

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS E VARIABILIDADE  
DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM FÊMEAS CANINAS COM  
SEPSE DE OCORRÊNCIA NATURAL DEVIDO À PIOMETRA E  
SUAS CORRELAÇÕES COM VALORES SÉRICOS DE TNF-  
alfa, IL-1beta, IL-6, IL-10 E PROTEÍNA C REATIVA**

**Evandro Zacché Pereira**

Médico Veterinário

2015

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS E VARIABILIDADE**  
**DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM FÊMEAS CANINAS COM**  
**SEPSE DE OCORRÊNCIA NATURAL DEVIDO À PIOMETRA E**  
**SUAS CORRELAÇÕES COM VALORES SÉRICOS DE TNF-**  
**alfa, IL-1beta, IL-6, IL-10 E PROTEÍNA C REATIVA**

**MV. MSc. Evandro Zacché Pereira**

**Orientador: Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária, área: Clínica Médica Veterinária.

P436p Pereira, Evandro Zacché  
Parâmetros ecocardiográficos e variabilidade da frequência cardíaca em fêmeas caninas com sepse de ocorrência natural devido à piometra e suas correlações com valores séricos de TNF-alfa, IL-1beta, IL-6, IL-10 e proteína c reativa / Evandro Zacché Pereira. -- Jaboticabal, 2015  
xx, 85 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2015

Orientador: Aparecido Antonio Camacho

Banca examinadora: Marlos Gonçalves Sousa, Wilter Ricardo Russiano Vicente, Daniel Paulino Júnior, Wagner Luís Ferreira.

Bibliografia

1. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica. 2. Cardiomiopatia séptica. 3. cães. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 619:616.94:636.7





**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
CAMPUS DE JABOTICABAL  
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DE JABOTICABAL

### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO:** PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS E VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM FÊMEAS CANINAS COM SEPSE DE OCORRÊNCIA NATURAL DEVIDO À PIOMETRA E SUAS CORRELAÇÕES COM VALORES SÉRICOS DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 E PROTEÍNA C REATIVA

**AUTOR:** EVANDRO ZACCHÉ PEREIRA

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. APARECIDO ANTONIO CAMACHO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM MEDICINA VETERINÁRIA, Área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. APARECIDO ANTONIO CAMACHO

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. MARLOS GONÇALVES SOUSA  
Universidade Federal do Paraná / Curitiba/PR

Prof. Dr. WILTER RICARDO RUSSIANO VICENTE  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

  
Prof. Dr. DANIEL PAULINO JUNIOR  
Universidade de Franca / Franca/SP

  
Prof. Dr. WAGNER LUÍS FERREIRA  
Departamento de Clínica e Cirurgia e Reprodução Animal / Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba

Data da realização: 04 de fevereiro de 2015.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**EVANDRO ZACCHÉ PEREIRA** – nascido em Linhares, Espírito Santo, aos 19 dias do mês de julho, filho de José de Almeida Pereira e Rosângela Maria Zacché Pereira. Gradou-se em Medicina Veterinária pela Universidade Federal do Espírito Santo em agosto de 2006. Durante a graduação foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, na modalidade de Iniciação Científica, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Rezende Luz. Ingressou no programa de residência em clínica médica de pequenos animais na Pontifícia Universidade Católica do Paraná em fevereiro de 2007 e concluiu em fevereiro de 2009. Em março de 2009 ingressou no curso de Mestrado em Medicina Veterinária, área de concentração em Clínica Médica Veterinária, junto à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, sob a orientação do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho, e concluiu em fevereiro de 2011. Durante o período de Mestrado foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq. Em março de 2011 iniciou o curso de Doutorado em Medicina Veterinária na mesma instituição de ensino, também sob a orientação do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho. Durante o período de Doutorado foi bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

“Bom mesmo é ir à luta com determinação,  
abraçar a vida com paixão, perder com classe  
e vencer com ousadia... Pois o triunfo pertence  
a quem se atreve”

Charles Chaplin

À minha mãe, por todo amor, dedicação e sacrifício.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria imensamente de agradecer a todos aqueles que, direta ou indiretamente, colaboraram com a execução desse trabalho.

Inicialmente ao professor **Aparecido Antonio Camacho**, não só pela orientação, mas por todos os ensinamentos, pela parceria, sempre estimulando as novas ideias e empreitadas, pela preocupação e também pela amizade.

Aos irmãos do Serviço de Cardiologia **Fábio Gava, Edna Mireya, Fernando Rosa, Jorge Filho, Roberto Navarrete, Fabrício Marinho, Felipe Adams, Ana Paula Araújo, Rafael Camacho** pelo companheirismo, amizade e ajuda sempre.

Ao Serviço de Obstetrícia da instituição, mais especificamente ao professor **Wilter Ricardo Russiano Vicente** por ter, de forma tão solícita, permitido a utilização dos animais de sua rotina médica e proporcionado essa parceria, que sem a qual o trabalho não teria sido realizado. Às grandes parceiras e amigas **Marina Brito e Ana Paula Simões** pela participação ativa na execução do projeto, que considero ser tanto delas quanto meu.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Clínica, em especial ao professor **Áureo Evangelista Santana, Mateus e Nathan Cruz** pela liberação do laboratório e processamento das amostras.

Aos professores **Luciane Batalhão, Gustavo Gosuen, André Escobar, Daniel Paulino Jr., Wagner Luis Ferreira, Marlos Gonçalves de Sousa** e novamente ao professor **Wilter Ricardo Russiano Vicente** pelas correções e contribuições na redação.

A toda a família do Antro do HV, **Viçosa, Fernando Rosa, Tatá, Murilo, Tofu, Dido, Andrezão, Felipe, Bruninho e Sufrido**.

Aos proprietários dos animais que se propuseram a ajudar e tornaram o trabalho possível.

À **Carolina Toni**, pelo amor, dedicação e parceria incondicional.

E ao pequeno **Benjamin**, que ainda nem chegou, mas já transformou minha vida de uma maneira indescritível.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado (processo nº 2011/10361-5) e pelo auxílio (processo nº 2012/02247-0) concedidos para esse estudo.

## SUMÁRIO

	Página
RESUMO .....	xi
ABSTRACT .....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS .....	xiii
LISTA DE TABELAS .....	xv
LISTA DE FIGURAS .....	xviii
1. INTRODUÇÃO .....	21
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	22
3. OBJETIVOS .....	29
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
4.1. Seleção dos pacientes e critérios de inclusão .....	30
4.2. Avaliação cardiocirculatória .....	31
4.3. Perfil bioquímico .....	32
4.4. Perfil de citocinas e proteína C reativa .....	33
4.5. Procedimento cirúrgico e reavaliações .....	33
4.6. Análise estatística .....	34
5. RESULTADOS .....	35
5.1. Parâmetros clínicos, pressão arterial sistólica e avaliação hematológica ...	35
5.2. Avaliação cardíaca .....	39
5.3. Perfil de citocinas e proteína C reativa .....	43
5.4. Interação entre parâmetros ecocardiográficos e VFC com citocinas e proteína C reativa .....	45
5.5. Interação entre citocinas e proteína C reativa com valores hematológicos.	55
6. DISCUSSÃO .....	57
7. CONCLUSÃO .....	70
8. REFERÊNCIAS .....	71
9. APÊNDICES .....	85



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 02286/14 do trabalho de pesquisa intitulado **"Avaliação cardíaca em cadelas com sepse devido ao complexo hiperplasia cística endometrial/piometra"**, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aparecido Antonio Camacho está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), em reunião ordinária de 11 de março de 2014.

Jaboticabal, 11 de março de 2014.

**Prof.ª Dr.ª Paola Castro Moraes**  
Coordenadora - CEUA

**PARÂMETROS ECOCARDIOGRÁFICOS E VARIABILIDADE DA FREQUÊNCIA CARDÍACA EM FÊMEAS CANINAS COM SEPSE DE OCORRÊNCIA NATURAL DEVIDO À PIOMETRA E SUAS CORRELAÇÕES COM VALORES SÉRICOS DE TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 E PROTEÍNA C REATIVA**

**RESUMO** - Com o objetivo de avaliar a função miocárdica e autonômica de cães com sepse, foram estudadas 17 cadelas com diagnóstico de piometra e critérios de positividade para síndrome da resposta inflamatória sistêmica. Esses animais foram submetidos à avaliação ecocardiográfica e variabilidade da frequência cardíaca, além de avaliação hematológica, bioquímica sérica, dosagem das concentrações de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e proteína C reativa, no momento do diagnóstico (T-0) e 15 (T-15) e 30 (T-30) dias após a histerectomia. Dentre os parâmetros ecocardiográficos, foi observada diminuição do tempo de desaceleração da onde E do fluxo mitral em T-0 em relação ao T-30 ( $68,0 \pm 49,1$  e  $111,0 \pm 63,8$ ;  $p=0,035$ ) e tempo de relaxamento isovolumétrico também em T-0 em relação ao T-30 ( $61,5 \pm 15,6$  e  $70,0 \pm 13,6$ ;  $p=0,0002$ ). Foi observada também correlação negativa significativa entre os índices de função sistólica, fração de encurtamento e fração de ejeção, e a concentração sérica de proteína C reativa ( $r=-0,324$ ,  $p=0,02$  e  $r=-0,332$ ,  $p=0,01$ , respectivamente). Em relação à avaliação do sistema autonômico, foi observada redução de todos os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca em T-0 em relação aos demais momentos, com  $p<0,0001$  para todos os índices. Assim, nas condições do presente estudo foi possível concluir que fêmeas caninas com sepse de ocorrência natural apresentam disfunção autonômica, refletido pela diminuição de todos os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca e que a proteína C reativa pode desempenhar um papel na patogênese da progressão do comprometimento cardíaco.

**Palavra-chave:** síndrome da resposta inflamatória sistêmica, citocinas, cardiomiopatia relacionada à sepse, disfunção miocárdica, disfunção autonômica, cães.

## **ECHOCARDIOGRAPHIC PARAMETERS AND HEART RATE VARIABILITY IN BITCHES WITH NATURALLY OCCURRING SEPSIS DUE TO PYOMETRA AND ITS CORRELATIONS WITH SERUM VALUES OF TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 AND C-REACTIVE PROTEIN**

**ABSTRACT** - In order to assess myocardial and autonomic function in dogs with sepsis were studied 17 bitches diagnosed with pyometra and positive criteria for systemic inflammatory response syndrome. These animals underwent echocardiographic and heart rate variability tests, and also hematological evaluation, serum biochemistry, and serum TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 and C-reactive protein, at diagnosis (T-0) and 15 (T-15) and 30 (T-30) days after hysterectomy. Among the echocardiographic parameters were observed decrease in E mitral flow deceleration time in T-0 relative to the T-30 ( $68.0 \pm 49.1$  and  $111.0 \pm 63.8$ ;  $p = 0.035$ ) and isovolumetric relaxation time in relation to T-0 and T-30 ( $61.5 \pm 15.6$  and  $70.0 \pm 13.6$ ,  $p = 0.0002$ ). It was also observed a significant negative correlation between indexes of systolic function, fractional shortening and ejection fraction, and the serum concentration of C-reactive protein ( $r = -0.324$ ,  $p = 0.02$  and  $r = -0.332$ ,  $p = 0.01$ , respectively). Regarding the assessment of the autonomic system, there was a reduction of all parameters of heart rate variability in T-0 compared to other moments, with  $p < 0.0001$  for all indexes. Thus, under the circumstances of the present study, it was possible to conclude that female dogs with naturally occurring sepsis present autonomic dysfunction, reflected by the reduction of all parameters of heart rate variability, and C-reactive protein may play a pathogenic role in the progression of cardiac involvement.

**Key-words:** systemic inflammatory response syndrome, cytokines, sepsis-related cardiomyopathy, myocardial dysfunction, autonomic dysfunction, dogs.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

$\mu$	Micro
AE	Átrio esquerdo
ALT	Alanina amino transferase
Ao	Aorta
bpm	Batimentos por minuto
DIVE	Diâmetro interno do ventrículo esquerdo
dL	Decilitro
DMO	Disfunção múltipla de órgãos
DP	Desvio padrão
EF%	Fração de ejeção, do inglês “ejection fraction”
FA	Fosfatase alcalina
FS%	Fração de encurtamento, do inglês “fraction shortening”
IL	Interleucina
Index	Indexado pela área de superfície corpórea
Kg	Quilograma
L	Litro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
mpm	Movimentos por minuto
ms	Milissegundos
mV	Milivolt
NO	óxido nítrico, do inglês “nitric oxide”
PAMPs	padrões moleculares associados a patógenos, do inglês “pathogen-associated molecular patterns”
pg	Picograma
pNN>50	Porcentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms
rMSSD	Raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes
rpm	Rotações por minuto
SDANN	Desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos

SDNN	Desvio padrão de todos os intervalos RR
SDNNIDX	Média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos
SNA	Sistema nervoso autônomo
SRIS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TED	Tempo de desaceleração da onda E do fluxo mitral
TH	Tirosina hidroxilase
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TRIV	Tempo de relaxamento isovolumétrico
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
$\alpha$ 7nAChR	Subunidades sete dos receptores nicotínicos de acetilcolina

**LISTA DE TABELAS**

	Página
Tabela 1 Parâmetros clínicos [média $\pm$ DP ou mediana (mínimo – máximo)] de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).	35
Tabela 2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos [média $\pm$ DP ou mediana (mínimo – máximo)] de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).	37
Tabela 3 Parâmetros ecocardiográficos (média $\pm$ DP) de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).	40
Tabela 4 Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca [média $\pm$ DP ou mediana (mínimo – máximo)] de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).	42
Tabela 5 Concentrações séricas de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$ e proteína C reativa [média $\pm$ DP ou mediana (mínimo – máximo)] de fêmeas caninas com sepse (n=17) à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).	44

Tabela 6	Parâmetros ecocardiográficos (média $\pm$ DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de IL-6 em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).	46
Tabela 7	Parâmetros ecocardiográficos (média $\pm$ DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de IL-10 em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).	47
Tabela 8	Parâmetros ecocardiográficos (média $\pm$ DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de proteína C reativa em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).	48
Tabela 9	Distribuição do logaritmo natural da variabilidade da frequência cardíaca (média $\pm$ DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de IL-6 em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).	49
Tabela 10	Distribuição do logaritmo natural da variabilidade da frequência cardíaca (média $\pm$ DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de IL-10 em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).	49

- Tabela 11 Distribuição do logaritmo natural da variabilidade da frequência cardíaca (média  $\pm$  DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de proteína C reativa em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015). 50
- Tabela 12 Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros ecocardiográficos e IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>, IL-6<sub>Log</sub>, IL-10<sub>Log</sub>, TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub> e Proteína C reativa<sub>Log</sub> em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015). 51
- Tabela 13 Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca e IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>, IL-6<sub>Log</sub>, IL-10<sub>Log</sub>, TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub> e Proteína C reativa<sub>Log</sub> em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015). 53
- Tabela 14 Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros hematológicos e IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>, IL-6<sub>Log</sub>, IL-10<sub>Log</sub>, TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub> e Proteína C reativa<sub>Log</sub> em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido ao complexo hiperplasia cística endometrial – piometra e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015). 55
- Tabela 15 Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros bioquímicos séricos e IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>, IL-6<sub>Log</sub>, IL-10<sub>Log</sub>, TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub> e Proteína C reativa<sub>Log</sub> em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015). 56

**LISTA DE FIGURAS**

	Página	
Figura 1	Representação gráfica dos valores médios (frequência cardíaca e pressão arterial sistólica) e medianos (frequência respiratória e temperatura) dos parâmetros clínicos de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). $\Delta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30; $\Theta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-30. UNESP – Jaboticabal (2015).	36
Figura 2	Representação gráfica dos valores medianos dos parâmetros hematológicos de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). $\Delta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30; $\Theta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-30. UNESP – Jaboticabal (2015).	38
Figura 3	Representação gráfica dos valores medianos (FA e ALT) e médios (albumina) dos parâmetros bioquímicos séricos de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). $\Delta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30; $\Theta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-30. $\Psi$ : significativamente diferente em relação ao T15. UNESP – Jaboticabal (2015).	39

- Figura 4 Representação gráfica dos valores médios do tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de desaceleração da onda E de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente).  $\Theta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-30. UNESP – Jaboticabal (2015). 41
- Figura 5 Representação gráfica dos valores médios dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente).  $\Delta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30. UNESP – Jaboticabal (2015). 43
- Figura 6 Representação gráfica dos valores medianos (IL-6) e médios (proteína C reativa) dos marcadores inflamatórios de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente).  $\Delta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30.  $\Theta$ : significativamente diferente em relação ao momento T-30. UNESP – Jaboticabal (2015). 45
- Figura 7 Representação gráfica da correlação de Spearman entre o logaritmo natural da concentração sérica de proteína C reativa e os valores da fração de encurtamento (a) e fração de ejeção (b) de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente), totalizando 51 amostras. FS: fração de encurtamento; FE: fração de ejeção. UNESP – Jaboticabal (2015). 52

Figura 8 Representação gráfica da correlação de Spearman entre o logaritmo natural da concentração sérica de proteína C reativa e os valores dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. SDNN: desvio padrão de todos os intervalos RR; SDANN: desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos; SDNNIDX: média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos; rMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes; pNN50: percentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).

## 1. INTRODUÇÃO

A sepse está entre as principais causas de morte por infecção em todo o mundo. Estima-se, globalmente, que cerca de 20 a 30 milhões de pessoas sejam acometidas todos os anos, com aproximadamente 24 mil óbitos por dia. Mesmo com essas estatísticas e apesar de pacientes com sepse apresentarem probabilidade de morrer cinco vezes superior do que pacientes com infarto do miocárdio ou acidente vascular cerebral, a doença ainda é pouco conhecida e na maioria das vezes não é dada a ela o mesmo caráter emergencial dessas outras condições (REINHART et al., 2013).

Em um estudo norte americano, foi observada incidência de três casos para cada 1.000 habitantes nos Estados Unidos, equivalente a 751.000 casos por ano, superando o número de casos de síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) e dos principais tipos de câncer (ANGUS et al., 2001). No Brasil, estudos mostram incidências de aproximadamente 58 casos de sepse para cada 1.000 pacientes internados em unidades de terapia intensiva, com taxas de letalidade podendo chegar a mais de 50%. Além disso, sabe-se que para os pacientes que desenvolvem disfunção miocárdica como complicação da sepse a taxa de mortalidade pode se elevar até 90% (PARRILLO et al., 1990; SILVA et al., 2004; SALES JÚNIOR et al., 2006; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011)

Atualmente, diversas entidades mundiais têm focado seus esforços para reduzir tanto a incidência quanto os índices de mortalidade decorrentes da sepse e também aumentar a conscientização pública (REINHART et al., 2013). Infelizmente, em medicina veterinária o foco ainda se baseia na caracterização do paciente. Embora os cães tenham sido utilizados como modelos experimentais por muito tempo, pouco se sabe a respeito do perfil dos animais com sepse de ocorrência natural. Os dados a respeito de incidência e letalidade são escassos e as informações sobre a ocorrência de disfunção orgânica são quase inexistentes. Alguns autores sugerem a possibilidade de disfunção miocárdica acompanhando a sepse, no entanto, tanto esse quesito quanto as possíveis alterações ecocardiográficas e o comprometimento autonômico nunca foram criteriosamente investigados (STAATZ et al., 2002; BULMER, 2011).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Embora a utilização do termo sepse seja milenar, seu conceito moderno foi primeiramente definido no início da década de 90, em uma conferência de consenso entre o “American College of Chest Physicians” e a “Society of Critical Care Medicine”, e então revisto no ano de 2001, em uma conferência internacional sobre o assunto (BONE et al., 1992; LEVY et al., 2003). Atualmente, o conceito de sepse envolve as situações nas quais há presença de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) desencadeada por infecção suspeita ou confirmada (LEVY et al., 2003; FUNK et al., 2009; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011).

Esse quadro resulta de complexa interação entre o micro-organismo infectante e a resposta imune, pró-inflamatória e pró-coagulante do hospedeiro (HOTCHKISS & KARL, 2003; HENKIN et al., 2009; REINHART et al., 2012). Do ponto de vista clínico, essa interação tem várias possibilidades de manifestação, sendo elas infecção, SRIS, sepse, sepse grave, choque séptico e disfunção múltipla de órgãos (DMO) (LEVY et al., 2003; SIQUEIRA-BATISTA et al., 2011). Por muito tempo, a teoria mais prevalente foi de que a sepse representava uma resposta inflamatória descontrolada (BONE et al., 1992; STONE, 1994), no entanto a falha em reduzir a mortalidade na sepse com a utilização de agentes anti-inflamatórios levaram investigadores a questionar se a morte nos pacientes sépticos realmente resultava de processo inflamatório não controlado (NATANSON et al., 1994; NELSON, 1999). Assim, atualmente acredita-se que a resposta do hospedeiro e as características do organismo infectante são as principais variáveis fisiopatológicas da sepse. Desta maneira, ocorre progressão da síndrome quando o hospedeiro não consegue conter a infecção primária por resistência à opsonização, à fagocitose, aos antibióticos e à presença de superantígenos (HOTCHKISS & KARL, 2003; REINHART et al., 2012).

