para avaliação da disfunção da coagulação (disfunção orgânica prevista no escore SOFA). A diferente quantidade de heparina administrada durante a manipulação dos cateteres arterial e venoso no grupo CLP-CONTROLE adicionou ainda mais dificuldades para interpretação dos resultados relacionado à crase sanguínea. No entanto, a formação de coágulos intracardíacos na quase totalidade dos animais dos grupos *SHAM*, CLP-CONTROLE e CLP-IVABRADINA e a ausência completa de formação desses coágulos em todos os animais do grupo CLP-SALINA indica a presença de alterações da coagulação que merecem atenção em estudos futuros.

5.11.4 Ureia e creatinina

Há mais de 30 anos que se reconhece o papel do edema renal no desenvolvimento de oligúria e na perpetuação da injuria renal aguda.[172] O mecanismo da lesão renal nesse caso envolve a redução da pressão de perfusão como resultado do aumento da pressão intersticial em um órgão encapsulado. Apesar da lesão renal secundária ao edema intersticial ser reconhecida predominantemente no contexto da insuficiência cardíaca, pacientes sépticos também estão sob risco, principalmente aqueles que apresentam disfunção miocárdica. Em ambos os casos, a elevação da pressão venosa central tem importante função na gênese do edema intersticial e da lesão orgânica.[172,173,174] A adição de sobrecarga volêmica à disfunção cardíaca potencializa o risco de disfunção renal.[172]

A lesão renal secundária à ressuscitação volêmica já foi demonstrada em modelo animal por Burnett e colaboradores[175]. Esses autores observaram que o aumento da pressão venosa renal secundário à ressuscitação volêmica induziu a elevação da pressão intersticial renal culminando com disfunção do órgão.

Os dados do presente estudo sugerem a participação do edema intersticial e da redução da perfusão tissular na lesão renal observada após ressuscitação volêmica em animais do grupo CLP-SALINA, mas não são capazes de explicar inteiramente os surpreendentes resultados de ureia e creatinina observados nesse grupo.

Durante a análise dos resultados dos experimentos principais do presente estudo, a significativa diferença existente entre os grupos CLP-SALINA (ressuscitado volemicamente) e CLP-CONTROLE (não ressuscitado), principalmente em relação à função renal, atraiu a atenção dos autores e exigiu explicação para o fenômeno observado. Aparentemente, o emprego do modelo de sepse por CLP associado ao delineamento de estudo utilizado - experimentos realizados após 24 horas de sepse e inclusão de etapa de ressuscitação volêmica - acabou determinando alterações fisiopatológicas compatíveis com lesão por isquemia e reperfusão. A análise da evolução dos parâmetros microcirculatórios corrobora essa hipótese, havendo melhora do fluxo arteriolar (reperfusão) após a ressuscitação volêmica (t2).

A hipótese de lesão renal associada à isquemia e reperfusão encontra grande respaldo na literatura, podendo ser causa não reconhecida de insuficiência renal

aguda em pacientes críticos. Diversos estudos experimentais e clínicos já demonstraram que a ressuscitação volêmica pode contribuir para a disfunção renal nesses pacientes, propondo a disfunção tubular por estresse oxidativo como mecanismo fisiopatológico.[176,177,178]

A lesão renal isquêmica pode ocorrer em diversas situações clínicas, sendo uma das múltiplas causas de disfunção renal na sepse. Embora a restauração do fluxo sanguíneo renal seja considerada fundamental para a viabilidade do órgão, a reperfusão geralmente é acompanhada de piora da função orgânica, secundária à lesão de reperfusão. Devido à sua importância clínica, essa situação de dualidade ficou conhecida como o “paradoxo do oxigênio”, sendo mediada pela geração de espécies reativas de oxigênio (discutido adiante).[179]

O estresse oxidativo resultante da lesão renal induzida por isquemia e reperfusão, secundárias à sepse e ressuscitação volêmica, acaba por induzir desarranjos do fluxo microcirculatório no córtex renal, culminando com a disfunção do órgão.[176,180]

Apesar do delineamento do presente estudo não permitir a correlação entre a geração de H_2O_2 e a disfunção renal (quantificada pela concentração sérica de ureia e creatinina), essa já foi observada por Beytur e colaboradores[179] em um modelo de isquemia e reperfusão renal em ratos. De forma interessante, nesse estudo o tratamento com ivabradina foi eficaz na redução tanto dos marcadores de estresse oxidativo, quanto dos marcadores de lesão renal. Posto isso, especula-se que no presente estudo os efeitos da ivabradina sobre o estresse oxidativo tenham sido fundamentais para preservação da função renal nos hamsters tratados com essa droga. A redução da geração de H_2O_2 secundária ao uso de ivabradina teria efeitos protetores contra o edema intersticial e contra a lesão microcirculatória.

Um ponto importante a ser considerado na análise dos resultados de creatinina está relacionado aos efeitos da ressuscitação volêmica sobre esse parâmetro laboratorial. Se por um lado o tratamento agressivo com volume pode induzir disfunção renal, elevando a concentração sérica da creatinina, por outro lado ele pode mascarar a disfunção por efeito dilucional, reduzindo falsamente os valores da creatinina.[181] No presente estudo esse conceito ganha importância na análise do grupo CLP-IVABRADINA, tendo em vista que apesar dos resultados dos marcadores de lesão renal encontrados nesse grupo terem sido mais baixos que aqueles observados no grupo CLP-CONTROLE (p >0,05; Tabela 12), não se pode excluir que

os animais ressuscitados volemicamente e tratados com ivabradina tenham apresentado maior grau de lesão renal que os animais sépticos não ressuscitados.

Por fim, cabe destacar que todos os animais dos grupos *SHAM* e CLP-IVABRADINA apresentaram ao menos um episódio de diurese (não quantificado em volume) após a segunda etapa de ressuscitação volêmica com salina a 0,9%; a presença de diurese, no entanto, foi observada em apenas dois animais do grupo CLP-SALINA. Essa diferença de “débito urinário” corrobora os resultados de ureia e creatinina observados.

5.11.5 Bilirrubina

A elevação dos níveis séricos de bilirrubina em animais do grupo CLP-CONTROLE quando comparados ao grupo *SHAM* (diferença não significativa estatisticamente) era esperada e pode ser explicada pela disfunção hepática associada à sepse.[182] Por outro lado, a marcante elevação da bilirrubina em animais ressuscitados volemicamente no grupo CLP-SALINA demanda explicações adicionais.

Diferentemente da grande quantidade de evidências que associam a ressuscitação volêmica à insuficiência renal, a literatura carece de estudo que avaliem o papel da sobrecarga hídrica na disfunção hepática. Em um dos poucos estudos sobre esse tópico, Hogan e colaboradores[183] observaram elevação dos níveis séricos de bilirrubina após ressuscitação volêmica de paciente sépticos com albumina. No entanto, esses autores associaram a elevação do marcador de disfunção hepática à efeitos próprios do coloide utilizado e não à ação do mesmo sobre a volemia.

Assim como o rim, o fígado é um órgão encapsulado, estando sujeito a lesão isquêmica por elevação da pressão intersticial secundária à elevação da pressão venosa central e edema do órgão.[172,184] A elevação da pressão venosa que resulta em dano hepático é geralmente associada a quadros de insuficiência cardíaca congestiva, mas também pode ocorrer em pacientes sépticos com disfunção miocárdica submetidos à ressuscitação volêmica.[172]

Dados do presente estudo sugerem a participação do edema intersticial e da elevação da pressão venosa na lesão hepática observada após ressuscitação volêmica em animais do grupo CLP-SALINA.

Tendo em vista que a redução da geração de H_2O_2 secundária ao uso de ivabradina teria efeitos protetores contra o edema intersticial, especula-se que no presente estudo os efeitos da ivabradina sobre o estresse oxidativo tenham sido fundamentais para preservação da função hepática nos hamsters tratados com essa droga. Efeitos da ivabradina sobre a função cardíaca, reduzindo a pressão venosa, também podem ter contribuído para os achados. No entanto, por questões logísticas, a quantificação da geração de H_2O_2 não foi realizada em amostras de tecido hepático. Além disso, por questões de delineamento do estudo, a função cardíaca não foi investigada de forma direta através da instalação de cateter específico. Consequentemente, nenhuma das duas hipóteses pode ser comprovada pelos achados do presente estudo.

5.11.6 Glicose

Assim como em outros roedores, a glicemia de hamsters varia ao longo de uma ampla faixa de normalidade, de 37 a 198 $mg.dl^{-1}$.[185] Nestes animais, a concentração de glicose é afetada por diversos fatores nutricionais, hormonais, circadianos, comportamentais, patológicos e externos. Todos estes fatores foram levados em conta na elaboração do projeto de pesquisa e na análise dos dados relacionados à glicemia. Alguns cuidados metodológicos merecem destaque:

a) com o intuito de minimizar a influência da variação circadiana da glicemia nos resultados, todos os experimentos foram realizados no mesmo período do dia, ou seja, no terço final do período de luz do biotério. Esse período do dia não é considerado um período de extremos de glicemia, o que aumenta a uniformidade entre os animais;[185]
b) pequenos roedores são animais de alta demanda metabólica e pequena reserva energética. Desta forma, longos períodos de jejum podem alterar significantemente a glicemia dos animais.[145,144] No

presente estudo, esse possível fator confundidor existiu especificamente entre os animais do grupo CLP-CONTROLE que foram submetidos a curto período de jejum entre a sua retirada da gaiola e a coleta da glicemia, e os demais, nos quais a coleta da glicemia ocorreu em média após quatro/cinco horas de jejum (tempo médio do experimento). No entanto, essa diferença de duração no período de jejum não parece ter influenciado de forma significativa os resultados;

c) ainda em relação ao alto metabolismo, após a coleta de uma amostra de sangue, devido à presença de hemácias metabolicamente ativas, a glicemia pode cair até 7% em uma hora.[185] No presente estudo esse problema foi contornado pela imediata medição da glicose.

