



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

GUSTAVO ITHAMAR SOUTO MAIOR

**ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS CARDÍACAS EM CONCEPTOS DE
RATAS WISTAR SUBMETIDAS À PERITONITE FECAL AUTÓGENA E
ADMINISTRAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE MOXIFLOXACINA - DEXAMETASONA**

Recife/PE
2017

GUSTAVO ITHAMAR SOUTO MAIOR

**ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS CARDÍACAS EM CONCEPTOS DE
RATAS WISTAR SUBMETIDAS À PERITONITE FECAL AUTÓGENA E
ADMINISTRAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE MOXIFLOXACINA - DEXAMETASONA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Orientador externo: Prof. Dr. Carlos Teixeira Brandt

Recife/PE
2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa- CRB4-1010

M227a Maior, Gustavo Ithamar Souto.
 Alterações histomorfométricas cardíacas em conceptos de ratos wistar submetidas à peritonite fecal autógena e administração da associação de moxifloxacina - dexametasona / Gustavo Ithamar Souto Maior. – 2017.
 78 f.: il.; 30 cm.

 Orientadora: Líbia Cristina Rocha Vilela Moura.
 Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
 Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2017.
 Inclui referências e anexos.

 1. Peritonite. 2. Ratos. 3. Miocárdio. 4. Prenhez. I. Moura, Líbia Cristina Rocha Vilela (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-330)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

GUSTAVO ITHAMAR SOUTO MAIOR

**ALTERAÇÕES HISTOMORFOMÉTRICAS CARDÍACAS EM CONCEPTOS DE
RATAS WISTAR SUBMETIDAS À PERITONITE FECAL AUTÓGENA E
ADMINISTRAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO DE MOXIFLOXACINA - DEXAMETASONA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre em Medicina Tropical, com Comissão Julgadora composta pelos membros:

Prof. Dr. Diego Nery Benevides Gadelha (*Examinador Externo*)

Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG)

Prof^a. Dr^a. Maria Cecília Santos Cavalcanti Melo (*Examinadora Externa*)

Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG)

Prof^a. Dr^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho (*Examinadora Interna*)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINATROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Amélia Vieira Maciel

CORPO DOCENTE PERMANENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lucia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

Rejane Pereira Neves

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Cláudia Maria Assis Costa

CORPO DOCENTE COLABORADOR

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura

Virginia Maria Barros de Lorena

Dedico esta dissertação a Deus, por ter conduzido cada etapa deste trabalho, à minha esposa Lyzandra e minhas filhas, Bianca e Marina. Em vocês encontro toda força e amor que regem a minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Senhor meu Deus, pelo dom da vida. Por ter me dado paciência, sabedoria e resiliência para ultrapassar as dificuldades, e por ter colocado no meu caminho, ao longo desta jornada, pessoas tão especiais, sem as quais não conseguiria ter concretizado este sonho.

Aos meus pais, **Fernando** "in memoriam" e **Sonia**, por sempre acreditarem em mim. Obrigado pelos ensinamentos, paciência, amor e dedicação à minha educação e formação.

À minha esposa **Lyzandra**, meu eterno amor, que sempre esteve e está ao meu lado, por toda a compreensão e apoio. Não há um só momento especial na minha vida que você não esteja presente.

Às minhas filhas, **Bianca e Marina**, por preencherem a minha vida de alegria, ternura e amor. Vocês são o maior presente divino que recebi. Sem vocês não teria tido forças para seguir adiante com mais este desafio.

Aos meus irmãos **João, Rodolfo e Izabella**, por sempre vibrarem com minhas conquistas.

À Dra. **Libia Moura**, minha orientadora, por acreditar em mim e no meu projeto. Pela sua simplicidade, humildade, receptividade e carinho, sou muito grato!

Ao Professor **Carlos Brandt** pelos ensinamentos, acolhimento, orientações e paciência.

Ao Núcleo de Investigação Experimental da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande, especialmente à **Tharcia Kiara**, médica veterinária e responsável pelo suporte técnico no biotério.

Ao meu amigo **Alexandre Paz**, pelos conselhos, orientações e todo apoio técnico e intelectual.

Aos colegas **Diego Gadelha e Guilherme Mascena**, pela amizade e apoio na realização deste projeto.

A todos os professores e funcionários da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande e da Universidade Federal de Pernambuco, em especial professores do Departamento de Medicina Tropical e a Walter.

Aos meus colegas de Mestrado, **Carlos Alberto, Valéria, Rosivânia e Maíra** pela amizade, apoio e companheirismo. Essa difícil travessia, ao lado de vocês, foi mais suave e divertida.

Por fim, a todos que de alguma forma colaboraram para a concretização deste trabalho.

A excelência da sabedoria

¹Filho meu, se aceitares as minhas palavras e esconderes contigo os meus mandamentos, ²para fazeres atento à sabedoria o teu ouvido e para inclinares o coração ao entendimento, ³e, se clamares por inteligência, e por entendimento alçares a voz, ⁴se buscares a sabedoria como a prata e como a tesouros escondidos a procurares, ⁵então entenderás o temor do SENHOR e acharás o conhecimento de Deus. ⁶Porque o SENHOR dá a sabedoria, e da sua boca vem a inteligência e o entendimento.

Provérbios 2:1-6

RESUMO

Fundamento: Sepsé é responsável por 25% das admissões em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e, nos casos de choque, a mortalidade pode ultrapassar 50%. Com o avançar da idade materna, a incidência de sepsé neste grupo específico de pacientes, apresenta taxas crescentes. Nos EUA, a mortalidade materna passou de 12 por 100.000 nascidos vivos para 14 por 100.000 nascidos vivos, de 1990 a 2015. A peritonite é uma das principais causas de sepsé materna. O estudo da associação da infecção peritoneal materna com alterações orgânicas no recém-nascido, criança e adolescência, tem despertado interesse crescente nos últimos anos. O tratamento precoce da infecção materna pode reduzir morbimortalidade materno-fetal. Experimentalmente, mostrou-se que a peritonite fecal autógena em ratos Wistar determina alterações oculares e encefálicas nos conceptos as quais podem persistir na vida adulta. Porém, a infecção peritoneal materna como determinante de alterações cardíacas na prole adulta é desconhecida. **Objetivos:** Investigar a existência de alterações histomorfométricas cardíacas em ratos Wistar cujas mães foram submetidas à peritonite fecal autógena no período máximo da organogênese, e investigar o impedimento ou o comportamento destas alterações com a administração intravenosa da associação de moxifloxacina e dexametasona. **Métodologia:** Após aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG), foi realizado estudo prospectivo, analítico, histomorfométrico, em 29 corações de ratos Wistar de quatro meses de idade os quais foram divididos em: Grupo Controle Negativo (GCN), com nove animais, filhos de rata sem peritonite induzida durante a gestação; Grupo Controle Positivo (GCP), com 10 animais, filhos de rata com peritonite fecal induzida na gestação que não recebeu tratamento algum e Grupo Intervenção (GI), com 10 animais cuja mãe recebeu tratamento com moxifloxacina 40mg/Kg e dexametasona 0,2mg/Kg, 24h após a indução da peritonite fecal no período gestacional. Nos grupos GCP e GI, a peritonite materna foi induzida com administração de 4ml/Kg de suspensão fecal autógena a 10% filtrada, na cavidade abdominal, no quadrante ilíaco esquerdo, no 9º dia de gravidez. A eutanásia dos animais foi realizada aos 04 meses. Após ser acessada a cavidade torácica, os corações foram cuidadosamente isolados, retirados e embebidos em formol a 10%. As peças anatômicas foram emblocadas de forma padronizada. Cortes transversais de 2 a 3mm foram realizados da ponta do ventrículo esquerdo (VE) em direção aos vasos da base. Após a coloração de hematoxilina e eosina lamínulas do terço médio do coração foram escolhidas aleatoriamente e avaliadas à microscopia óptica que tinha um sistema de captura de imagem acoplado com capacidade de magnificar a imagem em 400x. Foram realizadas fotomicrografias de áreas randomicamente escolhidas da parede livre do VE. As imagens fotográficas foram avaliadas quanto aos parâmetros histomorfométricos (contagem nuclear, área ocupada e tamanho dos núcleos) a partir do software ImageJ 1.51n. **Resultados:** Foi observado contagem nuclear significativamente maior no GI em comparação ao GCP ($p=0,0016$) e no GCN em comparação ao GCP ($p=0,0380$). Não houve diferença significativa na contagem nuclear entre o GCN e o GI. A área ocupada pelos núcleos foi maior no GCN quando comparada ao GCP ($p=0,0448$), e no GI quando comparado ao GCP ($p=0,0006$). **Conclusões:** A peritonite fecal autógena induzida em ratos Wistar prenhas determinou alterações miocárdicas na prole adulta. Estas alterações foram evitadas com a administração intravenosa de moxifloxacina e dexametasona 24h após o insulto infeccioso materno.

Palavras-Chave: Peritonite. Ratos. Miocárdio. Prenhez.

ABSTRACT

Background: Sepsis accounts for 25% of admissions to Intensive Care Units (ICUs) and, in cases of shock, mortality may exceed 50%. With the advancement of maternal age, the incidence of sepsis in this specific group of patients presents increasing rates. In the United States, maternal mortality has increased from 12 per 100,000 live births to 14 per 100,000 live births from 1990 to 2015. Peritonitis is a major cause of maternal sepsis. The study of the association of maternal peritoneal infection with organic alterations in the newborn, child and adolescence has been of growing interest in recent years. Early treatment of maternal infection may reduce both maternal and fetal morbidity and mortality. Experimentally, it has been shown that autogenic fecal peritonitis in Wistar rats determines ocular and encephalic changes in offspring that may persist in adult life. However, maternal peritoneal infection as a determinant of cardiac changes in adult animals is unknown. **Objectives:** To investigate the existence of cardiac histomorphometric changes in Wistar rats whose mothers underwent autogenic fecal peritonitis in the maximum period of organogenesis and, if possible, to prevent such changes with the intravenous administration of the combination of moxifloxacin and dexamethasone. **Methods:** After approval by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Faculty of Medical Sciences of Campina Grande (FCM-CG), a prospective, analytical, histomorphometric study was performed on 29 hearts of four-month-old Wistar rats, divided into: Negative Control Group (NCG) enrolling nine animals, rat offspring without peritonitis induced during pregnancy; Positive Control Group (PCG) with 10 female offsprings with fecal induced peritonitis in gestation that received no treatment and Intervention Group (IG) with 10 animals whose mother received moxifloxacin and dexamethasone treatment 24 hours after induction of fecal peritonitis in the gestational period. In the PCG and IG groups, maternal peritonitis was induced by administration of 4 ml/kg of 10% autogenic fecal suspension filtered into the abdominal cavity in the left iliac quadrant on the 9th day of pregnancy. Euthanasia of the animals was performed at 04 months. After accessing the chest cavity, the hearts were carefully isolated, withdrawn and soaked in 10% formalin. The anatomical pieces were placed in a standardized way. Transverse cuts of 2 to 3 mm were performed from the tip of the left ventricle (LV) towards the vessels of the base. After staining of hematoxylin and eosin coverslips of the middle third of the heart were randomly selected and evaluated under optical microscopy that had an image capture system with the capacity to magnify the image by 400x. Photomicrographs of randomly chosen areas of the LV free wall were performed. The photographic images were evaluated for the histomorphometric parameters (nuclear count, occupied area and size of the nuclei) according to the ImageJ 1.51n software **Results:** Significantly higher nuclear counts were observed in IG compared to PCG ($p = 0.0016$) and in NCG compared to PCG ($p = 0.0380$). There was no significant difference in nuclear counts between NCG and IG. The area occupied by the nuclei was higher in the NCG when compared to the PCG ($p=0.0448$), and in the IG when compared to the PCG ($p = 0.0006$). **Conclusions:** Induced autogenic fecal peritonitis in pregnant Wistar rats determined myocardial changes in adult offspring. These changes were avoided with the intravenous administration of moxifloxacin and dexamethasone 24 hours after the maternal infectious insult.

Keywords: Peritonitis. Rats. Myocardium. Pregnancy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Histologia cardíaca.....	28
Figura 2 - Moléculas sinalizadoras determinantes da fibrose cardíaca.....	30
Figura 3 - Interações celulares na fibrose cardíaca.....	31
Figura 4 - Grupos de ratos envolvidos no estudo.....	39
Fotografia 1 - Indução da peritonite fecal.....	36
Fotografia 2 - Técnica de ressecção do coração.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALK5	Quinase associada a ativina 5
Ang-II	Angiotensina II
CC	Corticoide
CCN2	Fator de crescimento do tecido conjuntivo
ET-1	Endotelina-1
E	Eosina
Hx	Hematoxilina
IIA	Infecção Intra-abbominal
IL	Interleucina
IP	Intraperitoneal
IV	Intravenoso (a)
ISP	Isoprenalina
LPS	Lipopolissacarídeo
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Metaloproteinase da Matriz
NAC	N-Acetilcisteína
OMS	Organização Mundial de Saúde
PDGF	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas
PDGFD	Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas D
PNA	Peptídio Natriurético Atrial
SMA	Actina do Músculo Liso
SNS	Sistema Nervoso Simpático
SRAA	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

SRIS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
TGF- β	Fator transformador do crescimento- β
trkA	Receptor da tirosina quinase A
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	SEPSE	19
2.2	MODELOS EXPERIMENTAIS DE INDUÇÃO DE SEPSE ABDOMINAL	21
2.3	SEPSE NA GRAVIDEZ	22
2.4	ANTIBIOTICOTERAPIA NA SEPSE ABDOMINAL	24
2.5	CORTICOTERAPIA NA SEPSE	26
2.6	HISTOLOGIA CARDÍACA	27
3	OBJETIVOS	32
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
4	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	DESENHO DO ESTUDO	33
4.2	LOCAL DO ESTUDO	33
4.3	POPULAÇÃO DO ESTUDO	33
4.3.1	Critérios de elegibilidade	33
4.4	DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS E COLETA DE DADOS	34
4.4.1	<i>Definição dos termos</i>	34
4.4.2	<i>Operacionalização e categorização dos dados</i>	35
4.4.3	<i>Procedimentos técnicos</i>	36
4.5	ANÁLISE DOS DADOS	42
4.6	LIMITAÇÕES METODOLÓGICAS	43
4.7	ASPECTOS ÉTICOS	43
5	RESULTADOS	44
6	CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
	REFERÊNCIAS	46
	APÊNDICE - Artigo conforme normas dos Arquivos Brasileiros de Cardiologia	52
	ANEXO I - NORMAS DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CONFORME OS ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA	69
	ANEXO II - PARECER DO CEUA (COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS)	78

1 INTRODUÇÃO

A doença cardíaca congênita é a principal anomalia detectada ao nascimento e está associada à elevada morbimortalidade na infância e na adolescência (KHALIL et al., 2014). A elucidação de mecanismos subjacentes ao desenvolvimento cardíaco é fundamental para a identificação de anormalidades durante a organogênese, com o objetivo de adoção de estratégias de intervenção precoce (CHEN; VANBUREN, 2014).

A associação de anomalias congênitas oculares e encefálicas em conceptos com endotoxemia bacteriana materna, já foi demonstrada experimentalmente (BRANDT et al., 2014). A indução de peritonite em ratas no nono (9º) dia de prenhez, com suspensão fecal autógena filtrada a 10%, na dosagem de 4ml/kg, associou-se ao surgimento de encefalomalácia e catarata. Por outro lado, a intervenção com moxifloxacina 40ml/kg e dexametasona 0,2mg/kg intraperitoneal (IP), 48 a 72h após a indução da infecção materna, mostrou-se eficaz na prevenção do aparecimento dessas complicações. Esta pesquisa, contudo, não avaliou as repercussões histológicas cardiovasculares do insulto infeccioso materno nos conceptos das ratas infectadas, nem utilizou a via intravenosa (IV) para a terapia antimicrobiana a qual é a mais comum na prática clínica, em casos de peritonite em grávidas (NERY; GADELHA; BRANDT, 2014).

Em outro estudo experimental, evidenciou-se alterações histológicas encefálicas em conceptos de duas ratas grávidas com peritonite induzida pela inoculação IP de 4ml/Kg de solução fecal a 10%. As ratas prenhas receberam tratamento com moxifloxacina e dexametasona IV e, adicionalmente, dois microlitros do extrato de *Schinus terebinthfolius raddi* (aroeira) foi injetado na cavidade abdominal 24h após a indução da peritonite. Nos conceptos destas ratas, identificou-se aspecto gelatinoso cerebral (leucoencefalomalácia periventricular) e redução significativa da densidade das células neuronais, que traduziu a via final comum da neurotoxicidade induzida pela peritonite e a translocação bacteriana da cavidade peritoneal para a corrente sanguínea. Todavia, até o momento, não há evidências de acometimento das estruturas cardiovasculares em conceptos de ratas com peritonite fecal (GADELHA; NERY; GADELHA, 2015).

Alterações histológicas cardíacas em ratos Wistar têm sido demonstradas e associadas à injúria induzida pela Isoprenalina (ISP). A ISP é uma catecolamina sintética

que atua como agonista beta-adrenérgico e que em altas doses pode promover necrose miocárdica semelhante ao infarto (BROURI et al., 2002).

A NAC é um aminoácido que contém enxofre em sua composição e possui propriedades anti-angiogênicas, anticancerígenas e anti-oxidantes (MILLEA, 2009). A NAC, além de aumentar os níveis de glutathione, que é o maior fator protetor de radicais livres para as células, inibe o aumento do ferro de baixo peso molecular no miocárdio, reduz a liberação de mediadores inflamatórios no músculo cardíaco, promove dilatação coronariana e apresenta efeitos anti-plaquetários (WU et al., 2014). Pesquisa recente foi avaliada o efeito protetor da N-Acetilcisteína (NAC) na injúria miocárdica induzida pela ISP sob o ponto de vista histológico, imunohistoquímico e morfométrico (ZAKI et al., 2017). Neste estudo, 90 ratos adultos Wistar que foram divididos em quatro grupos: controle, tratados com ISP, grupo pré-tratados com NAC e o grupo pré e pós-tratados com NAC. Do ponto de vista histológico, os miócitos no grupo tratado com ISP mostraram-se fragmentados, rotos e com cariólise. Os vasos sanguíneos estavam dilatados, congestos e com extravasamento de sangue. Observou-se edema intersticial e infiltrado inflamatório celular. No grupo tratado com NAC foi percebido melhora importante dos achados histológicos, com degeneração apenas focal das fibras musculares cardíacas. Os capilares sanguíneos estavam normais. Havia mínimo extravasamento de sangue e infiltrado celular. No grupo de ratos pré e pós-tratados com NAC as fibras musculares cardíacas estavam regularmente arranjadas. O percentual de área de fibras de colágeno no grupo tratado com ISP foi significativamente maior quando comparado ao grupo controle. Porém, neste estudo histológico, não se investigou repercussão ocasionada por estímulo infeccioso materno no tecido cardíaco da cria e, em se comprovando essa associação, também não se avaliou o uso IV de antibiótico em associação com corticóide, 24h após o insulto infeccioso materno, teria a capacidade de impedir alterações cardíacas na prole.

Experimentalmente, é possível induzir peritonite em ratos com a injeção de lipopolissarídeos (LPS) na cavidade abdominal. Avaliando-se o coração de ratos que tiveram endotoxemia induzida pela injeção IP de solução salina contendo LPS, foi demonstrado que os fibroblastos exercem papel tão importante quanto os cardiomiócitos na cardiotoxicidade induzida pela sepse (ZHANG et al., 2014). A fibrose cardíaca é uma das consequências patológicas do remodelamento tecidual e do acúmulo de colágeno na matriz intersticial. A detecção histológica de fibrose cardíaca em murinos tem sido

realizada, com o emprego da coloração com o tricrômio de Masson(FLEVARIS et al., 2017).