Os efeitos generalizados que ocorrem na sepse são resultados da entrada de micro-organismos ou endotoxinas na circulação e posterior interação com células do sistema imune. A resposta imune inata é a responsável pelo processo inflamatório inicial na sepse. Ela é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão, que reconhecem os patógenos ou seus produtos identificados como padrões moleculares

associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) (MEDZHITOV & JANEWAY JR., 1998; KORTGEN et al., 2006).

Uma vez ativados, esses receptores desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares que culmina com a translocação de fatores de transcrição que promovem a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 beta (IL-1 $\beta$ ), e anti-inflamatórias como a interleucina 10 (IL-10) (BALDWIN JR, 2001; TAMAYO et al., 2011).

O TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  ativam a resposta imune adaptativa, que é responsável pela amplificação da resposta imune inata (RUSSEL, 2006). Essas moléculas, por *feedback* positivo, também estimulam sua própria liberação, via células T “helper” tipo 1 (Th1). Contrabalançando esse mecanismo, as células T “helper” tipo 2 (Th2) secretam interleucinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) (HENKIN et al., 2009).

As citocinas pró-inflamatórias anteriormente citadas aumentam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. Estas últimas, por sua vez, liberam óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, que tem papel fundamental na patogênese do choque séptico (RUSSEL, 2006). Por outro lado, a ativação dos monócitos e macrófagos e a intensa ação dos mediadores iniciais acarretam na síntese de outras citocinas, como IL-6, IL-8 e IL-10, com vários efeitos sinérgicos e antagônicos na resposta inflamatória. A secreção de IL-6 leva à reprogramação da expressão gênica hepática, a chamada “resposta de fase aguda”, caracterizada pela produção de proteínas de fase aguda como a proteína C reativa e a supressão das proteínas negativas de fase aguda, como a albumina (KORTGEN et al., 2006; TAMAYO et al., 2011).

Os mediadores liberados na sepse podem induzir febre, hipotensão, disfunção pulmonar e anorexia (SILVA et al., 2006; BOLLER & OTTO, 2009). Quando os pacientes, tanto humanos quanto animais, são examinados em fase precoce, os sinais clínicos refletem um estado hiperdinâmico e pode ser observado febre, taquicardia, taquipneia e congestão de membranas mucosas (PAIXÃO, 2005; SILVA et al., 2006). Com relação às análises sanguíneas, pode-se observar leucocitose com desvio à esquerda ou leucopenia, hiperglicemia, aumento do lactato e trombocitopenia. Nesta fase, a pressão arterial geralmente apresenta-se normal. À medida que a sepse

progredir para o choque séptico, pode-se encontrar hipotermia, extremidades frias, mucosas pálidas, hipotensão e fraqueza muscular (PAIXÃO, 2005; SILVA et al., 2006; BOLLER & OTTO, 2009).

Os pacientes em quadro séptico ainda podem apresentar disfunção de múltiplos órgãos como agravante da síndrome (PAIXÃO, 2005; FERNANDES JÚNIOR et al., 2006). O coração é um dos órgãos mais afetados pela resposta que ocorre na sepse, sepse grave e no choque séptico. É sabido, desde a década de 80, que na sepse ocorre depressão da função miocárdica, mesmo nos pacientes com débito cardíaco elevado, em face da deterioração da performance cardíaca, indicada pela diminuição da fração de ejeção e dilatação biventricular (RABUEL & MEBAZAA, 2006; ABRAHAM & SINGER, 2007, ANTONUCCI et al., 2014). Essa disfunção miocárdica é motivada por diversos fatores relacionados não só às mudanças no tônus vascular, mas também às alterações da função sistólica e diastólica dos ventrículos esquerdo e direito, tanto em humanos quanto em modelos experimentais, e parecem ser consequência de múltiplas alterações celulares, sob o efeito das citocinas, óxido nítrico, lisozimas, DNA e RNA bacterianos (KIMCHI et al., 1984; ELLRODT et al., 1985; COURT et al., 2002; RABUEL & MEBAZAA, 2006; ABRAHAM & SINGER, 2007, ANTONUCCI et al., 2014).

Numerosos estudos têm mostrado que, quando o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  são administrados ao tecido cardíaco humano ou animal, o resultado é uma depressão da contratilidade miocárdica concentração dependente (WEISENSEE et al., 1993; KUMAR et al., 1996; GU et al., 1998), que pode ocorrer de forma tão precoce quanto 10 minutos após a exposição às citocinas, ou de forma tardia, iniciando após horas desde a exposição e permanecendo por dias (KUMAR et al., 1996; KUMAR et al., 2001).

O mecanismo da depressão miocárdica na sepse envolve, finalmente, a atenuação reversível da força de contração dos miofilamentos dos miócitos cardíacos de forma individual. Fundamentalmente, dois mecanismos respondem por tal fenômeno. O primeiro mecanismo atribui a disfunção à diminuição da liberação de cálcio no citosol e o segundo, à diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio (TAVERNIER et al., 1998; RUDIGER & SINGER, 2007; MERX & WEBER, 2007).

Jardin et al. (1990) demonstraram que a disfunção ventricular que ocorre na sepse pode apresentar-se sob vários graus, desde uma alteração latente até uma

grave insuficiência ventricular sistólica. Estudos ecocardiográficos demonstraram que a diminuição da fração de ejeção e a dilatação ventricular aguda podem ser bons preditores da disfunção ventricular induzida pela sepse (STAHL et al., 1990; POELAERT et al., 1997). Outros trabalhos demonstraram enchimento ventricular lento e relaxamento anormal do ventrículo esquerdo, sugerindo que a perda de complacência ventricular também contribui para a depressão miocárdica na sepse (JAFRI et al., 1990; MUNT et al., 1998). Mais recentemente, Torres-rojo et al. (2005) observaram que, além da fração de ejeção, o índice de performance global é igualmente eficaz na avaliação da disfunção miocárdica na sepse e se relaciona com a severidade do quadro.

O aumento da frequência cardíaca observado na sepse é um fator também já atribuído como contribuinte da disfunção miocárdica (RUDIGER & SINGER, 2007). A taquicardia, uma característica típica da sepse, já foi vista como uma resposta ao subenchimento ventricular e febre, no entanto mais recentemente foi proposto que o sistema nervoso autônomo participa ativamente da modulação da resposta inflamatória e é um dos principais responsáveis pela taquicardia induzida pela sepse, podendo também estar relacionado à síndrome da disfunção múltipla de órgãos (RUDIGER & SINGER, 2007; DE COUCK et al., 2012; JANIG, 2014).

Anatomicamente, as vias eferentes do nervo vago descendem do núcleo ambíguo e núcleo dorsal do nervo vago no tronco encefálico para diversos órgãos incluindo pulmão, coração e trato gastrointestinal. A via aferente sensitiva, que termina no núcleo do trato solitário, transmite uma série de sinais para o cérebro durante quadro de doença grave (DE COUCK et al., 2012; LUKEWICH et al., 2014). Foi observado em estudo experimental que o nervo vago informa o cérebro a respeito de inflamação periférica mediante sinalização com IL-1 (EK et al., 1998). O cérebro responde mediante a liberação de potenciais de ação transmitidos pelo nervo vago, que culminam na liberação de acetilcolina, que interagem com as subunidades sete dos receptores nicotínicos de acetilcolina ( $\alpha 7$ nAChR), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (DE COUCK et al., 2012), resposta essa chamada de via anti-inflamatória colinérgica.

Acredita-se que durante a sepse há liberação maciça de catecolaminas, que leva à supressão da via anti-inflamatória colinérgica e também estimula diretamente a produção de mediadores pro-inflamatório nas células do sistema imune, principalmente nos macrófagos (ANNANE et al., 1999; SCHMIDT et al., 2001; SHARSHAR et al., 2003; DE COUCK et al., 2006).

Atualmente é possível conhecer o estado de ação autonômica em que se encontra o coração mediante utilização da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), uma ferramenta do exame eletrocardiográfico contínuo de 24 horas. A frequência cardíaca varia batimento a batimento como consequência das adaptações constantes promovidas pelo sistema nervoso autônomo (SNA), para manter o equilíbrio do sistema cardiovascular. Essas alterações podem ser avaliadas por meio das variações nos intervalos entre ondas R do eletrocardiograma, constituindo, assim, a variabilidade da frequência cardíaca (MALIK et al., 1996; MENEZES JÚNIOR et al., 2004; FRONCHETTI et al., 2006).

Os índices de VFC, calculados por meio de métodos estatísticos, podem ser divididos em duas categorias: índices baseados na medida dos intervalos RR individualmente (SDNN, SDANN e SDNNIDX) e índices baseados na comparação entre dois intervalos RR adjacentes (pNN>50 e rMSSD). Como a estimulação parassimpática resulta numa resposta rápida e de curta duração, fazendo-se notar já no primeiro ou segundo batimentos subsequentes, índices baseados na comparação entre a duração de dois ciclos adjacentes, como pNN>50 e rMSSD refletem predominantemente o tônus vagal, enquanto os demais refletem a ação conjunta dos sistemas simpático e parassimpático (MALIK et al., 1996; CALVERT, 1998; VANDERLEI et al., 2009). Diversos autores têm demonstrado interação entre inflamação e disfunção autonômica mediante a identificação da redução dos índices da VFC em pacientes com SRIS, sepse ou DMO (MADSEN et al., 2007; PAPAIOANNOU et al., 2009; THAYER, 2009).

Apesar de existirem muitas informações a respeito da sepse em pacientes humanos e animais de experimentação, pouco se sabe sobre essa síndrome e suas complicações nos cães (BULMER, 2011). Não se sabe exatamente a porcentagem de animais que apresentam alterações cardíacas que caracterizam disfunção miocárdica,

tampouco se os pacientes com sepse sem choque apresentam algum tipo de disfunção cardíaca (BULMER, 2011). O quadro é ainda menos esclarecedor quando se tenta traçar um perfil da função miocárdica ou autonômica de pacientes caninos com sepse de ocorrência natural. Nesta espécie, a grande maioria dos esforços para caracterizar a disfunção orgânica ocorre em pacientes que tiveram a doença induzida por aplicação de interleucinas pró-inflamatórias ou dos antígenos associados aos patógenos (DOI et al., 2009; SONG et al., 2013; YANG et al., 2014). No entanto, a ocorrência natural de sepse em cães é muito frequente, embora não existam dados epidemiológicos que expressem sua magnitude. Dentre as condições rotineiras que predispõem os cães à sepse, destaca-se a piometra (LAFORCADE et al., 2003).

A piometra é uma desordem reprodutiva comum que afeta aproximadamente um quarto de todas as fêmeas da espécie canina antes de atingirem 10 anos de idade, segundo estudo europeu (EGENVALL et al., 2001; VERSTEGEN et al., 2008). A doença é definida pelo acúmulo de material purulento dentro do lume uterino, que ocorre durante ou imediatamente após o período de dominância da progesterona (HAGMAN et al., 2006a; PRETZER, 2008; KEMPISTY et al., 2013). A importância da progesterona na patogenia da doença é atribuída principalmente à supressão da resposta imune, estimulação da secreção das glândulas endometriais, que fornecem ambiente adequado para o crescimento bacteriano e fechamento da cérvix, inibindo a drenagem do exsudato uterino (AUSTAD et al., 1979; VERSTEGEN et al., 2008). Estudos mais antigos atribuíam a doença à exposição excessiva ou prolongada à progesterona (DOW et al., 1959), no entanto dados mais recentes sugerem resposta exagerada à progesterona ao invés de aumento da concentração desse hormônio nos animais acometidos (DHALIWAL et al., 2002).

A combinação entre redução da imunidade local e condições uterinas favoráveis predispõe à colonização bacteriana (PRETZER, 2008). A bactéria mais comumente encontrada nos casos de piometra é a *Escherichia coli*, organismo particularmente perigoso devido à liberação de endotoxinas que podem resultar em sepse ou choque séptico (MCANULTY, 1983; PRETZER, 2008).

Laforcade et al. (2003), em estudo conduzido para avaliar o quadro hemostático de cães com sepse de ocorrência natural, observaram que a piometra foi uma das

principais responsáveis pela instalação do quadro séptico. Sendo assim, a utilização de cadelas com piometra mostra-se uma excelente escolha para o estudo da sepse de ocorrência natural.

Levando em consideração as semelhanças entre seres humanos e cães em relação à fisiopatologia dessa síndrome, levante-se a hipótese de que pacientes da espécie canina com sepse de ocorrência natural apresentam disfunção miocárdica e autonômica secundária à liberação de mediadores inflamatórios de forma semelhante ao que ocorre com pacientes humanos. Portanto, a caracterização adequada dos pacientes caninos com sepse de ocorrência natural é relevante tanto para a própria espécie, visto que o melhor entendimento da síndrome possibilitaria tratamento mais adequado, quanto para o desenvolvimento de um modelo experimental natural valioso para o estudo de novos métodos terapêuticos, que serve também a pacientes humanos.

### **3. OBJETIVOS**

O presente estudo teve como objetivo avaliar se fêmeas caninas com sepse de ocorrência natural apresentam alterações ecocardiográficas e/ou na variabilidade da frequência cardíaca e se essas supostas alterações se correlacionam com as concentrações séricas dos marcadores inflamatórios mensurados (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e proteína C reativa).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi conduzido no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, *campus* de Jaboticabal, conjuntamente entre os serviços de Cardiologia, Obstetrícia e o laboratório de Patologia Clínica.

### 4.1. Seleção dos pacientes e critérios de inclusão

Foram inicialmente selecionados para o estudo fêmeas da espécie canina, independente de raça, idade e peso, com diagnóstico de piometra, baseado no histórico, achados de exame físico, alterações hematológicas e ultrassonográficas. Além disso, os animais precisavam apresentar critérios de positividade para a síndrome da resposta inflamatória sistêmica, estabelecido pela presença de dois ou mais dos seguintes achados: aumento da frequência cardíaca ( $>120$  bpm), aumento da frequência respiratória ( $>40$  mpm), redução ou aumento da temperatura corpórea ( $<38,0^{\circ}\text{C}$  ou  $>40,0^{\circ}\text{C}$ ) e do número de leucócitos totais ( $>18.000/\mu\text{L}$  ou  $<5.000/\mu\text{L}$ ) ou aumento do número de neutrófilos imaturos ( $>10\%$ ) (HAUPTMAN et al., 1997; BARTON, 2005).

Foram mantidos no estudo somente os animais que não apresentaram sinais ecocardiográficos de doenças valvares ou miocárdicas primárias que pudessem levar à ativação de mecanismos compensatórios e/ou remodelamento cardíaco, não portadores de doenças sistêmicas que sabidamente interferem nas concentrações séricas de citocinas, que não apresentaram intercorrências com a amostra de soro no momento das dosagens das citocinas e aqueles pacientes que compareceram nas datas estabelecidas de reavaliação.

Obedeceram a esses critérios e fizeram parte do estudo 17 animais, com idade média de 9,3 anos (variando entre seis e 13 anos) e peso médio de 14,5 Kg (variando de 3,2 a 27 Kg). Esses animais foram submetidos a avaliações no momento do diagnóstico (T-0) e então 15 e 30 dias após (T-15 e T-30, respectivamente).

## 4.2. Avaliação cardiocirculatória

Após o diagnóstico da afecção, os animais foram encaminhados para o Serviço de Cardiologia, onde foram mantidos por 10 minutos em ambiente isolado, tranquilo, sob temperatura controlada e com a presença do proprietário objetivando ambientação. Então, foram submetidos à avaliação da pressão arterial não invasiva pelo método Doppler vascular (Model 811-B Doppler Ultrasonic Flow Detector, Parks Medical Electronics), seguindo protocolo padrão recomendado por Brown et al. (2007), ou seja, animais mantidos em decúbito lateral, manguito medindo 40% da circunferência do membro torácico e realização de cinco aferições consecutivas, com exclusão do primeiro valor, para a obtenção da média.

Após o procedimento anterior, os animais foram submetidos ao exame ecocardiográfico utilizando aparelho Pie Medical, modelo Pandion 300s, com transdutor multifrequencial 5,0 – 7,5 mHz. As variáveis mensuradas foram diâmetro interno do ventrículo esquerdo na sístole (DIVEs) e diástole (DIVEd), obtidos na imagem de eixo curto, em modo-M, pela janela paraesternal direita, ao nível das cordas tendíneas. Todas essas mensurações foram indexadas pela área de superfície corpórea. Com as variáveis obtidas foram calculadas a fração de encurtamento (FS) e fração de ejeção (EF) pelo método de Teichholz. Ainda em janela paraesternal direita, imagem de eixo curto, em modo bidimensional, em imagem padrão ao nível da base do coração – aorta, foram obtidos o diâmetro do átrio esquerdo (AE) e da artéria aorta (Ao) e calculada a relação entre ambos (AE/Ao) e também entre DIVEd e Ao.

Em janela paraesternal esquerda, modo bidimensional, foi mensurado o pico de velocidade do enchimento ventricular esquerdo rápido (onda E) e lento (onda A), posicionando-se o cursor do Doppler pulsado na extremidade dos folhetos da valva mitral durante sua abertura, em imagem apical quatro câmaras padrão. Na imagem apical cinco câmaras padrão, obtida pela mesma janela, mensurou-se o pico de velocidade do fluxo transaórtico ( $V_{max}$  Ao). O tempo de ejeção ventricular esquerda foi determinado contornando o envelope do espectro aórtico. Mediante a obtenção destes fluxos, foi também mensurado o tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e tempo de desaceleração da onda E do fluxo mitral (TED).

O posicionamento dos pacientes, a formação das imagens ecocardiográficas e a obtenção dos índices ecocardiográficos foram realizados de acordo com orientações de Boon (2011).

Finalizando o exame ecocardiográfico, os animais foram submetidos à avaliação eletrocardiográfica ambulatorial (Holter) de uma hora. O exame foi realizado com sistema de eletrodos de quatro vias e três canais, posicionados de forma a se aproximar das derivações bipolares I, II e III, e captado com gravador digital (Cardioflash® digital – Cardios Sistemas – São Paulo, Brasil).

Os traçados eletrocardiográficos de uma hora foram processados automaticamente por *software* específico (CardioManenger® S540 – Cardios Sistemas – São Paulo, Brasil) e então corrigidos manualmente. Foram avaliados o desvio padrão de todos os intervalos RR (SDNN), o desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos (SDANN), a média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos (SDNNIDX), a raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes (rMSSD) e a porcentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms (pNN>50).

#### **4.3. Perfil bioquímico**

Posteriormente à avaliação cardiovascular, os animais foram submetidos à coleta de 15 mL de sangue por venopunção jugular. Imediatamente após a obtenção da amostra sanguínea, esta foi centrifugada a 1000g durante 20 minutos para separação do soro, utilizado tanto para avaliação bioquímica sérica quanto para quantificação da concentração de citocinas e proteína C reativa. A avaliação bioquímica sérica constituiu-se na dosagem de alanina amino transferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), ureia, creatinina, proteína total e albumina, determinadas por espectrofotometria semiautomática Labquest (Bioplus, Sao Paulo, 2000), utilizando kits Labtest (Lagoa Santa, 2006).

#### **4.4. Perfil de citocinas e proteína C reativa**

O restante da amostra de soro foi armazenado à temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  até o momento da análise, nunca excedendo período de um ano. O material foi então enviado ao laboratório Gênese, localizado na cidade de São Paulo, (SP), para as dosagens. As concentrações séricas de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 foram simultaneamente mensuradas por teste multiplex de imunoensaio comercialmente disponível (CCYTO-90K Milliplex MAP, Millipore, Massachusetts, EUA), mediante utilização de analisador automático (Luminex 200, Luminex Corporation, Austin, TX, EUA) (KJELGAARD-HANSEN & JACOBSEN, 2011). Teste ELISA espécie específico foi utilizado para a mensuração da concentração sérica da proteína C reativa (PCR - Cat. # CYT296, Millipore, Massachusetts, EUA) e IL-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$  - Cat. # E90563CA, USCN). Todas as amostras foram analisadas em duplicata.

As sensibilidades para detecção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, e proteína C reativa foram 0,7 pg/mL, 5,8 pg/mL, 1,98 pg/mL, 0,9 pg/mL e 3,6  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Valores inferiores aos de detecção foram tabulados como os valores mínimos de sensibilidade para cada parâmetro.

#### **4.5. Procedimento cirúrgico e reavaliações**

Após o término dos procedimentos de avaliação, os animais foram reencaminhados para o Serviço de Obstetrícia onde foram submetidos à ovariossalpingohisterectomia, conjuntamente com as demais condutas necessárias, como fluidoterapia, terapia anti-inflamatória e antibioticoterapia.

Quinze e 30 dias após a cirurgia, foi solicitado o retorno dos animais ao Serviço de Cardiologia, onde foram novamente submetidos às avaliações anteriormente listadas.

#### 4.6. Análise estatística

Os resultados dos parâmetros estudados foram comparados entre os momentos de avaliação T-0, T-15 e T-30. Os resultados dos parâmetros ecocardiográficos e variabilidade da frequência cardíaca foram também distribuídos e comparados em relação aos intervalos interquartis dos valores das concentrações séricas de interleucinas 1 $\beta$ , 6, 10, TNF- $\alpha$  e proteína C reativa. Foi utilizada análise de variância (ANOVA) com posterior teste de Tukey quando os dados apresentaram distribuição paramétrica (Gaussiana) ou teste de Friedman e posterior teste de Dunn quando a distribuição apresentada foi não paramétrica, determinada pelo teste de normalidade dos resíduos Cramer-von Mises.