A importante redução da glicemia observada após a indução de sepse (Tabela 12) pode ser explicada pela alta demanda metabólica e pequena reserva energética dos hamsters. Em pequenos animais, a sepse leva à redução da gliconeogênese, à depleção da pequena reserva de glicogênio e ao aumento do, já alto, consumo periférico de glicose. O resultado metabólico final dessas alterações supera o estímulo hiperglicêmico associado ao aumento da liberação de catecolaminas e ao aumento da resistência periférica à insulina, sobrevindo a queda da glicemia.[186] Resultado de glicemia semelhante foi observado por Wichterman e colaboradores[23] durante a descrição original do modelo de CLP.

A ausência de significância estatística na diferença de glicemia observada entre os animais sépticos provavelmente está relacionada à “Erro tipo II”. Mesmo sendo estatisticamente não significativa, a importância clínica dessa diferença carece de estudos e pode ter contribuído em outras análises realizadas, como no escore de atividade. É bastante provável que a menor glicemia encontrada no grupo CLP-SALINA se deva ao pior estado clínico desses animais. No entanto, não podem ser excluídos como contribuintes a esse resultado efeitos desconhecidos da ivabradina sobre o metabolismo glicídico. Dada a importância do controle glicêmico em pacientes sépticos, a investigação das alterações da glicemia secundárias ao uso de ivabradina seria válida e deveria ser alvo de futuros estudos.

5.12 **Sobre a Hemocultura**

A hemocultura se torna positiva precocemente após a indução de sepse por CLP, sendo observados microrganismos entéricos como *Escherichia coli*, *Streptococcus bovis*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus* e *Bacteroides fragilis*. Além dessas bactérias, são encontrados no lavado peritoneal *Streptococcus viridians* e *Clostridium sporogenes*.[23,26] De fato, diversas morfologias de colônias bacterianas foram identificadas nas placas de cultura oriundas de animais alocados nos três grupos sépticos, sugerindo o crescimento de diferentes bactérias no sangue desses animais, o que caracteriza um modelo de sepse polimicrobiana.

A escolha de meio de cultura seletivo para Gram-negativos levou em consideração a técnica utilizada para coleta de sangue para realização das hemoculturas, ou seja, aspiração de sangue pelo cateter arterial. Como esses cateteres não poderiam ser considerados estéreis no momento da coleta, arbitrariamente preferiu-se excluir as bactérias Gram-positivas do estudo, tendo em vista a grande incidência de colonização de cateteres por esses microrganismos. A ausência de crescimento bacteriano nas hemoculturas de animais do grupo *SHAM* demonstra o acerto dessa conduta.

No presente estudo, a realização de hemocultura foi fundamental para confirmação laboratorial da infecção nos animais. Além disso, esse exame permitiu o estabelecimento de um parâmetro de controle para a intensidade do estímulo nocivo determinado pela sepse abdominal. A princípio, a observação de contagens de colônias bacterianas semelhantes no sangue dos animais alocados nos três grupos sépticos indica que todos esses animais foram expostos à mesma agressão biológica. Todavia, não se pode excluir que os animais tenham apresentado quadros sépticos de diferentes graus de gravidade, na dependência da virulência do microrganismo encontrado e da resposta do organismo à essa bactéria. Desta forma, a não identificação das bactérias presentes nas hemoculturas e a ausência de dosagens laboratoriais capazes de quantificar a resposta inflamatória podem ser entendidos como limitações do presente estudo. Esses experimentos não foram realizados por questões metodológicas e logísticas. No entanto, especula-se que eventuais diferenças de gravidade entre os quadros sépticos apresentados pelos animais tenham sido homogeneamente distribuídas entre os grupos, reduzindo esse viés.

5.13 **Sobre as Alterações no Escore de Atividade**

No presente estudo, a avaliação do escore de atividade foi realizada com auxílio de escala ordinal descrita por Chuck e colaboradores[133]. Apesar de ser um instrumento padronizado para uso em ratos, o mesmo já foi utilizado com sucesso em hamsters dourados.[39]

A indução de sepse por CLP foi capaz de alterar o escore de atividade dos animais sépticos em t1 (Gráfico 9). Entre as possíveis explicações para essa alteração pode-se citar a queda da glicemia que acompanhou a indução de sepse, o desenvolvimento de um quadro de encefalopatia tóxico-metabólica e/ou o desenvolvimento de neuroinflamação.[187] Edema cerebral citotóxico e vasogênico, além de dano neuronal direto, também são descritos após indução de sepse por CLP.[188]

Em t3, o menor escore de atividade observado nos animais do grupo CLP-SALINA quando comparado aos animais trados com ivabradina (grupo CLP-IVABRADINA) pode estar associado, ao menos em parte, à um ou mais dos seguintes fatores:

a) maior quantidade de edema intersticial no cérebro de animais alocados no grupo CLP-SALINA. Apesar do edema cerebral não ter sido diretamente avaliado, essa hipótese é corroborada pela necropsia dos animais, onde o estudo macroscópico do cérebro demonstrou evidente alteração da consistência desse órgão (mais amolecido e friável) em animais do grupo CLP-SALINA;
b) perfusão tecidual prejudicada. Hipótese não testada diretamente, mas corroborada pelos resultados microcirculatórios observados na câmara dorsal;
c) disfunção neurológica associada à sepse: pior nos animais do grupo CLP-SALINA como reflexo do pior estado clínico;
d) presença de uremia, disfunção hepática e grave hipoglicemia em animais do grupo CLP-SALINA.

Apesar de plausíveis, o presente estudo não possuiu poder metodológico para a confirmação de qualquer uma dessas hipóteses.

Outra hipótese para a diferença de escore de atividade entre os grupos CLP-SALINA e CLP-CONTROLE recai sobre possível efeito protetor neurológico associado à ação da ivabradina em canais HCN.

Além do coração, os canais HCN são amplamente expressos no sistema nervoso central e no periférico, permitindo a especulação de que os melhores escores de atividade encontrados em animais sépticos tratados com ivabradina (grupo CLP-IVABRADINA), quando comparados aqueles observados em animais tratados com salina a 0,9% (grupo CLP-SALINA), tenham como explicação a atividade direta da droga sobre o sistema nervoso.

Entre as quatro isoformas, a HCN2 é aquela expressa mais extensivamente, sendo encontrada na maior parte do cérebro. Em contraste, a expressão de HCN1 e HCN4 é espacialmente mais restrita. A isoforma HCN1 é encontrada no neocórtex, hipocampo, córtex cerebelar e tronco cerebral, ao passo que a HCN4 está presente principalmente nos núcleos talâmicos, gânglios basais e bulbo olfativo. Já a isoforma HCN3 é pouco expressa na maior parte do sistema nervoso central, com exceção do bulbo olfativo e alguns núcleos hipotalâmicos, que exibem níveis mais elevados de expressão dessa isoforma. Os canais HCN também são encontrados em células da retina, sistema nervoso periférico e neurônios do gânglio da raiz dorsal.[189]

Em células do sistema nervoso, os canais HCN estão associados à corrente iônica conhecida como “Corrente ativada por hiperpolarização” (ou corrente I_h), que tem papel chave no controle da despolarização neuronal. Dessa forma, diversas funções celulares têm sido atribuídas a esses canais, incluindo atividade de marcapasso neuronal, controle do potencial de repouso das membranas, integração dendrítica, transmissão sináptica e aprendizagem.[189]

A importância dos canais HCN para a homeostase da atividade neuronal pôde ser comprovada quando a sua disfunção foi associada à dois grupos de doenças neurológicas: as epilepsias e a dor neuropática.[190,191] Infelizmente, o papel desses canais na regulação da atividade neuronal é bastante complexo, desafiando seu potencial terapêutico, visto que tanto o aumento da atividade dos canais quanto a sua redução estão associados à patologias.[189]

Em contraponto à hipótese de uma ação direta da ivabradina sobre o sistema nervoso, já foi demonstrada a limitada capacidade dessa droga cruzar a barreira hemato-encefálica e agir em neurônios do sistema nervoso central.[192,193] Também já foi demonstrado que a ivabradina é substrato do transportador multidroga

glicoproteína-P, expresso na barreira hemato-encefálica, o que restringe ainda mais a ação central dessa droga.[194] Contudo, isso não excluiu ações da droga em nervos periféricos, nem alterações da permeabilidade da barreira hemato-encefálica secundárias à indução de sepse que permitissem o acesso da ivabradina ao sistema nervoso central em condições patológicas.[187,194]

Finalmente, as seguintes limitações do presente estudo podem ser enumeradas quanto a avaliação do escore de atividade:

a) todas as avaliações foram realizadas por um único observador não “cego” em relação ao experimento. Apesar do instrumento utilizado na avaliação do escore de atividade ser baseado em parâmetros razoavelmente objetivos e reprodutíveis, não se pode excluir a existência de viés que tenha contribuído para os resultados encontrados;
b) na ausência de instrumento mais adequado para avaliação neurológica dos animais, o escore de atividade foi extrapolado e utilizado para diagnóstico e quantificação da disfunção neurológica secundária à sepse. Dada a complexidade das alterações neurológicas associadas à sepse, é provável que o uso isolado de uma escala ordinal unidimensional não tenha capacidade discriminatória suficiente para identificar pequenas diferenças que tenham existido entre os animais. Postula-se que a adição de testes comportamentais e psicométricos, como o Teste de campo aberto, o Teste de memória aversiva e o Teste de Morris (*water maze test*), ao protocolo poderiam ter contribuído para o melhor entendimento dos resultados encontrados. No entanto, existia grande limitação à realização desses experimentos em animais recém operados para realização de CLP ou procedimento cirúrgico controle.

