



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Maria Luísa da Silveira Hahmeyer

**Disfunção cardíaca na sepse: o envolvimento dos discos intercalares**

Florianópolis  
2020

Maria Luísa da Silveira Hahmeyer

**Disfunção cardíaca na sepse: o envolvimento dos discos intercalares**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Jamil Assreuy, Dr.

Florianópolis

2020

## Ficha de identificação da obra

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Hahmeyer, Maria Luísa da Silveira Hahmeyer  
Disfunção cardíaca na sepse: o envolvimento dos discos  
intercalares / Maria Luísa da Silveira Hahmeyer Hahmeyer ;  
orientador, Jamil Assreuy Assreuy, 2020.  
70 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Sepse. 3. Discos intercalares. 4. N  
Caderina. 5. Óxido nítrico. I. Assreuy, Jamil Assreuy. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Maria Luísa da Silveira Hahmeyer

**Disfunção cardíaca na sepse: o envolvimento dos discos intercalares**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Jamil Assreuy, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.<sup>a</sup> Thereza Christina Barja-Fidalgo, Dr.<sup>a</sup>.

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. José Eduardo da Silva Santos, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Farmacologia.

---

Prof. Rui Daniel Schroder Prediger, Dr.

Coordenador do Programa

---

Prof. Jamil Assreuy Dr.

Orientador

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado a todos os professores e mestres, aos quais incluo com orgulho minha mãe, que, ao cruzarem o meu caminho, fizeram meus olhos brilharem ao aprender algo novo.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina, pela oportunidade de me formar como profissional através de um ensino de qualidade. Agradeço a ela também, por me abrir os horizontes e me mostrar que o mundo é muito mais diverso do que antes eu imaginava;

Agradeço ao meu orientador, professor doutor Jamil Assreuy, o qual me acolheu e soube lidar com as minhas limitações. Obrigada por ser um excelente orientador, por ter um cuidado paternal comigo, por ser muitas vezes meu parceiro de bancada, por me estimular e por me ensinar sobre resiliência. Obrigada pelas caronas e pelas conversas sobre ciência, sobre a vida, sobre livros e pelas boas risadas que tiramos delas. Agradeço pelo exemplo que o senhor se tornou para mim. Espero que seus ensinamentos perdurem e reflitam em minhas atitudes ao longo da minha jornada profissional;

À equipe NOLab: Adriane, nossa mãezona; Camila e Jheniffer, pela parceria na alegria e na tristeza, na bancada e fora dela, sem vocês teria sido muito mais difícil; Clarissa, por tentar me ensinar a levar a vida com mais leveza e por compartilhar o amor por gatinhos; Daiane, pelas inúmeras conversas sérias e engraçadas (quase todas), por tentar me fazer pensar positivo, pelos inúmeros blots e por me ajudar com as células (nada está aqui como resultado final, mas o conhecimento permanece); Filipe e Thiele pelos momentos de descontração, p.ex: centrífuga da Barbie + “o que é que eu tô fazendo?”; ICs: Déborah, Rafaela e Graciela por toda ajuda nos experimentos e por entender que eu troco de assunto muito rápido e o agregado Geisson, sempre disposto a ensinar e ajudar;

Ao Junior, pelo cuidado com o nosso biotério e por me ajudar nas injeções subcutâneas feitas nesse trabalho; ao Gustavo e Marcelo pelas muitas tentativas de fazer o Langendorff ir para frente e aos três em conjunto pelas boas piadas que tiramos de todas as dificuldades.

À professor doutora Evelise Maria Nazari, que me acompanhou desde os meus primeiros passos na vida científica e me ensinou sobre cuidado e capricho ao escrever um trabalho. Repito o mesmo agradecimento que fiz na última oportunidade que tive, obrigada pelo exemplo de amor à profissão;

Aos ainda colegas do LRDA: Gilian, meu primeiro parceiro de laboratório e professor de bancada, que sorte a minha cair de primeira nas tuas mãos; Manuela, também parceira de bancada, exemplo de capricho em tudo que faz e principalmente por me ajudar a montar as pranchas apresentadas nesse trabalho; Madson, que junto comigo integra o grupo dos últimos da velha guarda do LRDA, pelos conselhos e dicas nos experimentos e fora deles; Nathalia,

minha irmãzinha de coração, da iniciação ao infinito e além, obrigada pela parceria e em particular pela revisão das minhas referências;

Aos professores do Programa de Pós-graduação por todos os ensinamentos, em especial à professora Beth e ao professor Pádua por sempre me ouvirem.

À estrutura e aos técnicos do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia e do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica, os quais sempre foram solícitos tentando esclarecer minhas dúvidas em experimentos.

Às agências de fomento, Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

À minha mãe, por me ensinar que educação e caráter são as maiores heranças. Obrigada, mãe, por me guiar e me fazer chegar onde eu cheguei. Os erros e acertos da vida fazem sermos quem nós somos hoje e eu tenho muito orgulho dessa família de três meninas;

Aos meus avós, por entenderem minhas escolhas profissionais e serem grandes entusiastas delas;

Ao meu pai, que mesmo longe soube estar perto. Obrigada por todas as reflexões de vida e por entender e incentivar minhas escolhas profissionais;

Às minhas amigas de escola e de faculdade, que ouviram minhas lamentações e vibram comigo a cada pequena vitória. Ter vocês ao meu lado deixa tudo mais leve!

Ao meu beijinho de coco, minha beijoqueira e companheira de estudos Agatha Matilda, obrigada por me fazer transbordar de amor a cada vez que lembro ou vejo seu rostinho.

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

Leonardo da Vinci

## RESUMO

A sepse é uma condição grave e definida como uma síndrome que ameaça a vida, na qual ocorre disfunção de órgãos ocasionada pela resposta imune desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. A disfunção cardiovascular é a principal disfunção decorrente da sepse e o óxido nítrico (NO) tem papel relevante nela. Apesar da sepse e sua fisiopatologia serem temas amplamente abordados na literatura, ainda não há uma terapia específica disponível. Faz-se então urgente a busca pelo entendimento integral da sua fisiopatologia, bem como por novos alvos terapêuticos. Um aspecto ainda pouco conhecido se refere às causas da disfunção cardíaca. Os discos intercalares, estruturas que conectam os miócitos, tem papel fundamental na transmissão elétrica e iônica cardíaca e permite que o coração funcione como um sincício. O presente estudo busca averiguar o envolvimento dos discos intercalares e do NO na disfunção cardíaca da sepse. Utilizou-se o modelo de cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) para a indução da sepse em ratos fêmeas. Coração e sangue foram coletados em 6, 12 e 24 horas após a cirurgia. O tecido cardíaco foi coletado para ensaios de imunomarcagem para a proteína N-caderina, importante elemento estrutural dos discos intercalares e para averiguação dos níveis de S-nitrosilação. No sangue foram feitas dosagens de marcadores de danos de órgãos e níveis de nitrito+nitrato. A imunomarcagem para N-caderina já foi vista 6 horas após a sepse, mas atingiu o máximo 12 horas, mostrando uma tendência de retorno ao normal 24 horas após a cirurgia. A marcação da S-nitrosilação aumentou nos corações sépticos, com máximo em 12 horas. Para avaliar diretamente o papel do NO na desestruturação da marcação da N-caderina animais normais (não-sépticos) foram tratados com um doador de NO, o S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) e o coração foi coletado 6 horas após. Adicionalmente, para avaliar o potencial resgate da morfologia dos discos intercalares, outro grupo de animais normais foram tratados com o agente desnitrosilante, 5,5-dítio-bis-(2-ácido nitrobenzoico; (DTNB) 3 horas após a administração de SNAP. O tratamento com SNAP desestruturou a imunomarcagem para N-caderina dilatando a estrutura dos discos intercalares. O tratamento com DTNB reverteu parcialmente o efeito do SNAP. Como conclusão, nossos resultados sugerem que o papel da N-caderina nos mecanismos que envolvem a fisiopatologia da sepse parece ser precoce e mais correlacionado com a morbidade do que com a mortalidade desta síndrome. O fato de a sepse alterar a imunomarcagem de N-caderina e este efeito ser reproduzido em animais tratados com um doador de NO permite a especulação de que esta desestruturação dos discos seja elemento importante para a disfunção cardíaca e torna os discos alvos interessantes para eventuais novas abordagens para a sepse.

**Palavras-chave:** Sepsis. N-Caderina. Óxido nítrico.

## ABSTRACT

Sepsis is a serious condition, defined as a life-threatening syndrome, in which organ dysfunction occurs due to the host dysregulated immune response to an infection. Cardiovascular dysfunction is the main dysfunction resulting from sepsis and nitric oxide (NO) has a relevant role in it. Although sepsis and its pathophysiology are widely studied in the literature, there is still no specific therapy available. It is therefore urgent to seek a better understanding of its pathophysiology, as well as new therapeutic targets. A relatively unknown aspect refers to the mechanism of cardiac dysfunction. Intercalated discs, structures that connect the myocytes, play a fundamental role in cardiac electrical and ionic transmission to allow the heart to function as a syncytium. The present study seeks to investigate the involvement of intercalated discs and nitric oxide (NO) in cardiac dysfunction in sepsis. The cecum ligation and perforation (CLP) model was used to induce sepsis in female rats. Heart and blood were collected at 6, 12 and 24 hours after surgery. Cardiac tissue was collected for immunostaining assay for the protein N-cadherin, an important structural element of the intercalated discs and for the investigation of S-nitrosylation levels. In the blood, organ damage markers and nitrite + nitrate levels were measured. Immunostaining for N-cadherin was already seen 6 hours after sepsis, but reached a maximum of 12 hours, showing a tendency to return to normal 24 hours after surgery. S-nitrosylation markedly increased in septic hearts, with a maximum of 12 hours. To directly assess the role of NO in the disruption of N-cadherin labeling, normal (non-septic) animals were treated with a NO donor, S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) and the heart was collected 6 hours later. In addition, to assess the potential rescue of the intercalated disc morphology, another group of normal animals was treated with the denitrosylating agent, 5,5-dithio-bis- (2-nitrobenzoic acid; DTNB) 3 hours after SNAP administration. Treatment with SNAP disrupted the immunostaining for N-cadherin by dilating the structure of the intercalated discs, and treatment with DTNB partially reversed the effect of SNAP. In conclusion, our results suggest that the role of N-cadherin in the mechanisms involving the pathophysiology of sepsis seems to be early and more correlated with morbidity than with the mortality of this syndrome. The fact that sepsis alters the immunostaining of N-cadherin and this effect is reproduced in animals treated with a NO donor allows to suggest that disruption of intercalated discs is an important element for cardiac dysfunction and makes the discs interesting targets for possible new approaches to sepsis.

**Keywords:** Sepsis. N-Cadherin. Nitric oxide.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos discos intercalares .....	27
Figura 2 – Ilustração das junções celulares que compõe os discos intercalares.....	28
Figura 3 – Ilustração do arranjo de proteínas que compõe as junções aderentes .....	29
Figura 4 –Representação da metodologia de análise da área dos discos intercalares .....	38
Figura 5 – Avaliação dos metabólitos do NO, nitrato e nitrito (NOx) .....	40
Figura 6 – Mensuração dos marcadores bioquímicos séricos em animais sépticos .....	41
Figura 7 – Curso temporal da imunomarcção de N-caderina em corações de ratos submetidos ao protocolo de indução de sepse por CLP .....	43
Figura 8 – Detalhes da imunomarcção de N-caderina em corações de ratos submetidos ao protocolo de indução de sepse por CLP .....	44
Figura 9 –Análise por imunofluorescência da quantidade de nitrosotíóis em tecido cardíaco no curso temporal da sepse em animais submetidos ao CLP .....	46
Figura 10 – Imunofluorescência dos nitrosotíóis em tecido cardíaco de animais tratados com SNAP e DTNB .....	48
Figura 11 – Efeito do tratamento com SNAP e com DTNB na imunomarcção dos discos intercalares.....	49
Figura 12 – Efeito do tratamento com SNAP e com DTNB na morfologia dos discos intercalares em maior aumento .....	50

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 – Sinais e sintomas da sepse (infecção suspeita ou documentada).....	20
---	----

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Novos termos e definições da sepse .....	17
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ASC	Ácido ascórbico
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina trifosfato
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP	Do inglês, <i>cecal ligation puncture</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-phenilindol
DP	Desvio padrão
DTNB	5,5-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMP	Monofosfato cíclico de guanosina
ILAS	Instituto Latino Americano da Sepsis
LPS	Lipopolissacarídeo
MPB	N-3-maleimidilpropionil biotina
NEM	N-etilmaleimida
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOx	Nitrato e nitrito
qSOFA	do inglês, <i>Quick Sequential Organ Failure Assessment</i>
ROS	Do inglês, <i>Reactive Oxygen Species</i>
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina
SIRS	Do inglês, <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SNAP	S-Nitroso-N-acetilpenicilamina
SOFA	Do inglês, <i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TRL	Do inglês, <i>Toll-like receptor</i>
UTI	Unidade de terapia intensiva

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	HISTÓRICO DAS INFECÇÕES .....	15
1.2	DEFINIÇÕES .....	16
1.3	EPIDEMIOLOGIA.....	18
1.4	FISIOPATOLOGIA .....	20
1.5	SEPSE E ÓXIDO NÍTRICO .....	22
1.6	DISFUNÇÃO CARDÍACA NA SEPSE .....	24
1.7	FISIOLOGIA CARDÍACA E DOS DISCOS INTERCALARES .....	25
1.8	JUSTIFICATIVA .....	31
1.9	HIPÓTESE .....	31
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>32</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	32
<b>2.1.1</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>33</b>
3.1	ANIMAIS .....	33
3.2	REAGENTES .....	33
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	33
<b>3.3.1</b>	<b>Indução da sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP).....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Preparo das lâminas histológicas .....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Imunofluorescência.....</b>	<b>34</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Formação de nitrosotióis.....</b>	<b>35</b>
<b>3.3.5</b>	<b>Dosagem de nitrato e nitrito (NOx).....</b>	<b>36</b>
<b>3.3.6</b>	<b>Dosagens bioquímicas.....</b>	<b>36</b>
3.3.6.1	<i>Aspartato aminotransferase (AST) .....</i>	36

3.3.6.2	<i>Alanina aminotransferase (ALT)</i> .....	36
<b>3.3.7</b>	<b>Análises obtidas por microscopia de fluorescência</b> .....	<b>37</b>
3.4	GRUPOS E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	38
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>40</b>
4.1	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NITRATO E NITRITO (NOX).....	40
4.2	QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANO DE ÓRGÃOS.....	40
4.3	IMUNOMARCAÇÃO DA PROTEÍNA N-CADERINA DURANTE O CURSO TEMPORAL DA SEPSE .....	41
4.4	NITROSILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO CARDÍACO.....	45
4.5	PARTICIPAÇÃO DO NO NA ALERAÇÃO MORFOLÓGICA DOS DISCOS INTERCALARES.....	47
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>59</b>



# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO DAS INFECÇÕES

Desde os primórdios da humanidade as doenças infecciosas acompanham a vida do homem na terra, sendo consideradas uma das principais causas de morte. Diversas personalidades históricas faleceram em decorrência de infecções, como René Descartes e Friederich Nietzsche, que faleceram de pneumonia; Dom Pedro I e Emily Brontë, os quais faleceram de tuberculose e Ignaz Semmelweis, que teve como causa de morte a sepse.

Hipócrates definiu doença como o desequilíbrio dos humores do corpo, sangue, bile amarela e negra e escarro. Hieronymus Fracastorius, no século XVI, propôs que as doenças seriam causadas por pequenos elementos capazes de se replicar e multiplicar. Para Fracastorius, a transmissão das doenças poderia ocorrer por contato direto com os pequenos elementos; por contato indireto, por meio de fômites ou serem transmitidas à distância, através do ar. Anos mais tarde, Anton van Leeuwenhoek contribuiu com observação direta de micro-organismos através das lentes de um microscópio e da descrição dos elementos vistos nele, os “animáculos”, os quais correspondem aos formatos de coco, bacilos e espiroquetas das bactérias conhecidas atualmente. Juntamente com o trabalho de outros estudiosos da época, a teoria postulada por Fracastorius e as descobertas de Leeuwenhoek serviram de base para a criação de uma teoria revolucionária na história da ciência, conhecida como a teoria dos germes (revisado em FUNK et al., 2009).

