

# Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca del corazón séptico in situ e in vitro

Paola Contreras<sup>1\*</sup>, Eduardo R. Migliaro<sup>1</sup>, Bruno Suhr<sup>1</sup>

## Resumen

Las oscilaciones normales de la duración del ciclo cardíaco se denominan Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca y están determinadas principalmente por la influencia del sistema nervioso autónomo sobre el nodo sinusal. Una reducción de dicha variabilidad se ha asociado con diversas patologías, incluida la sepsis. Investigamos si la reducción de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en sepsis experimental se debe a cambios intrínsecos del corazón.

Se registró el ECG de ratas antes y después de la inducción de sepsis peritoneal y se aisló el corazón para estudiar su cronotropismo intrínseco (N=22).

La mortalidad de las ratas sépticas fue 23% a las 24 h. Las ratas sépticas presentaron taquicardia y disminuyeron su Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca. El corazón aislado de ratas sépticas presentó una frecuencia cardíaca intrínseca similar al aislado de ratas a las que se les realizó la inducción simulada de sepsis (grupo sham, N=14). La Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca del corazón aislado tampoco discriminó entre corazones sépticos y sham. Por lo tanto, los corazones aislados de ratas sépticas presentan características cronotrópicas similares a los aislados de ratas sham. La Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca in vitro disminuyó con respecto a in situ sólo en los corazones sham. Es decir, considerando la modulación de la frecuencia cardíaca, el corazón séptico in situ se comporta como aislado del sistema nervioso autónomo.

Concluimos que la taquicardia y reducción de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en las ratas sépticas no se deben a cambios intrínsecos del corazón ex vivo.

**Palabras clave:** Sepsis, Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca, taquicardia.

**Title:** Heart Rate Variability of the septic heart in situ and in vitro.

## Abstract

Normal oscillations in cardiac cycle length are known as Heart Rate Variability and are mainly determined by the influence of the Autonomic Nervous System over the sinus node. A reduction of Heart Rate Variability has been associated with many pathologies, including sepsis. We investigated whether the reduction of Heart Rate Variability in sepsis could be caused by changes in intrinsic properties of the heart.

In order to analyze changes in Heart Rate Variability, we recorded the ECG of rats before and after the induction of peritoneal sepsis (N=22) or sham sepsis (N=14). Later, we isolated the hearts for studying their intrinsic chronotropic properties.

Mortality rate was 23% at 24 h for septic rats. Septic rats presented tachycardia and diminished their Heart Rate Variability. The isolated hearts from septic rats had a similar intrinsic heart rate than those from sham rats. Heart Rate Variability in isolated hearts did not distinguish between those from septic or sham rats. Therefore, isolated hearts from septic rats show chronotropic features similar to those from sham rats. Heart Rate Variability values in vitro diminished with respect to in situ only for sham hearts,

1. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina. Universidad de la República, Uruguay.

\* Contacto: Paola Contreras, Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UdelaR - Avenida General Flores 2125, Montevideo 11800, Uruguay. E- mail: [contreras@fmed.edu.uy](mailto:contreras@fmed.edu.uy)

i.e., considering the heart rate modulation, septic hearts in situ behave as isolated from the Autonomic Nervous System.

We conclude that the tachycardia and Heart Rate Variability reduction in septic rats are not due to intrinsic changes of their hearts *ex vivo*.

**Keywords:** Sepsis, Heart Rate Variability, tachycardia

## Introducción

La sepsis es una respuesta sistémica deletérea secundaria a una infección. Su mala evolución conduce a disfunción multiorgánica (sepsis severa) y shock séptico; convirtiéndose en un problema grave de salud por su alta mortalidad e incidencia creciente [1]. En esta patología se ha descrito un aumento de la frecuencia cardíaca (FC) y una disminución de la variabilidad de la frecuencia cardíaca (VFC). En un grupo de pacientes sépticos hemos mostrado que la menor VFC al momento del ingreso a la sala de cuidados intensivos se relacionó con una peor evolución [2]. Concluimos que la menor VFC fue predictora de disfunción multiorgánica y por lo tanto de mortalidad. La reducida VFC en estos pacientes estaría precediendo al diagnóstico clínico de la sepsis severa.

Teóricamente, el aumento de la FC en la sepsis podría deberse a un incremento de la actividad simpática y/o un descenso de la parasimpática. En ratas anestesiadas se comprobó que la inyección de endotoxinas bacterianas (lipopolisacárido, LPS) produjo taquicardia junto con un aumento de la actividad nerviosa simpática registrada a nivel renal [3].

Un aumento del tono simpático podría explicar la reducción de la VFC: si la rama simpática supera ampliamente a la parasimpática, se saturaría el sistema de regulación e imposibilitaría la modulación autonómica de la FC lo cual aislaría al corazón de sus mecanismos de control, impidiendo que el sistema cardiaco se adapte a estímulos internos y externos [4].