Quando necessário, os dados foram submetidos à transformação logarítmica ou por raiz quadrada para adequar a normalidade da distribuição dos resíduos, estabelecer a homogeneidade das variâncias ou somente reduzir a assimetria (*skewness*).

O teste de Spearman foi utilizado para determinar correlações entre os resultados da avaliação ecocardiográfica e variabilidade da frequência cardíaca e os resultados da avaliação bioquímica sérica e das citocinas.

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa SAS<sup>®</sup> (The SAS system for Windows, versão 9.0) e GraphPad Prism<sup>®</sup> (versão 4 – GraphPad Software, Inc. 2003), sempre com nível de significância de 5%.

## 5. RESULTADOS

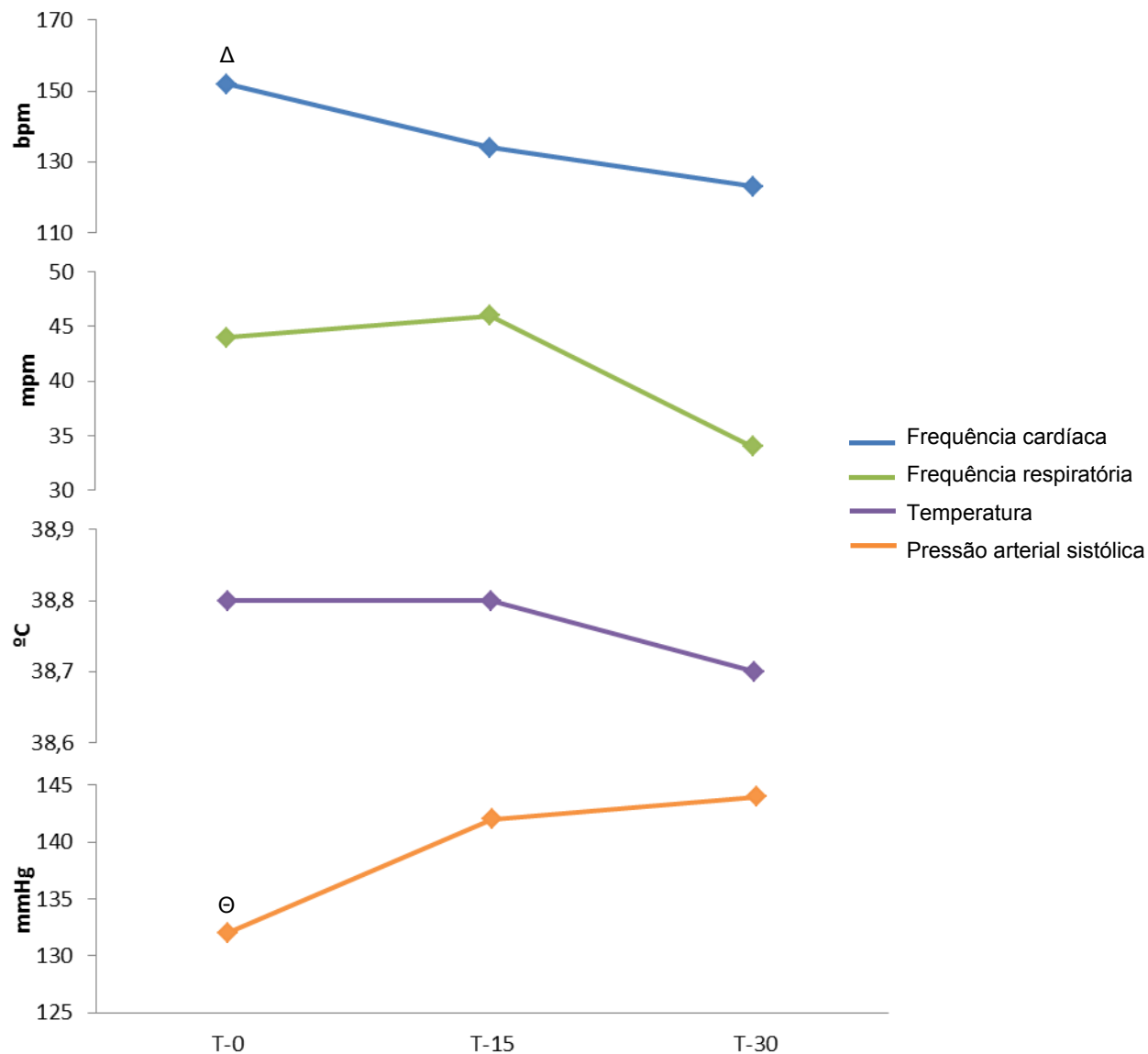
### 5.1. Parâmetros clínicos, pressão arterial sistólica e avaliação hematológica

O aumento da frequência cardíaca, contagem global de leucócitos e da quantidade de formas imaturas de neutrófilos foram os critérios mais prevalentes utilizados para classificar os pacientes como sépticos. No momento da primeira avaliação, os animais apresentavam significativo aumento desses parâmetros, além do aumento significativo de linfócitos, monócitos e FA em relação aos momentos subsequentes de avaliação. Apresentaram também redução significativa nos valores de pressão arterial sistólica e albumina. Os resultados da avaliação clínica, hematológica e bioquímica sérica encontram-se detalhados nas Tabelas 1 e 2, e graficamente representados nas Figuras 1, 2 e 3.

**Tabela 1.** Parâmetros clínicos [média  $\pm$  DP ou mediana (mínimo – máximo)] de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).

PARÂMETRO	MOMENTO			<i>p</i>
	T-00	T-15	T-30	
Freq. cardíaca (bpm)	152 $\pm$ 21 <sup>a</sup>	134 $\pm$ 30 <sup>b</sup>	123 $\pm$ 31 <sup>b</sup>	0,0002†
Freq. respir. (mpm)	44 (24-200) <sup>A</sup>	46 (10-128) <sup>A</sup>	34 (16-60) <sup>A</sup>	0,36‡
Temperatura (°C)	38,8 (36,7-40,6) <sup>A</sup>	38,8 (38,3-40,0) <sup>A</sup>	38,7 (38,0-39,9) <sup>A</sup>	0,30‡
PAS (mmHg)	132 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>	142 $\pm$ 12,3 <sup>ab</sup>	144 $\pm$ 10,7 <sup>b</sup>	0,02†

PAS: Pressão arterial sistólica; †: valor de *p* para a ANOVA de médias repetidas; ‡: valor de *p* para o teste de Friedman; Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey; Medianas com letras maiúsculas iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Dunn.

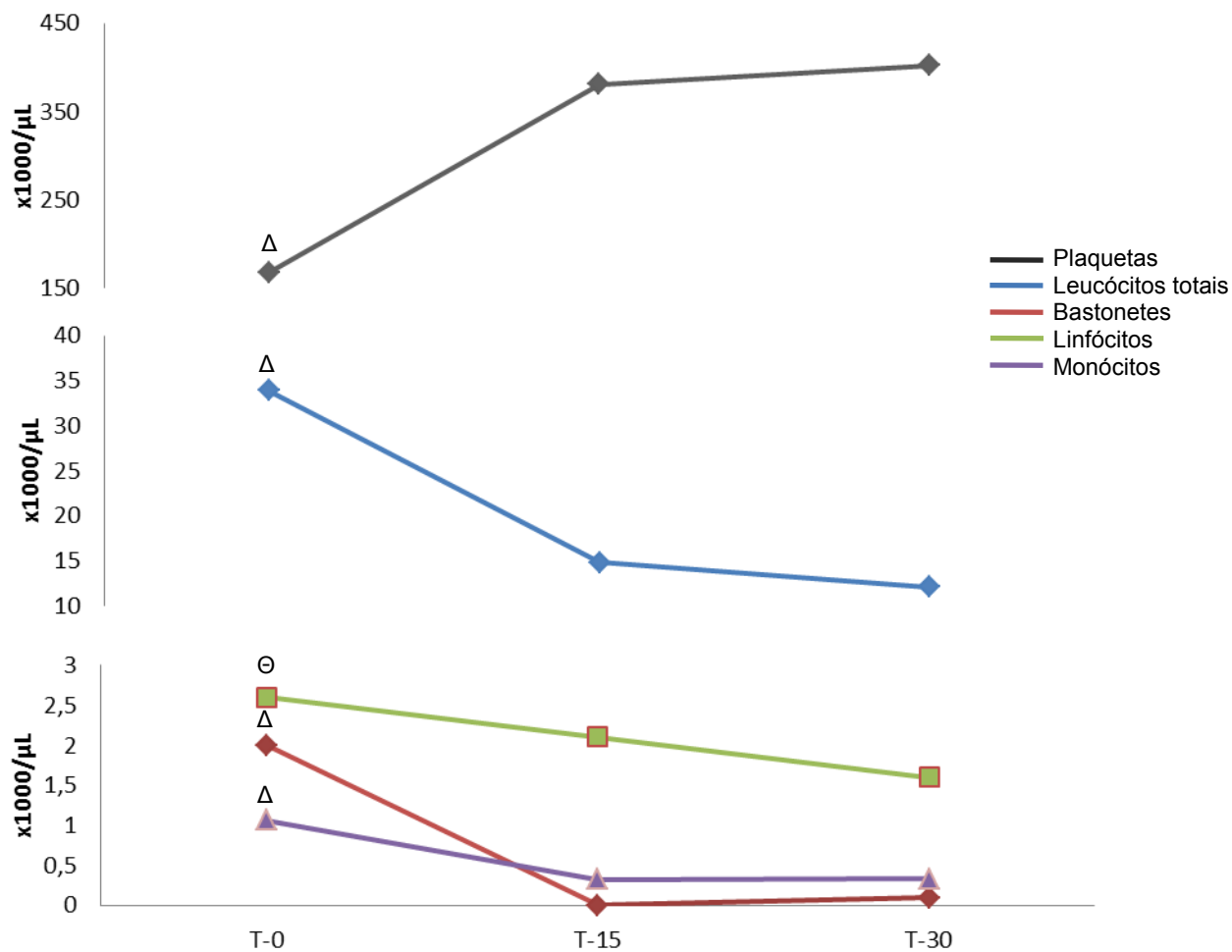


**Figura 1.** Representação gráfica dos valores médios (frequência cardíaca e pressão arterial sistólica) e medianos (frequência respiratória e temperatura) dos parâmetros clínicos de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). Δ: significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30; Θ: significativamente diferente em relação ao momento T-30. UNESP – Jaboticabal (2015).

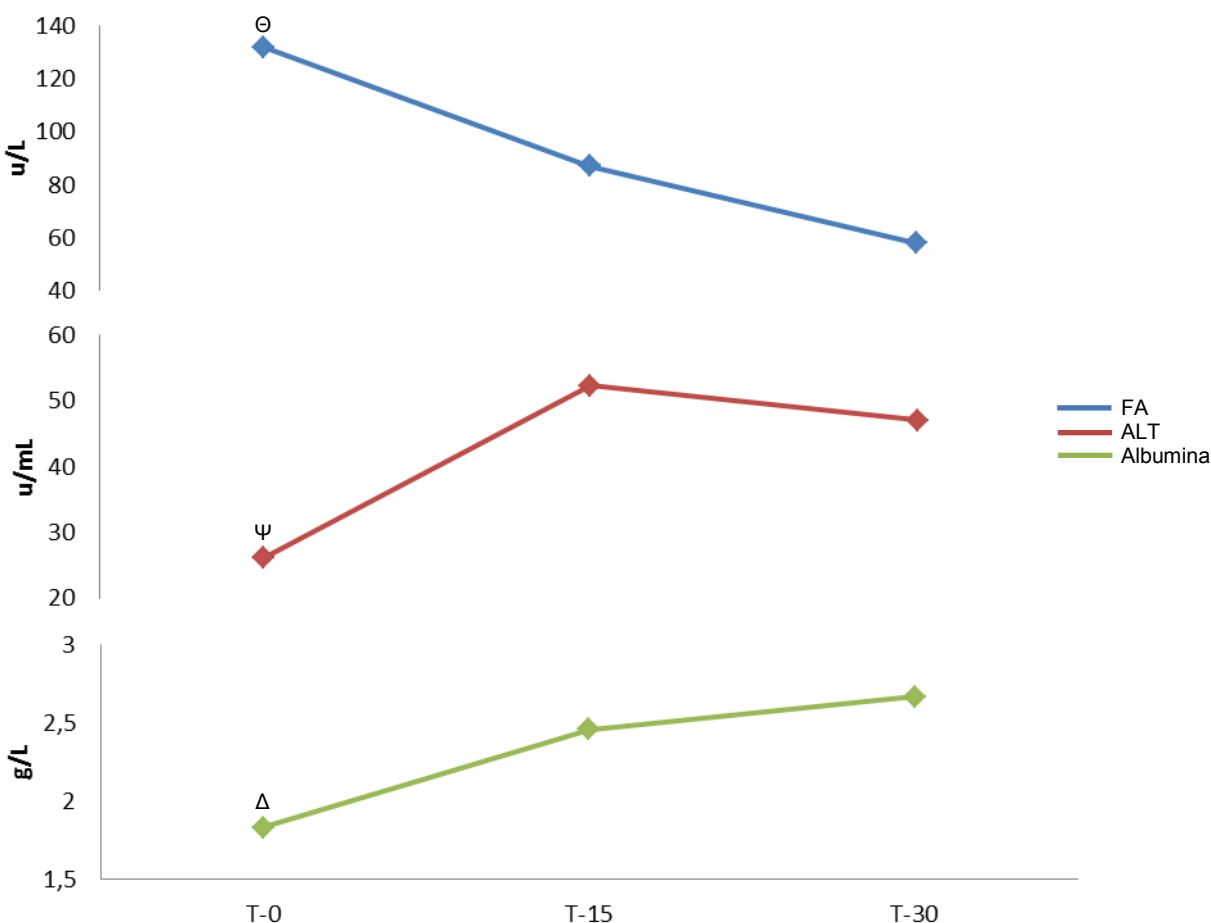
**Tabela 2.** Parâmetros hematológicos e bioquímicos séricos [média ± DP ou mediana (mínimo – máximo)] de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).

PARÂMETRO	MOMENTO			p
	T-00	T-15	T-30	
<i>Hematologia</i>				
Leuc. totais (x10 <sup>3</sup> /μL)	33,9 (8,1-54,8) <sup>A</sup>	14,8 (7,7-31,2) <sup>B</sup>	12,1 (6,6-17,0) <sup>B</sup>	<0,0001‡
Hemácias (x10 <sup>6</sup> /μL)	4,9 ± 1,6 <sup>a</sup>	4,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	5,6 ± 1,0 <sup>a</sup>	0,07†
Hematócrito (%)	34,1 ± 11,1 <sup>a</sup>	34,6 ± 7,4 <sup>a</sup>	39,0 ± 9,2 <sup>a</sup>	0,06†
Plaquetas (x10 <sup>3</sup> / μL)	168 (29-547) <sup>a</sup>	381 (177-771) <sup>b</sup>	402 (103-875) <sup>b</sup>	0,0001‡
Bastonetes (x10 <sup>3</sup> / μL)	2,0 (0,36-18,5) <sup>A</sup>	0 (0-0,81) <sup>B</sup>	0,09 (0-0,37) <sup>B</sup>	<0,0001‡
Linfócitos (x10 <sup>3</sup> / μL)	2,6 (1,11-6,40) <sup>A</sup>	2,1 (0,61-4,53) <sup>AB</sup>	1,6 (0,92-4,71) <sup>B</sup>	0,04
Monócitos (x10 <sup>3</sup> / μL)	1,06 (0-6,11) <sup>A</sup>	0,32 (0-3,12) <sup>B</sup>	0,33 (0-0,73) <sup>B</sup>	0,0007
<i>Bioquímica sérica</i>				
Ureia (mg/dL)	31,1 (7,00-205) <sup>A</sup>	27,5 (13,8-107) <sup>A</sup>	35 (16,0-103) <sup>A</sup>	0,58‡
Creatinina (mg/dL)	1,1 (0,5-5,6) <sup>A</sup>	1,0 (0,5-1,8) <sup>A</sup>	1,2 (0,6-1,9) <sup>A</sup>	0,50‡
ALT (u/mL)	26,1 (15,0-83,8) <sup>A</sup>	52,3 (15,0-151,0) <sup>B</sup>	47,1 (3,4-131,0) <sup>AB</sup>	0,008‡
FA (u/L)	132 (81,7-240) <sup>A</sup>	87,0 (33,1-182) <sup>AB</sup>	58,0 (20,9-248) <sup>B</sup>	0,001‡
Albumina (g/L)	1,83 ± 0,44 <sup>a</sup>	2,46 ± 0,37 <sup>b</sup>	2,67 ± 0,49 <sup>b</sup>	<0,0001†
Proteína total (g/L)	7,33 (5,81-10,9) <sup>A</sup>	7,70 (6,30-9,60) <sup>A</sup>	7,55 (6,29-11,0) <sup>A</sup>	0,45‡
Glicemia (mg/dL)	89,0 ± 16,3 <sup>a</sup>	96,1 ± 9,76 <sup>a</sup>	97,9 ± 10,6 <sup>a</sup>	0,051†
Lactato (mmol/L)	3,95 ± 1,10 <sup>a</sup>	4,41 ± 0,82 <sup>a</sup>	4,33 ± 0,76 <sup>a</sup>	0,14†

†: valor de p para a ANOVA de médias repetidas; ‡: valor de p para o teste de Friedman; Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey; Medianas com letras maiúsculas iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Dunn.



**Figura 2.** Representação gráfica dos valores médios dos parâmetros hematológicos de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). Δ: significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30; Θ: significativamente diferente em relação ao momento T-30. UNESP – Jaboticabal (2015).



**Figura 3.** Representação gráfica dos valores medianos (FA e ALT) e médios (albumina) dos parâmetros bioquímicos séricos de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). Δ: significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30; Θ: significativamente diferente em relação ao momento T-30. Ψ: significativamente diferente em relação ao T15. UNESP – Jaboticabal (2015).

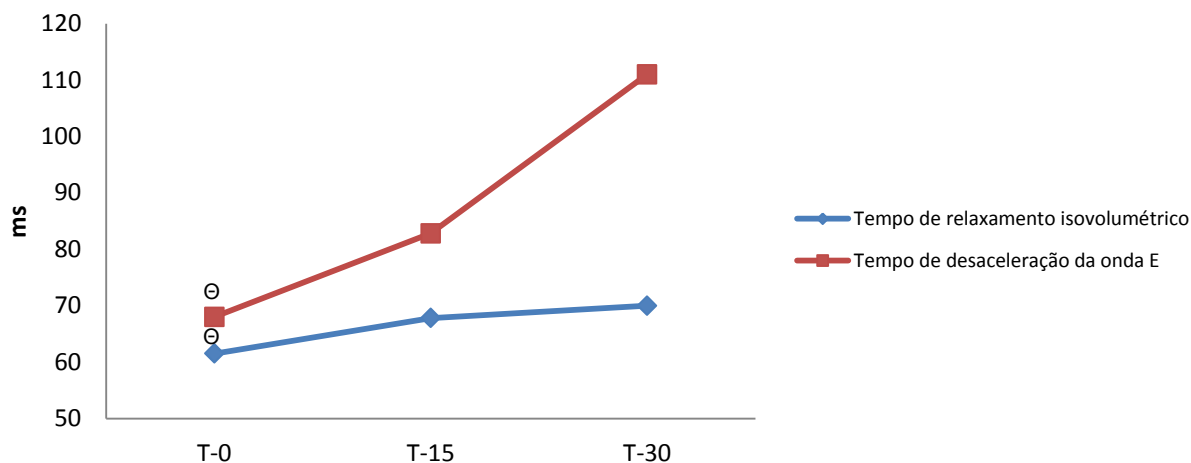
## 5.2. Avaliação cardíaca

Os resultados da avaliação ecocardiográfica encontram-se detalhados na Tabela 3 e graficamente representados na Figura 4. Nessa avaliação, foi observada redução significativa do tempo de relaxamento isovolumétrico (TRIV) e tempo de desaceleração da onda E (TDE) no momento T-0 em relação ao T-30 ( $p = 0,0002$  e  $p = 0,035$ , respectivamente). No momento T-0, oito animais (47,05%) apresentaram relação E/A negativa, e nos momentos T-15 e T-30 foram sete (41,17%) e seis (35,29%), respectivamente, sem diferença significativa pelo teste de Fisher.