Apesar de tantas descobertas acerca dos micro-organismos, somente no século XIX é que medidas de higiene passaram a ser consideradas de fato importantes para a redução no número de mortes por infecções. Ignaz Semmelweis, em 1841, percebeu que lavar as mãos antes de realizar partos reduzia a morte das parturientes, embora não soubesse o que eram os agentes causadores da mortalidade. Alguns anos depois, Joseph Lister, um médico inglês, percebeu que as infecções poderiam ser transmitidas através de feridas abertas na pele. Simultaneamente às descobertas de Lister, Louis Pasteur descobriu que o processo de putrefação requer a presença de organismos vivos, sepultando, de fato, a teoria da geração espontânea de Aristóteles (revisado em FUNK et al., 2009).

A investigação científica passou seu enfoque para a descoberta de substâncias capazes de eliminar os micro-organismos quando Paul Ehrlich fez essa sugestão pela primeira vez, após iniciar seu trabalho sobre a identificação das bactérias. Alexander Fleming (1929) publicou a descoberta de uma substância antibacteriana obtida através do fungo *Penicillium notatum*, a

penicilina, conhecida como o primeiro antibiótico a ser utilizado em larga escala. Na intenção de conhecer mais sobre o mecanismo envolvido no aparecimento das doenças infecciosas, Richard Pfeiffer, um médico alemão, descobriu uma substância tóxica presente nas paredes celulares das bactérias. Essa substância foi nomeada como endotoxina e foi considerada a responsável pelos efeitos tóxicos das bactérias durante o processo infeccioso (revisado em FUNK et al., 2009).

## 1.2 DEFINIÇÕES

Dentro do panorama das doenças infecciosas, a sepse aparece como uma das principais doenças infecciosas causadoras de morte. O termo sepse se refere à “decomposição da matéria animal, vegetal ou orgânica em presença de bactérias” (GEROULANOS e DOUKA, 2006). Atualmente sepse é definida como um conjunto de manifestações sistêmicas causadas pela resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção, que culminam na disfunção de órgãos, que pode ocasionar a morte (SINGER et al., 2016).

No decorrer dos anos, o termo sepse foi redefinido diversas vezes na tentativa de padronizar o tratamento dos pacientes com essa condição. A primeira tentativa de padronização ocorreu em 1991, quando estudiosos da área se reuniram em uma conferência realizada pelo *American College of Chest Physicians* e pela *Society of Critical Care Medicine*. Nessa conferência foi definido o termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica – SIRS, resposta inflamatória desregulada sistêmica, a qual pode ocorrer devido a diversos insultos, como queimadura, traumas e pancreatite. Os sintomas clínicos desse quadro incluem: hipo ou hipertermia; taquicardia (> 90 bpm); frequência respiratória maior do que 20 movimentos por minuto (taquipneia); contagem de leucócitos acima de 12.000/mm<sup>3</sup> ou abaixo de 4.000/mm<sup>3</sup> ou então porcentagem de neutrófilos imaturos maior do que 10%. Para casos em que juntamente da SIRS há uma infecção confirmada, cunhou-se o termo sepse. Quando a sepse progredia para um quadro de disfunção orgânica, denominava-se sepse grave e quando a hipotensão característica da sepse persistia frente a reposição de fluidos e o uso de vasoconstritores, padronizou-se o termo choque séptico (BONE et al., 1992).

Entretanto, apesar dos esforços para a padronização dos termos relacionados à sepse, o diagnóstico dos sinais e sintomas ainda era e continua sendo um desafio na clínica. Vincent e colaboradores (1996) propuseram um sistema de reconhecimento dos sinais e sintomas de pacientes para auxiliar a identificação da disfunção de órgãos pelos profissionais de saúde.

Assim, foi criado o *Sepsis-related Organ Failure Assessment* (SOFA). O SOFA é um score que avalia o grau de disfunção de órgãos nos pacientes. Os critérios possibilitam avaliar a disfunção de seis órgãos ou sistemas-chave, dentre os quais estão: o sistema respiratório, sistema cardiovascular, sistema nervoso central, o sistema renal, o sistema hepático e o sistema da coagulação. Quando desenvolvido pela primeira vez, a intenção do SOFA não era prever os desfechos, nem reduzir a chance de mortalidade, mas sim descrever as complicações causadas por doenças graves como a sepse. Por ser um sistema prático, objetivo e simples, seu uso se difundiu mundialmente e permitiu que estudos fossem realizados a partir deste, podendo confirmar que um score SOFA acima de 2 está relacionado a um risco de 10% de mortalidade (SHANKAR-HARI et al., 2016).

Em 2001, uma nova reunião foi organizada para atualizar o consenso, a qual ficou conhecida como *Sepsis-2*. O objetivo final não foi alterar as definições de cada critério e sim, enriquecer o detalhamento sobre os sinais e sintomas de cada um dos termos (LEVY et al., 2003). Quinze anos depois, em 2016, fez-se necessário uma reavaliação dos termos cunhados no consenso passado e assim foi criado o *Sepsis-3*, ou terceiro consenso internacional de definições para sepse e choque séptico. Diferentemente do *Sepsis-2*, a última reunião modificou substancialmente as definições, passando a empregar apenas dois termos: sepse e choque séptico (Tabela 1). O argumento utilizado para as modificações realizadas foi que as definições dos consensos anteriores focam excessivamente na inflamação, com o conceito de SIRS, o que prejudicava a especificidade e sensibilidade dos critérios, gerando discrepâncias na hora de comparar dados de incidência e mortalidade. Juntamente com as modificações nas terminologias, excluiu-se o termo sepse grave, uma vez que todo quadro de sepse é bastante severo, tornando a expressão redundante (SINGER et al., 2016).

Tabela 1: Novos termos e definições da sepse.

Termo	Definição
Sepse	Condição que ameaça a vida, onde há disfunção de órgãos causada pela resposta imune desregulada do hospedeiro frente a uma infecção.
Choque séptico	Quadro de sepse acrescido de: - Hipotensão persistente a qual requer uso de vasopressores e reposição fluidica para manter a pressão arterial média acima de 65 mmHg - Níveis séricos de lactato acima de 2 mmol/L

Fonte: Adaptado de Singer et al., 2016.

Foi criado durante o *Sepsis-3*, uma variação do score SOFA, com o objetivo de acelerar o processo de identificação de pacientes sépticos. O *quick-SOFA* (qSOFA), avalia apenas três parâmetros: frequência respiratória igual ou maior que 22 movimentos por minuto, alteração do estado de consciência e pressão arterial sistólica maior que 100 mmHg (SINGER et al., 2016).

### 1.3 EPIDEMIOLOGIA

Ao longo das últimas décadas alguns programas foram criados para conscientizar a população e principalmente os profissionais de saúde sobre a importância da sepse. Estudiosos das áreas básicas e clínicas com expertise em sepse se reuniram no intuito de estabelecer definições e critérios clínicos para auxiliar profissionais da saúde no combate à sepse. Exemplos de reuniões desse tipo são os primeiro, segundo e terceiro consensos de sepse (Sepsis-1,2,3), a campanha de combate à sepse (*Surviving Sepsis Campaign*) e o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS). Os documentos produzidos por essas entidades passaram a ser referência mundial para o tratamento da sepse. Um estudo de 2019 mostrou que a não-adesão aos protocolos de tratamento feitos para o combate e tratamento da sepse levou ao aumento da mortalidade e que a adesão completa dos protocolos de tratamento reduziu esses índices (LINDBERG et al. 2019).

A sepse é considerada um problema de saúde pública de elevada relevância no cenário mundial. Fleischmann e colaboradores (2016) estimam que a incidência esperada de sepse no mundo inteiro a cada ano seja em torno de mais de 30 milhões de pacientes e que a sepse contribua com 5,3 milhões de mortes por ano no mundo. Nos Estados Unidos, a sepse acomete 1,7 milhões de adultos por ano e um a cada três pacientes que morrem hospitalizados tem sepse (RHEE et al., 2017). Pacientes sépticos necessitam frequentemente de suporte intensivo e monitorização contínua do seu estado de saúde, dados coletados das UTI de todo o mundo constatam que a mortalidade de pacientes sépticos é maior do que a mortalidade de não sépticos e que pacientes com sepse permanecem por mais tempo internados nas UTI (SAKR et al., 2019). No Brasil, paciente sépticos ocupam cerca de 30% dos leitos de Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Com base nesse dado, estima-se que a incidência da sepse no Brasil seja de 36,3 casos a cada 1000 pacientes por dia e que mais de 200 mil mortes por ano no Brasil tenham como causa a sepse, o que representa uma mortalidade de aproximadamente 50% (MACHADO et al., 2017).

Os elevados índices de mortalidades decorrentes da sepse se dão em virtude do quadro de disfunção orgânica que se instaura nessa patologia. Cerca de 62% dos pacientes sépticos desenvolvem falência de órgãos nas primeiras 24 h após o início da sepse e 86,1% após 48 h (YENDE et al., 2019). A disfunção de órgãos está intimamente relacionada às elevadas taxas de mortalidade. Martin e colaboradores (2003) mostraram que em 70% das mortes, pacientes sépticos apresentavam falência de órgãos.

Desde os anos 2000, dentro e fora do Brasil, estudos mostram o trato respiratório como o principal sítio de infecção para o início da sepse (MARTIN et al., 2003; SILVA et al., 2004; SALES JR et al., 2006; SOGAYAR et al., 2008; VINCENT et al., 2009; SAKR et al., 2019 e YENDE et al., 2019). É possível encontrar também na literatura as infecções do trato urinário com maior incidência, muito embora as infecções pulmonares ainda sejam as maiores responsáveis pelas altas taxas de falência e mortalidade (MARTIN et al., 2003; SOGAYAR et al., 2008 e HATFIELD et al., 2018).

Vincent e colaboradores (2009) descreveram os principais micro-organismos causadores da sepse como sendo *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* representando as bactérias Gram positivas e *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* representando as bactérias Gram negativas. Na sepse fúngica, as espécies mais encontradas são do gênero *Candida* (2009). Avaliando dados globais, Sakr e colaboradores (2019) mostram que dois terços dos micro-organismos isolados dos pacientes sépticos são bactérias sendo metade Gram negativas e a outra metade Gram positivas. Além disso, esse estudo mostra que em mais de 50% dos casos de sepse é possível isolar mais de um micro-organismo. Os micro-organismos encontrados com maior frequência na América do Norte e Oriente médio são *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (SARM), *Klebsiella* spp é encontrada mais frequentemente no continente africano, leste europeu e na América do Sul, enquanto *Pseudomonas* spp. aparece também nos isolados de pacientes da América do Sul e do leste europeu.

Alguns dados acerca da sepse são similares em todo o mundo, por exemplo, a idade média dos pacientes, cerca de 60 anos, bem como o tempo de internação, aproximadamente 10 dias. (SALES JR et al., 2006; RHEE et al., 2017; HATFIELD et al., 2018 e YENDE et al., 2019). Além disso, observa-se também semelhança nos dados em relação ao sexo mais acometido por essa patologia, a maior incidência acontece no sexo masculino, logo, parecem ter mais chance de ter a doença, bem como representam a maior parte das mortes (ANGUS et al., 2001; MARTIN et al., 2003; SALES JR et al., 2006; LAGU et al., 2012; KOFTIS et al., 2019).

As elevadas taxas de incidência e mortalidade juntamente com a falta de uma terapia específica culminam em grandes montantes de recursos destinados ao tratamento de pacientes sépticos. Em 2001, Angus e colaboradores, mostraram que pacientes sépticos advindos de centros cirúrgicos e UTI dos Estados Unidos são mais dispendiosos e permanecem mais tempo hospitalizados. Um estudo realizado entre os anos de 2003 e 2007, revelou que os gastos com pacientes sépticos nos Estados Unidos aumentaram 57%, o que parece estar associado à diminuição da mortalidade durante esses anos e em um aumento dos pacientes em cuidados paliativos pós-sepse (LAGU et al., 2012). Em uma coorte prospectiva, Sogayar e colaboradores (2008) calcularam que os gastos médios com pacientes sépticos no Brasil são em torno de 9 mil dólares, valor que aumenta conforme as disfunções orgânicas aparecem.

#### 1.4 FISIOPATOLOGIA

A sepse é uma condição que nem sempre é diagnosticada facilmente. A agilidade na detecção da doença é determinante para evitar o risco de morte, por isso o reconhecimento inicial dos sinais e sintomas descritos no quadro 1 é tão importante.

Quadro 1: Sinais e sintomas da sepse (infecção suspeita ou documentada).

<u>Sinais gerais</u>	<u>Inflamação</u>	<u>Hemodinâmicas</u>	<u>Disfunção orgânica</u>
Febre (>38°C)	Leucocitose	Hipotensão arterial (PAS < 90 mmHg; PAM < 70 mmHg)	Hipóxia
Hipotermia (< 36°C)	Leucopenia	Aumento do índice cardíaco (>3,5 L/min/m <sup>2</sup> de área corporal)	Oligúria
Frequência cardíaca elevada (>90 bpm)	Presença de formas imaturas de leucócitos (>10%)		Aumento dos níveis de creatinina
Taquipneia			Distúrbios de coagulação
Alterações de consciência mental			Trombocitopenia
Edema			Hiperbilirrubinemia
Hiperglicemia (na ausência de diabetes)			Hiperlactatemia

Adaptado de: Angus & van der Poll, 2013.

Os mecanismos da patogênese da sepse derivam de um diálogo complexo entre mediadores inflamatórios liberados como resultado da infecção e as alterações hemodinâmicas provenientes do processo inflamatório exacerbado.

A infecção é o ponto de partida para a sepse acontecer, muito embora nem sempre seja necessária a cultura positiva para a confirmação da sepse. Antígenos como o ácido teicoico, nas bactérias Gram positivas, o lipopolissacarídeo (LPS) nas bactérias Gram negativas são os responsáveis por iniciar o processo inflamatório. A interação dessas moléculas com receptores da família de receptores TRL, do inglês *Toll-like receptors*, leva ao recrutamento de uma cascata de proteínas acessórias, que culmina na transcrição de genes pró-inflamatórios induzida por NF- $\kappa$ B (KAWAZAKI E KAWAI, 2014).

O panorama inflamatório da sepse conta com a liberação de mediadores e ativação de citocinas pró-inflamatórias, que promovem o recrutamento de células do sistema imune, bem como a ativação de plaquetas, das células endoteliais, do sistema complemento e produção de eicosanoides, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.

Conjuntamente, os eventos inflamatórios suscitam a disfunção endotelial. As células endoteliais são capazes de detectar e responder a variações metabólicas e físicas, desempenhando assim um papel fundamental na manutenção da funcionalidade hemodinâmica (AIRD, 2004). Na sepse, as células endoteliais perdem a sua capacidade auto-regulatória. A perda da função de barreira do endotélio, desencadeia aumento da permeabilidade vascular e consequentes edema e infiltração inflamatória, gerando prejuízos macro e microhemodinâmicos (revisado em ASSREUY, 2006).

Além dos mecanismos imunológicos, as alterações hemodinâmicas também são um ponto chave na patologia da sepse, já que elas permitem dividir a sepse em duas fases, uma fase inicial, marcada pela baixa resistência vascular periférica, acrescida de débito cardíaco aumentado e normotensão, e uma fase tardia, caracterizada pelo prejuízo da performance cardíaca com diminuição do débito cardíaco e da resistência vascular periférica, provocando assim hipovolemia e a hipotensão, típica do quadro de sepse (GAHHOS et al., 1981).

A fisiopatologia dos eventos hemodinâmicos da sepse acontece de forma interconectada. A redução da resistência vascular periférica é causada pela perda do tônus vasomotor, que desencadeia as alterações na pressão arterial, as quais por sua vez desregulam a distribuição do débito cardíaco. Em conjunto, esses eventos provocam distúrbios microcirculatórios, os quais levam a heterogeneidade na distribuição do fluxo sanguíneo e acarretam o transporte inadequado de oxigênio para os tecidos. A má perfusão tecidual desloca

o metabolismo para a produção anaeróbica de energia, aumentando os níveis plasmáticos de lactato (CARABALLO et al., 2019).