Pero a su vez, estas modificaciones en la modulación autonómica podrían deberse no sólo a alteraciones de la actividad del sistema nervioso autónomo (SNA), sino también de la respuesta del corazón a dicha modulación (acoplamiento SNA-nodo sinusal) y/o de las propiedades intrínsecas del marcapaso cardíaco. Se ha reportado que las aurículas derechas aisladas de ratas sépticas tienen una respuesta cronotrópica a la acetilcolina

(ACh) atenuada en comparación con las aurículas controles [5]. Además, se ha descrito que LPS *in vitro* reduce la corriente marcapaso If en miocitos auriculares [6]. Esto se opondría al aumento de la FC observada en sepsis *in vivo*. Los autores explican la controversia por efecto de la liberación masiva de catecolaminas que superaría el efecto directo de LPS sobre If. Más recientemente se ha propuesto que el mecanismo por el cual LPS inhibe la corriente If es la interacción directa con los canales HCN [7] y que la abolición del control de la FC mediante If concomitantemente con una actividad simpática incrementada podrían explicar la reducción de la VFC porque se estrecha el rango de modulación de la FC [8]. También se ha estudiado el rol de las citoquinas en las alteraciones de la VFC. La IL-6 está elevada en sangre dos días antes del diagnóstico clínico de sepsis neonatal [9]. Se ha demostrado en cardiomiocitos neonatales que la IL-6, la IL-1 $\beta$  y el TNF- $\alpha$  aumentan la frecuencia de descarga y bloquean el efecto cronotrópico positivo de la estimulación con isoproterenol [10]. Sin embargo, otros autores han demostrado que la aurícula derecha aislada de ratas en estadios tempranos de sepsis es hipersensible a la acción cronotrópica de los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos [11].

A pesar de la gran cantidad de estudios sobre el tema, los mecanismos que determinan la reducción de la VFC en sepsis aún no están claros.

Nuestro objetivo fue analizar si el corazón de un animal séptico presenta modificaciones intrínsecas de su cronotropismo. Para ello, comparamos la FC y la VFC entre corazones sanos y sépticos *in vitro* (aislados del entorno patológico) y dentro de cada grupo, comparamos los resultados *in situ* con aquellos *in vitro*.

## Materiales y métodos

El protocolo experimental fue aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal

(CHEA) de la Universidad de la República (protocolo A5373-01). Se usaron 36 ratas albinas derivadas de la cepa Wistar. Eran machos adultos ( $13.7 \pm 0.3$  semanas) con un peso inicial de  $306 \pm 5$  g. La comida y el agua estuvieron disponibles ad libitum. El régimen de luz y oscuridad fue el natural. La temperatura ambiente se mantuvo en  $23^\circ\text{C}$ . Estos mismos animales fueron incluidos en un lote mayor analizado en otro artículo científico [12].

Para registrar la actividad eléctrica cardíaca (ECG) de la rata se implantó un transmisor telemétrico (CA-F40, Data Sciences International, MN, Estados Unidos). El mismo se alojó en un bolsillo subcutáneo en el dorso de la rata. Los electrodos se hicieron viajar por un túnel hasta la zona ventral y se suturaron en los músculos pectorales de forma de obtener un registro similar a la derivación DII del ECG convencional. A las 48 h se registró el ECG de 60 min de duración iniciado entre las 8 y 11 AM. Se realizó luego la cirugía para provocar sepsis abdominal (N=22) o la misma cirugía sin las maniobras que inducen la sepsis (ratas sham, N=14). Se volvió a registrar el ECG a las 24 h. En algunas ratas (N=12), el protocolo también incluyó el registro del ECG a las 48 h. Luego del último registro del ECG, se aisló el corazón para el estudio *in vitro*. Se registró la actividad eléctrica espontánea del corazón aislado. Se procesaron los registros y se obtuvieron los valores de FC e índices de VFC.

Para todos los procedimientos quirúrgicos se usó anestesia inhalatoria (VetEquip Incorporated, CA, EEUU) con isoflurano (Forane, Abbott, Uruguay).

### Análisis de la VFC de la rata (*in vivo*)

El transmisor telemétrico permitió registrar el ECG de la rata consciente sin restricción del movimiento colocando la caja en la que estaba alojado el animal sobre la bandeja receptora de las señales de radiofrecuencia. La bandeja se conectó con una tarjeta conversora analógica/digital (1208 FS Measurement Computing, Norton, Massachusetts, EEUU) la que permitió adquirir la señal a una frecuencia de muestreo de 1KHz durante 60 min, con un programa escrito en DasyLab. Una vez finalizado el protocolo experimental se realizó la eutanasia de la rata y se extrajo el transmisor. Antes de reutilizarlo se esterilizó con glutaraldehído al 2%.

Los registros adquiridos en formato numérico se analizaron "off line". Se importó el archivo con el programa Spike2 (version 6.07, Cambridge

Electronic Design, Cambridge, Reino Unido). Se ubicó un cursor horizontal de forma tal que sólo fuera superado por las ondas R y se realizó la detección automática de las mismas. El programa midió el tiempo entre las detecciones y generó una lista de intervalos RR que se exportó como un archivo de texto. El programa VFC32 filtró automáticamente la lista de intervalos RR [13] y calculó diversos índices de VFC. Se seleccionaron la FC (inversa del intervalo RR promedio) y tres índices de VFC estadísticos: SDNN (desvío estándar de todos los intervalos RR normales), RMSSD (misma fórmula que el desvío estándar pero calculando la diferencia entre intervalos sucesivos) y CV (coeficiente de variación:  $\text{SDNN}/\text{RR} \times 100$ ).

