

PEDECIBA
ÁREA BIOLOGÍA
Subárea Ciencias Fisiológicas

Reducción de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en sepsis experimental: explicaciones desde el corazón.

Trabajo para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas

Magíster Paola Contreras Chahinian

Director: Dr. Eduardo R. Migliaro

Co-director: Dr. Ruben Budelli

Montevideo

XII 2013

AGRADECIMIENTOS

- A la Comisión de Admisión y Seguimiento: Dres. Eduardo R. Migliaro (director), Ruben Budelli (co-director), Omar Macadar, Carlos Romero y el difunto Luis Eduardo Folle.
- A la miembro del tribunal que no formó parte de la Comisión de Admisión y Seguimiento: Dra Mónica Brauer.
- Al Dr. Julio Pontet por introducir el tema de la sepsis en el laboratorio de Fisiología Cardiovascular.
- Al Dr. Javier Hurtado por dirigirme a Mariana Seija y Cecilia Baccino para que me enseñaran la técnica de inducción de sepsis y a ellas por hacerlo con tanta generosidad (Departamento de Fisiopatología, Hospital de Clínicas, Facultad de Medicina, UdelaR).
- A Pedro Yunis por su desinteresada donación de los filtros para la anestesia inhalatoria y a la Fundación Manuel Pérez por recibirla.
- Al Laboratorio de Oncología Básica y Biología Molecular (LOBBM, Facultad de Medicina, UdelaR) por compartir sus tanques de nitrógeno líquido.
- A la Dra. Graciela Borthagaray y Lic. Ana Ingold (Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Química, UdelaR) por realizar los hemocultivos.
- A los integrantes del Departamento de Fisiología y en particular, del Laboratorio de Fisiología Cardiovascular, por su apoyo durante todo este tiempo; en particular a Edith Moraes por su asistencia técnica incondicional y a Bruno Suhr por su trabajo entusiasta y profesional.
- Al Dr. Ariel Escobar por su contagiosa pasión por la ciencia.
- A PEDECIBA por otorgarme la beca de Doctorado.
- A CSIC por financiar este proyecto (I+D 2008).

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	III
ÍNDICE.....	IV
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABLAS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMEN	IX
DEDICATORIA	XI
INTRODUCCIÓN	- 2 -
MATERIALES Y MÉTODOS	- 28 -
EXPERIMENTO 1	- 43 -
EXPERIMENTO 2	- 62 -
EXPERIMENTO 3	- 82 -
CONCLUSIÓN GENERAL.....	- 94 -
PERSPECTIVAS	- 98 -
REFERENCIAS	- 100 -

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. SISTEMA DE CONDUCCIÓN CARDÍACO	- 3 -
FIGURA 2. POTENCIALES DE ACCIÓN MARCAPASO.	- 4 -
FIGURA 3. MECANISMOS CELULARES DE LOS NEUROTRANSMISORES AUTONÓMICOS.	- 7 -
FIGURA 4. REFLEJO INFLAMATORIO.	- 17 -
FIGURA 5. REFLEJO INFLAMATORIO Y VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDÍACA.	- 25 -
FIGURA 6. TRANSMISOR TELEMÉTRICO PARA REGISTRAR LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA CARDÍACA <i>IN SITU</i>	- 28 -
FIGURA 7. UBICACIÓN DEL TRANSMISOR Y LOS ELECTRODOS EN LA RATA PARA REGISTRAR EL ECG.	- 30 -
FIGURA 8. ELECTRODO PARA EL REGISTRO DEL ECG.	- 30 -
FIGURA 9. ECG DE UNA RATA CONSCIENTE.	- 33 -
FIGURA 10. VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDIACA EN RATAS A LO LARGO DE UNA SEMANA.	- 34 -
FIGURA 11. UBICACIÓN DE LAS LIGADURAS DEL CIEGO.	- 37 -
FIGURA 12. ESQUEMA DEL NÚMERO DE ANIMALES UTILIZADOS: LOTE 1.	- 45 -
FIGURA 13. CAMBIOS EN LA FC Y LA VFC EN LOS GRUPOS SHAM Y SÉPTICO.	- 49 -
FIGURA 14. CAMBIOS EN LA FC Y LA VFC DE LOS GRUPOS SEPARADOS SEGÚN EL MODELO DE INDUCCIÓN DE SEPSIS.	- 49 -
FIGURA 15. TACOGRAMAS ANTES Y DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DE SEPSIS (EJEMPLO 1).	- 52 -
FIGURA 16. TACOGRAMAS ANTES Y DESPUÉS DE LA INDUCCIÓN DE SEPSIS (EJEMPLO 2).	- 53 -
FIGURA 17. GRÁFICOS DE POINCARÉ ANTES Y DESPUÉS DE INDUCIR SEPSIS (EJEMPLOS 1 Y 2).....	- 54 -
FIGURA 18. DISTRIBUCIÓN NORMAL DE LOS VALORES DE SDNN EN RATAS.	- 56 -
FIGURA 19. TACOGRAMAS DE TRES RATAS SÉPTICAS GRAVEMENTE ENFERMAS.	- 58 -
FIGURA 20. FRECUENCIA CARDÍACA BASAL E ÍNDICES DE VFC EN LOS CORAZONES AISLADOS.	- 63 -
FIGURA 21. TACOGRAMAS DE UNA RATA SHAM CON DISTINTAS DURACIONES.	- 67 -
FIGURA 22. TACOGRAMAS DEL CORAZÓN AISLADO DE UNA RATA SHAM CON DISTINTAS ESCALAS.	- 68 -
FIGURA 23. TACOGRAMA DE UN CORAZÓN AISLADO EN RESPUESTA A LA NORADRENALINA.	- 70 -
FIGURA 24. CURVA DOSIS-RESPUESTA PARA LA NORADRENALINA EN UN CORAZÓN AISLADO.	- 71 -
FIGURA 25. RESPUESTA CRONOTRÓPICA DE LOS CORAZONES AISLADOS A LA NORADRENALINA.	- 72 -
FIGURA 26. CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA NORADRENALINA.	- 73 -
FIGURA 27. TACOGRAMA DE UN CORAZÓN AISLADO EN RESPUESTA A LA ACETILCOLINA.	- 75 -

FIGURA 28. CURVA DOSIS-RESPUESTA PARA LA ACETILCOLINA EN UN CORAZÓN AISLADO.	- 76 -
FIGURA 29. RESPUESTA CRONOTRÓPICA DE LOS CORAZONES AISLADOS A LA ACETILCOLINA.	- 77 -
FIGURA 30. CURVAS DOSIS-RESPUESTA PARA ACETILCOLINA.....	- 78 -
FIGURA 31. ESQUEMA DEL NÚMERO DE ANIMALES UTILIZADOS: LOTE 2.	- 83 -
FIGURA 32. CAMBIOS DE LA FC Y LA VFC EN LAS RATAS SÉPTICAS Y SHAM (LOTE 2).....	- 85 -
FIGURA 33. CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE CATECOLAMINAS EN RATAS SHAM Y SÉPTICAS.	- 87 -
FIGURA 34. CONCENTRACIÓN DE ACETILCOLINA Y COLINA EN AURÍCULAS DERECHAS DE RATAS SHAM Y SÉPTICAS.	- 88 -
FIGURA 35. CONCENTRACIÓN DE ACETILCOLINA EN AURÍCULAS DERECHAS DE RATAS SHAM Y SÉPTICAS.	- 91 -
FIGURA 36. VALORES DE RMSSD EN FUNCIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ACETILCOLINA.....	- 92 -

LISTA DE TABLAS

TABLA 1. ÍNDICES ESTADÍSTICOS DE LA VARIABILIDAD DE LA FRECUENCIA CARDÍACA.	- 11 -
TABLA 2. MORTALIDAD DE LOS MODELOS DE INDUCCIÓN DE SEPSIS PERITONEAL.	- 46 -
TABLA 3. ÍNDICES DE VFC CORRESPONDIENTES A LOS TACOGRAMAS DE LA FIGURA 15.	- 52 -
TABLA 4. ÍNDICES DE VFC CORRESPONDIENTES A LOS TACOGRAMAS DE LA FIGURA 16.	- 53 -
TABLA 5. NÚMERO DE RATAS CON VFC ANORMAL EN CADA MODELO DE SEPSIS PERITONEAL.	- 57 -
TABLA 6. RESPUESTA CRONOTRÓPICA A LA NORADRENALINA DEL CORAZÓN AISLADO DE UNA RATA SHAM.	- 71 -
TABLA 7. RESPUESTA CRONOTRÓPICA A LA ACETILCOLINA DEL CORAZÓN AISLADO DE UNA RATA SHAM.	- 76 -

LISTA DE ABREVIATURAS

(por orden alfabético)

ACh: acetilcolina (por la palabra en inglés: acetylcholine)

AMP_c : adenosín monofostato cíclico

CLF: ligadura del ciego e inóculo fecal (del inglés: Cecal Ligation and Fecal inoculum)

CLI: ligadura del ciego e infección (si bien este término fue creado para esta tesis y no figura en la literatura, mantuve el mismo criterio sobre generar la sigla a partir de las palabras en inglés: Cecal Ligation and Infection)

CLP: ligadura y perforación del ciego (del inglés: Cecal Ligation and Puncture)

CV: coeficiente de variación; se calcula dividiendo el SDNN sobre el intervalo RR y multiplicando por 100

EC₅₀: concentración que provoca un 50% del efecto máximo (del inglés: effective concentration)

ECG: registro de la actividad eléctrica cardíaca o electrocardiograma. En la presente tesis incluye una única derivación con electrodos subcutáneos

FC: frecuencia cardíaca

HF: índice de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en el ámbito de la frecuencia; corresponde a la potencia espectral en la banda de frecuencias altas (del inglés: High Frequency)

HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento (del inglés: High Performance Liquid Chromatography)

IC: intervalo de confianza

IC₅₀: concentración que provoca un 50% del efecto inhibitor máximo (del inglés: inhibitory concentration)

IL: interleuquina

LF: índice de Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en el ámbito de la frecuencia; corresponde a la potencia espectral en la banda de frecuencias bajas (del inglés: Low Frequency)

LPS: lipopolisacárido

Nor: noradrenalina

PA: potencial de acción

RMSSD: Del inglés, Root-Mean-Square of Successive Differences (misma fórmula que el desvío estándar (SDNN) pero sustituyendo la media del intervalo RR por el RR sucesivo

RR: entre 2 picos de ondas R consecutivas del registro eléctrico de la actividad cardíaca.

SA: sino-auricular o sinusal

SD: desvío estándar

SDNN: desvío estándar de todos los intervalos RR normales (del inglés: Standard Deviation of all Normal-Normal intervals)

SEM: error estándar de la media

SIRS: síndrome de respuesta inflamatoria sistémica

SNA: sistema nervioso autónomo

TNF: factores de necrosis tumoral

VFC: Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca

V_m: potencial de membrana

“El pulso ha demostrado ser el mensajero que nunca miente.”

Extraído de “El médico” de Noah Gordon

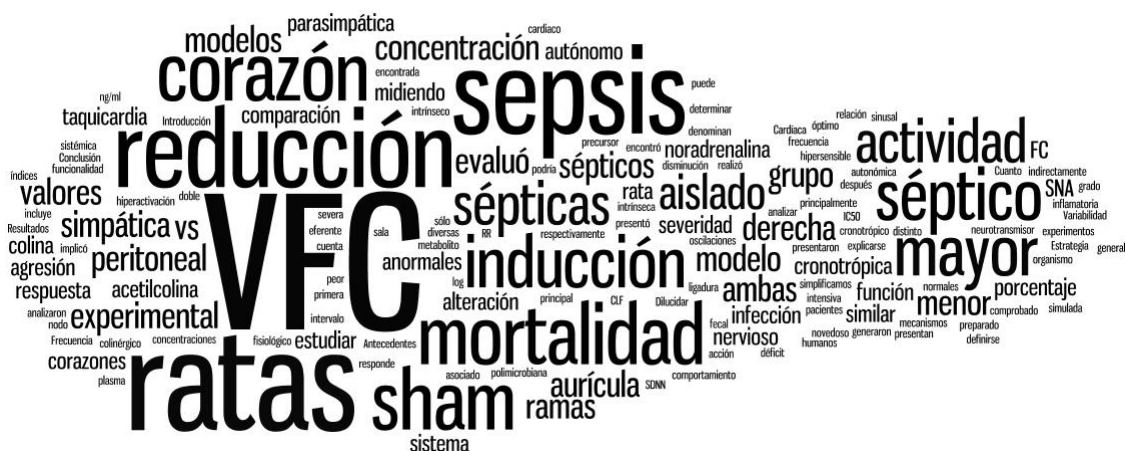


Figura 0. Nube de frecuencia de palabras en el Resumen de esta tesis. El tamaño de cada palabra es directamente proporcional a su frecuencia en el resumen. La nube fue generada con el software disponible online en <http://www.wordle.net/>

RESUMEN

Introducción: Las oscilaciones normales de la duración del ciclo cardiaco (intervalo RR) se denominan Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca (VFC) y están determinadas principalmente por la influencia de ambas ramas del sistema nervioso autónomo (SNA) sobre el marcapaso fisiológico del corazón (nodo sinusal). Una reducción de la VFC se ha asociado con el envejecimiento y con diversas patologías. Una de ellas es la sepsis, que puede definirse como la respuesta inflamatoria sistémica a una infección severa.

Antecedentes: Hemos comprobado en un grupo de pacientes sépticos que la menor VFC al ingresar a la sala de terapia intensiva, implicó peor evolución; con mayor riesgo de mortalidad.

Objetivo general: Dilucidar los mecanismos que determinan la reducción de la VFC en la sepsis experimental en la rata.

Hipótesis: La reducción de la VFC en un contexto esperado de alta frecuencia cardíaca (FC), podría explicarse por una alteración de la función de ambas ramas del SNA, con un aumento de la actividad simpática y una disminución de la actividad parasimpática.

Estrategia: Se registró el ECG de la rata consciente antes y después de la inducción de sepsis peritoneal. Se analizaron los cambios de la VFC y la mortalidad de modelos de inducción de sepsis con distinto grado de severidad de la agresión para determinar la relación entre la reducción de la VFC y la mortalidad. Como primera aproximación para analizar la reducción de la VFC en la sepsis, simplificamos el preparado experimental aislando el corazón del animal séptico para estudiar su comportamiento cronotrópico intrínseco y la forma en que responde a los neurotransmisores autonómicos. En otro grupo de ratas sépticas se evaluó la funcionalidad de ambas ramas del sistema nervioso autónomo, midiendo indirectamente su actividad eferente. La actividad simpática se evaluó cuantificando la concentración de catecolaminas en plasma. La actividad parasimpática se evaluó midiendo las concentraciones de acetilcolina y colina (precursor y metabolito del neurotransmisor) en la aurícula derecha aislada.

Todos los experimentos se hicieron también en un grupo de ratas a las que se les realizó la inducción simulada de sepsis (ratas sham) para su comparación con las ratas sépticas.

Resultados:

1. Se encontró una asociación entre la reducción de la VFC y la mortalidad en ratas sépticas. Cuanto mayor fue la severidad de la agresión del modelo de inducción de sepsis, mayor fue la mortalidad y menor la VFC. Los modelos de inducción de sepsis de mayor mortalidad generaron un mayor porcentaje de ratas con reducción de la VFC a valores anormales ($SDNN < 4$ ms). Entre los distintos modelos de inducción de sepsis peritoneal ensayados, la doble ligadura del ciego con inóculo fecal (CLF, 300 mg/kg) fue óptimo para estudiar la reducción de la VFC teniendo en cuenta la mortalidad del modelo y el porcentaje de ratas que disminuyeron su VFC a valores anormales.
2. El corazón aislado de ratas sépticas presentó una FC intrínseca similar a la del corazón aislado de ratas sham a pesar de la taquicardia encontrada en el organismo séptico. Los índices de VFC del corazón aislado tampoco discriminaron entre corazones sépticos y sham. Los valores de VFC disminuyen al aislar el corazón sham pero no el séptico.
3. El corazón aislado de ratas sépticas fue hipersensible a la acción cronotrópica negativa de la acetilcolina ($\log IC_{50}$ (M) = -7.2 ± 0.2 vs. -6.0 ± 0.4 ; $P=0.0412$ en los grupos séptico ($N=10$) y sham ($N=5$), respectivamente). La respuesta cronotrópica positiva a la noradrenalina fue similar en otros corazones aislados de ratas sépticas ($N=10$) y sham ($N=5$).
4. Las ratas sépticas ($N=10$) presentaron mayor concentración de noradrenalina plasmática (en ng/ml: 38.2 ± 15.6 vs. 5.8 ± 4.0 ; $P= 0.009$) y menor concentración de colina en la aurícula derecha en comparación con las ratas sham ($N=5$): 0.6 ± 0.1 vs. 1.6 ± 0.6 nMol/mg de proteína ($P=0.0063$).

Conclusión: El principal aporte de esta tesis es que las ratas sépticas, con taquicardia y reducción de la VFC, presentan una alteración de la función autonómica que incluye no sólo hiperactivación simpática sino también un déficit colinérgico en la aurícula derecha. Este resultado novedoso es relevante porque fue obtenido en un modelo experimental que imita la sepsis peritoneal en humanos (con un foco séptico e infección polimicrobiana).

DEDICATORIA

A la memoria de la Licenciada Elisa Delle Piane (1925-2008).



Elisa me regaló este dibujo cuando recibí el título de Licenciada en Ciencias Biológicas. Hoy le dedico esta tesis a su memoria porque sigue siendo una mujer faro.

INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

1.1. Marcapaso cardíaco

El tejido muscular cardíaco (miocardio) puede clasificarse en inespecífico o específico de acuerdo a si su rol principal es la función mecánica (contracción) o la eléctrica (automatismo, conducción), respectivamente. Dentro del miocardio específico, existen tres sectores diferentes con actividad marcapaso: el nodo sinusal o sinoauricular (SA), el nodo aurículo-ventricular y las fibras de Purkinje (figura 1). El término actividad marcapaso se refiere a la capacidad de generar su propios estímulos. Esto se logra por despolarización espontánea de la membrana celular, que alcanza así, el nivel de disparo y por lo tanto se genera un potencial de acción (PA). Esta propiedad eléctrica se denomina automatismo. Cualquier célula cardíaca con actividad marcapaso puede potencialmente iniciar el latido pero el marcapaso con la mayor frecuencia es el que dispara un PA que comandará a todos los demás. El marcapaso más rápido determina entonces la frecuencia cardíaca (FC) y anula a todos los marcapasos más lentos. Así, existe una jerarquía entre los marcapasos cardíacos basada en su frecuencia intrínseca. El nodo SA es el que presenta la mayor frecuencia de disparo y por lo tanto es el marcapaso fisiológico del corazón de mamífero.

El nodo SA es una estructura formada por células más pequeñas que las del miocardio común y con escasos filamentos contráctiles (células P). La parte principal del nodo SA está ubicada en la unión de la aurícula derecha y la vena cava superior. Sin embargo, es posible encontrar células P a lo largo del eje que une ambas venas cavas lo que hace pensar que el nodo SA es una estructura mayor a lo que se creía originalmente [1].

El nodo SA se diferencia de su entorno también por sus propiedades funcionales. Por ejemplo, su particular combinación de canales iónicos determina un PA de características bien diferentes al de las células auriculares que lo rodean. La principal característica del PA marcapaso es la inestabilidad de la fase 4, con una lenta despolarización diastólica que lleva a la activación espontánea.

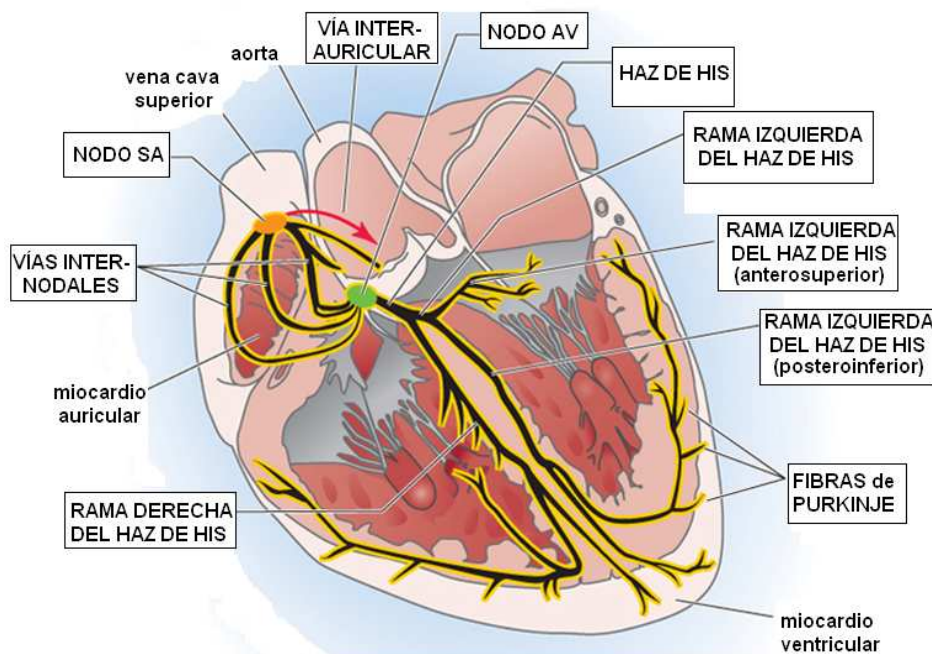


Figura 1. Sistema de conducción cardíaco

El potencial de acción cardíaco se origina en el nodo sinoauricular (SA), localizado en la aurícula derecha. Las células del nodo SA se despolarizan espontáneamente y disparan potenciales de acción a una frecuencia intrínseca regular. En el esquema se resalta en amarillo el miocardio específico (sistema de conducción cardíaco) y se nombran en letras mayúsculas sus principales sectores. La existencia de vías de conducción discretas en la aurícula aún está en disputa. Alrededor de 0.1 s después del origen, la señal llega al nodo aurículo-ventricular (AV). El impulso no se propaga directamente desde las aurículas a los ventrículos debido a la presencia de un anillo fibroso aurículo-ventricular. La única vía disponible para la conducción del impulso es a través del nodo AV al sistema de His-Purkinje, una vía especializada de células conductoras que transporta la señal al músculo de ambos ventrículos. Modificada de [2]

Simplificando las diferencias entre las especies, se pueden describir los eventos de un PA de este tipo de la siguiente manera: la hiperpolarización que ocurre como consecuencia de la repolarización previa determina que se abran los canales HCN (del inglés, hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels). Estos canales no selectivos permiten el ingreso de Na^+ a la célula (corriente I_f), comenzando así la despolarización diastólica. También contribuyen con esta despolarización las corrientes de calcio a través de los canales tipo L y tipo T (I_{Ca}) y la corriente I_{NaCa} a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. En la fase 4, además de las corrientes entrantes en aumento, se superpone una corriente de salida que disminuye (I_K) la cual contribuye con la lenta despolarización marcapaso asociada con el nodo SA. Así, el potencial de membrana (V_m) aumenta desde -65 mV hacia el nivel de disparo de

aproximadamente -55 mV. I_{Ca} se incrementa y se vuelve regenerativa lo que produce el aumento de V_m de mayor pendiente correspondiente a la fase 0. La fase 0 es una rápida despolarización en comparación con la fase 4 pero es lenta si la comparamos con la fase 0 del PA de las células auriculares (figura 2). La fase 0 más lenta en las células marcapaso se debe a la ausencia de la corriente rápida de Na^+ en ellas. En la transición entre las fases 0 y 3, I_{Ca} comienza a inactivarse, lo cual inicia el proceso de repolarización. La inactivación de I_{Ca} se combina con la lenta activación de I_K para que surja la fase 3 o repolarización del PA. Diversas corrientes y canales de K^+ están involucrados en la fase de repolarización.

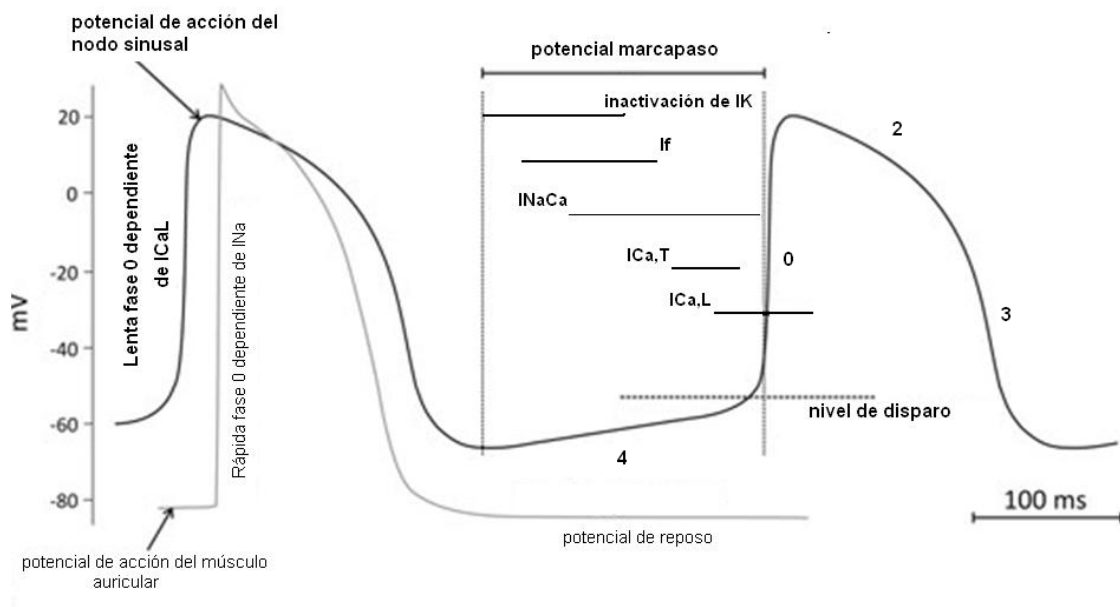


Figura 2. Potenciales de acción marcapaso

Se muestran los típicos potenciales de acción marcapasos del centro del nodo sinusal (negro) y para su comparación el típico potencial de acción de músculo auricular (gris). Las contribuciones temporales de las principales corrientes iónicas al potencial marcapaso se muestran con las barras negras. Modificada de [3]

La cinética de activación e inactivación de los canales determina las corrientes iónicas y de esa forma el ritmo cardíaco a partir del denominado reloj de la membrana. La definición de la principal corriente marcapaso se ha dificultado, probablemente por la redundancia de este mecanismo que asegura su correcto funcionamiento pese a posibles fallas. La complejidad del

sistema marcapaso es mayor aún ya que en los últimos años se ha descrito que superpuesto al reloj de la membrana, existe un reloj intracelular determinado por la liberación de Ca^{++} desde el retículo sarcoplasmático [4]. De esta forma, las células marcapaso cardíacas poseen dos osciladores de diferente naturaleza, el reloj químico del Ca^{++} y el reloj eléctrico de los canales iónicos de la membrana plasmática. A su vez, cada célula marcapaso con estos dos relojes interactúa con el resto de las células marcapaso que forman el nodo sinusal y es esta interacción entre osciladores el verdadero determinante de la FC intrínseca [5]. Además, tal como ocurre en las otras zonas del corazón, la expresión de canales iónicos no es estática en el nodo SA sino que varía en ciertas circunstancias fisiológicas (envejecimiento) y patológicas (por ejemplo, insuficiencia cardíaca) [3].

1.2. Sistema nervioso autónomo y marcapaso cardíaco.

Tal como se explicó arriba, el nodo SA inicia el impulso que genera latidos cardíacos rítmicos y regulares. A su vez, la FC intrínseca, determinada por la frecuencia de disparo del nodo SA, está modulada latido a latido, por ambas ramas del sistema nervioso autónomo (SNA), para ajustar la FC de acuerdo a las demandas fisiológicas cambiantes.

La estimulación parasimpática (nervio vago), a través del neurotransmisor acetilcolina (ACh), disminuye la frecuencia de descarga de las células marcapaso (efecto cronotrópico negativo) mientras que la estimulación simpática, mediada por Nor, tiene el efecto opuesto.

En la aurícula derecha, la ACh se une a receptores muscarínicos, principalmente del subtipo M2 [6], y a través de la proteína G acoplada al mismo, abre los canales de K^+ rectificadores entrantes (GIRK1 o Kir3.1) lo cual aumenta la conductancia al K^+ (figura 3). La corriente de K^+ activada por ACh (I_{KACh}) provoca un acortamiento del PA pero a pesar de eso, un enlentecimiento del marcapaso ya que hace más negativo el máximo potencial diastólico durante la fase 4 del PA. I_{KACh} es responsable de aproximadamente la mitad del efecto cronotrópico negativo de la estimulación vagal sobre el corazón [1]. La ACh actúa además por otros mecanismos mediados por la inhibición de la enzima adenilato ciclasa (a través de la proteína G_{ai}) y por lo tanto, reducción

de la concentración intracelular del segundo mensajero adenosín monofostato cíclico (AMP_c). De esta forma disminuye I_f e I_{Ca} y por lo tanto se reduce la pendiente de la despolarización diastólica y además lleva el potencial de disparo a valores más positivos. El efecto neto es por lo tanto, la reducción de la FC. La posibilidad de regulación de la FC a través de la concentración de AMP_c se ve potenciada porque en el nodo sinusal existe elevada actividad constitutiva de las dos enzimas que determinan la concentración intracelular de AMP_c , es decir, la enzima responsable de su síntesis (adenilato ciclasa) y la enzima responsable de su degradación (fosfodiesterasa). La inhibición de I_f , a través de cambios en la concentración de AMP_c , requeriría concentraciones de ACh veinte veces menores en comparación con las requeridas para la activación de I_{KACH} [7].

La noradrenalina (Nor) liberada desde las fibras nerviosas simpáticas y la hormona adrenalina secretada desde la médula adrenal producen efecto cronotrópico positivo. Se unen al receptor β -1 adrenérgico, subtipo de receptor adrenérgico predominante en el corazón. El receptor β -1 adrenérgico está acoplado a una proteína G con subunidad α del tipo s, es decir que activa a la adenilato ciclasa provocando un aumento de la concentración de AMP_c intracelular. El aumento de FC generado por la activación de estos receptores puede explicarse, en parte, por su capacidad para potenciar I_f (figura 3). Los canales iónicos responsables de dicha corriente se denominan HCN (ver arriba) justamente haciendo mención a su modulación por la interacción con nucleótidos cíclicos como el AMP_c . La estimulación adrenérgica tiene como consecuencia un corrimiento positivo en la activación dependiente de voltaje de I_f sin cambios en la conductancia del canal individual. Es decir, que a cualquier V_m habrá más corriente entrante despolarizante vía I_f , y esto aumentará la velocidad de despolarización y así la FC. El efecto opuesto de la ACh, se explica en parte, como se dijo arriba, porque el receptor muscarínico M2 está acoplado a una proteína G_{oi} , es decir que inhibe a la adenilato ciclasa.

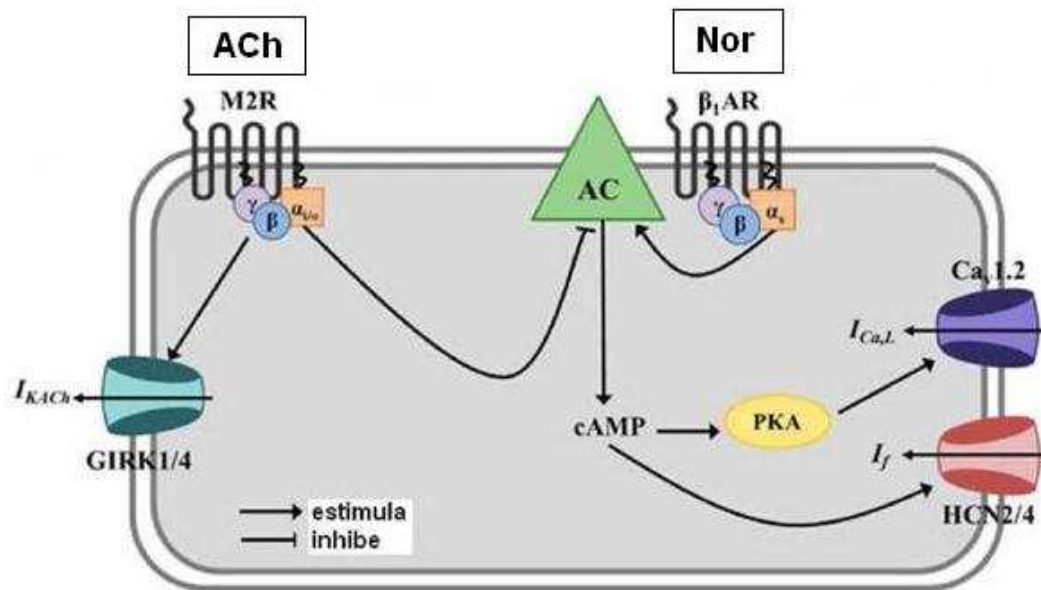


Figura 3. Mecanismos celulares de los neurotransmisores autonómicos

El esquema representa una célula marcapasos del nodo sinusal. Se muestran los mecanismos que median el efecto de la estimulación simpática (Nor) y parasimpática (ACh) a través de los receptores beta 1 adrenérgicos (β_1 AR) y muscarínicos M2 (M2R) respectivamente. Modificada de [8]. AC: adenilato ciclasa.