**Tabela 3.** Parâmetros ecocardiográficos (média  $\pm$  DP) de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).

PARÂMETRO	MOMENTO			<i>p</i>
	T-00	T-15	T-30	
<i>Índices de tamanho e volume</i>				
DIVE <sub>diástole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	5,20 $\pm$ 1,05 <sup>a</sup>	5,60 $\pm$ 1,32 <sup>a</sup>	5,37 $\pm$ 1,36 <sup>a</sup>	0,65
DIVE <sub>sístole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	3,09 $\pm$ 0,74 <sup>a</sup>	3,34 $\pm$ 0,75 <sup>a</sup>	3,26 $\pm$ 0,94 <sup>a</sup>	0,37
DIVE <sub>diástole</sub> /Ao	1,77 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,77 $\pm$ 0,18 <sup>a</sup>	1,77 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	0,44
AE/Ao	1,27 $\pm$ 0,15 <sup>a</sup>	1,23 $\pm$ 0,11 <sup>a</sup>	1,26 $\pm$ 0,19 <sup>a</sup>	0,62
<i>Índices de função sistólica</i>				
FS (%)	40,8 $\pm$ 7,42 <sup>a</sup>	40,0 $\pm$ 6,14 <sup>a</sup>	39,4 $\pm$ 6,66 <sup>a</sup>	0,75
EF (%)	72,4 $\pm$ 8,66 <sup>a</sup>	72,9 $\pm$ 7,49 <sup>a</sup>	70,8 $\pm$ 8,68 <sup>a</sup>	0,77
<i>Índices de função diastólica</i>				
E/A	1,00 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	1,12 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	1,06 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	0,09
TRIV (ms)	61,5 $\pm$ 15,6 <sup>a</sup>	67,8 $\pm$ 9,22 <sup>ab</sup>	70,0 $\pm$ 13,6 <sup>b</sup>	0,0002
TDE mitral (ms)	68,0 $\pm$ 49,1 <sup>a</sup>	82,8 $\pm$ 41,1 <sup>ab</sup>	111 $\pm$ 63,8 <sup>b</sup>	0,035

DIVE: diâmetro interno do ventrículo esquerdo; AE: átrio esquerdo; Ao: aorta; E/A: relação entre o pico das ondas E e A do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E do fluxo transmitral; FS: fração de encurtamento; EF: fração de ejeção; *p*: valor de *p* para ANOVA de médias repetidas.



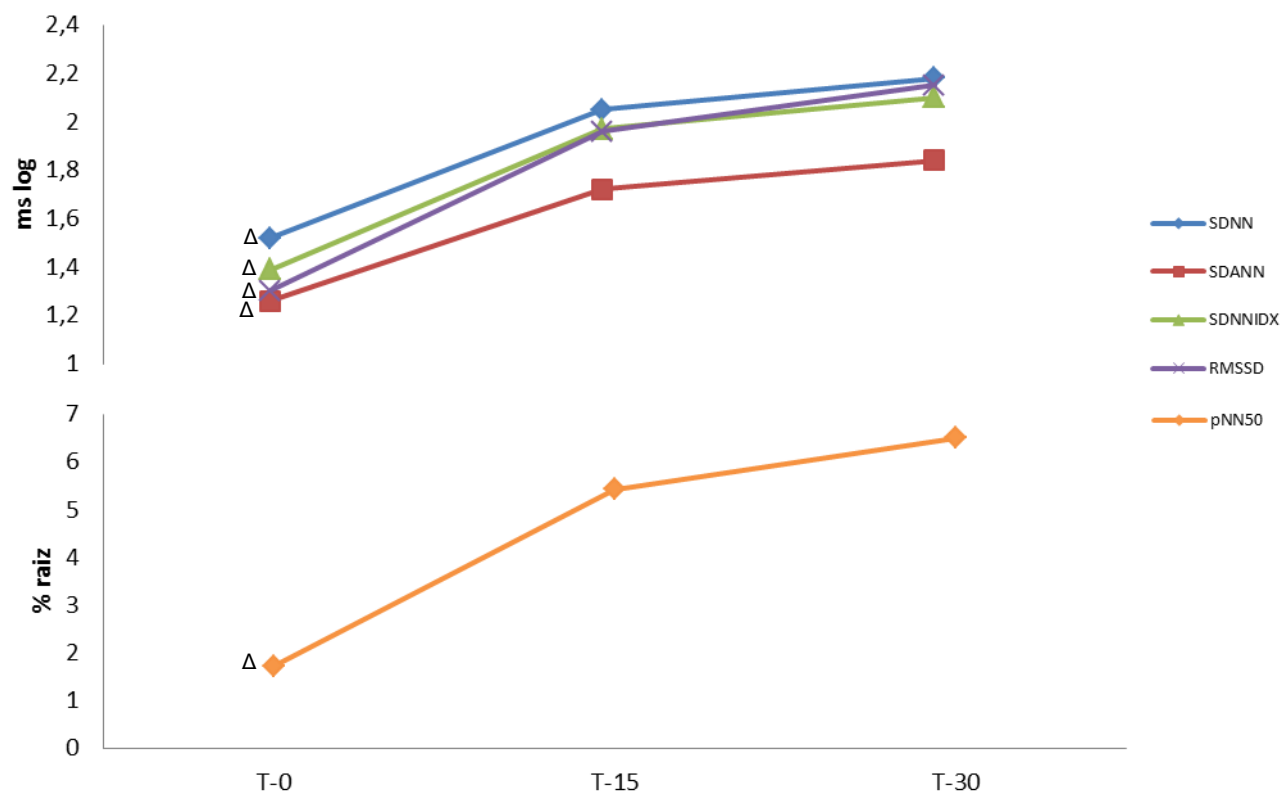
**Figura 4.** Representação gráfica dos valores médios do tempo de relaxamento isovolumétrico e tempo de desaceleração da onda E de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). Θ: significativamente diferente em relação ao momento T-30. UNESP – Jaboticabal (2015).

Todos os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca testados apresentaram-se significativamente reduzidos no momento T-0 em comparação aos demais momentos de avaliação ( $p < 0,0001$  para todos os parâmetros) (Tabela 4 e Figura 5).

**Tabela 4.** Parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca [média  $\pm$  DP ou mediana (mínimo – máximo)] de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).

PARÂMETRO	MOMENTO			<i>p</i>
	T-00	T-15	T-30	
<i>Dados transformados</i>				
SDNN <sub>Log</sub>	1,52 $\pm$ 0,17 <sup>a</sup>	2,05 $\pm$ 0,21 <sup>b</sup>	2,18 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	<0,0001
SDANN <sub>Log</sub>	1,26 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	1,72 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	1,84 $\pm$ 0,26 <sup>b</sup>	<0,0001
SDNNIDX <sub>Log</sub>	1,39 $\pm$ 0,21 <sup>a</sup>	1,97 $\pm$ 0,22 <sup>b</sup>	2,10 $\pm$ 0,24 <sup>b</sup>	<0,0001
rMSSD <sub>Log</sub>	1,30 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	1,96 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	2,15 $\pm$ 0,32 <sup>b</sup>	<0,0001
pNN50 <sub>Raiz</sub>	1,72 $\pm$ 1,28 <sup>a</sup>	5,42 $\pm$ 1,83 <sup>b</sup>	6,50 $\pm$ 1,63 <sup>b</sup>	<0,0001
<i>Dados não transformados</i>				
SDNN (ms)	32 (16-75)	110 (53-309)	160 (69-431)	
SDANN (ms)	17 (8-57)	56 (20-132)	86 (21-199)	
SDNNIDX (ms)	29 (7-47)	91 (43-277)	136 (49-380)	
rMSSD (ms)	22 (7-51)	88 (27-417)	161 (32-442)	
pNN50 (%)	1,66 (0,04-26,13)	27,53 (5,69-70,76)	44,72 (7,47-72,98)	

SDNN: desvio padrão de todos os intervalos RR; SDANN: desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos; SDNNIDX: média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos; rMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes; pNN50: percentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms. *p*: valor de *p* para ANOVA de médias repetidas. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey.



**Figura 5.** Representação gráfica dos valores médios dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). Δ: significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T30. UNESP – Jaboticabal (2015).

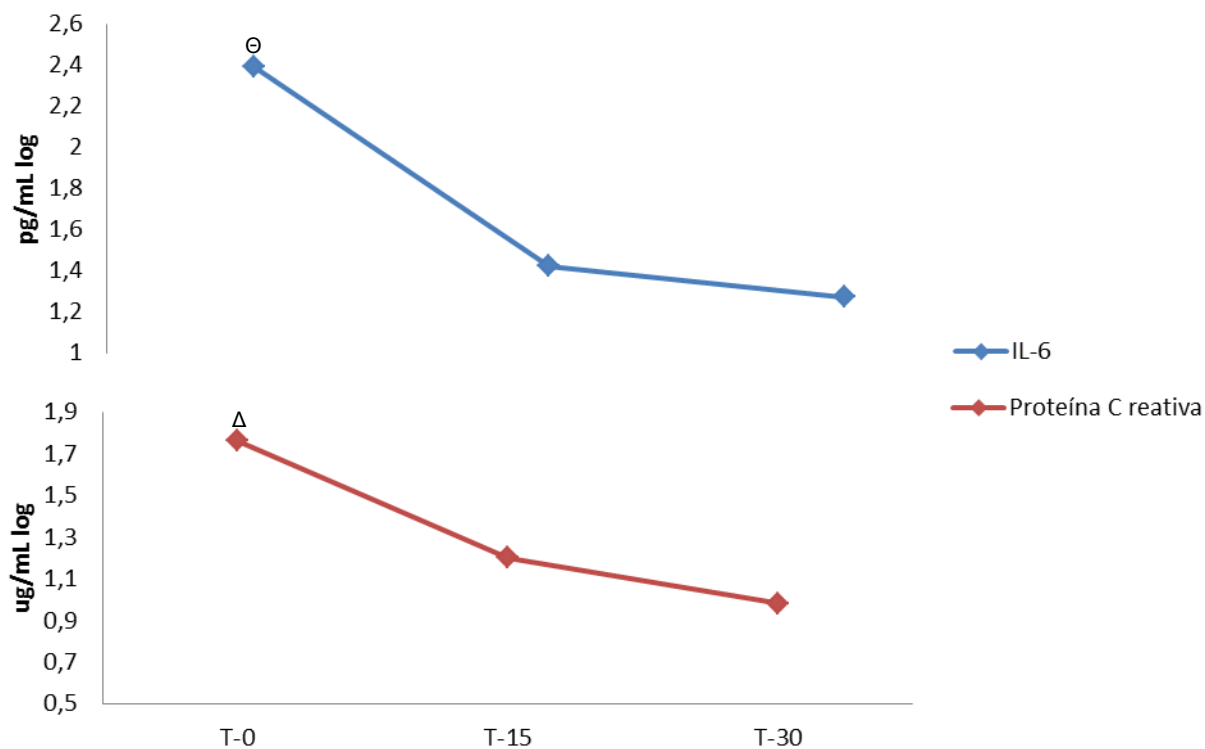
### 5.3. Perfil de citocinas e proteína C reativa

Os resultados das concentrações séricas de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e proteína C reativa encontram-se detalhados na Tabela 5 e graficamente representados na Figura 6. A IL-6 apresentou concentração sérica significativamente maior no momento T-0 em relação ao T-30 ( $p=0,003$ ) e A proteína C reativa apresentou concentração sérica maior em T-0 em comparação aos demais momentos ( $p<0,0001$ ).

**Tabela 5.** Concentrações séricas de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e proteína C reativa [média  $\pm$  DP ou mediana (mínimo – máximo)] de fêmeas caninas com sepse (n=17) à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).

PARÂMETRO	MOMENTO			p
	T-00	T-15	T-30	
<i>Dados transformados</i>				
IL-1 <sub>Log</sub>	1,05 (0,76-2,54) <sup>A</sup>	0,76 (0,76-2,22) <sup>A</sup>	0,76 (0,76-2,23) <sup>A</sup>	0,91‡
IL-6 <sub>Log</sub>	2,39 (1,08-3,40) <sup>A</sup>	1,42 (0,85-3,84) <sup>AB</sup>	1,27 (0,81-3,66) <sup>B</sup>	0,003‡
IL-10 <sub>Log</sub>	1,33 (0,28-3,62) <sup>A</sup>	1,16 (0,28-2,43) <sup>A</sup>	0,97 (0,28-2,09) <sup>A</sup>	0,36‡
TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub>	0,82 (0,75-2,74) <sup>A</sup>	0,75 (0,75-3,05) <sup>A</sup>	0,75 (0,75-2,97) <sup>A</sup>	0,68‡
Prot. C Reativa <sub>Log</sub>	1,76 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	1,20 $\pm$ 0,47 <sup>b</sup>	0,98 $\pm$ 0,35 <sup>b</sup>	<0,0001†
<i>Dados não transformados</i>				
IL-1 (pg/mL)	11,12 (5,8-345)	5,8 (5,8-165)	5,8 (5,8-171)	
IL-6 (pg/mL)	244 (12,15-2.484)	26,38 (7,09-6.998)	17,45 (6,4-4.550)	
IL-10 (pg/mL)	21,3 (1,90-4.128)	14,5 (1,9-269)	9,27 (1,90-123)	
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	6,60 (5,60-554)	5,60 (5,60-1128)	5,60 (5,60-933)	
Prot. C Reativa (ug/mL)	39,1 (7,9-270)	11,6 (3,30-137)	9,07 (2,43-33,0)	

†: valor de p para a ANOVA de médias repetidas; ‡: valor de p para o teste de Friedman; Médias com letras minúsculas iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey; Medianas com letras maiúsculas iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Dunn.



**Figura 6.** Representação gráfica dos valores medianos (IL-6) e médios (proteína C reativa) dos marcadores inflamatórios de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente). Δ: significativamente diferente em relação ao momento T-15 e T-30. Θ: significativamente diferente em relação ao momento T-30. UNESP – Jaboticabal (2015).

#### 5.4. Interação entre parâmetros ecocardiográficos e VFC com citocinas e proteína C reativa

Os parâmetros ecocardiográficos não apresentaram diferença significativa quando comparados em relação aos intervalos interquartis dos valores das concentrações séricas de IL-6, IL-10 e proteína C reativa (Tabelas 6, 7 e 8). Essas análises não foram realizadas com as concentrações séricas de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  devido ao fato de mais de um intervalo interquartil ser representado pelo mesmo valor.

**Tabela 6.** Parâmetros ecocardiográficos (média  $\pm$  DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de IL-6 em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

Parâmetros	Intervalos interquartis				<i>p</i>
	1° (até 13,46)	2° (>13,46-28,14)	3° (>28,14-327)	4° (>327-6998)	
DIVE <sub>diástole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	5,80 $\pm$ 1,65	5,82 $\pm$ 1,11	5,24 $\pm$ 0,96	4,64 $\pm$ 0,76	0,05
DIVE <sub>sístole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	3,42 $\pm$ 1,06	3,50 $\pm$ 0,76	3,13 $\pm$ 0,67	2,85 $\pm$ 0,53	0,16
FS (%)	41,3 $\pm$ 7,65	39,8 $\pm$ 6,42	40,2 $\pm$ 8,13	38,75 $\pm$ 4,00	0,81
EF (%)	73,3 $\pm$ 9,96	71,5 $\pm$ 7,94	71,6 $\pm$ 9,44	70,3 $\pm$ 4,79	0,84
E/A	1,07 $\pm$ 0,23	1,01 $\pm$ 0,22	1,06 $\pm$ 0,20	1,09 $\pm$ 0,22	0,83
TRIV (ms)	66,0 $\pm$ 11,1	68,7 $\pm$ 9,75	65,3 $\pm$ 15,4	65,9 $\pm$ 17,3	0,93
TDE mitral (ms)	91,2 $\pm$ 51,5	88,1 $\pm$ 40,9	91,7 $\pm$ 77,8	77,4 $\pm$ 43,6	0,91

DIVE: diâmetro interno do ventrículo esquerdo; FS: fração de encurtamento; EF: fração de ejeção; E/A: relação entre os picos de velocidade das ondas E e A do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E do fluxo transmitral; INDEX: valor indexado pela área de superfície corpórea; *p*: valor de *p* para a ANOVA.

**Tabela 7.** Parâmetros ecocardiográficos (média  $\pm$  DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de IL-10 em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

Parâmetros	Intervalos interquartis				<i>p</i>
	1° (até 1,9)	2° (>1,9-14,58)	3° (>14,58-66,63)	4° (>66,63-4128)	
DIVE <sub>diástole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	5,92 $\pm$ 1,54	5,14 $\pm$ 1,24	5,15 $\pm$ 0,94	5,15 $\pm$ 0,95	0,24
DIVE <sub>sístole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	3,49 $\pm$ 0,96	3,02 $\pm$ 0,82	3,20 $\pm$ 0,69	3,09 $\pm$ 0,67	0,44
FS (%)	40,7 $\pm$ 7,09	41,1 $\pm$ 5,97	38,31 $\pm$ 7,09	40,2 $\pm$ 6,56	0,73
EF (%)	72,8 $\pm$ 8,89	73,0 $\pm$ 7,22	69,4 $\pm$ 8,71	71,6 $\pm$ 7,73	0,67
E/A	1,09 $\pm$ 0,19	1,13 $\pm$ 0,15	1,06 $\pm$ 0,21	0,96 $\pm$ 0,27	0,25
TRIV (ms)	63,7 $\pm$ 12,5	65,5 $\pm$ 13,7	68,3 $\pm$ 11,9	69,6 $\pm$ 16,8	0,69
TDE mitral (ms)	82,0 $\pm$ 44,1	111,9 $\pm$ 49,5	75,3 $\pm$ 36,4	71,1 $\pm$ 48,9	0,18

DIVE: diâmetro interno do ventrículo esquerdo; FS: fração de encurtamento; EF: fração de ejeção; E/A: relação entre os picos de velocidade das ondas E e A do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E do fluxo transmitral; INDEX: valor indexado pela área de superfície corpórea; *p*: valor de *p* para a ANOVA.

**Tabela 8.** Parâmetros ecocardiográficos (média  $\pm$  DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de proteína C reativa em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

Parâmetros	Intervalos interquartis				p
	1° (até 7,78)	2° (>7,78-21,75)	3° (>21,75-39,10)	4° (>39,10-270,8)	
DIVE <sub>diástole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	5,15 $\pm$ 1,02	5,81 $\pm$ 1,76	5,34 $\pm$ 0,94	5,24 $\pm$ 1,07	0,55
DIVE <sub>sístole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	2,94 $\pm$ 0,69	3,43 $\pm$ 0,98	3,20 $\pm$ 0,65	3,35 $\pm$ 0,85	0,43
FS (%)	43,0 $\pm$ 5,19	40,4 $\pm$ 6,21	39,9 $\pm$ 7,65	36,6 $\pm$ 6,54	0,12
EF (%)	74,9 $\pm$ 5,91	72,7 $\pm$ 7,70	71,6 $\pm$ 9,76	67,3 $\pm$ 7,82	0,12
E/A	1,06 $\pm$ 0,27	1,05 $\pm$ 0,17	1,16 $\pm$ 0,17	0,97 $\pm$ 0,21	0,18
TRIV (ms)	71,5 $\pm$ 12,8	69,4 $\pm$ 12,4	60,4 $\pm$ 9,72	64,5 $\pm$ 16,8	0,14
TDE mitral (ms)	85,0 $\pm$ 36,1	87,9 $\pm$ 45,8	82,6 $\pm$ 56,8	76,3 $\pm$ 44,5	0,93

DIVE: diâmetro interno do ventrículo esquerdo; FS: fração de encurtamento; EF: fração de ejeção; E/A: relação entre os picos de velocidade das ondas E e A do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E do fluxo transmitral; INDEX: valor indexado pela área de superfície corpórea; p: valor de p para a ANOVA.

Já os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca apresentaram-se, na sua totalidade, significativamente menores nas concentrações do 3° intervalo interquartil de IL-6 e nas maiores concentrações de proteína C reativa (Tabelas 9, 10 e 11).

**Tabela 9.** Distribuição do logaritmo natural da variabilidade da frequência cardíaca (média  $\pm$  DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de IL-6 em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

Parâmetros	Intervalos interquartis				<i>p</i>
	1º (até 13,46)	2º (>13,46-28,14)	3º (>28,14-327)	4º (>327-6998)	
SDNN <sub>Log</sub>	2,06 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	2,04 $\pm$ 0,20 <sup>a</sup>	1,66 $\pm$ 0,31 <sup>b</sup>	1,91 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>	0,01
SDANN <sub>Log</sub>	1,78 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	1,72 $\pm$ 0,26 <sup>a</sup>	1,38 $\pm$ 0,30 <sup>b</sup>	1,56 $\pm$ 0,38 <sup>ab</sup>	0,01
SDANNIDX <sub>Log</sub>	1,96 $\pm$ 0,35 <sup>a</sup>	1,94 $\pm$ 0,22 <sup>a</sup>	1,53 $\pm$ 0,36 <sup>b</sup>	1,84 $\pm$ 0,42 <sup>ab</sup>	0,009
rMSSD <sub>Log</sub>	1,97 $\pm$ 0,45 <sup>a</sup>	1,96 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	1,45 $\pm$ 0,38 <sup>b</sup>	1,84 $\pm$ 0,52 <sup>ab</sup>	0,01
pNN50 <sub>Raiz</sub>	5,31 $\pm$ 2,39 <sup>a</sup>	5,78 $\pm$ 2,12 <sup>a</sup>	2,44 $\pm$ 1,90 <sup>b</sup>	4,67 $\pm$ 2,77 <sup>ab</sup>	0,003

SDNN: desvio padrão de todos os intervalos RR; SDANN: desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos; SDANNIDX: média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos; rMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes; pNN50: percentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms; *p*: valor de *p* para ANOVA. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey.