Avaliação histomorfométrica de cardiomiócitos e do colágeno no tecido cardíaco de ratos Wistar foi realizada ao se investigar o efeito da ooforectomia nestes animais (SILVA et al., 2016). Nessa pesquisa, 20 ratas foram utilizadas e separadas em dois grupos: GI - ooforectomizadas e GII - *sham*-ooforectomizadas. Seis meses após a ooforectomia, os animais foram eutanaziados, seus corações retirados, submetidos a processamento histológico e corados com hematoxilina e eosina. Análises histomorfométricas (área celular e área e volume nuclear) foram realizadas pelo microscópio de luz e software ImageJ versão 1.44. Observou-se diminuição significativa das áreas celular e nuclear dos cardiomiócitos do GI quando comparado ao GII, bem como a área ocupada pelo colágeno, no músculo cardíaco, foi maior em GI quando comparado a GII. Portanto, as alterações observadas nos cardiomiócitos do GI foram sugestivas de maior atividade apoptótica nesse grupo, devido à diminuição nos níveis séricos do estrógeno provocado pela ooforectomia, e o aumento da área ocupada pelo colágeno, no grupo ooforectomizado, foi associado ao efeito cardioprotetor do estrógeno.

Nesta pesquisa foi investigada a histomorfometria cardíaca em ratos Wistar com quatro meses de idade, cujas mães foram submetidas à peritonite com suspensão fecal autógena filtrada a 10%, na fase precoce da gravidez (nono dia), no período máximo da organogênese cardíaca fetal e, foi avaliada a possibilidade de impedir as alterações cardíacas com a administração IV da associação de moxifloxacina e dexametasona, 24h após a indução da infecção abdominal materna. Em cenário de infecção experimental envolvendo o binômio materno-fetal, esta pesquisa, pioneiramente, avaliou se a via IV do tratamento materno, que é a mais utilizada na prática clínica diária para tratar peritonite, foi eficaz em prevenir alterações cardíacas fetais, traduzidas histologicamente na fase adulta.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Sepses

Há muito tempo a sepsis vem sendo estudada. Segundo Hipócrates, durante essa condição, a "carne apodrecia, fluidos gasosos eram produzidos e as feridas inflamavam"(MAJNO G., 1991). Apesar dos avanços das pesquisas clínicas e experimentais nas últimas décadas, a sepsis ainda representa importante problema clínico, com expressiva morbimortalidade, e um grande desafio, principalmente, nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (CURLEY; SLUTSKY, 2014). Aproximadamente 25% das admissões em UTI são decorrentes da sepsis que, nos casos de choque, pode determinar mortalidade acima de 50% (ANGUS DC et al, 2001).

A sepsis é uma síndrome de anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas induzidas por infecção, que representa importante problema de saúde pública, e que representou mais de US\$ 20 bilhões (5,2%) do total de custos hospitalares dos EUA em 2011 (TORIO; ANDREWS, 2013).

Embora esteja aumentando, devido ao envelhecimento populacional e suas comorbidades associadas, a verdadeira incidência da sepsis é desconhecida. Estimativas conservadoras indicam que a sepsis é uma das principais causas de mortalidade e doenças críticas e, os pacientes que sobrevivem à sepsis, muitas vezes têm problemas físicos, psicológicos e deficiências cognitivas com implicações sociais e de saúde significativas (FLEISCHMANN et al., 2016).

Essa condição clínica é pautada por reações inflamatórias locais e sistêmicas complexas que dificultam o seu manejo. A sepsis é caracterizada por imunomodulação, eventos pró-inflamatórios com ativação de neutrófilos e liberação de substâncias quimiotáticas, e anti-inflamatórios com o objetivo de amenizar dano tecidual e promover um equilíbrio (BRUN-BUISSON C et al, 2004)(AZIZ M, JACOB A, YANG WL, MATSUDA A, 2012) .

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) é classicamente descrita na sepsis e pode ser detectada quando estão presentes dois dentre os seguintes critérios: (1) temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C, (2) frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto, (3) frequência respiratória acima de 20 incursões por minuto ou pressão parcial de gás carbônico (CO₂) menor que 32 mmHg ou necessidade de

ventilação mecânica e (4) contagem de leucócitos acima de 12.000/ml ou abaixo de 4.000/ml ou mais de 10% de formas imaturas (LEVY MM et al, 2003).

Inicialmente, os patógenos ativam as células do sistema imune, através de receptores de quatro classes principais: tipo toll, tipo lecitina C, semelhantes ao gene 1 induzível pelo ácido retinóico e semelhantes ao domínio de oligomerização de pontes nucleotídicas (MEDZHITOV, 2001). Esses receptores reconhecem as estruturas presentes nos diversos microrganismos, levam a um aumento da transcrição de genes inflamatórios e ativam a imunidade inata. Polimorfismos nesses receptores podem ter implicação decisiva na evolução para sepse grave e choque séptico (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

Sepse abdominal representa uma resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro a infecções intra-abdominais. Trata-se de um processo dinâmico que pode evoluir para condições de severidade variável. A resposta inflamatória em pacientes com sepse depende do patógeno e do hospedeiro (características genéticas e doenças coexistentes), com respostas diferentes a nível local, regional e sistêmico. Se não tratada, a sepse pode levar ao comprometimento funcional de um ou mais órgãos ou sistemas vitais. A gravidade da doença e o risco de mortalidade inerente aumentam de acordo com estágios mais avançados da doença: sepse, sepse grave, choque séptico e falência de vários órgãos e diferenças no espectro da etiologia e dos fatores intrínsecos do paciente, incluindo idade e comorbidades, tornam obscuro o curso desta condição clínica em seus diferentes estágios. Alguns pacientes com infecções intra-abdominais e sepse em curso podem não ter níveis elevados de lactato na apresentação ou durante a evolução clínica. A medida do lactato é aconselhável como um componente importante da avaliação inicial dos pacientes com sepse. Níveis elevados de lactato (mesmo que $> 4\text{mmol/l}$) não fazem mais parte dos critérios de disfunção de órgãos para definir sepse. À luz do conhecimento atual, níveis elevados de lactato devem ser utilizados apenas como um dos critérios para definir choque séptico (SARTELLI et al., 2017).

De acordo com o Terceiro Consenso Internacional da Definição de Sepse e Choque Séptico a sepse é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. A disfunção orgânica pode ser representada por um aumento no escore SOFA - Sequential Organ Failure Assessment - de 2 pontos ou mais. O choque séptico deve ser definido como um subtipo de sepse e deve ser clinicamente identificado pela necessidade de vasopressores para manter uma pressão arterial média de 65 mmHg ou superior, e um nível sérico de lactato

superior a 2 mmol/L (>18 mg/dL), na ausência de hipovolemia. A nova definição de sepse também sugere que pacientes com pelo menos 2 dessas três variáveis clínicas: escore de coma de Glasgow de 13 ou menos, pressão arterial sistólica de 100 mm Hg ou menos e taxa respiratória 22 / min ou superior podem ser propensos a um desfecho mais desfavorável. A combinação de hipotensão significativa - pressão arterial média menor que 65 mmHg - e um nível sérico de lactato superior a 2 mmol/L (>18 mg/dL) na ausência de hipovolemia, está associada a taxas de mortalidade hospitalar superiores a 40%. No departamento de emergência ou em ambiente extra-hospitalar, pacientes adultos com suspeita de infecção podem ser fácil e rapidamente identificados como sendo mais propensos a apresentar os desfechos desfavoráveis da sepse se tiverem pelo menos 2 dos seguintes critérios clínicos que juntos constituem um novo índice clínico de cabeceira denominado "quickSOFA" (qSOFA): taxa respiratória de 22 / min ou mais, modificação ou pressão arterial sistólica de 100 mm Hg ou menos (SINGER et al., 2016).

O reconhecimento precoce do paciente com sepse abdominal é essencial para um tratamento eficaz. Administração rápida de fluidos IV para ressuscitação é crítica neste grupo de doentes. A ressuscitação inicial deve ser titulada pela resposta clínica e não apenas guiada por um protocolo pré-determinado. Os agentes vasopressores podem servir para aumentar e auxiliar a ressuscitação volêmica, particularmente quando esta, isoladamente, não está sendo eficaz - recomendação grau 1 nível de evidência A - (VINCENT; DE BACKER, 2013).

Os dados do estudo WISS mostraram que a mortalidade foi significativamente afetada pela sepse - a mortalidade pelo grau da sepse foi: sem sepse 1,2%, apenas com sepse 4,4%, sepse grave 27,8% e choque séptico 67,8%. Identificar, de forma precoce, pacientes sépticos e corrigir a disfunção microvascular subjacente pode melhorar os resultados e proporcionar evolução mais favorável. Se não corrigida, a disfunção microvascular pode levar a hipóxia tecidual global, dano direto aos tecidos e, em última análise, insuficiência orgânica múltipla (SARTELLI et al., 2017) .

2.2 Modelos experimentais de indução de sepse abdominal

Os modelos experimentais mais utilizados para simular as alterações fisiopatológicas da sepse envolvem a injeção direta na cavidade abdominal de bactérias ou componentes microbianos como LPS ou a liberação direta de fezes na cavidade peritoneal (FREISE, 2001). As espécies animais utilizadas para esse fim incluem ratos,

camundongos, coelhos, cachorros, porcos, ovelhas e primatas não humanos (FINK; HEARD, 1990). Níveis sanguíneos de LPS, endotoxina correspondente à camada externa das bactérias gram-negativas, são detectáveis em até 75% dos pacientes com sepse em UTI (LIPCSEY et al., 2016).

A sepse de foco abdominal também pode ser induzida através da perfuração intestinal (PARKER; WATKINS, 2001). A introdução de suspensão fecal dentro da cavidade peritoneal, como modelo de indução de peritonite e sepse, iniciou-se na década de 70 (BARTLETT et al., 1978). Esse modelo permite a graduação da gravidade da infecção, através da inoculação de diferentes quantidades de fezes. Porém, a inoculação súbita do material fecal na cavidade abdominal e a ausência de material necrótico, distanciam a fisiopatologia das peritonites experimental e clínica (NERY; GADELHA; BRANDT, 2014).

Em ratos Wistar, buscou-se avaliar a dose ideal de suspensão fecal autógena filtrada, a ser infundida no peritônio, que promoveria o maior insulto infeccioso sem ocasionar a morte animal. A dose de 4 ml/Kg de solução fecal foi determinada como ideal. Neste estudo, a peritonite materna induziu dano cerebral na prole. O uso de moxifloxacina (40 mg/Kg) e dexametasona (0,2 mg/kg), mostrou-se eficaz, ao ser administrada IP 48 a 72h após a indução da infecção, em reduzir dano neurológico nos conceptos (BRANDT et al., 2014).

O modelo de peritonite fecal em animais de experimentação mimetiza a peritonite, adquirida tanto na comunidade como em ambiente hospitalar, pois utiliza a flora intestinal endógena que, habitualmente, contamina a cavidade peritoneal quando ocorre a perfuração de víscera por doença no tubo gastrointestinal. Esse modelo é adequado para estudos da evolução natural da doença e possibilita investigações sobre fatores que possam influenciar a história natural (CARNEIRO et al., 2002).

Ainda assim, nenhum modelo experimental de sepse pode prover uma evidência definitiva da eficácia de um determinado agente terapêutico. A doença humana é heterogênea e as condições experimentais controladas se distanciam desse cenário (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980).

2.3 Sepse na gravidez

A infecção continua sendo importante causa de morbimortalidade materna. O acometimento do líquido amniótico pode ocorrer em qualquer fase da gestação, porém, é

mais frequente próximo ao parto ou no puerpério. Os germes aeróbios e anaeróbios, gram-positivos e gram-negativos, constituem a flora mais comumente encontrada nestes casos (BORN et al., 2006).

Sepse é um dos principais fatores determinantes de internação de gestantes em UTI e de morte materna. Estudos desenvolvidos nos últimos anos têm permitido maior compreensão dos fatores subjacentes ao processo séptico em gestantes. Neste grupo de pacientes, verifica-se rápida progressão da SRIS ou sepse, para a sepse grave ou choque séptico (BARTON; SIBAI, 2012).

O diagnóstico de dor abdominal e pélvica aguda, em gestantes, representa um desafio. Muitas condições clínicas podem se manifestar com esses sintomas. O diagnóstico torna-se mais difícil em virtude de limitações anatômicas impostas pelo útero gravídico e pelo receio do uso de técnicas diagnósticas que utilizam a radiação ionizante. Por volta da décima segunda semana de gravidez, o útero torna-se um órgão abdominal e comprime as estruturas viscerais circunvizinhas. A flacidez da parede abdominal anterior pode mascarar ou retardar o surgimento de sinais clínicos peritoneais. Ao mesmo tempo, o útero gravídico predispõe à estase urinária aumentando o risco de urolitíase e infecção (BROWN et al., 2009).

A apendicite é a principal causa de dor abdominal e pélvica aguda, e a mais comum emergência cirúrgica não-obstétrica em grávidas (THOMPSON; KUDLA; CHRISHOLM, 2014). A incidência estimada é de um caso em cada 1.000 gestantes (ABBASI; PATENAUDE; ABENHAIM, 2014). O diagnóstico de apendicite nestas pacientes é desafiador. Diagnóstico pré-operatório incorreto ocorre em 25 a 50% dos pacientes. Náuseas, perda de apetite, vômitos e dor abdominal leve em abdome inferior são frequentes tanto na gravidez normal quanto na apendicite aguda. A busca do diagnóstico preciso e do tratamento precoce da apendicite aguda e suas complicações devem ser encorajadas. O atraso ou erro de diagnóstico pode resultar em apendicite perfurada e peritonite, que se associa a altas taxas de parto precoce, aborto espontâneo e perda fetal (ARAS. et al., 2016) .

Há pouco mais de 100 anos, Balber ressaltou que a mortalidade da apendicite na gestante era a mortalidade do retardo do seu diagnóstico. Isto se confirma nos dias atuais por estudos que associam o atraso no diagnóstico da apendicite ao surgimento de complicações graves. Neste ínterim, a perda fetal varia de 1,5 a 4%, nos casos de apendicite não complicada, e de 21 a 35%, nos casos de perfuração do apêndice (KAPAN et al., 2013).

A sepse materna corresponde a uma pequena fração de casos de sepse total. Trata-se de complicação pouco frequente da gravidez, parto e puerpério. A morbidade e mortalidade maternas relacionadas à septicemia permanecem problema significativo e persistente. A sepse foi a causa mais frequente de morte materna no século XIX, responsável por 50% dos casos. Sepse puerperal é definida na Classificação Internacional de Doenças (ICD-10) como um "aumento de temperatura acima de 38.0C, mantido ao longo de 24h ou recorrente, do primeiro ao décimo dia após o parto ou o aborto". Alternativamente, a Organização Mundial de Saúde (OMS) define sepse puerperal como "infecção do trato genital que ocorre em qualquer momento entre o início da ruptura das membranas ou do parto e o 42 ° dia pós-parto, no qual a febre e um ou mais dos seguintes aspectos estão presentes: dor pélvica, secreção vaginal anormal e/ou com odor e atraso na taxa de redução do tamanho do útero (FERNÁNDEZ-PÉREZ et al., 2005).

O diagnóstico correto da sepse materna e a implementação precoce de diretrizes de conduta baseadas em evidências podem reduzir o risco geral de mortalidade e morbidade materno-fetal (VAN DILLEN et al., 2010).

2.4 Antibioticoterapia na sepse abdominal

Apesar dos avanços no conhecimento da fisiopatologia das infecções graves, testes diagnósticos, tratamentos com antibióticos, avanços das técnicas cirúrgicas e cuidados perioperatórios, expressiva percentagem de pacientes são acometidos por infecções abdominais graves e necessitam de cuidados intensivos. Dentro deste contexto, a taxa de mortalidade chega aos 23%, principalmente nos pacientes mais idosos, portadores de comorbidades múltiplas e naquele cujo diagnóstico é realizado em fases mais avançadas do processo infeccioso. A década de 90 foi caracterizada pelo desenvolvimento e consolidação do uso de novos antibióticos. Nesta década houve melhora do prognóstico dos pacientes com infecções intra-abdominais graves. A associação de betalactâmicos com inibidores de betalactamase permitiram tratamento eficaz das infecções mistas em pacientes criticamente enfermos. Porém, o uso indiscriminado destes antibióticos favoreceu o surgimento de resistência bacteriana (GUIRAO et al., 2010).

Infeções intra-abdominais (IIA) complicadas adquiridas na comunidade são frequentes na prática clínica. A taxa de mortalidade varia de 30 a 50%. A condução destes casos envolve grande custo hospitalar. O diagnóstico rápido das IIA, associado ao uso

precoce de medidas anti-seps e estratégias anti-infecciosas, podem proporcionar desfechos mais favoráveis e prevenir mortes ou eventos infecciosos subsequentes (CHEADLE et al., 2010).

As IIA classificam-se em não complicadas ou complicadas. As primeiras caracterizam-se pelo acometimento infeccioso em órgão único, sem ruptura anatômica do mesmo. Nestes casos, a conduta mais apropriada é a ressecção cirúrgica, sem prolongamento da antibioticoterapia que deve ser usada apenas como profilaxia pré-operatória. As IIA complicadas estendem-se além do acometimento da víscera oca e atingem o espaço peritoneal. Estas infecções são associadas à formação de abscessos ou peritonite e necessitam de procedimento cirúrgico ou percutâneo para o seu controle (SOLOMKIN et al., 2003).

As infecções ocasionadas por aeróbios gram-positivos ou gram-negativos produzem peritonite secundária. Os anaeróbios são os principais responsáveis pelos abscessos. Grande variedade de bactérias aeróbicas e anaeróbicas está envolvida na fisiopatologia das IIA. O patógeno prevalente depende da origem da infecção. Bactérias aeróbicas gram-positivas, gram-negativas e organismos facultativos são comumente isolados do estômago, duodeno, árvore biliar e intestino delgado proximal. Organismos aeróbicos e facultativos gram-negativos, e anaeróbios, são frequentemente isolados do intestino delgado distal. Infecções colônicas são determinadas, por sua vez, por organismos anaeróbios obrigatórios ou facultativos como estreptococos e enterococos e frequentemente inclui *Escherichia coli*. Independente da localização, a IIA é de natureza polimicrobiana e os aeróbios constituem a flora dominante (STEINBACH et al., 2015).

As fluoroquinolonas correspondem a uma classe popular de antibióticos. São muito utilizadas na prática diária para tratar uma grande variedade de infecções. Novas drogas desta classe têm sido desenvolvidas, com amplo espectro de ação e com maior cobertura contra organismos gram-positivos e anaeróbios.

A moxifloxacina é uma fluoroquinolona que possui excelente penetração no peritônio e nos tecidos do trato gastrointestinal e pancreático. Apresenta atividade e potência antimicrobiana equivalente à associação da levofloxacina com o metronidazol, nas IIA complicadas. A moxifloxacina pode ser administrada em dose única diária para todas as suas indicações. Este medicamento representa excelente opção terapêutica para pacientes alérgicos à penicilina ou betalactâmicos. Em portadores de disfunção renal, não é necessário ajuste de dose. A taxa de eventos adversos, associada ao seu uso, assemelha-

se a de outros antimicrobianos utilizados na prática clínica diária, no tratamento de IIA complicadas (CHEADLE et al., 2010).