Además, el aumento del AMP_c intracelular activa la proteinquinasa A (PKA) la cual fosforila a diversas proteínas, entre ellas el canal de calcio responsable de la corriente $I_{Ca,L}$ (figura 3). Este efecto a nivel del nodo SA provoca un aumento de la pendiente de la fase 4 del PA, produciendo así un efecto cronotrópico positivo. Además, PKA (y otras enzimas que se activan como la calcio-calmodulina quinasa II), fosforila proteínas que afectan al reloj de calcio mencionado arriba; por ejemplo, el canal responsable de la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico (receptor de ryanodina) o la proteína reguladora (fosfolamban) de la bomba SERCA, responsable de la recaptación de calcio hacia el retículo.

Vale la pena recordar que esta descripción está centrada en los efectos cronotrópicos del SNA, dado el objetivo de la tesis, pero que son tan o más importantes los efectos inotrópicos, dromotrópicos y lusitrópicos positivos que genera la Nor sobre el miocardio a través de la fosforilación de las proteínas ya mencionadas y de otras tantas, por ejemplo, proteínas contráctiles.

1.3. Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca

La FC está determinada principalmente por la influencia del SNA sobre la frecuencia intrínseca del nodo SA. Habitualmente se expresa como número de latidos por minuto (lpm). Para obtener un valor de FC en el ser humano puede tomarse el pulso durante 15 segundos, por ejemplo y hacer el cálculo para expresarlo en 1 minuto. La FC obtenida de este modo representa un promedio de la FC para ese minuto. Un valor de, por ejemplo, 60 lpm no implica necesariamente que todos los ciclos cardíacos duren exactamente 1 segundo. Si en el mismo minuto calculáramos la FC instantánea (inversa de cada uno de los intervalos entre latidos), apreciaríamos las variaciones que ocurren latido a latido. Precisamente, las oscilaciones en la duración del ciclo cardíaco se denominan VFC y ocurren incluso durante condiciones estables en reposo, sin modificaciones de la FC promedio. Por lo tanto, el latido de un corazón sano no es absolutamente regular, tal como lo observó Albrecht von Haller en el siglo XVIII (citado en [9]). Un ejemplo de VFC, es la arritmia sinusal respiratoria caracterizada por un aumento de la FC durante la inspiración y una disminución de la FC durante la espiración.

La VFC puede explicarse por perturbaciones endógenas y exógenas a la función cardiovascular y por la respuesta dinámica de los sistemas reguladores que mantienen la homeostasis cardiovascular [10]. Se ha propuesto que el estudio de la variabilidad latido a latido es en realidad el estudio de la “homeodinámica”, es decir de los procesos dinámicos involucrados en mantener la homeostasis [11].

A partir del desarrollo del estudio de la VFC, se comprendió que las oscilaciones de duración del ciclo cardíaco pueden aportar más información que el valor promedio del intervalo entre latidos.

La relevancia clínica de la VFC se manifestó por primera vez en el área obstétrica (referencia en [12]), al constatar que la VFC estaba correlacionada con la viabilidad del feto. La depresión del sistema nervioso central secundaria a la hipoxia, lleva a la pérdida de la modulación latido a latido de la FC y por lo tanto a un latido tipo metrónomo (todos los intervalos idénticos). Las alteraciones en los intervalos entre latidos aparecen antes que cualquier cambio apreciable en la FC [10]. Es decir, que se podría diagnosticar

sufrimiento fetal al detectar disminución de la VFC, lo cual precede al descenso patológico de la FC (bradicardia).

Entonces, un ritmo sinusal absolutamente regular puede ser tan negativo como algunas arritmias. La salud se asociaría por lo tanto, con un estado irregular y variable abarcando un rango amplio de límites fisiológicos, mientras que la enfermedad se asociaría con un aumento de la regularidad y disminución de la variabilidad.

En los últimos años se han publicado varios estudios que demuestran el valor pronóstico y diagnóstico de la VFC en diversas patologías, no sólo en las relacionadas con trastornos cardiovasculares. Por ejemplo, la VFC es de utilidad para diagnosticar la neuropatía diabética cuando aún no se ha manifestado clínicamente [13].

En un mismo individuo ocurren cambios fisiológicos de la VFC a lo largo del día (aumenta durante la noche) y en el transcurso de su vida (en adultos sanos, la VFC disminuye con la edad) [14] [15].

La gran dependencia de la VFC con el SNA, ha llevado a que varios autores consideren que el análisis de la VFC es una buena medida de la función autónoma [12] aunque otros autores han puesto en duda ese papel de “evaluador del SNA” que se le atribuye a la VFC [16]. En cualquier caso, las descargas del SNA son moduladas por osciladores centrales (centro vasomotor y respiratorio) y por influencias periféricas (por ejemplo, movimientos respiratorios). Por lo tanto, analizar la VFC no sólo proveería información sobre la actividad eferente del SNA sobre el corazón sino también acerca del estado funcional del propio nodo sinusal y de las otras influencias implicadas (osciladores centrales, factores humorales, etc.)

Los índices de VFC serían una medida del grado de modulaciones autonómicas más que del nivel del tono autonómico [17], o de otro modo, cuantificarían la capacidad de respuesta del corazón a niveles fluctuantes de actividad autonómica [11].

1.3. A. Cuantificación de la VFC

La incorporación de herramientas informáticas en la investigación científica impulsó el gran desarrollo del análisis de la VFC. Esta denominación se ha impuesto pese a que el análisis se basa en la duración del intervalo entre latidos, más que en la propia FC (inversa de dicho intervalo) [17].

Las variaciones en la duración del ciclo cardíaco pueden cuantificarse calculando índices de VFC a partir de la lista de intervalos entre latidos obtenida de algún tipo de registro que evidencie la actividad cardíaca, habitualmente, una de las derivaciones de un electrocardiograma (ECG) digitalizado. Estos intervalos se denominan R-R (RR) ya que dadas sus características de amplitud y pendiente, la onda más fácil de detectar es la onda R del complejo QRS y por lo tanto se mide la duración del ciclo cardíaco como el intervalo entre dos ondas R consecutivas. En realidad sería más correcto detectar la onda P en lugar de la onda R ya que representan la despolarización auricular y ventricular respectivamente (fase 0 del PA simultáneo de todas las células auriculares o ventriculares).

Para calcular la mayoría de los índices de VFC, es necesario previamente contar con una lista validada de intervalos RR normales, es decir, que la detección automática de las ondas R debe ser corregida manual y/o automáticamente para asegurarse que no existan falsos positivos (por ejemplo, detección de ruido) o falsos negativos (por ejemplo, falla en la detección de una onda R por movimiento de la línea de base) [18] [19]. A su vez, se establece un límite para el porcentaje de intervalos que se admite sean corregidos del total de intervalos registrados.

La duración del registro debe ser estandarizada cuando se quiere realizar comparaciones de valores de VFC, porque ciertos índices se ven modificados por esta variable, que abarca un rango muy amplio, desde 5 min a 24 h.

Se han aplicado diversas metodologías para generar índices de VFC a partir de la lista de intervalos RR considerada como una serie temporal. Se describen a continuación algunos de ellos.

1.3. A. a. Índices estadísticos

Los métodos más simples para calcular índices de VFC lo hacen en el ámbito del tiempo, aplicando análisis estadístico (tabla 1). Estos índices tienen la ventaja de ser fácilmente reproducibles.

En la clínica, los software que analizan los ECG de 24 h (Holter) incluyen análisis de VFC y varios índices estadísticos se definen a partir de este registro (tabla 1) [17]. Para calcular algunos índices se consideran los intervalos RR en su conjunto sin importar la secuencia temporal de los mismos (por ejemplo,

SDNN). En otros casos se tiene en cuenta la diferencia de intervalos RR sucesivos (por ejemplo, rMSSD o pNN50). Otros índices evalúan las 24 h de registro pero tomadas en segmentos de 5 min de duración (por ejemplo, SDNN index).

Hemos demostrado que los registros de corta duración (10 min) son tan potentes como los de 24 h para detectar las diferencias de VFC entre un grupo de pacientes con diabetes tipo 1 de larga evolución y un grupo de sujetos controles de la misma edad y FC [20]. Los registros de corta duración presentan la ventaja de poder realizarse en condiciones más controladas y por lo tanto equivalentes entre los distintos individuos que se quiere estudiar.

Tabla 1. Índices estadísticos de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca.

Índice (unidades)	Descripción
SDNN (ms)	El desvío estándar de todos los intervalos RR normales; del inglés: Standard Deviation of all NN* intervals
SDNN index (ms)	Promedio de los desvíos estándares de los intervalos RR tomados en segmentos de 5 min
RMSSD (ms)	Del inglés: Root-Mean-Square of Successive Differences (igual fórmula que SDNN pero sustituyendo la media del intervalo RR por el intervalo RR sucesivo). Estadísticamente equivalente al desvío estándar de las diferencias entre intervalos RR sucesivos (SDSD) [21]
pNN50 (ms)	Es el porcentaje de diferencias de intervalos RR sucesivos cuyo valor es mayor a 50 ms [†]

*Los intervalos NN son los intervalos RR normales, es decir los que se obtienen luego del acondicionamiento de la lista de intervalos RR.

[†]Este índice está definido para los seres humanos, en el caso de otros animales, con FC mayor y menor VFC, el índice debe ser redefinido para que tenga sentido, por ejemplo, Aubert y col. utilizan pNN10 en estudios realizados en ratas [22].

Más allá de la duración del registro, que determinará la posibilidad de evaluar la VFC a corto o largo plazo, el modo de calcular cada índice también condiciona si se analiza VFC global o VFC latido a latido. Por ejemplo, el SDNN

informa sobre la VFC global y el RMSSD sobre las variaciones rápidas de la FC. A su vez, las variaciones rápidas de la FC están asociadas con la modulación parasimpática de la FC. Esto se debe a que la acción del nervio vago tiene menor latencia y también menor duración que la de la rama simpática. Los motivos son diversos; entre otros, la rápida acción de la ACh sobre los canales de potasio GIRK y la corta vida de la ACh debido a la acción inmediata de la acetilcolinesterasa. Recientemente se han descrito proteínas reguladoras de la señalización por proteína G, que serían responsables en parte, de esta posibilidad de acción latido a latido del nervio vago sobre la FC [8].

Los valores de VFC se ven afectados por el valor de FC; a mayor FC, dado un intervalo RR menor, es de esperar que el valor de SDNN también sea menor [14]. Para independizarse del valor de FC al comparar índices de VFC, pueden utilizarse los índices normalizados para el valor del intervalo RR. Este tipo de índice no es habitualmente usado en la bibliografía pero creo que tiene sentido su análisis. Se define, entonces, el coeficiente de variación o CV (%) = $\text{SDNN (ms)} / \text{intervalo RR (ms)} \times 100$.

1.3. A. b. Índices espectrales

Para el análisis por separado de la modulación de la FC por cada una de las dos ramas del SNA, se ha usado preferentemente la estimación de índices de VFC en el ámbito de la frecuencia. La propuesta surgió originalmente a partir de los experimentos realizados por Akselrod y col. en perros conscientes a los que se les administraba antagonistas de los receptores muscarínicos y/o β -adrenérgicos [12].

Para el análisis en el ámbito de la frecuencia se parte de la lista de intervalos RR normales graficados en función del tiempo (tacograma) luego de haberlos remuestreado para que en el eje de abscisas los puntos queden equiespaciados (intervalos iguales). El perfil del tacograma se trata como una señal compuesta por múltiples ondas de diferentes frecuencias. Se analiza la distribución de la potencia (varianza) en función de la frecuencia (análisis espectral). El espectro se divide en bandas de frecuencia y se estima la densidad espectral de la potencia de cada banda expresada en ms^2 . Se prefieren tiempos de análisis breves porque es imprescindible asumir que las condiciones son estacionarias, es decir, que cualquiera sea el conjunto de

influencias que está afectando a la FC, se mantiene estable a lo largo del período de análisis. Por este motivo es de interpretación dudosa el análisis espectral realizado en registros de larga duración, incluso aunque se consideren segmentos breves y luego se los promedie [17].

Se identifican dos componentes espectrales principales en registros de corta duración en seres humanos: de baja frecuencia (Low-Frequency; LF: 0.04 a 0.15 Hz) y de alta frecuencia (High-Frequency; HF: 0.15 a 0.40 Hz) [17].

El componente HF se explica principalmente por la actividad vagal eferente sobre el corazón. Generalmente el pico de HF se encuentra a una frecuencia coincidente con la frecuencia respiratoria, indicando que gran parte de estas variaciones de alta frecuencia están determinadas por la respiración. Se ha encontrado una correlación casi perfecta entre HF y el índice estadístico RMSSD [14] [23] [24] [25].

El componente LF es considerado un marcador del grado de modulación simpática y parasimpática, ya que el efecto del bloqueo farmacológico parasimpático produce abolición del pico HF pero también reducción de la amplitud del pico LF [12]. Los cambios en la actividad eferente simpática presentan mayor latencia para generar una respuesta en la FC que los cambios en la actividad parasimpática [26], es decir que la respuesta es mucho más lenta (varios segundos vs. la respuesta en el siguiente latido). LF, con su pico centrado alrededor de 0.1 Hz (6/min), estaría asociado con el control de la presión arterial (oscilaciones vasomotoras) [27].

La desventaja de los índices espectrales es que tienen requisitos más estrictos para poder realizar una estimación confiable. Además, la forma de estimarlos es muy diversa por lo que se hace difícil la comparación de valores de diferentes grupos de investigación. Los estándares para estas estimaciones no fueron establecidas en el esfuerzo de la Task Force del año 1996 [17], y se sugiere entonces que se especifique según el método usado (por ejemplo, transformada rápida de Fourier o modelado autoregresivo), las condiciones seleccionadas para el procesamiento (tipo de interpolación, de ventana, etc.).

La descripción sobre los índices espectrales realizada arriba se aplica a seres humanos. En el caso de querer aplicarlos en animales de experimentación la dificultad se incrementa porque ni siquiera se ha estandarizado la definición de las bandas de frecuencia. Los rangos de

frecuencia utilizados en humanos no pueden aplicarse a otras especies dadas las diferencias en los valores de FC y frecuencia respiratoria. En la rata, la banda HF ha sido definida de manera diversa por los diferentes autores. Por ejemplo, Pancoto y col. utilizaron un rango de 1.0-5.0 Hz [28] mientras que Aubert y col. usaron 0.78-2.5 Hz [22].

1.3. A. c. Otros índices de VFC

Se han aplicado muchos otros métodos para el análisis de la VFC en el intento de obtener mayor información para su interpretación fisiológica y como predictor de riesgo [29]. Los métodos geométricos cuantifican VFC a partir de la construcción de una figura geométrica; por ejemplo, a partir de un histograma de frecuencia de los intervalos RR [17].

Con el mismo objetivo, más recientemente, se han aplicado métodos no lineales para el análisis de la VFC. Dadas las complejas interacciones entre los osciladores intra- y extra-cardíacos que determinan la VFC, se ha postulado que un análisis basado en dinámica no lineal permitiría revelar aspectos que quedan ocultos con métodos lineales.

El gráfico de Poincaré, en el cual cada intervalo RR es graficado en función del intervalo RR precedente, es un método geométrico que permite evidenciar claramente la VFC [30]. Se ha analizado desde el punto de vista cualitativo y cuantitativo. Si bien, es considerado un método no lineal, la forma más común de cuantificar los índices de VFC a partir del mismo (sd1 y sd2) solamente informa sobre los aspectos lineales del fenómeno de la VFC [30].

A pesar de la gran diversidad de índices evaluados, no se ha podido definir un único índice para analizar la VFC que satisfaga todas las necesidades para considerarlo el elegido.

1.4. Sepsis

La sepsis se ha definido como la respuesta inflamatoria sistémica a una infección severa [31]. Más específicamente, el origen de la sepsis puede encontrarse en la pérdida de la regulación de la respuesta inflamatoria [32].

El sistema inmune innato reconoce estructuras moleculares que son características de los patógenos microbianos pero no de las células de mamíferos. Por ejemplo, las bacterias gram negativas contienen en su pared celular un lipopolisacárido (LPS) o endotoxina. El sistema inmunitario también reconoce moléculas endógenas que son producidas y liberadas desde las

células dañadas o de células sanas del sistema inmune lo cual potencia una respuesta inmune innata a las infecciones. Las citoquinas son un grupo grande y heterogéneo de proteínas secretadas por diversos tipos celulares que median y regulan todos los aspectos de la inmunidad, muchas de ellas con efectos proinflamatorios. Podría haber hasta 180 genes humanos que codifican para proteínas con características de citoquinas [33]. Las citoquinas no se almacenan como moléculas preformadas sino que su síntesis se inicia por transcripción del gen como resultado de la activación celular. Esa activación transcripcional es transitoria y los ARN mensajeros son inestables. Una citoquina puede actuar en diversos tipos celulares y tener múltiples efectos biológicos (pleiotropismo). A su vez, múltiples citoquinas pueden tener la misma acción; son redundantes. Una citoquina puede estimular o inhibir la producción de otras y las citoquinas pueden antagonizar o producir efectos aditivos o sinérgicos con otras. Cuando se producen en grandes cantidades, las citoquinas entran en la circulación y actúan a distancia desde el sitio de producción (acción endócrina).

Los factores de necrosis tumoral (TNF) son un ejemplo de citoquina con efectos locales y distantes (sistémicos). Serían de las primeras citoquinas en ser liberadas por el hígado y estimularía la secreción de otras citoquinas por los monocitos y macrófagos, por ejemplo, las interleuquinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6). Los mediadores producidos durante la respuesta inmune innata a la infección o al daño tisular tienen efectos sistémicos que contribuyen a la defensa del huésped y son responsables de muchos de los signos clínicos de la enfermedad infecciosa e inflamatoria.

La inflamación usualmente es una respuesta bien organizada del organismo para defenderse de los agentes infecciosos. Mientras la producción de citoquinas se halla confinada al sitio de infección, la respuesta inflamatoria es claramente beneficiosa. Para una efectiva defensa contra la infección mediada por el sistema inmune se requeriría entonces inflamación local y anti-inflamación sistémica. Para controlar el balance entre respuesta inflamatoria y anti-inflamatoria, existen aferencias endócrinas y neurales desde el sistema inmune al sistema nervioso central que informan sobre la respuesta a la infección en los tejidos [34]. Por ejemplo, algunas citoquinas interactúan con los centros hipotalámicos para producir fiebre y algunas fibras nerviosas

sensoriales periféricas informan sobre el dolor en los sitios donde se acumulan los mediadores inflamatorios. A partir de esta información, surge la respuesta del sistema nervioso central para modular la respuesta inmune. Las eferencias incluyen la activación del sistema nervioso simpático y del eje hipotálamo-hipófiso-corticosuprarrenal. Se ha encontrado que otra de las formas de controlar la respuesta inflamatoria es a través del SNA parasimpático [35]. Este reflejo inflamatorio involucra al nervio vago (figura 4). Las aferencias vagales detectan la inflamación a través de receptores para citoquinas (por ejemplo, IL-1) y las eferencias vagales activadas liberan ACh, que se une a receptores nicotínicos en los macrófagos, inhibiendo así la producción de más citoquinas [36]. Se ha reportado que la exposición de macrófagos humanos a nicotina o ACh inhibe la liberación de TNF, IL-1 e IL-8 en respuesta a endotoxina [37]. La importante interacción entre los sistemas inmune y nervioso ha llevado a la creación de una nueva disciplina, la Neuroinmunología

Si la inflamación no logra mantenerse bajo control, las bacterias y consecuentemente las citoquinas invaden la circulación sanguínea sistémica. Demasiada concentración de citoquinas proinflamatorias en la sangre puede ser perjudicial, causando excesiva inflamación y sepsis. También se ha propuesto como causa de la sepsis, una respuesta antiinflamatoria compensadora que se torna incontrolable [32].

En cualquier caso, la patogenia de la sepsis se encontraría en la respuesta del individuo a la infección más que en la noxa propiamente dicha.

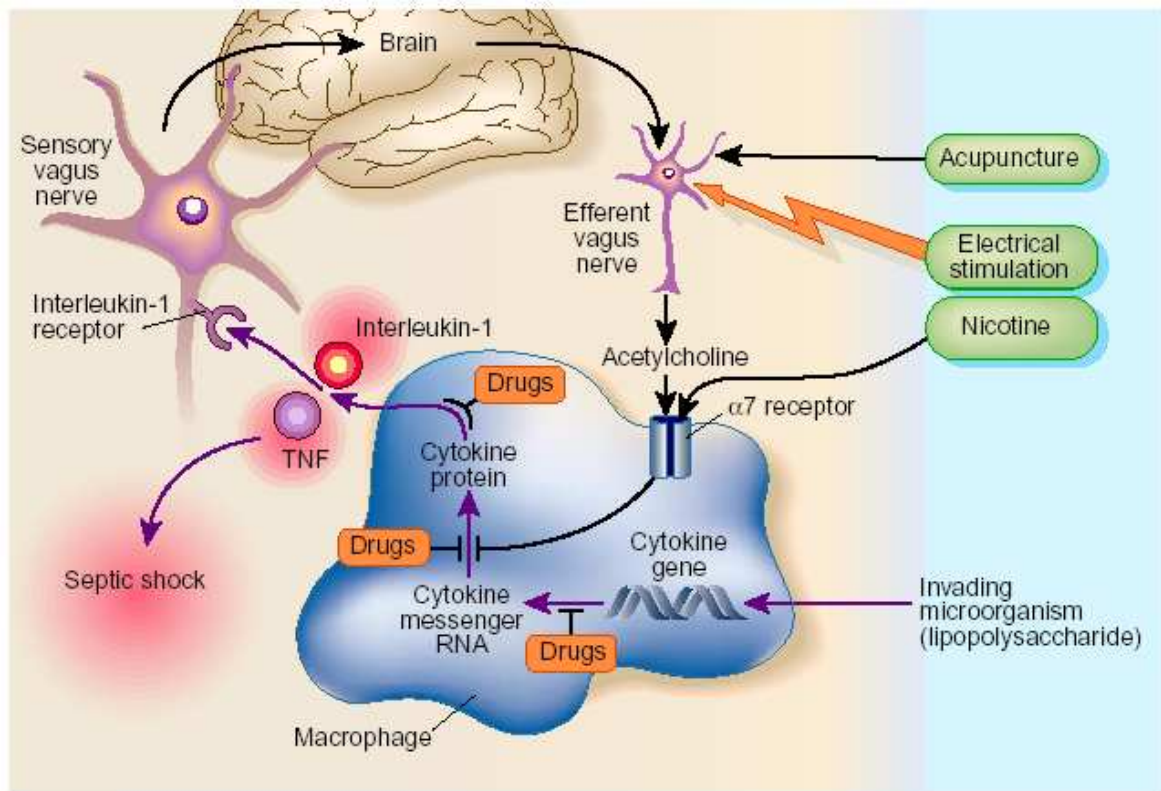


Figura 4. Reflejo inflamatorio

El ciclo esquematizado comienza cuando el lipopolisacárido (LPS) de las bacterias se une a receptores específicos (CD14) en la membrana de los macrófagos a nivel tisular (o de los monocitos a nivel sanguíneo). Copiada de [35].

Lin y col. cuantificaron $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ en el plasma de ratas conscientes luego de la inducción de sepsis mediante inyección de LPS [38]. Ambas citoquinas presentaron un pico de concentración 1 h después de la inyección y una reducción gradual hasta los niveles basales en un período de 9 h. En el caso de la $\text{IL-1}\beta$, hubo un segundo pico a las 3 h. La FC aumentó hasta alcanzar el máximo a las 3 h (de 361 a 459 lpm) y se mantuvo elevada durante todo el período de análisis (24 h posteriores a la inyección de LPS). También encontraron una activación de la expresión de ARNm de la enzima inducible para la síntesis de óxido nítrico en diversos tejidos, incluido el corazón. Concluyen que la producción de óxido nítrico, además de las citoquinas, podría contribuir a la disfunción orgánica inducida por LPS. Esta idea ha sido apoyada por experimentos en ratas sépticas que demuestran que el daño tisular y la disfunción orgánica disminuyen si se bloquea la síntesis de óxido nítrico y que la contractilidad diafragmática disminuida está mediada al menos parcialmente

por una superproducción de óxido nítrico [39]. Los macrófagos requieren una cantidad normal de óxido nítrico para destruir las bacterias pero en cantidades excesivas podría causar además, la hipotensión que se observa en el shock séptico.

1.4.A. Aspectos clínicos

El tema de la sepsis desde el punto de vista clínico es de gran interés porque la sepsis severa y el shock séptico afectan a millones de personas en todo el mundo cada año y su mortalidad es al menos 25%. Este valor no ha disminuido significativamente en las últimas décadas a pesar de los avances en la tecnología médica, los tratamientos y la comprensión de los mecanismos patológicos subyacentes [40], con el agravante del aumento de la incidencia [41] en parte debido a la mayor expectativa de vida de la población.

Tal como se dijo arriba, la sepsis puede definirse como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SIRS) secundario a una infección demostrada. En los seres humanos, SIRS se diagnostica cuando están presentes al menos dos de los siguientes criterios [42]: temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ o $< 36^{\circ}\text{C}$; frecuencia cardíaca > 90 lpm; frecuencia respiratoria > 20 cpm o presión parcial de CO_2 en sangre arterial < 32 mmHg; leucocitosis ($> 12000/\text{mm}^3$) o leucopenia ($< 4000/\text{mm}^3$). La sepsis pasa a ser severa o grave si se asocia a la disfunción de uno o más órganos, hipoperfusión tisular o hipotensión arterial. Si la enfermedad evoluciona hacia un síndrome de disfunción multiorgánica, la mortalidad aumenta significativamente y más aún si aparece el shock séptico, es decir, la incapacidad para mantener una perfusión tisular efectiva. El shock séptico está incluido en el tipo de shock distributivo [43], determinado por la pérdida del control vasomotor con intensa vasodilatación arteriolar y venular que puede presentarse con gasto cardíaco normal, aumentado o disminuido. En definitiva, la sepsis no es una única enfermedad sino un proceso complejo y heterogéneo [44]. El pronóstico de la sepsis depende de varios factores, entre los que se destacan: estado inmunitario del paciente, ubicación del foco infeccioso, el germen involucrado y el número de disfunciones [42].

En Uruguay el foco infeccioso peritoneal es el de mayor frecuencia (25%) [42] y presenta una elevada mortalidad. Las bacterias representan el 90% del total de los agentes infecciosos y dentro de ellas los bacilos gram negativos son más frecuentes que los cocos gram positivos como causa de

sepsis. A su vez, dentro de los bacilos gram negativos, las enterobacterias, como *E. Coli*, son los de mayor incidencia [42]. Las formas clínicas de presentación del paciente séptico son diversas. Por ejemplo, hay casos de pacientes con foco infeccioso evidente, SIRS y disfunción multiorgánica pero con hemocultivos negativos y por otro lado, pacientes sin foco infeccioso clínicamente evidente pero con SIRS, disfunción multiorgánica y hemocultivos positivos [42].

1.4. B. Modelos de sepsis experimental.

Los modelos preclínicos de sepsis son de gran interés para la investigación “translacional” pero no existe un único modelo ideal de sepsis sino más bien un gran número de modelos complementarios [45].

Se han usado cuatro clases de modelos de sepsis intra-abdominal en roedores [46]:

- Inyección intraperitoneal de productos bacterianos (LPS). Este modelo tiene la ventaja de ser simple, reproducible y de bajo costo pero se ha reportado que es “fisiológicamente” diferente a la peritonitis bacterial, por el curso temporal de las variaciones de las concentraciones de las citoquinas y la respuesta a algunas terapéuticas.

- Inserción de pellets fecales intraperitoneales. La principal desventaja de este modelo es la variedad en el número y tipo de patógenos de cada muestra. Se recomienda además el uso de adyuvantes y otros materiales para evitar la rápida depuración de las bacterias, porque de lo contrario los animales presentan dos respuestas extremas, una enfermedad fulminante que culmina en una muerte rápida o una completa recuperación. Chopra y col. describieron una variedad de este modelo en el cual se realiza la inyección intraperitoneal de una solución preparada con materia del ciego extraída de una rata donante [47] [48]. Estos autores usan dosis de 200 a 400 mg/kg de peso corporal.

- Inyección intraperitoneal de bacterias. Generalmente se usa *E. coli*. Tiene la ventaja de poder dosificarse con precisión. Usando varios modelos de inóculos bacterianos se estableció que la sepsis intra-abdominal es una enfermedad con dos fases. La primera fase de peritonitis y bacteremia con mortalidad progresiva de 2 a 5 días, luego de lo cual los animales se recuperan. Dependiendo del modelo usado (tipo de bacteria, dosis, etc.) los

animales que se recuperan desarrollan abscesos intra-abdominales y raramente mueren por ellos. La fase de peritonitis se debe a bacterias entéricas gram negativas mientras que la formación de abscesos se debe a anaerobios, especialmente de la especie *Bacteroides*.

— Contaminación endógena. Es un modelo de sepsis polimicrobiana que se asemeja más a las condiciones de la sepsis clínica en parte por poseer un foco de infección en lugar de ser iniciada sistémicamente [43]. El modelo más típico de esta categoría es la ligadura y perforación del ciego (CLP por el nombre en inglés: Cecal Ligation and Puncture). La ligadura del ciego agrega a la infección, una fuente de tejido necrótico que a menudo se encuentra en la sepsis clínica [44]. Además, teniendo un foco de infección diferenciado, permite su simple y concisa remoción quirúrgica en el caso que el protocolo lo ameritara [44]. Sin embargo, existen diferencias entre la fisiología murina y humana que pueden restringir el uso de CLP. Por ejemplo, la ligadura del ciego sin perforación es tolerada bastante bien por un ratón, mientras que la situación análoga en el humano sería fatal si el tejido necrosado no fuera escindido. Otro modelo dentro de la misma categoría, pero menos utilizado, es colocar un “stent” en el colon ascendente para evitar que se cierre la perforación y mantener la contaminación fecal continua [46].

Para seleccionar el modelo a utilizar debe definirse primero exactamente la situación clínica que se quiere modelar, incluida la mortalidad. Además, tendrá que ser simple de realizar y reproducible en el sentido que todos los animales generen la misma respuesta (por ejemplo, todos viven o todos mueren) o confiable, es decir, que un porcentaje similar de los animales generen la misma respuesta (por ejemplo, una mortalidad consistente y predecible) [46].

Una vez seleccionado el modelo es importante estandarizar las condiciones en las que se practica y detallar las características de los animales utilizados. Por ejemplo, al igual que lo descrito en humanos, la mortalidad por peritonitis es más alta en roedores añosos que en jóvenes [46] [49].

2. Antecedentes: Sepsis y Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca

El efecto de la sepsis sobre la función mecánica del corazón (efecto inotrópico negativo) ha sido más estudiado que su efecto sobre el cronotropismo. Aún así, hay mucha evidencia sobre el aumento de la FC y la disminución de la VFC en la sepsis. Por ejemplo, Pancoto y col. indujeron sepsis peritoneal en ratas mediante CLP (10 perforaciones con aguja 16 G) y analizaron los cambios en la VFC pocas horas después de la cirugía [28]. Efectivamente, encontraron aumento de la FC y disminución de la VFC estimada con índices en el ámbito de la frecuencia (LF y relación LF/HF). Sus resultados los llevaron a proponer un control autonómico alterado del corazón y de los vasos sanguíneos en la sepsis.

Nosotros hemos mostrado en un grupo de pacientes sépticos que la menor VFC al momento del ingreso a la sala de cuidados intensivos se relacionó con peor evolución a pesar de similares escores de severidad clínica [50]. De los 39 pacientes de ambos géneros incluidos en el estudio, 11 desarrollaron disfunción multiorgánica luego del registro del ECG para evaluar su VFC. Al comparar este subgrupo de pacientes sépticos con los restantes 28 que no presentaron disfunción multiorgánica durante su estadía en la sala de cuidados intensivos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en su VFC, edad y mortalidad (7/11 vs. 0/28) pero no en las otras variables comparadas (FC, género, escores de severidad). En el subgrupo con disfunción multiorgánica la VFC era menor y la edad mayor. Por lo tanto, se hizo un estudio caso-control, seleccionando de los 28 pacientes sépticos con buena evolución, los 11 de mayor edad. La comparación caso-control ($N=11$ en cada grupo) ya no generaba diferencias estadísticamente significativas en la edad pero sí en dos de los índices de VFC evaluados. Por lo tanto, se concluyó que la menor VFC es predictor de disfunción multiorgánica y por lo tanto de mortalidad. La reducida VFC en estos pacientes estaría evidenciando un desacople entre el SNA y el corazón, precediendo al diagnóstico clínico de la sepsis severa.

Si bien se ha descrito la reducción de la VFC en sepsis, no se han aclarado los mecanismos que la determinan. Debido a la relación entre la menor VFC y el peor pronóstico, surge el interés por dilucidar dichos mecanismos.

Teóricamente, el aumento de la FC que se describe en la sepsis puede explicarse por dos cambios en la modulación de la función del nodo SA: un incremento relativo de la modulación simpática o una disminución de la parasimpática. En ratas anestesiadas se comprobó que la inyección de LPS producía un aumento de la actividad nerviosa simpática registrada a nivel renal concomitantemente con taquicardia [51].