5.14 **Sobre a Ação da Ivabradina Sobre o Estresse Oxidativo**

Conforme anteriormente discutido, os resultados microcirculatórios e de exames laboratoriais do presente estudo foram compatíveis com a presença de lesão orgânica por isquemia e reperfusão, mediada por espécies reativas de oxigênio.

Postula-se que a ação da ivabradina sobre o estresse oxidativo esteja diretamente associada aos seus efeitos microcirculatórios benéficos. De fato, essa associação já foi demonstrada em um modelo experimental de lesão vascular por aterosclerose, no qual a ivabradina foi capaz de reduzir de forma significativa o estresse oxidativo vascular, melhorando a função endotelial em aortas torácicas.[7] Nesse estudo, a ivabradina inibiu a atividade da enzima NADPH oxidase (NADPH, forma reduzida da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) e a liberação de superóxido. Além disso, a peroxidação de lipídios, um marcador global do estresse oxidativo, foi significativamente reduzida. Resultado semelhante foi obtido por Baumhakel e colaboradores[195] ao estudarem a disfunção endotelial em pênis de camundongos dislipidêmicos. Postula-se que o elo fisiopatológico entre o estresse oxidativo e a disfunção microcirculatória envolva mudanças na estrutura e fisiologia do glicocálix endotelial secundárias à ação de espécies reativas de oxigênio.[29] Como, a princípio, a ivabradina não possui propriedades antioxidantes diretas, sua ação sobre o estresse oxidativo pode estar relacionada à alteração da geração de espécies reativas de oxigênio, como o H_2O_2.[8]

Dada a importância da microcirculação para a função de órgãos, torna-se fácil o entendimento de como a ação da ivabradina sobre o estresse oxidativo pode não só melhorar a função endotelial, mas também a função de sistemas orgânicos. Essa ação protetora já foi demonstrada em rins de ratos submetidos a modelo de isquemia e reperfusão, nos quais o tratamento com ivabradina foi eficaz na prevenção da disfunção renal.[179] Também já foi demonstrada ação protetora da ivabradina sobre cardiomiócitos ventriculares de camundongos e porcos submetidos à isquemia e reperfusão e sobre a função contrátil ventricular esquerda de porcos.[196] Em todos esses modelos experimentais, postula-se que a mitocôndria tenha sido o alvo da ação protetora da ivabradina, reduzindo a geração de espécies reativas de oxigênio e elevando a produção de ATP mitocondrial.[197]

Aparentemente, os efeitos da ivabradina sobre a lesão por reperfusão são independentes da sua ação cronotrópica negativa.[125,198] Corroborando essa hipótese, Heusch e colaboradores[199] demostraram que os efeitos benéficos da ivabradina em porcos submetidos à isquemia e reperfusão miocárdica não foram inibidos pelo aumento da frequência cardíaca através de marcapasso. Em outro estudo, Kroller-Schon e colaboradores[200] observaram que a ivabradina foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e a disfunção endotelial em ratos dislipidêmicos, no entanto, esses resultados não foram observados em animais hipertensos. Em ambos os experimentos, a ivabradina foi capaz de reduzir a frequência cardíaca dos animais em cerca de 15-20%, demonstrando que o mecanismo de lesão endotelial (dislipidemia vs. hipertensão) foi muito mais importante para a resposta ao tratamento que a ação da droga sobre a frequência cardíaca.

Conforme discussão anterior, os resultados de hematócrito do presente estudo evidenciam uma possível lesão endotelial, com consequente aumento do extravasamento vascular de plasma. Segundo Miranda e colaboradores[29], a contínua degradação e descamação do glicocálix por espécies reativas de oxigênio expõe as células endoteliais ao dano oxidativo, levando à perda de integridade das junções aderentes e aumento da permeabilidade paracelular, com subsequente comprometimento da função de barreira do endotélio. Esse aumento da permeabilidade endotelial resulta em extravasamento de fluido a partir do espaço intravascular. Além do dano endotelial secundário ao estresse oxidativo, o *pooling* de sangue no sistema venoso observado em animais do grupo CLP-SALINA também promove o extravasamento capilar.[176] Posto isso, postula-se que os resultados de hematócrito observados no grupo CLP-IVABRADINA sejam secundários à melhora da função miocárdica e a possíveis efeitos protetores da ivabradina contra o dano oxidativo à função de barreira endotelial vascular, reduzindo o extravasamento capilar.

Na sepse, os desarranjos da permeabilidade capilar combinados com a elevação da pressão hidrostática vascular após ressuscitação volêmica agressiva resultam em importante edema intersticial. O acúmulo de água nos tecidos leva à hipóxia tecidual e disfunção orgânica, estando associado a piores desfechos clínicos.[29]

Corroborando a hipótese de maior edema visceral nos animais sépticos tratados com salina a 0,9%, durante a realização das necropsias foi observada a formação de derrame cavitário (derrame pleural volumoso [não quantificado]) na

maioria dos animais alocados no grupo CLP-SALINA. Esse derrame não foi observado em animais dos grupos *SHAM* e CLP-CONTROLE e foi raramente observado em animais do grupo CLP-IVABRADINA.

Especula-se que a ressuscitação volêmica também poderia estar relacionada à lesão do glicocálix endotelial, e consequentemente ao edema tecidual, por mecanismo não relacionado à geração de espécies reativas de oxigênio.[201] Essa hipótese é corroborada por estudo de Chappell e colaboradores[202] no qual os autores observaram que a ressuscitação volêmica de pacientes submetidos a cirurgias eletivas, com 20 $ml.kg^{-1}$ de hidroxietilamido 130/0,4, induziu a liberação de peptídeo natriurético atrial e elevou a concentração sérica de componentes do glicocálix, como sindecan-1 e hialuronano. Esses autores sugerem que o fator natriurético atrial esteja implicado na descamação do glicocálix, sendo mais uma fonte potencial de lesão endotelial associada à sobrecarga hídrica.[203] De qualquer forma, a ivabradina já se mostrou capaz de reduzir a expressão de fator natriurético atrial em modelo animal de insuficiência cardíaca.[170]

Experimentos microcirculatórios realizados no BioVasc-UERJ utilizando o modelo da bolsa da bochecha demonstraram a capacidade da ivabradina de atenuar a elevação da permeabilidade capilar induzida por isquemia e reperfusão da bolsa jugal em hamsters dourados sépticos (dados não publicados), o que corrobora os resultados de hematócrito do presente estudo. Sabe-se que a geração de espécies reativas de oxigênio tem papel ativo nesse modelo de lesão microvascular, fortalecendo a hipótese de que os efeitos microcirculatórios da ivabradina sejam predominantemente secundários à sua ação protetora contra o estresse oxidativo.

Por fim, vale destacar que a preferência pela avaliação de parâmetro indireto da função de barreira endotelial vascular (valor do hematócrito) ao invés de parâmetro mais direto, como a avaliação da VE-caderina/claudina-5, é uma limitação metodológica específica da espécie utilizada no presente estudo. Apesar de serem excelentes animais para preparação do modelo microcirculatório da câmara dorsal, diversas análises laboratoriais não são validadas para uso em hamsters dourados.

5.15 **Considerações Finais**

Analisando em conjunto todos os resultados do presente estudo e contextualizando-os com dados da literatura referentes a efeitos farmacológicos da ivabradina especula-se que:

a) a ressuscitação volêmica, e não a ivabradina, tenha sido responsável pela recuperação inicial dos parâmetros microcirculatórios;
b) a ação microcirculatória da ivabradina não seja direta, mas através da redução/atenuação do dano endotelial induzido pela ressuscitação volêmica;
c) o efeito benéfico da ivabradina sobre a microcirculação seja, ao menos em parte, resultado de sua ação protetora contra o estresse oxidativo;
d) a redução da geração de espécies reativas de oxigênio esteja associada ao menor extravasamento capilar, reduzindo o edema intersticial;
e) a redução do extravasamento capilar em animais tratados com ivabradina tenha sido vantajosa por prolongar os efeitos microcirculatórios benéficos da ressuscitação volêmica, como melhora do fluxo arteriolar, e reduzir seus efeitos iatrogênicos, sobretudo a formação de edema;
f) a manutenção de líquido no compartimento intravascular tenha sido fundamental para os efeitos benéficos da ivabradina em animais ressuscitados volemicamente;
g) a lesão de isquemia e reperfusão secundária à ressuscitação volêmica, e não exclusivamente a sepse, tenha contribuído para as disfunções orgânicas observadas em animais do grupo CLP-SALINA;
h) a conjugação de fatores benéficos, como melhor perfusão tecidual, menor edema intersticial e menor lesão oxidativa, tenha contribuído para menor quantidade de disfunções orgânicas em animais tratados com ivabradina.

O delineamento de estudo não permite especulações com relação ao papel da redução da frequência cardíaca *per se* para os resultados obtidos. A observação de correlação matemática entre a frequência cardíaca e o fluxo arteriolar em análise *post hoc* pode ser meramente resultado de confundimento. De qualquer forma, a simples associação estatística entre as duas variáveis não implica na existência de uma relação mecanicista. Portanto, uma relação de causa e efeito entre a redução da frequência cardíaca e a melhora dos parâmetros microcirculatórios ainda carece de demonstração.