As fluoroquinolonas inibem diretamente a síntese do DNA bacteriano. Este antibiótico inibe duas enzimas bacterianas, a DNA-girase e a topoisomerase IV, que têm papéis essenciais e distintos na replicação do DNA. Esta ação resulta no dano ao DNA e determina a morte da bactéria. Portanto, as fluoroquinolonas são agentes bactericidas (DRLICA; ZHAO, 1997).

Durante a gravidez e lactação, as fluoroquinolonas são geralmente evitadas. Experimentalmente, em animais, observou-se toxicidade ao desenvolvimento cartilaginoso. Todavia, não foi documentado em paciente gestantes efeito adverso em cartilagens, nem aumento da incidência de malformações. Metanálise mostrou que a exposição às quinolonas, durante o primeiro trimestre da gravidez, não está associada ao aumento do risco de malformação, parto pré-termo ou baixo peso ao nascimento (BAROZ et al., 2009).

2.5 Corticoterapia na sepse

Os corticoides (CC) são compostos sintéticos de cortisol, que exercem efeitos semelhantes aos seus correspondentes endógenos. Além da atividade glicocorticóide, muitos CC sintéticos possuem componentes mineralocorticóides que servem como precursores para a síntese de catecolaminas. Alguns CC que foram investigados no cenário da sepse incluem hidrocortisona, metil-prednisolona e prednisona. Os regimes de dose e tempo de uso variam conforme os estudos. A deficiência de cortisol na sepse é multifatorial, geralmente reversível e resulta em uma quantidade inadequada de cortisol a nível tecidual. A resistência dos tecidos aos CC pode envolver alteração no número ou função dos receptores de glicocorticoides, metabolismo do cortisol ou acesso aos tecidos. O resultado da remoção desta "verificação" na resposta imune do hospedeiro é a atividade descontrolada da cascata inflamatória e a disfunção orgânica. A deficiência relativa de mineralocorticoides pode contribuir ainda mais para a hipoperfusão sistêmica e ocasiona diminuição do fornecimento de sangue oxigenado para a periferia. A suplementação exógena com agentes que possuem atividade glicocorticóide e mineralocorticóide é, portanto, uma opção terapêutica promissora em pacientes com sepse (ROCHWERG et al., 2017).

A dexametasona é um dos glicocorticóides mais usados e seguros. Ainda assim, efeitos colaterais sérios são observados com o uso deste medicamento, devido à sua hidrofobicidade e baixa biodisponibilidade. Este CC é usado em muitas aplicações biomédicas: na cultura celular, para promover a diferenciação das células mesenquimais; na oftalmologia, para o tratamento de doenças inflamatórias agudas e crônicas, retinopatia proliferativa e neovascularização sub-retiniana; na alergologia, devido à sua capacidade de inibir funções de linfócitos, fibroblastos, macrófagos e outras células imunes, e na hematologia pediátrica, no tratamento da leucemia linfocítica aguda, por induzir apoptose dos linfócitos B e T (URBAŃSKA; KAREWICZ; NOWAKOWSKA, 2014).

Múltiplos CC já foram usados como tratamento adjuvante do choque séptico. Revisão sistemática não observou evidência clara de superioridade, na redução de mortalidade ou taxa de superinfecção, entre a hidrocortisona, metilprednisolona ou dexametasona, em pacientes sépticos. Houve forte evidência de superioridade, na reversão de choque, com a hidrocortisona em bolus ou infusão (GIBBISON et al., 2017).

Estudo experimental investigou o efeito da dexametasona no período de latência para nascimento, em modelo murino de trabalho de parto pré-termo. Ratas grávidas foram distribuídas aleatoriamente em grupos: o grupo controle recebeu água para injeção (n=20), o grupo de trabalho de parto pré-termo recebeu injeção com LPS (n=22), enquanto o grupo de glicocorticoide foi tratado com dexametasona uma hora antes (n=17) ou após (n=7) a injeção de LPS. Parto prematuro foi induzido pelo LPS, mas o pré-tratamento ou tratamento com CC prolongou a gestação e exerceu impacto favorável na sobrevivência dos fetos. O soro dos ratos estimulados por LPS induziu apoptose de esplenócitos em ratos saudáveis, prenhas ou não. Isto foi revertido após a incubação destas células com soro de ratos pré-tratados com dexametasona. O prolongamento da gestação e a sobrevivência neonata, em modelo murino estéril de parto prematuro foram atribuídos ao uso da dexametasona. Estes resultados estão associados a alterações nas respostas imunes e apoptóticas destes animais.

2.6 Histologia cardíaca

O miocárdio, o músculo cardíaco quase inexaurível, composto principalmente por um conjunto de células musculares especializadas denominadas *miócitos* cardíacos (Figura 1), é fundamental para a função cardíaca. Os miócitos estão dispostos em uma

orientação circular e espiral ao redor do ventrículo esquerdo, a câmara que bombeia o sangue para a circulação sistêmica.

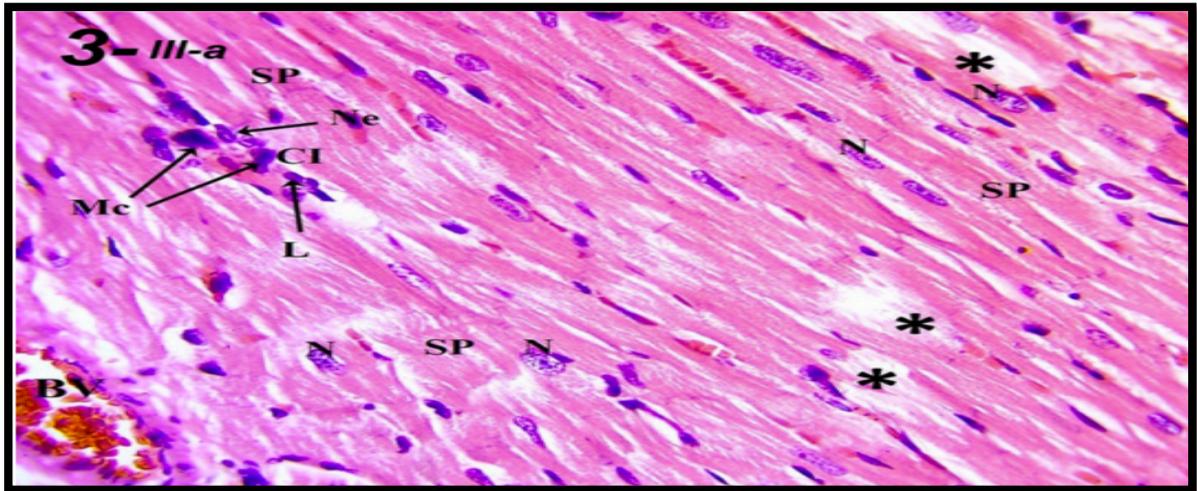


Figura 1 - Histologia Cardíaca

Feixes de células musculares cardíacas separadas por fina trave de tecido conjuntivo fibroso, com sarcoplasma (SP) acidofílico e núcleo (N) central vesicular. Degeneração focal de fibras cardíacas (asterisco). Mínimo infiltrado celular (CI) na forma de macrófagos (Mc), neutrófilos (Ne) e linfócitos (L). (Hx. & E. 400x). (ZAKI et al., 2017)

Os miócitos cardíacos possuem cinco componentes principais: (1) membrana celular (sarcolema) e túbulos T, para a condução dos impulsos nervosos; (2) retículo sarcoplasmático, um reservatório de cálcio necessário para a contração; (3) elementos contráteis; (4) mitocôndrias e (5) núcleo. As células do músculo cardíaco contêm muito mais mitocôndrias entre as miofibrilas do que as células do músculo esquelético (aproximadamente 23% do volume celular versus 2%), o que reflete a dependência quase completa do músculo cardíaco do metabolismo aeróbico. Cada miócito contém geralmente um núcleo em forma de fuso (SCHOEN, 2005).

A unidade intracelular contrátil do músculo cardíaco é chamada *desarcômero* e corresponde a um arranjo ordenado de filamentos espessos, compostos principalmente de miosina, e de filamentos finos, que contêm actina. Os sarcômeros também são constituídos pelas proteínas reguladoras troponina e tropomiosina. As células do músculo cardíaco são compostas de miofilamentos paralelos (arranjos de sarcômeros em série), que são responsáveis pelo aspecto estriado dessas células. O comprimento dos sarcômeros depende do estado de contração do coração. Os mais curtos apresentam uma considerável sobreposição de actina e miosina com conseqüente redução da força contrátil. Os mais longos possuem contratilidade mais acentuada conforme justificado pelo mecanismo de Frank-Starling (NEVES et al., 2016).

Do número total de células cardíacas, os miócitos respondem por cerca de 25%. Porém, devido ao seu tamanho ser maior que as demais células presentes neste órgão, eles são responsáveis por mais de 90% do volume do miocárdio. Os miócitos atriais são menores e mais simples que os ventriculares. Alguns possuem grânulos elétron-densos no seu citoplasma, denominados *grânulos atriais específicos*, que armazenam os peptídeos natriuréticos atriais (PNA ou peptídeo natriurético tipo A). O PNA é um polipeptídeo secretado no sangue a partir da distensão atrial. O PNA pode produzir vasodilatação, natriurese, diurese e inibição do Sistema Renina- Angiotensina- Aldosterona (SRAA) e do Sistema Nervoso Simpático (SNS). Outros peptídeos natriuréticos são produzidos pelos ventrículos. O peptídeo natriurético tipo B, inicialmente denominado peptídeo natriurético cerebral, é secretado em resposta a elevação na pressão e volume ventriculares. O peptídeo natriurético tipo C é produzido pelo endotélio vascular em resposta a uma tensão de cisalhamento elevada (RUBATTU; TRIPOSKIADIS, 2017).

Além dos miócitos o miocárdio é constituído de células endoteliais, na maioria das vezes associada à rica rede capilar miocárdica, e fibroblastos. No miocárdio normal, as células inflamatórias são raras e o colágeno é escasso. Os *discos intercalares* são estruturas exclusivas do músculo cardíaco e são responsáveis pela integração funcional dos miócitos. Dentro destes discos, as junções intercelulares permitem interação mecânica e elétrica - iônica - entre as células. Um dos componentes dos discos intercalares são as *junções comunicantes*. Estas possibilitam uma interação elétrica, por meio da passagem relativamente ilimitada de íons, entre células vizinhas e facilitam a contração sincrônica dos miócitos. As *junções comunicantes* consistem em agrupamento de canais formados por membrana plasmática que interligam de modo direto os compartimentos citoplasmáticos de células vizinhas. Anormalidades na distribuição espacial dessas junções e de suas respectivas proteínas podem contribuir para disfunção eletromecânica e arritmias.

No coração também existem miócitos especializados, excitatórios e condutores, que estão envolvidos na regulação da frequência e do ritmo cardíaco. São componentes do sistema de condução cardíaco: (1) o nó-sinoatrial (SA) que se localiza na parede póstero-superior do átrio direito, junto à desembocadura da veia cava superior; (2) o nó atrioventricular (AV), localizado no átrio direito ao longo do septo interatrial; (3) feixe de His, que segue do átrio direito ao ápice do septo interventricular; e sua subdivisão em (4) ramos direito e esquerdo e, por fim, (5) as células de Purkinje.

A matriz extracelular (MEC) no miocárdio consiste primariamente de fibras de colágeno tipo I e tipo III. Eletroforese miocárdica em ratos adultos e primatas indicam que aproximadamente 80% do colágeno neste órgão é representado pelo colágeno tipo I. Pequenas quantidades de colágeno tipo IV e V estão presentes nas membranas basais dos miócitos e no espaço pericelular (EGHBALI; WEBER, 1990).

As doenças fibróticas possuem uma incidência global atual alarmante, e as opções terapêuticas são bastante limitadas. Até recentemente, as alterações cardíacas subjacentes às cardiopatias eram vistas como resultado de alterações que envolviam apenas os cardiomiócitos. Evidências mais atuais apontam que o interstício cardíaco e a sua matriz colagenosa têm papel importante nesse processo (MCVICKER; BENNETT, 2017).

Em relação ao coração, o excesso de tecido cicatricial pode causar enrijecimento tecidual, atrofia de cardiomiócitos, arritmias e hipóxia. As células efetoras da fibrose são os miofibroblastos - fibroblastos ativados - que correspondem a células com alto potencial contrátil. Estas células têm aparência de actina de fibras musculares lisas tipo α . Os mecanismos subjacentes à diferenciação e persistência dos fibroblastos ainda estão sob investigação e envolvem uma complexa rede de sinalização (figura 2) e interações celulares (figura 3), envolvendo o fator transformador do crescimento β (TGF- β), endotelina-1 (ET-1), angiotensina-2 (AT-II), fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento do tecido conjuntivo (CCN2) (LEASK, 2015).

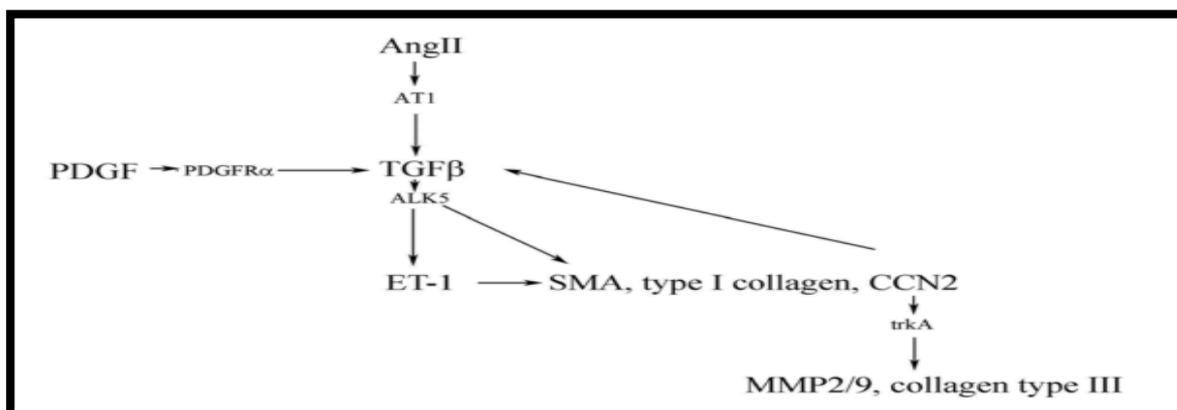


Figura 2 - Moléculas sinalizadoras determinantes da fibrose cardíaca

Uma série de interações diretas e indiretas entre fatores de crescimento e proteínas matricelulares são determinantes da fibrose. Os fatores de crescimento e proteínas matricelulares e seus receptores de superfície celular são mostrados, juntamente com os maiores efetores pró-fibróticos e seus produtos finais. AngII indica angiotensina II; ALK5, quinase associada a ativina 5; AT1, receptor da angiotensina 1; ET-1, endotelina1; MMP, metaloproteínase da matriz; PDGF, fator de crescimento derivado das plaquetas; SMA, actina do músculo liso; TGF- β , fator transformador do crescimento- β ; e trkA, receptor da tirosina quinase A.(LEASK, 2015)

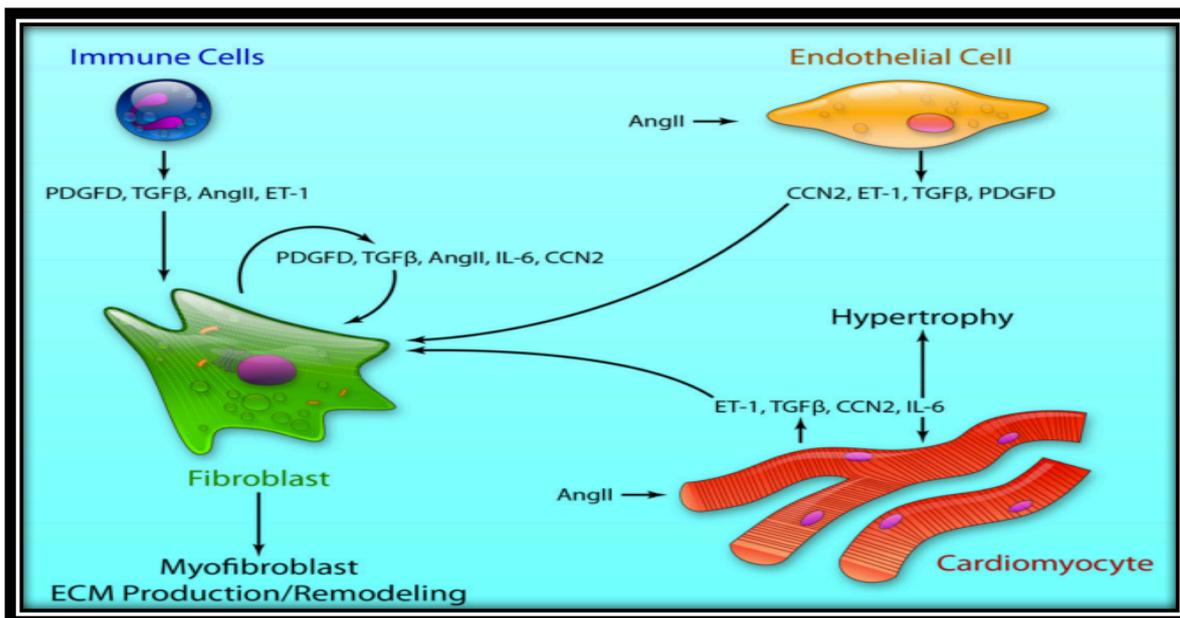


Figura 3 - Interações celulares na fibrose cardíaca

As células envolvidas nas interações descritas na figura 2 estão mostradas. Proteínas pró-fibróticas podem ter origens diversas, porém a célula efetora final da fibrose é o miofibroblasto. Ang-II indica angiotensina II; ECM, matriz extracelular; ET, endotelina; IL, interleucina; PDGFD, fator de crescimento derivado das plaquetas D; e TGF-β, fator transformador do crescimento-β. (LEASK, 2015)

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar alterações histomorfométricas cardíacas em ratos Wistar cujas mães foram submetidas à peritonite fecal autógena durante a gravidez, no período máximo da organogênese fetal e, investigar o impedimento ou o comportamento destas alterações com a administração intravenosa da associação de moxifloxacina e dexametasona 24 horas após insulto infeccioso materno.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a contagem, tamanho e área ocupada pelos núcleos em cada grupo do estudo (GCN, GCP e GI)
- Investigar a ocorrência de diferenças na contagem, tamanho e área ocupada pelos núcleos entre os grupos do estudo (GCN, GCP e GI)

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo

Estudo prospectivo, longitudinal, analítico e de intervenção.

4.2 Local do estudo

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisas Experimentais da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande, Paraíba. O emblocamento dos corações na parafina e a confecção das lâminas histológicas foi realizada no laboratório de anatomia patológica da Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa.

4.3 População do estudo

4.3.1 Critérios de elegibilidade

- *Critérios de inclusão*

Foram incluídos 03 ratas adultas Wistar (*Rattus Novergicus Albinus Rodentia Mammalia*) e 29 ratos jovens Wistar de 04 meses de idade (conceptos das ratas adultas). Para a escolha dos animais do estudo não foi necessária a randomização já que as características dos mesmos são semelhantes, fazerem parte da mesma linhagem e terem sido criados nas mesmas condições ambientais e alimentares.