### Inducción de sepsis por ligadura del ciego e infección

Uno de los modelos de inducción de sepsis más utilizado es la ligadura y perforación del ciego (CLP) [14]. Sin embargo, en nuestros experimentos usamos un modelo original de contaminación endógena que combina la ligadura del ciego descrita en la CLP con el inóculo cecal descrito por Chopra y col. [15]. Esta modificación incrementó la severidad de la agresión, lo cual aumentó la mortalidad del modelo y el porcentaje de ratas que redujeron la VFC a valores anormales [16]. Al modelo utilizado le llamamos CLF (ligadura del ciego e inóculo fecal). Otros investigadores también ensayaron la combinación de ligadura cecal e infección pero inyectando E.Coli [17].

Se hizo una incisión abdominal longitudinal de la piel y el músculo de aproximadamente 3 cm de largo en la línea media. Se localizó el ciego y se ligó por debajo de la válvula ileocecal para no impedir la comunicación entre el intestino delgado y grueso. Se realizó una segunda ligadura de forma de dividir el ciego a la mitad. Se volvió a ubicar el ciego en la cavidad peritoneal sin perforarlo y se derramó la solución fecal antes de cerrar la herida. La solución fecal se preparó con suero fisiológico estéril (300 mg/5 ml) y se administró en dosis de 300 mg/kg. Finalmente, se suturó el músculo abdominal y se cerró la herida de la piel con agrafes.

Para analizar los efectos de la sepsis, los animales sépticos fueron comparados con animales a los cuales se les realizó la cirugía abdominal descrita arriba pero incluyendo únicamente la manipulación

del ciego sin la ligadura ni la infección (inducción simulada de sepsis, ratas sham). Sólo se administró un volumen equivalente de solución salina estéril en la cavidad abdominal.

### Análisis de la VFC del corazón aislado de rata (in vitro)

El modelo de corazón aislado permite la evaluación de la performance cardíaca intrínseca sin la influencia de factores externos tales como la respiración y el sistema nervioso central, hormonas circulantes, o reflejos nerviosos de los baro-receptores del seno carotídeo y la aorta [4].

Brevemente, se abrió el tórax cortando la parrilla costal desde el centro hacia ambos lados. Se aisló el corazón y se perfundió en forma retrógrada mediante una cánula colocada en la aorta (técnica de Langendorff, [18]). La perfusión se realizó a velocidad constante (9 ml/min) con solución Tyrode mantenida a 37°C, en mmol/l: NaCl 140; KCl 5.4; MgCl<sub>2</sub> 1; CaCl<sub>2</sub> 2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.33; glucosa 10 y HEPES 10. El pH se ajustó previamente a 7.4. La solución se burbujeó con O<sub>2</sub> al 100 %.

Se dejó estabilizar el corazón durante 20 min y luego se registró la actividad eléctrica espontánea mediante un electrodo ubicado en la aurícula derecha y otro en el cono de la arteria pulmonar. La señal eléctrica se amplificó usando un amplificador Tecnomed (Montevideo, Uruguay), un conversor A/D LabMaster (Scientific Solutions Inc. OH, EEUU) y el software Axotape (Axon Instruments Inc. CA, EEUU). La frecuencia de muestreo fue de 500 Hz. Se importaron los archivos de los registros con Spike2 y se procesaron de forma similar a como se describió para los registros del ECG del animal consciente. Se consideraron los 4 min posteriores a la estabilización para calcular la FC basal y los índices de VFC.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico y los gráficos se hicieron con GraphPad Prism (versión 6.00, GraphPad Software, La Jolla, CA, EEUU). Se utilizaron tests no-paramétricos y se consideraron significativos los valores de P de 2 colas < 0.05.

Las comparaciones entre dos valores obtenidos del mismo animal se hicieron con el test de Wilcoxon para medidas pareadas. Las comparaciones entre grupos se hicieron con el test de Mann-Whitney.

Los valores se expresan como la media ± el error estándar de la media (SEM).

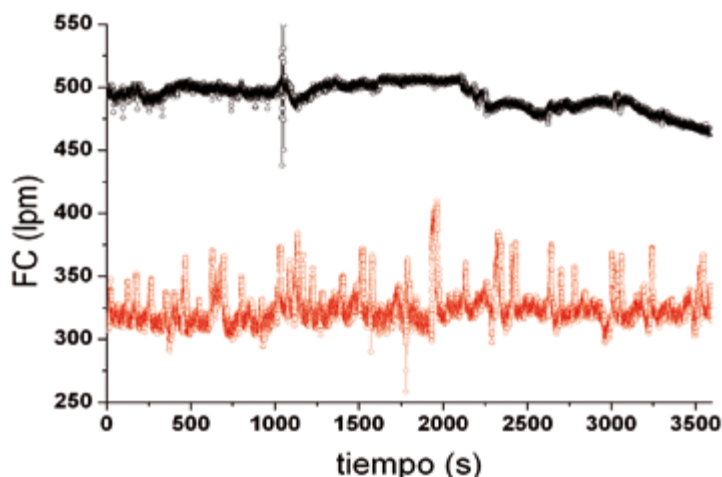
### Resultados y discusión

En las ratas sham la mortalidad fue 0% y en las sépticas 23% al otro día de inducir la sepsis y 38% a las 48 h. Las ratas sépticas dejaron de ingerir alimento. Sus necropsias mostraron: abdomen hinchado, cavidad peritoneal con fluido oscuro, ciego gangrenoso y órganos abdominales adheridos entre sí. Las necropsias de las ratas sham no mostraron estos cambios.