**Tabela 10.** Distribuição do logaritmo natural da variabilidade da frequência cardíaca (média  $\pm$  DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de IL-10 em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

Parâmetros	Intervalos interquartis				<i>p</i>
	1º (até 7,78)	2º (>7,78-21,75)	3º (>21,75-39,10)	4º (>39,10-270,8)	
SDNN <sub>Log</sub>	1,96 $\pm$ 0,37	1,97 $\pm$ 0,36	1,99 $\pm$ 0,35	1,74 $\pm$ 0,27	0,26
SDANN <sub>Log</sub>	1,69 $\pm$ 0,34	1,65 $\pm$ 0,38	1,67 $\pm$ 0,33	1,41 $\pm$ 0,30	0,16
SDANNIDX <sub>Log</sub>	1,85 $\pm$ 0,41	1,89 $\pm$ 0,39	1,90 $\pm$ 0,36	1,62 $\pm$ 0,32	0,24
rMSSD <sub>Log</sub>	1,89 $\pm$ 0,48	1,81 $\pm$ 0,48	1,90 $\pm$ 0,48	1,59 $\pm$ 0,35	0,30
pNN50 <sub>Raiz</sub>	4,94 $\pm$ 2,74	4,81 $\pm$ 2,71	4,98 $\pm$ 2,73	3,34 $\pm$ 2,01	0,33

SDNN: desvio padrão de todos os intervalos RR; SDANN: desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos; SDANNIDX: média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos; rMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes; pNN50: percentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms; *p*: valor de *p* para ANOVA.

**Tabela 11.** Distribuição do logaritmo natural da variabilidade da frequência cardíaca (média  $\pm$  DP) de acordo com os intervalos interquartis da concentração sérica de proteína C reativa em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

Parâmetros	Intervalos interquartis				<i>p</i>
	1º (até 7,78)	2º (>7,78-21,75)	3º (>21,75-39,10)	4º (>39,10-270,8)	
SDNN <sub>Log</sub>	2,10 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	2,02 $\pm$ 0,38 <sup>a</sup>	1,86 $\pm$ 0,40 <sup>ab</sup>	1,67 $\pm$ 0,19 <sup>b</sup>	0,007
SDANN <sub>Log</sub>	1,75 $\pm$ 0,30 <sup>a</sup>	1,76 $\pm$ 0,31 <sup>a</sup>	1,56 $\pm$ 0,35 <sup>ab</sup>	1,36 $\pm$ 0,29 <sup>b</sup>	0,008
SDANNIDX <sub>Log</sub>	2,03 $\pm$ 0,23 <sup>a</sup>	1,90 $\pm$ 0,46 <sup>ab</sup>	1,77 $\pm$ 0,43 <sup>ab</sup>	1,55 $\pm$ 0,16 <sup>b</sup>	0,01
rMSSD <sub>Log</sub>	2,07 $\pm$ 0,27 <sup>a</sup>	1,92 $\pm$ 0,52 <sup>a</sup>	1,74 $\pm$ 0,55 <sup>ab</sup>	1,47 $\pm$ 0,15 <sup>b</sup>	0,005
pNN50 <sub>Raiz</sub>	5,97 $\pm$ 1,46 <sup>a</sup>	5,40 $\pm$ 2,95 <sup>a</sup>	3,94 $\pm$ 2,99 <sup>ab</sup>	2,74 $\pm$ 1,30 <sup>b</sup>	0,005

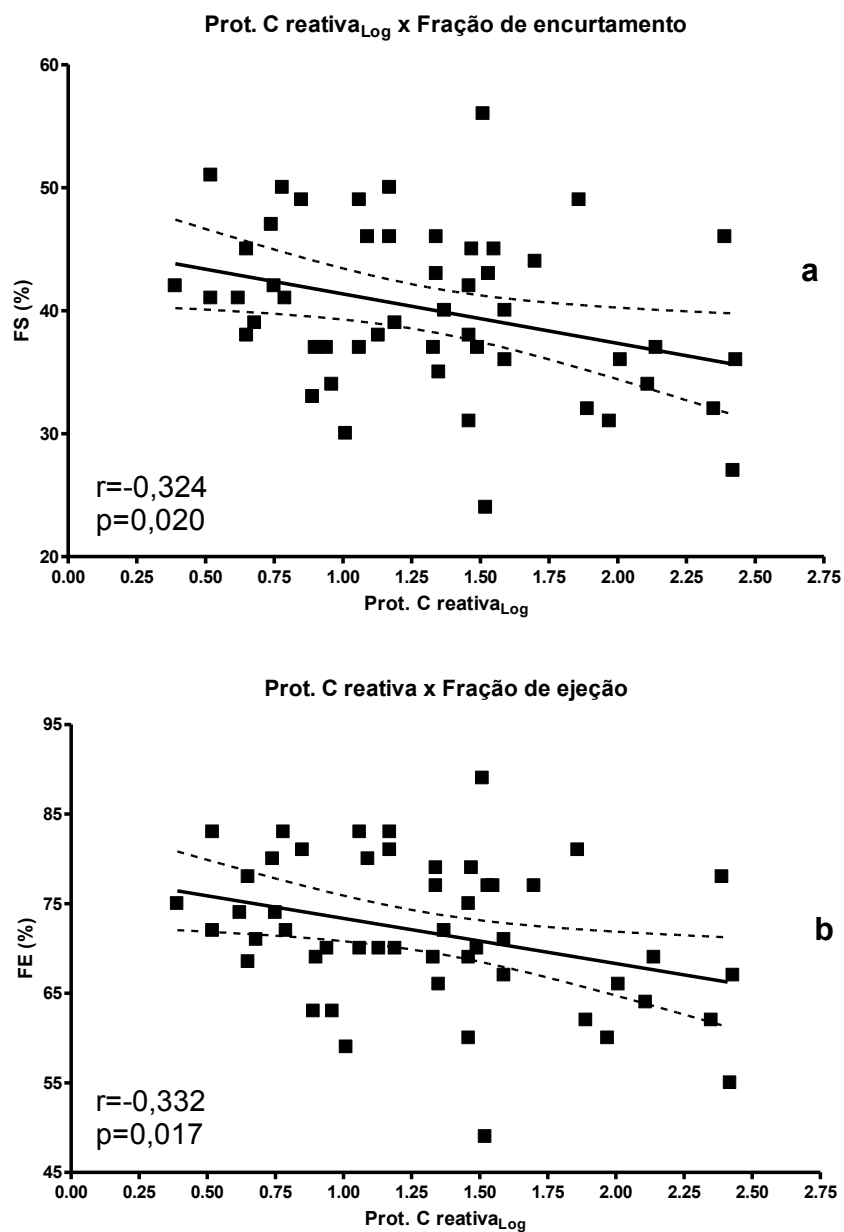
SDNN: desvio padrão de todos os intervalos RR; SDANN: desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos; SDANNIDX: média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos; rMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes; pNN50: porcentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms; *p*: valor de *p* para ANOVA. Médias com letras iguais não apresentam diferença significativa pelo teste de Tukey.

Não houve correlação entre a concentração sérica da maioria das citocinas e os parâmetros ecocardiográficos avaliados. No entanto, houve correlação negativa entre IL-10<sub>Log</sub> e E/A ( $r = -0,289$  e  $p = 0,03$ ), entre o DIVE<sub>diástole</sub>-index e IL-6<sub>Log</sub> ( $r = -0,286$  e  $p = 0,04$ ) e TNF- $\alpha$  ( $r = -0,308$  e  $p = 0,02$ ) e entre Proteína C reativa e a fração de encurtamento ( $r = -0,324$  e  $p = 0,02$ ) e fração de ejeção ( $r = -0,332$  e  $p = 0,01$ ). Os coeficientes de correlação encontram-se na Tabela 12 e na Figura 7.

**Tabela 12.** Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros ecocardiográficos e IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>, IL-6<sub>Log</sub>, IL-10<sub>Log</sub>, TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub> e Proteína C reativa<sub>Log</sub> em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

	IL-1 <sub>log</sub>	IL-6 <sub>log</sub>	IL-10 <sub>log</sub>	TNF- $\alpha$ <sub>log</sub>	Prot. C Reat. <sub>log</sub>
DIVE <sub>diástole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	NS	-0,356*	NS	-0,308*	NS
DIVE <sub>sístole</sub> – index (cm/m <sup>2</sup> )	NS	NS	NS	NS	NS
FS (%)	NS	NS	NS	NS	-0,324*
EF (%)	NS	NS	NS	NS	-0,332*
E/A	NS	NS	-0,289*	NS	NS
TRIV (ms)	NS	NS	NS	NS	NS
TDE mitral (ms)	NS	NS	NS	NS	NS

DIVE: diâmetro interno do ventrículo esquerdo; FS: fração de encurtamento; EF: fração de ejeção; E/A: relação entre os picos de velocidade das ondas E e A do fluxo transmitral; TRIV: tempo de relaxamento isovolumétrico; TDE: tempo de desaceleração da onda E do fluxo transmitral; INDEX: valor indexado pela área de superfície corpórea; NS: não significativo; \*: p<0,05.



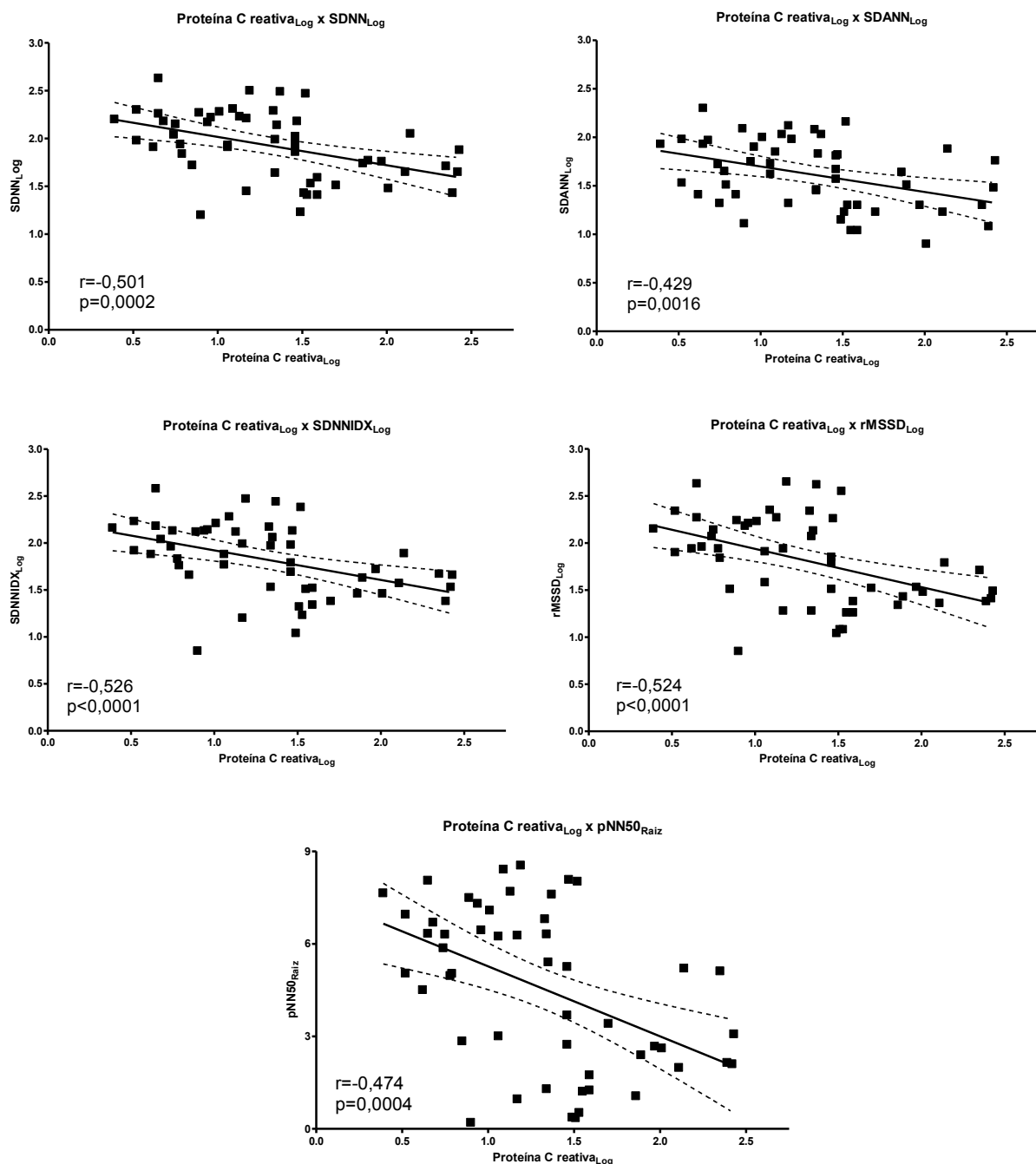
**Figura 7.** Representação gráfica da correlação de Spearman entre o logaritmo natural da concentração sérica de proteína C reativa e os valores da fração de encurtamento (a) e fração de ejeção (b) de fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento (T-15 e T-30, respectivamente), totalizando 51 amostras. FS: fração de encurtamento; FE: fração de ejeção. UNESP – Jaboticabal (2015).

Houve correlação negativa entre IL-6<sub>Log</sub> e proteína C reativa<sub>Log</sub> e praticamente todas as variáveis da variabilidade da frequência cardíaca. Os coeficientes de correlação encontram-se na Tabela 13 e Figura 8.

**Tabela 13.** Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca e IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>, IL-6<sub>Log</sub>, IL-10<sub>Log</sub>, TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub> e Proteína C reativa<sub>Log</sub> em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

	IL-1 <sub>Log</sub>	IL-6 <sub>Log</sub>	IL-10 <sub>Log</sub>	TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub>	Prot. C Reat. <sub>Log</sub>
SDNN <sub>log</sub>	NS	-0,304*	NS	NS	-0,501***
SDANN <sub>log</sub>	NS	-0,351*	-0,302*	NS	-0,429**
SDNNIDX <sub>log</sub>	NS	-0,283*	NS	NS	-0,526***
rMSSD <sub>log</sub>	NS	-0,308*	NS	NS	-0,524***
pNN50 <sub>raiz</sub>	NS	NS	NS	NS	-0,474***

SDNN: desvio padrão de todos os intervalos RR; SDANN: desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos; SDNNIDX: média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos; rMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes; pNN50: percentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms; NS: não significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.



**Figura 8.** Representação gráfica da correlação de Spearman entre o logaritmo natural da concentração sérica de proteína C reativa e os valores dos parâmetros da variabilidade da frequência cardíaca de fêmeas caninas com sepse ( $n=17$ ) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. SDNN: desvio padrão de todos os intervalos RR; SDANN: desvio padrão das médias dos intervalos RR obtidos a cada 5 minutos; SDNNIDX: média dos desvios-padrão dos intervalos RR a cada 5 minutos; rMSSD: raiz quadrada da média do quadrado das diferenças entre intervalos RR adjacentes; pNN50: porcentagem de intervalos RR adjacentes com diferença de duração maior que 50 ms (T-15 e T-30, respectivamente). UNESP – Jaboticabal (2015).

### 5.5. Interação entre citocinas e proteína C reativa com valores hematológicos

Houve correlação significativa entre IL-6<sub>Log</sub> e proteína C reativa<sub>Log</sub> e a maioria dos parâmetros hematológicos avaliados (Tabela 14).

**Tabela 14.** Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros hematológicos e IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>, IL-6<sub>Log</sub>, IL-10<sub>Log</sub>, TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub> e Proteína C reativa<sub>Log</sub> em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

	IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>	IL-6 <sub>Log</sub>	IL-10 <sub>Log</sub>	TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub>	Prot. C Reat <sub>Log</sub>
Leucócitos	NS	0,377**	NS	NS	0,535***
Hemácias	NS	NS	NS	NS	NS
Hematócrito	NS	NS	NS	NS	NS
Plaquetas	NS	NS	NS	NS	-0,326*
Bastonetes	NS	0,361**	NS	NS	0,567***
Linfócitos	NS	0,285*	NS	NS	0,319*
Monócitos	NS	NS	NS	NS	0,398**

NS: não significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

A correlação entre os parâmetros da análise bioquímica sérica e citocinas analisadas encontram-se descritos na Tabela 15.

**Tabela 15.** Coeficiente de correlação de Spearman entre os parâmetros bioquímicos séricos e IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>, IL-6<sub>Log</sub>, IL-10<sub>Log</sub>, TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub> e Proteína C reativa<sub>Log</sub> em fêmeas caninas com sepse (n=17) devido à piometra (T-0) e 15 e 30 dias após o tratamento, totalizando 51 amostras. UNESP – Jaboticabal (2015).

	IL-1 $\beta$ <sub>Log</sub>	IL-6 <sub>Log</sub>	IL-10 <sub>Log</sub>	TNF- $\alpha$ <sub>Log</sub>	Prot. C Reat <sub>Log</sub>
Ureia	NS	NS	NS	NS	-0,346*
Creatinina	NS	NS	NS	NS	NS
ALT	NS	NS	NS	NS	NS
FA	NS	0,509***	NS	0,362**	0,425**
Albumina	NS	NS	NS	NS	-0,313*
Proteínas totais	NS	NS	NS	NS	NS
Glicemia	-0,281*	NS	NS	NS	NS
Lactato	-0,480**	NS	NS	0,304*	NS

NS: não significativo; \*p<0,05; \*\*p<0,01; \*\*\*p<0,001.

## 6. DISCUSSÃO

Com o presente estudo foi possível demonstrar que os animais avaliados apresentaram, no momento do diagnóstico em relação às avaliações subsequentes, disfunção autonômica, refletida pela diminuição dos índices da variabilidade da frequência cardíaca e correlação inversa entre as variáveis de função sistólica e as concentrações séricas de proteína C reativa. Embora não tenha sido o principal objetivo desse estudo, também foi possível traçar um perfil clínico e hematológico que certamente auxilia no entendimento da síndrome e do comprometimento cardíaco em cães com sepse de ocorrência natural.

Em 1997, Hauptman et al. elaboraram critérios diagnósticos de sepse para cães, semelhantes aos criados e utilizados para paciente humanos em 1991 (BONE et al., 1992), que continuam sendo os mais empregados até os dias atuais. Estes critérios foram os adotados no estudo em questão para a identificação do quadro inflamatório sistêmico e por esse motivo há grande concordância entre os dois estudos. Leucocitose e desvio à esquerda foram os principais fatores determinantes para o diagnóstico de inflamação sistêmica tanto no trabalho em tela quanto naquele apresentado por Hauptman et al. (1997). Embora todos os parâmetros clínicos de diagnóstico da sepse, ou seja, frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corpórea, tenham sido utilizados em algum momento para determinação da inflamação sistêmica, o aumento da frequência cardíaca foi o mais empregado, ao passo que a temperatura corpórea foi o parâmetro utilizado em menor número de casos.

Embora nesse estudo o critério clínico mais utilizado para o diagnóstico da inflamação sistêmica tenha sido a elevação da frequência cardíaca, Hauptman et al. (1997) também citaram a temperatura retal e a frequência respiratória como fatores importantes. Outros autores também observaram a temperatura corpórea e a frequência respiratória como fatores relevantes para o diagnóstico da inflamação sistêmica em cães e isso reflete a variabilidade desses parâmetros frente a diferentes condições, nem sempre patológicas, como por exemplo, estresse e condições climáticas (LAFORCADE et al., 2003; HAGMAN et al., 2006b; KARLSSON et al., 2012).

É possível observar na Tabela 1 que os valores medianos da frequência respiratória e temperatura corpórea não se alteraram significativamente ao longo do estudo, e até o momento T-15, os valores da frequência respiratória encontraram-se acima dos limites de classificação da SRIS, o que deixa claro que esse parâmetro deve ser utilizado com cautela na determinação do quadro inflamatório sistêmico, principalmente em regiões com condições climáticas peculiares como essa onde foi realizado o estudo.

Essa mesma observação referente à variação dos achados clínicos já foi levantada como um ponto complicador no diagnóstico da sepse em pacientes humanos por mais de duas décadas e uma solução proposta tem sido aumentar o foco nos parâmetros laboratoriais e a criação de um sistema de escore hematológico (RODWELL & TUDEHOPE, 1988; LEVY et al., 2003; MAKKAR et al., 2013). Recentemente, Makkar et al. (2013) sugeriram um esquema de pontuação para o diagnóstico da sepse em crianças recém-nascidas no qual a presença de achados como a alteração do número de leucócitos totais, de polimorfonucleares (PMN) totais, de PMN imaturos, da relação entre PMN imaturos e totais, da relação entre PMN imaturos e maduros, da contagem plaquetária e presença de PMN com grânulos tóxicos receberia individualmente um ponto. Os autores identificaram relação direta entre a pontuação total do escore e a chance do diagnóstico de sepse. Apesar desse esquema apresentar sensibilidade e especificidade satisfatórias, ser facilmente acessível e de baixo custo, os autores sugerem simplificação e melhor padronização do método antes da aplicação na prática médica. No entanto, iniciativa semelhante nunca foi testada ou validada para cães.

A questão do diagnóstico e classificação da sepse é, de fato, um ponto sensível até os dias atuais. Na última década, a compreensão da inflamação e a interação entre patógeno e hospedeiro aumentou consideravelmente, assim como o desenvolvimento de terapias inovadoras para o tratamento da síndrome (CHRISTAKI et al., 2011), no entanto o diagnóstico ainda hoje, mesmo em pacientes humanos, se baseia, como mencionado, em alterações não específicas, como aumento da temperatura corpórea, frequência cardíaca e respiratória (REINHART et al., 2012). Essa disparidade entre as inovações referentes ao tratamento e a estagnação diagnóstica fez com que Nathan (2002) criticasse dizendo “não faz sentido a utilização de tecnologia do século 21 para

o desenvolvimento de drogas direcionadas a infecções específicas cujo diagnóstico se baseia em métodos do século 19”.