Las posibilidades a plantear para explicar la reducción de la VFC son más complejas porque podría deberse, en el caso de la regulación simpática, por ejemplo, tanto a una disminución como a un aumento de la misma. En el segundo caso la imposibilidad de modulación estaría dada por la saturación del sistema. Según Schumacher y col. [52] cuando una división del SNA supera a la otra en forma aplastante, la dinámica que subyace a la VFC se vuelve determinística y estacionaria. Esta pérdida de modulación autonómica podría aislar al corazón de sus mecanismos de control, impidiendo que el sistema cardiaco se adapte a estímulos internos y externos

A su vez, estas modificaciones en la modulación autonómica podrían ser causadas por actividad alterada del SNA (disfunción autonómica) y/o por la forma en la cual el corazón responde a dicha modulación (acoplamiento entre el SNA y el marcapaso cardíaco).

Por ejemplo, se ha descrito recientemente que las aurículas derechas aisladas de ratas sépticas 5 h después de haberles inyectado LPS tienen una respuesta cronotrópica negativa atenuada en comparación con las aurículas controles [53]. Previamente a aislar las aurículas, las ratas presentaban VFC disminuida. Los autores concluyeron que la inflamación sistémica está ligada a la capacidad disminuida del corazón para responder a los estímulos colinérgicos y que este desacople parcial del marcapaso cardíaco del control neural autonómico podría explicar la reducción de la VFC durante la sepsis. La respuesta cronotrópica adrenérgica no se vio alterada.

También se ha argumentado a favor de mecanismos intracardíacos para explicar la disminución de la VFC, como por ejemplo, los cambios en las corrientes iónicas de las células marcapaso [54]. Se ha descrito que LPS *in vitro* reduce la corriente marcapaso I_f en miocitos auriculares [55]. Esto estaría en contra del aumento en 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 la corriente I_f . También se ha publicado que los cardiomiocitos de ratas sépticas (por administración intratraqueal de *S. Pneumoniae*) presentan expresión alterada de transportadores lo cual produce desequilibrios iónicos que involucran al calcio y el sodio [56] y por lo tanto podrían determinar cambios del ritmo cardíaco. En miocitos ventriculares aislados 18 h después de la inducción de sepsis en ratas, se ha descrito un V_m en reposo más bajo [57].

Se ha estudiado el rol de las citoquinas en las alteraciones de la VFC. Por ejemplo, en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica se ha encontrado una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de IL-6 y la VFC en 24 h, aunque no se ha demostrado una relación causa-efecto entre ambos [58]. Malave y col. plantearon la hipótesis que la sobre-expresión de TNF con la subsiguiente pérdida de capacidad de respuesta al estímulo β -adrenérgico contribuiría al descenso de la VFC observado en esa patología [59].

La IL-6 está elevada en sangre dos días antes del diagnóstico clínico de sepsis neonatal. Se ha demostrado en cardiomiocitos neonatales que la IL-6, la IL-1 β y el TNF- α aumentan la frecuencia de descarga y bloquean el efecto cronotrópico positivo de la estimulación adrenérgica con isoproterenol. Gulick y col. demostraron que IL-1 y TNF derivados de los macrófagos inducen una potente inhibición de la respuesta contráctil de miocitos cardíacos a la estimulación adrenérgica [60]. Esta respuesta disminuida se ha correlacionado con menor producción de AMP $_c$ (segundo mensajero de la acción adrenérgica) incluso cuando se mantiene la densidad y afinidad de los receptores β -adrenérgicos [61]. En células sanguíneas humanas de pacientes sépticos también se detectaron defectos post-receptoriales en la transducción de señales β -adrenérgicas relacionadas con la síntesis disminuida de AMP $_c$. Esto se reprodujo en linfocitos humanos sanos cultivados con el suero de pacientes sépticos [62]. Se concluyó que ciertos factores solubles en el plasma de los pacientes sépticos inhiben la adenilato ciclasa por activación de la proteína G $_{ai}$. Boillot y col. obtuvieron resultados similares estudiando el corazón aislado de rata 3 h después de la inducción de sepsis mediante inyección de *E. coli* [63]. Estos corazones estimulados con isoproterenol no presentaron diferencias con los controles en la respuesta cronotrópica aunque mostraron menor densidad

de receptores adrenérgicos y menor producción de AMP_c. Sin embargo, otros autores han demostrado que la aurícula derecha aislada de ratas en estadios tempranos de sepsis es hipersensible a las acciones cronotrópicas de los agonistas β - adrenérgicos [64]. En miocitos ventriculares aislados de ratas sépticas 18 h después de la inducción de sepsis, la respuesta a la estimulación adrenérgica no se diferenció de las células aisladas de ratas sham a pesar de diferencias encontradas en el V_m en reposo [57].

Además de la reducción de la VFC, se han encontrado otras características anormales del ritmo cardíaco en sepsis. Por ejemplo, Griffin y col. [65] describieron en neonatos sépticos, desaceleraciones transitorias en un contexto de baja VFC y lo correlacionaron con un mayor riesgo de mortalidad. Fairchild y col. [66] inyectaron altas dosis de LPS a ratones y observaron un aumento de la FC y una caída de la VFC luego de 2-15 h, correlacionado con un pico de expresión de diversas citoquinas. En algunos de los ratones observaban previamente una bradicardia transitoria. En otro estudio, los mismos autores encontraron también esas bradicardias previas al descenso de la VFC al inyectar distintos patógenos a los ratones y lo explicaron por activación parasimpática [67]. La activación parasimpática en respuesta a la sepsis podría explicarse entre otras razones por el reflejo inflamatorio descrito por Tracey [68]. Este autor propone que la activación vagal involucrada también afectaría al corazón y por lo tanto la VFC (figura 5). Se sugiere que podría haber un aumento de la VFC en esas condiciones.

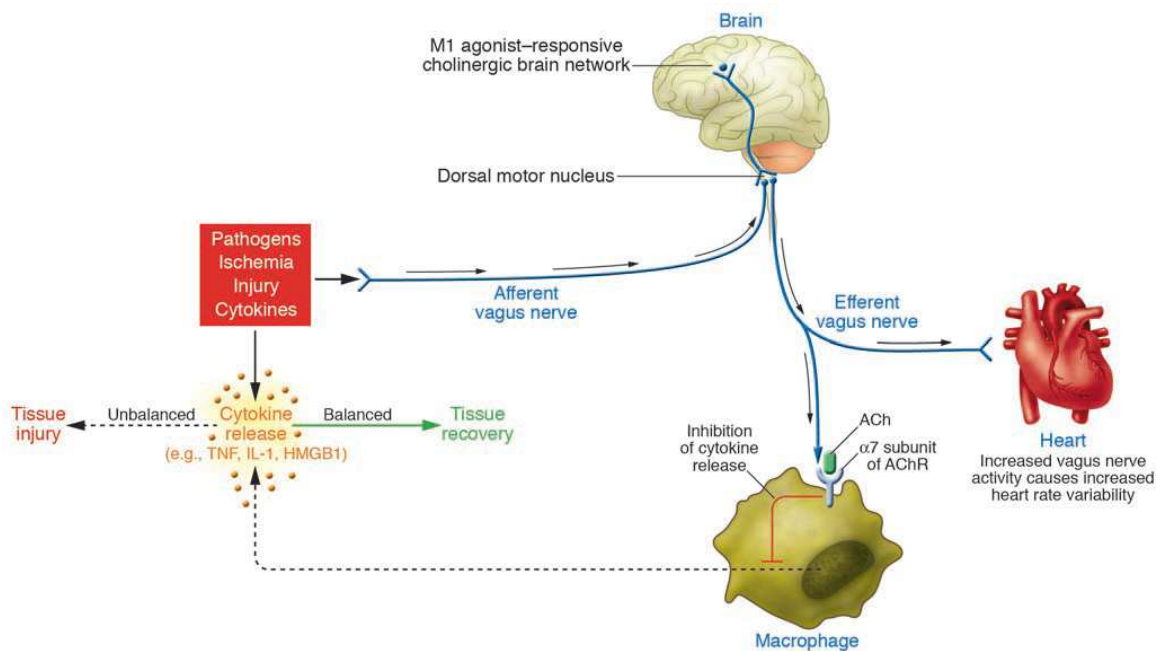


Figura 5. Reflejo inflamatorio y Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca

Este esquema es muy parecido al mostrado en la figura 4 pero en éste, los autores incluyen el posible efecto directo sobre el corazón que tendría la actividad eferente vagal aumentada. Tomada de [68].

La reducida VFC en la sepsis podría explicarse entonces por un desequilibrio simpato-vagal en el cual la rama simpática domina por su actividad exacerbada pero que podría estar acompañada por actividad parasimpática aumentada, disminuida o normal.

En resumen, 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. Resulta relevante su estudio por la relación entre la pérdida de la VFC y el pronóstico adverso de los pacientes sépticos pero también para conocer cómo se conectan ambos fenómenos.

3. Objetivos

Objetivo general

Dilucidar los mecanismos que determinan la reducción de la VFC en la sepsis experimental en la rata.

Objetivos específicos

1. Determinar la relación entre la reducción de la VFC y la mortalidad en ratas sépticas.
2. Analizar si el corazón de ratas sépticas presenta modificaciones intrínsecas de su cronotropismo.
3. Analizar el acoplamiento entre el SNA y el corazón en ratas sépticas.
4. Evaluar la funcionalidad del sistema nervioso autónomo en ratas sépticas.

Hipótesis

La reducción de la VFC en la sepsis experimental se debe a un desequilibrio de la modulación autonómica cardíaca a favor de la regulación simpática. Las hipótesis para cada objetivo específico serán planteadas al describir los experimentos realizados.

4. Estrategia

Se registró el ECG de la rata consciente antes y después de la inducción de sepsis peritoneal. Se analizaron los cambios de la VFC y la mortalidad de modelos de inducción de sepsis con distinto grado de severidad de la agresión para determinar la relación entre la reducción de la VFC y la mortalidad.

Como primera aproximación para analizar la reducción de la VFC en la sepsis, simplificamos el preparado experimental aislando el corazón séptico para estudiar su comportamiento cronotrópico intrínseco y la forma en que responde a los neurotransmisores autonómicos.

Se evaluó la funcionalidad de ambas ramas del sistema nervioso autónomo, midiendo indirectamente su actividad eferente. La actividad simpática se evaluó cuantificando la concentración de catecolaminas en plasma. La actividad parasimpática se evaluó midiendo las concentraciones de ACh y colina (precursor y metabolito del neurotransmisor) en la aurícula derecha aislada.

Todos los experimentos se hicieron también en un grupo de ratas a las que se les realizó la inducción simulada de sepsis (ratas sham) para su comparación con las ratas sépticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se hace primero una descripción general de los métodos utilizados, independientemente de los experimentos realizados para cumplir con los objetivos planteados.

En todos los casos el único animal de experimentación utilizado fue la rata. Los protocolos experimentales fueron aprobados por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) de la Universidad de la República (protocolos A5373-01 y 071140-002232-12).

1. Análisis de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca de la rata (*in vivo*).

1.1. Colocación del transmisor telemétrico.

El registro eléctrico de la actividad cardíaca (ECG) de la rata consciente sin restricción del movimiento se hizo mediante un transmisor telemétrico subcutáneo (CA-F40, Data Sciences International, MN, Estados Unidos). Estos transmisores pesan 7 g y tienen un volumen de 3 ml (figura 6). Pueden ser utilizados en animales de peso corporal entre 175 g – 2.5 kg. Tienen dos electrodos formados por un doble espiral de acero inoxidable recubierto por teflón.



Figura 6. Transmisor telemétrico para registrar la actividad eléctrica cardíaca *in situ*

El sector blanco incluye la batería. Los electrodos presentan el largo original pero son cortados para adaptarlos al tamaño de la rata.

Para implantar el transmisor, se realizó una cirugía con la rata anestesiada con un equipo de anestesia inhalatoria (VetEquip Incorporated, CA, Estados Unidos). Se introdujo al animal en la cámara de inducción hermética y se lo dejó allí durante 5 min con un flujo de O₂ de 1 l/min y una concentración

de isofluorano de 3% (Forane, Abbott, Uruguay). Una vez cumplido ese tiempo, el animal se ubicó sobre una bandeja de poliestireno expandido y se le colocó un cono nasal para la inhalación del anestésico. El cono se sujetó con hilo dental por detrás de los incisivos superiores para mantenerlo bien ubicado pese a los cambios de posición del animal necesarios para la cirugía. El mantenimiento de la anestesia se realizó con un flujo de O₂ de 0.5 l/min y una concentración de Forane de 2%. Se observaban las reacciones del animal para ajustar la concentración de anestésico.

La cirugía comenzaba con el animal en decúbito dorsal. Se depilaban dos zonas ventrales en el tórax, en la línea claviclar media derecha a la altura de la escotadura esternal y en la línea claviclar media izquierda a nivel de la apófisis xifoides (figura 7). Los electrodos subcutáneos ubicados en esas zonas permitían realizar un registro de la actividad eléctrica del corazón de forma similar a la derivación DII del ECG convencional. Luego de la depilación, se desinfectó la piel, se inyectó lidocaína en ambas zonas y se realizó un pequeño corte con bisturí (1 ml de lidocaína para todo el procedimiento; vía subcutánea antes de los cortes e instilada luego de los mismos). Se giraba al animal para que quedara apoyado sobre el vientre y se depilaba la zona dorsal a nivel de la línea media (figura 7). Se desinfectaba, se inyectaba lidocaína y se cortaba con bisturí (hoja nº 20) una línea de aproximadamente 3 cm de longitud. Se hacía un bolsillo subcutáneo hacia la izquierda con tijera de punta roma. Allí se alojaba el transmisor, el cual se fijaba al músculo mediante dos suturas usando las ranuras que tiene la cobertura del transmisor. Cada uno de los dos electrodos se hacía viajar a través de un túnel subcutáneo para que el extremo alcanzara uno de los orificios del sector ventral. El túnel subcutáneo se construía con una sonda metálica rodeada de un catéter flexible. De esa forma, el túnel subcutáneo quedaba formado por el catéter al cual se le extraía la sonda. Se hacían viajar los electrodos por el túnel. Una vez que los electrodos asomaban por cada orificio ventral, se extraía el catéter. La primera vez que se usaron, los electrodos se cortaron de forma tal de ajustar su largo para que los extremos terminaran al nivel de los orificios ventrales. Cuando el transmisor era reutilizado, se facilitaba la maniobra si una vez que el electrodo asomaba por el orificio ventral, se sujetaba con una pinza hemostática para asegurarse que no

se retrajera hasta el momento en que era suturado al músculo pectoral. Se suturaba la piel dorsal con agrafes de 9 mm y se bañaba la herida con iodo.

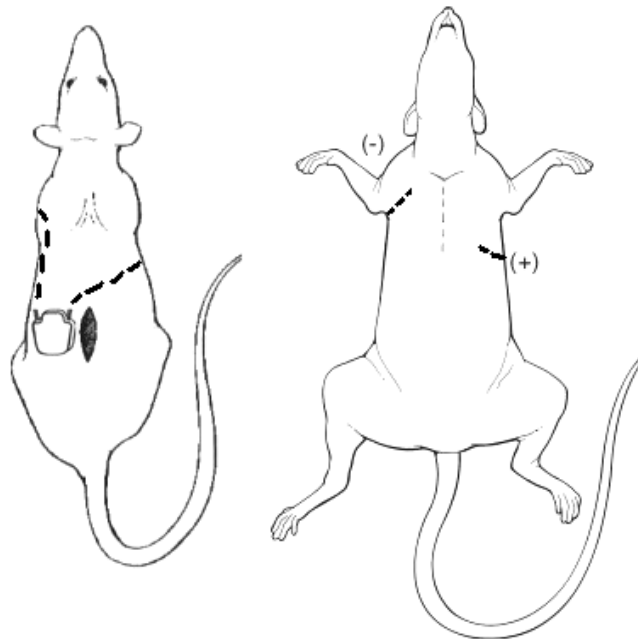


Figura 7. Ubicación del transmisor y los electrodos en la rata para registrar el ECG
(Modificada del Manual de la empresa que fabrica los transmisores: Data Science International, Inc)

Se volvía a girar al animal para suturar los electrodos en los músculos pectorales de forma tal que un sector sin teflón quedara en contacto con el músculo (figura 8). Se cerraba el corte de la piel con un agrafo y se aplicaba un desinfectante (iodofón). Se colocaba al animal en su caja y ésta sobre una almohada térmica hasta que el animal despertaba de la anestesia, lo cual ocurría muy rápidamente.

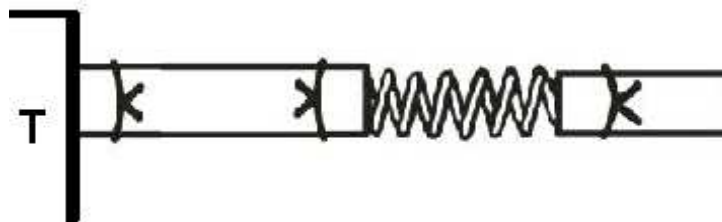


Figura 8. Electrodo para el registro del ECG

La cubierta de teflón se corta de forma tal que un sector del electrodo queda expuesto. Esa zona se sutura en el músculo pectoral. La punta del electrodo también se cubre con teflón para evitar dañar el tejido. Modificado de Data Sciences International

1.2. Registro del ECG de la rata consciente.

Para registrar el ECG de una rata que tenía implantado el transmisor, se colocaba la caja en la que estaba alojado el animal sobre la bandeja de registro. El transmisor tiene una llave magnética que permite encenderlo pasando un imán sobre la caja. La bandeja de registro recibía entonces las señales telemétricas (de radiofrecuencia) y las convertía en señales eléctricas. A su vez, la bandeja de registro estaba conectada a una computadora a través de una tarjeta conversora analógica/digital (1208 FS Measurement Computing, Norton, Massachusetts, EEUU). Se adquiría la señal a una frecuencia de muestreo de 1000 Hz durante 60 min, con un programa escrito en DasyLab. Al finalizar el registro se apagaba el transmisor con el imán y se guardaban los archivos generados para su posterior análisis. La vida de la batería es de 6 meses estando el transmisor encendido.

Una vez finalizado el protocolo experimental se realizaba la eutanasia de la rata y se extraía el transmisor. Antes de volver a utilizarlo en otro animal, el transmisor se limpiaba con detergente enzimático Terg-A-Zyme® 1% y se esterilizaba químicamente con glutaraldehído al 2%.

1.3. Procesamiento de los registros del ECG

Los registros adquiridos en formato numérico se analizaron “off line”. Para ello se importó el archivo con el programa Spike2 (version 6.07, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido). Se ubicaba un cursor horizontal como umbral de detección de forma tal que sólo fuera superado por las ondas R y se realizaba la detección automática de las mismas. Se inspeccionaba visualmente para corroborar que todas las detecciones correspondieran con latidos sinusales y que todas las ondas R hubiesen sido efectivamente detectadas. Las detecciones automáticas fueron corregidas en los casos necesarios, agregando o borrando marcas. La figura 9 muestra un ejemplo de cómo se visualiza el registro del ECG con el programa Spike y las detecciones de las ondas R realizadas automáticamente por dicho programa. Una vez que las detecciones eran confiables, el programa medía el intervalo de tiempo entre ellas y generaba una lista de intervalos RR que se exportaba como un archivo de texto.

El archivo con los intervalos RR se abría luego con el programa VFC32 [69] para filtrar automáticamente la señal, con el objetivo de descartar falsos positivos o negativos que hubieran permanecido luego de la inspección visual [19]. Se descartaban los archivos en los cuales el porcentaje de intervalos RR corregidos fuera superior al 10% del total de intervalos RR del registro. Finalmente, el mismo programa calculaba diversos índices de VFC.

De todos los índices que ofrecía el programa VFC32, se seleccionaron la FC (inversa del intervalo RR promedio) y dos índices de VFC en el ámbito del tiempo, el SDNN y el RMSSD que miden variabilidad global y variabilidad latido a latido respectivamente (tabla 1). Además se calculó el CV (ver Introducción).

En nuestro estudio previo realizado en pacientes con sepsis [50], se analizaron además de los índices estadísticos, diversos índices, incluidos los geométricos y espectrales. Los índices que lograron discriminar los pacientes que evolucionarían a disfunción multiorgánica de los que tendrían buena evolución fueron los índices RMSSD y LF (caso-control, $N=11$ en cada grupo). En el presente estudio no se utilizaron los índices espectrales porque, como se explicó en la Introducción, el procedimiento para estimarlos no está estandarizado para los humanos y menos aún para los roedores. Se encuentran diversas definiciones de bandas de frecuencia de acuerdo a los distintos investigadores [22] [28] [70] [71]. Además, los requisitos para obtener valores confiables son mucho más estrictos; por ejemplo, la señal debe ser estacionaria. Nuestra experiencia muestra además, que los índices espectrales presentan rangos de variación enormes dentro de los grupos estudiados. Fairchild y col. han argumentado además, que al menos en roedores, los índices espectrales no aportan más información que la obtenida a partir de los estadísticos [67]. El RMSSD ha sido correlacionado con la modulación parasimpática de la FC e incluso se ha argumentado que tiene ventajas sobre el índice HF por estar menos afectado por los cambios en la respiración [72].

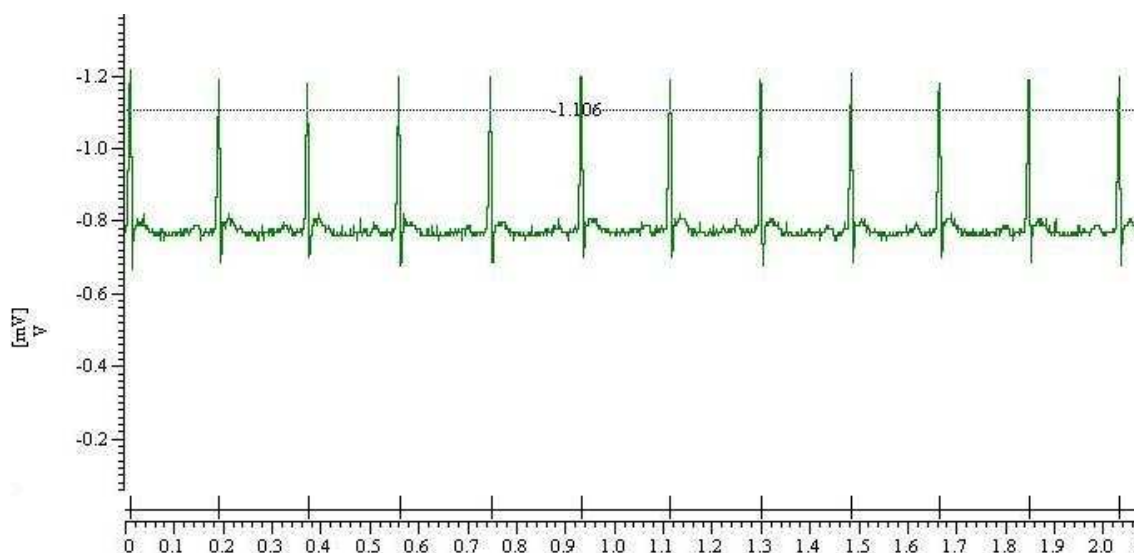


Figura 9. ECG de una rata consciente

El archivo fue importado con el programa Spike. Se ve el registro eléctrico en función del tiempo (segundos). Se muestran sólo 2 s del total de 60 min del registro. El umbral de detección es la línea horizontal que cruza las ondas R, en este caso en el nivel de voltaje -1.1 mV. Se observa inmediatamente por encima del eje temporal, las detecciones automáticas de las ondas R realizadas por el programa.

1.4. Estudio de la estabilidad de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca en ratas conscientes.

Se colocó el transmisor en ocho ratas macho con un peso inicial de 240-293 g. Se registró el ECG como se describió arriba, enseguida de colocado el transmisor (día 0) y durante una semana todos los días de mañana.

La figura 10 muestra los valores de FC y VFC a lo largo de los días. Si bien se observan variaciones en los valores para cada día, las diferencias no son significativas cuando se realiza un análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas. Tampoco se observa una tendencia, por ejemplo, de reducción de la FC, que podría sugerir que las variables están en proceso de estabilización luego de la cirugía en la que se les implantó el transmisor a las ratas. A partir de estos resultados se decidió que un período de recuperación de 48 h era suficiente a pesar que en varios estudios se espera una semana o más para continuar con los subsiguientes protocolos.

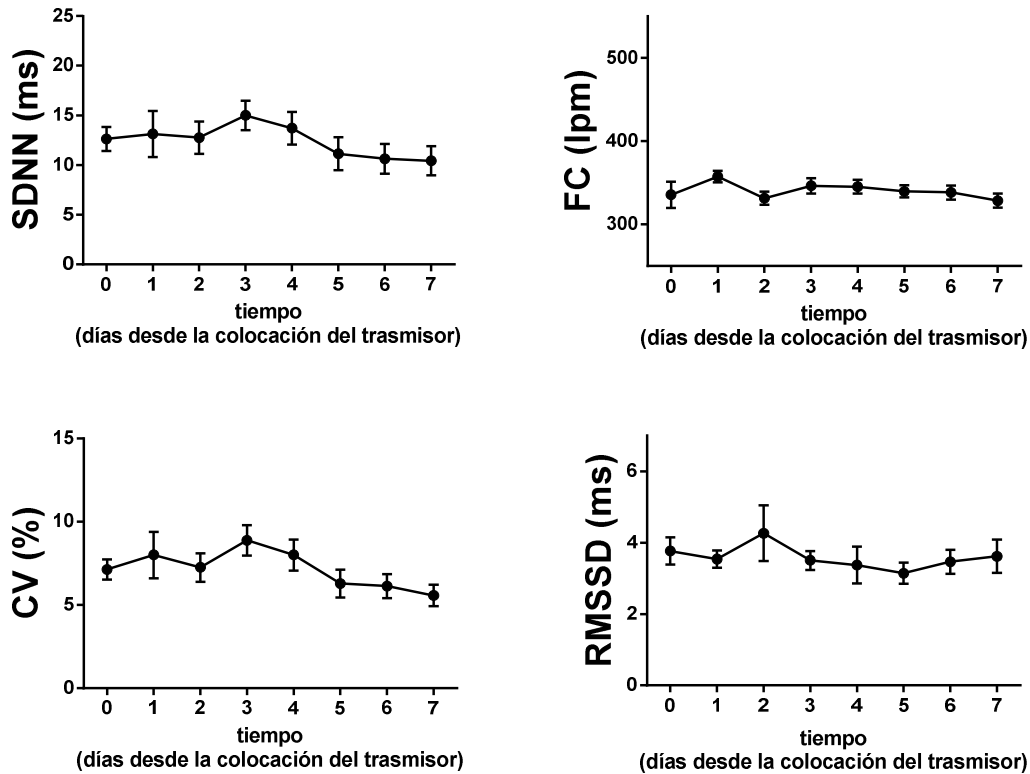


Figura 10. Variabilidad de la Frecuencia Cardiaca en ratas a lo largo de una semana.

El día 0 es cuando se coloca el transmisor telemétrico. Los índices son obtenidos de registros del ECG de 1 h de duración realizados en las mañanas. Se grafica la media ($N=8$) y el error estándar de la media (SEM) de cada día.

2. Análisis del cronotropismo 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 baroreceptores del seno carotídeo y la aorta [52].

Se realizó la inducción anestésica y el mantenimiento de la misma forma que se describió arriba, con la rata en decúbito dorsal. Se sujetaron los miembros del animal con cinta adhesiva de papel sobre la bandeja de cirugía. Se abrió el tórax cortando la parrilla costal desde el centro hacia ambos lados. Se expuso el corazón y se tomaron los grandes vasos entre los dedos antes de cortar por encima de ellos para aislar el corazón. Se lo colocó rápidamente en un vaso de bohemia con solución salina previamente oxigenada para transportarlo hasta el “setup” de corazón aislado.

Se perfundió el corazón mediante la técnica de Langendorff, es decir, en forma retrógrada mediante una cánula colocada en la aorta. La perfusión se realizó a velocidad constante (aproximadamente 9 ml/min) con solución Tyrode mantenida a 37°C. La composición de la solución Tyrode utilizada por nosotros fue, en mmol/l: NaCl 140; KCl 5.4; MgCl₂ 1; CaCl₂ 2; NaH₂PO₄ 0.33; glucosa 10 y HEPES 10. El pH se ajustaba previamente a 7.4 con NaOH a 37°C. La solución se burbujeaba con O₂ al 100 %.

Se atravesaba el miocardio con un par de electrodos, uno ubicado en la aurícula derecha y otro en el cono de la arteria pulmonar. Se registró la actividad eléctrica espontánea usando un amplificador Tecnomed, un conversor A/D LabMaster y el software Axotape. La frecuencia de muestreo fue de 500 Hz.

Se dejaba estabilizar el corazón durante 25 min antes de realizar cualquier cambio de solución.

Los archivos se guardaban para su posterior análisis. Para construir los tacogramas de todo el experimento, se importaban los archivos de los registros con Spike2 y se procesaban de forma similar a como se describió para los registros del ECG del animal consciente. Se ubicaba el cursor horizontal para realizar las detecciones automáticas de la primera onda de cada ciclo, para analizar de esa manera el ritmo sinusal. Aquí también se inspeccionaban las detecciones antes de medir automáticamente el intervalo entre ellas y se exportaba el archivo que contenía una lista de intervalos a partir de la cual se construían los tacogramas de FC instantánea.

3. Inducción de sepsis por ligadura del ciego e infección

Como se describió en la Introducción, el modelo de contaminación endógena que incluye la **ligadura y perforación del ciego** (del inglés, **CLP** por cecal ligation and puncture) es uno de los más utilizados para inducir sepsis abdominal polimicrobiana. Este procedimiento lo aprendí en el departamento de Fisiopatología de la Facultad de Medicina (Mariana Seijas y Cecilia Baccino).

Se inducía y mantenía la anestesia con isoflurano como se explicó arriba con el animal en decúbito dorsal. Se sujetaban sus miembros y se depilaba la

zona abdominal. Se desinfectaba la piel y se inyectaba lidocaína (0.5 ml en total por vía subcutánea o instilada). Con un bisturí se hacía una incisión abdominal longitudinal de la piel y el músculo de aproximadamente 3 cm de largo en la línea media. Se ampliaba la abertura con separador quirúrgico y se localizaba el ciego. A diferencia de lo que ocurre en los seres humanos, la ubicación del ciego en la rata es variable. De un total de 88 ratas macho analizadas en nuestros experimentos, el 57 % presentó el ciego en el centro, el 36 % a la izquierda y el 7 % a la derecha. Otros autores estudiaron la ubicación del ciego definiendo dos posiciones, izquierda o derecha, y encontraron un porcentaje muy superior de localización a la izquierda en comparación con la derecha en ratas Wistar [73]. El ciego se extraía con una pinza y se apoyaba sobre gasa embebida en suero fisiológico estéril sobre el cuerpo del animal (figura 11). Se ligaba por debajo de la válvula ileocecal de forma de no impedir la comunicación entre el intestino delgado y el grueso. Se realizaba una segunda ligadura de forma de dividir el ciego a la mitad (figura 11). Se perforaba el ciego con aguja 18 G y se presionaba con los dedos de forma de asegurarse que algo de materia saliera por el orificio. De acuerdo a la bibliografía, se puede aumentar la severidad del modelo aumentando el número de perforaciones. Nosotros ensayamos 2, 4 y 10 perforaciones. Otros autores llegaron a describir 14 perforaciones en ciegos más pequeños como el del ratón [74].

Probamos además, una variedad más agresiva, no descrita en la bibliografía consultada. En lugar de perforaciones con aguja, luego de las ligaduras se realizó un corte con bisturí de aproximadamente 1 cm de longitud. A este modelo le llamamos **CLP modificada**.

A continuación, se volvía a ubicar el ciego en su lugar y se suturaba el músculo abdominal con aguja de sutura e hilo estériles (hilo 4-0 de nylon). Se cerraba la herida de la piel con 4-5 agrafes. Se desinfectaba y se inyectaba suero fisiológico estéril para reponer líquido que pudiera haberse perdido durante la cirugía (10 ml/kg de peso) [44]. Además, el shock séptico se caracteriza por un déficit en el volumen circulatorio efectivo debido a la pérdida de fluido desde los capilares hacia el espacio intersticial. La resultante perfusión sanguínea insuficiente contribuye significativamente con la fisiopatología de la sepsis. Este déficit estaría atenuado al administrar suero

fisiológico; de acuerdo a Hubbard y col. en una dosis de 30 ml/kg subcutánea [44].

Finalmente se volvía a colocar al animal en su caja, sobre una hoja de papel absorbente y se ubicaba la caja sobre una almohadilla térmica hasta que se confirmaba que reaccionaba (generalmente en pocos minutos).