A má perfusão tecidual é o gatilho para a disfunção dos órgãos. A falência orgânica é a principal complicação causada pela sepse, e, associada à falta de uma terapia específica, culmina nos altos níveis de mortalidade e morbidade dessa patologia.

O tratamento da sepse, embora não específico, consiste na administração de antimicrobianos para controle da infecção, bem como no uso de vasopressores para reestabelecer a pressão sanguínea e para tratar a depressão miocárdica, podendo ser administrados agentes inotrópicos e catecolaminas. Além disso, a estratégia clínica utilizada para restaurar o volume intravascular, reduzido pelo quadro de hipovolemia, é realizar a reposição fluídica adequada. Em 1967, em *screening* de 56 pacientes sépticos, MacLean e colaboradores perceberam que o tratamento com vasopressores, agente inotrópicos e reposição de fluidos aumentava o débito cardíaco, restaurava a pressão arterial e reduzia a pressão venosa central, assim como os níveis de lactato. No entanto, pacientes em choque séptico respondem de forma reduzida a essas terapias convencionais, o que se afigura como um desafio na clínica.

### 1.5 SEPSE E ÓXIDO NÍTRICO

Devido à complexidade das interações entre mediadores e as respostas hemodinâmicas da sepse, muitos pesquisadores interessados na área se esforçaram ao longo dos anos para preencher a literatura científica com informações sobre o tema.

Paralelamente às elucidações sobre a sepse, alguns mediadores fundamentais para a ciência foram descobertos. Em 1980, Furchgott e Zawadzki questionaram o porquê da perda do efeito vasodilatador da acetilcolina sobre preparações *ex vivo*. A descoberta de um fator derivado do endotélio capaz de desencadear a vasodilatação mediante a um estímulo com acetilcolina, revolucionou a história da ciência. Anos mais tarde, as descobertas do fator derivado do endotélio e a identificação dessa molécula como o óxido nítrico (NO; Palmer et al., 1987) renderam o Prêmio Nobel à três pesquisadores americanos.

O NO é uma molécula gasosa de meia-vida curta, com baixo peso molecular, mas que desempenha diversas e importantes funções no organismo, como a modulação do tônus vascular (MONCADA et al., 1991). É produzido a partir do aminoácido L-arginina sob a ação das enzimas óxido nítrico sintase (NOS). No estado basal, a liberação de NO ocorre em pequenas quantidades e por pequenos intervalos e sua produção se deve à ação das isoformas NOS1 e

NOS3, as quais são constitutivas. A isoforma NOS2 tem sua transcrição induzida pelo processo inflamatório e em relação as isoformas constitutivas produz maior quantidade de NO por um período mais prolongado (FÖSTERMANN et al., 1991).

Considerando que a sepse é caracterizada como uma resposta inflamatória exacerbada frente à um agente infeccioso, é esperado que os níveis de NO estejam desbalanceados nessa patologia. Na década de 90, surgiram na literatura trabalhos que correlacionavam, tanto em humanos quanto em animais, níveis aumentados de nitrato e nitrito - metabólitos do NO mais estáveis que ele para serem dosados laboratorialmente - durante a sepse (OCHOA et al., 1991; ANDO et al., 1998). Assim, a correlação entre NO e sepse surgiu na literatura (FLEMING et al., 1991; SZABÓ et al., 1993) e foi consolidada com o passar dos anos (revisado em THIEMERMANN, 1997; PARRAT, 1998; FERNANDES e ASSREUY, 2008). A abundância de NO durante o quadro de sepse desencadeia a ação de diversos outros mecanismos. Os principais alvos do NO são enzimas com grupamento heme com destaque para a guanilato ciclase solúvel, grupamentos tióis presentes em cisteínas e uma espécie reativa de oxigênio em particular, o ânion superóxido. A ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), que leva ao aumento de GMP cíclico é considerada o principal mecanismo para os efeitos fisiológicos do NO. O aumento de GMP cíclico promovido pela ativação da GCs permite relaxamento das células musculares lisas, mecanismo primordial para a ocorrência da vasodilatação (revisado em ASSREUY et al., 2006). O tratamento com azul de metileno, um inibidor da GCs, se mostrou benéfico nos estágios tardios da sepse experimental, bem como na endotoxemia (FERNANDES et al., 2005; FERNANDES et al., 2008)

Outra importante ação do NO é a ativação de canais de potássio. A alteração da permeabilidade das membranas a íons é determinante para que o potencial de ação ocorra nas células. A ativação de canais de potássio promove a hiperpolarização da célula e o bloqueio desses canais leva à despolarização. As mudanças no potencial de ação celular desencadeiam a abertura e o fechamento de canais de cálcio, um íon intimamente ligado ao processo de contração muscular. A ativação dos canais de potássio pelo NO, hiperpolariza o miócito vascular, impedindo a abertura de canais de cálcio e conseqüente influxo deste íon, prejudicando a contração muscular (revisado em ASSREUY et al., 2006).

Tióis são compostos que contêm resíduos de enxofre em sua estrutura molecular. A glutationa e proteínas que possuem resíduos de cisteína são considerados tióis. Conforme citado anteriormente, o NO e seus derivados têm alta afinidade por grupamentos tióis, formando S-nitrosotióis. A nitrosilação é uma modificação pós-translacional que pode comprometer a

estrutura de diversas proteínas, bem como prejudicar suas funções. A nitrosilação é um processo fisiológico e reversível, porém na sepse, com o desbalanço da produção de NO, a nitrosilação também está desregulada contribuindo assim para a falência orgânica (BENEDET et al., 2017). As alterações nos níveis de NO são capazes de prejudicar principalmente o sistema cardiovascular, levando à vasodilatação excessiva, hiporreatividade vascular e má perfusão dos tecidos durante a sepse (FERNANDES e ASSREUY, 2008).

## 1.6 DISFUNÇÃO CARDÍACA NA SEPSE

O sistema cardiovascular é o principal sistema envolvido na fisiopatologia da sepse, uma vez que as disfunções hemodinâmicas e cardíacas se constituem como importantes causadoras da falência de múltiplos órgãos.

As causas da disfunção cardíaca são multifatoriais, muito embora o componente fisiológico seja mais proeminentemente afetado do que o componente anatômico. As múltiplas agressões tanto em nível celular, quanto em nível funcional, contribuem para as consequências sistêmicas dessa disfunção.

A disfunção cardíaca da sepse ocorre durante a fase hiperdinâmica, onde o débito cardíaco está aumentado e a resistência vascular periférica diminuída. Com o passar do tempo esta sobrecarga cardíaca desencadeia diminuição da contratilidade, da complacência do coração e redução da fração de ejeção, com conseqüente aumento do volume diastólico final. O aumento do volume diastólico final favorece a dilatação ventricular, seja ela direita ou esquerda, colaborando para o desenvolvimento da falência cardíaca (SANFILIPPO et al., 2015; revisado em HOCHSTADT et al., 2011; ZIESMANN e MARSHALL, 2018).

Pacientes que apresentam redução da fração de ejeção juntamente com o aumento do volume diastólico final usualmente sobrevivem a sepse, enquanto os não-sobreviventes mantêm os volumes cardíacos preservados. As alterações observadas para estes parâmetros cardíacos nos pacientes sobreviventes são reversíveis após aproximadamente dez dias. Essas informações sugerem que a dilatação transitória dos ventrículos possa ser um mecanismo compensatório para proteger o coração dos danos causados pela sepse (PARKER et al., 1984, revisado em HOCHSTADT et al., 2011; KAKIHANA et al., 2016).

Marcadores de falência cardíaca e depressão miocárdica são úteis na clínica, tanto para avaliar o curso da sepse, quanto para realizar o prognóstico dos pacientes. O dano causado às células cardíacas pode provocar a liberação de proteínas estruturais dos cardiomiócitos, como

as troponinas. As troponinas T e I são biomarcadores de falência cardíaca. Além disso, desde o início do estudo da disfunção cardíaca associada à sepse, já se sabe que o aumento da frequência cardíaca comumente está associado a um pior prognóstico (PARKER et al., 1984)

Intracelularmente, a depressão miocárdica está relacionada ao processo inflamatório decorrente da sepse, que aumenta os níveis de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Estas citocinas por sua vez suprimem a atividade contrátil dos cardiomiócitos e induzem a NOS do miocárdio a produzir NO. O excesso de NO nesse tecido desencadeia a vasodilatação, a resposta inflamatória aumenta a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS), altera a afinidade das miofibrilas ao cálcio, bem como modifica a sinalização  $\beta$ -adrenérgica (revisado em ZANOTTI-CAVAZZONI e HOLLENBERG, 2009; DALTON e SHAHUL, 2018).

A disfunção mitocondrial está associada ao aumento de NO e ROS. Essas substâncias são capazes de reduzir a atividade da cadeia transportadora de elétrons, inibindo a fosforilação oxidativa e conseqüentemente alteram os níveis de adenosina trifosfato (ATP). A redução do aporte energético nos cardiomiócitos contribui com a redução da oxigenação destes, propiciando o aparecimento dos sinais e sintomas funcionais da disfunção cardíaca. Nesse sentido, em pacientes sobreviventes a depressão miocárdica pode ser considerada um mecanismo de tentativa de diminuição do gasto energético devido à disfunção mitocondrial, situação em que o aporte de ATP está reduzido (revisado em RUDIGER e SINGER, 2007; ZANOTTI-CAVAZZONI e HOLLENBERG, 2009).

## 1.7 FISILOGIA CARDÍACA E DISCOS INTERCALARES

Entre os séculos 15 e 17, os trabalhos desenvolvidos por dois estudiosos se destacaram no conhecimento da anatomia e fisiologia cardiovascular. O primeiro deles, Leonardo da Vinci (1452-1519) dissecou diversos cadáveres, o que permitiu a ele desenhar e descrever características do coração como: i) a presença de quatro câmaras cardíacas, ii) a maior capacidade de distensão e complacência dos átrios em relação aos ventrículos, iii) o início da percepção do ciclo cardíaco com abertura das valvas, contração dos ventrículos, iv) a existência de fibras cardíacas em diferentes direções e v) a correlação da chegada e saída do sangue do coração com o calibre dos vasos (SHOJA et al., 2013). William Harvey (1578-1657), anos mais tarde mostrou que o sangue se move em um ciclo contínuo, circulando pelo corpo e retornando ao coração (RIBATTI, 2009).

Sendo o bombeamento uma característica fundamental do tecido cardíaco, é necessário que a estrutura tecidual desse órgão seja especializada para desenvolver tais funções. Portanto,

o coração é um órgão composto por musculatura cardíaca estriada, a qual tem como características a estimulação involuntária, via sistema autonômico, a promoção da contração vigorosa, contínua e rítmica (NABEEBACCUS E SHAH, 2018).

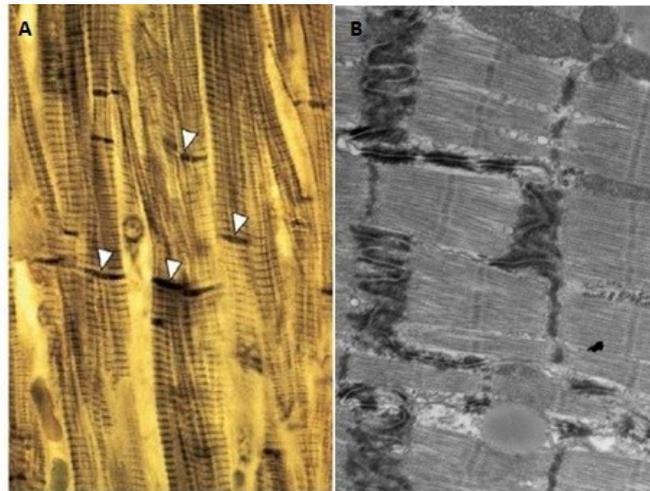
As células que compõem a musculatura cardíaca são chamadas de cardiomiócitos. São células alongadas, com um ou dois núcleos centrais, ramificadas e organizadas em feixes multidirecionais. Em seu citoplasma é possível observar estrias transversais, onde se localizam estruturas denominadas sarcômeros, responsáveis pela atividade contrátil desse tipo celular. Os sarcômeros são unidades iguais e repetidas compostas por filamentos que formam bandas e linhas. A actina e a miosina são os principais filamentos que formam os sarcômeros, os quais são dispostos paralelamente de forma que o deslizamento de um sobre o outro gere a contração sem alteração do tamanho dos filamentos. Diversos outros filamentos e proteínas participam do processo de contração da musculatura e em todos os tipos musculares, a contração é dependente das concentrações de cálcio e do gasto de ATP. Para garantir a energia necessária para a contração, os cardiomiócitos são ricos em mitocôndrias, compondo aproximadamente 40% do volume intracelular de um cardiomiócito (FORBES, 2001; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2004).

Os cardiomiócitos ventriculares não possuem características que permitem a despolarização espontânea. Por isso, o estímulo cardíaco precisa ser propagado para absolutamente todas as células do coração, de modo que a contração seja sincronizada. Essa forma de contração é diferente do que ocorre na musculatura esquelética, a qual pode recrutar a ação de mais feixes de fibras musculares para atender à uma maior demanda. Conseqüentemente, esse tipo celular necessita de uma estrutura que permita a transmissão rápida e contínua do estímulo iniciado pelas células de condução; essas estruturas são chamadas de discos intercalares (CERRONE et al., 2018).

Em 1886, as primeiras descrições do que viriam a ser os discos intercalares apareceram na literatura, sendo descritos como linhas compactadas (em alemão, *Verdichtungstreifen*) (SAPHIR E KARSNER, 1924). Os discos intercalares são estruturas presentes nas extremidades dos cardiomiócitos, que servem para conectá-los química, mecânica e eletricamente. DI são junções celulares especializadas e específicas do tecido cardíaco, estão dispostos transversalmente às fibras cardíacas e podem ser identificados tanto na microscopia de luz, quanto na microscopia eletrônica (Figura 1). O modo como os discos se interligam com as unidades contráteis do coração, os sarcômeros, permite o correto acoplamento mecânico e

elétrico das células, garantindo a comunicação celular e a correta propagação do estímulo cardíaco (VAN BREEMEN, 1953; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004). Devido às suas ações, os discos intercalares suavizam o estresse mecânico da contração celular, bem como podem se fechar e isolar tecidos danificados ou mortos, como ocorre no infarto do miocárdio (VERMIJ et al., 2017).

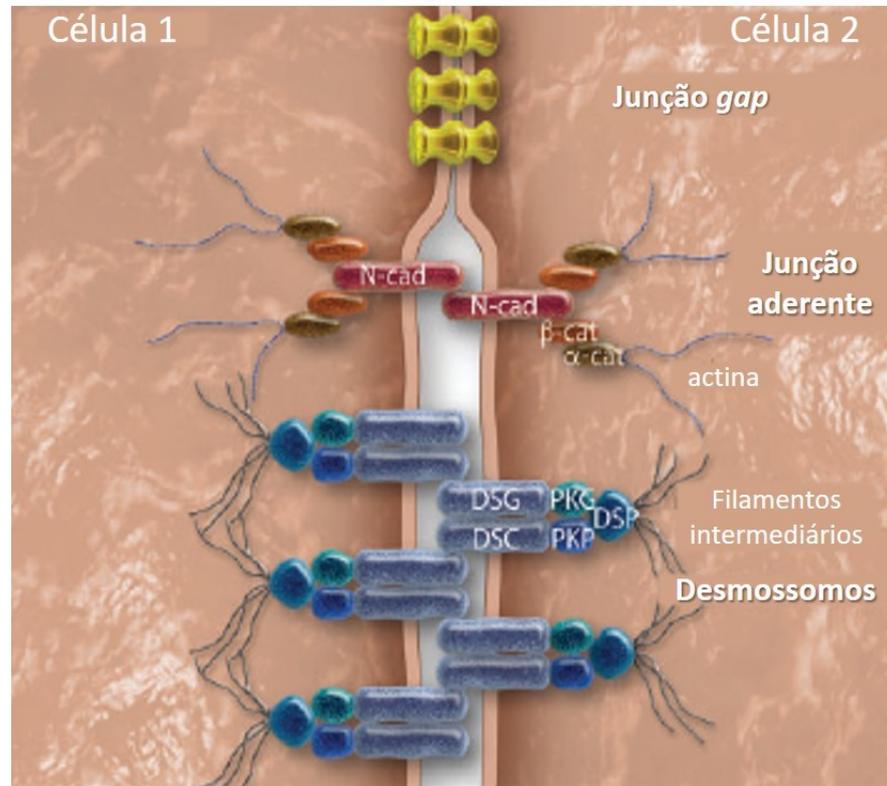
Figura 1: Estrutura dos discos intercalares, posicionadas transversalmente às fibras cardíacas. A) Fotomicrografia dos discos intercalares. B) Discos intercalares em microscopia eletrônica de transmissão.