CONCLUSÕES

No presente estudo, a administração intravenosa de ivabradina determinou redução da frequência cardíaca de hamsters ressuscitados volemicamente, sem alteração clinicamente significativa da pressão arterial média. Mais importante, esse tratamento foi eficaz na atenuação dos distúrbios microvasculares induzidos pela sepse experimental.

A recuperação das variáveis microcirculatórias na câmara dorsal foi acompanhada por melhores parâmetros laboratoriais metabólico-perfusionais e por menor incidência de disfunção orgânica. Esses resultados sugerem que a ivabradina possua efeitos benéficos sobre a perfusão tecidual de animais sépticos após ressuscitação volêmica.

Como o presente estudo aborda um uso *off-label* e experimental da ivabradina, novos estudos são necessários para confirmar esses resultados favoráveis.

REFERÊNCIAS

1. PINSKY, M.R. Is there a role for β-blockade in septic shock? **Journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 16, p. 1677–1678, Oct. 2013.

2. MORELLI, A. et al. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. **Journal of the American Medical Association**, v. 310, n. 16, p. 1683–1691, Oct. 2013.

3. RUDIGER, A.; SINGER, M. The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 187–195, Mar. 2013.

4. LEIBOVICI, L. et al. Relative tachycardia in patients with sepsis: an independent risk factor for mortality. **QJM**, v. 100, n. 10, p. 629–634, Oct. 2007.

5. VELLINGA, N.A.R. et al. International study on microcirculatory shock occurrence in acutely ill patients. **Critical Care Medicine**, v. 43, n. 1, p. 48–56, Jan. 2015.

6. SANTIS, V. et al. Ivabradine: a preliminary observation for a new terapeutic role in patients with multiple organ dysfunction syndrome. **Clinical Research in Cardiology**, v. 103, n. 10, p. 831–834, May 2014.

7. CUSTODIS, F. et al. Heart rate reduction by ivabradine reduces oxidative stress, improves endothelial function, and prevents atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation**, v. 117, n. 18, p. 2377–2387, May 2008.

8. DROUIN, A. et al. Chronic heart rate reduction by ivabradine prevents endothelial dysfunction in dyslipidaemic mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 4, p. 749–757, Jun. 2008.

9. MARTIN, G.S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, p. 1546–1554, Apr. 2003.

10. GAIESKI, D.F. et al. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 5, p. 1167–1174, May 2013.

11. VINCENT, J.L. et al. Assessment of the worldwide burden of critical illness: the intensive care over nations (ICON) audit. **Lancet Respiratory Medicine**, v. 2, n. 5, p. 380–6, May 2014.

12. ANGUS, D.C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, Jul. 2001.

13. BONE, R.C.; SIBBALD, W.J.; SPRUNG, C.L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481–1483, Jun. 1992.

14. BONE, R.C. Sepsis, the sepsis syndrome, multi-organ failure: a plea for comparable definitions. **Annals of Internal Medicine**, v. 114, n. 4, p. 332–333, Feb. 1991.

15. BONE, R.C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644–1655, Jun. 1992.

16. LEVY, M.M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250–1256, Apr. 2003.

17. SINGER, M. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 801–810, Feb. 2016.

18. SEYMOUR, C.W. et al. Assessment of clinical criteria for sepsis. **Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 762–774, Feb. 2016.

19. SHANKAR-HARI, M. et al. Developing a new definition and assessing new clinical criteria for septic shock. **Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 775–787, Feb. 2016.

20. ABRAHAM, E. New definitions for sepsis and septic shock. **Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 757–759, Feb. 2016.

21. POLI-DE-FIGUEIREDO, L.F. et al. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 53–59, Oct. 2008.

22. RITTIRSCH, D.; HOESEL, L.M.; WARD, P.A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 137–143, Jan. 2007.

23. WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189–201, Aug. 1980.

24. MEDINA, E. Murine model of polymicrobial septic peritonitis using cecal ligation and puncture (CLP). **Methods in Molecular Biology**, v. 602, p. 411–415, 2010.

25. DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, Apr. 2011.

26. HUBBARD, W.J. et al. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 24 Suppl 1, p. 52–57, Dec. 2005.

27. RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, Sep. 2009.

28. SCHABBAUER, G. Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 9, n. 1, p. e17–e21, primavera 2012.

29. MIRANDA, M.L. et al. Microcirculatory dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, ajpheart.00034.2016, Apr. 2016.

30. COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, Dec. 2002.

31. LEGRAND, M. et al. The response of the host microcirculation to bacterial sepsis: does the pathogen matter? **Journal of Molecular Medicine**, v. 88, n. 2, p. 127–133, Feb. 2010.

32. INCE, C. The microcirculation is the motor of sepsis. **Critical Care**, v. 9 Suppl 4, p. S13–S19, Aug. 2005.

33. BATEMAN, R.M. et al. Sepsis impairs microvascular autoregulation and delays capillary response within hypoxic capillaries. **Critical Care**, v. 19, p. 389, Nov. 2015.

34. ELLIS, C.G. et al. Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O(2) extraction in sepsis. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 282, n. 1, p. H156–H164, Jan. 2002.

35. LAM, C. et al. Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 5, p. 2077–2083, Nov. 1994.

36. DE BACKER, D. et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 1, p. 98–104, Jul. 2002.

37. CRONER, R.S. et al. Hepatic platelet and leukocyte adherence during endotoxemia. **Critical Care**, v. 10, n. 1, p. R15, Feb. 2006.

38. FARQUHAR, I. et al. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. **Journal of Surgical Research**, v. 61, n. 1, p. 190–196, Feb. 1996.

39. MIRANDA, M.L.; BALARINI, M.M.; BOUSKELA, E. Dexmedetomidine attenuates the microcirculatory derangements evoked by experimental sepsis. **Anesthesiology**, v. 122, n. 3, p. 619–630, Mar. 2015.

40. SECOR, D. et al. Impaired microvascular perfusion in sepsis requires activated coagulation and P-selectin-mediated platelet adhesion in capillaries. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 11, p. 1928–1934, Nov. 2010.

41. TACCONE, F.S. et al. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. **Critical Care**, v. 14, n. 4, p. R140, Jul. 2010.

42. VERDANT, C.L. et al. Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 11, p. 2875–2881, Nov. 2009.

43. DE BACKER, D. et al. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 3, p. 791–799, Mar. 2013.

44. SAKR, Y. et al. Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 9, p. 1825–1831, Sep. 2004.

45. TRZECIAK, S. et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. **Annals of Emergency Medicine**, v. 49, n. 1, p. 88–98, 98.e1–2, Jan. 2007.

46. AIRD, W.C. Endothelium as an organ system. **Critical Care Medicine**, v. 32, n. 5 Suppl, p. S271–9, May 2004.

47. HERNANDEZ, G.; BRUHN, A.; INCE, C. Microcirculation in sepsis: new perspectives. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 161–169, Mar. 2013.

48. TRZECIAK, S. et al. Resuscitating the microcirculation in sepsis: the central role of nitric oxide, emerging concepts for novel therapies, and challenges for clinical trials. **Academic Emergency Medicine**, v. 15, p. 399–413, May 2008.

49. INCE, C.; SINAASAPPEL, M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1369–1377, Jul. 1999.

50. CEPINSKAS, G.; WILSON, J.X. Inflammatory response in microvascular endothelium in sepsis: role of oxidants. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 42, p. 175–184, May 2008.

51. LIDINGTON, D. et al. Conducted vasoconstriction is reduced in a mouse model of sepsis. **Journal of Vascular Research**, v. 40, n. 2, p. 149–158, Mar. 2003.

52. LIDINGTON, D.; OUELLETTE, Y.; TYML, K. Endotoxin increases intercellular resistance in microvascular endothelial cells by a tyrosine kinase pathway. **Journal of Cellular Physiology**, v. 185, n. 1, p. 117–125, Oct. 2000.

53. TYML, K. et al. Lipopolysaccharide reduces intercellular coupling in vitro and arteriolar conducted response in vivo. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 3, p. H1397–H1406, Sep. 2001.

54. PRICE, S.A. et al. Subacute sepsis impairs vascular smooth muscle contractile machinery and alters vasoconstrictor and dilator mechanisms. **Journal of Surgical Research**, v. 83, n. 1, p. 75–80, May 1999.

55. TYAGI, A. et al. The microcirculation in sepsis. **Indian Journal of Anaesthesia**, v. 53, n. 3, p. 281–293, Jun. 2009.

56. WU, F.; WILSON, J.X.; TYML, K. Ascorbate inhibits iNOS expression and preserves vasoconstrictor responsiveness in skeletal muscle of septic mice. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 285, n. 1, p. R50–R56, 2003.

57. BATEMAN, R.M.; SHARPE, M.D.; ELLIS, C.G. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. **Critical Care**, v. 7, n. 5, p. 359–373, Jul. 2003.

58. JAGGER, J.E. et al. Role of erythrocyte in regulating local O2 delivery mediated by hemoglobin oxygenation. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 6, p. H2833–H2839, Jun. 2001.

59. SINGEL, D.J.; STAMLER, J.S. Chemical physiology of blood flow regulation by red blood cells: the role of nitric oxide and S-nitrosohemoglobin. **Annual Review of Physiology**, v. 67, p. 99–145, 2005.

60. BATEMAN, R.M. et al. Erythrocyte deformability is a nitric oxide-mediated factor in decreased capillary density during sepsis. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 280, n. 6, p. H2848–H2856, Jun. 2001.