Al otro día de la inducción de la sepsis, las ratas sépticas aumentaron su FC en relación al valor del día anterior ( $407 \pm 14$  lpm vs.  $319 \pm 6$  lpm, N=17, P<0.0001) o al valor de las ratas sham ( $326 \pm 8$  lpm, N=14, P<0.0001), el cual se mantuvo incambiado ( $327 \pm 8$  lpm el día previo a la inducción simulada de la sepsis). Además, las ratas sépticas disminuyeron su VFC al otro día de la inducción de sepsis. Los índices de VFC presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los valores previos a la inducción de sepsis con los valores a las 24 h: el SDNN disminuyó de  $12.7 \pm 0.9$  a  $5.0 \pm 0.8$  ms (P<0.0001), el RMSSD de  $3.6 \pm 0.2$  a  $2.3 \pm 0.3$  ms (P<0.01) y el CV pasó de  $6.7 \pm 0.5$  a  $3.2 \pm 0.4$  % (P<0.001). Dentro del grupo sham, las comparaciones pareadas generaron valores de P >0.05 salvo en el caso del SDNN que mostró un aumento estadísticamente significativo (P=0.034). Este aumento de la VFC podría ser una respuesta compensadora al estrés generado por la cirugía y resalta aún más la reducción hallada en el grupo séptico. La figura 1 muestra los tacogramas antes y después de la inducción de sepsis para una rata representativa del grupo séptico.

Cuando se aislaron los corazones y se hicieron las comparaciones entre los grupos sham y séptico, se comprobó que no presentaron diferencias estadísticamente significativas en la FC ni en ninguno de los índices de VFC evaluados. Es decir, en el corazón aislado se perdieron las diferencias encontradas entre los corazones in situ de las ratas sépticas y sham. La figura 2 muestra los valores de FC y VFC en los corazones aislados para cada una de las ratas de los grupos sham y séptico.

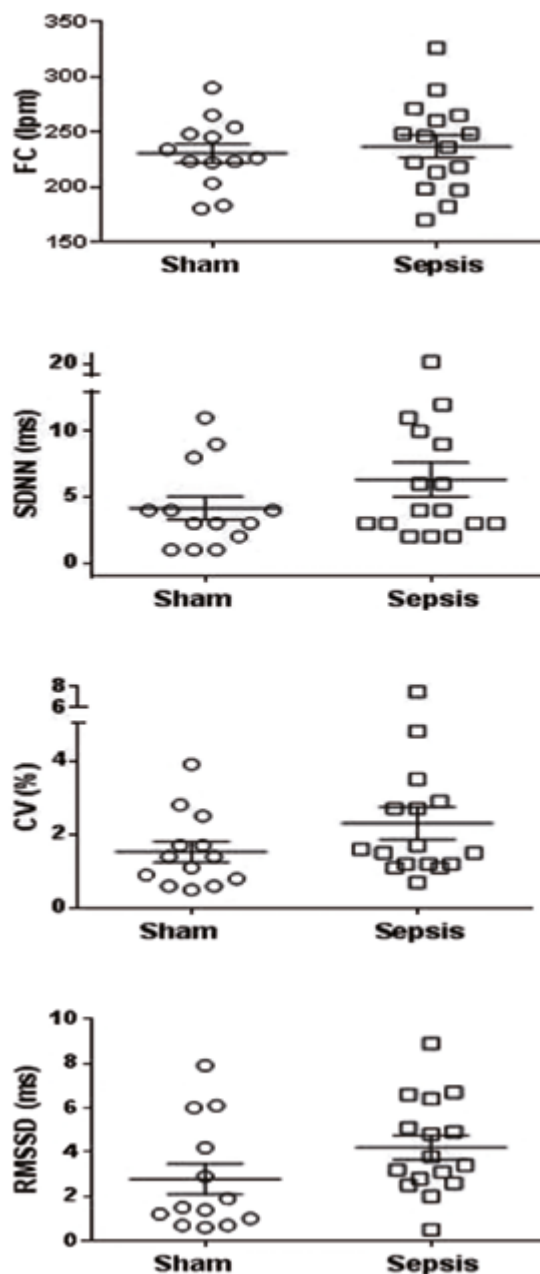
La ausencia de taquicardia en el corazón aislado de ratas sépticas muestra que el incremento de la FC en la sepsis requiere las condiciones presentes



**Figura 1.** Tacogramas antes y después de la inducción de sepsis. Los valores de SDNN son: antes de la inducción de sepsis 7 ms (rojo) y después 3 ms (negro). El ECG se realizó a las 24 h de la inducción de la sepsis y la rata murió 15 min después.

en el organismo séptico, por ejemplo, los niveles de catecolaminas elevados y/o de otros mediadores de la inflamación [19]. En apoyo de esto podemos decir que, en otro grupo de ratas sépticas mediante CLF encontramos valores de noradrenalina plasmática mayores en comparación con las ratas sham [12]. Otros investigadores reportaron una FC basal aumentada en corazones y aurículas derechas aislados de ratas sépticas que presentaron taquicardia in situ y niveles plasmáticos de catecolaminas elevados [20]. Muchos factores más podrían determinar la taquicardia in vivo pero no fueron evaluados en el presente trabajo. En otras ratas anestesiadas, no incluidas en este estudio, registramos la temperatura rectal antes y después de la inducción de sepsis. Detectamos un aumento de la temperatura en las ratas sépticas ( $36.5 \pm 0.1$  °C vs.  $37.2 \pm 0.2$  °C;  $N=15$ ;  $P=0.002$ ) [16]. La temperatura registrada podría estar subestimada por haberla medido en las ratas anestesiadas pero, de todas formas, no parece ser suficiente para explicar por sí sola los cambios encontrados en la FC. Además, no hallamos una correlación entre los valores de temperatura y la FC. Los resultados de otros investigadores en ratones y ratas han argumentado a favor de mecanismos más complejos para explicar las alteraciones producidas por LPS sobre el control de la FC que las producidas como simples consecuencias de los cambios de temperatura [21,22].