Fonte: Adaptado de A) Junqueira e Carneiro, 2004; B) Manring et al., 2018.

As junções celulares que compõe os discos intercalares são as junções aderentes, os desmossomos e as junções comunicantes, do inglês “*gap junctions*”. As junções comunicantes, ou “*gap*”, são responsáveis pelo acoplamento elétrico, enquanto as junções aderentes e os desmossomos realizam o acoplamento mecânico. Aproximadamente 200 proteínas estão presentes na estrutura dos discos intercalares (VERMIJ et al., 2017, Figura 2).

Figura 2: Ilustração das junções celulares que compõe os discos intercalares. São representadas na Figura: N-caderina (N-cad),  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -cat),  $\alpha$ -catenina ( $\alpha$ -cat), desmogleína (DSG), plakoglobina (PKG), plakofilina (PKP) e desmoplakina (DSP).

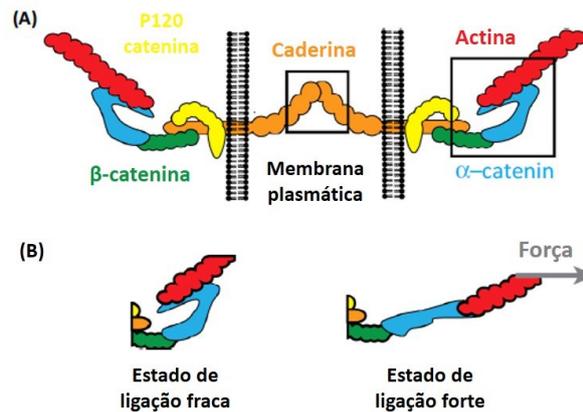


Fonte: Adaptado de VERMIJ et al., 2017.

As junções aderentes são junções celulares que transmitem a força contrátil pelos cardiomiócitos durante o ciclo cardíaco. Elas são responsáveis por manter a adesão mecânica e garantir a integridade do tecido cardíaco, já que agem ancorando os filamentos dos sarcômeros à estrutura do disco intercalar. A força mecânica pelas quais as proteínas das junções aderentes estão sujeitas durante um ciclo de contração desencadeiam mudanças de organização nos sarcômeros, bem como no formato da célula (Figura 3, Painel B). A principal constituinte das junções aderentes é a proteína transmembranar N-caderina, que possui 100 kD (NOORMAN et al., 2009). Os domínios extracelulares da N-caderina formam um homodímero com a N-caderina da célula vizinha numa ligação dependente de cálcio, formando dois monômeros que se aloca paralelamente ao sarcolema no espaço intercelular (20 nm) enquanto que o domínio citoplasmático se liga à  $\beta$ -catenina, outra proteína das junções aderentes (HOFFMANN e YAP, 2015). Quando desligada da estrutura dos discos intercalares, a  $\beta$ -catenina livre se transloca para o núcleo e ativa a via canônica de sinalização Wnt, envolvida na transcrição de genes envolvidos principalmente com a proliferação celular (MACDONALD et al., 2009). A  $\beta$ -

catenina dos discos intercalares, por sua vez, se liga à  $\alpha$ -catenina, que mediará a ligação com o citoesqueleto de actina, de forma a estabilizar essa estrutura (Figura 3, Painel A). O animal sem o gene da N-caderina tem depleção de outras proteínas presentes nos discos intercalares, desencadeando danos celulares (LI et al., 2001).

Figura 3: Ilustração do arranjo de proteínas que compõe as junções aderentes.



Fonte: Adaptado de HOFFMANN e YAP, 2015.

Os desmossomos também são junções que auxiliam no suporte do estresse contrátil sofrido pelos discos intercalares, servindo com uma forma de ancoragem célula-célula mais robusta por meio da ligação de suas proteínas com os filamentos intermediários. Os desmossomos possuem três famílias de proteínas, as caderinas desmossomais, plakinas e cateninas. As caderinas desmossomais também são proteínas transmembranares e formam um heterodímero produzido pela ligação, dependente de cálcio, da desmocolina com a desmoglobina. Ligado ao domínio citoplasmático desse heterocomplexo está outra família de cateninas, as plakoglobinas e plakofilinas, as quais fazem a conexão entre o heterocomplexo das caderinas desmossomais e a desmoplakina. A desmoplakina é a proteína que faz a ligação com a desmina, um tipo de filamento intermediário encontrado na banda Z dos sarcômeros (DELMAR e MCKENNA, 2010). Assim como as junções aderentes, a perda de proteínas desmossomais também leva à prejuízos para as células cardíacas, por exemplo, a depleção da plakofilina-2 provoca a diminuição da subunidade  $\alpha$  do canal de sódio dependente de voltagem, também presente na estrutura dos discos, resultando na redução da velocidade de propagação do estímulo (SATO et al., 2009).

O acoplamento elétrico nos discos é realizado pelas junções comunicantes, poros de baixa resistência, os quais fazem a comunicação direta entre células vizinhas permitindo a

propagação do estímulo elétrico. A proteína que forma o poro é chamada de conexina, sendo a conexina 43 (Cx-43) a mais prevalente em mamíferos. Além da Cx-43, é possível encontrar ainda a Cx-40 nos átrios e a Cx-45 é encontrada em pequenas quantidades, uma vez que estão presentes nos cardiomiócitos especializados dos nodos sinoatrial e atrioventricular, onde fornecem a baixa condutância necessária para a despolarização espontânea. O poro é formado por dois conexons de células vizinhas. Um conexon é um hemicanal formado por seis conexinas ligadas através de pontes dissulfeto. As junções comunicantes podem estar em conformação fechada ou aberta, dependendo da concentração de cálcio, sendo que o aumento de cálcio faz o canal se fechar (ACKERMANN et al. 2012). Esses canais podem ainda ser regulados por pH, voltagem, concentração de magnésio e fosforilação. As junções comunicantes podem sofrer diversas fosforilações no sentido de modular suas funções, mas algumas mudanças organizacionais provocadas pela fosforilação podem causar alterações essenciais para a dinâmica dessas estruturas. Isso ocorre porque a meia vida das conexinas é pequena, o que requer que elas estejam em constante rearranjo. Dentro das junções comunicantes, elas parecem ser segregadas de acordo com a idade, de modo que as novas conexinas estejam sempre indo para os bordos celulares e as conexinas antigas sejam trazidas de volta para o citoplasma para a posterior degradação.

A proteína de junção ocludente-1 (ZO-1) é quem permite a estabilidade da estrutura do conexon, regulando o seu tamanho e inibindo a incorporação de novos conexons. A ligação entre o conexon e a ZO-1 é mediada via o domínio PDZ. Essa estrutura formada entre as ZO-1 e os conexons são chamadas de perinexus (PALATINUS et al., 2010; RHETT et al., 2011). A ação de enzimas que fosforilam o conexon, como Src, AKT e MAPK medeiam o desligamento da ZO-1 e da conexina, sendo possível então o remodelamento da estrutura (MÁRQUEZ-ROSADO et al. 2012; VERMIJ et al., 2017).

As junções comunicantes dependem da estabilidade física e mecânica provida pelas junções aderentes, tanto que as junções aderentes surgem primeiro durante o desenvolvimento dos discos intercalares. Portanto, a ausência da N-caderina prejudica a produção e ação das Cx-43, mas o contrário não é verdadeiro (GUTSTEIN et al., 2002). Outro estudo com a mesma temática mostrou que o tratamento de cardiomiócitos de rato isolados em cultura com um peptídeo capaz de desfazer a ligação do homodímero de N-caderina nas junções aderentes foi capaz de reduzir a agregação celular e que o tratamento promoveu um indício de *turn over* para Cx-43, a qual foi translocada em parte dos bordos celulares para o citoplasma (ZHU et al.,

2010). Desta forma ficou evidenciado na literatura que a dissociação da estrutura das junções aderentes prejudica a comunicação entre estas e as junções comunicantes.

Conforme mostrado anteriormente, alterações nas quantidades e na função em uma das proteínas presentes nos discos intercalares podem desencadear uma série de modificações na organização destas estruturas. A literatura mostra que essas modificações estão envolvidas na fisiopatologia de diversas doenças cardíacas, por exemplo, cardiomiopatias arritmogênicas podem ser causadas por alterações nas proteínas desmossomais, assim como no surgimento da falência cardíaca (SHEIK et al., 2009; DOS SANTOS et al., 2016; KESSLER et al., 2017; CHEN et al., 2017).

Considerando a participação das proteínas dos discos intercalares na fisiopatologia de diversas doenças, Celes e colaboradores (2007) realizaram um estudo que mostrou a diminuição das proteínas N-caderina e conexina-43 no tecido cardíaco de camundongos sépticos. Além disso, foi mostrado também que há um remodelamento da estrutura dos discos intercalares durante a sepse. Os autores sugerem que exista relação entre as mudanças qualitativas e quantitativas observadas e a disfunção cardíaca que ocorre na sepse, porém ainda não existem dados na literatura que mostrem que a funcionalidade cardíaca seja diretamente alterada pela remodelação dos discos encontrada nesse estudo.

## 1.8 JUSTIFICATIVA

Considerando i) a gravidade da sepse; ii) a relevância dos gastos despendidos mundialmente; iii) a relevância da disfunção cardíaca na patogênese da sepse e iv) o papel crucial dos DI na fisiologia cardíaca, as análises realizadas no presente trabalho englobaram a imunolocalização da N-caderina, bem como a análise da morfologia dos discos intercalares nos cardiomiócitos de animais sépticos, com o intuito de questionar qual o papel dos discos na disfunção cardíaca e qual a participação do óxido nítrico na manutenção da sua estrutura deles, de forma a compreender melhor os mecanismos que desencadeiam a disfunção cardíaca existente na sepse.

## 1.9 HIPÓTESE

Animais sépticos apresentam alterações na estrutura dos discos intercalares durante a sepse envolvendo a N-caderina e o óxido nítrico, que podem estar relacionadas à disfunção cardíaca.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar se há alterações morfológicas nos discos intercalares na sepse e se o NO tem participação nestas alterações.

#### **2.1.1 Objetivos Específicos**

Confirmar a presença da sepse;

Analisar a morfologia e a imunolocalização da N-caderina no coração de animais sépticos;

Avaliar o papel do NO durante a sepse no tecido cardíaco;

Avaliar a influência do NO na marcação de N-caderina;

Avaliar a marcação de N-caderina após o tratamento com agente desnitrosilante.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas com média de idade de 90 dias e peso de 200 g fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia com água e ração *ad libitum*, ciclo claro e escuro (12/12h; luzes as 07:00 hs) e temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ . Os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (n° 2291220319 CEUA/UFSC).

#### 3.2 REAGENTES

Neste estudo foram utilizados os seguintes compostos: acetona e paraformaldeído (Synth, Diadema, SP, BR); bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de sódio ( $\text{NaHPO}_4$ ), (Merck, Brasil); o ácido ascórbico, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), 4',6-diamidino-2-phenilindol (DAPI), ácido fosfórico, meio de montagem aquoso Fluoromount, N-3-maleimildipropionil biotina (MPB), neocuproína, N-etilmaleimida, poli-L-lisina, soro fetal bovino (BSF), sulfanilamida,  $\alpha$ -naftil e Tween-20 (Sigma-Aldrich Co. LLC, St Louis, MO, EUA); *Tissue-tek* (Fisher Healthcare, Gardena, CA, EUA); Triton X-100 (Thermo Fisher, Waltham, MA, EUA); anticorpo contra N-Caderina conjugado à Alexa Fluor 594 (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA); Avidina conjugada ao fluorocromo isotiocianado de fluoresceína (FITC; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA); heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP); cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina (Syntec do Brasil Ltda., Santana de Parnaíba, SP, BR); isoflurano (BioChimico do Brasil Ltda., Brasil) e tramadol (Laboratório Teuto Brasileiro S.A., Anápolis, GO, BR).

#### 3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

##### 3.3.1 Indução da sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Os animais foram sedados com xilazina (5 mg/Kg) por via intraperitoneal (i.p.) e juntamente à sedação, foi realizada a analgesia com tramadol (10 mg/Kg). A anestesia foi realizada com isoflurano e, para tanto, os animais foram acomodados sobre uma manta aquecida a  $37^\circ\text{C}$  e a confirmação da perda dos reflexos foi feita através do pinçamento das patas. Foi realizada a laparotomia com incisão de aproximadamente 1 cm, permitindo a exposição do ceco para posterior ligadura não obstrutiva do ceco logo abaixo da valva ileocecal e perfuração única

e transfixante com agulha 14 G. A perfuração permitiu que, com uma leve compressão do ceco, ocorresse a saída do conteúdo intestinal. Ao final da cirurgia, os animais receberam reposição fluídica por via subcutânea (s.c.) com 30 mL/Kg de PBS (do inglês, *phosphate-buffered saline*) aquecido. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em ambiente aquecidos até a sua recuperação. A analgesia pós-cirúrgica (12 h) foi realizada com tramadol (5 mg/Kg, s.c.). Animais não operados (*naïve*) foram utilizados como controle.

### 3.3.2 Preparo das lâminas histológicas

Os animais, 6 h, 12 h e 24 h horas após serem submetidos à cirurgia de CLP, foram anestesiados terminalmente com sobredose de cetamina (200 mg/Kg), submetidos à abertura do tórax para exposição e remoção do coração, o qual foi dissecado e seccionado em duas metades. Uma das metades do coração foi colocada em um *blister* contendo *Tissue-tek*, congelada imediatamente com nitrogênio líquido e seguiu para o armazenamento a -80°C até o momento do uso. Secções histológicas de 5 µm foram feitas a -24° C em criostato Thermo Scientific HM525 NX do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC). Cada conjunto de lâminas continha quatro cortes de coração, sendo pelo menos um deles de um animal *naïve*.

### 3.3.3 Imunofluorescência

Um conjunto de lâminas foi destinado para a imunomarcção fluorescente da proteína N-caderina. Imediatamente após a montagem dos cortes nas lâminas, a fixação dos tecidos foi realizada com acetona. a 4° C por 10 minutos. O meio de montagem, *Tissue-tek*, foi retirado com três banhos de 10 minutos com água destilada. Os bordos das lâminas foram gentilmente secos para a aplicação de caneta hidrofóbica, a qual permite a formação de poços de soluções para as incubações das etapas seguintes. Os cortes foram então lavados por 20 minutos com PBS + Tween 0,5% para a permeabilização das membranas. Sucedeu-se o bloqueio das ligações inespecíficas com soro fetal bovino 5% por 1 hora. Em seguida, os cortes foram lavados por três vezes de 5 minutos com solução de PBS + Tween 0,5%. O anticorpo N-caderina conjugado à Alexa Fluor 594 (em diluição de 1:400) (IgG camundongo monoclonal, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) foi incubado durante a noite a 4°C. No dia seguinte o anticorpo foi removido e os cortes foram lavados seis vezes por 5 minutos com PBS + Tween 0,5%. A marcação dos núcleos celulares foi feita com DAPI (4',6-diamidino-2-phenilindol; Sigma

Aldrich) (1  $\mu\text{g/mL}$ ). Por fim, as lâminas foram montadas com meio de montagem Fluoromount (Sigma Aldrich).