Os ratos jovens foram divididos em 03 grupos:

- ❖ ***Grupo Controle Negativo - GCN*** - filhos de ratas normais
- ❖ ***Grupo Controle Positivo - GCP*** - filhos de ratas que tiveram peritonite fecal autógena induzida e que não receberam tratamento
- ❖ ***Grupo Intervenção - GI*** - filhos de ratas com peritonite fecal autógena induzida que foram tratadas com a administração intravenosa da associação de antimicrobiano e corticóide - moxifloxacina e dexametasona

Ratos Wistar são caracterizados pelas orelhas alongadas, cabeça grande e comprimento da cauda sempre menor que o comprimento corporal. A gestação dura de 20 a 22 dias e o desmame ocorre com 17 a 19 dias de vida. São considerados animais dóceis, de fácil manipulação e com boa capacidade de aprendizado.

Estes animais constituem uma linhagem albina da espécie *Rattus norvegicus*, desenvolvida no Instituto Wistar, na Filadélfia, apresentam comumente alopecia, por vezes temporária, e baixa incidência de tumores (TUFIK, 2004). Esta linhagem é uma das mais utilizadas mundialmente em pesquisas de laboratório (ANDREOLLO et al., 2012).

- *Crítérios de exclusão*

Foram excluídos os animais que:

- ❖ No momento da indução da peritonite, apresentaram sinal de qualquer fluido orgânico no aspirado da cavidade peritoneal,
- ❖ Apresentaram nas fezes qualquer sinal de processo inflamatório, incluindo pus ou sangue e,
- ❖ Que desenvolverem desnutrição.

4.4 Definição das variáveis e coleta de dados

4.4.1 Definição dos termos

- **RATAS GRÁVIDAS OU PRENHAS**

Para o diagnóstico da prenhez nas ratas, foi realizado o esfregaço vaginal, utilizando-se uma cureta que, após ser flambada, foi colocada em solução salina 0,9% e introduzida no intróito vaginal. Em seguida, foi retirada uma pequena quantidade de secreção que foi colocada numa lâmina de vidro. As lâminas foram levadas ao microscópio óptico, e a presença de espermatozoides, bem como a verificação do estro foram considerados os fatores para o diagnóstico positivo da prenhez, sendo este dia considerado como o dia zero da gestação (SILVA; ROCHA, 1995).

- **PERITONITE**

Entende-se por peritonite a inflamação de um segmento ou de toda a superfície parietal ou visceral da membrana peritoneal. Após a inoculação da solução fecal autógena filtrada na cavidade abdominal, as ratas foram diariamente acompanhadas, com monitorização dos sinais de septicemia evolutiva: diminuição da atividade física, redução da ingestão de água e ração, piloereção, taquipnéia e formação de halo de coloração escurecida em torno dos olhos.

4.4.2 Operacionalização e categorização dos dados

a) Núcleo celular

Variável quantitativa discreta. Estrutura presente nas células eucariontes que contém o material genético. É delimitado pelo envoltório nuclear - responsável por separar as reações químicas que ocorrem no citoplasma, das reações que ocorrem no núcleo. O envoltório nuclear comunica-se com o citoplasma através dos poros nucleares. O núcleo celular contém ainda algumas proteínas que têm a função de regular a expressão gênica e é a estrutura responsável pela síntese proteica.

A identificação desta variável nas lâminas histológicas foi realizada partir da análise microscópica celular e reconhecimento de estruturas vesiculares que se localizam no centro do citoplasma. A identificação do núcleo da célula cardíaca, a partir da fotografia da lâmina histológica, foi realizada de forma automática, com o software Image J.

b) Tamanho nuclear

Variável quantitativa discreta medida em pixels. Corresponde à dimensão dos núcleos celulares presentes nos cortes histológicos da parede livre do ventrículo esquerdo. Esta medida foi obtida de forma automática, a partir da fotografia da lâmina histológica, pelo software Image J.

c) Área ocupada pelos núcleos

Variável quantitativa discreta medida em pixels e detectada automaticamente pelo software Image J. Corresponde ao percentual da área total da fotografia da lâmina histológica da parede livre do ventrículo esquerdo ocupada pelos núcleos celulares.

4.4.3 Procedimentos técnicos

- **Desenho do estudo**

Utilizamos três ratas Wistar adultas prenhas jovens (12 meses de idade), com peso médio de 300 gramas, sem qualquer doença ou agravo, provenientes da colônia de criação do biotério da Faculdade de Ciências Médica de Campina Grande (FCM-CG) Em duas destas ratas foi induzida peritonite fecal com administração de 4ml/Kg de suspensão fecal autógena a 10% filtrada, na cavidade abdominal, no quadrante ilíaco esquerdo, no 9º dia de gravidez (Fotografia 1). A suspensão fecal foi obtida da seguinte maneira:

- ✓ Dois gramas de fezes foram coletados de cada rata individualmente,
- ✓ A amostra de fezes foi dissolvida em 20 ml de solução salina a 0,9%,
- ✓ A mistura foi homogeneizada e filtrada com uma gaze para remoção das grandes partículas.



Fotografia 1 - Indução de peritonite fecal

Injeção de 4 ml/Kg de suspensão fecal autógena a 10% filtrada no quadrante ilíaco esquerdo de rata Wistar no 9º dia de gravidez

Das duas ratas prenhas, que tiverem peritonite induzida, uma foi tratada com a combinação de moxifloxacina e dexametasona em doses intravenosas de 40mg/kg e 0,2mg/kg, respectivamente. O tratamento foi realizado 24h após a indução da infecção materna. A rata foi imobilizada e a cauda exposta. A veia caudal lateral foi puncionada com escalpe. Aspirou-se o êmbolo da seringa e observou-se retorno sanguíneo. A medicação foi administrada de forma lenta. Não foi observada infiltração da cauda durante a injeção.

As ratas Wistar prenhas, infectadas (02) e não infectada (01), foram alojadas em gaiolas de polipropileno com dimensão de 430x430x200 mm (CxLxA) e mantidas em ambiente ventilado e com temperatura controlada ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$). As 24 horas foram divididas em dois ciclos: luz de 12h/escurecimento de 12h. Todos os animais tiveram livre acesso à alimentação (ração balanceada própria para ratos Wistar) e água *ad libitum*.

Diariamente, as ratas foram:

- ✓ Monitoradas e observadas pela mesma médica veterinária, responsável pelo laboratório de cirurgia experimental da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande,
- ✓ Submetidas à aferição do peso corporal, frequência respiratória e temperatura com o objetivo de detectar precocemente sinais de infecção,
- ✓ Analisadas quanto à quantidade e coloração dos pêlos, também como objetivo de detectar sinais de infecção
- ✓ Avaliadas quanto ao nascimento dos filhotes.

Após o nascimento (que ocorreu aproximadamente 21 dias após a prenhez) e o período de três semanas da amamentação, 10 filhotes de cada uma das 03 ratas Wistar foram separados das suas mães. Entre os filhotes, também foi realizada a separação por sexo.

De cada rata nasceram cinco filhotes de cada sexo. Após o período da amamentação e consequente separação das mães, 01 conceito feminino, nascido da rata que teve peritonite induzida e não tratada, veio a óbito. Todos os outros filhotes sobreviveram e apresentaram bom desenvolvimento.

Aos 04 meses de idade, estes animais jovens (n=29), 20 machos e 09 fêmeas, foram eutanasiados com a administração intravenosa de cloridrato de ketamina, 50mg/kg, e xilazina, na dosagem de 10mg/kg.

A cavidade torácica foi acessada por meio de incisão na linha média com bisturi de lâmina fria nº 15. As demais camadas da parede torácica e o osso esterno foram

seccionados com tesoura cirúrgica. O coração e os vasos da base foram cuidadosamente retirados em bloco (Fotografia 2), embebidos em formaldeído a 10% e enviados para emblocamento em parafina e confecção das lâminas histológicas.



Fotografia 2 - Técnica de ressecção do coração

Toracotomia mediana por lâmina de bisturi fria número 15. Isolamento e retirada em bloco do coração e vasos da base com posterior colocação em formaldeído a 10% e envio para emblocamento em parafina e confecção das lâminas histológicas

Dez filhotes de ratas normais, que não tiveram peritonite induzida, foram utilizados como controle negativo - GCN. Os nove filhotes de ratas submetidas à peritonite e que não receberam intervenção alguma foram utilizados como controle positivo - GCP. Os dez filhotes de ratas que tiveram peritonite induzida mas que receberam 24h após, o tratamento associado de antibiótico e corticóide (moxifloxacina 4mg/Kg e dexametasona 0,2mg/Kg) constituíram o grupo de intervenção - GI.

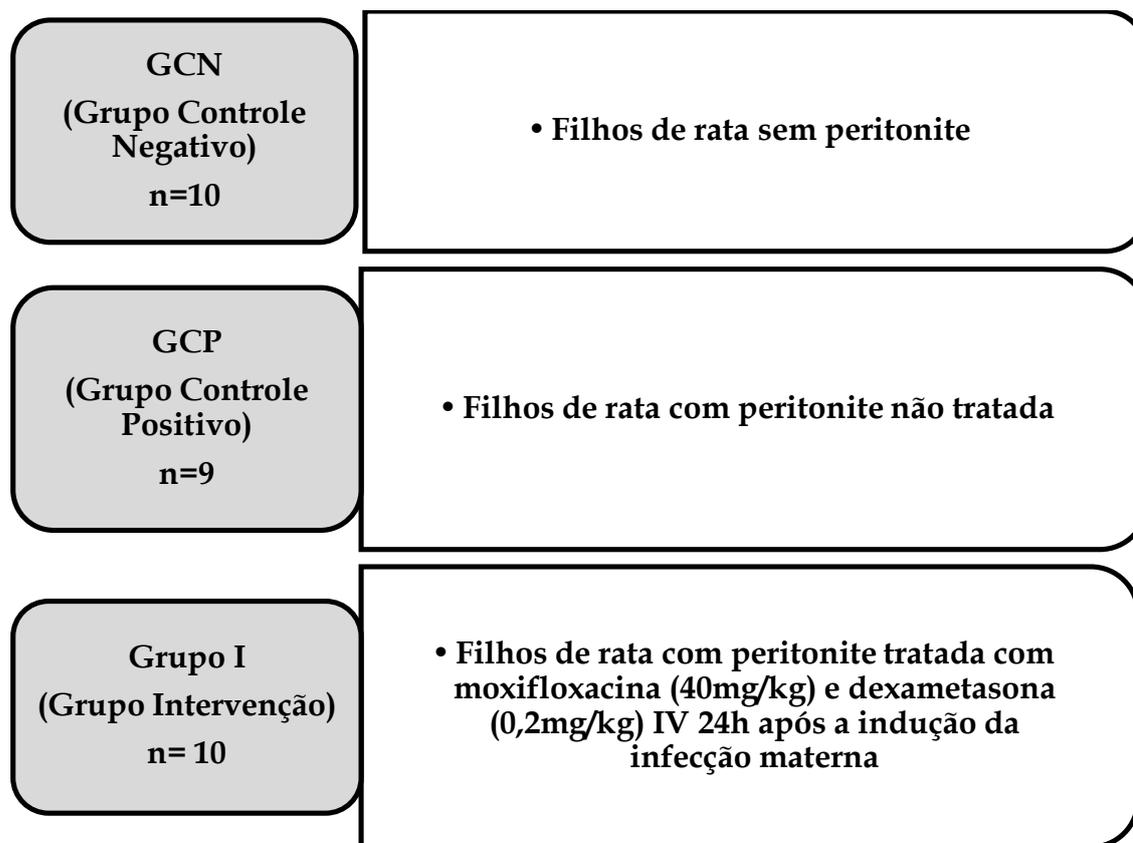


Figura 4 - Grupos de ratos envolvidos no estudo

- ***Processo Histológico - Hematoxilina e Eosina (Hx&E)***

Os espécimes teciduais (corações removidos), previamente fixados em formalina a 10% tamponada, foram submetidos a seccionamento transversal, com cortes de aproximadamente 3-5 mm de espessura, da ponta do coração para a base, para serem submetidos a processos químicos que favoreceram ao corte histológico.

Após a lavagem dos espécimes teciduais em água corrente por uma hora, para retirada de possíveis precipitações da formalina, o material foi submetido a processo químico que possibilitou o enrijecimento adequado e padronizado das amostras para os cortes histológicos.

O processo químico seguiu uma sequência alcoólica para desidratação, com intuito de tornar as soluções miscíveis e a não retração tecidual. Após a desidratação, os espécimes teciduais foram imersos em solução de xileno, que realiza a retirada do álcool,

imiscível em parafina fundida, além de serem submetidos à diafanização do tecido, que consiste na infiltração do tecido por um solvente de parafina que seja ao mesmo tempo desalcolizante. Em sequência, todo material tecidual foi imerso em banhos sucessivos de parafina fundida à 60-63°C, com o objetivo de retirar todo xileno dos espécimes teciduais e endurecer o tecido para os cortes histológicos.

Concluiu-se o processamento químico tecidual e posteriormente, todo material foi encaminhado para a inclusão e formação de blocos histológicos através de moldes pré-aquecidos. Com o material imerso no molde com a parafina fundida, esse foi resfriado e retirado do molde, formando o chamado bloco de parafina histológico.

Os blocos de parafina foram resfriados à baixa temperatura, visando um reforço na solidificação da parafina e melhor desbaste do bloco durante o processo de microtomia. Os blocos provenientes de todo processamento histológico foram dispostos em freezer com temperatura -3°C, segundo ordem das amostras, sobre formas de gelos, e mantidos por pelo menos meia hora até disponibilidade de temperatura para início do serviço.

As lâminas histológicas foscas foram identificadas com lapiseira, conforme a identificação do bloco de parafina, para facilitar o manuseio e prevenir possíveis erros de trocas de materiais. A partir do bloco de parafina desbastado e resfriado, fitas de cortes histológicos seriados foram realizados, com o objetivo da montagem de uma lâmina para análise.

Utilizou-se, para tanto, um micrótomo de bancada, banho-maria, cuba tipo manteigueira sem tampa, água destilada, álcool absoluto, pincel, gaze, lâminas histológicas foscas, rótulos e suporte de madeira para lâminas.

Cada bloco de parafina foi fixado ao suporte próprio do micrótomo sendo obtidas fitas de cortes histológicos representativas do material emblocado de forma padronizada. A espessura do corte obtido foi de 3-4 micrômetros. Os cortes já dispostos à lâmina foram mantidos no suporte de madeira disponível sobre a bancada por cerca de 20 a 30 minutos. Retirou-se o excesso de parafina das lâminas “recém-pescadas”, por meio de calor, numa estufa de esterilização e secagem calibrada à temperatura entre 60-65°C e mantidas nesse ambiente por cerca de 30 minutos.

Em seguida, foi realizado o preparo prévio (submissão de substâncias químicas) do corte histológico para coloração em *Hx&E*, conforme o seguinte procedimento: realizou-se banhos sucessivos de Xilol I, Xilol II e Xilol III (desparafinização); álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool 95%, álcool 80%, álcool 70% (hidratação); água destilada; Hematoxilina de Harris (coloração); água destilada; ácido clorídrico 1%

(diferenciação); água destilada; Eosina Y (coloração); álcool 70%, álcool 80%, álcool 95%, álcool absoluto I, álcool absoluto II (desidratação); Xilol I, Xilol II (diafanização); e Xilol III (montagem). Todo esse processo foi realizado em equipamento automático para coloração de lâminas histológicas, modelo ST5010 Leica.

Após concluir a coloração, seguiu-se a montagem da lâmina, que consistiu em sobrepor à camada de tecido já corada em *Hx&E*, disposta à lâmina com uma película de vidro, chamada lamínula, de modo a evitar desgaste ou remoção brusca do corte histológico, com o auxílio do meio de montagem tipo Bálsamo do Canadá. Enxugou-se a face oposta ao corte com toalha de papel. As lâminas já montadas foram dispostas sobre bandeja de madeira para posterior análise após breve período de secagem à temperatura ambiente.

A hematoxilina é um corante básico que tem afinidade por estruturas ácidas (acidófilo) e possui cor azul ou púrpura. A eosina é um corante ácido que tem afinidade por estruturas básicas (basófilo) e possui cor rosa.

As lâminas do coração foram observadas ao microscópio, com magnificação de 400x. Três cortes representativos de cada seção do ventrículo esquerdo - parede livre - de cada rato, dos respectivos grupos, foram selecionadas para análise.

- ***Histomorfometria***

A contagem de células é um procedimento importante que é realizado rotineiramente. Geralmente é feita com um hemocitômetro e as células necessitam ser contadas manualmente em oito áreas de 1x1 mm nas duas câmaras de contagem. O hemocitômetro foi inventado por Louis-Charles Malassez e consiste de uma espessa lamina de vidro para microscopia com indentações retangulares que criam as câmaras. Estas, por sua vez, são subdivididas em grades a partir de indentações -linhas - perpendiculares, criadas à laser. As áreas delimitadas pelas linhas e a profundidade das câmaras são conhecidas. Ao se observar uma área definida da grade é possível a contagem do número de células ou partículas num volume específico do líquido e, assim, calcular a concentração destas células (ZEIDLER-ERDELY et al., 2016).

Esta de forma de contagem é pouco prática e demanda bastante tempo. Neste contexto o surgimento de softwares de contagem automática de células permitiu a realização desta função com praticidade, rapidez e economia de tempo. Esta abordagem

é aproximadamente 10 vezes mais rápida e possui resultados mais consistentes e confiáveis que a contagem manual (GRISHAGIN, 2015).

As análises histomorfométricas foram realizadas com um microscópio Leica DM 2000 (lente de ampliação x40) ligado a uma câmara digital (Leica DFC 425, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e acoplados a um computador equipado com um programa analisador de imagem. Nesta pesquisa, as medidas histomorfométricas foram realizadas, empregando-se o software de análise digital de imagens Image J 1.51, Java 1.8.0 _ 101 (64-bit). Este programa é amplamente utilizado em pesquisas científicas envolvendo quantificação e análise de imagens (GIRISH; VIJAVALAKSHMI, 2004), com plataforma de programação baseada na linguagem Java. De forma sistemática todas as fotomicrografias foram processadas segundo o mesmo algoritmo. Inicialmente, a fotomicrografia foi convertida em 8-bits. Em seguida, na aba "processos", imagem foi tornada binária. Os dados de cada imagem (número, tamanho e área nuclear) foram obtidos através do plugin "Nucleus Counter", de forma automática. O comando "Threshold" foi utilizado para separar o fundo da imagem das partículas de interesse. Determinou-se um ponto de corte para todas as partículas com uma área inferior a 100 pixels ou superior a 5000 pixels. Não impusemos restrições à forma. O ponto de corte eliminou ruídos e eventuais células coalescidas.

4.5 Análise dos dados

Os resultados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism (Prism 7 for Mac OS X, Version 7.0c, March 1, 2017 - GraphPad Software, Inc., USA). Em cada um dos grupos avaliamos o percentual de área por campo ocupada pelos núcleos celulares, o número e o tamanho dos núcleos em cada fotomicrografia da parede livre do ventrículo esquerdo.

Os parâmetros quantitativos foram expressos por suas médias e desvio-padrão bem como gráficos box-plot. Cada parâmetro foi testado quanto à distribuição gaussiana utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov.

Para a comparação das múltiplas médias entre os grupos que passaram no teste de normalidade utilizamos o one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, para identificar quais grupos diferiram entre si.

Para as comparações de médias não paramétricas, utilizamos o teste de Kruskal-Wallis. O pós-teste de Dunn foi utilizado para identificar quais grupos diferiram entre si. Valores de $p < 0.05$ foram utilizados para rejeitar a hipótese de nulidade.