El efecto inhibitorio de LPS sobre la corriente marcapaso por interacción directa con los canales



**Figura 2.** Frecuencia cardíaca e índices de VFC en los corazones aislados. Se muestra el valor obtenido en cada uno de los corazones aislados de las ratas sham (círculos,  $N=13$ ) y sépticas (cuadrados,  $N=16$ ). Las barras horizontales muestran la media  $\pm$  SEM para cada grupo.

HCN que ha sido descrito por otros autores [7] estaría en desacuerdo con la igualdad de FC encontradas en los corazones aislados de ratas sépticas y sham de nuestro trabajo o podría especularse que dicho efecto sería reversible al perfundir los corazones con solución fisiológica sin endotoxina como en nuestro protocolo experimental. Hubiera sido interesante desafiar los corazones aislados con LPS para analizar este punto.

	Grupo Sham, N=13			Grupo Séptico, N=16		
	In situ	In vitro	P	In situ	In vitro	P
FC (lpm)	322	231	***	414	237	****
SDNN (ms)	14	4	**	6	6	Ns
CV (%)	8	2	***	2	3	Ns
RMSSD (ms)	3	3	Ns	2	4	*

**Tabla 1.** Frecuencia Cardíaca y Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca in situ e in vitro.

La FC basal de los corazones aislados de ratas sépticas ( $237 \pm 10$  lpm) y sham ( $231 \pm 9$  lpm) fue menor que la FC que presentaron in situ antes de la inducción de la sepsis. Lo mismo han descrito otros autores [23]. Por ejemplo, Riascos y col. definieron la FC normal in vivo en ratas en valores cercanos a los 300 lpm y la FC espontánea del corazón aislado entre 200 y 250 lpm [18]. Esto podría estar evidenciando un tono simpático dominante en roedores, a diferencia de lo que ocurre en el ser humano [24].

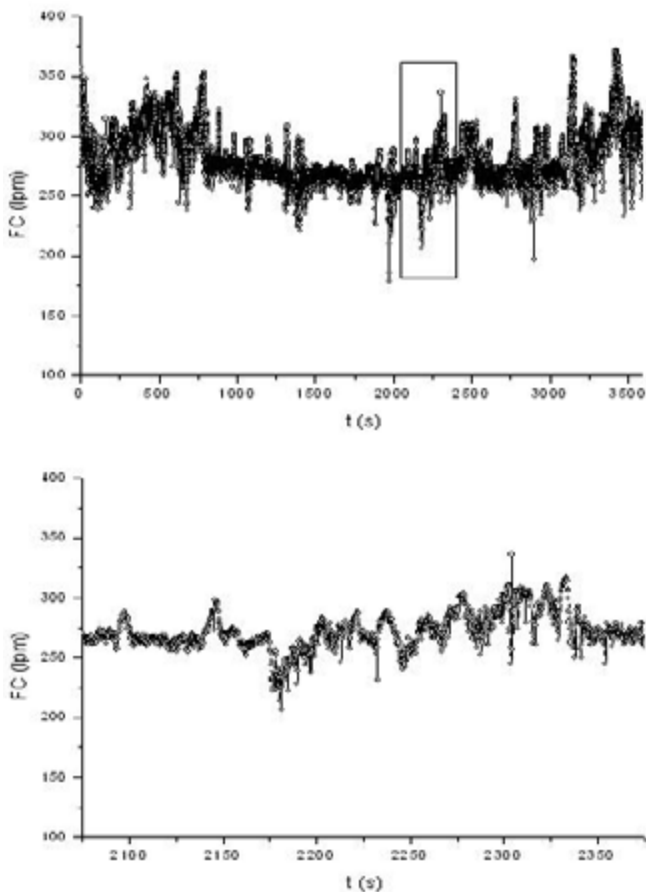
El comportamiento de la VFC de los corazones aislados en los grupos sham y séptico, evidenció una diferencia entre ambos grupos: los corazones de las ratas sham disminuyeron su VFC (SDNN y CV) al aislarlos mientras que los corazones de las ratas sépticas no lo hicieron (tabla 1). Por ejemplo, el SDNN de las ratas sham (N=13) se redujo de  $14.2 \pm 1.0$  ms in situ a  $4.2 \pm 0.9$  ms in vitro (P=0.0005). Este descenso era esperado por el hecho de aislar al corazón de la influencia del SNA, principal determinante de la VFC. Sin la influencia del SNA ni del sistema endócrino, la VFC dependería exclusivamente de la variabilidad del nodo sinusal (y eventualmente de variaciones cíclicas en el flujo de perfusión y la temperatura) [25]. El hecho que la VFC no haya cambiado en los corazones sépticos en ambas situaciones (SDNN =  $5.5 \pm 0.9$  vs.  $6.3 \pm 1.3$ , N=16) sugiere la ausencia de modulación autonómica de la FC in situ.