61. CONDON, M.R. et al. Appearance of an erythrocyte population with decreased deformability and hemoglobin content following sepsis. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 284, n. 6, p. H2177–H2184, Jun. 2003.

62. EICHELBRÖNNER, O. et al. Endotoxin promotes adhesion of human erythrocytes to human vascular endothelial cells under conditions of flow. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 6, p. 1865–1870, Jun. 2000.

63. KAYAL, S. et al. Elevated circulating E-selectin, intercellular adhesion molecule 1, and von Willebrand factor in patients with severe infection. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, n. 3 Pt 1, p. 776–784, Mar. 1998.

64. CHELAZZI, C. et al. Glycocalyx and sepsis-induced alterations in vascular permeability. **Critical Care**, v. 19, p. 26, Jan. 2015.

65. HENRY, C.B.; DULING, B.R. TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 279, n. 6, p. H2815–H2823, Dec. 2000.

66. STEPPAN, J. et al. Sepsis and major abdominal surgery lead to flaking of the endothelial glycocalix. **Journal of Surgical Research**, v. 165, n. 1, p. 136–141, Jan. 2011.

67. MARECHAL, X. et al. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. **Shock**, v. 29, n. 5, p. 572–576, May 2008.

68. INCE, C. Hemodynamic coherence and the rationale for monitoring the microcirculation. **Critical Care**, v. 19 Suppl 3, p. S8, Dec. 2015.

69. NELSON, A. et al. Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. **Shock**, v. 30, n. 6, p. 623–627, Dec. 2008.

70. SCHMIDT, E.P. et al. The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. **Nature Medicine**, v. 18, n. 8, p. 1217–1223, Aug. 2012.

71. DONATI, A. et al. Alteration of the sublingual microvascular glycocalyx in critically ill patients. **Microvascular Research**, v. 90, p. 86–89, Nov. 2013.

72. JOHANSSON, P.I. et al. A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients. **Annals of Surgery**, v. 254, n. 2, p. 194–200, Aug. 2011.

73. CABRALES, P. et al. Microvascular and capillary perfusion following glycocalyx degradation. **Journal of Applied Physiology**, v. 102, n. 6, p. 2251–2259, Jun. 2007.

74. CONSTANTINESCU, A.A.; VINK, H.; SPAAN, J.A. Endothelial cell glycocalyx modulates immobilization of leukocytes at the endothelial surface. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 23, n. 9, p. 1541–1547, Sep. 2003.

75. GODDARD, C.M. et al. Prolonged leukocyte transit time in coronary microcirculation of endotoxemic pigs. **American Journal of Physiology**, v. 269, n. 4 Pt 2, p. H1389–H1397, Oct. 1995.

76. DE BACKER, D.; DONADELLO, K.; FAVORY, R. Link between coagulation abnormalities and microcirculatory dysfunction in critically ill patients. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 22, n. 2, p. 150–154, Apr. 2009.

77. BATEMAN, R.M. et al. Myocardial hypoxia-inducible HIF-1alpha, VEGF, and GLUT1 gene expression is associated with microvascular and ICAM-1 heterogeneity during endotoxemia. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 1, p. H448–H456, Jul. 2007.

78. DE BACKER, D. et al. The effects of dobutamine on microcirculatory alterations in patients with septic shock are independent of its systemic effects. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 2, p. 403–408, Feb. 2006.

79. KAO, R. et al. Erythropoietin improves skeletal muscle microcirculation and tissue bioenergetics in a mouse sepsis model. **Critical Care**, v. 11, n. 3, p. R58, 2007.

80. GOLDMAN, D.; BATEMAN, R.M.; ELLIS, C.G. Effect of sepsis on skeletal muscle oxygen consumption and tissue oxygenation: interpreting capillary oxygen transport data using a mathematical model. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, n. 6, p. H2535–H2544, Dec. 2004.

81. GOLDMAN, D.; BATEMAN, R.M.; ELLIS, C.G. Effect of decreased O2 supply on skeletal muscle oxygenation and O2 consumption during sepsis: role of heterogeneous capillary spacing and blood flow. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 290, n. 6, p. H2277–H2285, Jun. 2006.

82. SINGER, M. et al. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. **Lancet**, v. 364, n. 9433, p. 545–548, Aug. 2004.

83. DE BACKER, D. et al. Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 73–79, Jan. 2014.

84. EIPEL, C. et al. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 286, n. 5, p. G769–G776, May 2004.

85. ROSENGARTEN, B. et al. Microcirculatory dysfunction in the brain precedes changes in evoked potentials in endotoxin-induced sepsis syndrome in rats. **Cerebrovascular Diseases**, v. 23, n. 2-3, p. 140–147, Nov. 2007.

86. BORUTAITE, V. et al. Reversible inhibition of cellular respiration by nitric oxide in vascular inflammation. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 281, n. 6, p. H2256–H2260, Dec. 2001.

87. FROST, M.T. et al. Hypoxia accelerates nitric oxide-dependent inhibition of mitochondrial complex I in activated macrophages. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 2, p. R394–R400, Feb. 2005.

88. LIZASOAIN, I. et al. Nitric oxide and peroxynitrite exert distinct effects on mitochondrial respiration which are differentially blocked by glutathione or glucose. **Biochemical Journal**, v. 314 Pt 3, p. 877–880, Mar. 1996.

89. VINCENT, J.L.; DE BACKER, D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. **Critical Care**, v. 9 Suppl 4, p. S9–S12, Aug. 2005.

90. DOERSCHUG, K.C. et al. Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 293, n. 2, p. H1065–H1071, Aug. 2007.

91. SHAPIRO, N.I. et al. The association of near-infrared spectroscopy-derived tissue oxygenation measurements with sepsis syndromes, organ dysfunction and mortality in emergency department patients with sepsis. **Critical Care**, v. 15, n. 5, p. R223, Sep. 2011.

92. TRZECIAK, S. et al. Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 34, n. 12, p. 2210–2217, Dec. 2008.

93. EDUL, V.S.K. et al. Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 5, p. 1443–1448, May 2012.

94. UNGER, L.S.; CRYER, H.M.; GARRISON, R.N. Differential response of the microvasculature in the liver during bacteremia. **Circulatory Shock**, v. 29, n. 4, p. 335–344, Dec. 1989.

95. DRAZENOVIC, R. et al. Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. **Journal of Applied Physiology**, v. 72, n. 1, p. 259–265, Jan. 1992.

96. NAKAJIMA, Y. et al. Microcirculation in intestinal villi: a comparison between hemorrhagic and endotoxin shock. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 164, n. 8 Pt 1, p. 1526–1530, Oct. 2001.

97. INCE, C. The microcirculation unveiled. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 1, p. 1–2, Jul. 2002.

98. DE BACKER, D. et al. Monitoring the microcirculation in the critically ill patient: current methods and future approaches. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 11, p. 1813–1825, Nov. 2010.

99. MENGER, M.D.; LASCHKE, M.W.; VOLLMAR, B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. **European Surgical Research**, v. 34, n. 1-2, p. 83–91, Jan. 2002.

100. HOFFMANN, J.N. et al. A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. **Shock**, v. 12, p. 355–364, Nov. 1999.

101. LASCHKE, M.W.; VOLLMAR, B.; MENGER, M.D. The dorsal skinfold chamber: window into the dynamic interaction of biomaterials with their surrounding host tissue. **European Cells Materials**, v. 22, p. 147–164, Sep. 2011.

102. PAPENFUSS, H.D. et al. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. **Microvascular Research**, v. 18, n. 3, p. 311–318, Nov. 1979.

103. PARRILLO, J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 20, p. 1471–1477, May 1993.

104. DÜNSER, M.W.; HASIBEDER, W.R. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 5, p. 293–316, Sep. 2009.

105. SCHMIDT, H. et al. Autonomic dysfunction predicts mortality in patients with multiple organ dysfunction syndrome of different age groups. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1994–2002, Sep. 2005.

106. SHARSHAR, T. et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Lancet**, v. 362, n. 9398, p. 1799–1805, Nov. 2003.

107. MAGDER, S.A. The ups and downs of heart rate. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 1, p. 239–245, Jan. 2012.

108. WERDAN, K. et al. Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 87, n. 4, p. 266–274, Apr. 2009.

109. MUSIALEK, P. et al. Nitric oxide can increase heart rate by stimulating the hyperpolarization-activated inward current, I(f). **Circulation Research**, v. 81, n. 1, p. 60–68, Jul. 1997.

110. JOULIN, O. et al. Cardiac force-frequency relationship and frequency-dependent acceleration of relaxation are impaired in LPS-treated rats. **Critical Care**, v. 13, n. 1, p. R14, Feb. 2009.

111. PARKER, M.M. et al. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. **Critical Care Medicine**, v. 15, n. 10, p. 923–929, Oct. 1987.

112. MACCHIA, A. et al. Previous prescription of β-blockers is associated with reduced mortality among patients hospitalized in intensive care units for sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 2768–2772, Oct. 2012.

113. DE SANTIS, V. et al. Ivabradine: potential clinical applications in critically ill patients. **Clinical Research in Cardiology**, v. 102, n. 3, p. 171–178, Mar. 2013.

114. DIFRANCESCO, D. The role of the funny current in pacemaker activity. **Circulation Research**, v. 106, n. 3, p. 434–446, Feb. 2010.

115. CÉSAR, L.A.M. Corrente If e o controle da frequência cardíaca. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 88, n. 4, p. e99–e102, abr. 2007.