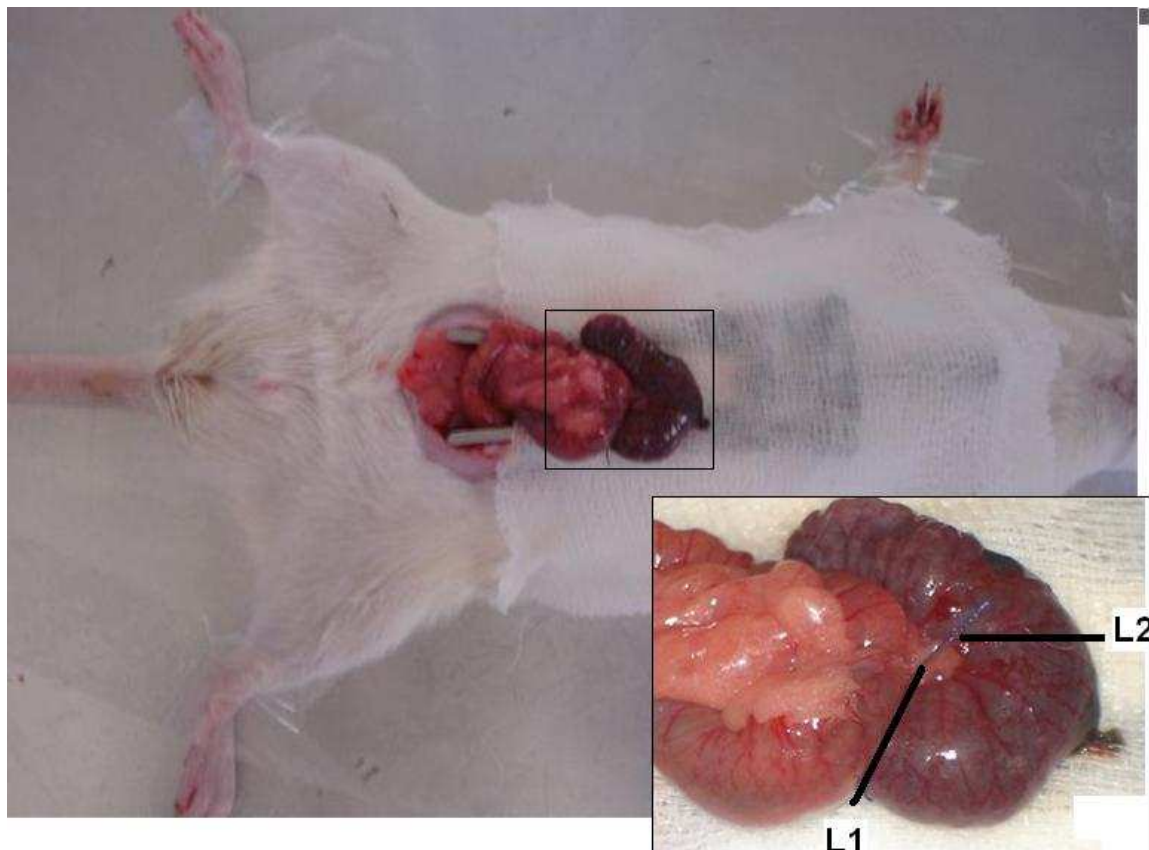


Figura 11. Ubicación de las ligaduras del ciego.

Se muestra la rata en el momento de ligar el ciego el cual está apoyado sobre una gasa húmeda (por debajo se trasluce el separador quirúrgico). El cuadro que incluye el ciego se amplía para mostrar los sitios de las ligaduras. En todos los casos se realiza la ligadura indicada como L1, que separa el ciego del resto del intestino. Cuando se hace doble ligadura, se liga además la zona indicada como L2. De acuerdo a Singleton y col., la distancia de ciego ligada puede determinar la mortalidad del modelo CLP así como los niveles de citoquinas circulantes [75].

En otro grupo de animales ensayamos un modelo original que combina la ligadura del ciego descrita en la CLP con el inóculo fecal descrito por Chopra y col. [47]. Como se dijo en la Introducción, la ligadura del ciego provee una fuente de tejido necrótico que habitualmente se encuentra en la sepsis clínica [44]. Después de ligar el ciego, se lo volvía a ubicar en el peritoneo sin

perforarlo y se derramaba la solución fecal antes de cerrar la herida. La solución fecal se preparaba con suero fisiológico estéril (300 mg/5 ml) y se administraba en dosis de 200, 300 o 400 mg/kg. En nuestro protocolo no usamos una rata donante para extraer la materia del ciego sino que se preparó con materia fecal fresca de la propia rata, habitualmente obtenida de la caja de inducción anestésica. A este modelo lo denominamos **CLF**.

Otros investigadores también ensayaron la combinación de ligadura cecal e infección pero en su caso mediante inyección de E.Coli [76].

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 las perforaciones o la infección (sepsis simulada o “sham” por la palabra en inglés). Sólo se administraba un volumen equivalente de solución salina estéril en el peritoneo.

El volumen de reposición fue el mismo en todos los animales independientemente del modelo de sepsis usado ya que para calcular el volumen necesario para reponer los 10 ml/kg (vía subcutánea) se restaba el volumen administrado de lidocaína y del inóculo fecal en caso de corresponder.

4. Métodos realizados por otros investigadores.

Los investigadores que realizaron las técnicas descritas a continuación, no conocían a qué grupo pertenecían las muestras que analizaban.

4.1. Hemocultivos

Realizados en el Departamento de Bioquímica Clínica de la Facultad de Química, Universidad de la República, por la Dra. Graciela Borthagaray y la Lic. Ana Ingold.

Con el corazón expuesto, antes de aislarlo para montarlo en el “setup” de Langenodoff, se tomaba una muestra de sangre intracardíaca para realizar un hemocultivo. Se extraían aproximadamente 2 ml de sangre del ventrículo derecho con jeringa y aguja 21 G estériles. Se inoculaba la muestra en una botella con medio de cultivo (Oxoid Signal® Blood Culture System, Oxoid Ltd.,

Basingstore, Reino Unido) y se la llevaba a la Facultad de Química donde era analizada por el Departamento de Bioquímica Clínica.

Se conectaba a la botella de hemocultivo el dispositivo indicador de crecimiento de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los cultivos se incubaban aeróbicamente a $36 \pm 1^\circ\text{C}$. Los sistemas de cultivo usados están diseñados para el cultivo de organismos aeróbicos, anaeróbicos y micro-aerofílicos [77] [78] y para crear presión en la botella sellada cuando los organismos están creciendo [79].

Los cultivos se examinaban diariamente y cuando se detectaba crecimiento se continuaba el estudio por subcultivo y microscopía. Cada botella de cultivo positiva era sub-cultivada en agar de sangre ovina al 5% y cultivada aeróbicamente, examinada luego de 24 h y re-incubada por otras 24 h. Las botellas de cultivo se examinaban diariamente para detectar crecimiento positivo por 7 días y si no había crecimiento en ese período, eran estudiadas por sub-cultivo y microscopía antes de declarar el hemocultivo como negativo. Las bacterias aisladas eran identificadas por métodos convencionales [80] y por método automático usando el sistema Vitek-2 (bioMérieux Inc., EEUU).

4.2. Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)

4.2.A. Determinación de la concentración de catecolaminas en plasma.

Este método fue realizado en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) por los Dres. Juan Andrés Abin-Carriquiry (Departamento de Neuroquímica y Plataforma HPLC) y Marcela Martínez (Plataforma HPLC).

La muestra de sangre se tomaba con el corazón expuesto de la rata anestesiada, como se explicó arriba en el procedimiento para aislar el corazón. Se extraían aproximadamente 2 ml de sangre del ventrículo derecho con jeringa y aguja (21 G) estériles previamente enjuagadas con heparina sódica concentrada (5000 UI/ml). Se quitaba la aguja y se descargaba la sangre contenida en la jeringa en tubos de plástico cónicos con tapa (aproximadamente 1 ml por tubo). Se mantenían los tubos en hielo hasta el momento de centrifugarlos a 2400 rpm durante 10 min para separar el plasma

(sobrenadante). Se guardaba el plasma en otros tubos que se almacenaban a -80°C hasta el momento del ensayo para determinar catecolaminas en el IIBCE.

Para realizar el análisis de catecolaminas (Nor y adrenalina) se agregaban 200 µl de plasma a un tubo cónico de 1.5 ml que contenía aproximadamente 15 mg de alúmina. Luego se agregaba DHBA (estándar interno) y 350 µl de buffer Tris (pH 9.2) y se agitaba por 15 min. Se centrifugaba (2000 x g) por 5 min y se descartaba el sobrenadante. Se lavaba la alúmina 2 veces con 1.4 ml de agua. Después de remover y descartar el último enjuague, se agregaban 150 µl de ácido perclórico (0.25 M) y se mezclaba con vórtex por 5 min. Se centrifugaba nuevamente (5000 x g) por 5 min y se removía el sobrenadante a otro tubo, el cual se mantenía en hielo hasta la inyección de la muestra.

Se inyectaban 100 µl de la muestra en el sistema HPLC (PM-80 BAS, West Lafayette, IN, EEUU) equipado con una columna C18 (partículas de 5 µm, 220 mm x 4.6 mm; BAS, EEUU) y un detector electroquímico (LC-4C BAS) con potencial de oxidación establecido en + 0.65 V (electrodo activo de carbono vs. electrodo de referencia de Ag/AgCl). La fase móvil estaba compuesta por ácido cítrico (0.15 M), octilsulfato de sodio (0.6 mM), 4% acetonitrilo y 1.6% tetrahidrofurano a pH 3.0; con un flujo de 1.2 ml/ min [81].

4.2.B. Determinación de la concentración de ACh en aurícula derecha.

Debido a la rápida hidrólisis que sufre la ACh una vez que es liberada, no se espera detectarla en plasma. Por ese motivo, se midió la concentración en el tejido. Se seleccionó la aurícula derecha porque incluye al nodo sinusal, y es la zona de mayor densidad de inervación parasimpática del corazón.

Este método fue realizado en el Neurochemistry Core Lab del Vanderbilt University Medical Center (Nashville, EEUU) por Raymond F. Johnson.

Se exponía el corazón de la rata anestesiada como se explicó arriba para la técnica de corazón aislado pero en este caso, se tomaba con una pinza la aurícula derecha y se la escindía tratando de recuperar todo el tejido

auricular. Se colocaba la aurícula en un tubo cónico de plástico de 1.5 ml de volumen y se lo tapaba antes de arrojarlo a un recipiente con nitrógeno líquido para congelarla rápidamente. La tapa del tubo tenía un orificio que se había hecho previamente con una aguja 27G. Las muestras de aurículas derechas eran almacenadas en un freezer a -80°C hasta el momento en que fueron enviadas al laboratorio de Estados Unidos para su análisis. Las muestras viajaron en conservadora de poliestireno expandido conteniendo hielo seco y fueron transportadas por una empresa de encomiendas que garantizó la entrega al destinatario en menos de 48 h.

En la mayoría de la bibliografía consultada [82] [83] y de acuerdo al protocolo sugerido por el laboratorio que realizó el procedimiento, el método incluía la irradiación con microondas del animal o del tejido para desnaturalizar la acetilcolinesterasa y evitar que desapareciera la ACh. Sin embargo, dado que nuestro método de eutanasia era precisamente la escisión de la aurícula derecha y que el método de congelamiento era muy rápido por hacerse con nitrógeno líquido, preferimos evitar el procesamiento en el horno microondas. Los resultados obtenidos avalaron el protocolo ensayado porque los valores de ACh en las ratas sham fueron incluso mayores a otros reportados en la bibliografía (ver Experimento 3).

El método para la determinación de las concentraciones de ACh y colina por HPLC incluía un reactor enzimático post-columna [84].

Se homogenizaba la muestra de tejido en 250 µl de acetonitrilo usando ultrasonido. La muestra se centrifugaba a 13000 g por 30 min. La fracción de acetonitrilo se transfería a un tubo limpio y se lavaba con 125 µl de heptano, 2 veces. La capa de acetonitrilo se evaporaba con un chorro de nitrógeno. Se agregaban 75 µl de la fase móvil de la HPLC (37.5 mmol de H_3PO_4 , pH 8.5) al tubo seco y se agitaba en vórtex. Finalmente, 50 µl de la muestra eran inyectados en el sistema HPLC equilibrado.

La determinación de ACh y colina por HPLC se basa en la reacción con la acetilcolinesterasa y la colina-oxidasa. Ambas enzimas están unidas a la fase estacionaria en el reactor enzimático inmovilizado post-columna. En el

ensayo, los extractos de tejido eran inyectados en la columna de HPLC la cual determina ACh y colina. Cada una de las sustancias, al dejar la columna, entraba en el reactor enzimático en el cual la ACh era convertida a colina por la acetilcolinesterasa, y posteriormente oxidada por la colina-oxidasa a peróxido de hidrógeno. Este producto de la reacción era entonces detectado amperométricamente y cuantificado con un electrodo activo de platino (+400 mv). El sistema de HPLC está compuesto de un inyector automático de muestras Waters 2707, una bomba Water 515 y un detector electroquímico Antec Decade. La columna de ACh empleada fue de Bioanalytical Systems.

El límite de sensibilidad para la determinación de ACh y colina fue 0.076 ng/mg de proteína (0.125 μ M).

5. Análisis estadístico

El análisis estadístico y los gráficos se hicieron con el programa GraphPad Prism (versión 6.00, GraphPad Software, La Jolla, CA, EEUU). Se utilizaron en todos los casos tests no-paramétricos y se consideraron significativos los valores de $P < 0.05$, de 1 o 2 colas según si la hipótesis planteada en la comparación indicaba o no el sentido de la diferencia.

Las comparaciones entre dos valores obtenidos del mismo animal o del mismo corazón se hicieron con el test de Wilcoxon para medidas pareadas. Las comparaciones entre grupos se hicieron con el test de Mann-Whitney. Se elige dar o mostrar gráficamente los valores de media $\pm$ SEM (a pesar que el test no paramétrico compara los valores de mediana) con el objetivo de agregar un dato más ya que en la mayoría de los gráficos se muestran todos los puntos y por lo tanto es posible determinar el valor de mediana.

EXPERIMENTO 1

Objetivo específico 1:

Determinar la relación entre la reducción de la VFC y la mortalidad en ratas sépticas.

Hipótesis:

A mayor severidad de la agresión del modelo de inducción de sepsis peritoneal mayor será la mortalidad de las ratas y menor su VFC.

Experimento:

Registrar el ECG de la rata consciente sin restricción de movimientos mediante telemetría y comparar la VFC antes y después de la inducción de sepsis peritoneal mediante modelos de distinta severidad de la agresión.

Justificación:

Nos interesa dilucidar los mecanismos que subyacen a la reducción de la VFC por su relación con la peor evolución de los pacientes sépticos. Por ello, es necesario corroborar que en la sepsis experimental de las ratas también existe esta relación. Analizamos la mortalidad y la reducción de la VFC en ratas a las que se les indujo sepsis peritoneal mediante modelos de distinta severidad de la agresión.

Descripción:

- Animales

Se usaron 64 ratas albinas derivadas de Wistar (lote 1). Eran ratas machos y adultas. Tenían una edad promedio de 13.7 ± 0.3 semanas y un peso inicial de 306 ± 5 g.

Se trabajó con 2 ratas simultáneamente, alojadas en cajas individuales. Las ratas permanecían en el laboratorio mientras duraba el protocolo (4 o 5 días). La comida y el agua estaban disponibles *ad libitum*. El régimen de luz y oscuridad era el natural. La temperatura ambiente se mantenía a 23°C con un equipo de aire acondicionado.

- Protocolo

Los lunes de cada semana se traían al laboratorio 2 ratas desde el bioterio de la Facultad de Medicina, ubicado en el mismo edificio. Esa misma mañana se implantaba el transmisor telemétrico para registrar el ECG de la rata consciente. El día miércoles, luego del registro del ECG de 1 h de duración

iniciado entre las 8 y las 11 AM, se realizaba la cirugía para provocar sepsis abdominal ($N=46$) o la misma cirugía sin las maniobras que inducen la sepsis (ratas sham, $N=18$). Si bien el modelo experimental para inducir sepsis en todos los casos fue la ligadura del ciego y la infección (CLI), se utilizaron variaciones para incrementar la severidad de la agresión.

El modelo con menor severidad de la agresión incluía una única ligadura del ciego y 2 perforaciones con aguja 18G (CLP, $N=9$). La severidad se incrementó, aumentando el número de ligaduras a 2 en todos los casos. La infección endógena se realizó con mayor número de perforaciones (4 y 10) o con un corte (CLP modificada, $N=6$). También se probó la doble ligadura del ciego más un inóculo fecal de 200, 300 o 400 mg/kg (CLF, $N=22$). La edad de los animales incluidos en cada modelo fue similar siendo el promedio en semanas 13.5; 13.9; 13.8 y 13.2 para los modelos sham, CLP, CLF y CLP modificada respectivamente.

Al otro día de la inducción de la sepsis (o inducción simulada), se volvía a registrar el ECG a la misma hora. En algunas ratas ($N=29$), el protocolo incluía el registro del ECG a las 24 y a las 48 h desde la inducción de la sepsis (figura 12). Luego del último registro del ECG, se aisló el corazón de las ratas para el estudio *in vitro* (Experimento 2).

Los registros de ECG anterior y posterior a la inducción de la sepsis se realizaron a la misma hora del día para cada animal para evitar variaciones debido al ritmo circadiano. La rata tiene hábitos nocturnos por lo tanto, en el horario de la mañana, se encuentra generalmente en reposo y presenta menor FC que en la noche [85]. Se procesaron los registros y se obtuvieron los valores de FC y los índices de VFC seleccionados: SDNN, CV y RMSSD.

- Análisis estadísticos

Las diferencias obtenidas en el experimento 1 se consideraron estadísticamente significativas si el valor de P de 1 cola < 0.05 . Se seleccionó 1 cola porque antes de realizar las comparaciones se preveía el sentido de la diferencia, por ejemplo, una reducción de la VFC en las ratas sépticas.

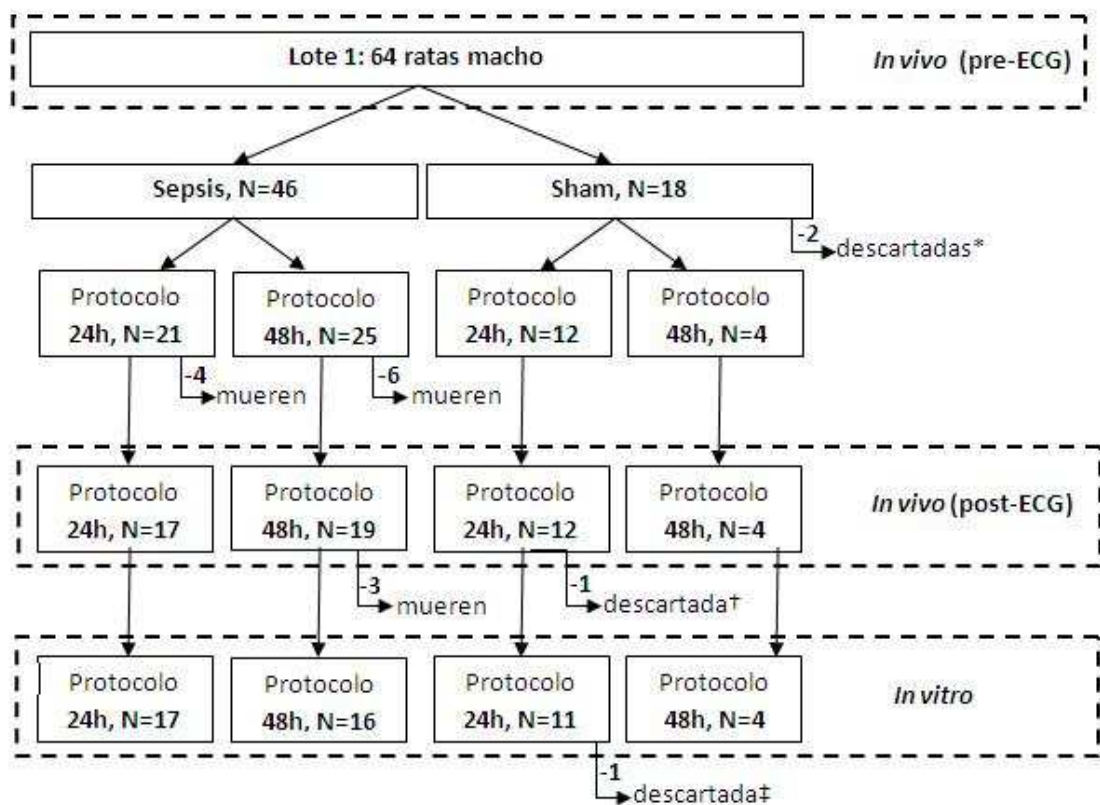


Figura 12. Esquema del número de animales utilizados: Lote 1

Cuatro ratas sham fueron descartadas en distintas etapas, lo que determinó que se considerara únicamente su registro del ECG previo a la inducción simulada de sepsis. Los motivos por los que debieron ser descartadas fueron: *: abrieron su herida abdominal, †: se perdió el archivo con el registro del ECG posterior a la inducción simulada de sepsis, ‡: se encontró un coágulo sobre el ciego en la necropsia. Se muestra además, el número de ratas sépticas que murieron.

- **Resultados y discusión**

La mortalidad fue 0 % en las ratas sham. En las ratas sépticas la mortalidad fue 22 % (10/46) al otro día de inducir la sepsis y 36 % (9/25) a las 48 horas (figura 12). Los resultados de mortalidad discriminados para cada modelo de CLI ensayado se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Mortalidad de los modelos de inducción de sepsis peritoneal.

Modelo de CLI	Mortalidad a las 24 h (%)	Mortalidad a las 48 h (%)
Sham	0/16 (0)	0/4 (0)
CLP (2, 4 o 10 perforaciones)	0/18 (0)	1/12 (8)
CLF (200, 300 o 400 mg/kg)	5/22 (23)	3/8 (38)
CLP modificada (corte)	5/6 (83)	5/5 (100)

CLI: ligadura del ciego e infección; CLP: ligadura y perforación del ciego; CLF: ligadura del ciego e inóculo fecal.

La mortalidad cambió con cada modelo de CLI ensayado ($P=0.0001$, test de Chi cuadrado para los valores a las 24 h). Por lo tanto, la severidad de la agresión creciente en los modelos de CLP, CLF y CLP modificada, se correspondió con mayor mortalidad. Sin embargo, la mortalidad no cambió con las variaciones dentro de cada modelo. Por ejemplo, la única rata que murió con el modelo de CLP ($N=18$), tenía sólo 1 ligadura y 2 perforaciones (y no 2 ligaduras y 10 perforaciones). Es decir que la mortalidad no se incrementó al incrementar el número de perforaciones, tal como lo describió Maier y col. al comparar la mortalidad en ratones con CLP con 1 o 2 perforaciones [86].

Las ratas sépticas presentaban algunos síntomas en grado variable, por ejemplo, letargia, piloerección y secreción alrededor de los ojos. Sin embargo, todas ellas dejaban de ingerir alimento.

Las necropsias de los animales sépticos mostraban: abdomen hinchado, cavidad peritoneal con fluido oscuro, ciego gangrenoso y órganos abdominales

adheridos entre sí. Las necropsias de las ratas sham no mostraban estos cambios. La única rata sham que presentó un coágulo sobre su ciego fue descartada (figura 12).

Los resultados de los hemocultivos en las ratas sépticas fueron negativos en el 24% (6 de 25) y positivos en el 76% (19 de 25). Los resultados positivos identificaron una gran diversidad de patógenos, tal como lo describieron Brooks y col. a las 20 h posteriores a la CLP [87]. La mayoría de los resultados positivos en el grupo séptico (10/19) correspondió a bacterias gram negativas o a resultados mixtos (bacterias gram positivas y gram negativas). Las ratas sépticas a las que se les realizó hemocultivo pertenecían a los modelos CLP o CLF. El porcentaje de resultados positivos fue similar para ambos modelos (12/17 y 7/8 respectivamente). Sin embargo, el modelo menos agresivo (CLP) presentó un porcentaje mayor de resultados que incluían únicamente bacterias gram positivas (66%) en comparación con el modelo más agresivo (CLF, 14%). Estos resultados son coherentes con los reportados para pacientes sépticos en los cuales se describió una mayor mortalidad de acuerdo al germen involucrado: 60 % para coco gram positivo vs. 73% para algunos bacilos gram negativos [42]. En las 10 ratas sham evaluadas se obtuvieron 60 % de resultados negativos y 40% positivos (en todos los casos, cocos gram positivos, que podrían corresponder a contaminación de las muestras).

Tal como se esperaba, al otro día de la inducción de la sepsis peritoneal, las ratas sépticas aumentaron su FC comparada con sus propios valores del día anterior (389 ± 8 vs. 320 ± 3 lpm, $N=36$, $P<0.0001$) o con el valor de las ratas sham (326 ± 8 , $N=14$, $P<0.0001$), el cual se mantuvo incambiado (327 ± 8 lpm el día previo a la inducción de la sepsis simulada). Además, las ratas sépticas disminuyeron su VFC al otro día de la inducción de sepsis. Los 3 índices de VFC seleccionados presentaron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) al comparar los valores previos a la inducción de sepsis con los valores a las 24 horas ($N=36$): el SDNN disminuyó de 11.9 ± 0.5 a 6.8 ± 0.7 ms ($P<0.0001$), el RMSSD de 3.6 ± 0.1 a 2.8 ± 0.3 ms ($P=0.002$) y el CV pasó de 6.3 ± 0.3 a 4.2 ± 0.4 % ($P<0.0001$). Los resultados de las comparaciones entre los grupos sham y séptico a las 24 y 48 horas de la inducción de la sepsis se muestran en la figura 13. Se encontraron diferencias

estadísticamente significativas en la FC y en la VFC evaluada con los índices SDNN y CV pero no con el RMSSD.

También se analizó el cambio en la FC y la VFC discriminando a las ratas según los diferentes modelos de inducción de sepsis. La figura 14 muestra los gráficos con los valores promedio de cada variable antes de la inducción de sepsis y a las 24 horas. En el caso de la CLP modificada se muestra el valor de la única rata que sobrevivió a las 24 horas y por lo tanto no se incluye en el análisis estadístico. De todas formas, los valores de VFC de esta rata son los mínimos en comparación con los promedios de los otros modelos a pesar que el valor de FC no es el máximo. Al comparar dentro de cada modelo los valores pareados previos y posteriores a la inducción de sepsis se encontró un aumento de la FC estadísticamente significativo en los modelos CLP y CLF ($P < 0.0001$) pero no en las ratas sham. Sin embargo, el descenso de la VFC fue más pronunciado en el grupo CLF en comparación con el grupo CLP. Esta afirmación se basa en tres hechos. Primero, la VFC desciende en forma estadísticamente significativa para los 3 índices evaluados en el caso de la CLF ($P < 0.0001$, $P=0.0029$ y $P=0.0002$ para SDNN, RMSSD y CV respectivamente) mientras que en el modelo CLP sólo el SDNN disminuye de forma estadísticamente significativa. Segundo, el valor de P obtenido al hacer el análisis estadístico pareado del SDNN, genera un valor mucho menor en el modelo de CLF comparado con el CLP (< 0.0001 vs. 0.03). Tercero, el valor de SDNN es menor en el grupo CLF que en el CLP (5.0 ± 0.8 ms vs. 8.8 ± 1.0 ms, respectivamente; $P = 0.0021$). Por lo tanto, en el grupo CLP, la disminución del SDNN podría explicarse por el aumento de la FC, dado que el CV no cambia. Dentro del grupo sham las comparaciones pareadas genera valores de $P > 0.05$ salvo en el caso del SDNN que muestra un aumento estadísticamente significativo ($P = 0.0171$). 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.

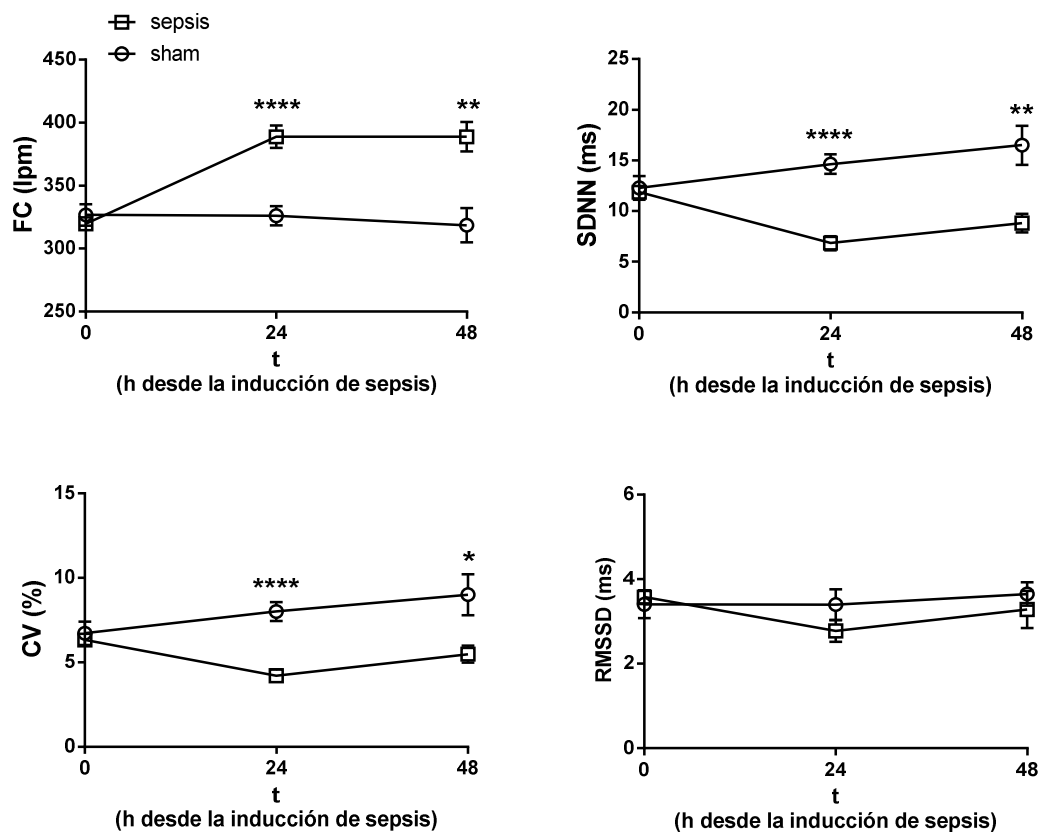


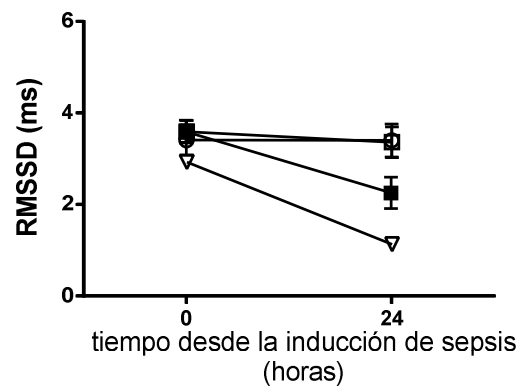
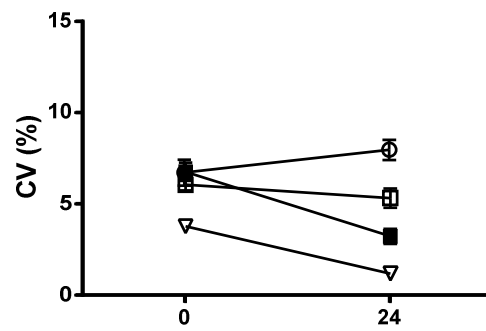
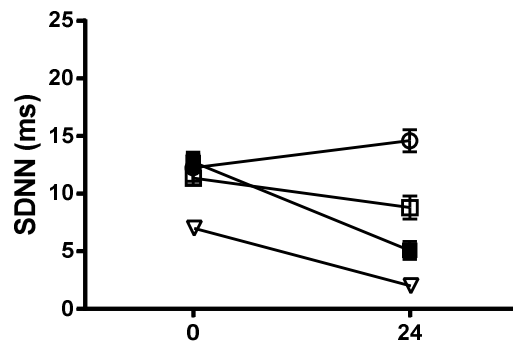
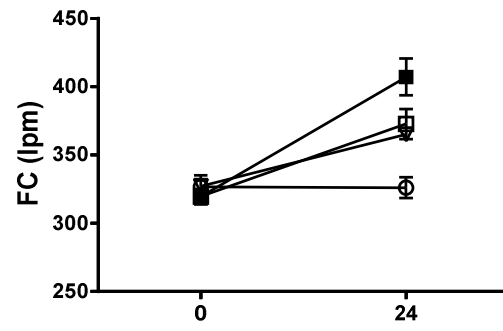
Figura 13. Cambios en la FC y la VFC en los grupos sham y séptico

Se muestran los valores promedio de cada día para cada uno de los grupos (media $\pm$ SEM). El N antes de la inducción de sepsis y a las 24 horas es 14 para el grupo sham y 36 para el grupo séptico. Sin embargo, a las 48 h el N disminuye debido a la mortalidad en el grupo séptico y al menor número de animales incluidos en el protocolo de 48 h ($N=4$ y 16 para los grupos sham y séptico respectivamente). Los asteriscos indican aquellas comparaciones entre el grupo sham y el séptico que generan valores de $P < 0.05$ con el test de Mann-Whitney.

Figura 14. Cambios en la FC y la VFC de los grupos separados según el modelo de inducción de sepsis

Se muestran los valores promedio de cada día para cada uno de los grupos (media $\pm$ SEM). Los resultados de las comparaciones se describen en el texto. Referencias:

○ sham, $N=14$ □ CLP, $N=18$ ■ CLF, $N=17$ ▽ CLPm, $N=1$



Los resultados presentados hasta el momento permiten concluir que la mayor severidad de la agresión se correspondió con una mayor mortalidad y una menor VFC. A esta misma conclusión se llega al hacer el análisis desde otro punto de vista, tal como se explica a continuación.