4.6 Limitações metodológicas

Com o intuito de minimizar as falhas, o acompanhamento e coleta de dados dos animais foi realizado pela mesma médica veterinária responsável pela Unidade de Investigação Experimental da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande e o acesso às cavidades torácica dos animais, após a eutanásia, bem como as avaliações dos resultados, realizados pelo pesquisador. Entretanto, apesar de termos avaliado as alterações histológicas com base na histomorfometria, é possível que os usos de outras ferramentas diagnósticas possam ter a capacidade de detectar alterações ainda que sutis nos tecidos cardíacos da prole de ratas submetidas ao insulto infeccioso.

Ressaltamos ainda que, apesar da confecção das lâminas ter sido realizada utilizando-se sempre a mesma técnica, com o mesmo padrão de emblocamento dos corações, no mesmo laboratório de patologia da Universidade Federal da Paraíba, em João Pessoa, e pela mesma profissional, a eventual falta da uniformidade dos cortes histológicos pode associar-se a discrepâncias nos dados histomorfométricos adquiridos pelo software ImageJ. Porém, como o mesmo padrão de corte foi utilizado para todas as lâminas, em corações com o mesmo padrão de emblocamento na parafina, observamos que a uniformidade na confecção das lâminas histológicas na análise de suas fotografias minimiza este fator de confusão, na análise dos dados.

4.7 Aspectos éticos

Os ratos receberam cuidados em concordância com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório”, respeitando-se os “Princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (COBEA). O projeto de investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/CESED) conforme anexo.

5 RESULTADOS

Os resultados da pesquisa encontram-se na forma de artigo disposto no Apêndice.

6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em ratas adultas prenhas, submetidas a peritonite com 4ml/kg desolução fecal autógena a 10% filtrada, foi observado, a partir da análise histomorfométrica com o software ImageJ, redução significativa da densidade nuclear no tecido cardíaco na prole adulta. Esta alteração foi evitada com administração precoce e intravenosa de moxifloxacina 40mg/Kg e dexametasona 0,2mg/Kg.

A contagem nuclear e área ocupada pelos núcleos foi significativamente maior no GCN quando comparado ao GCP e no GI comparado ao GCP. Não houve diferença significativa entre grupos GCN e GI. O tamanho nuclear foi significativamente maior no GI quando comparado ao GCP.

Os resultados encontrados poderão fornecer melhor entendimento da repercussão cardíaca fetal, ocasionada pela translocação bacteriana da cavidade peritoneal materna para a circulação sanguínea fetal e, determinar a importância da intervenção precoce materna, com antibiótico e corticóide, como forma de prevenção das alterações cardíacas fetais. Adicionalmente, a investigação poderá fornecer informações quanto a possível gênese de transtornos do miocárdio em adultos jovens, nascidos de mães que sofreram infecções na fase precoce da gravidez.

REFERÊNCIAS

ABBASI, N.; PATENAUDE, V.; ABENHAIM, H. A. **Management and outcomes of acute appendicitis in pregnancy-population-based study of over 7000 cases.** BJOG : An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, v. 121, n. 12, p. 1509–14, nov. 2014.

ANDREOLLO, N. A. et al. **Idade dos ratos versus idade humana: qual é a relação?** ABCD. Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva (São Paulo), v. 25, n. 1, p. 49–51, 2012.

ANGUS DC, LINDE-ZWIRBLE WT, LIDICKER J, CLERMONT G, CARCILLO J, P. M. **Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care.** Critical Care Medicine, v. 29, n. 7, p. 1303–10, 2001.

ARAS., A. et al. **The diagnosis of acute appendicitis in pregnant versus non-pregnant women: A comparative study.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 62, n. 7, p. 622–627, 2016.

AZIZ M, JACOB A, YANG WL, MATSUDA A, W. P. **Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis.** J Leukoc Biol., v. 7, n. 11, p. 1–14, 2012.

BAR-OZ, B. et al. **The safety of quinolones--a meta-analysis of pregnancy outcomes.** European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology, v. 143, n. 2, p. 75–8, abr. 2009.

BARTLETT, J. G. et al. **A review. Lessons from an animal model of intra-abdominal sepsis.** Archives of Surgery (Chicago, Ill. : 1960), v. 113, n. 7, p. 853–7, 1978.

BARTON, J. R.; SIBAI, B. M. **Severe Sepsis and Septic Shock in Pregnancy.** Obstetrics & Gynecology, v. 120, n. 3, p. 689–706, set. 2012.

BORN, D. et al. **Cuidados Intensivos na Gestação Complicada.** In: Conduitas no Paciente Grave. Third ed. [s.l: s.n.]. p. 1909–14.

BRACAMONTE-BARAN, W.; ČIHÁKOVÁ, D. **Cardiac Autoimmunity: Myocarditis.** Advances in Experimental Medicine and Biology, v. 1003, p. 187–221, 2017.

BRANDT, C. T. et al. **Brain Damage and Congenital Cataract due to Autogenously Fecal Peritonitis in Pregnant Wistar rats.** Acta Cirúrgica Brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia, v. 29, n. 10, p. 681–7, 2014.

BROURI, F. et al. **Toxic Cardiac Effects of Catecholamines: Role of Beta-adrenoceptor Downregulation.** European Journal of Pharmacology, v. 456, n. 1–3, p. 69–75, 5 dez. 2002.

BROWN, J. J. S. et al. **Appendicitis in Pregnancy: An Ongoing Diagnostic Dilemma.** *Colorectal Disease*, v. 11, n. Table 1, p. 116–122, 2009.

BRUN-BUISSON C, MESHAKA P, PINTON P, V. B. . **EPISEPSIS: A Reappraisal of the Epidemiology and Outcome of Severe Sepsis in French Intensive Care Units.** *Intensive Care Medicine*, v. 30, n. 4, p. 580–8, 2004.

CAFORIO, A. L. P. et al. **Current State of Knowledge on Aetiology, Diagnosis, Management, and Therapy of Myocarditis: A position Statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases.** *European Heart Journal*, v. 34, n. 33, p. 2636–2648, 2013.

CAFORIO, A. L. P. et al. **Myocarditis: A Clinical Overview.** *Current cardiology reports*, v. 19, n. 7, p. 63, jul. 2017.

CARNEIRO, B. et al. **Estudo Comparativo entre Diversos Tipos de Tratamento para Peritonite Fecal em Rato.** 2002;29(1):43-8. *Rev Col Bras Cir.*, v. 29, n. 1, p. 43–48, 2002.

CHEADLE, W. et al. **Clinical Update on the Use of Moxifloxacin in the Treatment of Community-Acquired Complicated Intraabdominal Infections.** *Surgical Infections*, v. 11, n. 5, p. 487–494, 2010.

CHEN, H.; VANBUREN, V. **A Provisional Gene Regulatory Atlas for Mouse Heart Development.** v. 9, n. 1, 2014.

COOPER, L. T. et al. **The role of Endomyocardial Biopsy in the Management of Cardiovascular Disease: a Scientific Statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology.** Endorsed by the Heart Failure Society of. *Journal of the American College of Cardiology*, v. 50, n. 19, p. 1914–31, 6 nov. 2007.

CURLEY, G. F.; SLUTSKY, A. S. **Year in Review 2013: Critical Care – Respiriology.** *Critical Care*, v. 18, n. 5, p. 577, 2014.

DRLICA, K.; ZHAO, X. **DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews* : MMBR, v. 61, n. 3, p. 377–92, set. 1997.

EGHBALI, M.; WEBER, K. T. **Collagen and the Myocardium: Fibrillar Structure, Biosynthesis and Degradation in Relation to Hypertrophy and its Regression.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, v. 96, n. 1, p. 1–14, 1990.

ESCHER, F. et al. **Long-term Outcome of Patients with Virus-negative Chronic Myocarditis or Inflammatory Cardiomyopathy after Immunosuppressive Therapy.** *Clinical Research in Cardiology*, v. 105, n. 12, p. 1011–1020, 16 dez. 2016.

FERNÁNDEZ-PÉREZ, E. R. et al. **Sepsis During Pregnancy.** *Critical care medicine*, v. 33, n. 10 Suppl, p. S286-93, out. 2005.

FINK, M. P.; HEARD, S. O. **Laboratory models of sepsis and septic shock**. The Journal of Surgical Research, v. 49, n. 2, p. 186–196, 1990.

FLEISCHMANN, C. et al. **Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations**. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, v. 193, n. 3, p. 259–72, 1 fev. 2016.

FLEVARIS, P. et al. **PAI-1 Controls Cardiomyocyte TGF- β and Cardiac Fibrosis**. Circulation, 6 jun. 2017.

FREISE, H. **Animal Models of Sepsis**. J Invest. Surg. v. 14, n. 4, 195-212, 2001.

GADELHA, N. N. C. B.; NERY, D.; GADELHA, B. **Impact of prenatal antimicrobial treatment on the fetal brain damage due to autogenously fecal peritonitis in Wistar rats** : Histology study. 2015.

GIBBISON, B. et al. **Corticosteroids in Septic Shock: a Systematic Review and Network Meta-analysis**. Critical Care, v. 21, n. 1, p. 78, 2017.

GIRISH, V.; VIJAVALAKSHMI, A. **Affordable image analysis using NIH Image/Image J**. Indian J Cancer, p. 41–47, 2004.

GRISHAGIN, I. V. **Automatic cell counting with ImageJ**. Analytical Biochemistry, v. 473, p. 63–65, 2015.

GUIRAO, X. et al. **Recommendations in the empiric anti-infective agents of intra-abdominal infection**. Cirugía española, v. 87, n. 2, p. 63–81, 2010.

JENSEN, L. D.; MARCHANT, D. J. **Emerging pharmacologic targets and treatments for myocarditis**. Pharmacology & Therapeutics, v. 161, p. 40–51, maio 2016.

KAPAN, S. et al. **Management of acute appendicitis in pregnancy**. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg, v. 19, n. 1, p. 20–24, 2013.

KHALIL, A. et al. **Brain abnormalities and neurodevelopmental delay in congenital heart disease** : systematic review and meta-analysis. Ultrasound Obstet Gynecol. V. 43:14–24, 2014.

LEASK, A. **Getting to the heart of the matter: New insights into cardiac fibrosis**. Circulation Research, v. 116, n. 7, p. 1269–1276, 2015.

LEVY, M. et al. , SCCM/ ESICM/ACCP/ATS/SIS **International Sepsis Definitions Conference**. Critical Care Medicine, v. 31, n. 4, p. 1250–6, 2003.

LIPCSEY, M. et al. **Abdominal Septic Shock - Endotoxin Adsorption Treatment (ASSET) - endotoxin removal in abdominal and urogenital septic shock with the Alteco® LPS Adsorber**: study protocol for a double-blinded, randomized placebo-controlled trial. Trials, v. 17, n. 1, p. 587, 8 dez. 2016.

MAJNO G. **The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis)**. *J Infect Dis*, v. 163, p. 937–945, 1991.

MCVICKER, B. L.; BENNETT, R. G. **Novel Anti-fibrotic Therapies**. *Frontiers in Pharmacology*, v. 8, p. 1–21, 31 maio 2017.

MEDZHITOV, R. **Toll-like Receptors and Innate Immunity**. *Nat Rev Immunol*, v. 1, n. 2, p. 135–145, 2001.

MILLEA, P. J. **N-acetylcysteine: multiple clinical applications**. *American Family Physician*, v. 80, n. 3, p. 265–9, 1 ago. 2009.

NERY, D.; GADELHA, B.; BRANDT, C. T. **Severe autogenously fecal peritonitis in Wistar rats with permanent bilateral carotid**. *Acta Cirúrgica Brasileira / Sociedade Brasileira para Desenvolvimento Pesquisa em Cirurgia*, v. 29, n. 2, p. 76–81, 2014.

NEVES, J. S. et al. **Acute myocardial response to stretch: What we (don't) know**. *Frontiers in Physiology*, v. 6, n. JAN, p. 1–11, 2016.

PARKER, S. J.; WATKINS, P. E. **Experimental models of Gram-negative sepsis**. *Br J Surg*. 2001 Jan;88(1):22-30. V. 88, n. 1, p. 22–30, 2001.

POLLACK, A. et al. **Viral myocarditis—diagnosis, treatment options, and current controversies**. *Nature Reviews Cardiology*, v. 12, n. 11, p. 670–680, 21 jul. 2015.

ROCHWERG, B. et al. **Corticosteroids in sepsis: an updated systematic review and meta-analysis (protocol)**. *BMJ open*, v. 7, n. 6, p. e016847, 30 jun. 2017.

RUBATTU, S.; TRIPOSKIADIS, F. **Resetting the neurohormonal balance in heart failure (HF): the relevance of the natriuretic peptide (NP) system to the clinical management of patients with HF**. *Heart Failure Reviews*, v. 22, p. 1–10, 2017.

SADRAEI-MOOSAVI, S.-M.; NIKHBAKHS, N.; DARZI, A. A. **Postoperative antibiotic therapy after appendectomy in patients with non-perforated appendicitis**. *Caspian Journal of Internal Medicine*, v. 8, n. 2, p. 104–107, 2017.

SARTELLI, M. et al. **The management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections**. *World Journal of Emergency Surgery: WJES*, v. 12, p. 29, 2017.

SCHOEN, F. O Coração. In: KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. (Eds.). **Bases Patológicas das Doenças**. Sétima ed. [s.l.] Elsevier LTda., 2005. p. 584–650.

SILVA, J. R. DE O.; ROCHA, R. F. **Efeitos de cloridrato de tetraciclina em fetos de ratas tratadas com o antibiótico**. *Revista de Odontologia*, v. 24, n. 1, p. 109–115, 1995.

SILVA, M. C. R. et al. **Análise histomorfométrica dos cardiomiócitos e deposição de colágeno no músculo cardíaco de ratas ooforectomizadas**. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 36, n. 3, p. 216–220, 2016.

SINGER, M. et al. **The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3)**. JAMA, v. 315, n. 8, p. 801–810, 23 fev. 2016.

SNYDER, C. C. et al. **Severe Sepsis And Septic Shock In Pregnancy: Indications For Delivery And Maternal And Perinatal Outcomes**. The journal of maternal-fetal & neonatal medicine: the official journal of the European Association of Perinatal Medicine, the Federation of Asia and Oceania Perinatal Societies, the International Society of Perinatal Obstetricians, v. 26, n. 5, p. 503–6, 2013.

SOLOMKIN, J. S. et al. **Guidelines for the Selection of Anti-infective Agents for Complicated Intra-abdominal Infections**. Clinical Infectious Diseases, v. 37, n. 8, p. 997–1005, 2003.

STEINBACH, C. L. et al. **Spectrum Adequacy of Antibiotic Regimens for Secondary Peritonitis: A Retrospective Analysis in Intermediate and Intensive Care Unit Patients**. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, v. 14, n. 1, p. 48, 2015.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. **Pattern recognition receptors and inflammation**. Cell, v. 140, n. 6, p. 805–20, 19 mar. 2010.

THOMPSON, M. M.; KUDLA, A. B.; CHRISHOLM, C. B. **Appendicitis During Pregnancy with a Normal MRI**. Western Journal of Emergency Medicine. v. 15, 652-654, 2014.

TORIO, C. M.; ANDREWS, R. M. **National Inpatient Hospital Costs: The Most Expensive Conditions by Payer, 2011: Statistical Brief #160**. [s.l: s.n.].

TUFIK, S. ET AL. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2004. <http://www.usp.br/bioterio/Links.asp>

URBAŃSKA, J.; KAREWICZ, A.; NOWAKOWSKA, M. **Polymeric delivery systems for dexamethasone**. Life Sciences, v. 96, n. 1–2, p. 1–6, 2014.

VAN DILLEN, J. et al. **Maternal sepsis: epidemiology, etiology and outcome**. Current Opinion in Infectious Diseases, v. 23, n. 3, p. 249–254, jun. 2010.

VINCENT, J.-L.; DE BACKER, D. **Circulatory Shock**. The New England Journal of Medicine, v. 369, n. 18, p. 1726–34, 31 out. 2013.

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

WU, X.-Y. et al. **N-acetylcysteine reduces oxidative stress, nuclear factor- κ B activity and cardiomyocyte apoptosis in heart failure**. Molecular medicine reports, v. 10, n. 2, p. 615–24, ago. 2014.

ZAKI, S. M. et al. **Protective Role of N-Acetylcysteine on Isoprenaline-Induced Myocardial Injury: Histological, Immunohistochemical and Morphometric Study.** *Cardiovascular Toxicology*, 24 abr. 2017.

ZEIDLER-ERDELY, P. C. et al. **Comparison of cell counting methods in rodent pulmonary toxicity studies:** automated and manual protocols and considerations for experimental design. *Inhal Toxicology*, v. 1848, n. 9, p. 410–420, 2016.

ZHANG, W. et al. **Cardiac Fibroblasts Contribute to Myocardial Dysfunction in Mice with Sepsis:** The role of NLRP3 inflammasome activation. *PLoS ONE*, v. 9, n. 9, 2014.

APÊNDICE

Este artigo está formatado conforme as normas dos "Arquivos Brasileiros de Cardiologia".

Alterações Histomorfométricas Cardíacas em Conceptos de Ratas Wistar submetidas à Peritonite Fecal Autógena e Administração de Moxifloxacina - Dexametasona

Cardiac Histomorphometric Findings in Wistar Rats Concepts due to Autogenic fecal Peritonitis and Administration of Moxifloxacin - Dexametason

Autores:

Gustavo Ithamar Souto Maior <mailto:gustavoithamar@gmail.com>

Guilherme Veras Mascena <mailto:guilherme.mascena@globo.com>

Alexandre Rolim da Paz <mailto:rolimpaz@yahoo.com>

Carlos Teixeira Brandt <mailto:carlosbrandt@bol.com.br>

Carlos Alberto Figueiredo Filho <mailto:carlosfig@globo.com>

Líbia Cristina Rocha Vilela Moura <mailto:mouralibia@gmail.com>

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG)

RESUMO

Fundamento: Peritonite fecal autógena em ratas Wistar determina alterações oculares e encefálicas na prole as quais podem persistir na vida adulta. Porém, a infecção peritoneal materna como determinante de alterações cardíacas na prole adulta é incerta.

Objetivos: Investigar a existência de alterações histomorfométricas cardíacas em ratos Wistar cujas mães foram submetidas à peritonite fecal autógena no período máximo da organogênese, e, se é possível, impedir tais alterações com a administração intravenosa da associação de moxifloxacina e dexametasona

Métodos: Foi realizado estudo prospectivo, analítico, histomorfométrico em 29 corações de ratos Wistar de quatro meses de idade os quais foram divididos em: Grupo Controle Negativo (GCN), com nove animais, filhos de rata sem peritonite induzida durante a gestação; Grupo Controle Positivo (GCP), com 10 animais filhos de rata com peritonite fecal induzida na gestação que não recebeu tratamento algum e Grupo Intervenção (GI), com 10 animais cuja mãe recebeu tratamento com moxifloxacina e dexametasona 24h após a indução da peritonite fecal no período gestacional. Nos grupos GCP e GI, a peritonite materna foi induzida com administração de 4ml/Kg de suspensão fecal autógena a 10% filtrada, na cavidade abdominal, no quadrante ilíaco esquerdo, no 9º dia de gravidez.

Resultados: Foi observado contagem nuclear significativamente maior no GI em comparação ao GCP ($p=0.0016$) e no GCN em comparação ao GCP ($p=0.0380$). Não houve diferença significativa na contagem nuclear entre o GCN e o GI.

Conclusões: A peritonite fecal autógena induzida em ratas Wistar prenhas determinou alterações miocárdicas na prole adulta. Estas alterações puderam evitadas com a administração intravenosa de moxifloxacina e dexametasona 24h após o insulto infeccioso materno.