A observação cuidadosa das Tabelas 2 e 5 permite atestar essas deficiências. Nestas tabelas é possível identificar pacientes com diferentes graus de lesão orgânica remota (enzimas hepáticas normais ou aumentadas, por exemplo) e inflamação sistêmica (concentrações de proteína C reativa e IL-6 baixas ou severamente aumentadas, por exemplo), evidenciando a incapacidade dos critérios diagnósticos atuais em selecionar pacientes com perfis distintos de acometimento sistêmico. Nesse contexto, Dal-Pizzol e Ritter (2012) confirmam a importância e necessidade de diagnóstico e estratificação mais precisos, com ferramentas mais acuradas como, por exemplo, biomarcadores, e ainda vislumbram a possibilidade de, no futuro, transformar a síndrome clínica em uma ou mais doenças distintas passíveis de tratamento específico.

Apesar da diminuição da contagem plaquetária não ser um dos critérios de diagnóstico sugeridos por Hauptman et al. (1997), no presente estudo foi observada redução significativa desse parâmetro no momento do diagnóstico, assim como em outro estudo avaliando o quadro hemostático de cadelas com piometra (PLAVEC et al., 2006). Embora a leucocitose seja classicamente tida como uma resposta à ativação de mecanismos de defesa frente a um quadro inflamatório, os fatores que levam à trombocitopenia não estão totalmente elucidados (RITTIRSCH et al., 2008). Apesar das trombocitopenias graves estarem mais comumente associadas à presença de coagulação intravascular disseminada (em casos de sepse), acredita-se que os casos mais brandos estejam relacionados à interação entre as bactérias ou endotoxinas e as plaquetas ou até mesmo dano imunológico a esses componentes, visto que já foi observado elevação plasmática de IgG associado a plaqueta em pacientes sépticos trombocitopênicos (MAMMEN, 1998; LEVY, et al., 2003; RITTIRSCH et al., 2008; MAKKAR et al., 2013).

Embora a avaliação hematológica seriada não tenha sido o foco deste estudo, sua principal utilidade foi avaliar se o tempo de acompanhamento empregado (30 dias), arbitrariamente acolhido, foi adequado. Como pode ser observado na Tabela 2, aos 30 dias após o diagnóstico e consequente intervenção cirúrgica, os animais apresentavam valores médios ou medianos dentro do intervalo de normalidade para praticamente

todos os parâmetros avaliados, o que valida os testes estatísticos tanto em relação às análises de correlação quanto à comparação entre os momentos.

Além de alterações no hemograma, foram também observadas no presente estudo anormalidades na avaliação bioquímica sérica referentes ao comprometimento hepático. Durante a sepse, a disfunção hepática é um dos componentes da síndrome da disfunção múltipla de órgãos e geralmente está associada a piores prognósticos (SPAPEN, 2008; NESSELER et al., 2012). Como o fígado é responsável por atividades metabólicas, homeostáticas e de defesa, acreditava-se que a disfunção hepática era uma consequência simples do choque séptico e hipoperfusão tecidual. No entanto, atualmente assume-se que o fígado é um fator importante na amplificação da disfunção múltipla de órgãos (NESSELER et al., 2012). Durante o curso da sepse, os hepatócitos alteram suas vias metabólicas e intensificam a síntese de proteínas de fase aguda, em resposta a determinadas interleucinas, principalmente a IL-6 (VARY & KIMBALL, 1992), e como consequência há redução da produção hepática de albumina, transferrina e antitrombina. Além disso, as células de Küpffer, após interação com lipopolissacarídeos, desempenham papel importante tanto na amplificação da resposta inflamatória, mediante liberação de TNF- $\alpha$ , quanto na hepatotoxicidade, mediante liberação de IL-18 e posterior secreção de interferon- $\gamma$  (FONG et al., 1990; TSUTSUI et al., 1997). Embora não existam estudos que estabeleçam critérios claros para o diagnóstico da lesão hepática aguda relacionada à sepse em pacientes caninos, já foi demonstrado em humanos que a avaliação da bilirrubina, albumina, ALT, AST, FA e tempo de protrombina podem ser utilizados tanto como marcadores diagnósticos quanto prognósticos (MARSHALL et al., 1995; BAKKER et al., 2004).

A observação das Tabelas 2 e 5 permite identificar a presença de leucocitose, hipoalbuminemia e aumento da IL-6, proteína C reativa e fosfatase alcalina. Estes resultados possibilitam a confirmação do estado inflamatório sistêmico dos animais incluídos no estudo e também atestam o envolvimento hepático tanto em relação a alteração de vias metabólicas quanto em relação à hepatotoxicidade, de forma semelhante ao que acontece em humanos com sepse. Frente a isso, fica claro que cães com sepse de ocorrência natural apresentam envolvimento hepático, e este não está obrigatoriamente associado à hipotensão, uma vez que não foram avaliados

animais com choque séptico. No entanto, o grau de disfunção, os parâmetros que melhor definem essa disfunção e a relevância clínica e prognóstica desses dados precisam ser estudados de forma mais específica, visto que informações à respeito desse assunto em cães com sepse de ocorrência natural são praticamente inexistentes (NESSELER, 2012; OSTERBUR et al., 2014).

Talvez um dos resultados mais expressivos desse estudo tenha sido a confirmação da interação entre sistema nervoso autônomo e sistema inflamatório nos pacientes avaliados. Esta interação tem recebido especial atenção nas últimas décadas como um potencial marcador do acometimento sistêmico e importante fator prognóstico, visto que recentemente tem sido proposto que o SNA participa da fisiopatogenia de diversas afecções, incluindo câncer, doenças cardiovasculares e sepse (MIKSA et al., 2005; DE COUCK, 2012).

A identificação da influência autonômica sobre o sistema imune não é recente, desde a década de 60 já se sabe que adrenalina e noradrenalina inibem a secreção de histamina pelos mastócitos (MANNAIONI et al., 1964). Posteriormente se descobriu uma comunicação bidirecional entre o sistema nervoso central e o sistema imune, sendo que o sistema imune influencia o sistema nervoso central tanto pela estimulação direta de terminais nervosos que projetam aferentes para a medula, que possuem receptores para citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1), quanto pela ativação periférica indireta de fibras nociceptivas via substância P (BESEDOVSKY et al., 1986; ELENKOV et al., 2000; WAPNIR & TEICHBERG, 2002). Já o cérebro influencia o sistema imune tanto pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal quanto pelas vias parassimpática e simpática, mediadas pela acetilcolina e noradrenalina, respectivamente (LABORIT, 1976; BESEDOVSKY et al., 1986; MIKSA et al., 2005).

Foi observado em estudo experimental que o nervo vago informa o cérebro a respeito de inflamação periférica mediante sinalização com IL-1 (EK et al., 1998). O cérebro responde mediante a liberação de potenciais de ação transmitidos pelo nervo vago, que culminam na liberação de acetilcolina. Essa, por sua vez, interage com as subunidades sete dos receptores nicotínicos de acetilcolina ( $\alpha 7nAChR$ ), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, resposta essa chamada de via anti-inflamatória colinérgica (DE COUCK et al., 2012).

Diversos autores mostram que níveis elevados de noradrenalina, presentes tanto em estágios iniciais quanto tardios da sepse, são responsáveis pela potencialização da resposta pró-inflamatória e inibição da via anti-inflamatória colinérgica (HAHN et al., 1995; YANG et al., 2000). Segundo Miksa et al. (2005), a diminuição da atividade parassimpática e consequente supressão da via anti-inflamatória colinérgica ocorre como resultado da hiperativação do sistema nervoso simpático. Atualmente acredita-se que o intestino seja a principal fonte da elevação sustentada de noradrenalina durante a sepse e o principal fator responsável por isso é o aumento da expressão e liberação de tirosina hidroxilase (TH) pelas fibras nervosas entéricas, que converte, sequencialmente, a tirosina em noradrenalina (YANG et al., 2000; ZHOU et al., 2004).

No estudo em questão, as variáveis da VFC se apresentaram reduzidas de forma semelhante ao observado por outros autores em estudos com seres humanos e animais de laboratório (GRIFFIN et al., 2005; GRIFFIN et al., 2006; MOORMAN et al., 2006; PANCOTO et al., 2008). Esses resultados confirmam, de forma indireta, a elevação dos níveis de catecolaminas e redução da atividade parassimpática nos animais avaliados. Sabe-se que as alterações das medidas diretas da VFC (SDNN, SDANN e SDNNIDX), evidenciadas no presente estudo, representam anormalidades na atividade simpática e/ou parassimpática, não permitindo distinguir quando essas alterações são devidas ao aumento do tônus simpático ou redução do tônus parassimpático (CALVERT, 1998; VANDERLEI et al., 2009). Já as alterações nos índices derivados da diferença entre os intervalos RR adjacentes (RMSSD e pNN>50) refletem as alterações curtas e rápidas do ciclo cardíaco, que são produzidas pela ação parassimpática. Assim, fica evidente que há redução da atividade parassimpática e é possível inferir que esse estado se deva à liberação maciça de noradrenalina na circulação devido tanto à hiperexpressão de TH quanto ao aumento dos níveis de sintaxina 1 e redução de transportadores de noradrenalina, que aumentam a síntese e liberação e reduzem a recaptção de noradrenalina, respectivamente, com sugerem Kushima et al. (1995), Masson et al. (1999), Baltazar et al. (2003) e Sung et al. (2003).

Os efeitos pró-inflamatórios da noradrenalina na sepse se devem à regulação da produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  via receptores adrenérgicos alfa-2 nas células de Kúpffer, que ocorre devido ao aumento da concentração portal de catecolaminas derivadas do

intestino e tal evento contribui de forma significativa para o aumento dos níveis circulantes de outras citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, a IL-6 (YANG et al., 2000; YANG et al., 2001; ZHOU et al., 2005). A relação indireta entre catecolaminas e citocinas pró-inflamatórias pôde também ser observada no presente estudo, que evidenciou correlação inversa significativa entre a VFC e IL-6, concordando com estudos anteriores que mostram que a atividade vagal se correlaciona inversamente com o grau de inflamação (JANSZKY et al., 2004). Segundos dados da Tabela 9, concentrações séricas de IL-6 entre 28 e 327 pg/mL influenciaram significativamente na redução dos parâmetros da VFC. Godin e Buchman (1996) acreditam que esse quadro de disfunção autonômica leve à síndrome da DMO em consequência de um desacoplamento da interação orgânica neuralmente mediada.

Ainda em relação à avaliação autonômica, pôde-se observar correlação negativa significativa entre todos esses parâmetros e a concentração sérica de proteína C reativa. A observação da Tabela 11 permite constatar que valores da proteína C reativa maiores que 39 µg/mL influenciam significativamente na redução da VFC. Outros autores já identificaram a redução da VFC em pacientes em sepse, demonstrando, inclusive, correlação com proteínas de fase aguda e interleucinas. Em experimento com injeção de lipopolissacarídeos em ratos, Fairchild et al. (2009) demonstram discreta redução e posterior normalização da VFC logo após a expressão de TNF- $\alpha$ , e depressão máxima da VFC após o início de expressão de outras citocinas. Segundo Madsen et al. (2007) e Haarala et al. (2011) quanto maior a concentração sérica de proteína C reativa, menor os parâmetros da VFC, confirmando, assim, a relação entre inflamação e sistema autonômico. No entanto, o exato mecanismo ligando essa proteína de fase aguda à VFC não é explicado por esses autores. Assim, levando em consideração a relação causal entre IL-6 e proteína C reativa, é possível especular que o aumento da atividade simpática (pelo aumento da noradrenalina derivada do intestino), que será refletido pela diminuição da VFC, leva ao aumento da produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  pelas células de Küpffer que, por sua vez, estimularão a produção de outras citocinas pró-inflamatórias, em especial a IL-6, que estimula a síntese e produção hepática de proteína C reativa.

Sajadieh et al. (2006) demonstraram que a interação sinérgica entre a baixa variabilidade da frequência cardíaca e a alta concentração de proteína C reativa contribuem para morte futura e infarto do miocárdio em pacientes humanos. Embora a metodologia utilizada no presente estudo não permita a estratificação de prognóstico tampouco a avaliação da possibilidade de doenças tardias, os dados permitem concordar com diversos autores que afirmam que a análise da VFC pode servir como um “fisiomarcador” para processos desencadeados pela sepse, inclusive a progressão para a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, como afirma Mizock (2009) (FAIRCHILD & O'SHEA, 2010; PAPAIOANNOU et al., 2013).

Nesse contexto, é possível imaginar a avaliação da VFC como uma ferramenta de rotina para a estratificação de severidade em pacientes com sepse, por se tratar de uma análise rápida, relativamente barata e com alta correlação com a concentração sérica de proteína C reativa. Além disso, cria-se um modelo natural para o estudo da disfunção autonômica na sepse com possibilidade de se testar condutas que visam a atenuação da inflamação pela estimulação vagal, como já tem sido realizado, com sucesso, em modelos experimentais de diversas doenças (MIHAYLOVA et al., 2012; YAMAKAWA et al., 2013; SABBAH, 2013), ou pela administração de substâncias simpatoplégicas, como a grelina, por exemplo (MATSUMURA et al., 2002). Porém, mesmo com esses potenciais, estudos futuros sobre a sensibilidade e especificidade da VFC na detecção da sepse e seu valor prognóstico se fazem necessários devido às múltiplas causas potenciais de alterações nos resultados dessa análise.

Os resultados desse estudo permitem a identificação de uma dessas causas potenciais de alteração da VFC. Além da clara influência da proteína C reativa no tônus autonômico, é possível observar que no mesmo momento em que há redução da variabilidade da frequência cardíaca (T-0), também há redução da pressão arterial, levantando a possibilidade de que as anormalidades volêmicas, inerentes ao estado séptico, também podem ter contribuído para a redução dos índices testados.

A proteína C reativa também se mostrou importante em relação à avaliação ecocardiográfica, com a qual foi possível observar correlação negativa significativa com os índices de função sistólica. A proteína C reativa é uma proteína predominantemente secretada pelo fígado em resposta às citocinas pró-inflamatórias, fatores do

complemento e hormônios, e é amplamente utilizada como um marcador de inflamação em pacientes humanos (SZALAI & MCCRORY, 2002). A concentração dessa proteína também está elevada em pacientes caninos em várias condições como já observado (NAKAMURA et al., 2008). No entanto, a questão se essa proteína funciona apenas como um marcador ou se ela desempenha algum fator causal na disfunção miocárdica tem sido discutida (SCHULZ & HEUSCH, 2011).

Nagai et al. (2011) mostraram que ratos super expressando o gene da proteína C reativa apresentam remodelamento cardíaco acelerado e, como no presente estudo, diminuição da função contrátil demonstrada pela diminuição da fração de encurtamento, sugerindo que a proteína C reativa seja um fator determinante para a disfunção miocárdica. Acredita-se que os efeitos da proteína C reativa no coração ocorram devido a sua capacidade de se ligar e ativar receptores Fcγ, resultando na produção de citocinas pro-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, que contribuem para a progressão da lesão miocárdica mediante oxidação dos miofilamentos e apoptose dos cardiomiócitos (HEUSCH et al., 2010; NAGAI et al., 2011; SCHULZ & HEUSCH, 2011).

Mesmo com a correlação negativa entre a proteína C reativa e os índices de função sistólica, não foi admitido que os animais do presente estudo apresentassem disfunção miocárdica. Nelson e Thompson (2006) apresentaram um estudo retrospectivo com 16 cães com doença sistêmica severa e disfunção miocárdica, definida por esses autores pela fração de encurtamento menor que 26% e/ou fração de ejeção menor que 46%. Em 2010, Kenney et al, diagnosticaram disfunção miocárdica em 17,5% dos cães com sepse estudados. Os autores classificaram a disfunção miocárdica de acordo com critérios mais atuais, que enquadram no grau de disfunção cardíaca induzida pela sepse os pacientes com hipotensão que necessitam de intervenção medicamentosa. No entanto, Antonucci et al. (2014) mostram que por não existir critério universal que defina a disfunção miocárdica na sepse, a maioria dos autores utilizam como marcador a redução da fração de ejeção.

No presente estudo não foram introduzidos pacientes com pressão arterial menor que 90 mmHg, da mesma forma que não foram observadas fração de encurtamento ou de ejeção compatíveis com quadro de disfunção sistólica. Sendo

assim, mesmo com valores de fração de encurtamento mais baixos nos animais com concentrações séricas de proteína C reativa mais elevadas, considerou-se que os cães estudados não apresentavam disfunção sistólica, visto que não se enquadravam nos critérios previamente adotados para cães, tampouco naqueles adotados para humanos.

Apesar dos estudos sobre o envolvimento cardíaco na sepse não serem recentes, muita confusão e controvérsia ainda existe a respeito da disfunção sistólica e dilatação ventricular nesses pacientes (HUANG et al., 2013; REPESSÉ et al., 2013). Em um dos estudos mais criteriosos sobre esse assunto, uma meta-análise com mais de 700 pacientes, Huang et al. (2013) não encontraram evidências que suportam a relação entre disfunção miocárdica e prognóstico. Nesse mesmo estudo, os autores afirmam que parte da grande discrepância entre as pesquisas a respeito da presença ou não de disfunção miocárdica se deve ao emprego de técnicas de avaliação que são altamente dependentes da pré-carga e pós-carga, e não refletem exclusivamente a contratilidade intrínseca (ROBOTHAM et al., 1991; REPESSÉ et al., 2013). É crucial se lembrar do envolvimento vascular ou microvascular que ocorre no pacientes com sepse e nesses casos, a função sistólica do ventrículo esquerdo, avaliado ecocardiograficamente, pode refletir mais o tônus arterial que a função contrátil intrínseca (ROBOTHAM et al., 1991; HUANG et al., 2013).

Sendo assim, embora a avaliação das Tabelas 9 e 12 permita especular que o estudo de animais com quadros mais severos de inflamação, e conseqüentemente valores mais elevados de proteína C reativa, provavelmente evidenciaria valores mais baixos da fração de encurtamento e fração de ejeção, é fundamental a introdução de técnicas que consigam avaliar a função miocárdica de forma menos dependente da pré e pós carga como, por exemplo, o Doppler tecidual e a avaliação da deformação miocárdica por “speckle tracking”.

Outro achado relevante foi ausência de dilatação ventricular como tem sido relatado desde a década de 70 e defendido por alguns autores mais recentemente (WEISEL et al., 1977; PARKER et al., 1984; PULIDO et al., 2012; WENG et al., 2012). Huang et al. (2013) também não encontram evidências que suportam a relação entre dilatação ventricular e prognóstico. Em 1993, Parrillo desenvolveu o conceito de “adaptação de pré-carga” que dizia que os pacientes que sobreviviam ao choque

séptico assim o faziam porque o ventrículo esquerdo sofria dilatação aguda para corrigir a diminuição da fração de ejeção. No entanto, posteriormente essa teoria não foi confirmada, e Vieillard-Baron et al. (2001) afirmam que quando se corrige o estado hipovolêmico dos pacientes com sepse o volume ventricular permanece dentro dos limites de normalidade. Como os pacientes do estudo em tela não apresentavam quadro hipovolêmico significativo, é de se esperar, de fato, que não apresentassem dilatação ventricular, de acordo com Vieillard-Baron et al., (2001).

Embora a maioria dos autores concorde que os pacientes com choque séptico apresentem maiores graus de disfunção diastólica e que a severidade dessa disfunção está diretamente relacionada à sobrevida (OMAR et al., 2012), já foi demonstrado que pacientes com sepse, mesmo sem choque, podem apresentar alterações nas fases de relaxamento ventricular (JAFRI et al., 1990). Munt et al. (1998) relataram anormalidades nos parâmetros diastólicos derivados do Doppler, principalmente no tempo de desaceleração da onda E, parâmetro que apresenta forte correlação com a rigidez ventricular (OHNO et al., 1994; LITTLE & OHNO, 2009). Outros estudos ecocardiográficos em humanos demonstram enchimento ventricular lento e anormalidade de relaxamento em pacientes com sepse, e os autores sugerem contribuição importante da diminuição da complacência ventricular na disfunção miocárdica relacionada à sepse (JAFRI et al., 1990; POELART et al., 1997; MUNT et al., 1998).

Mesmo que o presente estudo tenha evidenciado diferença significativa nos parâmetros supracitados em relação aos momentos de análise, os valores encontrados se situavam dentro dos intervalos de normalidade sugeridos em outras pesquisas (SCHOBBER et al., 2010; BOON, 2011). Levando em consideração que os critérios diagnósticos para disfunção diastólica, sugeridos tanto pela “American Society of Echocardiography” quanto por livros texto (NAGUEH et al., 2009; BOON, 2011), incluem alterações da relação E/A, TRIV e TDE, não foi considerado que os animais estudados, no momento do diagnóstico, apresentavam disfunção diastólica.

Ao contrário de estudos mais recentes que utilizaram a técnica de imagem por Doppler tecidual para diagnosticar disfunção diastólica (BROWN et al., 2012; LANDESBURG et al., 2012), no presente trabalho foi utilizado o Doppler de fluxo, cujas

variáveis são dependentes da pré-carga e podem ter sua utilidade reduzida em altas frequências cardíacas (BOON, 2011). Assim, a metodologia empregada não permite confirmar ou descartar de forma definitiva a presença de disfunção diastólica em cães com sepse.