Cuando se comparaban a simple vista los tacogramas de cada rata antes y después de la inducción de sepsis, se observaba que la reducción de la VFC era evidente en el patrón del tacograma en algunas ratas sépticas pero no en otras. Como muestran las figuras 15 y 16, los tacogramas de ambas ratas antes de la inducción de la sepsis presentan ondas de aceleración y desaceleración [22]. Estas ondas se mantienen en la rata mostrada en la figura 15, a pesar del aumento de su FC y el descenso de su VFC, tal como lo indican los valores en la tabla 3. Sin embargo, en el tacograma mostrado en la figura 16, se perdieron las típicas ondas del tacograma o dicho de otra forma, el tacograma se aplanó completamente, evidenciando una “rigidez” de la FC [88] que se acompaña con valores de VFC más pequeños que los de la rata mostrada en la figura 15 (tanto en valores absolutos como relativos con respecto al valor previo; ver tabla 4). Estas mismas diferencias pueden apreciarse claramente cuando se observan los gráficos de Poincaré para estos dos ejemplos (figura 17).

Para determinar cuantitativamente esta diferencia en el grado de reducción de la VFC, primero definimos los valores normales de SDNN de acuerdo a los resultados obtenidos en los ECG previos a la inducción de la sepsis (o sham sepsis).

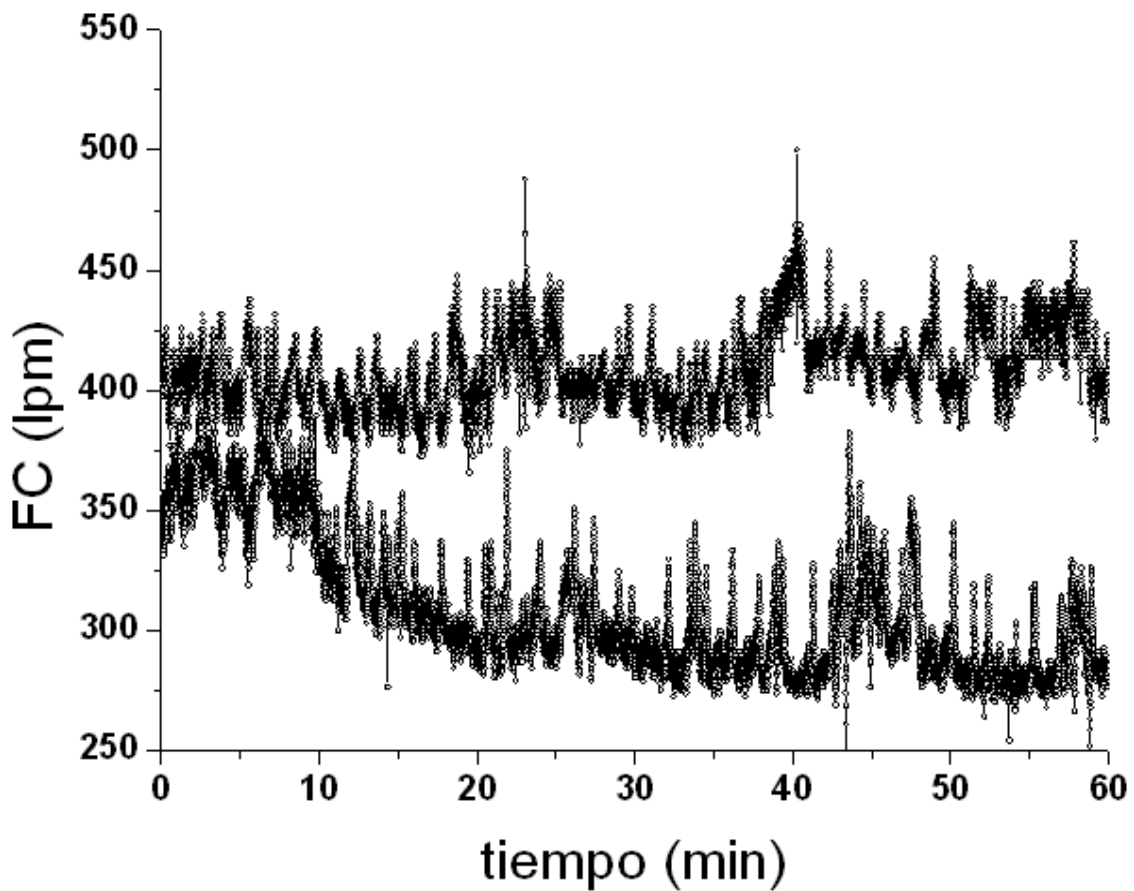


Figura 15. Tacogramas antes y después de la inducción de sepsis (ejemplo 1)

Ambos tacogramas son de una misma rata. Se observa el aumento de la FC en el tacograma realizado un día después de la inducción de la sepsis. La FC promedio y los índices de VFC para ambos tacogramas se presentan en la tabla 3. Si bien la VFC disminuyó de acuerdo a los valores calculados, la reducción de la VFC no es muy evidente a simple vista en el tacograma dado que conserva las ondas de aceleración y desaceleración presentes antes de la inducción de la sepsis.

Tabla 3. Índices de VFC correspondientes a los tacogramas de la figura 15

	Inducción de sepsis	FC (lpm)	SDNN (ms)	CV (%)	RMSSD (ms)
rata de la figura 15	antes	310	17	9	3
	después	410	6	4	2

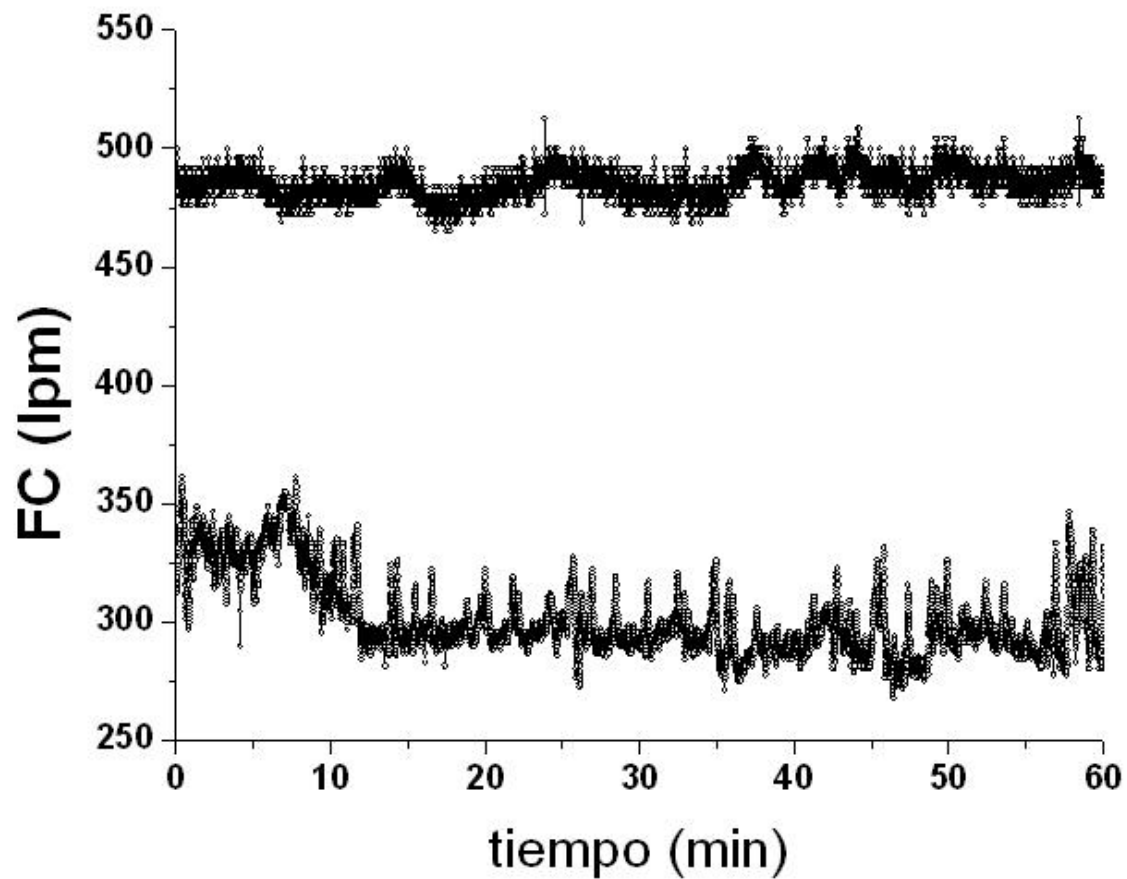


Figura 16. Tacogramas antes y después de la inducción de sepsis (ejemplo 2)

Ambos tacogramas corresponden a la misma rata. Se observa el aumento de la FC en el tacograma realizado un día después de la inducción de la sepsis y la pérdida de las ondas correspondientes a aceleraciones seguidas por desaceleraciones. El tacograma se “aplana” lo que muestra la “rigidez” de la FC en estas condiciones. La FC promedio y los índices de VFC para ambos tacogramas se presentan en la tabla 4.

Tabla 4. Índices de VFC correspondientes a los tacogramas de la figura 16

	Inducción de sepsis	FC (lpm)	SDNN (ms)	CV (%)	RMSSD (ms)
rata de la figura 16	antes	302	11	5	2
	después	485	2	1	1

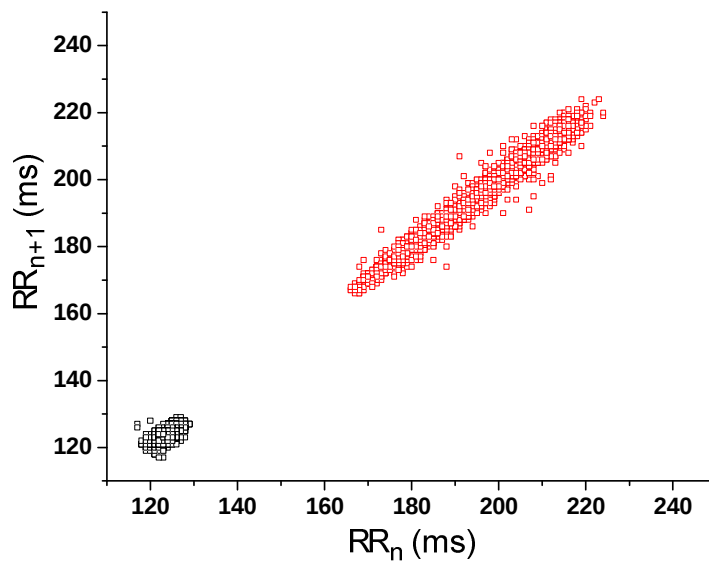
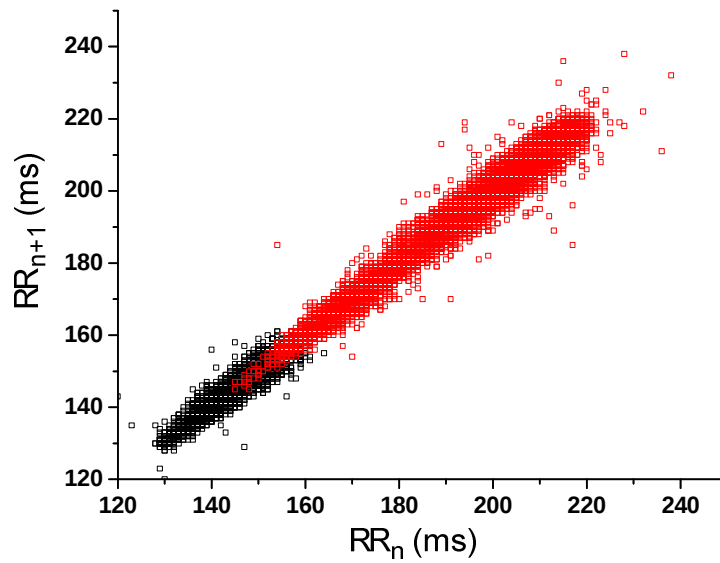


Figura 17. Gráficos de Poincaré antes y después de inducir sepsis (ejemplos 1 y 2)

Cada intervalo RR (RR_{n+1}) se grafica en función del intervalo RR precedente (RR_n). Los gráficos en rojo son los anteriores a la inducción de la sepsis y los gráficos negros los posteriores. Los gráficos de arriba corresponden a la rata de la figura 15 y los de abajo a la rata de la figura 16.

La figura 18 muestra un histograma de frecuencia de los valores de SDNN a partir del registro pre-ECG para las 64 ratas del lote 1 (figura 12). Los datos pasaron el test de normalidad de D'Agostino & Pearson, por lo tanto, el 95 % de los valores se encuentran entre la media (12.9 ms) $\pm$ 2*SD (3.4 ms). Se puede calcular el intervalo de confianza (IC) del SD y así estar 99% seguros que el SD de la población estará incluido en ese IC. El cálculo del IC depende del N. Para N=64, se calcula: 0.85*SD a 1.21*SD (GraphPad Statistics Guide). O sea, el SD real se encontrará entre 2.8 y 4.4 ms. Si tomamos el límite superior (4.4) de este IC del SD para calcular el rango de SDNN en el que se encuentra el 95% de la población, obtendremos: $12.9 \pm 2*4.4$ (12.9 ± 8.8). Es decir, definimos el rango normal de valores de SDNN entre 4.1 y 21.7 ms. Por lo tanto, valores de SDNN < 4 ms se consideran anormales.

Tal como se ve en la figura 18 ninguna de las ratas presentó valores de SDNN < 4 ms al calcularlo a partir del registro de ECG previo a la inducción de sepsis (o sham sepsis). Sin embargo, cuando se calculó el SDNN a partir del registro del ECG posterior a la inducción de sepsis, se encontró que 13 ratas presentaron valores anormales de SDNN. Las 13 ratas pertenecían al grupo séptico. Once de ellas presentaron los valores anormales de SDNN a las 24 horas y las 2 restantes presentaron valores normales a las 24 horas (8 y 13 ms) y los redujeron a valores anormales a las 48 horas. Por lo tanto, dentro del grupo séptico, un subgrupo presentó valores de SDNN normales, aunque reducidos, mientras que el otro subgrupo, presentó valores anormales de SDNN.

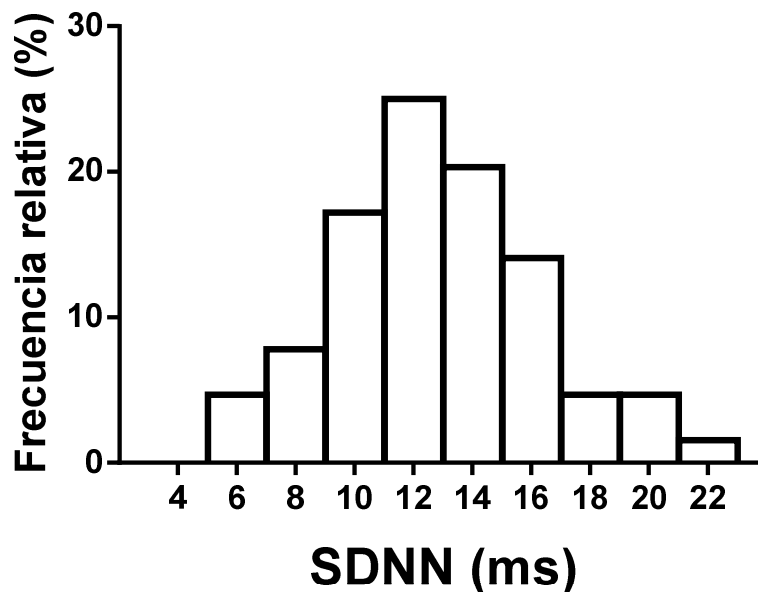


Figura 18. Distribución normal de los valores de SDNN en ratas

El gráfico es un histograma de frecuencias de los valores de SDNN en los ECG previos a la inducción de la sepsis (o sham sepsis) en 64 ratas. Los valores de SDNN están expresados en rangos de 2 ms.

Al analizar los resultados de los hemocultivos discriminando según la reducción del SDNN, vemos que de los 19 resultados positivos en las ratas sépticas, sólo 6 correspondieron a animales que presentaron reducción anormal de la VFC. Esto sugiere que un hemocultivo positivo no implica reducción anormal de la VFC. A su vez, se realizaron hemocultivos a 7 de las 13 ratas que redujeron su VFC a valores anormales. De estos 7 hemocultivos, uno fue negativo (14%) y 6 fueron positivos (86 %). En las ratas sépticas con VFC normal, 7 de los 13 cultivos positivos fueron cultivos puros de bacterias gram positivas; *Enterococcus faecalis* o *Streptococcus* sp. a las 24 h. En 4 muestras se obtuvieron cultivos polimicrobianos que incluían bacterias gram negativas. Como dije arriba, en las ratas sépticas con VFC anormal, 6 de las 7 ratas analizadas tuvieron cultivos positivos a las 24 h; 4 eran polimicrobianos y el patógeno más frecuente fue *E. coli*. Esta bacteria se recuperó de una de las muestras cuando la sangre fue cultivada directamente en la placa de agar sangre, mostrando una gran abundancia de la misma en la sangre de la rata

enferma. La prevalencia de bacterias gram negativas y cultivos polimicrobianos fue mayor en las ratas sépticas con VFC anormal. Fairchild y col. han reportado cambios de la FC y la VFC en ratones luego de la inyección intraperitoneal de distintos tipos de patógenos vivos: una bacteria gram positiva, una bacteria gram negativa o un hongo [67]. La VFC volvía a valores normales en los ratones inyectados con la bacteria gram positiva 10 horas después de la inyección y en ese grupo de ratones todos sobrevivían a las 42 horas a diferencia de los ratones de los otros dos grupos.

Para analizar la relación entre la reducción de la VFC y la severidad de la agresión de los distintos modelos de inducción de sepsis peritoneal, se consideró el número de ratas con una reducción del SDNN a valores anormales en cada uno de ellos (tabla 5).

La tabla 5 muestra que las 13 ratas con valores anormales de VFC se obtuvieron de los 3 modelos de CLI. Sin embargo, cuanto más severo el modelo, de acuerdo al menor porcentaje de ratas sobrevivientes, mayor era el porcentaje de ratas con una reducción de la VFC a valores anormales.

Tabla 5. Número de ratas con VFC anormal en cada modelo de sepsis peritoneal

Modelo de CLI	Supervivientes a las 24 h (%)	Nº de ratas con SDNN < 4 ms (%)
Sham	16/16 (100)	0 (0)
CLP (2, 4 o 10 perforaciones)	18/18 (100)	3 (17)
CLF (200, 300 o 400 mg/kg)	17/22 (77)	9 (53)
CLP modificada (corte)	1/6 (17)	1 (100)

CLI: ligadura del ciego e infección; CLP: ligadura y perforación del ciego; CLF: ligadura del ciego e inóculo fecal.

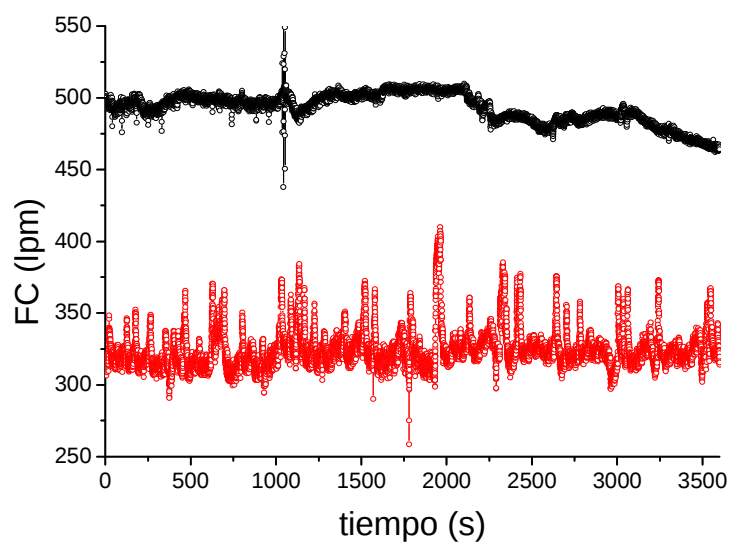
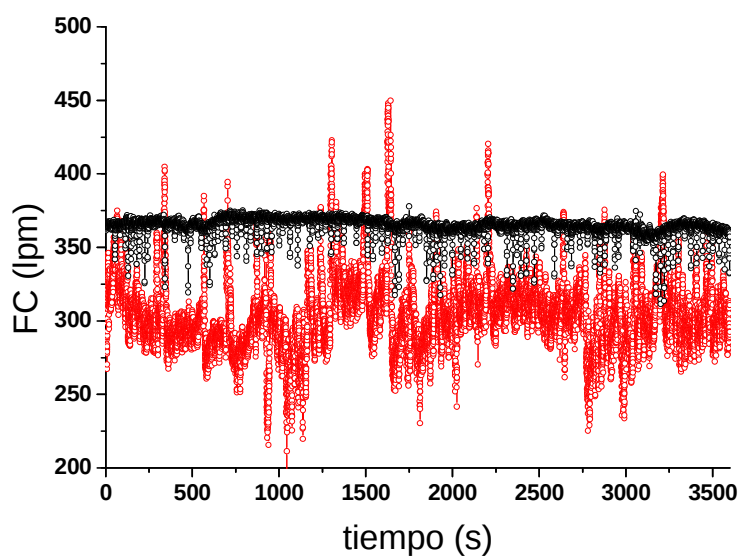
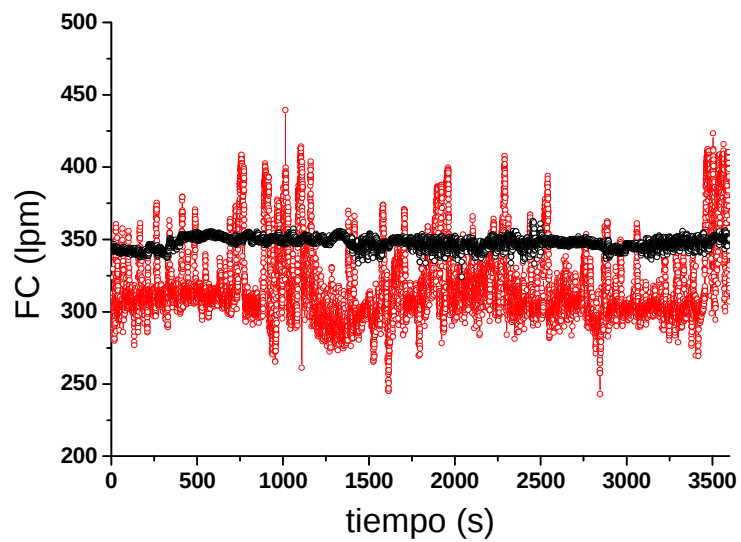
En la figura 12 se ve que de las ratas sépticas que sobrevivieron para poder realizarles el post-ECG, hubo 3 que murieron antes de la eutanasia para proseguir con el protocolo correspondiente. Las 3 pertenecían al grupo de ratas CLI con VFC anormal (y protocolo de 48 h). Por lo tanto, la mortalidad fue 23% (3/13) para el grupo de ratas sépticas que disminuyeron su VFC a valores anormales y 0% para las ratas sépticas que mantuvieron valores normales de VFC. Es decir, que la reducción de la VFC a valores anormales podría considerarse un indicador temprano de mortalidad. La figura 19 muestra los tacogramas antes y después de la inducción de la sepsis en las 3 ratas que murieron antes de proseguir con el protocolo experimental.

Es interesante observar que en 2 de las 3 ratas mostradas en la figura 19, la reducción de la VFC a valores anormales ocurre con aumento moderado de la FC, por lo que se independizan estos dos factores.

En el gráfico del medio de la figura 19, se observa que el tacograma luego de la inducción de la sepsis presenta desaceleraciones a partir de la FC basal (es decir, no precedidas por aceleraciones como en el tacograma previo a la inducción de la sepsis). Fairchild y col. [66] describieron la presencia de bradiarritmias como parte de los cambios inducidos por patógenos inyectados en ratones. Estas desaceleraciones transitorias, también mencionadas en la Introducción en relación a la sepsis neonatal humana [89], aparecieron en nuestros registros y aparentemente fueron más frecuentes en las ratas sépticas con valores anormales de la VFC pero no lo analizamos sistemáticamente.

Figura 19. Tacogramas de tres ratas sépticas gravemente enfermas

Para cada una de las 3 ratas se muestran los tacogramas antes (rojo) y después (negro) de la inducción de la sepsis. En los 3 casos, las ratas murieron luego del ECG realizado un día después de la inducción de la sepsis pero antes de la eutanasia para realizar el protocolo subsiguiente. Los valores de SDNN (ms) para cada tacograma antes de la inducción de la sepsis son (de arriba hacia abajo) 15, 7 y 7. Los valores de SDNN (ms) para cada uno de los tacogramas posteriores a la inducción de sepsis son 2, 2 y 3. Los modelos de inducción de sepsis en cada una de estas ratas fueron: CLP con 2 perforaciones, CLP modificada y CLF (300 mg/kg). El tiempo que transcurrió desde el registro del ECG y la muerte de cada una de las ratas fue < 4 h, 4-22 h y < 15 min.



Conclusión:

Se constató por lo tanto la asociación entre severidad de la agresión, mortalidad y reducción de la VFC.

Comprobamos que la inducción de sepsis peritoneal en la rata produce un aumento de la FC y un descenso de la VFC. Sin embargo, detectamos que el descenso de la VFC es más pronunciado cuanto más severa es la agresividad del modelo. Los animales que sobreviven a la inducción de la sepsis mediante un modelo de gran severidad (mayor mortalidad), es más probable que presenten valores anormalmente bajos de VFC.

El modelo CLF fue suficientemente agresivo para generar diferencias estadísticamente significativas en todos los índices de VFC evaluados pero no tanto como para que la alta mortalidad impidiera contar con un número razonable de animales vivos al otro día de la inducción de la sepsis. De acuerdo a estos resultados, se incluyen en el Experimento 2 únicamente las ratas sépticas a las que se les indujo sepsis mediante el modelo CLF. A su vez, el modelo CLF fue el único utilizado para inducir la sepsis en el lote 2 de ratas (Experimento 3).

EXPERIMENTO 2

A. Objetivo específico 2:

Analizar si el corazón de un animal séptico presenta modificaciones intrínsecas de su cronotropismo.

B. Objetivo específico 3:

Analizar el acoplamiento entre el corazón de un animal séptico y el sistema nervioso autónomo.

Experimento:

A. Aislar el corazón de ratas sépticas y analizar la FC y la VFC del corazón latiendo en forma espontánea.

B. Evaluar la respuesta cronotrópica de los corazones aislados a la estimulación con los neurotransmisores autonómicos (Nor o ACh).

Hipótesis:

El corazón de un animal séptico presenta alteraciones de su cronotropismo basal o de la respuesta cronotrópica a los neurotransmisores autonómicos debido a modificaciones intrínsecas que permanecen aún aislado del entorno patológico y del sistema nervioso autónomo.

Justificación:

La reducción de la VFC en una rata séptica puede deberse a múltiples factores, por eso, para simplificar el abordaje, buscamos las primeras pistas analizando el comportamiento cronotrópico del corazón aislado, tal como lo describe el título de la tesis. La estrategia de analizar el corazón aislado para explicar la VFC anormal en la rata séptica podría considerarse inútil, dado que una eventual falta de diferencias con un corazón sham podría deberse justamente al aislamiento del corazón del medio patológico, es decir que no permitiría descartar alteraciones del corazón que se manifestarían únicamente *in situ*. Sin embargo, si aislado de su entorno patológico, el corazón aún presentara diferencias, el resultado ameritaría ser analizado. Pero además, la comparación dentro de cada grupo entre los resultados *in situ* con los obtenidos *in vitro* permite inferir cómo están actuando los mecanismos de regulación en el organismo enfermo.

Descripción:

A. Análisis de la FC y la VFC del corazón aislado de ratas sépticas

- **Animales**

Se utilizaron las ratas del lote 1 sham ($N=14$) y las que sobrevivieron a la inducción de la sepsis mediante el modelo CLF ($N=16$). El número de ratas del protocolo de 48 horas fue 4 y 5 en el grupo sham y séptico respectivamente.

- **Protocolo**

Una vez finalizado el registro del ECG posterior a la inducción de la sepsis, se extrajo el corazón del animal y se lo montó en un set experimental para perfundirlo de acuerdo a la técnica de Langendorff. Se registró la actividad eléctrica espontánea del corazón aislado. Se consideraron los últimos 4 min de los 25 min de estabilización para calcular la FC basal y los índices de VFC.

- **Análisis estadístico**

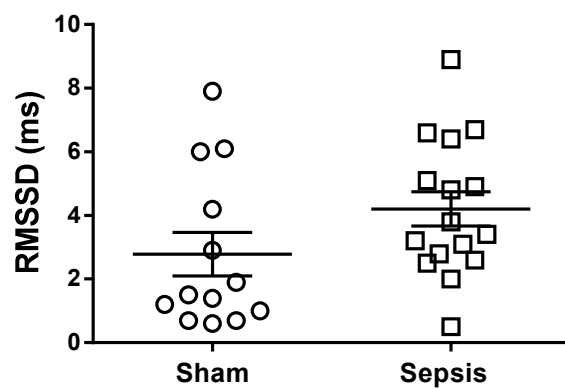
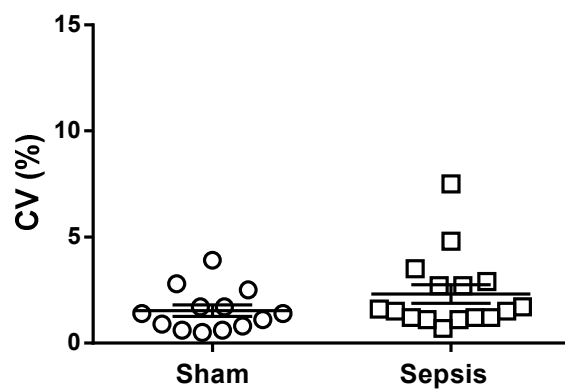
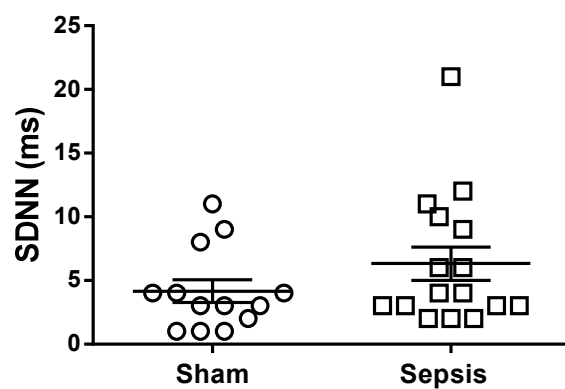
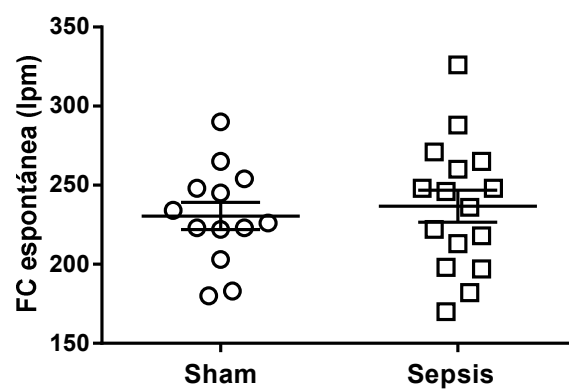
Las comparaciones entre el grupo sham y séptico se hicieron con el test de Mann-Whitney. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de P de 2 colas < 0.05 dado que la hipótesis no establece el sentido de las diferencias esperadas. Para estas comparaciones el N del grupo sham disminuyó en 1 porque se perdió el registro que incluía el período necesario para el cálculo de la FC basal.

- **Resultados y discusión**

La figura 20 muestra los resultados obtenidos en los corazones aislados de las ratas sham y sépticas. Los grupos no presentan diferencias estadísticamente significativas en la FC ni en ninguno de los índices de VFC evaluados. Es decir, en el corazón aislado se pierden las diferencias encontradas entre las ratas sépticas y sham (mayor FC y menor VFC).

Figura 20. Frecuencia cardíaca basal 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.



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 en el organismo séptico, por ejemplo, los niveles de catecolaminas elevados y/o de otros mediadores de la inflamación [90]. Otros investigadores encontraron una FC basal aumentada en corazones y aurículas derechas aislados de ratas sépticas que presentaban taquicardia *in situ* y niveles plasmáticos de catecolaminas elevados [91].

A su vez, la FC basal de los corazones aislados de ratas sépticas (237 ± 10 lpm) y sham (231 ± 9 lpm) fue menor que la FC que presentaban los corazones *in situ* antes de la inducción de la sepsis. Lo mismo han descrito otros autores [92] [93]. Por ejemplo, en una revisión sobre la técnica de Langendorff, Riascos y col. describen 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 [94]. Esto podría estar evidenciando un tono simpático dominante en roedores, a diferencia de lo que ocurre en el ser humano [82].

El comportamiento de la VFC de los corazones aislados en el grupo sham y el séptico, evidencia 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. Por ejemplo, el SDNN de las ratas sham ($N=13$) se redujo de 14.2 ± 1.0 ms *in situ* a 4.2 ± 0.9 *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) [95]. El hecho que la VFC no cambie en los corazones sépticos en ambas situaciones (SDNN = 5.5 ± 0.9 vs. 6.3 ± 1.3 , $N=16$) sugiere la ausencia de modulación autonómica *in situ*, que podría deberse a una saturación por hiperactivación simpática.