El RMSSD en el corazón aislado tampoco diferenció a ambos grupos aunque este índice se mantuvo sin cambios en el grupo sham al aislar el corazón ( $2.8 \pm 0.7$  vs.  $3.2 \pm 0.3$  ms in situ e in vitro, respectivamente; N=13). El mismo valor de RMSSD ocurre para FC menores en el corazón aislado a pesar de que la mayor duración de los

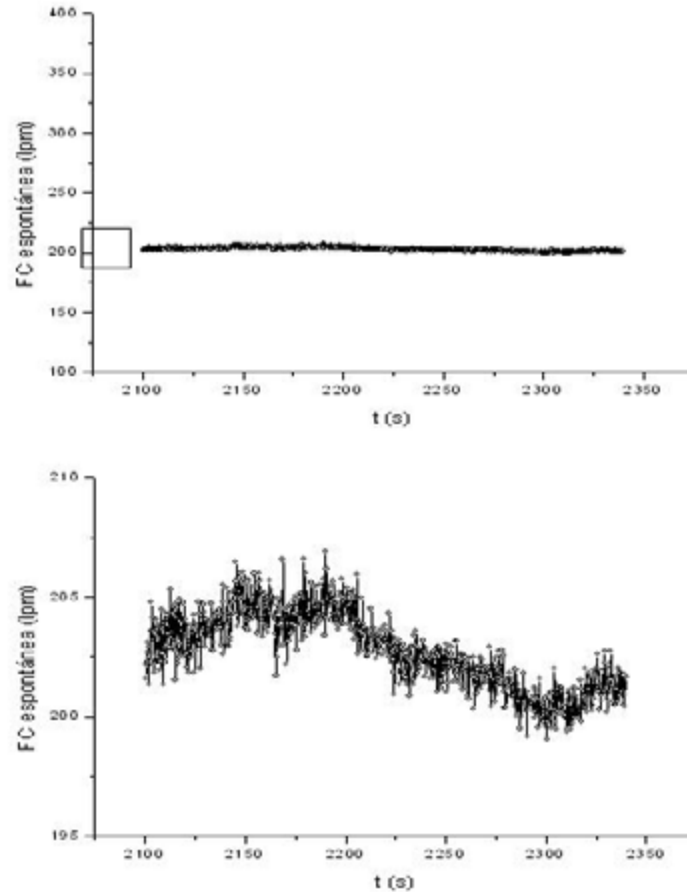
intervalos RR podría determinar un aumento de las diferencias entre ellos. El hecho que se mantuviera igual a pesar del aumento del valor del intervalo RR sugeriría una VFC disminuida en estas condiciones. Sin embargo, en el grupo séptico, se produjo un aumento estadísticamente significativo del RMSSD al aislar el corazón ( $4.2 \pm 0.5$  vs.  $2.3 \pm 0.3$  ms, P= 0.025). Este resultado podría explicarse por lo dicho anteriormente (mayor intervalo RR dada la menor FC del corazón aislado) o podría estar evidenciando una irregularidad patológica del nodo sinusal séptico, que in situ sería completamente superada por la influencia simpática. Schmidt et al. describieron reducción de la VFC en cardiomiocitos aislados de ratas neonatas en presencia de endotoxina [26].

Una limitación para comparar los valores de VFC entre las situaciones in situ e in vitro es la diferencia en el tiempo considerado para el cálculo de los índices de VFC: 60 vs. 4 min, respectivamente. El menor tiempo de análisis disminuiría los índices de VFC afectados por la duración del registro (por ejemplo, SDNN) pero esto ocurriría en ambos grupos. La mayor VFC in situ en las ratas sham puede apreciarse gráficamente, incluso tomando un período de pocos minutos, tal como lo muestran los gráficos de las figuras 3 y 4 para una rata sham y su corazón aislado, respectivamente.

Especulamos que la ausencia de modulación de la FC por el SNA en las ratas sépticas se debe a un desequilibrio autonómico con dominancia simpática no sólo por hiperactivación simpática sino por disfunción vagal. La hiperactivación simpática la demostramos indirectamente en otro estudio, al encontrar un aumento de la concentración plasmática de noradrenalina en ratas sépticas [12]. El déficit colinérgico en la aurícula derecha fue sugerido indirectamente en esas mismas ratas por la menor concentración de colina, precursor y metabolito de la ACh [12]. El desequilibrio autonómico implicaría peor pronóstico por al menos dos posibles razones. Primero, los efectos deletéreos de la sobreexcitación del sistema nervioso simpático sobre el organismo no serían reducidos por la acción parasimpática [27]. Además, el déficit colinérgico afectaría la regulación de la respuesta inflamatoria que podría descontrolarse y convertirse en más perjudicial para el organismo que los propios patógenos [28]. Varias medidas terapéuticas investigadas



**Figura 3.** Tacograma de una rata sham con distintas duraciones. Arriba se muestra el tacograma con una duración de 60 min y abajo sólo un sector de 5 min. Los valores de FC y VFC de los corazones in situ se calculan considerando los 60 min de registro. En este ejemplo: FC= 281 lpm, SDNN= 16 ms, CV= 7% y RMSSD= 5 ms.