Palavras-Chave: Peritonite; ratos; miocárdio; gravidez

ABSTRACT

Background: Autogenic fecal peritonitis in Wistar rats determines ocular and encephalic changes in offspring that may persist in adult life. However, maternal peritoneal infection as a determinant of cardiac changes in adult animals is uncertain.

Objectives: To investigate the existence of cardiac histomorphometric changes in Wistar rats whose mothers underwent autogenic fecal peritonitis in the maximum period of organogenesis and, if possible, to prevent such changes with the intravenous administration of the combination of moxifloxacin and dexamethasone

Methods: A prospective, analytical, histomorphometric study was performed on 29 hearts of four-month-old Wistar rats, divided into: Negative Control Group (NCG) enrolling nine animals, rat offspring without peritonitis induced during pregnancy; Positive Control Group (PCG) with 10 female offspring with fecal induced peritonitis in gestation that received no treatment and Intervention Group (IG) with 10 animals whose mother received moxifloxacin and dexamethasone treatment 24 hours after induction of fecal peritonitis in the gestational period. In the PCG and IG groups, maternal peritonitis was induced by administration of 4 ml/kg of 10% autogenic fecal suspension filtered into the abdominal cavity in the left iliac quadrant on the 9th day of pregnancy.

Results: Significantly higher nuclear counts were observed in IG compared to PCG ($p = 0.0016$) and in NCG compared to PCG ($p = 0.0380$). There was no significant difference in nuclear counts between NCG and IG.

Conclusions: Induced autogenic fecal peritonitis in pregnant Wistar rats determined myocardial changes in adult offspring. These changes could be avoided with the intravenous administration of moxifloxacin and dexamethasone 24 hours after the maternal infectious insult.

Keywords: Peritonitis; rats; myocardium; pregnancy

INTRODUÇÃO

A doença cardíaca congênita é a principal anomalia detectada ao nascimento e está associada à elevada morbimortalidade na infância e na adolescência (1). A elucidação de mecanismos subjacentes ao desenvolvimento cardíaco é fundamental para a identificação de anormalidades durante a organogênese, com o objetivo de adoção de estratégias de intervenção precoce (2).

A associação de anomalias congênitas oculares e encefálicas, em conceptos com endotoxemia bacteriana materna, já foi demonstrada experimentalmente (3). A indução de peritonite em ratas no nono (9º) dia de prenhez, com suspensão fecal autógena filtrada a 10%, na dosagem de 4ml/kg, associou-se ao surgimento de encefalomalácia e catarata. Por outro lado, a intervenção com moxifloxacina 40mg/kg e dexametasona 0,2mg/kg intraperitoneal (IP), 48 a 72h após a indução da infecção materna, mostrou-se eficaz na prevenção do aparecimento dessas complicações (4). Esta pesquisa, contudo, não avaliou as repercussões histológicas cardiovasculares do insulto infeccioso materno nos conceptos das ratas infectadas, nem utilizou a via intravenosa (IV) para a terapia antimicrobiana a qual é a mais utilizada na prática clínica, em casos de peritonite em grávidas

A presente pesquisa se propõe a investigar a histomorfometria cardíaca em conceptos de ratas Wistar com quatro meses de idade, cujas mães foram submetidas à peritonite com suspensão fecal autógena filtrada a 10%, na fase precoce da gravidez (nono dia), no período máximo da organogênese cardíaca fetal e, investigar o impedimento ou o comportamento das alterações cardíacas com a administração intravenosa da associação de moxifloxacina e dexametasona 24h após a indução da infecção abdominal materna.

MÉTODOS

Desenho Experimental

Estudo prospectivo, longitudinal, analítico e de intervenção, desenvolvido no Laboratório de Pesquisas Experimentais da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG), Paraíba.

Animais

Foram incluídas 03 ratas adultas, jovens, de aproximadamente 03 meses de idade prenhas, e peso de 300 gramas, adultas, da raça Wistar (*Rattus Novergicus Albinus Rodentia Mammalia*), sem qualquer doença ou agravo, provenientes da colônia de criação do biotério da FCM-CG e 29 ratos jovens de 04 meses de idade (conceptos das ratas adultas), da mesma espécie.

Os ratos jovens foram divididos em 03 grupos: **Grupo Controle Negativo - GCN** - filhos de ratas sem peritonite induzida; **Grupo Controle Positivo - GCP** - filhos de ratas que tiveram peritonite fecal autógena induzida e que não receberam tratamento e o **Grupo Intervenção - GI** - filhos de ratas com peritonite fecal autógena induzida e, que foram tratadas com a administração intravenosa da associação de moxifloxacina (40mg/Kg) e dexametasona (0,2mg/Kg) 24h após a indução do insulto infeccioso materno.

Foram excluídos os animais que no momento da indução da peritonite, apresentaram sinal de qualquer fluido orgânico no aspirado da cavidade peritoneal, evidências de processo inflamatório nas fezes, incluindo pus ou sangue, ou que desenvolveram desnutrição.

Cuidado com os animais

Os ratos receberam cuidados em concordância com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório”, respeitando-se os “Princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).” O projeto de investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento/Faculdade de Medicina de Campina Grande (CESED/FCM-CG).

As ratas prenhas, infectadas (02) e não infectada (01), foram alojadas em gaiolas de polipropileno com dimensão de 430x430x200 mm (CxLxA) e mantidas em ambiente ventilado e com temperatura controlada ($24\pm 1^{\circ}\text{C}$). As 24 horas foram divididas em dois ciclos: luz de 12h/escuridão de 12h. Todos os animais tiveram livre acesso à alimentação (ração balanceada própria para ratos Wistar) e água *ad libitum*.

Diariamente, as ratas foram monitoradas e observadas pela mesma médica veterinária e submetidas à aferição do peso corporal, frequência respiratória e temperatura. Também foram avaliadas quanto à quantidade e coloração dos pêlos com o objetivo de detectar precocemente sinais de infecção e observadas quanto ao nascimento dos filhotes, que ocorreu aproximadamente 21 dias após a prenhez. De cada rata nasceram 10 filhotes (cinco machos e cinco fêmeas). Hum concepto feminino, nascido do grupo GCP, veio a óbito. Todos os demais

sobreviveram e apresentaram bom desenvolvimento. Após o período de três semanas da amamentação, os filhotes de cada uma das três ratas foram separados, das suas mães e, entre si, por sexo.

Indução da Peritonite nas Ratas Prenhas

Foram utilizadas três ratas Wistar adultas prenhas sem qualquer doença ou agravo, provenientes da colônia de criação do biotério da Faculdade de Ciências Médica de Campina Grande (FCM-CG). Em duas destas ratas foi induzida peritonite fecal com administração de 4ml/Kg de suspensão fecal autógena a 10% filtrada, na cavidade abdominal, no quadrante ilíaco inferior esquerdo, no 9º dia de gravidez (Fotografia 1). A suspensão fecal foi obtida a partir de dois gramas de fezes coletadas de cada rata. Esta amostra foi dissolvida em 20 ml de solução salina a 0,9%, homogeneizada e filtrada com uma gaze para remoção das grandes partículas.

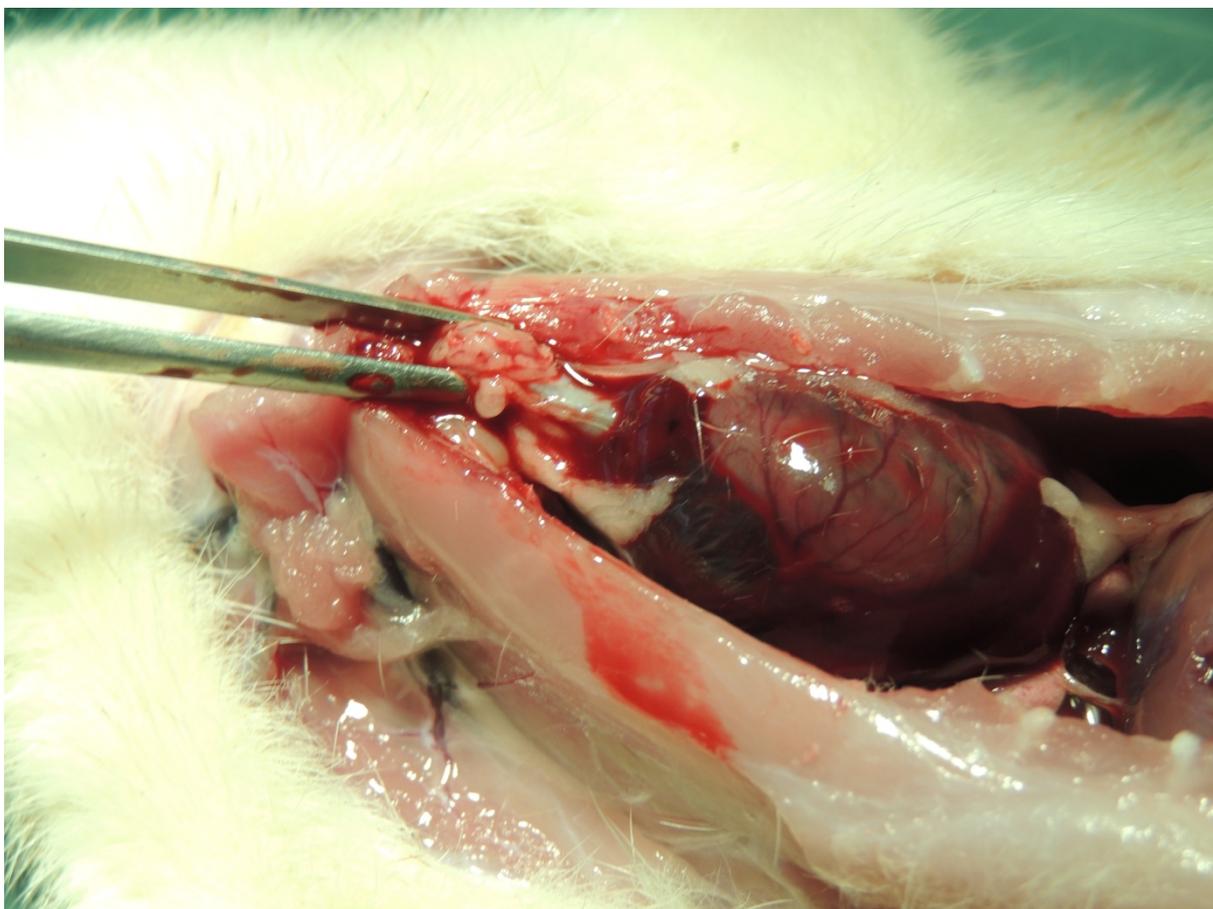


Fotografia 1 - Indução de peritonite fecal

Injeção de 4 ml/Kg de suspensão fecal autógena a 10% filtrada no quadrante ilíaco esquerdo de rata Wistar no 9º dia de gravidez

Remoção dos corações

Aos 04 meses de idade, os animais jovens (n=29), 15 machos e 14 fêmeas, foram eutanasiados com a administração intravenosa de cloridrato de ketamina, 50mg/kg, e xilazina, 10mg/kg. A cavidade torácica foi acessada por meio de incisão na linha média com lâmina de bisturi fria nº 15. As demais camadas da parede torácica e o osso esterno foram seccionados com tesoura cirúrgica. O coração e os vasos da base foram cuidadosamente retirados em bloco (Fotografia 2), embebidos em formaldeído a 10% e enviados para emblocamento em parafina e confecção das lâminas histológicas.



Fotografia 2 - Técnica de ressecção do coração

Toracotomia mediana por lâmina de bisturi fria número 15. Isolamento e retirada em bloco do coração e vasos da base com posterior colocação em formaldeído a 10% e envio para emblocamento em parafina e confecção das lâminas histológicas

Processo Histológico

Os espécimes teciduais removidos e, previamente fixados em formalina a 10% tamponada, foram submetidos a seccionamento transversal, com cortes de aproximadamente 3-5 mm de espessura, da ponta do coração para a base.

Após a lavagem em água corrente por uma hora, para retirada de possíveis precipitações da formalina, o material foi submetido a processo químico que possibilitou o enrijecimento adequado e padronizado das amostras para os cortes histológicos.

O processo químico seguiu uma sequência alcoólica para desidratação, com intuito de tornar as soluções miscíveis e evitar retração tecidual. Após a desidratação, os espécimes teciduais foram imersos em solução de xileno, que realiza a retirada do álcool, imiscível em parafina fundida, além de serem submetidos à diafanização do tecido. Em sequência, todo material tecidual foi imerso em banhos sucessivos de parafina fundida à 60-63°C, com o objetivo de retirar todo xileno e endurecer o tecido para os cortes histológicos. Concluiu-se o processamento químico tecidual e todo material foi encaminhado para a inclusão e formação de blocos histológicos através de moldes pré-aquecidos.

Com o material imerso no molde com a parafina fundida, esse foi resfriado e retirado do molde, formando os chamado blocos de parafina histológico que foram resfriados à baixa temperatura, visando um reforço na solidificação da parafina e melhor desbaste do bloco durante o processo de microtomia. Os blocos foram dispostos em freezer com temperatura -3°C, segundo ordem das amostras, sobre formas de gelos, e mantidos por pelo menos meia hora até disponibilidade de temperatura para início do serviço.

As lâminas histológicas foscas foram identificadas e, a partir do bloco de parafina desbastado e resfriado, fitas de cortes histológicos seriados foram realizados, com o objetivo da montagem de uma lâmina para análise. A espessura dos cortes obtidos foi de 3-4 micrômetros. Os cortes já dispostos à lâmina foram mantidos no suporte de madeira disponível sobre a bancada por cerca de 20 a 30 minutos. Retirou-se o excesso de parafina das lâminas “recém-pescadas”, por meio de calor, numa estufa de esterilização e secagem calibrada à temperatura entre 60-65°C cerca de 30 minutos.

Posteriormente, foi realizado o preparo (submissão de substâncias químicas) do corte histológico para coloração em Hematoxilina e Eosina. Todo esse processo foi realizado em equipamento automático para coloração de lâminas histológicas, modelo ST5010 Leica. Após concluir a coloração, seguiu-se a montagem da lâmina para posterior análise após breve período de secagem à temperatura ambiente. As lâminas do coração foram observadas ao microscópio,

com magnificação de 400x. Cortes representativos de cada seção do ventrículo esquerdo - parede livre - de cada rato, dos respectivos grupos, foram selecionadas randomicamente para análise.

Histomorfometria.

As análises histomorfométricas foram realizadas com o auxílio de um microscópio Leica DM 2000 (lente de ampliação x40) ligado a uma câmara digital (Leica DFC 425, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e acoplados a um computador equipado com um programa analisador de imagem. Nesta pesquisa, as medidas histomorfométricas foram realizadas, empregando-se o software de análise digital de imagens Image J 1.51, Java 1.8.0 _ 101 (64-bit). Este programa é amplamente utilizado em pesquisas científicas envolvendo quantificação e análise de imagens (5–10), com plataforma de programação baseada na linguagem Java. De forma sistemática, todas as fotomicrografias foram processadas segundo o mesmo algoritmo. Inicialmente, a fotomicrografia foi convertida em 8-bits. Em seguida, na aba "processos", imagem foi tornada binária. Os dados de cada imagem (número, tamanho e área nuclear) foram obtidos através do plugin "Nucleus Counter". O comando "Threshold" foi utilizado para separar o fundo da imagem das partículas de interesse. Determinou-se um ponto de corte para todas as partículas com uma área inferior a 100 pixels ou superior a 5000 pixels. Não impusemos restrições à forma. O ponto de corte eliminou ruídos e eventuais células coalescidas.

Análise dos Dados

Os resultados foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism (Prism 7 for Mac OS X, Version 7.0c, March 1, 2017 - GraphPad Software, Inc., USA). Os parâmetros quantitativos foram expressos por suas médias e desvio-padrão e representados em gráficos box-plot. Cada parâmetro foi testado quanto à distribuição gaussiana utilizando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a análise comparativa das múltiplas médias entre os grupos que passaram no teste da normalidade foi utilizado o one-way ANOVA e o pós-teste de comparações múltiplas de Tukey. As comparações de médias não paramétricas foram realizadas com o teste de Kruskal-Wallis. O pós-teste de Dunn foi utilizado para identificar quais grupos diferiram entre si. Valores de $p < 0.05$ foram utilizados para rejeitar a hipótese de nulidade

RESULTADOS DA HISTOMORFOMETRIA

Contagem nuclear

A contagem nuclear diferiu entre os grupos (Kruskal-Wallis - $p= 0,0015$) e foi significativamente maior no GCN quando comparado ao GCP ($p=0,0380$). No grupo GI, também foi evidenciado contagem nuclear maior quando comparado GCP ($p=0,0016$). Não houve diferença significativa entre grupos GCN e GI. Tabelas 1A e 1B e gráfico 1 .

Tabela 1A. Contagem nuclear - Estatística Descritiva

	Sem Peritonite (GCN)	Petionite não tratada (GCP)	Grupo Intervenção (GI)
Mínimo	584	526	429
Percentil 25%	769,5	594	702,3
Mediana	833	727	1103
Percentil 75%	1018	746	1525
Máximo	1264	1110	2136
Médio	894,2	700,1	1150
Desvio Padrão	211	137,7	503,9
Erro Padrão da Média	58,51	31,59	112,7

Teste de Kruskal-Wallis ($p=0,0015$)

Tabela 1B. Contagem nuclear - Análise Estatística

Teste de Comparações Múltiplas de Dunn	Significante?	Valor Ajustado de P
Sem Peritonite (GCN) vs. Peritonite não tratada (GCP)	sim	0,0380
Sem Peritonite (GCN) vs. Grupo Intervenção (GI)	não	>0,9999
Peritonite não tratada (GCP) vs. Grupo Intervenção (GI)	sim	0,0016

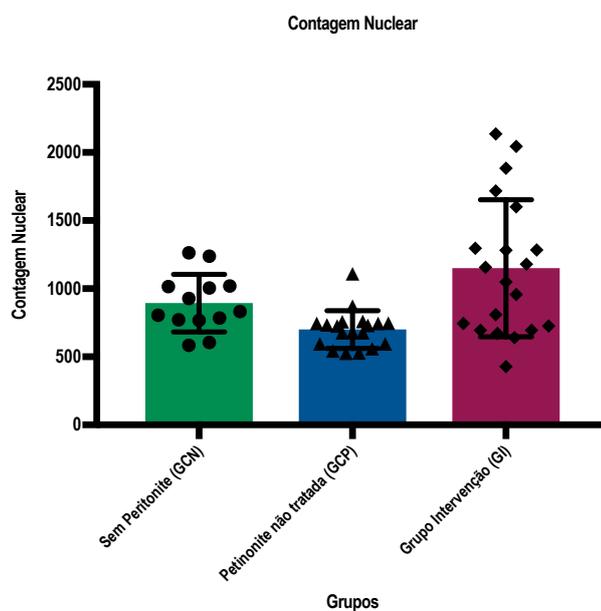


Gráfico 1. Contagem nuclear por campo avaliado nos grupos em investigação

Área ocupada pelos núcleos

O percentual da área da fotomicrografia ocupada pelos núcleos diferiu entre os grupos (Kruskal-Wallis - $p=0,0007$) e foi significativamente maior no GCN quando comparado ao GCP ($p=0,0448$) e no grupo GI quando comparado ao GCP ($p=0,0006$). Não houve diferença significativa entre grupos GCN e GI. Tabelas 2A e 2B e gráfico 2.