El índice RMSSD en el corazón aislado tampoco diferenció a ambos grupos. Sin embargo, este índice se mantuvo sin cambios en el grupo sham al aislar el corazón (2.8 ± 0.7 vs. 3.2 ± 0.3 *in situ* e *in vitro*, respectivamente; $N=13$). De todas formas, hay que considerar que el mismo valor de RMSSD

ocurre para intervalos RR mayores en el corazón aislado. En el grupo séptico, se produjo un aumento estadísticamente significativo del RMSSD al aislar el corazón (4.2 ± 0.5 *in vitro* vs. 2.3 ± 0.3 *in situ*, $P= 0.025$). Este resultado podría estar evidenciando una irregularidad patológica del nodo sinusal séptico, que *in situ* sería completamente superada por la influencia del SNA. Este concepto es opuesto al propuesto por Schmidt *et al.* basados en la reducción de la variabilidad de los intervalos entre latidos de cardiomiocitos aislados de ratas neonatas en presencia de endotoxina [96].

Por otro lado, una de las limitaciones 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 min vs. 4 min, respectivamente. El menor tiempo de análisis tendería a disminuir los índices de VFC afectados por la duración del registro, por ejemplo, el SDNN. Sin embargo, puede apreciarse gráficamente que la VFC es mayor *in situ* incluso tomando un período de 4 min, tal como lo muestran los gráficos de las figuras 21 y 22 para una rata sham y su corazón aislado, respectivamente.

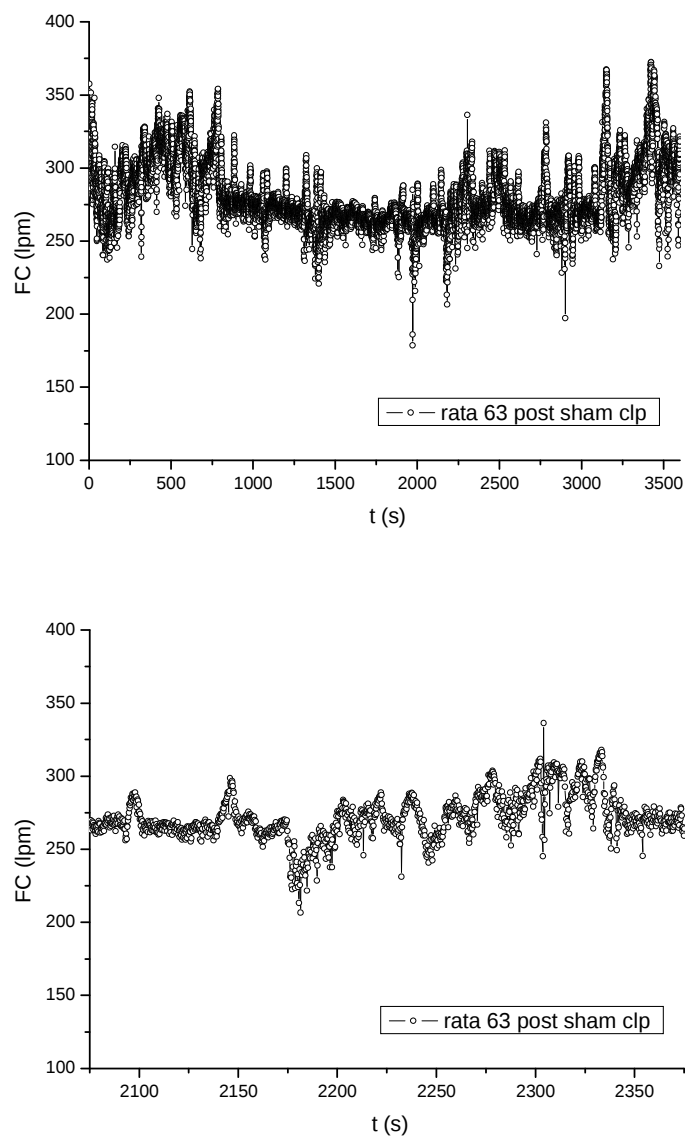


Figura 21. Tacogramas de una rata sham con distintas duraciones

Se muestra arriba el tacograma con una duración de 60 minutos y abajo sólo un sector de 5 min (para su comparación con el tacograma de la figura 22). Los valores de FC y VFC de los corazones *in situ* se calculan considerando los 60 min de registro y en este ejemplo son: FC= 281 lpm, SDNN= 16 ms, CV= 7 % y RMSSD= 5 ms.

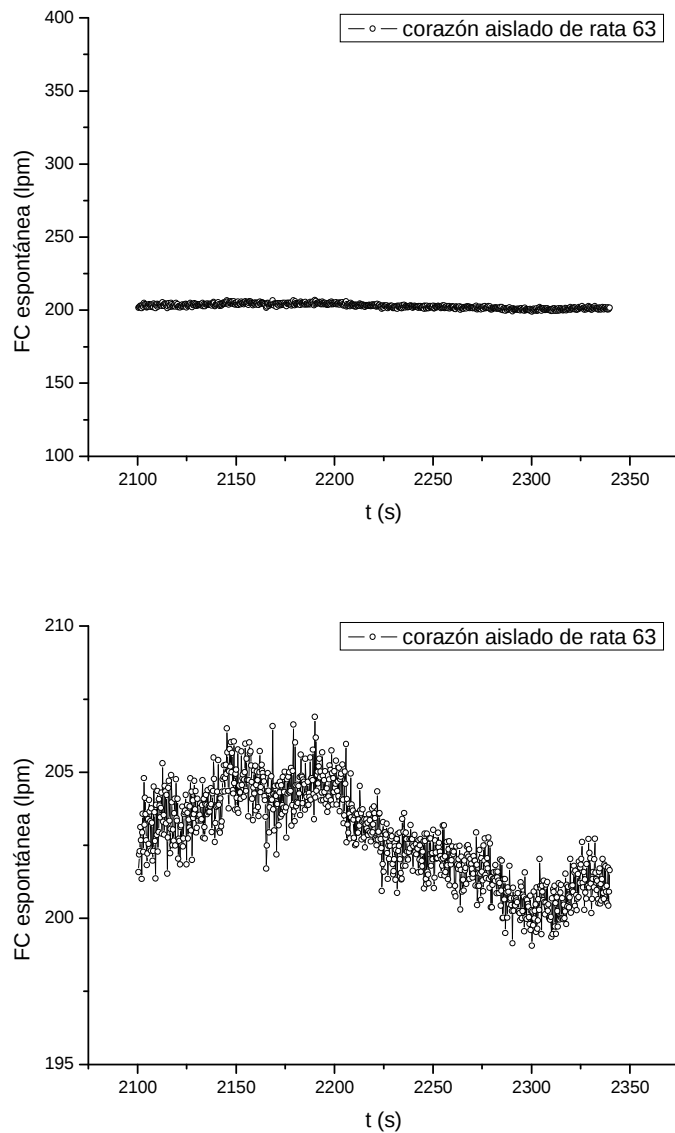


Figura 22. Tacogramas del corazón aislado de una rata sham con distintas escalas

Se muestra arriba el tacograma con una duración de 4 min. Los valores de FC y VFC de los corazones *in vitro* se calculan considerando los últimos 4 min de la estabilización de 25 min. A pesar que se observa un tacograma plano al usar la misma escala de la figura 21 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. En este ejemplo los valores obtenidos fueron: FC= 203 bpm, SDNN= 2 ms, CV= 0.8 % y RMSSD= 1.5 ms.

B. Respuesta cronotrópica del corazón aislado séptico a los neurotransmisores autonómicos.

B.1. Noradrenalina

- **Protocolo**

Los corazones aislados descritos en A fueron utilizados para evaluar la respuesta cronotrópica a uno u otro de los dos neurotransmisores autonómicos luego del período de estabilización de 25 min. Para evaluar la respuesta a la Nor se usaron 8 corazones sépticos y 9 corazones sham.

El modelo de corazón aislado permite la evaluación de la performance miocárdica intrínseca sin la influencia de factores externos tales como la respiración y el sistema nervioso central, hormonas circulantes, o reflejos nerviosos originados en los barorreceptores del seno carotídeo y el cayado de la aorta [52]. Sin embargo, las terminaciones nerviosas del SNA son intracardiácas [97], y por lo tanto, la respuesta cronotrópica adrenérgica fue evaluada en presencia de un antagonista colinérgico (10^{-6} M de atropina), 15 min antes de la primera dosis y durante todas las dosis [52]. El antagonista colinérgico fue agregado para evitar los efectos de la posible liberación local de neurotransmisores por estimulación cruzada y no se espera que tenga efecto alguno en la FC a esa dosis [98]. En nuestros corazones la FC no cambió luego de 10 min de perfundir con atropina (datos no mostrados).

Se perfundió el corazón con 5 dosis crecientes de Nor durante 5 min cada una. Las dosis ensayadas fueron (M): 10^{-8} , 10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} .

- **Análisis estadístico**

Para cada dosis, se determinó la máxima FC instantánea alcanzada. En la figura 23 se muestra un ejemplo para una de las ratas sham incluidas en este protocolo. En ella se puede ver el tacograma obtenido durante la perfusión de su corazón aislado con las distintas dosis de Nor y en la tabla 6 los valores de FC máximos alcanzados con cada dosis expresados en valores absolutos y porcentajes. Se construyeron curvas dosis-respuesta para cada corazón. La FC control para cada curva dosis-respuesta se calculó como la FC promedio para el período de 5 min anterior a la perfusión con la menor dosis de Nor (luego de 10 min con atropina). Para normalizar, se consideró 0% la FC control y 100% la

máxima FC instantánea de cada corazón cualquiera fuera la dosis. En la tabla 6 se muestran esos cálculos para el corazón aislado de una rata sham incluida en este protocolo. Se obtuvo un valor individual de $\log EC_{50}$ para cada corazón por regresión no lineal de los resultados dosis-respuesta. La figura 24 muestra un ejemplo de curva dosis-respuesta para el mismo corazón aislado considerado en la figura 23 y la tabla 6. Luego, el $\log EC_{50}$ fue comparado entre los 2 grupos con el test de Mann-Whitney y se consideraron estadísticamente significativos los valores de P de 2 colas < 0.05 . Además, la respuesta promedio para cada dosis fue comparada entre grupos y usada para obtener una curva dosis-respuesta representativa.

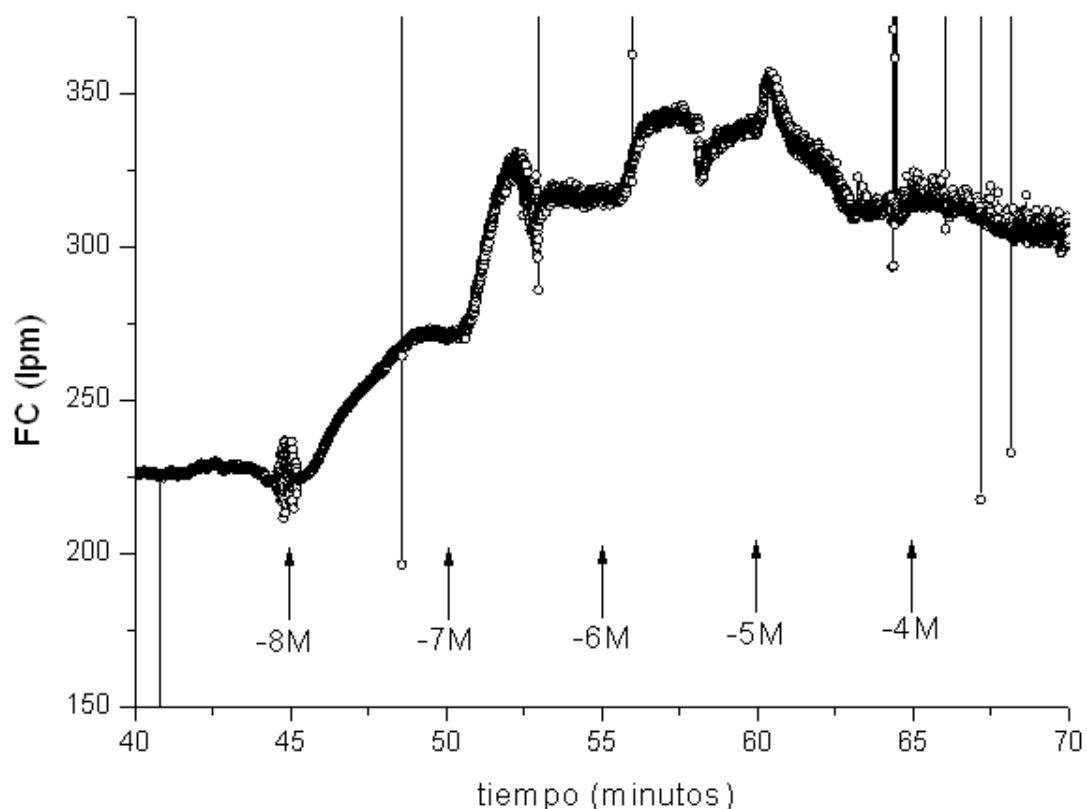


Figura 23. Tacograma de un corazón aislado en respuesta a la noradrenalina

El ejemplo mostrado es del corazón aislado de una rata sham. Las flechas indican el momento en el que llega al corazón cada dosis de noradrenalina, expresada como el $\log$ [noradrenalina, (M)]. Si se observa esta gráfica y los valores de FC máxima que surgen de ella (tabla 6) se hace evidente que fueron descartadas las extrasístoles para determinar la máxima FC alcanzada con cada dosis de noradrenalina.

Tabla 6. Respuesta cronotrópica a la noradrenalina del corazón aislado de una rata sham

[Nor] (M)	FC instantánea máxima (lpm)	FC instantánea máxima (%)
0	230	0
10^{-8}	274	34
10^{-7}	332	80
10^{-6}	347	91
10^{-5}	358	100
10^{-4}	325	74

El corazón aislado elegido para este ejemplo es el mismo cuyo tacograma se ve en la figura 23. Ver la explicación en el texto. Nor: noradrenalina, FC: frecuencia cardíaca.

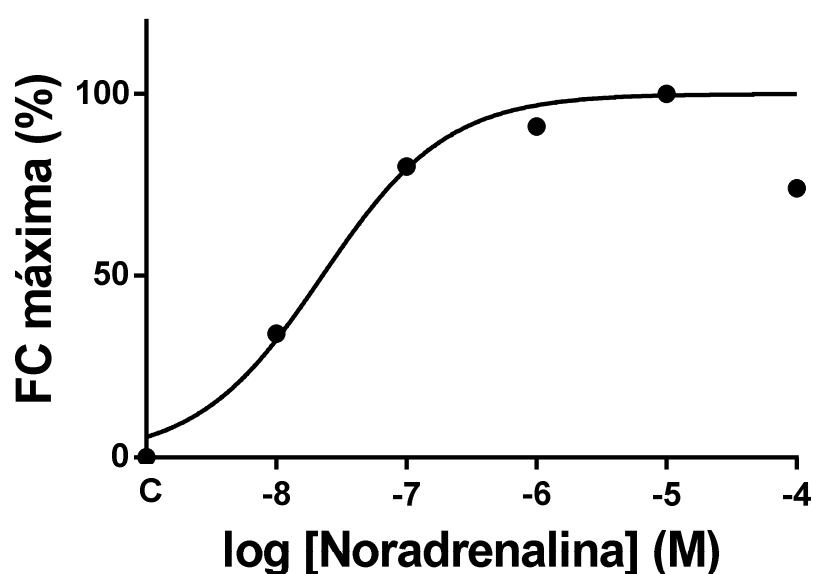


Figura 24. Curva dosis-respuesta para la noradrenalina en un corazón aislado

El corazón que se toma como ejemplo fue aislado de una rata sham y es el mismo cuyos valores se presentan en la tabla 6. El log EC_{50} para esta curva es -7.6. C: control (antes de perfundir con la menor dosis de noradrenalina, por lo tanto corresponde a una concentración de 0 M).

- Resultados y discusión

La sensibilidad a la Nor no diferenció al grupo séptico del sham tal como se aprecia en la figura 25 donde se grafican los valores de log EC₅₀ para cada uno de los corazones aislados incluidos en este protocolo. Los valores promedio de EC₅₀ fueron 2.3×10^{-8} M y 1.6×10^{-7} M en el grupo séptico y sham respectivamente.

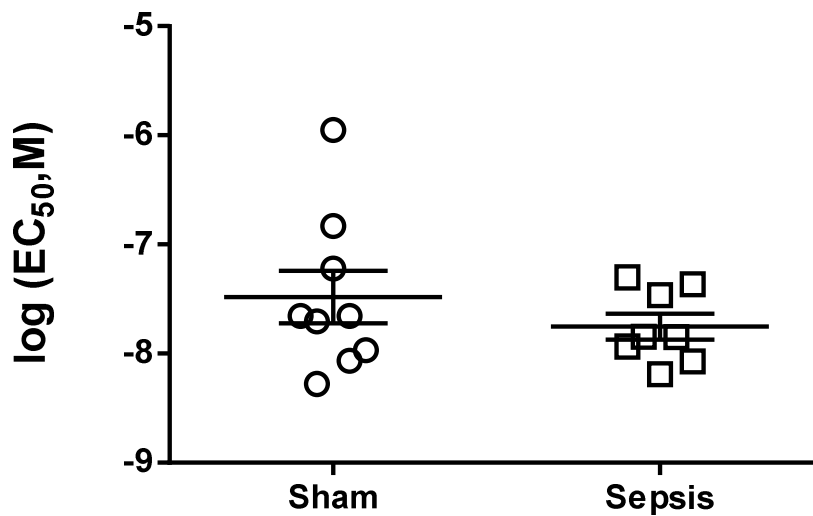


Figura 25. Respuesta cronotrópica de los corazones aislados a la noradrenalina

Se muestran los valores de log EC₅₀ para cada uno de los corazones aislados incluidos en este protocolo. Las líneas horizontales representan el valor de media $\pm$ SEM para cada grupo (7.5 ± 0.2 y 7.8 ± 0.1 en el grupo sham y séptico respectivamente).

La figura 26 muestra las curvas dosis-respuesta representativas para cada grupo a partir de las respuestas promedio para cada dosis. Las comparaciones de estas respuestas no arrojaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. Además, la máxima FC alcanzada también fue similar en ambos grupos al comparar los valores absolutos (378 ± 20 vs. 369 ± 13 lpm en los grupos sham y séptico respectivamente).

Concluimos que la respuesta cronotrópica positiva a la Nor es similar en ambos grupos.

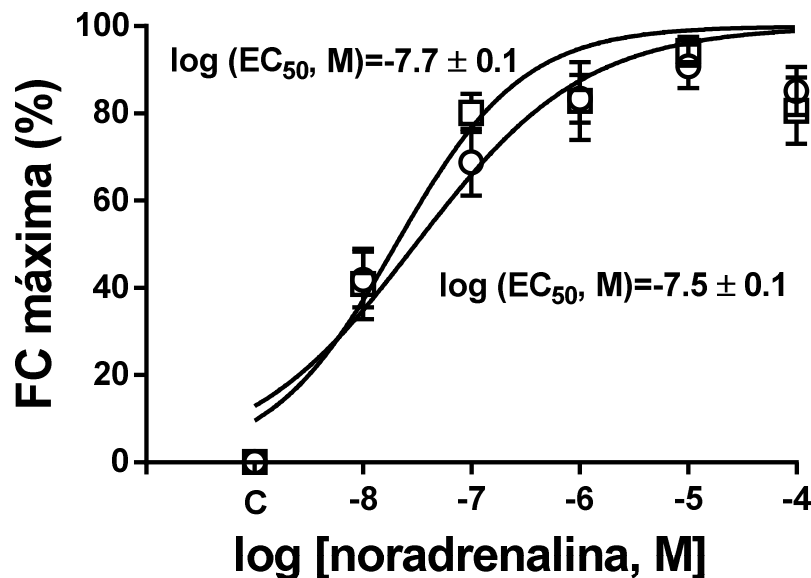


Figura 26. Curvas dosis-respuesta para noradrenalina

Se muestran las curvas representativas para los grupos sham (círculos) y séptico (cuadrados) obtenidas por ajuste no-lineal de la respuesta promedio ($N=9$ y 8 , respectivamente). El $\log EC_{50}$ a partir de estas curvas es similar al obtenido promediando los $\log EC_{50}$ individuales para cada corazón (ver figura 25). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos al comparar las respuestas para cada dosis.

Esa conclusión está de acuerdo con los resultados descritos por Gholami y col. [53] en aurículas derechas aisladas de ratas sépticas 5 horas después de la inyección de LPS. La respuesta cronotrópica adrenérgica era igual en comparación con la de aurículas aisladas de ratas sham. Sin embargo, otros autores han reportado una respuesta adrenérgica alterada relacionada con la sepsis, aunque en direcciones opuestas, tanto en el medio patológico como aislado de él [62] [88] [99] [100]. Por ejemplo, Smith. y col. encontraron que la sensibilidad cronotrópica a la estimulación beta-adrenérgica está aumentada en el corazón y aurícula derecha aislados de ratas sépticas [91] mientras que Jazaeri y col. describieron hipo-respuesta cronotrópica positiva a la estimulación adrenérgica en aurículas aisladas de ratas sépticas 5 h después de la inyección de LPS [101]. Para comparar estos resultados es importante considerar el modelo de inducción de sepsis utilizado. Por ejemplo, Jazaeri y col. describieron respuesta cronotrópica positiva a la Nor atenuada luego de la inyección de LPS en ratas sanas pero no en ratas cirróticas [101]

B.2. Acetilcolina

- Protocolo

Para evaluar la respuesta a la ACh se usaron los restantes 8 corazones sépticos y 5 corazones sham.

La respuesta cronotrópica colinérgica fue evaluada en presencia de un antagonista β -adrenérgico (10^{-6} M de nadolol), 15 min antes de la primera dosis y durante todas las dosis [52]. El antagonista adrenérgico fue agregado para evitar los efectos de la posible liberación cruzada de neurotransmisores locales y no se espera que tengan efecto alguno sobre la FC basal a esa dosis [98]. Sin embargo, los 5 corazones sham bajaron su FC aproximadamente 10 % (de 209 ± 14 a 189 ± 17 lpm) luego de 10 min de perfusión con nadolol pero esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($P=0.06$).

Las dosis ensayadas de ACh fueron 3 y cada una se perfundió durante 5 min: 10^{-8} , 10^{-7} y 10^{-6} M.

- Análisis estadístico

Para cada dosis de ACh, se determinó la mínima FC instantánea alcanzada. En la figura 27 se muestra un ejemplo para una de las ratas sham incluidas en este protocolo. En ella se puede ver el tacograma obtenido durante la perfusión de su corazón aislado con las distintas dosis de ACh y en la tabla 7 los valores de FC mínimos alcanzados con cada dosis expresados en valores absolutos y porcentajes (leer abajo).

Se construyeron curvas dosis-respuesta para cada corazón. La FC control para cada curva dosis-respuesta se calculó como la FC promedio para el período de 5 min anterior a la perfusión con la menor dosis de ACh (luego de 10 min con nadolol). Para normalizar, se consideró 100% la FC control y se computó la mínima FC instantánea para cada dosis como un porcentaje de la FC control. La tabla 7 muestra esos cálculos para el corazón aislado de la rata sham tomado como ejemplo también en la figura 27.

Se obtuvo un valor individual de $\log IC_{50}$ para cada corazón por regresión no lineal de los resultados dosis-respuesta. La figura 28 muestra un ejemplo de curva dosis-respuesta para el mismo corazón aislado considerado en la figura 27 y la tabla 7.

Luego, el $\log IC_{50}$ fue comparado entre los 2 grupos (test de Mann-Whitney). Además, la respuesta promedio para cada dosis fue comparada entre grupos y usada para obtener una curva dosis-respuesta representativa.

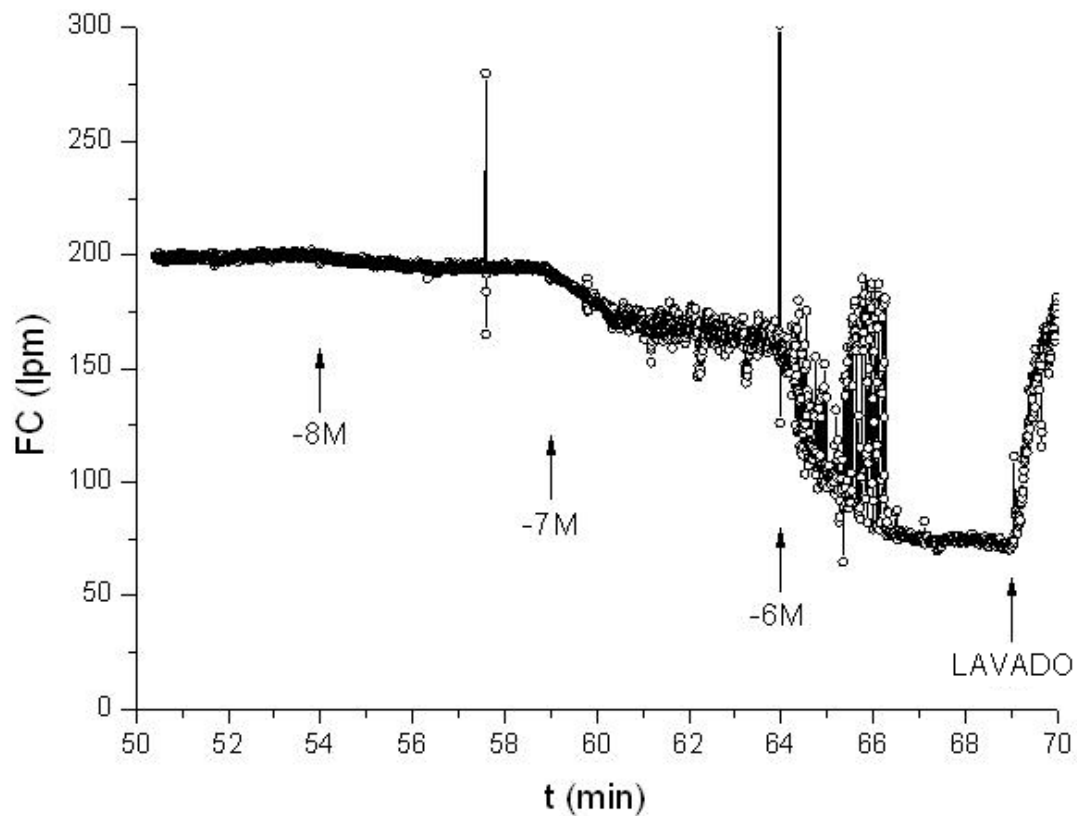


Figura 27. Tacograma de un corazón aislado en respuesta a la acetilcolina

El ejemplo mostrado es de un corazón aislado de una rata sham. Las flechas indican el momento en el que llega al corazón cada dosis de acetilcolina (ACh), expresada como el $\log [ACh]$ (M).

Tabla 7. Respuesta cronotrópica a la acetilcolina del corazón aislado de una rata sham

[ACh] (M)	FC instantánea mínima (lpm)	FC instantánea mínima (%)
0	196	100
10^{-8}	192	98
10^{-7}	158	81
10^{-6}	71	36

El corazón aislado elegido para este ejemplo es el mismo cuyo tacograma se ve en la figura 27. Ver la explicación en el texto. ACh: acetilcolina, FC: frecuencia cardíaca.

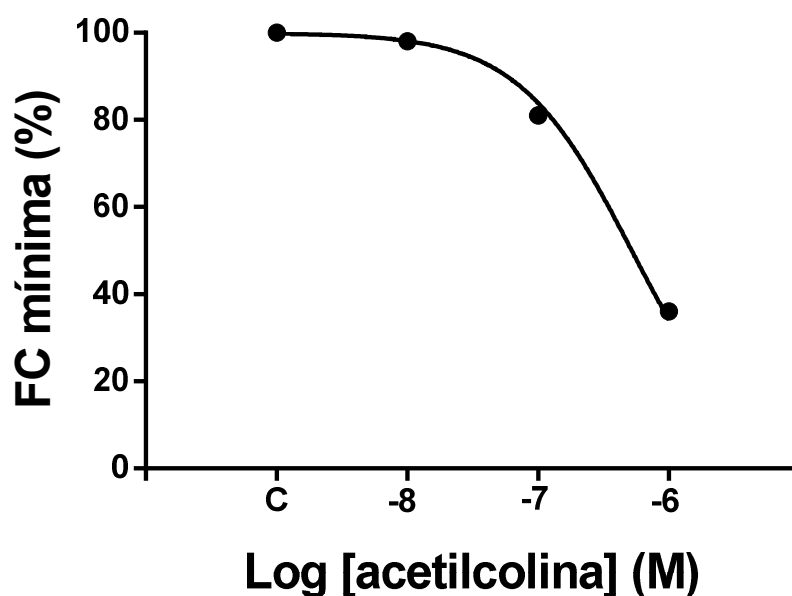


Figura 28. Curva dosis-respuesta para la acetilcolina en un corazón aislado

El corazón que se toma como ejemplo fue aislado de una rata sham y es el mismo cuyos valores se presentan en la tabla 7. La curva se ajusta a los puntos como se explica en la descripción del Análisis estadístico de este capítulo. El log IC_{50} para esta curva es -6.3.

- **Resultados y discusión**

La respuesta cronotrópica negativa a la ACh fue diferente entre ambos grupos de corazones. Los valores de log IC_{50} presentaron diferencias

estadísticamente significativas, siendo menores en el grupo de corazones sépticos (figura 29). La diferencia de la dosis (IC_{50}) también fue estadísticamente significativa, con un valor promedio de 1.7×10^{-7} y 4.4×10^{-6} M en los grupos séptico y sham respectivamente ($P= 0.0451$).

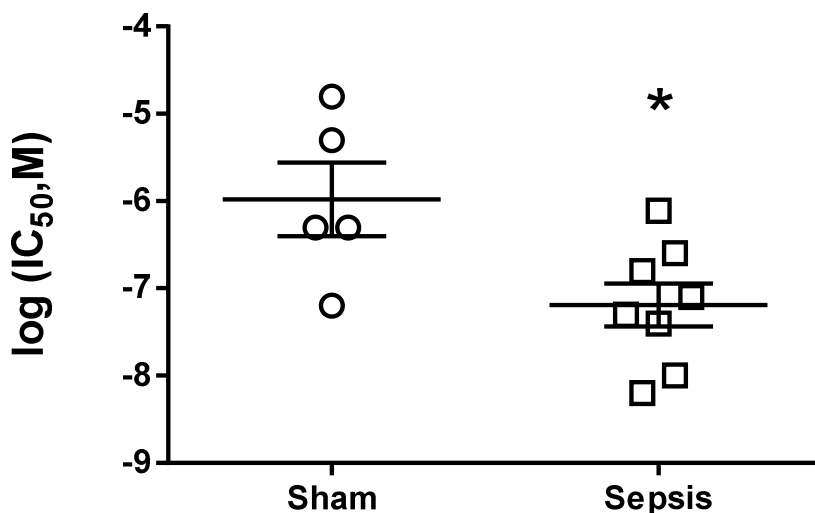


Figura 29. Respuesta cronotrópica de los corazones aislados a la acetilcolina

Se muestran los valores de log IC_{50} para cada uno de los corazones aislados incluidos en este protocolo. Las líneas horizontales representan el valor de media $\pm$ SEM para cada grupo (6.0 ± 0.4 y 7.2 ± 0.2 en el grupo sham y séptico, respectivamente). *: valor de P de 2 colas = 0.0412, test de Mann-Whitney.

La diferencia de log IC_{50} entre los grupos de corazones aislados de ratas sépticas y ratas sham, considerando los valores de la media, fue 1.2 (-7.2 y -6.0 respectivamente). La transformación de esta diferencia a su antilog la convierte en una relación de potencias de $10^{1.2}$, lo cual equivale a 16. Por lo tanto, se puede concluir que la ACh fue 16 veces más potente en los corazones aislados de ratas sépticas en comparación con los aislados de ratas sham [102]. La figura 30 muestra las curvas dosis-respuesta representativas para cada grupo a partir de las respuestas promedio para cada dosis. Las comparaciones de estas respuestas arrojaron una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos para la dosis menor (1×10^{-8} M).

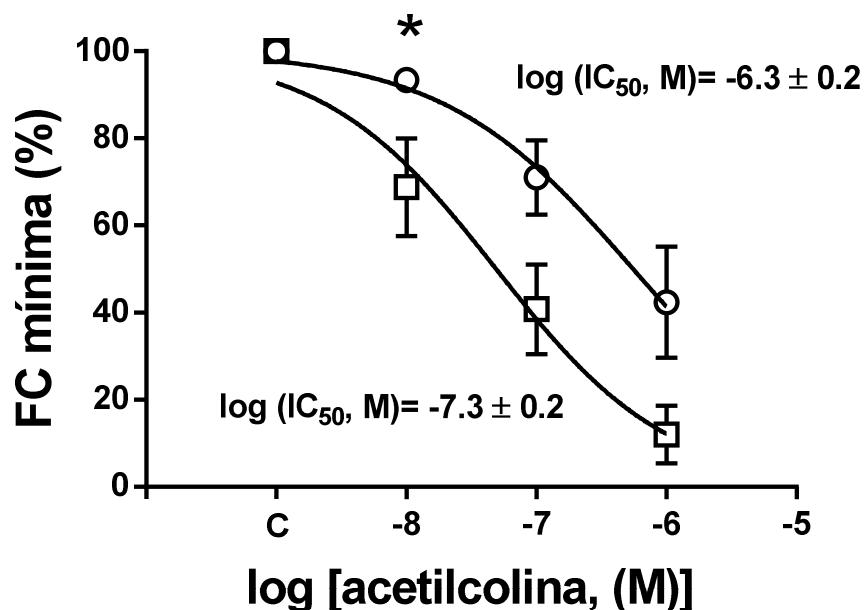


Figura 30. Curvas dosis-respuesta para acetilcolina

Se muestran las curvas representativas para los grupos sham (círculos) y séptico (cuadrados) obtenidas por ajuste no-lineal de la respuesta promedio ($N=5$ y 8 , respectivamente). El $\log IC_{50}$ a partir de estas curvas es similar al obtenido promediando los $\log IC_{50}$ individuales para cada corazón (ver pie de figura 29). *: valor P de 2 colas $=0.027$, test de Mann-Whitney.