### 3.3.4 Formação de nitrosotióis

O protocolo experimental descrito a seguir foi adaptado de Jaffrey e Snyder (2001) e Ckless et al., (2004), com modificações feitas por Benedet et al., (2018). Esse ensaio detecta proteínas S-nitrosiladas através da substituição do grupo NO ligado ao resíduo de cisteína pela biotina. Os animais foram anestesiados e perfundidos com uma solução de PBS contendo 0,1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e 0,01 mM de neocuproína por cinco minutos. Os corações foram coletados rapidamente, dissecados e congelados imediatamente com nitrogênio líquido em meio de congelamento Tissue-Tek e posteriormente armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Os tecidos foram cortados em criostato (Thermo Scientific HM525 NX do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB/UFSC) na espessura de 5  $\mu\text{m}$  e temperatura de  $-24^{\circ}\text{C}$  e colocados em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina para a adesão do corte. Para a remoção do meio de congelamento, os cortes foram lavados com água destilada por 3 vezes durante 10 minutos. Em seguida, os cortes foram fixados em lâmina utilizando paraformaldeído 4% diluído em PBS, durante 20 min, e posteriormente lavados utilizando tampão de lavagem (PBS, 25 mM de HEPES, 0,1 mM de EDTA, 0,1 mM de neocuproína e Triton X-100 1%). Foi passada ao redor dos cortes caneta de tinta hidrofóbica, a qual permitiu a manutenção do líquido das incubações seguintes em cima dos cortes. Para cada conjunto de lâminas, uma lâmina foi destinada para o controle negativo da técnica. O  $\text{HgCl}_2$  é capaz de desfazer as ligações das proteínas com os nitrosotióis e serviu para detectar a autofluorescência basal do tecido. Os cortes foram incubados por 5 min com  $\text{HgCl}_2$  100  $\mu\text{M}$  diluído em PBS seguido por lavagens com PBS. Para bloquear as sulfidrilas livres, os cortes foram incubados com 20 mM de N-etilmaleimida (NEM) durante 40 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  e em seguida foram lavados com tampão de lavagem. Na etapa seguinte, ocorreu a biotinilação das sulfidrilas ligadas ao NO. Os cortes foram incubados simultaneamente com ácido ascórbico (1 mM), cloreto de cobre (10  $\mu\text{M}$ ) e N-3-maleimidilpropionil biotina (0,05 mM) em PBS por 1 hora a temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com tampão de lavagem e então, para a amplificação do sinal e para a visualização de cor ao microscópio, os cortes foram incubados com avidina conjugada ao fluorocromo isotiocianado de fluoresceína (FITC) na proporção de 1:800, durante 1 hora a temperatura ambiente (Figura 2). Procedeu-se a lavagem e ao final a incubação com DAPI para marcação dos núcleos na proporção de 1 mg/1mL por 5 minutos e

então 3 últimas lavagens com tampão de lavagem. As lâminas foram montadas com Fluoromount (Sigma Aldrich). Três campos aleatórios de cada corte foram fotografados em microscópio confocal Leica DMI6000 B, no filtro 418 nm. Todo o procedimento, desde a coleta do coração até a leitura das lâminas foi feito ao abrigo de luz para evitar a degradação dos nitrosotióis.

### 3.3.5 Dosagem de nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub>)

Os níveis de NO<sub>x</sub> foram avaliados através da quantificação da concentração de nitrito e nitrato no plasma. Primeiramente, as amostras foram desproteinizadas e o nitrato foi convertido em nitrito, pela enzima nitrato redutase presente em *Escherichia coli* por 3 horas a 37°C. As amostras foram então centrifugadas, o sobrenadante foi coletado e adicionado ao reagente de Griess (Granger et al., 1990). A reação colorimétrica foi lida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 540 nm. Uma curva padrão de nitritos foi feita simultaneamente para correlação da concentração obtida na amostra. Os resultados foram expressos em µM NO<sub>x</sub>.

### 3.3.6 Análises bioquímicas

As amostras de sangue foram coletadas através do acesso da aorta abdominal dos animais previamente anestesiados em microtubos contendo 10 UI de heparina sódica para cada mL de sangue. Obteve-se o plasma das amostras centrifugado (1500 x g) o sangue por 10 minutos a temperatura ambiente. Os parâmetros descritos a seguir foram mensurados de maneira automatizada, utilizando o equipamento Dimension RxL Max HM (Siemens Healthineers, Erlanger, BY, Alemanha).

#### 3.3.6.1 Aspartato aminotransferase (AST)

Os níveis da enzima AST foram determinados, utilizando o equipamento Dimension RxL Max HM (Siemens Healthineers, Erlanger, BY, Alemanha). A dosagens foram feitas a partir de kits comerciais da Siemens, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de AST foram determinados em U/L.

#### 3.3.6.2 Alanina aminotransferase (ALT)

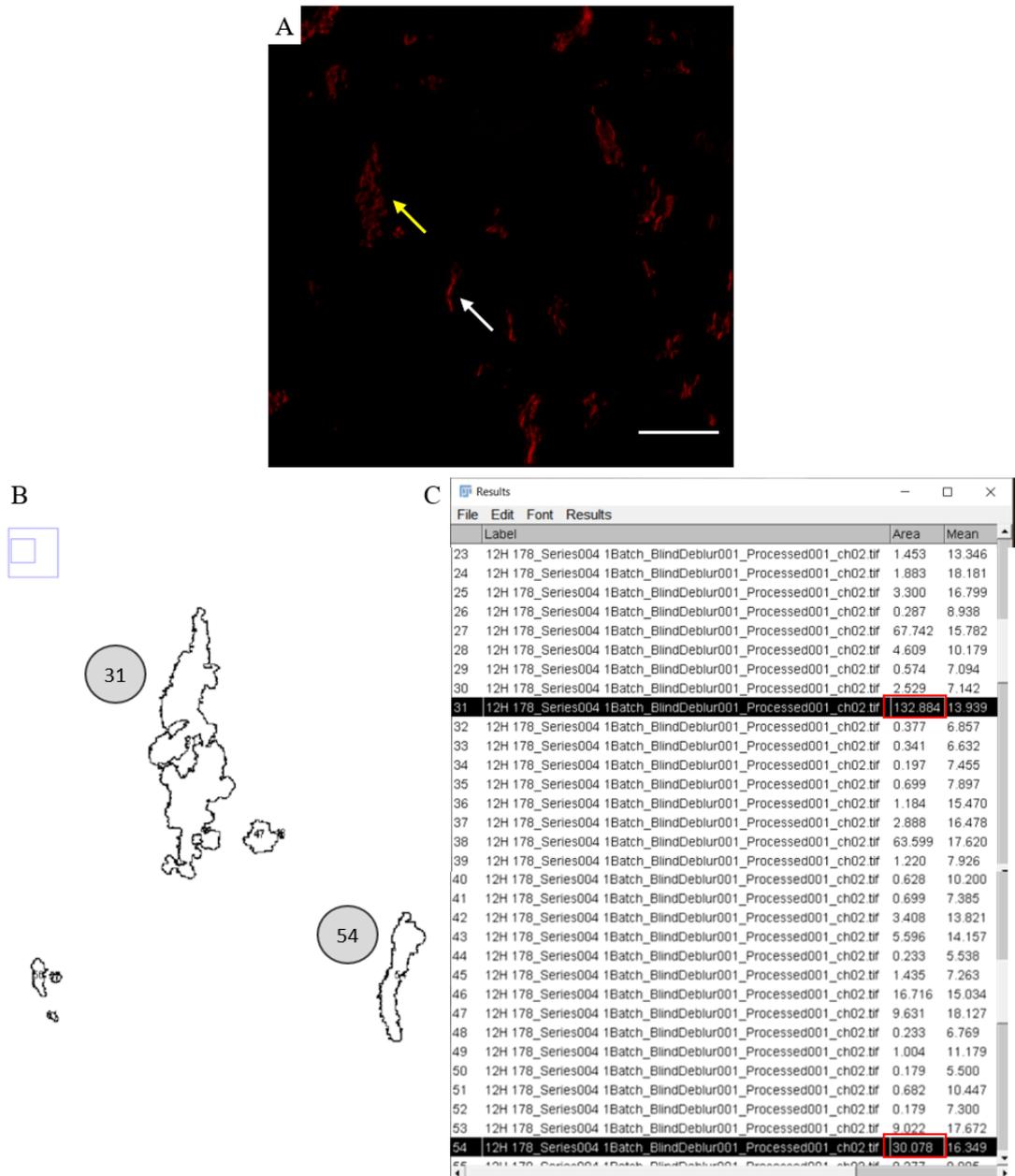
Os níveis da enzima ALT foram determinados, utilizando o equipamento Dimension RxL Max HM (Siemens Healthineers, Erlanger, BY, Alemanha). A dosagens foram feitas a

partir de kits comerciais da Siemens, de acordo com as instruções do fabricante. Os níveis de ALT foram determinados em U/L.

### 3.3.7 Análise das imagens obtidas por microscopia de fluorescência

De cada animal foram obtidos dois cortes, um utilizado para a imunomarcagem com N-caderina e outro para a avaliação da nitrosilação no tecido cardíaco. Os cortes para N-caderina foram avaliados com aumento de 400x e em maior aumento, 1200x para a análise da morfologia da marcação. O corte usado para detecção e quantificação da nitrosilação foi fotografado apenas no aumento de 630x. Para cada aumento foram avaliados três campos microscópicos, resultando em três fotos de cada aumento para cada animal. As imagens apresentadas no presente trabalho foram avaliadas através do software Image J, acrescido do pacote Fiji (NIH Image). Para quantificação, o tamanho da área a ser analisada foi normalizada para um valor igual para todas as imagens. Nas imagens com os aumentos de 400x e 630x, o parâmetro analisado foi a fluorescência total através da quantificação da soma dos pixels contidos naquela área e o valor final para cada N amostral foi obtido através da média dos três campos microscópicos. Para as imagens de maior aumento (para melhor compreensão da estratégia usada para esta quantificação, veja a Figura 4), onde é possível individualizar “partículas” de marcação, definiu-se três intervalos de tamanho destas partículas: i) área menor que 10 micrômetros foram consideradas como artefato; ii) área entre 10 e 49,99 micrômetros foram consideradas como áreas de discos de tamanho normal e iii) áreas maiores do que 50 micrômetros foram consideradas como representativas de discos intercalares dilatados. A partir daí, a soma das áreas de todas as partículas forneceu a área total daquele disco (parâmetro designado como *Area* no software. No Painel A é mostrada uma foto típica da marcação de N-caderina em corte de coração de rato em aumento de 1200x. A barra corresponde à 50 micrômetros e as setas identificam dois discos intercalares. Usando a estratégia acima, o programa identifica os discos que atendem às definições, os transforma em contornos e atribui números à cada um (Painel B). Na figura só estão mostrados os contornos dos discos assinalados pelas setas no Painel A. No Painel C, vê-se a tabela gerada pelo programa com a área de todos os contornos encontrados na foto e que atendem as definições feitas. Estão destacados os valores dos discos mostrados no Painel B. O disco 54 é uma estrutura normal e o disco 31 mostra a estrutura dilatada (setas branca e amarela, respectivamente, no Painel A).

Figura 4: Representação da metodologia de análise da área dos discos intercalares. No Painel A é mostrada uma foto típica da marcação de N-caderina em corte de coração de rato em aumento de 1200x. A barra corresponde à 50 micrômetros e as setas identificam dois discos intercalares, a seta amarela mostra uma marcação de N-caderina considerada dilatada e a seta branca mostra uma marcação considerada normal. No Painel B é possível visualizar os contornos das marcações feitas pelo programa. A tabela gerada pelo programa com a área de todos os contornos encontrados é vista no Painel C.



Fonte: HAHMEYER, 2020.

### 3.4 GRUPOS E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

A obtenção de material para avaliação dos parâmetros estudados neste trabalho contou com quatro grupos experimentais, sendo eles o grupo controle e grupos de diferentes tempos

(6, 12 e 24 horas) após a cirurgia de ligadura e punção cecal, que definia o início da sepse. Com o intuito de avaliar o envolvimento do NO na morfologia dos discos intercalares, um grupo de animais normais foi tratado com doador de óxido nítrico S-nitroso-N-acetilpenicilamina (SNAP) na dose de 45  $\mu\text{mol/kg}$  s.c. Outro grupo de animais normais foi tratado com SNAP e 12 horas após, com o agente desnitrosilante 5,5-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzoico) (DTNB) na dose 63  $\mu\text{mol/kg}$  s.c., diluído em bicarbonato de sódio 5% (BENEDET et al., 2017).

### 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

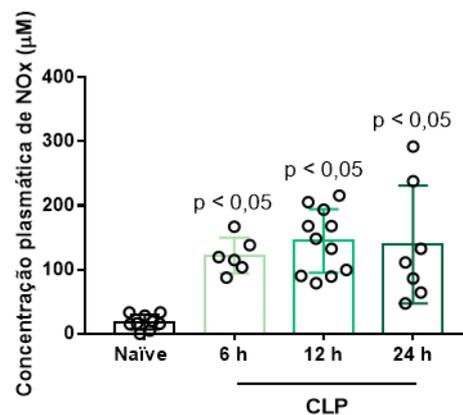
O N amostral foi definido por planejamento estatístico feito através do software G Power, onde definiu-se o poder do teste ( $\beta$ ), como 80% e nível de significância ( $\alpha$ ) como 0,05. Os dados coletados foram quantitativos e as variáveis independentes foram relativas aos grupos experimentais (naïve e CLP) e as variáveis dependentes são relativas aos valores quantitativos obtidos pelas diferentes metodologias empregadas, os quais são expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e as análises estatísticas foram feitas utilizando GraphPad Prism (Graph Pad Software, San Diego, CA). A normalidade dos dados foi verificada pelo teste Shapiro-Wilk e a variância pelo teste de Bartlett. Os dados foram analisados por ANOVA de uma via seguido de *post hoc* de Dunnett, quando os grupos foram comparados somente com o grupo controle (naïve) ou Tukey, quando todos os grupos foram comparados entre si. Valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NITRATO E NITRITO (NO<sub>x</sub>)

A concentração dos metabólitos estáveis do NO, nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub>) é um importante marcador da sepse por indicar a produção e liberação de NO. A condição de sepse adotada neste estudo foi capaz de aumentar significativamente os níveis de NO<sub>x</sub> em todos os tempos de análise do curso temporal, quando comparados aos animais (Figura 5). O aumento dos níveis de NO<sub>x</sub> é um indicativo da instauração do quadro de sepse nos animais.

Figura 5: Avaliação dos metabólitos do NO, nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub>).

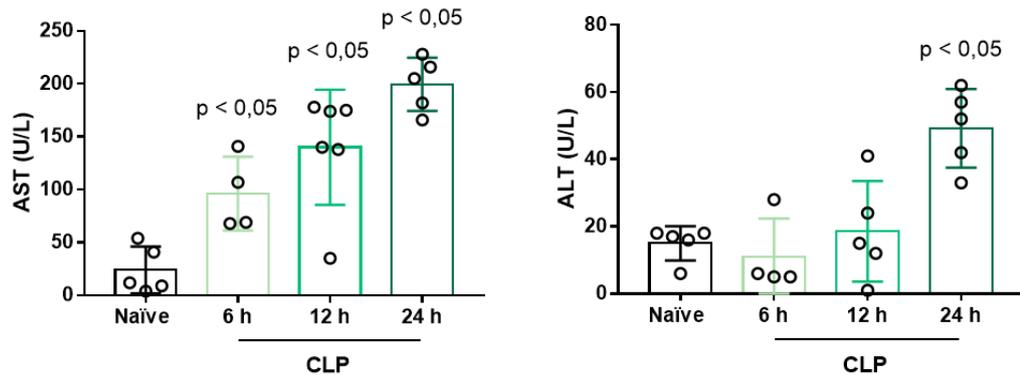


As dosagens dos níveis de nitrato e nitrito do NO foram determinadas pelo método de Griess e expressadas como NO<sub>x</sub> (µM). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnet. As barras representam média ± DPM.

### 4.2. QUANTIFICAÇÃO DOS MARCADORES BIOQUÍMICOS DE DANO DE ÓRGÃOS

A função hepática foi avaliada através da dosagem das enzimas aspartato e alanina aminotransferase. O dano de órgãos decorrente da sepse foi confirmado após o aumento significativo de AST a indução da sepse. A enzima ALT aumentou significativamente com pico enzimático após 24 h da sepse (Figura 6).

Figura 6: Mensuração dos marcadores bioquímicos séricos em animais sépticos.