**Figura 4.** Tacograma del corazón aislado de una rata sham con distintas escalas en las ordenadas. Se muestran los tacogramas con una duración de 4 min (tiempo considerado para el cálculo de FC y VFC de los corazones in vitro). A pesar que se observa un tacograma plano al usar la misma escala de la figura 3 en el eje de ordenadas, se puede apreciar que existe VFC cuando se modifica la escala como en el gráfico de abajo o cuando se calculan los índices de VFC: FC= 203 lpm, SDNN= 2 ms, CV= 0.8% y RMSSD= 1.5 ms.

recientemente están de acuerdo con este concepto [29, 30]. Por ejemplo, Setoguchi y col. publicaron que la inyección de un inhibidor de la acetilcolinesterasa después de la CLP en ratas, evitaba la reducción de la VFC y atenuaba el incremento en los niveles séricos de catecolaminas y citoquinas [31] aunque la tasa de supervivencia no mejoró. Kojima y col. reportaron efectos beneficiosos del tratamiento con nicotina en ratas inyectadas con LPS aunque en todos los casos iniciaron el tratamiento previamente a la inyección de LPS [32]. También se ha evaluado como maniobra terapéutica el bloqueo de receptores adrenérgicos  $\beta$ -1 [33, 34].

Otros autores han propuesto que la reducción de la VFC en sepsis se explicaría por la refractariedad del corazón a los neurotransmisores autonómicos [5]. Sin embargo, ellos analizaron la respuesta cronotrópica de la aurícula aislada y lo hicieron 5 h

después de la inyección de LPS. Aunque no se presentan en este artículo, nuestros corazones aislados fueron expuestos a dosis crecientes de noradrenalina y ACh y su respuesta cronotrópica fue igual o incluso mayor, en el caso de la ACh, en comparación con los corazones aislados sham [12]. La hipersensibilidad a la ACh en el corazón aislado séptico podría evidenciar la respuesta compensadora a un déficit colinérgico in situ.

El principal resultado de nuestro trabajo, es decir, ausencia de diferencias cronotrópicas (FC y VFC) entre el corazón aislado séptico y sham, está de acuerdo con otro publicado recientemente [35]. Esos autores tampoco encuentran diferencias al analizar la FC y la VFC de corazones aislados luego

de 3 h de haber inyectado a las ratas LPS o solución salina. Sin embargo, en esa investigación incluyen un análisis estadístico novedoso que les permite detectar en la serie temporal de los corazones aislados endotoxémicos, una “memoria” más duradera que podría explicar la menor VFC in situ.

### Conclusiones

Aunque las ratas sépticas presentan taquicardia y VFC reducida, sus corazones aislados tienen FC espontánea y valores de VFC similares a los de las ratas sham. Para llegar a dicha situación, los corazones aislados de las ratas sham disminuyeron su FC y su VFC. En cambio, los corazones aislados de ratas sépticas disminuyeron mucho más su FC sin cambios en su VFC. Por lo tanto, la VFC del corazón aislado séptico es igual in vitro e in situ lo que estaría evidenciando la falta de modulación autonómica in situ. Concluimos que la taquicardia y la reducción de la VFC en las ratas sépticas no se deben a cambios intrínsecos del corazón ex vivo.

### Agradecimientos

A PEDECIBA y CSIC (I+D 2008) por el apoyo financiero. A Edith Moraes por su asistencia técnica.

### Referencias

- Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, et al. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med*. 2013 Feb;41(2):580-637
- Pontet J, Contreras P, Curbelo A, Medina J, Noveri S, Bentancourt S, et al. Heart rate variability as early marker of multiple organ dysfunction syndrome in septic patients. *J Crit Care*. 2003 Sep;18(3):156-63
- Vayssettes-Courchay C, Bouysset F, Verbeuren TJ. Sympathetic activation and tachycardia in lipopolysaccharide treated rats are temporally correlated and unrelated to the baroreflex. *Auton Neurosci*. 2005 Jun 15;120(1-2):35-45.
- Schumacher AM, Zbilut JP, Webber CL Jr, Schwertz DW, Piano MR. Detection of cardiac variability in the isolated rat heart. *Biol Res Nurs* 2006 Jul;8(1):55-66.
- Gholami M, Mazaheri P, Mohamadi A, Delpour T, Safari F, Hajizadeh S, et al. Endotoxemia is associated with partial uncoupling of cardiac pacemaker from cholinergic neural control in rats. *Shock*. 2012 Feb;37(2):219-27.
- Zorn-Pauly K, Pelzmann B, Lang P, Machler H, Schmidt H, Ebel H, et al. Endotoxin impairs the human pacemaker current *I<sub>f</sub>*. *Shock*. 2007 Dec;28(6):655-61.
- Klockner U, Rueckschloss U, Grossmann C, Matzat S, Schumann K, Ebel H, et al. Inhibition of cardiac pacemaker channel hHCN2 depends on intercalation of lipopolysaccharide into channel-containing membrane microdomains. *J Physiol*. 2014 Mar 15;592(Pt 6):1199-211.
- Barbuti A, DiFrancesco D. The ‘funny’ side of sepsis. *J Physiol*. 2014 Mar 15;592(Pt 6):1171.
- Kuster H, Weiss M, Willeitner AE, Detlefsen S, Jeremias I, Zbojan J, et al. Interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis 2 days before clinical manifestation. *Lancet*. 1998 Oct 17;352(9136):1271-7.
- Oddis CV, Finkel MS. Cytokines and nitric oxide synthase inhibitor as mediators of adrenergic refractoriness in cardiac myocytes. *Eur J Pharmacol*. 1997 Feb 12;320(2-3):167-74.
- Barker LA, Winbery SL, Smith LW, McDonough KH. Supersensitivity and changes in the active population of beta adrenoceptors in rat right atria in early sepsis. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990 Feb;252(2):675-82.
- Contreras P, Migliaro ER, Suhr B. Right atrium cholinergic deficit in septic rats. *Auton Neurosci* 2014 Feb;180:17-23.
- Machado A, Migliaro ER, Contreras P, Coro F. Automatic filtering of R-R intervals for heart rate variability analysis. *Ann Noninvasive Electrocardiol*. 2000;5(3):255-61.
- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland ki, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005 Dec;24 Suppl 1:52-7.
- Chopra M, Sharma AC. Distinct cardiodynamic and molecular characteristics during early and late stages of sepsis-induced myocardial dysfunction. *Life Sci*. 2007 Jul 4;81(4):306-16.
- Contreras P. Reducción de la variabilidad de la frecuencia cardíaca en sepsis experimental: explicaciones desde el corazón. [Tesis no publicada]. Montevideo; 2013. [citada 2014 jul 7].