116. SCICCHITANO, P. et al. HCN channels and heart rate. **Molecules**, v. 17, n. 4, p. 4225–4235, Apr. 2012.

117. BORER, J.S.; LE HEUZEY, J.Y. Characterization of the heart rate-lowering action of ivabradine, a selective I(f) current inhibitor. **American Journal of Therapeutics**, v. 15, n. 5, p. 461–73, Sep. 2008.

118. BORER, J.S. Drug insight: If inhibitors as specific heart-rate-reducing agents. **Nature Clinical Practice - Cardiovascular Medicine**, v. 1, n. 2, p. 103–109, Dec. 2004.

119. NAIR, A.S.; GOPAL, T.V.S. Ivabradine in sepsis. **Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 570–571, Oct. 2013.

120. NUDING, S. et al. Reducing elevated heart rate in patients with multiple organ dysfunction syndrome by the I (f) (funny channel current) inhibitor ivabradine: MODI (f)Y trial. **Clinical Research in Cardiology**, v. 100, n. 10, p. 915–923, Oct. 2011.

121. MANZ, M. et al. A single intravenous dose of ivabradine, a novel I(f) inhibitor, lowers heart rate but does not depress left ventricular function in patients with left ventricular dysfunction. **Cardiology**, v. 100, n. 3, p. 149–155, 2003.

122. ZORN-PAULY, K. et al. Endotoxin impairs the human pacemaker current If. **Shock**, v. 28, n. 6, p. 655–661, Dec. 2007.

123. SCHERUEBEL, S. et al. I(f) blocking potency of ivabradine is preserved under elevated endotoxin levels in human atrial myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 72, p. 64–73, Jul. 2014.

124. BARBUTI, A.; DIFRANCESCO, D. The “funny” side of sepsis. **Journal of Physiology**, v. 592, n. 6, p. 1171, Mar. 2014.

125. HEUSCH, G. Pleiotropic action(s) of the bradycardic agent ivabradine: cardiovascular protection beyond heart rate reduction. **British Journal of Pharmacology**, v. 155, n. 7, p. 970–971, Dec. 2008.

126. COUVREUR, N. et al. Chronic heart rate reduction with ivabradine improves systolic function of the reperfused heart through a dual mechanism involving a direct mechanical effect and a long-term increase in FKBP12/12.6 expression. **European Heart Journal**, v. 31, n. 12, p. 1529–1537, Jun. 2010.

127. SIMON, L. et al. Coronary and hemodynamic effects of S 16257, a new bradycardic agent, in resting and exercising conscious dogs. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 2, p. 659–666, Nov. 1995.

128. LINK, A. et al. Effect of ivabradine in dobutamine induced sinus tachycardia in a case of acute heart failure. **Clinical Research in Cardiology**, v. 98, n. 8, p. 513–515, Aug. 2009.

129. DE FERRARI, G.M. et al. Favourable effects of heart rate reduction with intravenous administration of ivabradine in patients with advanced heart failure. **European Journal of Heart Failure**, v. 10, n. 6, p. 550–555, Jun. 2008.

130. BAUMANS, V. Use of animals in experimental research: an ethical dilemma? **Gene Therapy**, v. 11, p. S64–S66, 2004.

131. MARQUES, R.G. et al. Rumo à regulamentação da utilização de animais no ensino e na pesquisa científica no Brasil. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 20, n. 3, p. 262–267, maio 2005.

132. MARQUES, R.G.; MORALES, M.M.; PETROIANU, A. Brazilian law for scientific use of animals. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 69–74, Jan. 2009.

133. CHUCK, T.L. et al. Comparison between multiple behavioral effects of peripheral ethanol administration in rats: sedation, ataxia, and bradykinesia. **Life Sciences**, v. 79, n. 2, p. 154–161, Jun. 2006.

134. MESQUITA, J.A. et al. Improved instrumentation for blood flow velocity measurements in the microcirculation of small animals. **Review of Scientific Instruments**, v. 78, n. 2, p. 024303, Feb. 2007.

135. DEITCH, E.A. Rodent models of intra-abdominal infection. **Shock**, v. 24 Suppl 1, p. 19–23, Dec. 2005.

136. MAIER, S. et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. **Shock**, v. 21, n. 6, p. 505–511, Jun. 2004.

137. SANDERS, R.D.; HUSSELL, T.; MAZE, M. Sedation & immunomodulation. **Anesthesiology Clinics**, v. 29, n. 4, p. 687–706, Dec. 2011.

138. FINK, M.P.; HEARD, S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock. **Journal of Surgical Research**, v. 49, p. 186–196, Aug. 1990.

139. NACUL, F.E. et al. The effects of vasoactive drugs on intestinal functional capillary density in endotoxemic rats: intravital video-microscopy analysis. **Anesthesia and Analgesia**, v. 110, n. 2, p. 547–554, Feb. 2010.

140. FREITAS, G.C.; CARREGARO, A.B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 297–304, 2013.

141. SHARMA, V.; MCNEILL, J.H. To scale or not to scale: the principles of dose extrapolation. **British Journal of Pharmacology**, v. 157, n. 6, p. 907–921, Jul. 2009.

142. SPRENGER, T.; SUPRONSINCHAI, W.; GOADSBY, P.J. New onset migraine with aura after treatment initiation with ivabradine. **Journal of Headache and Pain**, v. 14, n. 1, p. 45, Dec. 2013.

143. FLECKNELL, P.A. Anaesthesia of common laboratory species: special considerations. In: FLECKNELL, P.A. **Laboratory animal anaesthesia**. 3. ed.: Elsevier, 2009. Cap. 7, p. 181–241.

144. WIXSON, S.K.; SMILER, K.L. Anesthesia and analgesia in rodents. In: KOHN, D.F. et al. **Anesthesia and analgesia in laboratory animals**: Elsevier, 1997. Cap. 9, p. 165–203.

145. LESTER, P.A. et al. Anesthesia and analgesia. In: SUCKOW, M.A.; STEVENS, K.A.; WILSON, R.P. **The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents**: Academic Press, 2012. Cap. 2, p. 33–56.

146. BERRY, F.A.; CASTRO, B.A. Anestesia neonatal. In: BARASH, P.G.; CULLEN, B.F.; STOELTING, R.K. **Anestesia clínica**. 4. ed.: Manole, 2004. Cap. 43, p. 1171–1194.

147. STEIN, A.B. et al. Effects of anesthesia on echocardiographic assessment of left ventricular structure and function in rats. **Basic Research in Cardiology**, v. 102, n. 1, p. 28–41, Jan. 2007.

148. WEI, C. et al. If channel inhibition with ivabradine does not improve cardiac and vascular function in experimental septic shock. **Shock**, v. SHK.0000000000000593, Feb. 2016.

149. MULDER, P. et al. Long-term heart rate reduction induced by the selective I(f) current inhibitor ivabradine improves left ventricular function and intrinsic myocardial structure in congestive heart failure. **Circulation**, v. 109, n. 13, p. 1674–1679, Apr. 2004.

150. JACQUET-LAGRÈZE, M. et al. Gut and sublingual microvascular effect of esmolol during septic shock in a porcine model. **Critical Care**, v. 19, p. 241, Jun. 2015.

151. INCE, C. To beta block or not to beta block; that is the question. **Critical Care**, v. 19, n. 1, p. 339, Sep. 2015.

152. MANGONI, A.A. et al. Heart rate-dependence of arterial distensibility in vivo. **Journal of Hypertension**, v. 14, n. 7, p. 897–901, Jul. 1996.

153. KELLUM, J.A. Fluid resuscitation and hyperchloremic acidosis in experimental sepsis: improved short-term survival and acid-base balance with Hextend compared with saline. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 2, p. 300–305, Feb. 2002.

154. BURDETT, E.; ROCHE, A.M.; MYTHEN, M.G. Hyperchloremic acidosis: pathophysiology and clinical impact. **Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine**, v. 5, n. 4, p. 424–430, Oct. 2003.

155. HOBBS, T.R. et al. Comparison of lactate, base excess, bicarbonate, and pH as predictors of mortality after severe trauma in rhesus macaques (Macaca mulatta). **Comparative Medicine**, v. 60, n. 3, p. 233–239, Jun. 2010.

156. PALMA, L. et al. Acidosis and mortality in severe sepsis and septic shock evaluated by base excess variation. **Critical Care**, v. 7, n. Suppl 3, p. P39, Jun. 2003.

157. GUNNERSON, K.J. et al. Lactate versus non-lactate metabolic acidosis: a retrospective outcome evaluation of critically ill patients. **Critical Care**, v. 10, p. R22, Feb. 2006.

158. BAKKER, J.; NIJSTEN, M.W.; JANSEN, T.C. Clinical use of lactate monitoring in critically ill patients. **Annals of Intensive Care**, v. 3, p. 12, May 2013.

159. SMITH, I. et al. Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care. **Intensive Care Medicine**, v. 27, n. 1, p. 74–83, Jan. 2001.

160. PARK, M. et al. Evolutive standard base excess and serum lactate level in severe sepsis and septic shock patients resuscitated with early goal-directed therapy: still outcome markers? **Clinics**, v. 61, n. 1, p. 47–52, Feb. 2006.

161. RIVERS, E. et al. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 345, p. 1368–1377, Nov. 2001.

162. CABRALES, P.; TSAI, A.G.; INTAGLIETTA, M. Is resuscitation from hemorrhagic shock limited by blood oxygen-carrying capacity or blood viscosity? **Shock**, v. 27, n. 4, p. 380–389, Apr. 2007.

163. CABRALES, P.; TSAI, A.G.; INTAGLIETTA, M. Hyperosmotic-hyperoncotic versus hyperosmotic-hyperviscous: small volume resuscitation in hemorrhagic shock. **Shock**, v. 22, n. 5, p. 431–437, Nov. 2004.