Amostras analisadas quanto aos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Dunnet. As barras representam a média  $\pm$  DPM.

#### 4.3. IMUNOMARCAÇÃO DA PROTEÍNA N-CADERINA DURANTE O CURSO TEMPORAL DA SEPSE

Como dito anteriormente, a N-caderina é um importante componente dos discos intercalares cardíacos e foi utilizada como repórter de alterações na estrutura deles. A Figura 7 mostra que a sepse induz um aumento da intensidade da imunomarcação da proteína N-caderina em cortes de coração e que este aumento é tempo dependente, tendo alcançado seu pico 12 h após a indução do quadro séptico.

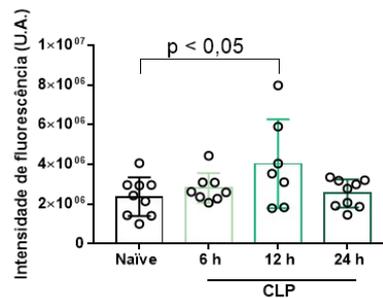
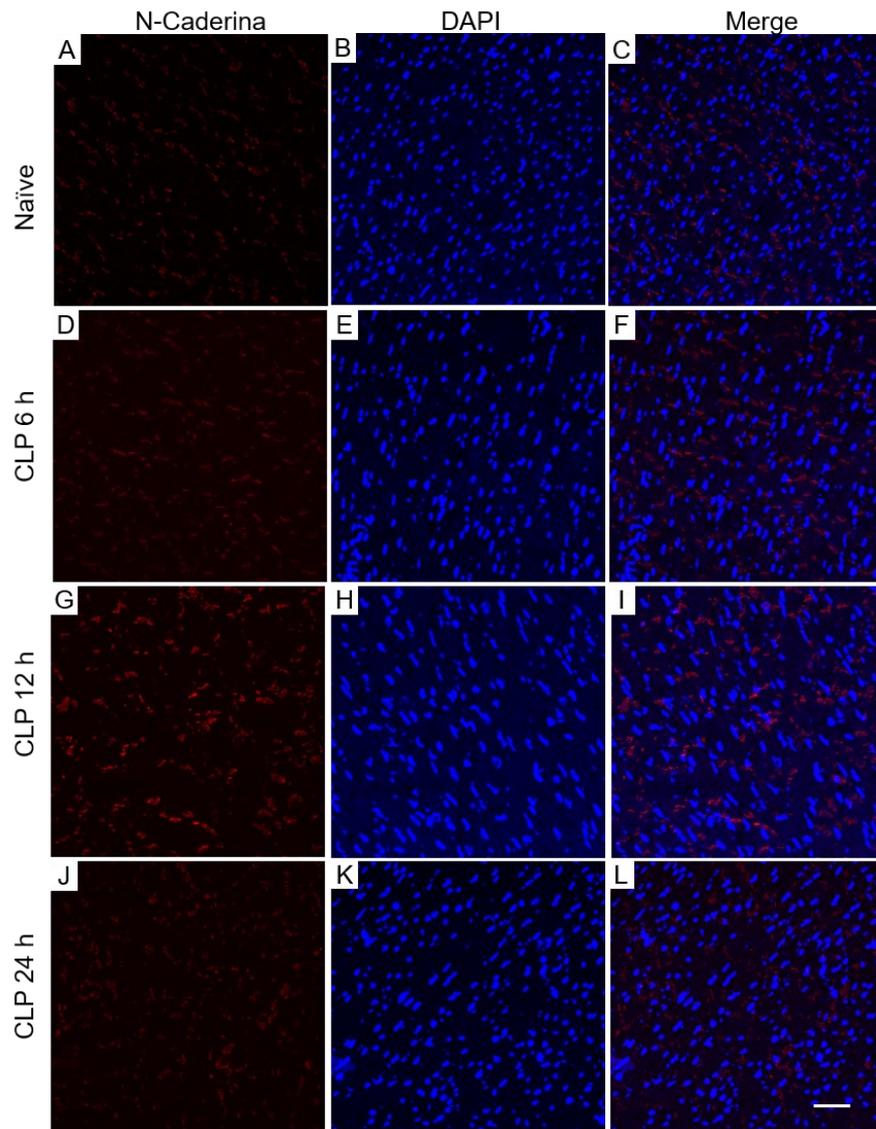
Durante a análise da fluorescência, percebemos que além do aumento da imunomarcação nos animais sépticos, havia também alteração na estrutura dos discos. No entanto estas não ficavam tão evidenciadas em uma vista panorâmica do tecido.

Um exame mais cuidadoso das imagens mostra alguns aspectos relevantes. Um deles é o fato de que a imunomarcação da N-caderina nos discos do corte de coração de um animal normal assemelha-se à pequenos “riscos” quase sempre perpendiculares aos núcleos (em azul; Figura 6, setas brancas). Na sexta hora após o início do quadro séptico já se notam extensas alterações na imunomarcação na forma de aparente “alargamento” ou “dilatação” dos discos. O alargamento dos discos deixa a marcação heterogênea, com aspecto granuloso (Figura 8, setas amarelas). Ambas as alterações foram por nós interpretadas como uma desestruturação da sua forma. Este quadro se mantém 12 horas depois da sepse e a desestruturação parece ser pelo

menos parcialmente revertida 24 h após a sepse. A variação de padrões estruturais nesse período é grande, sendo possível observar desde alguns poucos discos dilatados, até discos fragmentados e discos normais. O arranjo dito como fragmentado corresponde a marcações similares áreas hachuradas de uma figura e pontilhados de marcação (Figura 8, círculo verde). A fragmentação dos discos parece ser uma etapa intermediária para o retorno a estrutura normal.

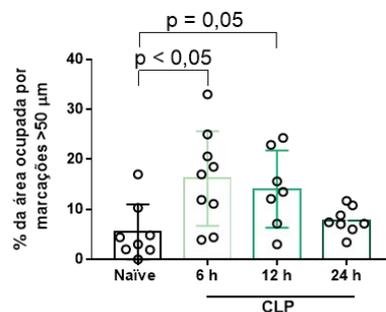
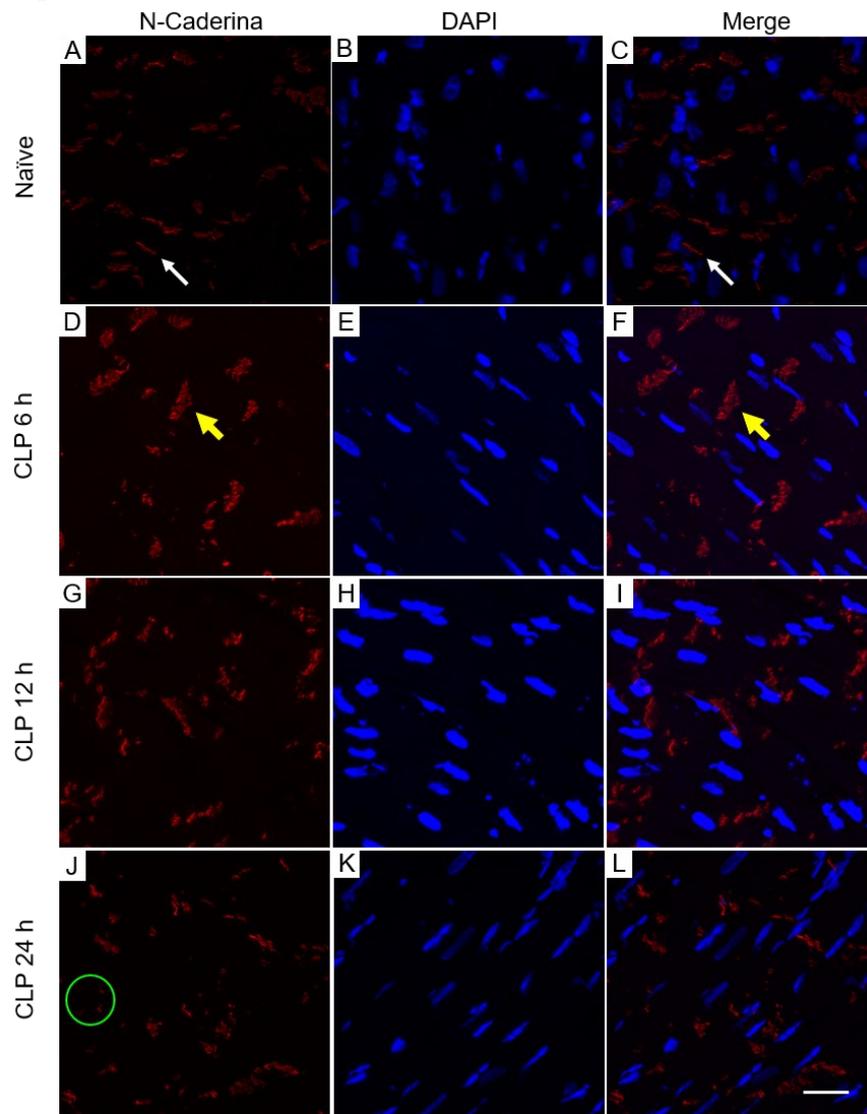
O exame da morfologia dos núcleos celulares sugere um aumento no seu tamanho principalmente no tempo de 12 h. Embora não tenhamos aprofundado neste aspecto, isto pode ser indicativo de edema celular que talvez tenha relação como causa ou efeito do alargamento dos discos.

Figura 7: Curso temporal da imunomarcação de N-caderina em corações de ratos submetidos ao protocolo de indução de sepse por CLP.



Imagens representativas da imunomarcação para N-caderina no tecido cardíaco (A, D, G, J), para núcleos feita com DAPI (B, E, H, K) e a junção das imagens. Para efeito de facilitar a visualização o brilho foi aumentado em 50% para todos os painéis. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Na quantificação da fluorescência cada círculo representa um animal e as barras representam média  $\pm$  DPM. Análise estatística ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Dunnett.

Figura 8: Detalhes da imunomarcção de N-caderina em corações de ratos submetidos ao protocolo de indução de sepse por CLP.

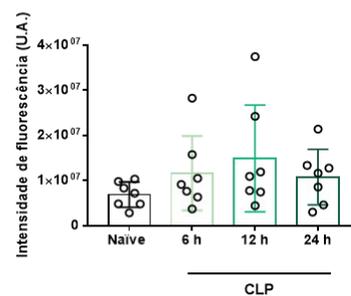
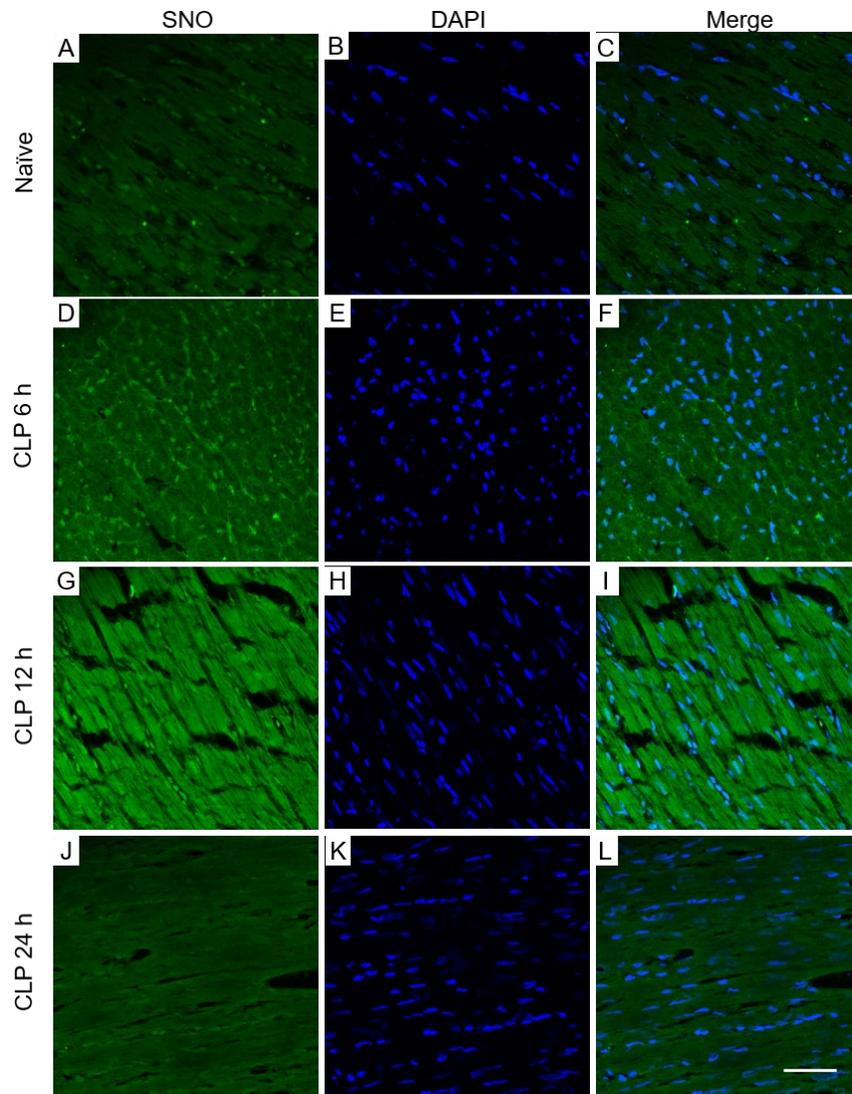


Imagens representativas da imunomarcção para N-caderina no tecido cardíaco (A, D, G, J), para núcleos feita com DAPI (B, E, H, K) e a junção das imagens. As setas brancas indicam discos considerados normais, as setas amarelas mostram discos dilatados e o círculo verde delimita fragmentos de marcação. Para efeito de facilitar a visualização o brilho foi aumentado em 35% para todos os painéis. Barra de escala = 20  $\mu\text{m}$ . Na quantificação da fluorescência cada círculo representa um animal e as barras representam média  $\pm$  DPM. Análise estatística ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Dunnet.

#### 4.4. NITROSILAÇÃO DE PROTEÍNAS NO TECIDO CARDÍACO

Quando avaliada a nitrosilação em relação ao curso temporal da sepse não foi possível observar aumento significativo da nitrosilação de proteínas, mas pode-se visualizar uma tendência de crescimento gradual das intensidades de fluorescência em 6 h, com pico em 12 h e queda em 24 h após a sepse (Figura 7). A marcação das proteínas é homogênea em todo o coração, não havendo regionalização, muito embora seja possível distinguir a localização do núcleo através do aumento de intensidade na marcação deste para todos os grupos experimentais apresentados. Alguns testes para a validação do protocolo aqui apresentado permitiram a nós entendermos que o acréscimo do reagente cloreto de cobre favorece a visualização da marcação de alvos mais protegidos, como o núcleo.

Figura 9: Análise por imunofluorescência da quantidade de nitrosotóxis em tecido cardíaco no curso temporal da sepse em animais submetidos ao CLP.



Imagens representativas da imunomarcagem nitrosotóxis no tecido cardíaco (A, D, G, J), para núcleos feita com DAPI (B, E, H, K) e a junção das imagens. Para efeito de facilitar a visualização o brilho foi aumentado em 20% para todos os painéis. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Na quantificação da fluorescência cada círculo representa um animal e as barras representam média  $\pm$  DPM. Análise estatística ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Dunnett.