- Disponibile en: <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/biol/uy24-16722.pdf>
17. Ninkovic MB, Malicevic ZM, Jelenkovic A, Dukic MM, Jovanovic MD, Stevanovic ID. Nitric oxide synthase inhibitors partially inhibit oxidative stress development in the rat brain during sepsis provoked by cecal ligation and puncture. *Gen Physiol Biophys*. 2009;28 (Special Issue):243-50.
  18. Riascos Bernal D, Baltaxe E, Pascual G. La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. *Universitas Médica*. 2004;45(3):111-7.
  19. Takayama K, Yuhki K, Ono K, Fujino T, Hara A, Yamada T, et al. Thromboxane A2 and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia. *Nat Med*. 2005 May;11(5):562-6. Epub 2005 Apr 17.
  20. Smith LW, Winbery SL, Barker LA, McDonough KH. Cardiac function and chronotropic sensitivity to beta-adrenergic stimulation in sepsis. *Am J Physiol*. 1986 Aug;251(2 Pt 2):H405-12.
  21. Fairchild KD, Saucerman JJ, Raynor LL, Sivak JA, Xiao Y, Lake DE, et al. Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009 Oct;297(4):R1019-27.
  22. Mazloom R, Eftekhari G, Rahimi M, Khori V, Hajizadeh S, Dehpour AR, et al. The role of alpha7 nicotinic acetylcholine receptor in modulation of heart rate dynamics in endotoxemic rats. *PLoS One* [Internet]. 2013 Dec 10 [citada 2014 jul 7];8(12):e82251 [cerca 12p.]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3858293/>
  23. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. Isolated heart perfusion according to Langendorff--still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2007 Mar-Apr;55(2):113-26. Epub 2006 May 26.
  24. Mabe AM, Hoover DB. Structural and functional cardiac cholinergic deficits in adult neurturin knockout mice. *Cardiovasc Res*. 2009 Apr 1;82(1):93-9.
  25. Langer SF, Lambert M, Langhorst P, Schmidt HD. Interbeat interval variability in isolated working rat hearts at various dynamic conditions and temperatures. *Res Exp Med (Berl)*. 1999 Jul;199(1):1-19.
  26. Schmidt H, Saworski J, Werdan K, Muller-Werdan U. Decreased beating rate variability of spontaneously contracting cardiomyocytes after co-incubation with endotoxin. *J Endotoxin Res*. 2007;13(6):339-42.
  27. Fairchild KD, O'Shea TM. Heart rate characteristics: physiomarkers for detection of late-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol*. 2010 Sep;37(3):581-98.
  28. Tracey KJ. The inflammatory reflex. *Nature*. 2002 Dec 19-26;420(6917):853-9.
  29. Huang J, Wang Y, Jiang D, Zhou J, Huang X. The sympathetic-vagal balance against endotoxemia. *J Neural Transm*. 2010 Jun;117(6):729-35.
  30. Song JG, Li HH, Cao YF, Lv X, Zhang P, Li YS, et al. Electroacupuncture improves survival in rats with lethal endotoxemia via the autonomic nervous system. *Anesthesiology*. 2012 Feb;116(2):406-14.
  31. Setoguchi D, Yatsuki H, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, Watanabe E, et al. Effects of a peripheral cholinesterase inhibitor on cytokine production and autonomic nervous activity in a rat model of sepsis. *Cytokine*. 2012 Feb;57(2):238-44.
  32. Kojima H, Ito K, Tsubone H, Kuwahara M. Nicotine treatment reduces LPS-induced sickness responses in telemetry monitoring rats. *J Neuroimmunol*. 2011 May;234(1-2):55-62.
  33. Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, Poputnikov D, et al. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med*. 2010 Feb;38(2):388-94.
  34. Novotny NM, Lahm T, Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, Wang Y, et al. Beta-Blockers in Sepsis: Reexamining the Evidence. *Shock*. 2009 Feb;31(2):113-9.
  35. Mazloom R, Shirazi AH, Hajizadeh S, Dehpour AR, Mani AR. The effect of endotoxin on the controllability of cardiac rhythm in rats. *Physiol Meas*. 2014 Mar;35(3):339-49.