Tabela 2A. Porcentagem da área da fotomicrografia ocupada pelos núcleos - Estatística Descritiva

	Sem Peritonite (GCN)	Petionite não tratada (GCP)	Grupo Intervenção (GI)
Mínimo	2,426	2,558	2,001
Percentil 25%	4,161	3,090	3,776
Mediana	4,469	3,578	5,852
Percentil 75%	5,737	3,893	9,794
Máximo	8,617	6,107	12,717
Médio	4,872	3,620	6,920
Desvio Padrão	1,606	0,7666	3,426
Erro Padrão da Média	4,454	0,1759	0,7661

Teste de Kruskal-Wallis($p = 0,0007$)

Tabela 2B. Porcentagem da área da fotomicrografia ocupada pelos núcleos - Análise Estatística

Teste de Comparações Múltiplas de Dunn	Significante?	Valor Ajustado de P
Sem Peritonite (GCN) vs. Peritonite não tratada (GCP)	sim	0,0448
Sem Peritonite (GCN) vs. Grupo Intervenção (GI)	não	>0,9999
Peritonite não tratada (GCP) vs. Grupo Intervenção (GI)	sim	0,0006

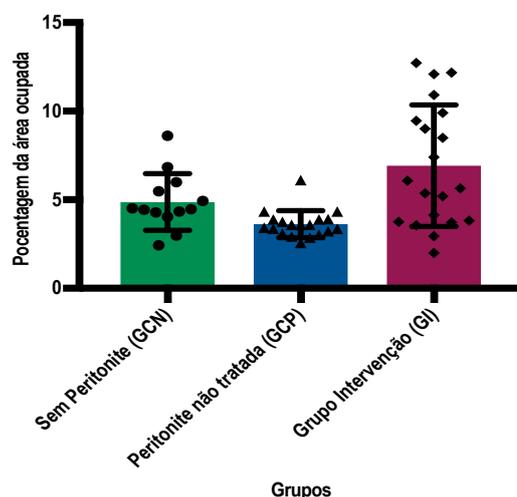


Gráfico 2. Área da fotomicrografia ocupada pelos núcleos nos grupos em investigação

Tamanho nuclear

A contagem dos núcleos celulares diferiu entre os grupos (ANNOVA - $p=0,0207$). Esta variável foi significativamente maior no GI quando comparado ao GCP ($p=0,0170$). Não houve

diferença significativa entre grupos GCN e GI, nem entre os grupos GCN e GCP. Tabelas 3A e 3B e gráfico 3.

Tabela 3A. Tamanho Nuclear (em pixels) - Estatística Descritiva

	Sem Peritonite (GCN)	Peritonite não tratada (GCP)	Grupo Intervenção (GI)
Mínimo	380584	472049	485281
Percentil 25%	497572	509866	541215
Mediana	577524	540007	626429
Percentil 75%	623857	595697	678605
Máximo	719346	616406	769391
Médio	570701	546566	617717
Desvio Padrão	100882	45246	85052
Erro Padrão da Média	27980	10380	19018

ANNOVA (p=0.0207)

Tabela 3B. Tamanho Nuclear - Análise Estatística

Teste de Comparações Múltiplas de Tukey	Significante?	Valor Ajustado de P
Sem Peritonite (GCN) vs. Peritonite não tratada (GCP)	não	0,6665
Sem Peritonite (GCN) vs. Grupo Intervenção (GI)	não	0,2167
Peritonite não tratada (GCP) vs. Grupo Intervenção (GI)	sim	0,0170

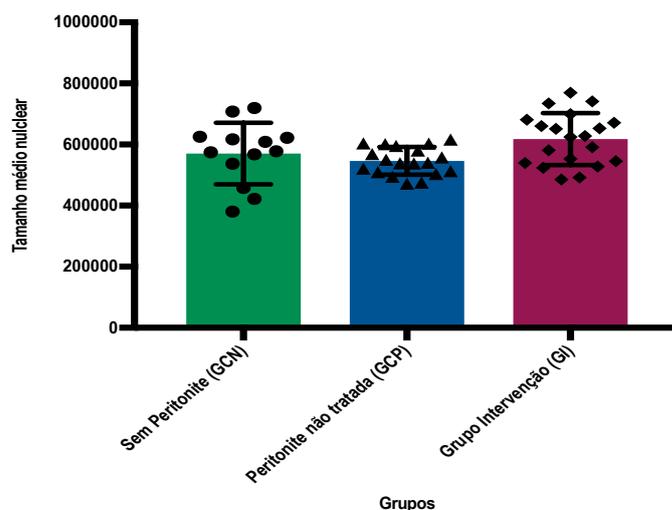


Gráfico 3. Tamanho nuclear em pixels nos grupos em investigação

DISCUSSÃO

Alterações histológicas cardíacas em ratos Wistar têm sido demonstradas em modelos que simulam o infarto (26). Entretanto, evidências vinculando infecção peritoneal materna, experimentalmente induzida, à repercussões cardiovasculares fetais são escassas.

No presente estudo, foi utilizado o software ImageJ para realizar a análise histomorfométrica e investigar as alterações cardíacas fetais ocasionadas pela endotoxemia

bacteriana materna em ratas Wistar prenhas. A contagem nuclear e o percentual de área ocupada núcleos foi significativamente maior no GCN em comparação ao GCP e no GCP que no GI, apontando para uma redução na densidade nuclear e maior atividade apoptótica, determinada pela peritonite materna. Diante destes dados, a ausência de diferença significativa na contagem nuclear entre os grupos GI e GCN indicaram a eficácia da terapêutica (moxifloxacina e dexametasona), dose (40mg/Kg e 0,2 mg/Kg, respectivamente) e da via de acesso (intravenosa) utilizada no GI, para debelar o processo infeccioso materno. Não foi encontrada diferença significativa no tamanho nuclear do GCN quando comparado ao GCP ou ao GI. Contudo, o tamanho nuclear no GCP foi menor que no GI. É possível que a maior dispersão do GCN (amplitude de 190.117) em comparação com o GCP (amplitude de 144.357), diante de uma amostra pequena, justifique a ausência de diferença estatística significativa entre os grupos evidenciada ao teste de comparação múltipla de Tukey ($p=0,6665$).

Em estudos experimentais com murinos a idade dos animais é crucial e tão importante quanto o peso, para se avaliar uma intervenção terapêutica. As três ratas prenhas da nossa pesquisa apresentavam idades semelhantes, aproximadamente 12 semanas de idade. Neste período a resposta à infecção não está comprometida pelo envelhecimento. Em humanos, observa-se avanço da idade materna. Neste grupo, as taxas de parto por cesariana, morte fetal e morbimortalidade neonatal são elevadas. A incidência e taxa de mortalidade, devido à sepse materna, têm aumentado na última década. Nos EUA a taxa de mortalidade materna aumentou de 12 por 100.000 nascidos vivos, em 1990, para 14 por 100.000 nascidos vivos, em 2015 (28,29). A imunosenescência, declínio do sistema imunológico com o aumento da idade, é um dos fatores que justificam o aumento da mortalidade materna nos últimos anos. A relevância destes dados fez com que, em 2000, a Organização das Nações Unidas (ONU), determinasse que a redução da mortalidade materna em 75% em 15 anos, seria um dos principais objetivos para o milênio. Esta meta não foi alcançada pela maioria dos países industrializados (30). Embora os resultados desta pesquisa tenham sido obtidos em filhotes adultos de ratas jovens com peritonite, é possível que, as alterações cardíacas encontradas sejam mais pronunciadas em animais de maior idade.

Diante da sepse materna, os recém-nascidos apresentam altas taxas de eventos adversos. A infecção do líquido amniótico pode ocorrer em qualquer fase da gestação, porém, é mais frequente próximo ao parto ou no puerpério. Os germes aeróbios e anaeróbios, gram-positivos e negativos, constituem a flora mais comumente encontrada - a flora mista (18). Na sepse neonatal tardia observa-se alterações da frequência cardíaca, variabilidade reduzida da frequência cardíaca e desacelerações, muitas vezes até 12 a 24h antes do diagnóstico clínico de sepse. A análise da variabilidade da frequência cardíaca normalmente é atribuída a uma disfunção

das células do nó sinusal ocasionada pela liberação de citocinas e alterações nos processos de transdução celular, ou à alterações no sistema nervoso central e autônomo, com consequente comprometimento do circuito de controle de feedback para a variação da frequência cardíaca (31). Contudo, a redução da contagem e área nuclear ocupada no GCP em comparação ao GCN, traz à tona a hipótese que, da mesma forma como se evidenciou em cardiomiócitos da parede livre do ventrículo esquerdo na prole adulta de ratas que tiveram peritonite induzida no período da organogênese, possa haver alterações histomorfométricas no sistema de condução cardíaco em qualquer outro local do coração. Nesta situação, o nó sinusal, passaria a exercer um papel ativo na gênese das arritmias. As alterações da variabilidade da frequência cardíaca seriam causadas diretamente pelo acometimento do nó sinusal pela infecção materna. Brandt e cols. demonstraram a associação de infecção peritoneal em ratas prenhas com o surgimento de alterações encefálicas (encefalomalácia) e oculares (catarata) (3). A semelhança do grau de diferenciação das células neuronais encefálicas com as células do sistema de condução cardíaco reforça a suspeita de que os achados histomorfométricos cardíacos da parede livre do ventrículo esquerdo, evidenciados nesta pesquisa, possam ser estendidos ao tecido de condução cardíaco.

Os resultados encontrados favorecem um melhor entendimento da repercussão cardíaca fetal, ocasionada pela translocação bacteriana da cavidade abdominal materna para a circulação sanguínea fetal. Em um cenário de infecção experimental, envolvendo o binômio materno-fetal, esta pesquisa, de forma inédita, mostrou que o tratamento precoce da infecção peritoneal materna com antibiótico associado a corticoide, pela via intravenosa, que é a mais utilizada na prática clínica diária, é eficaz em prevenir alterações cardíacas fetais.

CONCLUSÕES

Em ratas adultas prenhas, submetidas a peritonite com 4ml/Kg de solução fecal autógena a 10% filtrada, foi observado, a partir da análise histomorfométrica com o software ImageJ, redução significativa na contagem numérica nuclear e no percentual da área ocupada pelos núcleos no tecido cardíaco na prole adulta. Estas alterações foram evitadas com administração precoce e intravenosa de moxifloxacina 40mg/Kg e dexametasona 0,2mg/Kg. Não foi observada diferença significativa no tamanho nuclear ao compararmos os grupos GCP com GCN, porém, observamos que o tamanho nuclear no GI foi maior que no GCP.

Referências

1. Khalil A, Suff N, Thilaganathan B, Hurrell A, Cooper D, Carvalho JS. Brain abnormalities and neurodevelopmental delay in congenital heart disease : systematic review and meta-analysis. 2014;(May 2013):14–24.
2. Chen H, Vanburen V. A Provisional Gene Regulatory Atlas for Mouse Heart Development. 2014;9(1).
3. Brandt CT, Melo MCSC, Gadelha DNB, Gadelha NNCB, Oliveira TKB, Falcão MPMM. Brain damage and congenital cataract due to autogenously fecal peritonitis in pregnant Wistar rats. *Acta Cir Bras*. 2014;29(10):681–7.
4. Nery D, Gadelha B, Brandt CT. MODELS , BIOLOGICAL Severe autogenously fecal peritonitis in Wistar rats with permanent bilateral carotid. *Acta Cir Bras*. 2014;29(2):76–81.
5. Daunoravicius D, Besusparis J, Zurauskas E, Laurinaviciene A, Bironaite D, Pankuweit S, et al. Quantification of myocardial fibrosis by digital image analysis and interactive stereology. *Diagn Pathol*. 2014;9(1):114.
6. Lousinha A, Antunes E, Borrecho G, Oliveira MJ, Brito J, dos Santos JM. Histomorphometric evaluation of the small coronary arteries in rats exposed to industrial noise. *Int J Mol Sci*. 2015;16(5):10095–104.
7. Rossini KF, Andrea De Oliveira C, Rebelato J, Augusto M, Esquisatto M, Catisti R. Artigo Original Restrição Proteica Gestacional Aumenta Níveis de RNAm de Conexina 43 no Coração de Filhotes Machos Adultos Gestational Protein Restriction Increases Cardiac Connexin 43 mRNA levels in male adult rat offspring. *Arq Bras Cardiol*. 2017; 109(1):63-70
8. Grishagin I V. Automatic cell counting with ImageJ. *Anal Biochem*. 2015;473:63–5.
9. Schneider C, Rasband W, Eliceiri K. NIH Image to Image J: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 2012;7:671–5.
10. Girish V, Vijavalakshmi A. Affordable image analysis using NIH Image/Image J. *Indian J Cancer*. 2004;41–7.
11. Sartelli M, Chichom-Mefire A, Labricciosa FM, Hardcastle T, Abu-Zidan FM, Adesunkanmi AK, et al. The management of intra-abdominal infections from a global perspective: 2017 WSES guidelines for management of intra-abdominal infections. *World J Emerg Surg*. 2017;12:29.
12. Sadraei-Moosavi S-M, Nikhbakhsh N, Darzi A-A. Postoperative antibiotic therapy after appendectomy in patients with non-perforated appendicitis. *Casp J Intern Med*. 2017;8(2):104–7.
13. van Dillen J, Zwart J, Schutte J, van Roosmalen J. Maternal sepsis: epidemiology, etiology and outcome. *Curr Opin Infect Dis [Internet]*. junho de 2010;23(3):249–54.
14. Snyder CC, Barton JR, Habli M, Sibai BM. Severe sepsis and septic shock in pregnancy: indications for delivery and maternal and perinatal outcomes. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2013;26(5):503–6.
15. Barton JR, Sibai BM. Severe Sepsis and Septic Shock in Pregnancy. *Obstet Gynecol*. setembro de 2012;120(3):689–706. 201209000-00029
16. Kapan S, Bozkurt M a, Turhan a N, Gonenc M, Alis H. Management of acute appendicitis

- in pregnancy. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2013;19(1):20–4.
17. Fernández-Pérez ER, Salman S, Pendem S, Farmer JC. Sepsis during pregnancy. *Crit Care Med* [Internet]. outubro de 2005;33(10 Suppl):S286-93.
 18. Born D, Souza JAM, Andrade J, Franken RA. Cuidados Intensivos na Gestação Complicada. *Conduas no Paciente Grave. Third.* 2006. p. 1909–14.
 19. Pollack A, Kontorovich AR, Fuster V, Dec GW. Viral myocarditis—diagnosis, treatment options, and current controversies. *Nat Rev Cardiol.* 21 de julho de 2015;12(11):670–80.
 20. Caforio ALP, Pankuweit S, Arbustini E, Basso C, Gimeno-Blanes J, Felix SB, et al. Current state of knowledge on aetiology, diagnosis, management, and therapy of myocarditis: A position statement of the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2013;34(33):2636–48.
 21. Bracamonte-Baran W, Čiháková D. Cardiac Autoimmunity: Myocarditis. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2017;1003:187–221.
 22. Escher F, Kühl U, Lassner D, Poller W, Westermann D, Pieske B, et al. Long-term outcome of patients with virus-negative chronic myocarditis or inflammatory cardiomyopathy after immunosuppressive therapy. *Clin Res Cardiol* [Internet]. 16 de dezembro de 2016;105(12):1011–20.
 23. Jensen LD, Marchant DJ. Emerging pharmacologic targets and treatments for myocarditis. *Pharmacol Ther* [Internet]. maio de 2016;161:40–51.
 24. Caforio ALP, Malipiero G, Marcolongo R, Iliceto S. Myocarditis: A Clinical Overview. *Curr Cardiol Rep* [Internet]. julho de 2017;19(7):63.
 25. Cooper LT, Baughman KL, Feldman AM, Frustaci A, Jessup M, Kuhl U, et al. The role of endomyocardial biopsy in the management of cardiovascular disease: a scientific statement from the American Heart Association, the American College of Cardiology, and the European Society of Cardiology. Endorsed by the Heart Failure Society of. *J Am Coll Cardiol.* 6 de novembro de 2007;50(19):1914–31.
 26. Zaki SM, Abdalla IL, Sadik AO El, Mohamed EA, Kaooh S. Protective Role of N-Acetylcysteine on Isoprenaline-Induced Myocardial Injury: Histological, Immunohistochemical and Morphometric Study. *Cardiovasc Toxicol.* Springer US; 24 de abril de 2017
 27. Silva MCR, Arandas MJG, Lima-Junior NB, Aguiar-Júnior FCA, Santos KRP. Análise histomorfométrica dos cardiomiócitos e deposição de colágeno no músculo cardíaco de ratas ooforectomizadas. *Pesqui Veterinária Bras.* 2016;36(3):216–20.
 28. Chescheir NC. Enough already! *Obstet Gynecol.* janeiro de 2015;125(1):2–4.
 29. Creanga AA, Berg CJ, Syverson C, Seed K, Bruce FC, Callaghan WM. Pregnancy-related mortality in the United States, 2006-2010. *Obstet Gynecol.* janeiro de 2015;125(1):5–12.
 30. Lisonkova S, Potts J, Muraca GM, Razaz N, Sabr Y, Chan S, et al. Maternal age and severe maternal morbidity : A population-based retrospective cohort study. 2017;2:1–19.
 31. Griffin MP, O’Shea TM, Bissonette EA, Harrell FE, Lake DE, Moorman JR. Abnormal heart rate characteristics preceding neonatal sepsis and sepsis-like illness. *Pediatr Res.* junho de 2003;53(6):920–6.

Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

Fontes de Financiamento

O presente estudo foi desenvolvido com recursos financeiros do próprio autor e da Faculdade de Ciências Médica de Campina Grande - FCM-CG.

Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Gustavo Ithamar Souto Maior pela Universidade Federal de Pernambuco.

ANEXOS

ANEXO I - NORMAS DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CONFORME OS ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA

ARQUIVOS BRASILEIROS DE CARDIOLOGIA

1. Os Arquivos Brasileiros de Cardiologia (Arq Bras Cardiol) são uma publicação mensal da Sociedade Brasileira de Cardiologia, indexada no Cumulated Index Medicus da National Library of Medicine e nos bancos de dados do MEDLINE, EMBASE, LILACS, Scopus e da SciELO com citação no PubMed (United States National Library of Medicine) em inglês e português.

2. Ao submeter o manuscrito, os autores assumem a responsabilidade de o trabalho não ter sido previamente publicado e nem estar sendo analisado por outra revista. Todas as contribuições científicas são revisadas pelo Editor-Chefe, pelo Supervisor Editorial, Editores Associados e pelos Membros do Conselho Editorial. Só são encaminhados aos revisores os artigos que estejam rigorosamente de acordo com as normas especificadas. Os trabalhos também são submetidos à revisão estatística, sempre que necessário. A aceitação será na originalidade, significância e contribuição científica para o conhecimento da área.

3. Seções

3.1. Editorial: todos os editoriais dos Arquivos são feitos através de convite. Não serão aceitos editoriais enviados espontaneamente.

3.2. Carta ao Editor: correspondências de conteúdo científico relacionadas a artigos publicados na revista nos dois meses anteriores serão avaliadas para publicação. Os autores do artigo original citado serão convidados a responder.

3.3. Artigo Original: os Arquivos aceitam todos os tipos de pesquisa original na área cardiovascular, incluindo pesquisas em seres humanos e pesquisa experimental.

3.4. Revisões: os editores formulam convites para a maioria das revisões. No entanto, trabalhos de alto nível, realizados por autores ou grupos com histórico de publicações na área serão bem-vindos. Não serão aceitos, nessa seção, trabalhos cujo autor principal não tenha vasto currículo acadêmico ou de publicações, verificado através do sistema Lattes (CNPQ), Pubmed ou SciELO. Eventualmente, revisões submetidas espontaneamente poderão ser reclassificadas como “Atualização Clínica” e publicadas nas páginas eletrônicas, na internet (ver adiante).