#### 4.5. PARTICIPAÇÃO DO NO NA ALTERAÇÃO MORFOLÓGICA DOS DISCOS INTERCALARES

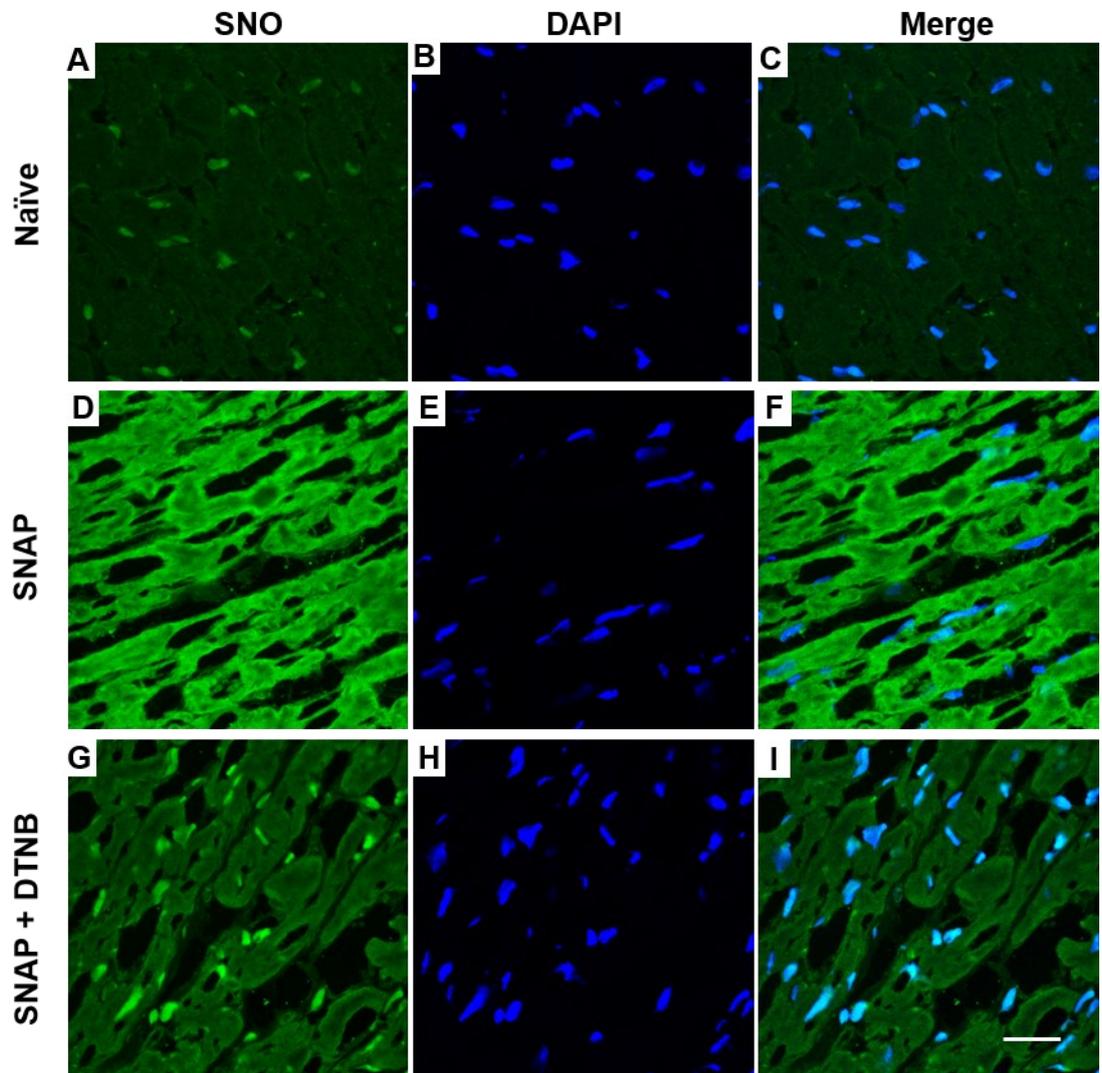
Em vista da tendência ao aumento da nitrosilação decorrente da sepse no tecido cardíaco, questionou-se se o NO isoladamente seria capaz de desencadear alterações na morfologia dos discos similares às encontradas no curso temporal da sepse. Assim, a abordagem do estudo foi redirecionada e, para tanto, animais normais foram tratados com um doador de óxido nítrico, SNAP, para simular o excesso de liberação de NO ocasionado pela sepse e com um agente desnitrosilante, o reagente de Ellman, ou DTNB, para verificar se a desnitrosilação era capaz de reverter a dilatação.

Como prova de conceito de que o SNAP de fato aumenta a nitrosilação no tecido cardíaco e que o DTNB reduz a marcação para nitrosotióis, foi executada a técnica de *Biotin-Switch* com essas amostras (Figura 10).

A imunomarcação para N-caderina mostrou que o tratamento com SNAP é capaz de provocar aumento da intensidade de marcação, assim como o encontrado em animais sépticos. No entanto, a redução de intensidade esperada, não aconteceu com o tratamento com DNTB (Figura 11).

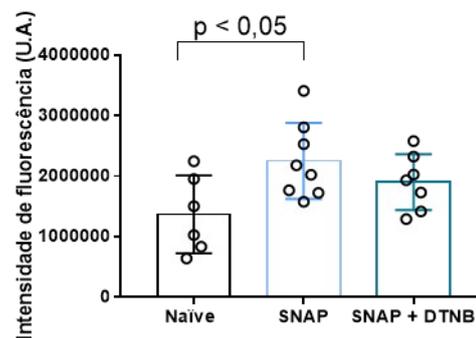
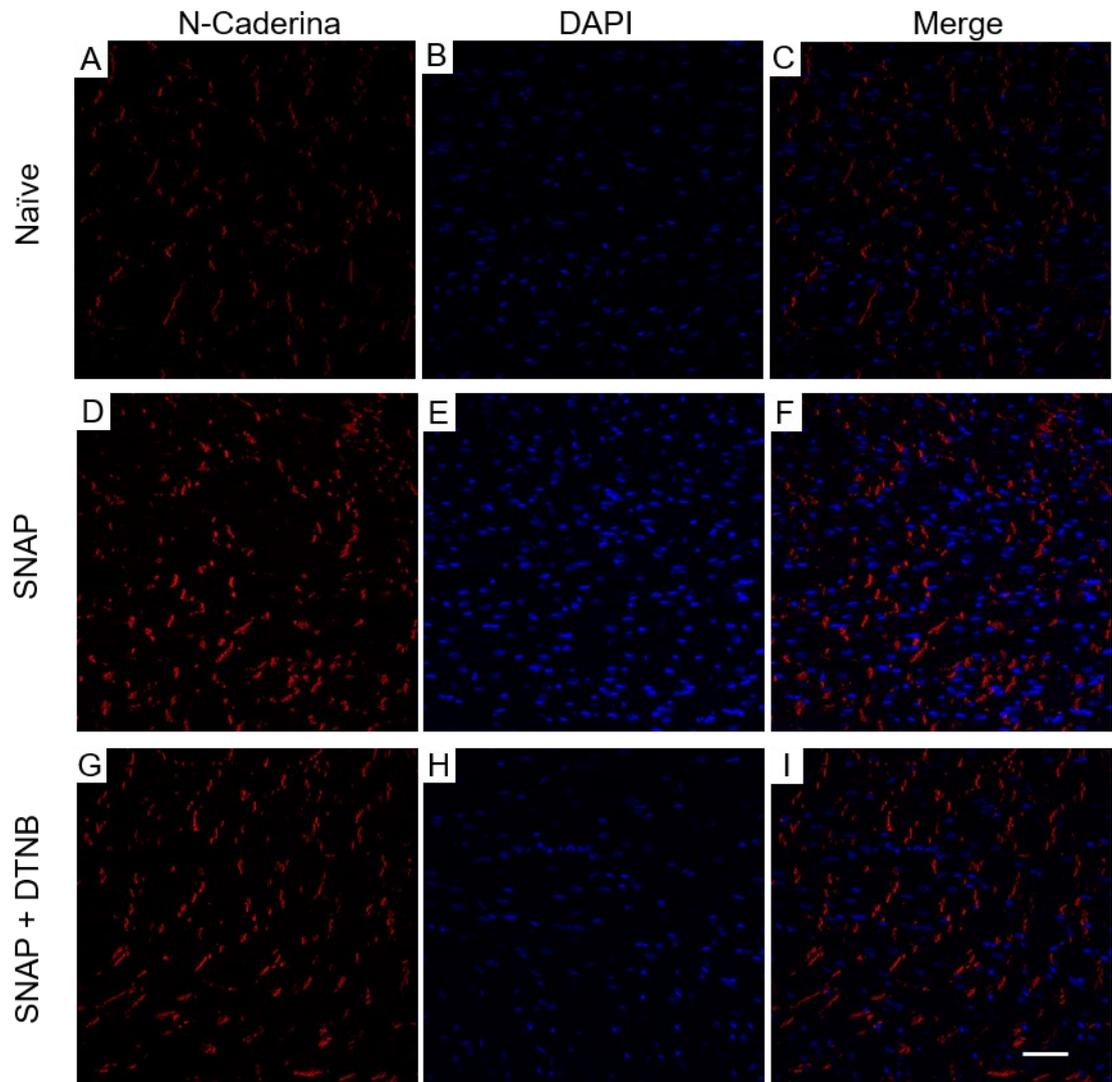
A morfologia dos discos intercalares também sofreu alterações pelo tratamento com SNAP, sendo significativamente diferente do grupo não tratado. Com esse tratamento, foi possível perceber o mesmo padrão de alargamento dos discos provocado pela sepse, bem como a fragmentação deles, similar a hachuras. A desnitrosilação, obtida através do tratamento com DTNB não provocou a restauração da morfologia dos discos, ainda que visualmente seja possível observar uma maior compactação deles (Figura 12).

Figura 10: Imunofluorescência dos nitrosotíóis em tecido cardíaco de animais tratados com SNAP e DTNB.



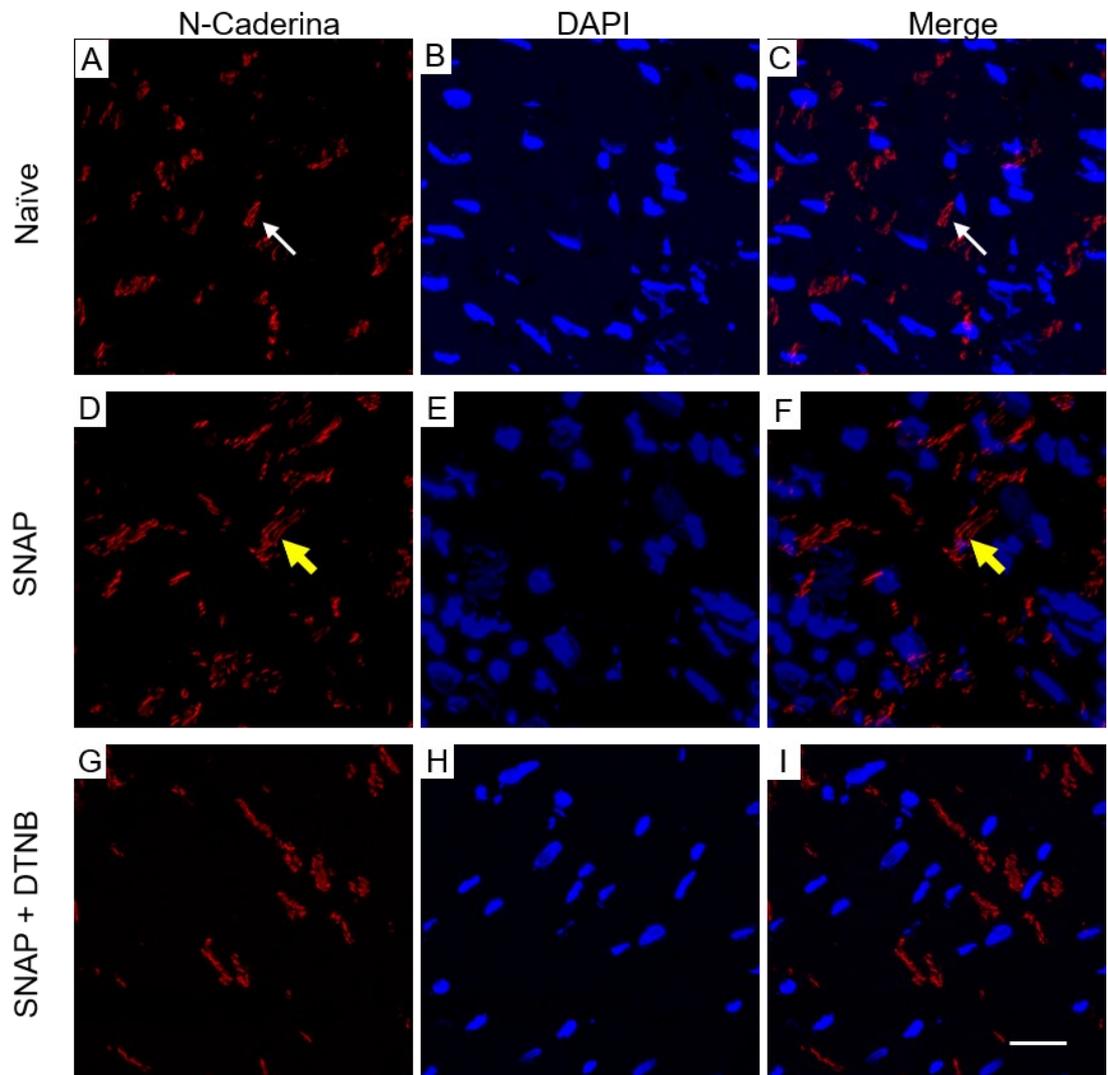
Imagens representativas da imunomarcção nitrosotíóis no tecido cardíaco (A, D, G, J), para núcleos feita com DAPI (B, E, H, K) e a junção das imagens. Para efeito de facilitar a visualização o brilho foi aumentado em 20% para todos os painéis. Barra de escala = 50  $\mu$ m.

Figura 11: Efeito do tratamento com SNAP e com DTNB na imunomarcção dos discos intercalares.



Imagens representativas da imunomarcção para N-caderina no tecido cardíaco (A, D, G, J), para núcleos feita com DAPI (B, E, H, K) e a junção das imagens. Para efeito de facilitar a visualização o brilho foi aumentado em 35% para todos os painéis. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Na quantificação da fluorescência cada círculo representa um animal e as barras representam média  $\pm$  DPM. Análise estatística ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

Figura 12: Efeito do tratamento com SNAP e com DTNB na morfologia dos discos intercalares em maior aumento.



Imagens representativas da imunomarcagem para N-caderina no tecido cardíaco (A, D, G, J), para núcleos feita com DAPI (B, E, H, K) e a junção das imagens. As setas brancas indicam discos considerados normais e as setas amarelas mostram discos dilatados. Para efeito de facilitar a visualização o brilho foi aumentado em 20% para todos os painéis. Barra de escala = 20 μm. Na quantificação da fluorescência cada círculo representa um animal e as barras representam média ± DPM. Análise estatística ANOVA de uma via, seguido do teste *post hoc* de Tukey.

#### 4 DISCUSSÃO

Os dados apresentados neste trabalho mostram aumento da intensidade de fluorescência, dilatação e fragmentação da marcação para N-caderina em células cardíacas de animais sépticos. A marcação para essa proteína é um indicativo da localização e da organização estrutural dos discos intercalares. Sendo assim, as alterações morfológicas encontradas na marcação da N-caderina indicam que durante a sepse a estrutura dos discos intercalares é afetada.

Utilizamos o modelo de indução de sepse por CLP em ratos no delineamento deste estudo. Este modelo se assemelha a diversos aspectos clínicos da sepse, permitindo que a gravidade seja modificada de acordo com o objetivo do estudo. A confirmação da instauração de um quadro de sepse com dano de órgãos foi feita através do aumento dos níveis das enzimas hepáticas AST e ALT no plasma dos animais e dos níveis plasmáticos aumentados dos metabólitos do óxido nítrico, nitrito e nitrato (NOx).

Nas primeiras horas do pós-sepse, foi observada a dilatação dos discos e 24 h após os discos parecem, pelo menos parcialmente, voltar a sua estrutura normal. O padrão de marcação ao longo do curso temporal da sepse pode ser interpretado como etapas da dissociação de uma estrutura. Após 6 h a marcação da N-caderina nos discos de corações de animais sépticos se mostra de forma heterogênea, floculada e ocupando maior dimensão do que nos animais controle. Em 12 h o padrão se mantém e não há aumento em relação ao tempo de 6 horas. Decorridas 24 h parte dos discos ainda estão bastantes fragmentados, mas uma parcela grande apresenta estrutura normal. Como dito anteriormente, discos intercalares são estruturas essenciais para o bom funcionamento do coração como um sincício. Também como dito anteriormente, a N-caderina é proteína essencial para a correta formação das junções entre miócitos. Portanto, nossa assunção é que alterações na morfologia do arranjo de N-caderina espelham alterações morfológicas em todo o disco intercalar. Importante notar que estas alterações se manifestam em tempo precoce do quadro séptico. A disfunção cardíaca da sepse deve estar relacionada mais a uma real “disfunção” do que alterações morfológicas irreversíveis. Considerando o papel crucial dos discos intercalares na correta sincronização dos eventos elétricos e mecânicos cardíacos, alterações neles podem acarretar falhas na funcionalidade, mas, por serem estruturas dinâmicas podem ser recompostos em tempos relativamente curtos. Importante também lembrar que a sepse tem dois momentos distintos: a fase hiperdinâmica precoce onde o coração ainda mantém sua capacidade de bombeamento, seguida por uma fase hipodinâmica onde o músculo já não consegue responder adequadamente

à demanda. Esta sequência parece ser reproduzida no curso temporal das alterações da marcação da N-caderina durante a sepse.