La evaluación de la respuesta cronotrópica a la ACh se hizo a partir de una FC menor a la fisiológica, lo que pudo haber reducido la capacidad de respuesta y por lo tanto disminuido la posibilidad de discriminación entre los grupos. A pesar de este posible inconveniente, fueron detectadas diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de corazones.

Por lo tanto, la alta FC y la baja VFC en la rata séptica no es probable que puedan ser explicados por refractariedad del corazón a la ACh, como proponen Gholami y col. [53]. Ellos encontraron la reducción de la VFC en ratas sépticas concomitantemente con hiposensibilidad de la aurícula aislada a la carbacolina (agonista muscarínico no hidrolizable por la acetilcolinesterasa) 5 h después de la inyección de LPS. La diferencia en el resultado podría deberse al modelo diferente y/o al tiempo que transcurre hasta que se analiza el tejido aislado. Al igual que lo descrito para la Nor, la hiporespuesta cronotrópica

negativa a la ACh de las aurículas aisladas de ratas a las que se les inyectó LPS sólo se observó si las ratas inyectadas eran sanas pero no cirróticas [103].

El mecanismo por el cual la respuesta cronotrópica negativa es mayor para una misma dosis de ACh en nuestros corazones sépticos podría deberse a una mayor expresión de receptores muscarínicos (ver abajo) y/o a una menor actividad de la acetilcolinesterasa. Hinkelbein y col. encontraron subexpresión de la acetilcolinesterasa en ratas 48 h después de la inducción de sepsis por CLP [104].

Sin embargo, la menor concentración de ACh para provocar el mismo efecto en corazones aislados sépticos no parece deberse a diferencias en la acción o expresión de la acetilcolinesterasa dado que ambos grupos de corazones, sépticos y sham, recuperaban la FC previa a la perfusión con ACh rápidamente, luego del lavado que se hacía al terminar la perfusión con la mayor dosis de ACh (figura 27).

Dong y col. [105] describieron cambios en la expresión de receptores muscarínicos en los ventrículos de ratas sépticas. Encontraron sobreexpresión de receptores muscarínicos M2 después de 9 h de la inducción de sepsis por CLP, durante la fase “hiperdinámica”, lo cual es consistente con nuestro resultado. Sin embargo, describen una fase hipodinámica a continuación (18 h posteriores a la CLP) con subexpresión de dichos receptores.

Más allá del mecanismo, la hipersensibilidad a la ACh del corazón aislado, podría estar evidenciando una respuesta compensadora frente a la hiperactivación simpática o más específicamente a un déficit colinérgico. Estas dos posibilidades implicarían un escenario de saturación de la modulación simpática a pesar de aumento de la modulación parasimpática en el primer caso o de saturación de la modulación simpática enfatizada por la pérdida de modulación parasimpática. Si separamos los corazones aislados sépticos en dos subgrupos de acuerdo a los valores de VFC *in situ* (datos no mostrados), los aislados de ratas sépticas con menor VFC son los que presentan hipersensibilidad mientras que los de VFC normal, presentan valores de log IC₅₀ similares a los sham. Por lo tanto, planteamos la hipótesis de un déficit colinérgico del organismo séptico. Para evaluar esta hipótesis, se propone determinar la concentración de ACh en la aurícula derecha de la rata séptica, tal como se describe en el capítulo siguiente.

Conclusión

Los corazones aislados de ratas sépticas no se diferencian de los corazones aislados de ratas sham en cuanto a su FC espontánea ni a sus índices de VFC. Los corazones *in vitro* presentan menor FC que *in situ*. Por lo tanto, el descenso de la FC es más pronunciado en los corazones sépticos ya que la rata séptica presentaba taquicardia. Este resultado sugiere un mayor predominio simpático en las ratas sépticas que en las sham. Por otro lado, la similitud de SDNN del corazón sham y séptico *in vitro* implica un descenso de la VFC en los corazones aislados de ratas sham. En los corazones aislados sépticos la VFC no disminuye, lo que podría evidenciar la falta de modulación autonómica *in situ*.

El acoplamiento entre el SNA y el corazón está alterado en la sepsis, dado que los corazones aislados sépticos son hipersensibles a la acción cronotrópica negativa de la ACh.

EXPERIMENTO 3

Objetivo específico 4:

Evaluar la funcionalidad del sistema nervioso autónomo en ratas sépticas.

Hipótesis: Las ratas sépticas presentan hiperactivación simpática y disfunción parasimpática.

Experimento:

Comparar los niveles de los neurotransmisores autonómicos entre ratas sépticas y sham: Nor plasmática y ACh en aurícula derecha.

Justificación:

Dado los resultados obtenidos en los Experimentos 1 y 2 y los antecedentes bibliográficos, esperamos que las ratas sépticas presenten una hiperactivación simpática que podrá evaluarse indirectamente midiendo la concentración de Nor plasmática [106]. En el caso de la ACh, a partir del resultado del Experimento 2, se plantea la hipótesis adicional de déficit colinérgico. Se evaluará la transmisión colinérgica en forma indirecta determinando la concentración de ACh y colina en la aurícula derecha. La ACh es rápidamente hidrolizada una vez que es liberada y por lo tanto no se espera encontrar niveles detectables en plasma. Por eso, se cuantifican sus niveles en el tejido. Se selecciona únicamente la aurícula derecha por dos motivos: 1. el efecto cronotrópico que estamos estudiando depende de la acción de la ACh a nivel del nodo sinusal, ubicado en ese sector del corazón, 2. la innervación parasimpática es más densa en la aurícula derecha que en cualquier otra zona del corazón como lo muestran las mayores concentraciones de ACh encontradas allí en comparación con la aurícula izquierda y los ventrículos [83].

Descripción:

- Animales

Se utilizó un nuevo lote de 24 ratas macho para realizar estos experimentos (lote 2). Las ratas eran adultas (12.8 ± 0.4 semanas de edad) y el peso inicial fue de 314 ± 4 g. De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento 1, se indujo sepsis peritoneal mediante el modelo CLF (300 mg/kg) y el registro del ECG posterior a la inducción de sepsis se realizó en todos los casos al otro día de dicho procedimiento (figura 31).

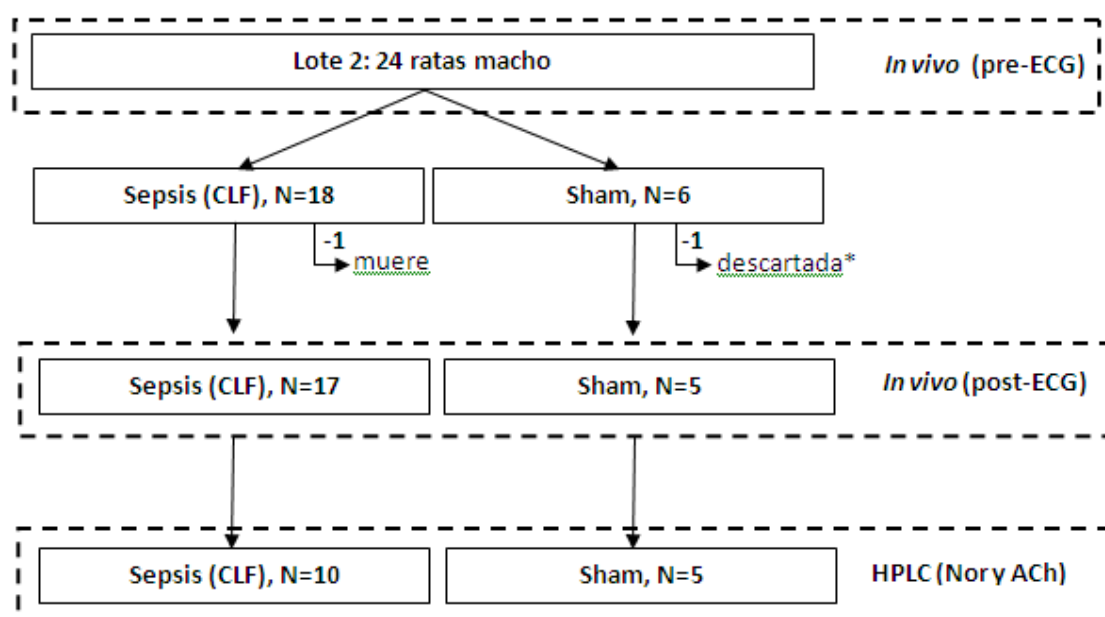


Figura 31. Esquema del número de animales utilizados: Lote 2

Se muestra que una rata séptica murió antes de realizar el registro del ECG posterior a la inducción de sepsis. Una rata sham fue descartada por arritmia en el registro previo a la inducción de la sepsis simulada (porcentaje de extrasístoles $\geq 10\%$; el resto de las ratas de los lotes 1 y 2 presentó valores $< 1\%$ a excepción de una rata que tuvo 2.8%).

- Protocolo

El registro del ECG antes y después de la inducción de la sepsis se realizó como se describió antes. Una vez finalizado el registro del ECG del día posterior a la inducción de la sepsis, se tomaba una muestra de sangre del ventrículo derecho para la determinación de catecolaminas y se extraía la aurícula derecha para la cuantificación de ACh y colina. La aurícula derecha era rápidamente congelada en nitrógeno líquido.

A las ratas de este lote se les midió la temperatura rectal antes y después de la inducción de sepsis (al inicio de la cirugía para inducir sepsis y al inicio de la cirugía para aislar la aurícula derecha).

- Análisis estadístico

La cuantificación de neurotransmisores autonómicos se realizó únicamente en 10 de las 17 ratas sépticas. Se seleccionaron las 10 ratas sépticas con valores extremos de SDNN (las 5 ratas sépticas con los mínimos valores de SDNN y las 5 con los máximos).

Las diferencias obtenidas en el experimento 3 se consideraron estadísticamente significativas si el valor de P de 1 cola < 0.05 . Se seleccionó 1 cola porque antes de realizar las comparaciones se preveía el sentido de la diferencia, por ejemplo, un aumento de las catecolaminas plasmáticas en las ratas sépticas.

- Resultados y discusión

La mortalidad fue 0% en las ratas sham y 6% (1 de 18) en las sépticas. El porcentaje de ratas que redujo su SDNN a valores anormales fue 29% (5 de 17). Si se compara la mortalidad y el porcentaje de ratas que redujeron su SDNN a valores anormales, con los obtenidos para el mismo modelo en el lote 1 (tablas 2 y 5), se verá que los valores son menores en el lote 2. Esta diferencia no se puede explicar por diferencias de edad ya que las ratas CLF del lote 1 presentaban similar edad que las ratas del lote 2 (13.8 ± 0.4 y 13.1 ± 0.5 semanas, respectivamente). Dentro del lote 2, las ratas que disminuyeron su VFC a valores anormales resultaron tener una edad significativamente mayor que las que mantuvieron su VFC normal (15.2 ± 0.9 vs. 12.4 ± 0.5 semanas, $N=5$ y 12 respectivamente, $P<0.01$). De todos modos, la mortalidad y el porcentaje de ratas con SDNN anormal en el lote 2 son coherentes con los del lote 1 en el sentido que una mortalidad intermedia entre los modelos CLP y CLF del lote 1 genera un porcentaje intermedio de ratas con SDNN anormal.

Los animales sham mantuvieron su temperatura corporal (en °C: 36.0 ± 0.4 vs. 36.3 ± 0.5 ; $N=5$) y los animales sépticos la aumentaron (en °C: 36.5 ± 0.1 vs. 37.2 ± 0.2 ; $N=15$; $P=0.002$). No se encontró correlación entre la temperatura y la frecuencia cardíaca considerando por separado los valores anteriores o posteriores a la inducción de sepsis.

La figura 32 muestra los valores de la FC y la VFC antes y después de la inducción de sepsis o sham sepsis en cada una de las 15 ratas del lote 2 a las que se les cuantificaron los neurotransmisores autonómicos (5 sham y 10 sépticas). Al igual que los resultados en el experimento 1, las ratas sépticas aumentaron su FC en forma estadísticamente significativa (de 334 ± 8 a 425 ± 20 lpm). Además, las ratas sépticas disminuyeron su VFC también en forma estadísticamente significativa si consideramos 2 de los índices evaluados: SDNN (de 12.7 ± 1.1 a 5.9 ± 1.3 ms) y CV (de 7.2 ± 0.7 a 3.8 ± 0.7 %). El

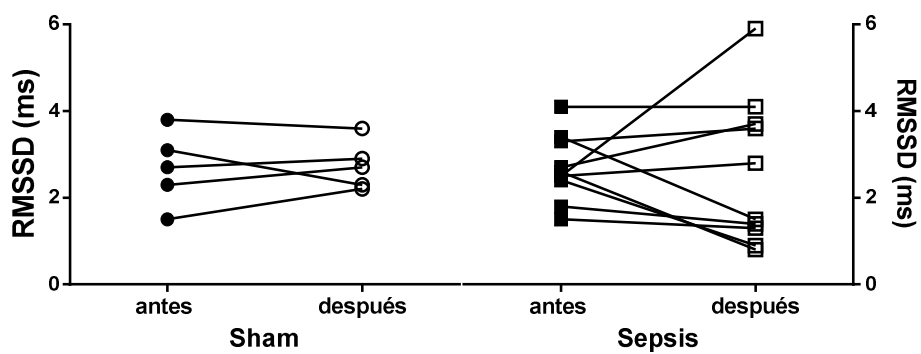
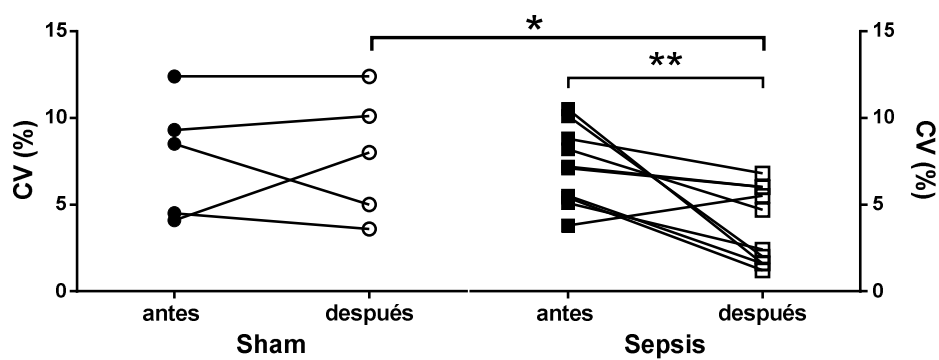
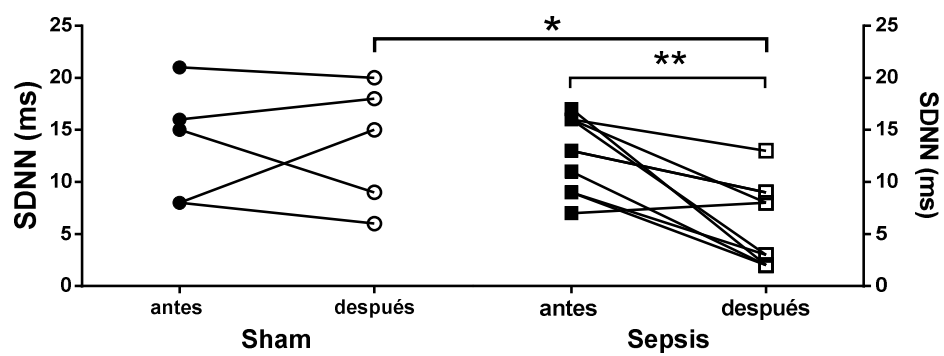
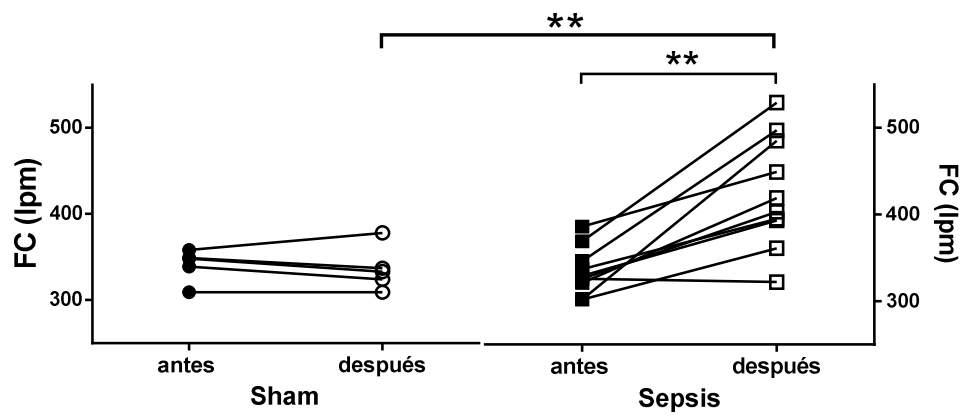
RMSSD no cambió, tanto si lo comparamos con los valores previos a la inducción de sepsis (2.7 ± 0.2 ms) como con los valores en las ratas sham posteriores a la inducción de sham sepsis (2.7 ± 0.3 ms).

El plasma de las ratas sépticas presentó mayor concentración de Nor que el plasma de las ratas sham. Tal como se muestra en la figura 33 la diferencia fue estadísticamente significativa (ng/ml: 29.2 ± 8.4 vs. 5.8 ± 4.1 , $P=0.009$). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la concentración plasmática de adrenalina (figura 33).

Los niveles plasmáticos de Nor aumentados eran de esperar en una situación de hiperactividad nerviosa simpática [106]. En cuanto a los resultados de adrenalina, están de acuerdo con los descritos por Kovarik y col. quienes encontraron un incremento en la concentración plasmática de adrenalina 5 h después de la inducción de sepsis por CLP en ratas, pero no luego de 20, 24, o 41 h [107]. Sin embargo, Hahn y col. describieron un aumento sostenido en los niveles de catecolaminas circulantes (adrenalina, Nor y dopamina) 20 h después de la CLP [108]. Berger y col. también describieron aumento estadísticamente significativo de Nor y adrenalina 24 h después de la CLP [109]. Si bien nuestra comparación de adrenalina no genera diferencias estadísticamente significativas, la media en el grupo séptico es mayor que en el sham (82.2 ± 24.6 vs. 27.1 ± 7.5 ng/ml).

Figura 32. Cambios de la FC y la VFC en las ratas sépticas y sham (lote 2)

Los cuadrados representan los valores de las ratas sépticas ($N=10$) y los círculos los de las ratas sham ($N=5$) antes (blancos) y después (negros) de la inducción de sepsis o sham sepsis. Se muestran las comparaciones que generaron valores estadísticamente significativos y se representan con 1 o 2 asteriscos de acuerdo al valor de P de 1 cola (test de Mann-Whitney o Wilcoxon según corresponda). *: $P<0.05$ o **: $P<0.01$.



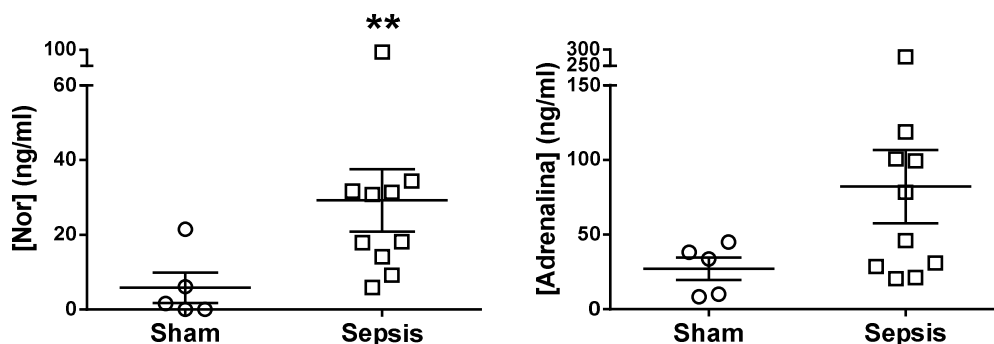


Figura 33. Concentración plasmática de catecolaminas en ratas sham y sépticas

Se muestran los valores de noradrenalina (Nor) y adrenalina obtenidos para cada una de las 10 ratas sépticas y 5 sham consideradas en la figura 32. Las barras horizontales muestran además los valores de media $\pm$ SEM para cada grupo de ratas. Para la Nor los valores son: 5.8 ± 4.0 y 38.2 ± 15.6 ng/ml. **: $P=0.009$

Si comparamos los valores de Nor en el plasma de nuestras ratas sham (5.8 ± 4.0 ng/ml) veremos que son algo más elevados que los descritos en ratas sanas por otros autores (en ratas Sprague-Dawley, 0.12 ± 0.01 ng/ml [109] y en ratas Wistar-Kyoto [110]). Nuestro procedimiento para la extracción de sangre se realiza con el tórax abierto. Se ha descrito que la asfixia por CO_2 provoca aumento de la Nor plasmática a través de los nervios simpáticos [110], lo que podría explicar las diferencias de los valores obtenidos. La comparación entre nuestros grupos sham y séptico es válida igual porque el método de extracción es el mismo para todas las ratas.

La cuantificación de ACh en las aurículas no presentó diferencias estadísticamente significativas pero sí los valores de colina (figura 34). La concentración de colina en las aurículas sépticas fue menor que en el grupo sham (nMol/mg de proteína: 0.6 ± 0.1 vs. 1.6 ± 0.6 , $P=0.0063$).

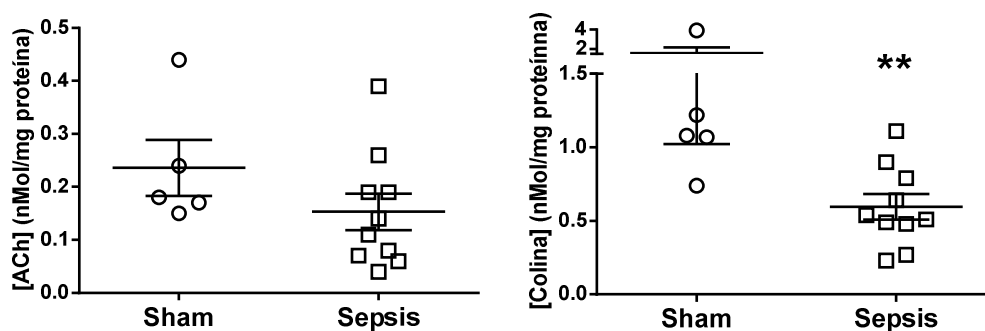


Figura 34. Concentración de acetilcolina y colina en aurículas derechas de ratas sham y sépticas

Se muestran los valores de concentración de acetilcolina (ACh) y colina en las aurículas derechas de cada una de las 10 ratas sépticas y 5 sham. Las barras horizontales muestran además los valores de media $\pm$ SEM para cada grupo de ratas. En el caso de la ACh esos valores son 0.24 ± 0.05 y 0.15 ± 0.03 nMol/mg de proteína en el grupo sham y séptico, respectivamente. **: $P=0.0063$.

El método de cuantificación de la ACh y colina en la aurícula derecha no discrimina el lugar específico donde se encuentran (dentro de la neurona o en el espacio sináptico) pero asumimos que la determinación global de ambos, el neurotransmisor (ACh) y su precursor y metabolito (la colina), es un indicador general de la integridad del sistema de neurotransmisión colinérgico [111]. La falta de diferencias en la concentración de ACh podría deberse a cambios paralelos en su síntesis y liberación, lo cual no alteraría la concentración en el tejido [112]. Sin embargo, niveles similares de ACh concomitantes con niveles reducidos de colina sugieren una alteración de la función colinérgica.

Crivello y col. provocaron cambios en la disponibilidad de colina en ratas mediante modificaciones nutricionales a corto plazo. Encontraron afectada la concentración tisular de colina y la síntesis y liberación de ACh en el sistema nervioso periférico [113]. Las ratas sépticas que estudiamos nosotros dejan de ingerir alimento. Falta determinar si un ayuno de esa duración sería suficiente para reducir la disponibilidad de colina y alterar así la vía de señalización colinérgica. En ese caso, la reducción de los niveles de colina en la aurícula podrían deberse a la necesidad de cubrir los requerimientos del cerebro de los precursores para la síntesis de ACh (glucosa y colina) [114].

Se puede especular sobre otras posibles causas de esta disfunción parasimpática. Por ejemplo, se ha descrito que el co-transmisor neuropéptido Y liberado durante la estimulación nerviosa simpática cardíaca prolongada

reduce la liberación de ACh actuando a través de receptores pre-sinápticos [115]. También podría ser que la propia severidad de la enfermedad produjera retracción de las fibras nerviosas parasimpáticas. Esto se ha descrito en otras patologías que involucran infección y citoquinas como la enfermedad de Chagas, concomitantemente con un aumento de los receptores muscarínicos cardíacos [116]. Además, el procedimiento quirúrgico para inducir sepsis realizado a nuestras ratas y la propia peritonitis, pudo haber dañado los nervios autonómicos que inervan las vísceras pélvicas y esto afectar en forma “retrógrada” el control que el nervio vago ejerce sobre otros órganos como el corazón. De hecho, se ha propuesto que las adherencias entre las vísceras abdominales como las que apreciamos en las necropsias de nuestras ratas sépticas, son en realidad consecuencia del déficit colinérgico a nivel intestinal provocado por la injuria tisular y la inflamación (demostrada por menor actividad de la enzima que sintetiza la ACh y menor tránsito intestinal a pesar de la mayor densidad de receptores muscarínicos) [117]. Otra posibilidad sería que la disfunción parasimpática a nivel cardíaco ocurriera por desensibilización de la activación del reflejo inflamatorio que se describe en la Introducción. Fairchild y col. encuentran activación parasimpática por la inyección de distintos patógenos a ratones, que se traduce en un descenso de la FC en la primer hora posterior a la infección. Sin embargo, si repiten la inyección a las 3 h o a los 3 días ya no obtienen dicha respuesta [67].

La posibilidad de que este déficit colinérgico sea la causa de la hipersensibilidad encontrada en el corazón aislado puede fundamentarse en los resultados obtenidos por Corey y McPhillips [118]. Ellos describieron que el pretratamiento de ratas durante 6 días con un bloqueante ganglionar producía un aumento de la sensibilidad del corazón a la acción cronotrópica negativa del carbachol. Es interesante considerar además, lo que discuten estos autores sobre cómo las respuestas en los diferentes preparados experimentales pueden variar. Por ejemplo, detectan hipersensibilidad a catecolaminas en corazón aislado de cobayo pero no en su aurícula aislada, sugiriendo que la ocurrencia de supersensibilidad estaba inversamente relacionada a la cantidad de manipulación y trauma al que se somete el tejido durante su aislamiento. Esto podría explicar algunas de las diferencias ya mencionadas, por ejemplo,

con los resultados de Gholami y col. que describieron en aurículas aisladas de ratas sépticas con VFC disminuida una menor respuesta cronotrópica a la ACh [53].

Conclusión:

Las ratas sépticas presentan niveles plasmáticos elevados de Nor comparadas con las ratas sham lo que sugiere una hiperactividad simpática en la sepsis. Además, las ratas sépticas tienen menor concentración de colina en la aurícula derecha que las aurículas sham lo que evidenciaría una disfunción parasimpática a nivel cardíaco.

Apéndice del Experimento 3

Se plantea un análisis alternativo de los datos del experimento 3. Los resultados obtenidos son coherentes con la VFC disminuida pero no puede asegurarse que exista una relación causa-efecto entre ellos. Las ratas sépticas seleccionadas para la cuantificación de neurotransmisores fueron las que presentaban valores extremos de VFC. Por lo tanto, se puede subdividir el grupo de 10 ratas sépticas en 2 subgrupos de 5 ratas cada uno, con los valores mínimos y máximos de VFC, lo cual coincide con valores anormales o normales de SDNN. Se realizan las comparaciones entre estos subgrupos y entre cada uno de ellos y el grupo sham (test de Mann-Whitney) y se consideran estadísticamente significativos los valores de P de 1 cola < 0.05 . De esta forma, se podrá analizar si dentro de las ratas sépticas, la diferencia de VFC determina diferencias en las otras variables analizadas. Describimos los resultados más relevantes:

1. La concentración plasmática de Nor está elevada en ambos subgrupos de ratas sépticas en comparación con las sham ($P=0.0159$ y $P=0.0437$ en las comparaciones entre el grupo sham y el subgrupo con SDNN anormal y normal, respectivamente) pero los niveles de Nor entre ambos subgrupos sépticos no se diferencian.
2. Los valores de ACh en las ratas con SDNN anormal son menores que en las ratas sham ($P=0.0278$). Sin embargo, los valores de ACh de las ratas

sépticas con SDNN normal no se diferencian de los encontrados en las ratas sham ni en las sépticas con SDNN anormal (figura 35).

- Los subgrupos sépticos presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí al comparar la relación de concentraciones entre ACh y colina siendo menor en el grupo con SDNN anormal: 0.16 ± 0.03 vs. 0.34 ± 0.06 , $P=0.0278$.

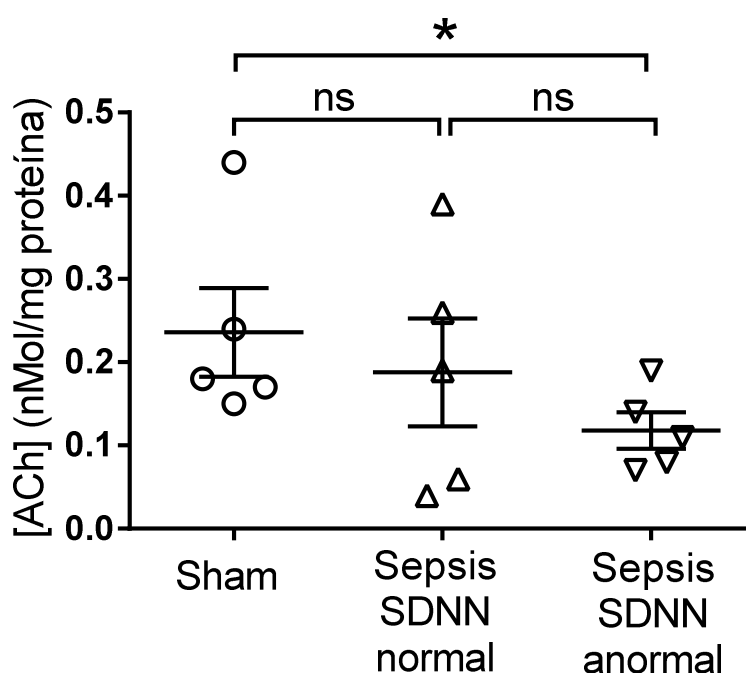


Figura 35. Concentración de acetilcolina en aurículas derechas de ratas sham y sépticas

Son los mismos valores mostrados en el gráfico de la izquierda de la figura 34 pero en este caso se separan las 10 ratas sépticas en 2 subgrupos de acuerdo a sus valores de VFC (SDNN). Las barras horizontales muestran además los valores de media $\pm$ SEM para cada grupo de ratas. Los valores para los subgrupos con SDNN normal y anormal son 0.19 ± 0.06 y 0.12 ± 0.02 nMol/mg de proteína, respectivamente.

Consideramos que estas comparaciones confirman el déficit colinérgico encontrado en la sepsis. Sin embargo, sería de esperar que la diferencia de VFC entre los subgrupos sépticos estuviera relacionada con alguna diferencia

en la cuantificación de los neurotransmisores. Podría ser que a iguales valores de Nor, la diferencia de VFC se debiera a diferencias en la ACh, por ejemplo. Si miramos las concentraciones promedio de ACh en el gráfico de la figura 35 se observa que disminuyen al disminuir la VFC. La falta de significación estadística entre los subgrupos sépticos podría estar determinada por la gran dispersión de valores en el grupo de animales sépticos con SDNN normal. Sin embargo, los animales sépticos con VFC anormal parece ser un grupo mucho más homogéneo. A su vez, cuando la VFC alcanza esos valores mínimos, es posible que sean menos los mecanismos subyacentes y por lo tanto más fácil de discriminar. Por ejemplo, sólo en este subgrupo (animales sépticos con VFC anormal) se encuentra una correlación estadísticamente significativa entre las concentraciones de ACh en la aurícula y los valores de RMSSD (índice de VFC relacionado con la regulación parasimpática), tal como lo muestra la figura 36.

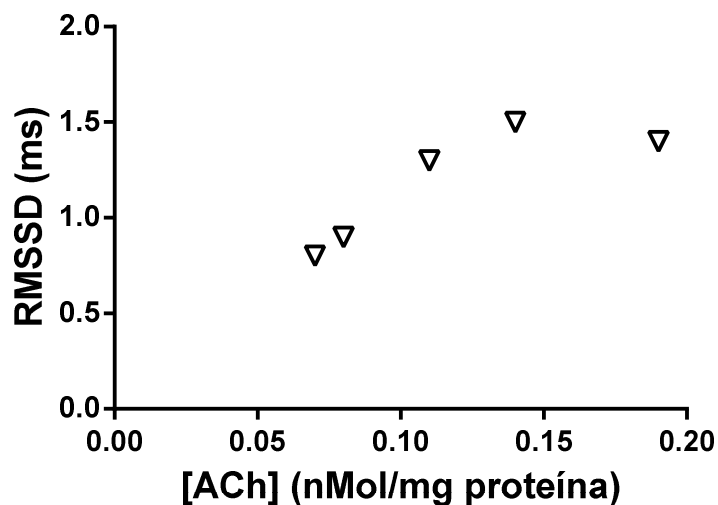


Figura 36. Valores de RMSSD en función de la concentración de acetilcolina

Se muestran los valores para las 5 ratas del subgrupo séptico con mínima VFC. La correlación de Spearman genera un valor de $r = 0.9$ ($P=0.0417$). Si se quisieran graficar los valores de RMSSD para el grupo sham y el subgrupo séptico con VFC normal, quedarían fuera de escala porque todos son > 2 ms.