3.5. Comunicação Breve: experiências originais, cuja relevância para o conhecimento do tema justifique a apresentação de dados iniciais de pequenas séries, ou dados parciais de ensaios clínicos, serão aceitos para avaliação.

3.6. Correlação Anátomo-Clínica: apresentação de um caso clínico e discussão de aspectos de interesse relacionados aos conteúdos clínico, laboratorial e anátomo-patológico.

3.7. Correlação Clínico-Radiográfica: apresentação de um caso de cardiopatia congênita, salientando a importância dos elementos radiográficos e/ou clínicos para a consequente correlação com os outros exames, que comprovam o diagnóstico. Última-se daí a conduta adotada.

3.8. Atualização Clínica: essa seção busca focar temas de interesse clínico, porém com potencial de impacto mais restrito. Trabalhos de alto nível, realizados por autores ou grupos com histórico de publicações na área serão aceitos para revisão.

3.9. Relato de Caso: casos que incluam descrições originais de observações clínicas, ou que representem originalidade de um diagnóstico ou tratamento, ou que ilustrem situações pouco frequentes na prática clínica e que mereçam uma maior compreensão e atenção por parte dos cardiologistas serão aceitos para avaliação.

3.10. Imagem Cardiovascular: imagens clínicas ou de pesquisa básica, ou de exames complementares que ilustrem aspectos interessantes de métodos de imagem, que esclareçam mecanismos de doenças cardiovasculares, que ressaltem pontos relevantes da fisiopatologia, diagnóstico ou tratamento serão consideradas para publicação.

3.11. Ponto de Vista: apresenta uma posição ou opinião dos autores a respeito de um tema científico específico. Esta posição ou opinião deve estar adequadamente fundamentada na literatura ou em sua experiência pessoal, aspectos que irão ser a base do parecer a ser emitido.

4. Processo de submissão: os manuscritos deverão ser enviados via internet e sistema, disponível no endereço: <http://www.arquivosonline.com.br/2013/submissao>

5. Todos os artigos devem vir acompanhados por uma carta de submissão ao editor, indicando a seção em que o artigo deva ser incluído (vide lista acima), declaração do autor de que todos os coautores estão de acordo com o conteúdo expresso no trabalho, explicitando ou não conflitos de interesse* e a inexistência de problemas éticos relacionados.

6. Todos os manuscritos são avaliados para publicação no menor prazo possível, porém, trabalhos que mereçam avaliação especial para publicação acelerada (“fast-track”) devem ser indicados na carta de submissão ao editor.

7. Os textos e as tabelas devem ser editados em word e as figuras e ilustrações devem ser anexados em arquivos separados, na área apropriada do sistema. Figuras devem ter extensão JPEG e resolução mínima de 300 DPI. As Normas para Formatação de Tabelas, Figuras e Gráficos encontram-se em:

http://www.arquivosonline.com.br/publicacao/informacoes_autores.asp /
http://publicacoes.cardiol.br/pub_abc/autor/pdf/manual_de_formatacao_abc.pdf

8. Conflito de interesses: quando existe alguma relação entre os autores e qualquer entidade pública ou privada que pode derivar algum conflito de interesse, essa possibilidade deve ser comunicada e será informada no final do artigo. Enviar a Declaração de Potencial Conflito de Interesses para revista@cardiol.br, colocando no assunto número do artigo. Acesse: http://www.arquivosonline.com.br/pdf/conflito_de_interesse_abc_2013.pdf

9. Formulário de contribuição do autor: o autor correspondente deverá completar, assinar e enviar por e-mail (revista@cardiol.br – colocar no assunto número do artigo) os formulários, explicitando as contribuições de todos os participantes, que serão informadas no final do artigo.

Acesse: http://www.arquivosonline.com.br/pdf/formulario_contribuicao_abc_2013.pdf

10. Direitos Autorais: os autores dos artigos aprovados deverão encaminhar para os Arquivos, previamente à publicação, a declaração de transferência de direitos autorais assinada por todos os coautores (preencher o formulário da página http://publicacoes.cardiol.br/pub_abc/autor/pdf/Transferencia_de_Direitos_Autorais.pdf e enviar para revista@cardiol.br, colocando no assunto número do artigo).

11. Ética

11.1. Os autores devem informar, no texto e/ou na ficha do artigo, se a pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa de sua instituição em consoante à Declaração de Helsinki.

11.2. Nos trabalhos experimentais envolvendo animais, os autores devem indicar se os procedimentos seguidos seguiram os padrões éticos do comitê responsável por experimentação humana (institucional e nacional) e da Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Se houver dúvida quanto à realização da pesquisa em conformidade com a Declaração de Helsinki, os autores devem explicar as razões para sua abordagem e demonstrar que o corpo de revisão institucional explicitamente aprovou os aspectos duvidosos do estudo. Ao relatar experimentos com animais, os autores devem indicar se as diretrizes institucionais e nacionais para o cuidado e uso de animais de laboratório foram seguidas.

11.3. Nos trabalhos experimentais envolvendo seres humanos, os autores devem indicar se os procedimentos seguidos seguiram os padrões éticos do comitê responsável por experimentação humana (institucional e nacional) e da Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008. Se houver dúvida quanto à realização da pesquisa em conformidade com a Declaração de Helsinki, os autores devem explicar as razões para sua abordagem e demonstrar que o corpo de revisão institucional explicitamente aprovou os aspectos duvidosos do estudo. Estudos realizados em humanos devem estar de acordo com os padrões éticos e com o devido consentimento livre e esclarecido dos participantes conforme Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde (Brasil), que trata do Código de Ética para Pesquisa em Seres Humanos e, para autores fora do Brasil, devem estar de acordo com Committee on Publication Ethics (COPE).

12. Ensaaios clínicos

12.1. O International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) acredita que é importante promover uma base de dados de estudos clínicos abrangente e disponível publicamente. O ICMJE define um estudo clínico como qualquer projeto de pesquisa que prospectivamente designa seres humanos para intervenção ou comparação simultânea ou grupos de controle para estudar a relação de causa e efeito entre uma intervenção médica e um desfecho relacionado à saúde. As intervenções médicas incluem medicamentos, procedimentos cirúrgicos, dispositivos, tratamentos comportamentais, mudanças no processo de atendimento, e outros.

12.2. O número de registo do estudo deve ser publicado ao final do resumo. Serão aceitos qualquer registo que satisfaça o ICMJE, ex. <http://clinicaltrials.gov/>. A lista completa de todos os registros de ensaios clínicos pode ser encontrada no seguinte endereço: <http://www.who.int/ictip/network/primary/en/index.html>.

12.3. Os ensaios clínicos devem seguir em sua apresentação as regras do CONSORT STATEMENT. Acesse <http://www.consort-statement.org/consort-statement/>

13. Citações bibliográficas: os Arquivos adotam as Normas de Vancouver – Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journal (www.icmje.org).

14. Idioma: os artigos devem ser redigidos em língua portuguesa (com a ortografia vigente) e/ou inglês.

14.1. Para os trabalhos que não possuem versão em inglês ou que essa seja julgada inadequada pelo Conselho Editorial, a revista providenciará a tradução sem ônus para o(s) autor(es).

14.2. Caso já exista a versão em inglês, tal versão deve ser enviada para agilizar a publicação.

14.3. As versões inglês e português serão disponibilizadas na íntegra no endereço eletrônico da SBC (<http://www.arquivosonline.com.br>) e da SciELO (www.scielo.br), permanecendo à disposição da comunidade internacional.

15. Avaliação pelos Pares (peer review): todos os trabalhos enviados aos ABC serão submetidos à avaliação inicial dos editores, que decidirão, ou não, pelo envio a revisão por pares (peer review), todos eles pesquisadores com publicação regular em revistas indexadas e cardiologistas com alta qualificação (Corpo de Revisores dos ABC <http://www.arquivosonline.com.br/conselhoderevisores/>).

15.1. Os autores podem indicar até cinco membros do Conselho de Revisores para análise do manuscrito submetido, assim como podem indicar até cinco revisores para não participar do processo.

15.2. Os revisores tecerão comentários gerais sobre o manuscrito e decidirão se esse trabalho deve ser publicado, corrigido segundo as recomendações, ou rejeitado.

15.3. Os editores, de posse dos comentários dos revisores, tomarão a decisão final. Em caso de discrepâncias entre os revisores, poderá ser solicitada uma nova opinião para melhor julgamento.

15.4. As sugestões de modificação dos revisores serão encaminhadas ao autor principal. O manuscrito adaptado às novas exigências será reencaminhado aos revisores para verificação.

15.5. Em casos excepcionais, quando o assunto do manuscrito assim o exigir, o Editor poderá solicitar a colaboração de um profissional que não conste do Corpo de Revisores.

15.6. Os autores têm o prazo de trinta dias para proceder às modificações solicitadas pelos revisores e submeter novamente o artigo. A inobservância desse prazo implicará na retirada do artigo do processo de revisão.

15.7. Sendo aceitos para revisão, os pareceres dos revisores deverão ser produzidos no prazo de 30 dias.

15.8. As decisões serão comunicadas por mensagem do Sistema de Envio de Artigos e e-mail.

15.9. As decisões dos editores não serão discutidas pessoalmente, nem por telefone. As réplicas deverão ser submetidas por escrito à revista.

15.10. Limites de texto: a contagem eletrônica de palavras deve incluir a página inicial, resumo, texto, referências e legenda de figuras/tabelas.

	Artigo Original	Editorial	Artigo de Revisão Atualização Clínica	Relato de Caso	Comunicação Breve	Pontos Vista
Nº máx. de autores	10	2	4	6	8	8
Título (caracteres incluindo espaços)	150	120	150	120	120	120
Título reduzido (caracteres incluindo espaços)	50	50	50	50	50	50
Resumo (nº máx. de palavras)	250	--	250	--	250	--

15.11. Orientações Estatísticas

15.11.1. O uso adequado dos métodos estatísticos bem como sua correta descrição é de suma importância para a publicação nos Arquivos Brasileiros de Cardiologia. Desta forma, a seguir, são apresentadas orientações gerais aos autores sobre as informações que devem ser fornecidas no artigo referente à análise estatística (para maiores detalhes, sugerimos a leitura das orientações estatísticas do European Heart Journal).

Sobre a amostra:

1) Detalhamento tanto da população de interesse quanto dos procedimentos utilizados para definição da amostra do estudo.

2) Dentro do tópico Métodos, criação de um subtópico direcionado exclusivamente à descrição da análise estatística efetuada no estudo, contendo:

- Forma de apresentação das variáveis contínuas e/ou categóricas: para variáveis contínuas com distribuição normal, apresentação da média e desvio-padrão e, para as com distribuição não normal, apresentar através de mediana e intervalos interquartis. Já para as variáveis categóricas, as mesmas devem ser apresentadas através de números absolutos e percentagens, com os respectivos intervalos de confiança;
- Descrição dos métodos estatísticos utilizados. Na utilização de métodos estatísticos mais complexos, deve ser fornecida uma literatura de referência para os mesmos;
- Como regra, os testes estatísticos devem sempre ser bilaterais ao invés de unilaterais;
- Nível de significância estatística adotado; e
- Especificação do software empregado nas análises estatísticas e sua respectiva versão.

3) Em relação à apresentação dos resultados obtidos após as análises estatísticas:

- Os principais resultados devem sempre ser descritos com seus respectivos intervalos de confiança;
- Não repetir no texto do artigo dados já existentes em tabelas e figuras;
- Ao invés de apresentar tabelas muito extensas, utilizar gráficos como alternativa de modo a facilitar a leitura e entendimento do conteúdo;
- Nas tabelas, mesmo que o p-valor não seja significativo, apresentar o respectivo valor em vez de "NS" (por exemplo, $p = 0,29$ em vez de NS).

16. Os artigos deverão seguir a seguinte ordem:

16.1. Página de título

16.2. Texto

16.3. Agradecimentos

16.4. Legendas de figuras

16.5. Tabelas (com legendas para as siglas)

16.6. Referências

16.7. Primeira Página:

16.7.1. Deve conter o título completo do trabalho de maneira concisa e descritiva, em português e inglês, assim como um título resumido (com até 50 caracteres, incluindo espaços) para ser utilizado no cabeçalho das demais páginas do artigo;

16.7.2. Devem ser incluídos de três a cinco descritores (palavras-chave), assim como a respectiva tradução para as keywords (descriptors). Os descritores devem ser consultados nos sites: <http://decs.bvs.br/>, que contém termos em português, espanhol e inglês ou www.nlm.nih.gov/mesh, para termos somente em inglês;

16.8. Segunda Página:

16.8.1. Resumo (até 250 palavras): o resumo deve ser estruturado em cinco seções quando se tratar Artigo Original, evitando abreviações e observando o número máximo de palavras. No caso de Artigo de Revisão e Comunicação Breve, o resumo não é estruturado, respeitando o limite máximo de palavras.

Não cite referências no resumo:

- Fundamento (racional para o estudo);
- Objetivos;
- Métodos (breve descrição da metodologia empregada);
- Resultados (apenas os principais e mais significativos);
- Conclusões (frase(s) sucinta(s) com a interpretação dos dados).

Obs.: Os Relatos de Caso não devem apresentar resumo.

16.9. Texto para Artigo Original: deve ser dividido em introdução, métodos, resultados, discussão e conclusões.

16.9.1. Introdução:

16.9.1.1. Não ultrapasse 350 palavras.

16.9.1.2. Faça uma descrição dos fundamentos e do racional do estudo, justificando com base na literatura.

16.9.2. Métodos: descreva detalhadamente como foram selecionados os sujeitos da pesquisa observacional ou experimental (pacientes ou animais de experimentação, incluindo o grupo controle, quando houver), incluindo idade e sexo.

16.9.2.1. A definição de raças deve ser utilizada quando for possível e deve ser feita com clareza e quando for relevante para o tema explorado.

16.9.2.2. Identifique os equipamentos e reagentes utilizados (incluindo nome do fabricante, modelo e país de fabricação, quando apropriado) e dê detalhes dos procedimentos e técnicas utilizadas de modo a permitir que outros investigadores possam reproduzir os seus dados.

16.9.2.3. Justifique os métodos empregados e avalie possíveis limitações.

16.9.2.4. Descreva todas as drogas e fármacos utilizados, doses e vias de administração.

16.9.2.5. Descreva o protocolo utilizado (intervenções, desfechos, métodos de alocação, mascaramento e análise estatística).

16.9.2.6. Em caso de estudos em seres humanos, indique se o trabalho foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa e se os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido.

16.9.3. Resultados: exibidos com clareza, subdivididos em itens, quando possível, e apoiados em número moderado de gráficos, tabelas, quadros e figuras. Evitar a redundância ao apresentar os dados, como no corpo do texto e em tabelas.

16.9.4. Discussão: relaciona-se diretamente ao tema proposto quando analisado à luz da literatura, salientando aspectos novos e importantes do estudo, suas implicações e limitações. O último período deve expressar conclusões ou, se pertinentes, recomendações e implicações clínicas.

16.9.5. Conclusões

16.9.5.1. Ao final da sessão “Conclusões”, indique as fontes de financiamento do estudo.

17. Agradecimentos: devem vir após o texto. Nesta seção, é possível agradecer a todas as fontes de apoio ao projeto de pesquisa, assim como contribuições individuais.

17.1. Cada pessoa citada na seção de agradecimentos deve enviar uma carta autorizando a inclusão do seu nome, uma vez que pode implicar em endosso dos dados e conclusões.

17.2. Não é necessário consentimento por escrito de membros da equipe de trabalho, ou colaboradores externos, desde que o papel de cada um esteja descrito nos agradecimentos.

18. Referências: os Arquivos seguem as Normas de Vancouver.

18.1. As referências devem ser citadas numericamente, por ordem de aparecimento no texto e apresentadas em sobrescrito.

18.2. Se forem citadas mais de duas referências em sequência, apenas a primeira e a última devem ser digitadas, separadas por um traço (Exemplo: 5-8).

18.3. Em caso de citação alternada, todas as referências devem ser digitadas, separadas por vírgula (Exemplo: 12, 19, 23). As abreviações devem ser definidas na primeira aparição no texto.

- 18.4. As referências devem ser alinhadas à esquerda.
- 18.5. Comunicações pessoais e dados não publicados não devem ser incluídos na lista de referências, mas apenas mencionados no texto e em nota de rodapé na página em que é mencionado.
- 18.6. Citar todos os autores da obra se houver seis autores ou menos, ou apenas os seis primeiros seguidos de et al, se houver mais de seis autores.
- 18.7. As abreviações da revista devem estar em conformidade com o Index Medicus/Medline – na publicação List of Journals Indexed in Index Medicus ou por meio do site <http://locatorplus.gov/>.
- 18.8. Só serão aceitas citações de revistas indexadas. Os livros citados deverão possuir registro ISBN (International Standard Book Number).
- 18.9. Resumos apresentados em congressos (abstracts) só serão aceitos até dois anos após a apresentação e devem conter na referência o termo “resumo de congresso” ou “abstract”.
19. Política de valorização: os editores estimulam a citação de artigos publicados nos Arquivos.
20. Tabelas: numeradas por ordem de aparecimento e adotadas quando necessário à compreensão do trabalho. As tabelas não deverão conter dados previamente informados no texto. Indique os marcadores de rodapé na seguinte ordem: *, †, ‡, §, //, ¶, #, **, ††, etc. O Manual de Formatação de Tabelas, Figuras e Gráficos para Envio de Artigos à Revista ABC está no endereço: http://publicacoes.cardiol.br/pub_abc/autor/pdf/manual_de_formatacao_abc.pdf
21. Figuras: as figuras submetidas devem apresentar boa resolução para serem avaliadas pelos revisores. As legendas das figuras devem ser formatadas em espaço duplo e estar numeradas e ordenadas antes das Referências. As abreviações usadas nas ilustrações devem ser explicitadas nas legendas. O Manual de Formatação de Tabelas, Figuras e Gráficos para Envio de Artigos à Revista ABC está no endereço: http://publicacoes.cardiol.br/pub_abc/autor/pdf/manual_de_formatacao_abc.pdf
22. Imagens e vídeos: os artigos aprovados que contenham exames (exemplo: ecocardiograma e filmes de cinecoronariografia) devem ser enviados através do sistema de submissão de artigos como imagens em movimento no formato MP4 com codec h:264, com peso de até 20 megas, para serem disponibilizados no site <http://www.arquivosonline.com.br> e nas revistas eletrônicas para versão tablet.
23. Os autores não são submetidos à taxa de submissão de artigos e de avaliação.

ANEXO II - PARECER DO CEUA (COMITÊ DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS)

PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 5804122015
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 04/12/2015

1. Pesquisador Responsável: **Gustavo Ithamar Souto Maior**
Título do Projeto: ANOMALIAS CONGÊNITAS NO SISTEMA CARDIOVASCULAR DOS CONCEPTOS DE RATAS WISTAR SUBMETIDAS À PERITONITE FECAL AUTÓGENA – ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.

2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de 04 / 12 / 2015.

Vigência do Projeto	01 de janeiro de 2016 à 01 de março de 2017
Espécie / linhagem	Ratos Wistar (Rattus Novergicus, Rodentia Mammalia)
Nº de animais	44
Peso / idade	Adultas e jovens de 4 meses
Sexo	Feminino e masculino
Origem	Biotério FCM Campina Grande

3. **Parecer Final: APROVADO**

Thárcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED

Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901 - Itararé
CEP 58411-020 | Campina Grande - PB | (83) 2101.8800
www.cesed.br | facisa@cesed.br | fcm@cesed.br | esac@cesed.br
CNPJ.: 02.108.023/0001-40