164. CABRALES, P.; TSAI, A.G.; INTAGLIETTA, M. Microvascular pressure and functional capillary density in extreme hemodilution with low- and high-viscosity dextran and a low-viscosity Hb-based O2 carrier. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 287, p. H363–H373, Jul. 2004.

165. VILLELA, N.R. et al. Fluid resuscitation therapy in endotoxemic hamsters improves survival and attenuates capillary perfusion deficits and inflammatory responses by a mechanism related to nitric oxide. **Journal of Translational Medicine**, v. 12, p. 232, Aug. 2014.

166. VARY, T.C. Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: effects on plasma lactate. **Shock**, v. 6, n. 2, p. 89–94, Aug. 1996.

167. MIRANDA, M.L. et al. Milrinone attenuates arteriolar vasoconstriction and capillary perfusion deficits on endotoxemic hamsters. **PloS One**, v. 10, n. 2, p. e0117004, Feb. 2015.

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

169. WALCHER, T. et al. Ivabradine reduces chemokine-induced CD4-positive lymphocyte migration. **Mediators of Inflammation**, v. 2010, p. 751313, Dec. 2010.

170. BECHER, P.M. et al. Role of heart rate reduction in the prevention of experimental heart failure: comparison between If-channel blockade and β-receptor blockade. **Hypertension**, v. 59, n. 5, p. 949–957, May 2012.

171. YUE-CHUN, L. et al. Comparison of effects of ivabradine versus carvedilol in murine model with the Coxsackievirus B3-induced viral myocarditis. **PloS One**, v. 7, n. 6, p. e39394, Jun. 2012.

172. BESEN, B.A.M.P. et al. Fluid and electrolyte overload in critically ill patients: an overview. **World Journal of Critical Care Medicine**, v. 4, n. 2, p. 116–29, May 2015.

173. DAMMAN, K. et al. Increased central venous pressure is associated with impaired renal function and mortality in a broad spectrum of patients with cardiovascular disease. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 53, n. 7, p. 582–588, Feb. 2009.

174. LEGRAND, M. et al. Association between systemic hemodynamics and septic acute kidney injury in critically ill patients: a retrospective observational study. **Critical Care**, v. 17, n. 6, p. R278, Nov. 2013.

175. BURNETT, J.C.; KNOX, F.G. Renal interstitial pressure and sodium excretion during renal vein constriction. **American Journal of Physiology**, v. 238, n. 4, p. F279–F282, Apr. 1980.

176. ERGIN, B. et al. The renal microcirculation in sepsis. **Nephrology, Dialysis, Transplantation**, v. 30, n. 2, p. 169–177, Feb. 2015.

177. AKSU, U. et al. Balanced vs unbalanced crystalloid resuscitation in a near-fatal model of hemorrhagic shock and the effects on renal oxygenation, oxidative stress, and inflammation. **Resuscitation**, v. 83, n. 6, p. 767–773, Jun. 2012.

178. PAYEN, D. et al. A positive fluid balance is associated with a worse outcome in patients with acute renal failure. **Critical Care**, v. 12, n. 3, p. R74, Jun. 2008.

179. BEYTUR, A. et al. Dose-dependent protective effect of ivabradine against ischemia-reperfusion-induced renal injury in rats. **Kidney Blood Pressure Research**, v. 35, n. 2, p. 114–119, Nov. 2012.

180. LEGRAND, M. et al. The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n. 9, p. 1534–1542, Sep. 2011.

181. DE ROSA, S.; SAMONI, S.; RONCO, C. Creatinine-based definitions: from baseline creatinine to serum creatinine adjustment in intensive care. **Critical Care**, v. 20, n. 1, p. 69, Mar. 2016.

182. NESSELER, N. et al. Clinical review: The liver in sepsis. **Critical Care**, v. 16, n. 5, p. 235, Oct. 2012.

183. HOGAN, B.J.; O'BEIRNE, J.P. Increased bilirubin following fluid resuscitation with albumin: mechanisms behind an important observation. **Intensive Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 893, May 2011.

184. SEETO, R.K.; FENN, B.; ROCKEY, D.C. Ischemic hepatitis: clinical presentation and pathogenesis. **American Journal of Medicine**, v. 109, n. 2, p. 109–13, Aug. 2000.

185. WASHINGTON, I.M.; HOOSIER, G.V. Clinical biochemistry and hematology. In: SUCKOW, M.; STEVENS, K.; WILSON, R.P. **The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents**: Academic Press, 2012. Cap. 3, p. 57–116.

186. JUTKOWITZ, L.A. Reproductive emergencies. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**, v. 35, p. 397–420, Mar. 2005.

187. SONNEVILLE, R. et al. Understanding brain dysfunction in sepsis. **Annals of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 15, May 2013.

188. BOZZA, F.A. et al. Sepsis-associated encephalopathy: a magnetic resonance imaging and spectroscopy study. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 30, n. 2, p. 440–448, Feb. 2010.

189. POSTEA, O.; BIEL, M. Exploring HCN channels as novel drug targets. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 10, n. 12, p. 903–914, Nov. 2011.

190. POOLOS, N.P. The Yin and Yang of the H-channel and its role in epilepsy. **Epilepsy Currents**, v. 4, n. 1, p. 3–6, Jan. 2004.

191. JIANG, Y.Q. et al. Characteristics of HCN channels and their participation in neuropathic pain. **Neurochemical Research**, v. 33, n. 10, p. 1979–1989, Oct. 2008.

192. SAVELIEVA, I.; CAMM, A.J. Novel If current inhibitor ivabradine: safety considerations. In: CAMM, A.J.; TENDERA, M. **Heart rate slowing by If current inhibition**: KARGER, 2006. Cap. 8, p. 79–96.

193. SAVELIEVA, I.; CAMM, A.J. If inhibition with ivabradine: electrophysiological effects and safety. **Drug Safety**, v. 31, n. 2, p. 95–107, 2008.

194. YOUNG, G.T. et al. Inflammatory and neuropathic pain are rapidly suppressed by peripheral block of hyperpolarisation-activated cyclic nucleotide-gated ion channels. **Pain**, v. 155, n. 9, p. 1708–1719, Sep. 2014.

195. BAUMHÄKEL, M. et al. Heart rate reduction with ivabradine improves erectile dysfunction in parallel to decrease in atherosclerotic plaque load in ApoE-knockout mice. **Atherosclerosis**, v. 212, n. 1, p. 55–62, Sep. 2010.

196. HEUSCH, G.; KLEINBONGARD, P. Ivabradine: cardioprotection by and beyond heart rate reduction. **Drugs**, v. 76, n. 7, p. 733–740, May 2016.

197. KLEINBONGARD, P.; GEDIK, N.; HEUSCH, G. Mitochondria are a target of cardioprotection by ivabradine. **FASEB Journal**, v. 29, n. 1 Supplement, Apr. 2015.

198. JEDLICKOVÁ, L. et al. Ivabradine - not only pure heart rate reduction? **Journal of Clinical Trials**, v. 4, p. 163, Apr. 2014

199. HEUSCH, G. et al. Improvement of regional myocardial blood flow and function and reduction of infarct size with ivabradine: protection beyond heart rate reduction. **European Heart Journal**, v. 29, n. 18, p. 2265–2275, Sep. 2008.

200. KRÖLLER-SCHÖN, S. et al. Differential effects of heart rate reduction with ivabradine in two models of endothelial dysfunction and oxidative stress. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, n. 6, p. 1147–1158, Nov. 2011.

201. GUIDET, B.; AIT-OUFELLA, H. Fluid resuscitation should respect the endothelial glycocalyx layer. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 707, Dec. 2014.

202. CHAPPELL, D. et al. Hypervolemia increases release of atrial natriuretic peptide and shedding of the endothelial glycocalyx. **Critical Care**, v. 18, n. 5, p. 538, Oct. 2014.

203. BRUEGGER, D. et al. Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, v. 289, n. 5, p. H1993–H1999, Nov. 2005.

APÊNDICE A – Padronização do modelo de sepse abdominal por ligadura e perfuração cecal em hamsters dourados

Visando a padronização do modelo de sepse abdominal por CLP para uso em hamsters sírios dourados, foi realizado estudo piloto que incluiu 32 animais divididos em quatro grupos:

a) grupo A: ligadura de 50% do ceco e perfuração única com agulha 16 Gauge (n=8);
b) grupo B: ligadura de 50% do ceco e perfuração única com agulha 20 Gauge (n=8);
c) grupo C: ligadura de 75% do ceco e perfuração única com agulha 16 Gauge (n=8);
d) grupo D: ligadura de 75% do ceco e perfuração única com agulha 20 Gauge (n=8).

A indução de sepse por CLP foi realizada seguindo-se descrição da técnica publicada por Rittirsch e colaboradores[27] e apresentada na seção Material e Métodos.