Embora autores concordem que as alterações miocárdicas induzidas pela sepse ocorram devido às ações da IL-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$  (KUMAR et al., 1996; KUMAR et al., 2001), no presente estudo não houve correlação entre nenhum dos parâmetros ecocardiográficos e IL-1 e TNF- $\alpha$ . Uma possível explicação para esse achado pode ser o caráter bifásico da liberação de mediadores inflamatórios na sepse. Estudos com modelos experimentais mostram que a liberação de IL-1 e TNF- $\alpha$  ocorrem de forma mais predominante na fase inicial da sepse e, em fases mais tardias, essas citocinas dão lugar a outras secretadas por monócitos e macrófagos ativados e também por células de tecido necrótico (CASEY 2000; MIKSA et al., 2005). Embora não se tenha o momento exato do início do quadro séptico dos animais incluídos no estudo, a maioria, se não a totalidade, apresentavam sinais compatíveis há mais de um dia, o que sustenta tal possibilidade. No entanto, não é possível descartar a possibilidade de que essa falta de correlação esteja relacionada à metodologia de análise dessas duas citocinas. Embora a plataforma multiplex utilizada seja uma técnica validada para cães e amplamente utilizada na atualidade (KJELGAARD-HANSEN et al., 2011; NIKOLIC NIELSEN et al., 2013), concentrações baixas ou não detectáveis de TNF- $\alpha$  foram relatadas em outros estudos utilizando a mesma metodologia (ZOIS et al., 2012).

Tendo em vista que foram obedecidos criteriosamente os procedimentos de coleta, manuseio e armazenamento das amostras, a falha na mensuração pode, de fato, ser devido à baixa sensibilidade do teste (KJELGAARD-HANSEN et al., 2011; ZOIS et al., 2012). Declue et al. (2009) também observaram concentrações baixas ou não detectáveis de IL-1 $\beta$  em gatos submetidos a infusão de endotoxinas e sugeriram que tal problema pode estar relacionado à baixa sensibilidade do ensaio por ELISA para a detecção dessa citocina.

Dentre as principais limitações do estudo se destaca a dificuldade em selecionar uma população uniforme de animais com sepse de ocorrência natural. O caráter heterogêneo da idade, raça e peso pode deixar dúvida a respeito dos resultados

referentes ao tamanho do coração e frequência cardíaca obtidos nesse estudo. Porém já foi demonstrado que a idade é um fator determinante no intervalo normal da frequência cardíaca somente em cães com menos de 12 meses (FERASIN et al., 2010) e Huang et al. (2013) afirmam que a relação entre o peso corpóreo e o tamanho do coração pode ser drasticamente minimizadas com a indexação dos valores ecocardiográficos.

A determinação da severidade da sepse nos pacientes estudados também foi um importante fator limitante. Em pacientes humanos, definições específicas de sepse, choque séptico e sepse grave foram estabelecidas para melhor categorizar esses pacientes e facilitar a comparação entre estudos. Porém, tal critério de classificação nunca foi devidamente estabelecido para cães com sepse e assim a severidade da doença ainda é um critério predominantemente subjetivo. Outra limitação importante foi não ter utilizado técnica mais específica para a caracterização da disfunção diastólica, como o Doppler tecidual. Os parâmetros diastólicos derivados do Doppler de fluxo podem sofrer influência da frequência cardíaca e pré-carga e assim causar um ponto de confusão em relação ao real quadro de relaxamento e complacência miocárdica no momento do diagnóstico.

Embora este seja um estudo pioneiro na avaliação ecocardiográfica de pacientes caninos com sepse de ocorrência natural, outros trabalhos avaliando o quadro hematológico já foram realizados e obtiveram resultados semelhantes aos da presente pesquisa, no entanto o caráter de gravidade ou a possibilidade de síndrome de DMO não foi levantada por nenhum deles (PRETZER, 2008; DABROWSKI, 2013). Dessa forma, o trabalho em questão é relevante não só pela caracterização do comprometimento autonômico e SDMO em pacientes com doenças rotineiras, como a piometra, destacando assim a necessidade e possibilidade de mais estudos sobre o assunto.

## 7. CONCLUSÃO

A análise dos resultados do presente estudo permite concluir que:

- Os animais avaliados em estado séptico não apresentaram remodelamento cardíaco ou disfunção miocárdica, no entanto demonstraram disfunção autonômica, refletida pela redução de todos os índices da VFC;
- As alterações do tônus autonômico se correlacionam com as concentrações séricas da proteína C reativa;
- A VFC obtida pela avaliação Holter de uma hora se faz adequada para a identificação da disfunção autonômica em cães com sepse;
- A proteína C reativa pode desempenhar um papel na patogênese da progressão do comprometimento cardíaco na sepse.

## 8. REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Critical Care Medicine**. v. 35, p. 2408-2416, 2007.

ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**. v. 29, p. 1303-1310, 2001.

ANNANE, D.; TRABOLD, F.; SHARSHAR, T.; JARRIN, I.; BLANC, A. S.; RAPHAEL, J.C.; GAJDOS, P. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. v. 160, p. 458-465, 1999.

ANTONUCCI, E.; FIACCADORI, E.; DONADELLO, K.; TACCONE, F. S.; FRANCHI, F.; SCOLLETTA, S. Myocardial depression in sepsis: From pathogenesis to clinical manifestations and treatment. **Journal of Critical Care**. v. 29, p. 500-511, 2014.

AUSTAD, R.; BLOM, A. K.; BORRESEN, B. Pyometra in the dog. III. -A pathophysiological investigation. III. Plasma progesterone levels and ovarian morphology. **Nord Veterinærmed**. v. 31, p. 258-262, 1979.

BAKKER, J.; GROVER, R.; MCLUCKIE, A.; HOLZAPFEL, L.; ANDERSSON, J.; LODATO, R.; WATSON, D.; GROSSMAN, S.; DONALDSON, J.; TAKALA, J.. Administration of the nitric oxide synthase inhibitor NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88) by intravenous infusion for up to 72 hours can promote the resolution of shock in patients with severe sepsis: results of a randomized, doubleblind, placebo-controlled multicenter study (study no. 144-002). **Critical Care Medicine**. v. 32, p. 1-12, 2004.

BALDWIN JR, A.S. The transcription factor NF- $\kappa$ B and human disease. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 107, p. 3-6, 2001.

BALTAZAR, G.; CARVALHO, A. P.; DUARTE, E. P. Differential expression of syntaxin 1A and 1B by noradrenergic and adrenergic chromaffin cells. **Neurochemical Research**. v. 28, p. 1453-1457, 2003.

BARTON, L. Sepsis and the systemic inflammatory response syndrome. ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Textbook of veterinary internal medicine**. 6. ed. St. Louis: Elsevier Saunders, 2005. p. 452-454.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**. v. 233, p. 652-654, 1986.

---

<sup>1</sup> ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração*. Rio de Janeiro, 2002. 23 p

BOLLER, E.M.; OTTO, C.M. Sepsis. In: SILVERSTEIN, D.C.; HOPPER, K. **Small Animal Critical Care Medicine**. 1.ed. Saint Louis: Saunders, 2009. p. 454-458.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**. v. 101, p. 1644-1655, 1992.

BOON, J. A. Evaluation of size, function and hemodynamics. In:\_\_\_\_. **Manual of Veterinary Echocardiography**. 2. ed. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 2011. P. 153-266.  
BROWN, S. M.; PITTMAN, J. E.; HIRSHBERG, E. L.; JONES, J. P.; LANSPA, M. J.; KUTTLER, K. G.; LITWIN, S. E.; GRISSOM, C. K. Diastolic dysfunction and mortality in early severe sepsis and septic shock: a prospective, observational echocardiography study. **Critical Ultrasound Journal**. v. 4, p. 1-9, 2012.

BROWN, S.; ATKINS, C.; BAGLEY, R.; CARR, A.; COWGILL, L.; DAVIDSON, M.; EGNER, B.; ELLIOTT, J.; HENIK, R.; LABATO, M.; LITTMAN, M.; POLZIN, D.; ROSS, L.; SNYDER, P.; STEPIEN, R. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 21, p. 542-558, 2007.

BULMER, B. J. Cardiovascular dysfunction in sepsis and critical illness. **Veterinary Clinics of Small Animal Practice**. v. 41, p. 717-726, 2011.

CALVERT, C. A.; JACOBS, G. J.; KRAUS, M.; BROWN, J. Signal-averaged electrocardiograms in normal Doberman pinschers. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 12, p. 355-364, 1998.

CASEY, L. C. Immunologic response to infection and its role in septic shock. **Critical Care Clinics**. v. 16, p. 193-213, 2000.

CHRISTAKI, E.; ANYFANTI, P.; OPAL, S. M. Immunomodulatory therapy for sepsis: an update. **Expert Review of Anti-infective Therapy**. v. 9, p. 1013–1033, 2011.

COURT, O.; KUMAR, A.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. **Critical Care**. v. 6, p. 500-508, 2002.

DABROWSKI, R.; WAWRON, W.; KOSTRO, K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. **Theriogenology**. v. 67, p. 321-327, 2007.

DAL-PIZZOL, F.; RITTER, C. À procura do Santo Graal: aonde vamos com os biomarcadores na sepse? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 24, p. 117-118, 2012.

DE COUCK, M.; MRAVEC, B.; GIDRON, Y. You may need the vagus nerve to understand pathophysiology and to treat diseases. **Clinical Science**. v. 122, p. 323-328, 2012.

DECLUE, A. E.; WILLIAMS, K. J.; SHARP, C. Systemic response to low-dose endotoxin infusion in cats. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.132, p. 167–174, 2009.

DHALIWAL, G. K.; ENGLAND, G. C. W.; NOAKES, D. E. The effects of endometrial scarification on uterine steroid receptors, bacterial flora and histological structure in the bitch. **Animal Reproduction Science**. v. 69, p. 239-249, 2002.

DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S. T.; STAR, R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 119, p. 2868-2878, 2009.

DOW, C. Experimental reproduction of cystic endometrial-pyometra complex in the bitch. **The Journal of Pathology and Bacteriology**. v. 78, p. 267–79, 1959.

EGENVALL, A.; HAGMAN, R.; BONNETT, B. N.; HEDHAMMAR, A.; OLSON, P.; LAGERSTEDT, A. S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 15, p. 530-538, 2001.

EK, M.; KUROSAWA, M.; LUNDEBERG, T.; ERICSSON, A. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1 $\beta$ : role of endogenous prostaglandins. **The Journal of Neuroscience**. v. 18, p. 9471–9479, 1998.

ELENKOV, I. J.; WILDER, R. L.; CHROUSOS, G. P.; VIZI, E. S. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological Reviews**. v. 52, p. 595-638, 2000.

ELLRODT, A. G.; RIEDINGER, M. S.; KIMCHI, A.; BERMAN, D. S.; MADDAHI, J.; SWAN, H. J.; MURATA, G. H. Left ventricular performance in septic shock: reversible segmental and global abnormalities. **American Heart Journal**. v. 110, p. 402-409, 1985.

FAIRCHILD, K. D.; O'SHEA, T. M. Heart rate characteristics: physiomarkers for detection of late-onset neonatal sepsis. **Clinics in Perinatology**. v. 37, p. 581-598, 2010.

FAIRCHILD, K.D.; SAUCERMAN, J.J.; RAYNOR, L.L.; SIVAK, J.A.; XIAO, Y.; LAKE, D.E.; MOORMAN, J.R. Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. v. 297, p. R1019-R1027, 2009.

FERASIN, L.; FERASIN, H.; LITTLE, J. L. Lack of correlation between canine heart rate and body size in veterinary clinical practice. *Journal of Small Animal Practice*. v. 51, p. 412-418, 2010.

FERNANDES JÚNIOR, C. J. AKAMINE, N.; KNOBEL, M.; KNOBEL, E. Depressão miocárdica na sepse. In: KNOBEL, E. **Condutas no Paciente Grave**. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 143-148.

FONG, Y. M.; MARANO, M. A.; MOLDAWER, L. L.; WEI, H.; CALVANO, S. E.; KENNEY, J. S.; ALLISON, A. C.; CERAMI, A.; SHIRES, G. T.; LOWRY, S. F. The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans. **Journal of Clinical Investigation**. v. 85, p. 1896-1904, 1990.

FRONCHETTI, L.; NAKAMURA, F.; AGUIAR, C.; OLIVEIRA, F. Indicadores de regulação autonômica cardíaca em repouso e durante exercício progressivo. Aplicação do limiar de variabilidade da frequência cardíaca. **Revista Portuguesa de Ciência Desportiva**. v. 6, p. 21-28, 2006.

FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and septic shock: A history. **Critical Care Clinics**. v. 25, p. 83-101, 2009.

GODIN, P. J.; BUCHMAN, T. G. Uncoupling of biological oscillators: A complementary hypothesis concerning the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. **Critical Care Medicine**. v. 24, p. 1107-1116, 1996.

GRIFFIN, M. P.; LAKE, D. E.; BISSONETTE, E. A.; HARRELL, F. E.; O'SHEA, T. M.; MOORMAN, J. R. Heart rate characteristics: novel physiomarkers to predict neonatal infection and death. **Pediatrics**. v. 116, p. 1070-1074, 2005.

GRIFFIN, M. P.; LAKE, D. E.; MOORMAN, J. R. Heart rate characteristics and laboratory tests in neonatal sepsis. **Pediatrics**. v. 115, p. 937-941, 2006.

GU, M.; BOSE, R.; BOSE, D.; YANG, J.; LI, X.; LIGHT, R. B.; JACOBS, H.; MINK, S. N. Tumour necrosis factor- $\alpha$ , but not septic plasma depresses cardiac myofilament contraction. **Canadian Journal of Anesthesia**. v. 45, p. 352-359, 1998.

HAARALA, A.; KÄHÖNEN, M.; EKLUND, C.; JYLHÄVÄ, J.; KOSKINEN, T.; TAITTONEN, L.; HUUPPONEN, R.; LEHTIMÄKI, T.; VIKARI, J.; RAITAKARI, O. T.; HURME, M. Heart rate variability is independently associated with C-reactive protein but not with Serum amyloid A. The Cardiovascular Risk in Young Finns Study. **European Journal of Clinical Investigation**. v. 41, p. 951-957, 2011.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; FRANSSON, B. A.; BERGSTRÖM, A.; HOLST, B. S.; LAGERSTEDT, A. S. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2-alpha metabolite analysis. **Theriogenology**. v. 66, p. 198-206, 2006a.

HAGMAN, R.; KINDAHL, H.; LAGERSTEDT, A. S. pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F<sub>2</sub> metabolite levels. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 47, p. 55-68, 2006b.

HAHN, P. Y.; WANG, P.; TAIT, S. M.; BA, Z. F.; REICH, S. S.; CHAUDRY, I. H. Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. **Shock**. v. 4, p. 269-73, 1995.

HAUPTMAN, J.G.; WALSHAW, R.; OLIVER, N.B. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. **Veterinary Surgery**. v. 26, p. 393-397, 1997.

HENKIN, C.S.; COELHO, J.C.; PAGANELLA, M.C.; SIQUEIRA, R.M.; DIAS, F.S. Sepsis: uma visão atual. **Scientia Medica**. v. 19, p. 135-145, 2009.

HEUSCH, P.; CANTON, M.; AKER, S.; VAN DE SAND, A.; KONIETZKA, I.; RASSAF, T.; MENAZZA, S.; BRODDE, O.E.; DI LISA, F.; HEUSCH, G.; SCHULZ, R. The contribution of reactive oxygen species and p38 mitogen-activated protein kinase to myofilament oxidation and progression of heart failure in rabbits. **British Journal of Pharmacology**. v. 160, p. 1408-1416, 2010.

HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. **The New England Journal of Medicine**. v.348, p. 138-150, 2003.

HUANG, S. J.; NALOS, M.; MCLEAN, A. S. Is early ventricular dysfunction or dilatation associated with lower mortality rate in adult severe sepsis and septic shock? A meta-analysis. **Critical Care**. v. 17, p. R96, 2013.

JAFRI, S. M.; LAVINE, S.; FIELD, B. E.; BAHOROZIAN, M. T.; CARLSON, R. W. Left ventricular diastolic function in sepsis. **Critical Care Medicine**. v. 18, p. 709-714, 1990.

JANIG, W. Autonomic nervous system and inflammation. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v. 182, p. 1-3, 2014.

JANSZKY, I.; ERICSON, M.; LEKANDER, M.; BLOM, M.; BUHLIN, K.; GEORGIADES, A.; AHNVE, S. Inflammatory markers and heart rate variability in women with coronary heart disease. **Journal of Internal Medicine**. v. 256, p. 421-428, 2004.

JARDIN, F.; BRUN-NEY, D.; AUVERT, B.; BEAUCHET, A.; BOURDARIAS, J. P. Sepsis-related cardiogenic shock. **Critical Care Medicine**. v. 18, p. 1055-1060, 1990.

KARLSSON, I.; HAGMAN, R.; JOHANNISSON, A.; WANG, L.; KARLSTAM, E.; WERNERSSON, S. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. **Reproduction in Domestic Animals**. v. 47, p. 337-341, 2012.

KEMPISTY, B.; BUKOWSKA, D.; WOZNA, M.; PIOTROWSKA, H.; JACKOWSKA, M.; ZURAW, A.; CIESIOLKA, S.; ANTOSIK, P.; MARYNIAK, H.; OCIEPA, E.; POROWSKI, S. Z.; BRUSSOW, K. P.; JASKOWSKI, J. M.; NOWICKI, M. Endometritis and pyometra in bitches: a review. **Veterinarni Medicina**. v. 58, p. 289-297, 2013.

KENNEY, E. M.; ROZANSKI, E. A.; RUSH, J. E.; DELAFORCADE-BURESS, A. M.; BERG, J.R.; SILVERSTEIN, D.C.; MONTEALEGRE, C.D.; JUTKOWITZ, L.A.; ADAMANTOS, S.; OVBAY, D.H.; BOYSEN, S. R.; SHAW, S. P. Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003–2007). **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 236, p. 83-87, 2010.

KIMCHI, A.; ELLRODT, A. G.; BERMAN, D. S.; RIEDINGER, M. S.; SWAN, H. J.; MURATA, G. H. Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study. **Journal of American College of Cardiology**. v. 4, p. 945-951, 1984.

KJELGAARD-HANSEN, M.; GOGGS, R.; WIINBERG, B.; CHAN, D. L. Use of serum concentrations of interleukin-18 and monocyte chemoattractant protein-1 as prognostic indicators in primary immune-mediated hemolytic anemia in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 25, p. 76–82, 2011.

KORTGEN, A.; HOFMANN, G.; BAUER, M. Sepsis – current aspects of pathophysiology and implications for diagnosis and management. **European Journal of Trauma**. v. 32, p. 3-9, 2006.

KUMAR, A.; KRIEGER, A.; SYMEONEIDES, S.; KUMAR, A.; PARRILLO, J. E. Myocardial dysfunction in septic shock: part II. Role of cytokines and nitric oxide. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**. v. 15, p. 485-511, 2001.

KUMAR, A.; THOTA, V.; DEE, L.; OLSON, J.; URETZ, E.; PARRILLO, J. E. Tumor necrosis factor  $\alpha$  and interleukin  $1\beta$  are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. **Journal of Experimental Medicine**. v. 183, p. 494-458, 1996.

KUSHIMA, Y.; FUJIWARA, T.; MORIMOTO, T.; AKAGAWA, K. Involvement of HPC-1/syntaxin-1A antigen in transmitter release from PC12h cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 212, p. 97-103, 1995.

LABORIT, H. On the mechanism of activation of the hypothalamo--pituitary--adrenal reaction to changes in the environment (the 'alarm reaction'). **Resuscitation**. v. 5, p. 19-30, 1976.

LAFORCADE, A. M.; FREEMAN, L. M.; SHAW, S. P.; BROOKS, M. B.; ROZANSKI, E. A.; RUSH, J. E. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 17, p. 674-679, 2003.

LANDESBERG, G.; GILON, D.; MEROZ, Y.; GEORGIEVA, M.; LEVIN, P. D.; GOODMAN, S.; AVIDAN, A.; BEERI, R.; WEISSMAN, C.; JAFFE, A. S.; SPRUNG, C.L. Diastolic dysfunction and mortality in severe sepsis and septic shock. **European Heart Journal**. v. 33, p. 895-903, 2012.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S. M.; VINCENT, J. L.; RAMSAY, G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**. v. 31, p. 1250-1256, 2003.

LITTLE, W. C.; OH, J. K. Echocardiographic evaluation of diastolic function can be used to guide clinical care. **Circulation**. v. 120, p. 802–809, 2009.

LUKEWICH, M. K.; ROGERS, R. C.; LOMAX, A. E. Divergent neuroendocrine responses to localized and systemic inflammation. **Seminars in Immunology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2014.01.004>, 2014.

MADSEN, T.; CHRISTENSEN, J. H.; TOFT, E.; SCHMIDT, E. B. C-reactive protein is associated with heart rate variability. **Annals of Noninvasive Electrocardiology**. v. 12, p. 216-222, 2007.

MAKKAR, M. Performance evaluation of hematologic scoring system in early diagnosis of neonatal sepsis. **Journal of Clinical Neonatology**. v. 2, p. 25-29, 2013.

MALIK, M.; BIGGER, J. T.; CAMM, A. J.; KLEIGER, R. E.; MALLIANI, A.; MOSS, A. J.; SCHWARTZ, P. J. Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. **Circulation**. v. 93, p. 1043-1065, 1996.