Conclusión:

Dentro del grupo de ratas sépticas, la separación de los animales de acuerdo a su VFC sólo determina diferencias estadísticamente significativas en la relación entre las concentraciones de ACh y colina. Por lo tanto, se necesitan más evidencias para determinar la relación causa- efecto entre el déficit colinérgico y la reducción de la VFC en sepsis.

CONCLUSIÓN GENERAL

1. Se encontró una asociación entre la reducción de la VFC y la mortalidad en ratas sépticas. Cuanto mayor es la severidad de la agresión del modelo de inducción de sepsis, mayor es la mortalidad y menor la VFC. Los modelos de inducción de sepsis de mayor mortalidad generan un mayor porcentaje de ratas con reducción de la VFC a valores anormales ($SDNN < 4$ ms). Entre los distintos modelos de inducción de sepsis peritoneal ensayados, la doble ligadura del ciego con inóculo fecal (CLF, 300 mg/kg) fue óptimo para estudiar la reducción de la VFC teniendo en cuenta la mortalidad del modelo y el porcentaje de ratas que disminuye su VFC a valores anormales.
2. El corazón aislado de ratas sépticas presenta una FC intrínseca similar a la del corazón aislado de ratas sham a pesar de la taquicardia encontrada en el organismo séptico. Los índices de VFC del corazón aislado tampoco discriminan entre corazones sépticos y sham. Los valores de VFC disminuyen al aislar el corazón sham pero no el séptico.
3. El corazón aislado séptico es hipersensible a la acción cronotrópica negativa de la ACh. La respuesta cronotrópica positiva a la Nor es similar en los corazones aislados sépticos y sham.
4. Las ratas sépticas presentan mayor concentración de Nor plasmática y menor concentración de colina en la aurícula derecha en comparación con las ratas sham.

El principal aporte de esta tesis es que las ratas sépticas, con taquicardia y reducción de la VFC, presentan una alteración de la función autonómica que incluye no sólo hiperactivación simpática sino también un déficit colinérgico en la aurícula derecha. Este resultado novedoso es relevante porque fue obtenido en un modelo experimental que imita la sepsis peritoneal en humanos (con un foco séptico e infección polimicrobiana).

La reducción de la VFC, entonces, no se explicaría por la refractariedad del corazón a los neurotransmisores autonómicos. De hecho, el corazón aislado séptico fue hipersensible a la ACh.

Las ratas sépticas fallarían entonces en mantener una activación vagal y por lo tanto la hiperactivación simpática dominaría, saturando la posibilidad de modulación y adaptación cardíaca. Este resultado queda en evidencia al comprobar que los corazones de ratas sépticas *in vitro* no disminuyen su VFC en comparación con la situación *in situ*, a diferencia de lo que ocurre en las ratas sham. Este escenario de 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 [119]. 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.

Si bien el déficit colinérgico a nivel cardíaco es un resultado nuevo, varias medidas terapéuticas investigadas recientemente están de acuerdo con un desequilibrio autonómico que incluye además de la hiperactivación simpática, la hipoactivación vagal. Por ejemplo, se ha propuesto restablecer el equilibrio entre las ramas simpática y parasimpática del SNA mediante estimulación eléctrica del nervio vago en ratas a las que se les induce sepsis por inyección de LPS [120] [121]. Setoguchi y col. recientemente 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 [122]. Sin embargo, la tasa de supervivencia no mejoró. Kessler y col. [123] encontraron que la vagotomía subdiafragmática aumentaba la mortalidad en otro modelo de sepsis polimicrobiana en ratones. Probaron el tratamiento con nicotina (porque la ACh controla la respuesta inflamatoria a través de receptores nicotínicos en las células inmunitarias) pero no lograron mejorar la supervivencia. 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 [124]. También se ha evaluado como maniobra terapéutica el bloqueo de receptores adrenérgicos β -1 [125] [126].

Una de las limitaciones de este estudio es que se analizaron únicamente las ratas sépticas que sobrevivieron. Además, cuando se discriminaron las ratas sépticas de acuerdo a sus valores de VFC, sólo se encontró una diferencia estadísticamente significativa en la relación de concentraciones entre ACh y colina lo que pone en duda que los resultados obtenidos puedan ser la causa de los distintos grados de reducción de la VFC en sepsis. Comprender las diferencias dentro de los animales sépticos puede ser de gran relevancia para explicar porqué algunos roedores con sepsis intraabdominal viven y otros mueren.

En conclusión, la paradoja de la hipersensibilidad a la ACh en corazones aislados de ratas sépticas argumenta a favor de funcionalidad vagal disminuida en lugar de respuesta alterada a los neurotransmisores autonómicos por parte de los corazones sépticos. La actividad vagal disminuida se sustenta además en las menores concentraciones de colina en las aurículas derechas de las ratas sépticas. Por lo tanto, la reducción de la VFC en sepsis puede ser explicada, al menos en parte, por la actividad alterada de ambas ramas del SNA, es decir, sobreexcitación simpática y disfunción parasimpática.

El artículo científico que surge de esta tesis se incluye como apéndice.

PERSPECTIVAS

Nuevas estrategias metodológicas permitirán confirmar algunos de los resultados obtenidos desde otra perspectiva. Por ejemplo, a través del análisis de las proteínas de membrana por Western blot, se podría determinar si la expresión de receptores muscarínicos está aumentada en la aurícula derecha de ratas sépticas lo que permitiría explicar la hipersensibilidad a la respuesta cronotrópica negativa de la ACh encontrada en su corazón aislado. Por inmunohistoquímica se podría determinar si el déficit colinérgico encontrado en la aurícula derecha séptica se corresponde con un cambio estructural que implique una densidad de innervación parasimpática disminuida en esa zona del corazón.

La mera observación de los ECG de las ratas sépticas nos sugirió analizar un aspecto que no nos habíamos planteado originalmente: la prolongación del intervalo QT a pesar de la reducción del intervalo RR (aumento de la FC). Este resultado lo corroboramos cuantitativamente para las ratas del lote 1 y 2. La prolongación del intervalo QT se ha relacionado con un riesgo aumentado a sufrir arritmias letales. Sin embargo, en otras especies, la sepsis se ha asociado con un acortamiento del intervalo QT. Por ejemplo, en el cerdo, la infusión i.v. de bacterias provocó taquicardia y acortamiento del intervalo QT (incluso corregido para la FC) asociado con una reducción de la duración del potencial de acción ventricular [127]. En situación de hiperactivación simpática se esperaría un aumento de la FC acompañado de un acortamiento de la duración del potencial de acción. La prolongación del intervalo QT podría ser independiente de la duración del potencial de acción y en realidad, estar determinada por una dispersión de la repolarización de diferentes células o sectores del corazón. Se podrían plantear hipótesis diversas y nuevos experimentos para profundizar en este resultado.

A pesar de la intensa investigación “translacional” para intentar disminuir la mortalidad de los pacientes con sepsis, no se ha encontrado aún una solución contundente [40]. A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y de la bibliografía al respecto, tiene sentido plantear como posible medida terapéutica, el tratamiento farmacológico para recomponer la actividad vagal en los

animales sépticos que reducen su VFC. El Br Bruno Suhr se planteó este objetivo preclínico en su proyecto de tesis de maestría de Pro.In.Bio. Realizará el registro continuo del ECG lo cual permitirá definir el momento de la reducción de la VFC. La reducción de la VFC no sólo determinará la oportunidad del tratamiento de ratas sépticas sino también el momento terapéutico. Además, el registro continuo del ECG permitirá analizar los cambios previos a la muerte. Esto contribuirá a comprender porqué los animales sépticos mueren. La infección descontrolada puede conducir a la muerte por varios mecanismos diferentes. Estos incluyen: shock séptico, falla respiratoria, falla metabólica, o síndrome de disfunción multiorgánica. La respuesta a la pregunta de porqué algunos roedores con sepsis intra abdominal viven y otros mueren no puede ser respondida por ahora pero es un área crítica de investigación [46].

La experiencia metodológica adquirida por la realización de esta tesis ha abierto puertas para establecer colaboraciones con otros investigadores. Por ejemplo, el Dr. Carlos Escande (Instituto Pasteur de Montevideo), está interesado en conocer cómo responden a la inducción de sepsis experimental sus ratones knock-out para sirtuinas. La Dra Alicia Mattiazzi (Universidad Nacional de La Plata, Argentina) quiere analizar la VFC *in situ* e *in vitro* en ratones knock-out para algunas de las proteínas relacionadas con el reloj de calcio cardíaco (por ejemplo, fosfolamban).

REFERENCIAS

1. Boyett MR, Tellez JO, Dobrzynski H (2009) The sinoatrial node: its complex structure and unique ion channel gene program. In: Zipes DP, Jalife J, editors. *Cardiac Electrophysiology: from cell to bedside*. 5 ed. Philadelphia.
2. Boron WF, Boulpaep EL (2009) *Medical Physiology: a cellular and molecular approach*. Philadelphia: Saunders-Elsevier.
3. Monfredi O, Dobrzynski H, Mondal T, Boyett MR, Morris GM (2010) The anatomy and physiology of the sinoatrial node--a contemporary review. *Pacing Clin Electrophysiol* 33: 1392-1406.
4. Lakatta EG, Maltsev V (2009) A new functional paradigm for the heart's pacemaker: mutual entrainment of intracellular calcium clocks and surface membrane ion channel clocks. In: Zipes DP, Jalife J, editors. *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
5. Monfredi O, Maltsev VA, Lakatta EG (2013) Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiology (Bethesda)* 28: 74-92.
6. Krejci A, Tucek S (2002) Quantitation of mRNAs for M(1) to M(5) subtypes of muscarinic receptors in rat heart and brain cortex. *Mol Pharmacol* 61: 1267-1272.
7. Li RA, Chiamvimonvat N (2009) Adrenergic signaling and cardiac ion channels. In: Zipes DP, Jalife J, editors. *Cardiac electrophysiology: from cell to bedside*. Philadelphia: Saunders Elsevier.
8. Stewart A, Huang J, Fisher RA (2012) RGS Proteins in Heart: Brakes on the Vagus. *Front Physiol* 3: 95.
9. Murray DR (2003) What is "heart rate variability" and is it blunted by tumor necrosis factor? *Chest* 123: 664-667.
10. Appel ML, Berger RD, Saul JP, Smith JM, Cohen RJ (1989) Beat to beat variability in cardiovascular variables: noise or music? *J Am Coll Cardiol* 14: 1139-1148.
11. Goldstein B, Fiser DH, Kelly MM, Mickelsen D, Ruttimann U, et al. (1998) Decomplexification in critical illness and injury: relationship between heart rate variability, severity of illness, and outcome. *Crit Care Med* 26: 352-357.
12. Akselrod S, Gordon D, Ubel FA, Shannon DC, Berger AC, et al. (1981) Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science* 213: 220-222.
13. Howorka K, Pumprla J, Schabmann A (1998) Optimal parameters of short-term heart rate spectrogram for routine evaluation of diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *J Auton Nerv Syst* 69: 164-172.
14. Tsuji H, Venditti FJ, Jr., Manders ES, Evans JC, Larson MG, et al. (1996) Determinants of heart rate variability. *J Am Coll Cardiol* 28: 1539-1546.
15. Migliaro ER, Contreras P, Bech S, Etxagibel A, Castro M, et al. (2001) Relative influence of age, resting heart rate and sedentary life style in short-term analysis of heart rate variability. *Braz J Med Biol Res* 34: 493-500.
16. Stauss HM (2003) Heart rate variability. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 285: R927-931.
17. Task Force of the ESC and the NASPE (1996) Heart rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology. *Circulation* 93: 1043-1065.
18. Migliaro ER, Canetti R, Contreras P, Hakas M, Eirea G, et al. (2004) Procesamiento de señales para el estudio de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca. In:

- Armentano RL DAC, Vera de Payer E, Risk MR editor. *Procesamiento de Señales e Imágenes: Teoría y Aplicaciones*. Buenos Aires.
19. Machado A, Migliaro ER, Contreras P, Coro F (2000) Automatic Filtering of R-R Intervals for Heart Rate Variability Analysis. *Annals of Non-Invasive Electrocardiology* 5: 255-261.
 20. Migliaro ER, Contreras P (2003) Heart rate variability: short-term studies are as useful as holter to differentiate diabetic patients from healthy subjects. *Ann Noninvasive Electrocardiol* 8: 313-320.
 21. Brennan M, Palaniswami M, Kamen P (2001) Do existing measures of Poincare plot geometry reflect nonlinear features of heart rate variability? *IEEE Trans Biomed Eng* 48: 1342-1347.
 22. Aubert AE, Ramaekers D, Beckers F, Breem R, Deneef C, et al. (1999) The analysis of heart rate variability in unrestrained rats. Validation of method and results. *Comput Methods Programs Biomed* 60: 197-213.
 23. Kamen PW, Krum H, Tonkin AM (1996) Poincare plot of heart rate variability allows quantitative display of parasympathetic nervous activity in humans. *Clin Sci (Lond)* 91: 201-208.
 24. Otzenberger H, Gronfier C, Simon C, Charloux A, Ehrhart J, et al. (1998) Dynamic heart rate variability: a tool for exploring sympathovagal balance continuously during sleep in men. *Am J Physiol* 275: H946-950.
 25. Contreras P, Canetti R, Migliaro ER (2007) Correlations between frequency-domain HRV indices and lagged Poincare plot width in healthy and diabetic subjects. *Physiol Meas* 28: 85-94.
 26. Hainsworth R (1995) The control and physiological importance of heart rate. In: Malik M, Camm JA, editors. *Heart Rate Variability*. Armonk, NY: Futura Publishing Company, Inc. pp. 3-20.
 27. Cerruti S, Bianchi A, Mainardi L (1995) Spectral analysis of the heart rate variability signal. In: Malik M, Camm JA, editors. *Heart Rate Variability*. Armonk, NY: Futura Publishing Company, Inc. pp. 63-74.
 28. Pancoto JA, Correa PB, Oliveira-Pelegrin GR, Rocha MJ (2008) Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Auton Neurosci* 138: 57-63.
 29. Guzik P, Piskorski J, Contreras P, Migliaro ER (2010) Asymmetrical properties of heart rate variability in type 1 diabetes. *Clin Auton Res* 20: 255-257.
 30. Contreras P (2005) Estudio de la Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca a través del gráfico de Poincaré. *PEDECIBA Biología - Ciencias Fisiológicas: Universidad de la República*. 86 p.
 31. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, et al. (2003) 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* 31: 1250-1256.
 32. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA (1997) Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 112: 235-243.
 33. Abbas A, Lichtman A, Pillai S (2009) *Inmunología celular y molecular*. Philadelphia: Saunders-Elsevier.
 34. Munford RS, Tracey KJ (2002) Is severe sepsis a neuroendocrine disease? *Mol Med* 8: 437-442.
 35. Libert C (2003) Inflammation: A nervous connection. *Nature* 421: 328-329.
 36. Borovikova LV, Ivanova S, Zhang M, Yang H, Botchkina GI, et al. (2000) Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. *Nature* 405: 458-462.

37. Tracey KJ (2002) The inflammatory reflex. *Nature* 420: 853-859.
38. Lin NT, Yang FL, Lee RP, Peng TC, Chen HI (2006) Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats. *Life Sci* 78: 1038-1043.
39. Nin N, Cassina A, Boggia J, Alfonso E, Botti H, et al. (2004) Septic diaphragmatic dysfunction is prevented by Mn(III)porphyrin therapy and inducible nitric oxide synthase inhibition. *Intensive Care Med* 30: 2271-2278.
40. Singer M, Glynne P (2005) Treating critical illness: the importance of first doing no harm. *PLoS Med* 2: e167.
41. Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, et al. (2013) Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. *Crit Care Med* 41: 580-637.
42. Manzanares W, Grecco G (2003) Sepsis. Aspectos clínicos y patogenia. In: Savio E, Grill F, editors. *Actualizaciones en infectología*. Montevideo: Arena. pp. 73-88.
43. Hurtado J (2004) Fisiopatología de los estados de shock. *Temas de Fisiopatología*. Montevideo: Oficina del Libro.
44. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW, 3rd, et al. (2005) Cecal ligation and puncture. *Shock* 24 Suppl 1: 52-57.
45. Marshall JC, Deitch E, Moldawer LL, Opal S, Redl H, et al. (2005) Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? *Shock* 24 Suppl 1: 1-6.
46. Deitch EA (2005) Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* 24 Suppl 1: 19-23.
47. Chopra M, Sharma AC (2007) Distinct cardiodynamic and molecular characteristics during early and late stages of sepsis-induced myocardial dysfunction. *Life Sci* 81: 306-316.
48. Chopra M, Golden HB, Mullapudi S, Dowhan W, Dostal DE, et al. (2011) Modulation of myocardial mitochondrial mechanisms during severe polymicrobial sepsis in the rat. *PLoS One* 6: e21285.
49. Turnbull IR, Wlzonek JJ, Osborne D, Hotchkiss RS, Coopersmith CM, et al. (2003) Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. *Shock* 19: 310-313.
50. Pontet J, Contreras P, Curbelo A, Medina J, Noveri S, et al. (2003) Heart rate variability as early marker of multiple organ dysfunction syndrome in septic patients. *J Crit Care* 18: 156-163.
51. Vayssettes-Courchay C, Bouysset F, Verbeuren TJ (2005) Sympathetic activation and tachycardia in lipopolysaccharide treated rats are temporally correlated and unrelated to the baroreflex. *Auton Neurosci* 120: 35-45.
52. Schumacher AM, Zbilut JP, Webber CL, Jr., Schwartz DW, Piano MR (2006) Detection of cardiac variability in the isolated rat heart. *Biol Res Nurs* 8: 55-66.
53. Gholami M, Mazaheri P, Mohamadi A, Dehpour T, Safari F, et al. (2012) Endotoxemia is associated with partial uncoupling of cardiac pacemaker from cholinergic neural control in rats. *Shock* 37: 219-227.
54. Papaioannou VE, Verkerk AO, Amin AS, de Bakker JM (2012) Intracardiac origin of heart rate variability, pacemaker funny current and their possible association with critical illness. *Curr Cardiol Rev* 9: 82-96.
55. Zorn-Paully K, Pelzmann B, Lang P, Machler H, Schmidt H, et al. (2007) Endotoxin impairs the human pacemaker current *I_f*. *Shock* 28: 655-661.
56. Ballard-Croft C, Maass DL, Sikes PJ, Horton JW (2007) Sepsis and burn complicated by sepsis alter cardiac transporter expression. *Burns* 33: 72-80.

57. Wu SN, Lue SI, Yang SL, Hsu HK, Liu MS (1993) Electrophysiologic properties of isolated adult cardiomyocytes from septic rats. *Circ Shock* 41: 239-247.
58. Straburzynska-Migaj E, Ochotny R, Wachowiak-Baszynska A, Straburzynska-Lupa A, Lesniewska K, et al. (2005) Cytokines and heart rate variability in patients with chronic heart failure. *Kardiol Pol* 63: 478-485; discussion 486-477.
59. Malave HA, Taylor AA, Nattama J, Deswal A, Mann DL (2003) Circulating levels of tumor necrosis factor correlate with indexes of depressed heart rate variability: a study in patients with mild-to-moderate heart failure. *Chest* 123: 716-724.
60. Gulick T, Chung MK, Pieper SJ, Lange LG, Schreiner GF (1989) Interleukin 1 and tumor necrosis factor inhibit cardiac myocyte beta-adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6753-6757.
61. Boillot A, Massol J, Maupoil V, Grelier R, Bernard B, et al. (1997) Myocardial and vascular adrenergic alterations in a rat model of endotoxin shock: reversal by an anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody. *Crit Care Med* 25: 504-511.
62. Bernardin G, Kisoka RL, Delporte C, Robberecht P, Vincent JL (2003) Impairment of beta-adrenergic signaling in healthy peripheral blood mononuclear cells exposed to serum from patients with septic shock: involvement of the inhibitory pathway of adenylyl cyclase stimulation. *Shock* 19: 108-112.
63. Boillot A, Massol J, Maupoil V, Grelier R, Capellier G, et al. (1996) Alterations of myocardial and vascular adrenergic receptor-mediated responses in *Escherichia coli*-induced septic shock in the rat. *Crit Care Med* 24: 1373-1380.
64. Barker LA, Winbery SL, Smith LW, McDonough KH (1990) Supersensitivity and changes in the active population of beta adrenoceptors in rat right atria in early sepsis. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 675-682.
65. Griffin MP, O'Shea TM, Bissonette EA, Harrell FE, Jr., Lake DE, et al. (2003) Abnormal heart rate characteristics preceding neonatal sepsis and sepsis-like illness. *Pediatr Res* 53: 920-926.
66. Fairchild KD, Saucerman JJ, Raynor LL, Sivak JA, Xiao Y, et al. (2009) Endotoxin depresses heart rate variability in mice: cytokine and steroid effects. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 297: R1019-1027.
67. Fairchild KD, Srinivasan V, Moorman JR, Gaykema RP, Goehler LE (2011) Pathogen-induced heart rate changes associated with cholinergic nervous system activation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R330-339.
68. Tracey KJ (2007) Physiology and immunology of the cholinergic antiinflammatory pathway. *J Clin Invest* 117: 289-296.
69. Machado A, Estévez M (2008) "VFC32: Software to digitize electrocardiograms and quantify Heart Rate Variability in humans" en *Variabilidad de la Frecuencia Cardíaca, apuntes para su estudio*. La Habana: Universidad de La Habana.
70. Kuwahara M, Yayou K, Ishii K, Hashimoto S, Tsubone H, et al. (1994) Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat. *J Electrocardiol* 27: 333-337.
71. Dabire H, Mestivier D, Jarnet J, Safar ME, Chau NP (1998) Quantification of sympathetic and parasympathetic tones by nonlinear indexes in normotensive rats. *Am J Physiol* 275: H1290-1297.
72. Hill LK, Siebenbrock A (2009) Are all measures created equal? Heart rate variability and respiration - biomed 2009. *Biomed Sci Instrum* 45: 71-76.
73. Coria-Avila GA, Gavrilá AM, Ménard S, Ismail N, Pfaus JG (2007) Cecum location in rats and the implications for intraperitoneal injections. *Laboratory Animal* 36.

74. Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, et al. (2002) Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun* 70: 3602-3610.
75. Singleton KD, Wischmeyer PE (2003) Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor- α and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. *Eur Surg Res* 35: 486-491.
76. Ninkovic MB, Malicevic ZM, Jelenkovic A, Dukic MM, Jovanovic MD, et al. (2009) Nitric oxide synthase inhibitors partially inhibit oxidative stress development in the rat brain during sepsis provoked by cecal ligation and puncture. *Gen Physiol Biophys* 28 Spec No: 243-250.
77. Daley C, Lim I, Modra J, Wilkinson I (1990) Comparative evaluation of nonradiometric BACTEC and improved oxid signal blood culture systems in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 28: 1586-1590.
78. Reimer LG, Wilson ML, Weinstein MP (1997) Update on detection of bacteremia and fungemia. *Clin Microbiol Rev* 10: 444-465.
79. King A, Bone G, Phillips I (1986) Comparison of radiometric and gas capture system for blood cultures. *J Clin Pathol* 39: 661-665.
80. Murray P, Baron E, Jorgensen J, Pfaller M, Tenover FC, Tenover MC (2003) *Manual of clinical microbiology*. Washington: ASM Press.
81. Foti A, Kimura S, DeQuattro V, Lee D (1987) Liquid-chromatographic measurement of catecholamines and metabolites in plasma and urine. *Clin Chem* 33: 2209-2213.
82. Mabe AM, Hoover DB (2009) Structural and functional cardiac cholinergic deficits in adult neurturin knockout mice. *Cardiovasc Res* 82: 93-99.
83. Lund DD, Oda RP, Pardini BJ, Schmid PG (1986) Vagus nerve stimulation alters regional acetylcholine turnover in rat heart. *Circ Res* 58: 372-377.
84. Damsma G, Westerink BH, Horn AS (1985) A simple, sensitive, and economic assay for choline and acetylcholine using HPLC, an enzyme reactor, and an electrochemical detector. *J Neurochem* 45: 1649-1652.
85. da Silva Lemos M, Nardoni Goncalves Braga A, Roberto da Silva J, Augusto Souza Dos Santos R (2005) Altered cardiovascular responses to chronic angiotensin II infusion in aged rats. *Regul Pept* 132: 67-73.
86. Maier S, Traeger T, Entleutner M, Westerholt A, Kleist B, et al. (2004) Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. *Shock* 21: 505-511.
87. Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, Andrews PL, Davies DC (2007) Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis* 22: 353-373.
88. Werdan K, Schmidt H, Ebelt H, Zorn-Pauly K, Koidl B, et al. (2009) Impaired regulation of cardiac function in sepsis, SIRS, and MODS. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 266-274.
89. Griffin MP, O'Shea TM, Bissonette EA, Harrell FE, Jr., Lake DE, et al. (2004) Abnormal heart rate characteristics are associated with neonatal mortality. *Pediatr Res* 55: 782-788.
90. Takayama K, Yuhki K, Ono K, Fujino T, Hara A, et al. (2005) Thromboxane A₂ and prostaglandin F₂ α mediate inflammatory tachycardia. *Nat Med* 11: 562-566.
91. Smith LW, Winbery SL, Barker LA, McDonough KH (1986) Cardiac function and chronotropic sensitivity to beta-adrenergic stimulation in sepsis. *Am J Physiol* 251: H405-412.

92. Skrzypiec-Spring M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R (2007) Isolated heart perfusion according to Langendorff---still viable in the new millennium. *J Pharmacol Toxicol Methods* 55: 113-126.
93. Mikusova A, Kralova E, Tylkova L, Novotova M, Stankovicova T (2009) Myocardial remodelling induced by repeated low doses of isoproterenol. *Can J Physiol Pharmacol* 87: 641-651.
94. Riascos Bernal D, Baltaxe E, Pascual G (2004) La preparación de Langendorff: corazón de mamífero aislado perfundido. *Universitas Médica* 45: 111-117.
95. Langer SF, Lambertz M, Langhorst P, Schmidt HD (1999) Interbeat interval variability in isolated working rat hearts at various dynamic conditions and temperatures. *Res Exp Med (Berl)* 199: 1-19.
96. Schmidt H, Saworski J, Werdan K, Muller-Werdan U (2007) Decreased beating rate variability of spontaneously contracting cardiomyocytes after co-incubation with endotoxin. *J Endotoxin Res* 13: 339-342.
97. Gray AL, Johnson TA, Ardell JL, Massari VJ (2004) Parasympathetic control of the heart. II. A novel interganglionic intrinsic cardiac circuit mediates neural control of heart rate. *J Appl Physiol* 96: 2273-2278.
98. Hicks KK, Seifen E, Stimers JR, Kennedy RH (1997) Diabetes with and without ketoacidosis on right atrial pacemaker rate and autonomic responsiveness. *Am J Physiol* 273: H1888-1893.
99. Tang C, Yang J, Wu LL, Dong LW, Liu MS (1998) Phosphorylation of beta-adrenergic receptor leads to its redistribution in rat heart during sepsis. *Am J Physiol* 274: R1078-1086.
100. Zausig YA, Geilfus D, Missler G, Sinner B, Graf BM, et al. (2010) Direct cardiac effects of dobutamine, dopamine, epinephrine, and levosimendan in isolated septic rat hearts. *Shock* 34: 269-274.
101. Jazaeri F, Tavangar SM, Ghazi-Khansari M, Khorramizadeh MR, Mani AR, et al. (2013) Cirrhosis is associated with development of tolerance to cardiac chronotropic effect of endotoxin in rats. *Liver Int* 33: 368-374.
102. Motulsky H (2010) Capstone Example. *Intuitive Biostatistics: A nonmathematical guide to statistical thinking*. 2 ed. New York: Oxford University Press.
103. Haddadian Z, Eftekhari G, Mazloom R, Jazaeri F, Dehpour AR, et al. (2013) Effect of endotoxin on heart rate dynamics in rats with cirrhosis. *Auton Neurosci* 177: 104-113.
104. Hinkelbein J, Kalenka A, Schubert C, Peterka A, Feldmann RE, Jr. (2010) Proteome and metabolome alterations in heart and liver indicate compromised energy production during sepsis. *Protein Pept Lett* 17: 18-31.
105. Dong LW, Tang C, Liu MS (2000) Biphasic redistribution of muscarinic receptor and the altered receptor phosphorylation and gene transcription are underlying mechanisms in the rat heart during sepsis. *Cardiovasc Res* 45: 925-933.
106. Goldstein DS, McCarty R, Polinsky RJ, Kopin IJ (1983) Relationship between plasma norepinephrine and sympathetic neural activity. *Hypertension* 5: 552-559.
107. Kovarik MF, Jones SB, Romano FD (1987) Plasma catecholamines following cecal ligation and puncture in the rat. *Circ Shock* 22: 281-290.
108. Hahn PY, Wang P, Tait SM, Ba ZF, Reich SS, et al. (1995) Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. *Shock* 4: 269-273.
109. Berger G, Guetta J, Klorin G, Badarneh R, Braun E, et al. (2011) Sepsis impairs alveolar epithelial function by downregulating Na-K-ATPase pump. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L23-30.

110. Borovsky V, Herman M, Dunphy G, Caplea A, Ely D (1998) CO₂ asphyxia increases plasma norepinephrine in rats via sympathetic nerves. *Am J Physiol* 274: R19-22.
111. Tsai TH (2000) Separation methods used in the determination of choline and acetylcholine. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 747: 111-122.
112. Blusztajn JK, Wurtman RJ (1983) Choline and cholinergic neurons. *Science* 221: 614-620.
113. Crivello NA, Blusztajn JK, Joseph JA, Shukitt-Hale B, Smith DE (2010) Short-term nutritional folate deficiency in rats has a greater effect on choline and acetylcholine metabolism in the peripheral nervous system than in the brain, and this effect escalates with age. *Nutr Res* 30: 722-730.
114. Kopf SR, Buchholzer ML, Hilgert M, Loffelholz K, Klein J (2001) Glucose plus choline improve passive avoidance behaviour and increase hippocampal acetylcholine release in mice. *Neuroscience* 103: 365-371.
115. Herring N, Lokale MN, Danson EJ, Heaton DA, Paterson DJ (2008) Neuropeptide Y reduces acetylcholine release and vagal bradycardia via a Y2 receptor-mediated, protein kinase C-dependent pathway. *J Mol Cell Cardiol* 44: 477-485.
116. Peraza-Cruces K, Gutierrez-Guedez L, Castaneda Perozo D, Lankford CR, Rodriguez-Bonfante C, et al. (2008) Trypanosoma cruzi infection induces up-regulation of cardiac muscarinic acetylcholine receptors in vivo and in vitro. *Braz J Med Biol Res* 41: 796-803.
117. Tokita Y, Yuzurihara M, Satoh K, Iizuka S, Imamura S, et al. (2008) The cholinergic nervous system plays an important role in rat postoperative intestinal adhesion. *Surgery* 143: 226-232.
118. Corey SE, McPhillips JJ (1972) Supersensitivity to the negative chronotropic action of carbachol and methacholine in the rat. *Br J Pharmacol* 44: 586-588.
119. Fairchild KD, O'Shea TM (2010) Heart rate characteristics: physiomarkers for detection of late-onset neonatal sepsis. *Clin Perinatol* 37: 581-598.
120. Huang J, Wang Y, Jiang D, Zhou J, Huang X (2010) The sympathetic-vagal balance against endotoxemia. *J Neural Transm* 117: 729-735.
121. Song JG, Li HH, Cao YF, Lv X, Zhang P, et al. (2012) Electroacupuncture improves survival in rats with lethal endotoxemia via the autonomic nervous system. *Anesthesiology* 116: 406-414.
122. Setoguchi D, Yatsuki H, Sadahiro T, Nakamura M, Hirayama Y, et al. (2012) Effects of a peripheral cholinesterase inhibitor on cytokine production and autonomic nervous activity in a rat model of sepsis. *Cytokine* 57: 238-244.
123. Kessler W, Diedrich S, Menges P, Ebker T, Nielson M, et al. (2012) The role of the vagus nerve: modulation of the inflammatory reaction in murine polymicrobial sepsis. *Mediators Inflamm* 2012: 467620.
124. Kojima H, Ito K, Tsubone H, Kuwahara M (2011) Nicotine treatment reduces LPS-induced sickness responses in telemetry monitoring rats. *J Neuroimmunol* 234: 55-62.
125. Ackland GL, Yao ST, Rudiger A, Dyson A, Stidwill R, et al. (2010) Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. *Crit Care Med* 38: 388-394.
126. Novotny NM, Lahm T, Markel TA, Crisostomo PR, Wang M, et al. (2009) Beta-Blockers in Sepsis: Reexamining the Evidence. *Shock* 31: 113-119.
127. Stengl M, Bartak F, Sykora R, Chvojka J, Benes J, et al. (2010) Reduced L-type calcium current in ventricular myocytes from pigs with hyperdynamic septic shock. *Crit Care Med* 38: 579-587.