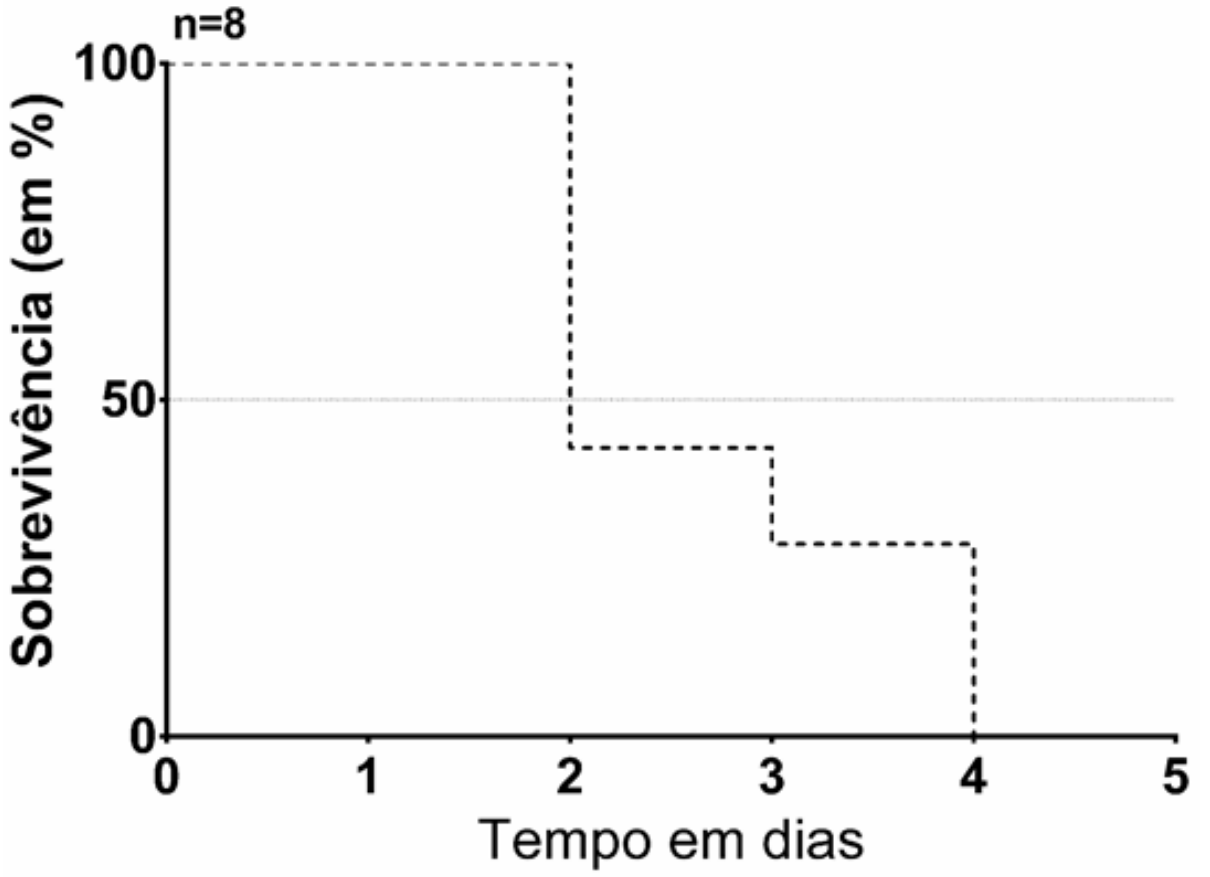
Todos os animais alocados nos grupos A e C evoluíram em 24 horas com grave torpor e hipotensão, morrendo nas próximas 12 horas.

Os animais alocados no grupo D apresentaram evolução heterogênea, com metade dos animais morrendo precocemente, nas primeiras 24 horas, e outra metade apresentando quadro séptico menos grave.

Os animais alocados no grupo B apresentaram evolução mais compatível com o delineamento experimental proposto para o presente estudo, sobrevivendo uma mediana de 48 horas após a indução de sepse por CLP e apresentando quadro séptico sem hipotensão.

O gráfico 14 apresenta a curva de sobrevida proporcional (curva de sobrevivência de Kaplan-Meier) dos animais alocados no grupo B (ligadura de 50% do ceco e perfuração única com agulha 20 Gauge).

Gráfico 10 – Análise de sobrevida após indução de sepse por CLP

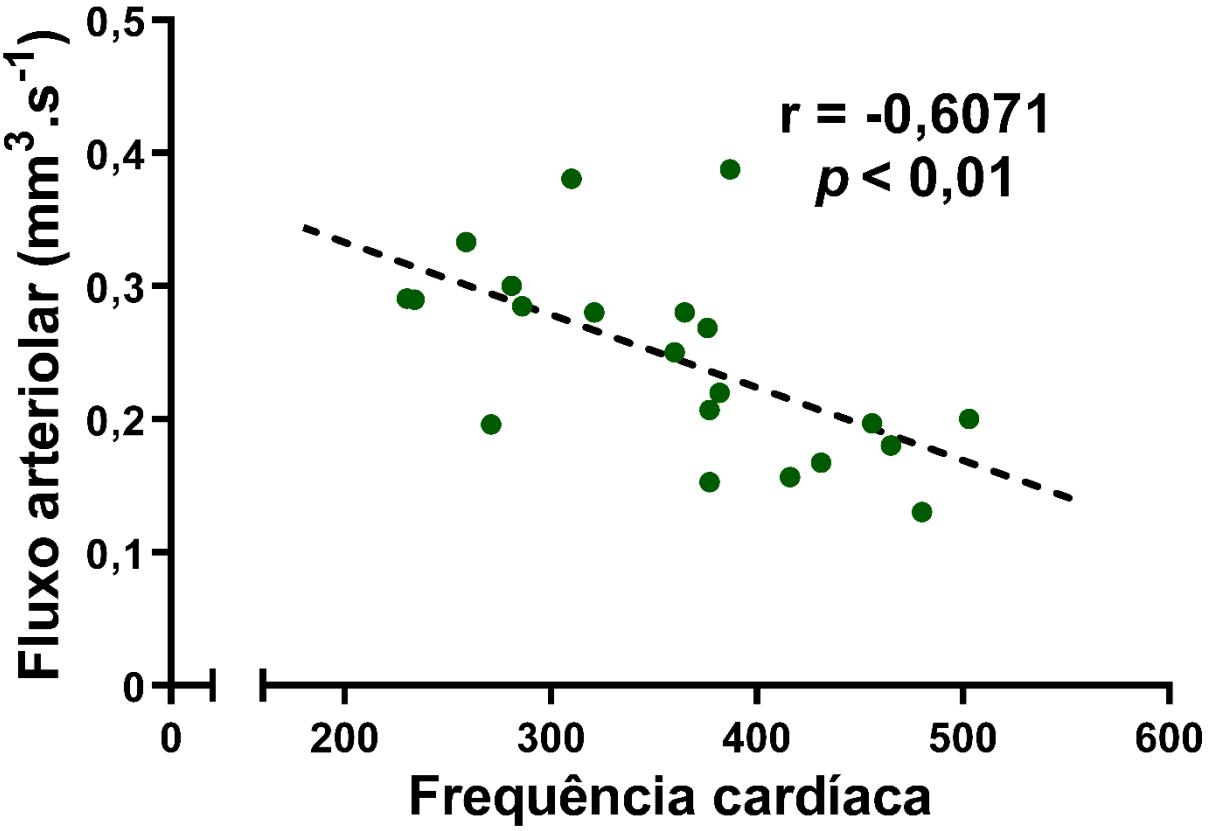


Legenda: Curva de sobrevivência de Kaplan-Meier de animais alocados no grupo B do estudo piloto de padronização do modelo de sepse abdominal por CLP para uso em hamsters sírios dourados.
Fonte: O autor, 2016.

APÊNDICE B – Correlação entre a frequência cardíaca e o fluxo arteriolar

Após análises estatísticas iniciais dos resultados do presente estudo, foi realizada análise *post hoc* dos dados dos experimentos principais tentando correlacionar os resultados de frequência cardíaca com os dados arteriolares. Para tanto, as variáveis arteriolares diâmetro e velocidade de fluxo sanguíneo foram convertidas matematicamente na variável fluxo arteriolar de acordo com a fórmula Q = A x V, onde Q é o fluxo arteriolar (em $mm^3.s^{-1}$), A é a área da secção transversa da arteríola e V é a velocidade de fluxo arteriolar. Assumindo-se uma geometria arteriolar cilíndrica, a área da secção transversa da arteríola foi calculada pela fórmula $\pi.R^2$, sendo π=3,14 e R=raio da arteríola medido pelo programa ImageJ. O gráfico 15 apresenta o resultado encontrado.

Gráfico 11 – Correlação entre a frequência cardíaca e o fluxo arteriolar



Legenda: Gráfico *scatter plots* da significativa correlação entre a frequência cardíaca e o fluxo arteriolar. Nota-se que quanto menor a frequência cardíaca, maior o fluxo arteriolar. O valor de r representa o coeficiente de correlação de Pearson. n = 21.

Fonte: O autor, 2016.

A variável fluxo arteriolar pode ser utilizada para avaliação indireta do débito cardíaco, sendo fisiologicamente aceitável a elevação do débito em frequências cardíacas mais baixas, como consequência do aumento do tempo de enchimento ventricular diastólico.

Por questões logísticas a viscosidade não foi utilizada para o cálculo do fluxo arteriolar, sendo possível que isso possa ter comprometido a interpretação dos resultados.

ANEXO – Parecer da Comissão de Ética para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCANTARA GOMES

COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº **CEUA/021/2015** sobre **"Avaliação das alterações microcirculatórias, perfusionais e inflamatórias secundárias ao uso de fármacos com ação cronotrópica negativa em um modelo experimental de sepse em hamsters"** sob a responsabilidade de **Eliete Bouskela,** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEUA), em **28/04/2015.** Este certificado expira em **28/04/2019.**

Rio de Janeiro, 28 de Abril de 2015.

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb
CEUA/IBRAG/UERJ

Profa. Dra. Patricia C. Lisboa
CEUA/IBRAG/UERJ

/.ass

☎ (21) 2587-6488 / 2587-6109 - Fax (21) 2284-9748
biologia@uerj.br