MAMMEN, E.F. The haematological manifestations of sepsis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 41, p. 17-24, 1998.

MANNAIONI, P. F.; ZILLETTI, L.; GUIDOTTI, A.; GIOTTI, A. Effects of Adrenotropic Drugs on the Release of Histamine in the Anaphylactic Reaction of the Isolated Guinea Pig Heart. **Life Science**. V. 11, p. 347-350, 1964.

MARSHALL, J. C.; COOK, D. J.; CHRISTOU, N. V.; BERNARD, G. R.; SPRUNG, C. L.; SIBBALD, W. J. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. **Critical Care Medicine**. v. 23, p. 1638-1652, 1995.

MASSON, J.; SAGNE, C.; HAMON, M.; EL MESTIKAWY, S. Neurotransmitter transporters in the central nervous system. **Pharmacological Reviews**. v. 51, p. 439-64, 1999.

MATSUMURA, K.; TSUCHIHASHI, T.; FUJII, K.; ABE, I.; IIDA, M. Central ghrelin modulates sympathetic activity in conscious rabbits. **Hypertension**. v. 40, p. 694-699, 2002.

MCANULTY, J. F. Septic shock in the dog: a review. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 19, p. 827–36, 1983.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY JR., C.A. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. **Seminars in immunology**. v. 10, p. 351-353, 1998.

MENEZES JÚNIOR, A.M.; MOREIRA, H. G.; DAHER, M. T. Análise da variabilidade da frequência cardíaca em pacientes hipertensos, antes e depois do tratamento com inibidores da enzima conversora de angiotensina II. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 83, p. 165-168, 2004.

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

MIHAYLOVA, S.; KILLIAN, A.; MAYER, K.; PULLAMSETTI, S. S.; SCHERMULY, R.; ROSENGARTEN, B. Effects of anti-inflammatory vagus nerve stimulation on the cerebral microcirculation in endotoxemic rats. **Journal of Neuroinflammation**. v. 183, p. 2-11, 2012.

MIKSA, M.; WU, R.; ZHOU, M.; WANG, P. Sympathetic excitotoxicity in sepsis: Pro-inflammatory priming of macrophages by norepinephrine. **Frontiers in Bioscience**. v. 10, p. 2217-2229, 2005.

MIZOCK, B.A. The multiple organ dysfunction syndrome. **Disease-a-Month**. v. 55, p. 476-526, 2009.

MOORMAN, J. R.; LAKE, D. E.; GRIFFIN, M. P. Heart rate characteristics monitoring for neonatal sepsis. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**. v. 53, p. 126-132, 2006.

MUNT, B.; JUE, J.; GIN, K.; FENWICK, J.; TWEEDDALE, M. Diastolic filling inhuman severe sepsis: an echocardiographic study. **Critical Care Medicine**. v. 26, p. 1829-1833.

NAGAI, T.; ANZAI, T.; KANEKO, H.; MANO, Y.; ANZAI, A.; MAEKAWA, Y.; TAKAHASHI, T.; MEGURO, T.; YOSHIKAWA, T.; FUKUDA, K. C-reactive protein overexpression exacerbates pressure overload-induced cardiac remodeling through enhanced inflammatory response. **Hypertension**. v. 57, p. 208-215, 2011.

NAGUEH, S. F.; APPLETON, C; P.; GILBERT, T. C.; ASTERISK, M.; MARINO, P. N.; ASTERISK, M.; OH, J. K.; SMISETH, O. A.; ASTERISK, P.; WAGGONER, A. D.; FLACHSKAMPF, F. A.; ASTERISK, L.; PELLIKKA, P. A.; EVANGELISTA, A. Recommendations for the Evaluation of Left Ventricular Diastolic Function by Echocardiography. **Journal of American Society of Echocardiography**. v. 22, p. 107-133; 2009.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K.; KOSHINO, A.; NAKASHIMA, K.; SETOBUCHI, A.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **Clinical Pathology**. v. 70, p. 127-131, 2008.

NATANSON, C.; HOFFMAN, W. D.; SUFFREDINI, A. F.; EICHACKER, P. Q.; DANNER, R. L. Selected treatment strategies for septic shock based on proposed mechanisms of pathogenesis. **Annals of Internal Medicine**. v. 120, p. 771-783, 1994.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**. v. 420, p. 846-852, 2002.

NELSON, O.L.; THOMPSON, P. A. Cardiovascular dysfunction in dogs associated with critical illnesses. **Journal of the American Animal Hospital Association**. v. 42, p. 344-349, 2006.

NELSON, S. A question of balance. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. v. 159, p. 1365-1367, 1999.

NESSLER, N.; LAUNEY, Y.; ANINAT, C.; MOREL, F.; MALLÉDANT, Y.; SEGUIN, P. Clinical review: The liver in sepsis. **Critical Care**. v. 16, p. 235, 2012.

NIKOLIC NIELSEN, L.; KJELGAARD-HANSEN, M.; KRISTENSEN, A.T. Monocyte chemotactic protein-1 and other inflammatory parameters in Bernese Mountain dogs with disseminated histiocytic sarcoma. **The veterinary Journal**. v. 198, p. 424-428, 2013.

OHNO, M.; CHENG, C. P.; LITTLE, W. C. Mechanism of altered patterns of left ventricular filling during the development of congestive heart failure. **Circulation**. v. 89, p. 2241-2250, 1994.

OMAR, S.A.; ELSHAFFEY, M.; TOEMA, K.; EL-HOSEINY, R. Diastolic Dysfunction in Septic Patients in Correlation with Renal Function. **Life Science Journal**. v. 9, p. 572-579, 2012.

OSTERBUR, K.; MANN, F.A.; KUROKI, K.; DECLUE, A. Multiple organ dysfunction syndrome in humans and animals. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 28, p. 1141-1151, 2014.

PAIXÃO, N. Sepsis e síndrome da resposta inflamatória sistêmica. In: RABELO, R.C.; CROWE JR., D.T. **Fundamentos de terapia intensiva veterinária em pequenos animais**. 1.ed. Rio de Janeiro: L.F. Livros, 2005, p. 113-126.

PANCOTO, J. A. T.; CORRÊA, P. B. F.; OLIVEIRA-PALEGRIN, G. R.; ROCHA, M. J. A. Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**. v. 138, p. 57-63, 2008.

PAPAIOANNOU, S.; PNEUMATIKOS, I.; MAGLAVERAS, N. Association of heart rate variability and inflammatory response in patients with cardiovascular diseases: current strengths and limitations. **Frontiers in Physiology**. v. 4, p. 1-13, 2013.

PAPAIOANNOU, V. E.; DRAGOUMANIS, C.; THEODOROU, V.; GARGARETAS, C.; PNEUMATIKOS, I. Relation of heart rate variability to serum levels of C-reactive protein, interleukin 6, and 10 in patients with sepsis and septic shock. **Journal of Critical Care**. V. 24, P. 625.e1–625.e7, 2009.

PARKER, M. M.; SHELHAMER, J. H.; BACHARACH, S. L.; GREEN, M. V. ; NATANSON, C.; FREDERICK, T. M.; DAMSKE, B. A.; PARRILLO, J. E. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Annals of Internal Medicine**. v. 100, p. 483-490, 1984.

PARRILLO, J. E.; PARKER, M. M.; NATANSON, C; SUFFREDINI, A. F.; DANNER, R. L.; CUNNION, R. E.; OGNIBENE, F. P. Septic Shock in Humans: Advances in the Understanding of Pathogenesis, Cardiovascular Dysfunction, and Therapy. **Annals of Internal Medicine**. v. 113, p. 227-242, 1990.

PARRILLO, J. Pathogenic mechanism of septic shock. **The New England Journal of Medicine**. v. 238, p. 1471-1477, 1993.

PLAVEC, T.; CELINEK, B.; DOLINAR, K.; PEAR, J.; NEMEC, A.; BUTINAR, J. Haemostasis impairment in bitches with pyometra. **Acta Veterinaria Belgrade**. v. 56, p. 529-540, 2006.

POELAERT, J.; DECLERCK, C.; VOGELAERS, D.; COLARDYN, F.; VISSER, C. A. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. **Intensive Care Medicine**. v. 23, p. 553-560, 1997.

PRETZER, S.D. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: A review. **Theriogenology**. v. 70, p. 359-363, 2008.

PULIDO, J. N.; AFESSA, B.; MASAKI, M.; YUASA, T.; GILLESPIE, S.; HERASEVICH, V.; BROWN, D. R.; OH, J. K. Clinical spectrum, frequency, and significance of myocardial dysfunction in severe sepsis and septic shock. **Mayo Clinic's Proceedings**. v. 87, p. 620-628, 2012.

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

REINHART, K.; BAUER, M.; RIEDEMANN, N. C.; HARTOG, C. S. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 25, p. 609-634, 2012.

REINHART, K.; DANIELS, R.; MACHADO, F. R. O ônus da sepse: uma chamada em apoio ao Dia Mundial da Sepse 2013. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 25, p. 3-5, 2013.

REPESSÉ, X.; CHARRON, C.; VIEILLARD-BARON, A. Evaluation of left ventricular systolic function revisited in septic shock. **Critical Care**. v. 17, p.1-3, 2013.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A.. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nature Reviews Immunology**. v. 8, p. 776-87, 2008.

ROBOTHAM, J. L.; TAKATA, M.; BERMAN, M.; HARASAWA, Y. Ejection fraction revisited. **Anesthesiology**. v. 74, p. 172-183, 1991.

RODWELL, R.L.; TUDEHOPE, D.I. Early diagnosis of neonatal sepsis using a hematologic scoring system. **Journal of Pediatrics**. v. 112, p. 761-767, 1988.

RUDIGER, A.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. **Critical Care Medicine**. v. 35, p. 1599-1608, 2007.

RUSSEL, J.A. Management of sepsis. **The New England Journal of Medicine**. v. 355, p. 1699-1713, 2006.

SABBAH, H. N. Electrical vagus nerve stimulation for the treatment of chronic heart failure. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. v. 78, p. 1-13, 2011.

SAJADIEH, A.; NIELSEN, O. W.; RASMUSSEN, V.; HEIN, H.O.; HANSEN, J.F. C-reactive protein, heart rate variability and prognosis in community subjects with no apparent heart disease. **Journal of Internal Medicine**. v. 260, p. 377-387, 2006.

SALES JÚNIOR, J. A. L.; DAVID, C. M., HATUM, R.; SOUZA, P. C. S. P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C. T. S.; FRIEDMAN, G.; SILVA, O. B.; DIAS, M. D.; KOTERBA, E.; DIAS, F. S.; PIRAS, C.; LUIZ, R. R. Sepse Brasil: Estudo epidemiológico da sepse em unidades de terapia intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 18, p. 9-17, 2006.

SCHMIDT, H.B.; WERDAN, K.; MÜLLER-WERDAN, U. Autonomic dysfunction in the ICU patient. **Current Opinion in Critical Care**. v. 7, p. 314-322, 2001.

SCHOBER, K. E.; HART, T. M.; STERN, J. A.; LI, X.; SAMII, V. F.; ZEKAS, L. J.; SCANSEN, B. A.; BONAGURA, J. D. Detection of congestive heart failure in dogs by Doppler echocardiography. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 24, p. 1358-1368, 2010.

SCHULZ, R.; HEUSCH, G. C-reactive protein: just a biomarker of inflammation or a pathophysiological player in myocardial function and morphology? **Hypertension**. v. 57, p. 151-153, 2011.

SHARSHAR, T.; GRAY, F.; LORIN DE LA GRANDMAISON, G.; HOPKINSON, N. S.; ROSS, E.; DORANDEU, A.; ORLIKOWSKI, D.; RAPHAEL, J. C.; GAJDOS, P.; ANNANE, D. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **The Lancet**. v. 362, p. 1799-1805, 2003.

SILVA, E.; FERNANDES JÚNIOR, C. J.; AKAMINE, N.; SOGOYAR, A. M. C. B.; KNOBEL, E. Sepsis e choque séptico. In: KNOBEL, E. **Condutas no Paciente Grave**. 3.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p. 61-78.

SILVA, E.; PEDRO MDE, A.; SOGOYAR, A. C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C.L.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G.; DE SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C.; DE MATOS, G. F.; BENTO, A. M.; CORRÊA, A. D.; VIEIRA, P. C.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**. v. 8, p. 251-260, 2004.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; GOMES, A. P.; CALIXTOLIMA, L.; VITORINO, R. R.; PEREZ, M. C. A.; MENDONÇA, E. G.; OLIVEIRA, M. G. A.; GELLER, M. Sepsis: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 23, p. 207-216, 2011.

SONG, Z.; CUI, Y.; DING, M.; JIN, H.; GAO, Y. Protective effects of recombinant human brain natriuretic peptide against LPS-Induced acute lung injury in dogs. **International Immunopharmacology**. v. 17, p. 508-512, 2013.

SPAPEN, H. Liver perfusion in sepsis, septic shock, and multiorgan failure. **The anatomical record**. v. 291, p. 714-720, 2008.

STAATZ, A.J.; MONNET, E. SEIM III, H.B. Open peritoneal drainage versus primary closure for the treatment of septic peritonitis in dogs and cats: 42 cases (1993-1999). **Veterinary Surgery**. v. 31, p. 174-180, 2002.

STAHL, T.J.; ALDEN, P. B.; RING, W. S.; MADOFF, R. C.; CERRA, F. B. Sepsis-induced diastolic dysfunction in chronic canine peritonitis. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**. v. 258, p. H625-H633, 1990.

STONE, R. Search for sepsis drugs goes on despite past failures. **Science**. v. 264, p. 364-365, 1994.

SUNG, U.; APPARSUNDARAM, S.; GALLI, A.; KAHLIG, K. M.; SAVCHENKO, V.; SCHROETER, S.; QUICK, M. W.; BLAKELY, R. D. A regulated interaction of syntaxin 1A with the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter establishes catecholamine clearance capacity. **Journal of Neuroscience**. v. 23, p. 1697-1709, 2003.

SZALAI, A.J.; MCCRORY, M.A. Varied biologic functions of C-reactive protein: lessons learned from transgenic mice. **Immunologic Research**. v. 26, p. 279-287, 2002.

TAMAYO, E.; FERNÁNDEZ, A.; ALMANSA, R.; CARRASCO, E.; HEREDIA, M.; LAJO, C.; GONCALVES, L.; GÓMEZ-HERRERAS, J. I.; DE LEJARAZU, R. O.; BERMEJO-MARTIN, J. F. Pro- and anti-inflammatory responses are regulated simultaneously from the first moments of septic shock. **European Cytokine Network**. v. 22, p. 82-87, 2011.

TAVERNIER, B.; GARRIGUE, D.; BOULLE, C.; VALLET, B.; ADNET, P. Myofilament calcium sensitivity is decreased in skinned cardiac fibers of endotoxin-treated rabbits. **Cardiovascular Research**. v. 38, p. 472-479, 1998.

THAYER, J. F. Vagal tone and the inflammatory reflex. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**. v. 76, p. s23-s26, 2009.

TORRES-ROJO, Y. I.; GUTIÉRREZ-BERNAL, J. L.; CASTILLEJOS-ZENTENO, C. F.; MACÍAS-LEÓN, C.; VIVEROS-RENTERÍA, E. Índice de funcionamiento miocárdico global com ecocardiografía Doppler en pacientes com sepsis. **Revista Mexicana de Cardiología**. v. 16, p. 60-64, 2005.

TSUTSUI, H.; MATSUI, K.; KAWADA, N.; HYODO, Y.; HAYASHI, N.; OKAMURA, H.; HIGASHINO, K.; NAKANISHI, K. IL-18 accounts for both TNF-alpha- and Fas ligand-mediated hepatotoxic pathways in endotoxin-induced liver injury in mice. **The journal of Immunology**. v. 159, p. 3961-3967, 1997.

VANDERLEI, L.C.; PASTRE, C. M.; HOSHI, R. A.; CARVALHO, T. D.; GODOY, M.F. Basic notions of heart rate variability and its clinical applicability. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**. v. 24, p. 205-217, 2009.

VARY, T.C.; KIMBALL, S.R. Regulation of hepatic protein synthesis in chronic inflammation and sepsis. **American Journal of Physiology**. v. 262, p. C445-452, 1992.

VERSTEGEN, J.; DHALIWAL, G.; VERSTEGEN-ONCLIN, K. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: Advances in treatment and assessment of future reproductive success. **Theriogenology**. v. 70, p. 364-347, 2008.

VIEILLARD-BARON, A.; SCHMITT, J. M.; BEAUCHET, A.; AUGARDE, R.; PRIN, S.; PAGE, B.; JARDIN, F. Early preload adaptation in septic shock? A transesophageal echocardiographic study. **Anesthesiology**. v. 94, p. 400-406, 2001.

WAPNIR, R. A.; TEICHBERG, S. Regulation mechanisms of intestinal secretion: implications in nutrient absorption. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 13, p. 190-199, 2002.

WEISEL, R.D.; VITO, L.; DENNIS, R. C.; VALERI, C. R.; HECHTMAN, H. B. Myocardial depression during sepsis. **American Journal of Surgery**. v. 133, p. 512-521, 1977.

WEISENSEE, D.; BEREITER-HAHN, J.; SCHOEPE, W.; LÖW-FRIEDRICH, I. Effects of cytokines on the contractility of cultured cardiac myocytes. **International Journal of Immunopharmacology**. v. 15, p. 581-587, 1993.

WENG, L.; LIU, Y. T.; DU, B.; ZHOU, J. F.; GUO, X. X.; PENG, J. M.; HU, X. Y.; ZHANG, S. Y.; FANG, Q.; ZHU, W. L. The prognostic value of left ventricular systolic function measured by tissue Doppler imaging in septic shock. **Critical Care**. v. 16, p. R71, 2012.

YAMAKAWA, K.; MATSUMOTO, N.; IMAMURA, Y.; MUROYA, T.; YAMADA, T.; NAKAGAWA, J.; SHIMAZAKI, J.; OGURA, H.; KUWAGATA, Y.; SHIMAZU, T. Electrical vagus nerve stimulation attenuates systemic inflammation and improves survival in a rat heatstroke model. **Plos One**. v. 8, p. e56728, 2013.

YANG, H.; SONG, Z.; JIN, H.; CUI, Y.; HOU, M.; GAO, Y. Protective effect of rhBNP on intestinal injury in the canine models of sepsis. **International Immunopharmacology**. v. 19, p. 262-266, 2014.

YANG, S.; KOO, D. J.; ZHOU, M.; CHAUDRY, I. H.; WANG, P. Gut-derived norepinephrine plays a critical role in producing hepatocellular dysfunction during early sepsis. **Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 279, p. G1274-G1281, 2000.

YANG, S.; ZHOU, M.; CHAUDRY, I. H.; WANG, P. Norepinephrine-induced hepatocellular dysfunction in early sepsis is mediated by activation of alpha2-adrenoceptors. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**. v. 281, p. G1014-G1021, 2001.

ZHOU, M.; DAS, P.; SIMMS, H. H.; WANG, P. Gut-derived Norepinephrine plays an important role in upregulating IL-1b and IL-10. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1740, p. 446-452, 2005.

ZHOU, M.; HANK SIMMS, H.; WANG, P. Increased gut-derived norepinephrine release in sepsis: up-regulation of intestinal tyrosine hydroxylase. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1689, p. 212-218, 2004.

ZOIS, N. E.; MOESGAARD, S. G.; KJELGAARD-HANSEN, M.; RASMUSSEN, C. E.; FALK, T.; FOSSING, C.; HAGGSTROM, J.; PEDERSEN, H. D.; OLSEN, L. H. Circulating cytokine concentrations in dogs with different degrees of myxomatous mitral valve disease. **The Veterinary Journal**. v. 192, p. 106-111, 2012.

## 9. APÊNDICES

### Valores de referência para parâmetros hematológicos em cães

Parâmetro	Unidade	Intervalo
Hemácias	$\times 10^6/\mu\text{L}$	5,0 - 7,9
Hematócrito	%	35 - 57
Leucócitos totais	$\times 10^3/\mu\text{L}$	5,0 - 14,1
Bastonetes	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0 - 0,45
Linfócitos	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0,4 - 2,9
Monócitos	$\times 10^3/\mu\text{L}$	0,1 - 1,4
Plaquetas	$\times 10^3/\mu\text{L}$	211 - 621

Adaptado de BONAGURA, J. D.; TWEDT, D. C. Kirk's current veterinary therapy XIV. St Louis: Saunders. 2009. 1388 p.

### Valores de referência para parâmetros bioquímicos séricos em cães

Parâmetro	Unidade	Intervalo
Ureia	mg/dL	0 - 24
Creatinina	mg/L	0,7 - 1,4
ALT	u/mL	4 - 90
FA	u/L	3 - 70
Albumina	g/L	2,6 - 4,0
Proteína total	g/L	5,4 - 8,0

Adaptado de BONAGURA, J. D.; TWEDT, D. C. Kirk's current veterinary therapy XIV. St Louis: Saunders. 2009. 1388 p.

### Valores de referência para parâmetros clínicos em cães

Parâmetro	Unidade	Intervalo
Frequência cardíaca	bpm	60 - 160
Frequência respiratória	mpm	24 - 36
Temperatura corpórea	$^{\circ}\text{C}$	38,5 - 39,2

Adaptado de RADOSTITS, O. M.; MAYHEW, I. G. J.; HOUSTON, D. M. Exame clínico e diagnóstico em veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 81.