Segundo a literatura (ROAK et al., 1993), a N-caderina é passível de sofrer fragmentação pela ação de metaloproteinases, resultando em dois fragmentos, um contendo o domínio citoplasmático e transmembrana e outro com o domínio extracelular. Considerando esse modelo de fragmentação e o fato de que o anticorpo utilizado se liga ao seu epítipo específico que fica no domínio extracelular da proteína, na nossa interpretação o aumento da intensidade fluorescência visto após 12 h de sepse e com SNAP (Figuras 7 e 11) se deve ao fato da ligação do anticorpo com a N-caderina ainda intacta, a qual não passou pelo processo de fragmentação e também, pela ligação com os fragmentos de N-caderina, não sendo este resultado, portanto, um indicativo de aumento de expressão da proteína.

Nossos dados contrastam com os resultados obtidos no trabalho de Celes e colaboradores (2007), onde a imunomarcação para N-caderina apresentou-se reduzida em corações de animais submetidos à sepse. É importante ressaltar que no estudo de Celes et al., (2007) o tempo avaliado após a sepse foi apenas o ponto de 24 h e que os animais utilizados eram camundongos machos C57BL/6. Além da espécie animal ser distinta da nossa uma outra razão para esta discrepância é que, tendo em vista que o modelo de sepse usado pelos autores é mais severo do que o modelo utilizado no presente trabalho, em 24 h os discos poderiam ainda estar fragmentados. Como visto em nossos resultados, a fragmentação dos discos fornece uma marcação com menor área e visualmente menos intensa, o que é compatível com a redução de intensidade de fluorescência. Vale ressaltar também que um exame mais cuidadoso dos dados de Celes et al (2007) mostrou alargamento da estrutura dos discos através da deiscência entre os bordos celulares que compõem os discos por meio da microscopia eletrônica. Apesar de termos utilizado metodologias diferentes, em ambos os trabalhos, podemos ver o prejuízo causado pela sepse na estrutura dos discos intercalares. Em nossa interpretação, Celes e colaboradores só não chegaram as mesmas conclusões que nós nos resultados de imunofluorescência, pois utilizaram apenas um *time point*. A junção dos resultados de ambos os trabalhos, mesmo sendo em roedores distintos, nos permite acreditar que nas primeiras horas de sepse há o desmonte da estrutura dimérica da N-caderina. Por ser uma proteína basilar para a integridade do tecido cardíaco, a dissociação ocorre pouco a pouco, de modo que o impacto causado por este desmonte seja atenuado até o momento de *turn over* após 24 h, com diminuição da marcação.

As alterações morfológicas encontradas nesse trabalho nos fazem questionar sobre qual a consequência destas para a fisiologia cardíaca durante a sepse. O alargamento e a fragmentação da marcação da proteína N-caderina nos animais sépticos indica que os bordos celulares se distanciaram e que a ligação entre as N-caderinas que compõem o dímero presente nas junções aderentes dos discos intercalares parece ter sido enfraquecida.

Na seção introdutória, foi comentada a importância das junções que compõem os discos intercalares, em particular, as junções aderentes. Interpretando a importância dessa junção pelo lado anatômico, pode-se dizer que preservação do arranjo das junções aderentes, permite que o coração suporte a força mecânica despendida a cada batimento cardíaco, mantendo as células unidas e o tecido íntegro. Tão importante quando para anatomia cardíaca, as junções aderentes contribuem enormemente para o correto funcionamento fisiológico do coração. As junções aderentes auxiliam na propagação da força mecânica contrátil célula a célula, uma vez que as células musculares cardíacas se contraem na forma de sincício.

A N-caderina foi a proteína estrutural escolhida para as análises realizadas nesse trabalho, uma vez que a outra proteína majoritariamente encontrada nos discos intercalares, a Cx-43, tem maior dinâmica intracelular. Enquanto a localização da N-caderina se mantém bastante estável, alicerçando os discos intercalares, a Cx-43 pode ser encontrada mais frequentemente no citoplasma, durante o processo de depuração dessa proteína. Takasu e colaboradores (2013) encontram em corações de pacientes sépticos um padrão de lateralização da marcação para Cx-43. Esse mesmo padrão de redistribuição da Cx-43 foi encontrado por Zhu e colaboradores (2010) em um trabalho que avaliou o impacto da modificação da estrutura molecular da N-Caderina sobre a comunicação das junções comunicantes (“*gap*”). Em conjunto, esses resultados mostram que a Cx-43 é uma proteína que tem sua dinâmica alterada tanto pela sepse, quanto por modificações na N-caderina. Uma relação importante e interessante entre estas proteínas está no achado que animais geneticamente modificados para a depleção do gene da Cx-43, proteína majoritária das junções comunicantes, apresentam quantidades normais de N-caderina no coração, enquanto animais com ausência de genes para N-caderina tem a redução do conteúdo de Cx-43 e, portanto, prejuízos na velocidade de condução elétrica (LI et al., 2001; Gutstein et al., 2002). Esses dados mostram que impactos nas quantidades disponíveis de N-caderina refletem em danos para os outros tipos de junções presentes nos discos intercalares. A N-caderina parece ser uma proteína regulada de forma mais robusta, de forma que modificações em sua localização, morfologia e quantidades não ocorrem tão frequentemente. Logo, alterações na morfologia da marcação para N-caderina, mesmo que

reversíveis, devem ter maior impacto na funcionalidade cardíaca. Uma limitação importante do presente trabalho é a falta de correlação funcional com os nossos achados morfológicos. Para isto, outros experimentos e abordagens são necessários.

O NO é um importante mediador celular, em especial para o sistema cardiovascular. Suas ações fisiológicas de vasodilatação, angiogênese, inibição da adesão de neutrófilos no endotélio e de inibição plaquetária contribuem para o correto funcionamento desse sistema (FARAH et al., 2018). Além da fisiologia, uma grande quantidade de dados implica o NO como um mediador chave nas disfunções cardíaca, vascular, renal e pulmonar da sepse e do choque séptico (VINCENT et al., 2000; GREER, 2015).

Sabe-se que a função cardíaca está prejudicada na sepse, porém, um aspecto que permanece controverso é se a disfunção contrátil do miocárdio é secundária às alterações estruturais. Alguns estudos realizados focaram predominantemente na maquinaria contrátil do miocárdio, na tentativa de correlacionar a presença de alterações estruturais com a disfunção cardíaca observada na sepse (ROSSI et al., 2007). Na avaliação do miocárdio humano com sepse de longa duração estes autores mostraram que, dentre outros achados, que os miocárdios controles apresentaram expressão normal dos filamentos de actina e miosina, enquanto os miocárdios sépticos apresentaram focos dispersos de ruptura do aparelho contrátil de actina/miosina, o que representaria lise de miofilamentos e a expressão da enzima óxido nítrico sintase, isoforma induzida (NOS-2) e nitrotirosina por cardiomiócitos e macrófagos intersticiais foi marcadamente aumentada nos miocárdios sépticos em comparação com os corações controles. Além disso, o trabalho já citado de Celes et al., 2007 também sugere que alterações estruturais no miocárdio, classificadas como “cardiomiopatia inflamatória”, podem ser responsáveis pela depressão da funcionalidade miocárdica induzida pela sepse.

Os dados mostrados no presente trabalho reforçam a hipótese de que as modificações estruturais nos discos intercalares podem estar relacionadas aos mecanismos que desencadeiam depressão miocárdica na sepse. Alterações relativamente discretas na estrutura celular cardíaca podem ter impactos profundos na funcionalidade deste órgão. Mais ainda, nossos dados de alterações da marcação da N-caderina e provavelmente da estrutura dos discos no coração de ratos sépticos tem curso temporal reminiscente das duas fases das alterações cardíacas da sepse.

Um achado interessante deste trabalho, mas o qual não aprofundamos, foi o de um aparente intumescimento celular e nuclear observado nos corações sépticos. A sepse causa aumento da permeabilidade vascular e edema intersticial (OPAL e POLL, 2015). É de se

imaginar que em uma situação de edema tecidual, os bordos celulares estejam distanciados devido ao acúmulo de líquido extracelular no interstício. Levando em conta que os discos intercalares são estruturas presentes nos bordos celulares, é possível pensar que o edema contribui para as modificações morfológicas dos discos, assim como contribui para o aumento de tamanho dos núcleos.

Dada a meia-vida curta do NO, a percepção de seu envolvimento pode ser feita pela evidência de um dos seus efetores, a S-nitrosilação de resíduos de cisteína (tióis) em proteínas. A N-caderina é uma proteína com cinco domínios extracelulares, um domínio transmembrana e um domínio citosólico. No quinto domínio extracelular, a N-caderina apresenta resíduos de cisteína (WALLIS et al., 1996). Consoante ao que foi dito anteriormente, o NO tem grande afinidade por resíduos de enxofre, logo, os resíduos de cisteína da N-caderina são passíveis de nitrosilação.

Nosso grupo e outros autores demonstraram ao longo dos anos que a sepse aumenta a nitrosilação de proteínas em diversos tecidos, como aorta, coração e pulmões (SIPS et al., 2013; BENEDET et al., 2017; DAL SECCO et al., 2018; OLIVEIRA, 2019). Corroborando esses dados, nossos resultados mostraram uma tendência de aumento da nitrosilação no tecido cardíaco durante a sepse. Adicionalmente, conseguimos ressaltar a nitrosilação na região que corresponde ao núcleo dos cardiomiócitos. Isso foi possível através de uma modificação no protocolo e incremento de um reagente que as demais técnica não utilizavam, o cloreto de cobre. Esse reagente foi adicionado na tentativa combinar sua ação ao do ácido ascórbico e amplificar o sinal de marcação. Curiosamente percebemos que a adição de cloreto de cobre, não só amplificava o sinal, como também permitia-nos ver a marcação na nitrosilação nuclear. A nitrosilação, assim como o NO, tem um papel dual na fisiologia. Ambos podem ser tanto benéficos quanto maléficos dependendo das quantidades e dos locais de ação. Na sepse a nitrosilação é majoritariamente considerada como uma modificação pós-translacional que acarreta danos às proteínas. A marcação para nitrosotióis no tecido cardíaco foi homogênea e não regionalizada. Isso sugere que as proteínas do coração foram nitrosiladas na sepse aparentemente de forma igual. No entanto, o prejuízo que a nitrosilação causará a cada uma dessas proteínas é dependente das características intrínsecas das proteínas e de seus sistemas regulatórios.

Embora não tenha havido uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos é possível perceber-se que a sepse induz um aumento da S-nitrosilação e que este efeito parece ser mais nítido no tempo de 12 horas, coincidente com a maior alteração nos discos intercalares.

Como dito acima, NO nitrosila várias proteínas de modo que este resultado não permitiu estabelecer uma relação direta entre NO, S-nitrosilação e desestruturação dos discos.

Dada esta dificuldade, optamos por tentar fazer uma prova de conceito para avaliar o papel do NO e da S-nitrosilação nas alterações morfológicas dos discos. Para tanto injetamos um doador de NO em animais normais, não-sépticos, e avaliamos os parâmetros de estrutura dos discos e S-nitrosilação. O doador de NO utilizado foi o S-nitroso-D,L-penicilamina (SNAP), já utilizado em inúmeras publicações do laboratório. O aumento dos níveis de NO após o tratamento com SNAP foi confirmado através do aumento da intensidade de marcação na avaliação da S-nitrosilação do tecido cardíaco. Nossos dados de marcação para N-caderina nos animais que receberam SNAP se mostraram muito similares aos resultados obtidos em 6 e 12 h após a sepse, ou seja, foi observada a dilatação da marcação para N-caderina na presença de níveis aumentados de NO, indicando claramente que o NO tem participação na desestruturação dos discos. Durante a sepse, induzida por CLP, o pico de indução da NOS2 no coração ocorre entre 12 e 24 h, o que indica que nesse momento do pós-sepse a produção e liberação de NO está aumentada (DAL-SECCO et al., 2017). Esse dado corrobora a nossa interpretação que o NO esteja participando ativamente do desmonte da estrutura da N-caderina.

Benedet e colaboradores (2017) demonstraram que o tratamento com DTNB, um agente desnitrosilante, melhorava a sobrevivência, a disfunção orgânica e o tônus vascular de animais sépticos. Conforme discutido na Introdução, as proteínas nitrosiladas podem servir como um reservatório de NO. O DTNB auxilia a reversão do processo de nitrosilação e por isso utilizamos essa substância na tentativa de resgatar o dano provocado pelo tratamento com SNAP. Apesar da S-nitrosilação ter sido substancialmente reduzida pelo DTNB, os discos não recuperam integralmente sua morfologia normal, apesar de termos usado a mesma espécie e sexo animal e dose do trabalho inicialmente citado. Fizemos o experimento de tratar animais sépticos com DTNB. No entanto, o ensaio foi feito tratando os animais 12 h após a sepse com DTNB e coletando os tecidos 24 h após a sepse. Não encontramos diferenças relevantes e não foi possível perceber o eventual potencial de reparo do DTNB na restauração da morfologia da marcação para N-caderina no “*time point*” escolhido, de forma que os resultados não foram aqui mostrados. Uma possível razão para não ter encontrado diferenças pode ser o fato que 24 hs após o CLP, os discos já estão retornando à sua morfologia normal e assim, não seria possível ver o efeito do DTNB. Para averiguar se o DTNB é capaz de retomar a forma dos discos ao seu estado normal, seriam necessários outros tempos e doses de tratamento com o DTNB. Ainda

assim, os dados mostrando que o DTNB reduz significativamente a desestruturação dos discos nos animais injetados com SNAP deixa clara a importância do NO e da S-nitrosilação das alterações morfológicas dos discos intercalares na sepse.

## 5 CONCLUSÃO

Como conclusão, nossos resultados sugerem que o papel da N-caderina nos mecanismos que envolvem a fisiopatologia da sepse parece ser precoce e mais correlacionado com a morbidade do que com a mortalidade desta síndrome. O fato de a sepse alterar a imunomarcagem de N-caderina e este efeito ser reproduzido em animais tratados com um doador de NO permite a especulação de que esta desestruturação dos discos seja elemento importante para a disfunção cardíaca e torna os discos alvos interessantes para eventuais novas abordagens para a sepse.

## 6 REFERÊNCIAS

ACKERMANN, Maegen A.; HU, Li-Yen R.; KONTROGIANNI-KONSTANTOPOULOS, Aikaterini. Intercellular connections in the heart: the intercalated disc. In: **Cardiomyopathies-from Basic Research to Clinical Management**. IntechOpen, 2012.

AIRD, William C.. Endothelium as an organ system. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 32, p.271-279, maio 2004. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).  
<http://dx.doi.org/10.1097/01.ccm.0000129669.21649.40>.

ANDO, Nobutoshi et al. Nitric oxide release from the liver surface to the intraabdominal cavity during acute endotoxemia in rats. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 2, n. 6, p.481-488, dez. 1998. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1006/niox.1999.0205>.

ANGUS, Derek C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 29, n. 7, p.1303-1310, jul. 2001. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).  
<http://dx.doi.org/10.1097/00003246-200107000-00002>.

ANGUS, Derek C.; POLL, Tom van Der. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 369, n. 9, p.840-851, 29 ago. 2013. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra1208623>.

ASSREUY, Jamil. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-drug Targets**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.165-173, 1 jun. 2006. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/187153006777442314>.

BENEDET, Patrícia O. et al. The therapeutic value of protein (de)nitrosylation in experimental septic shock. **Biochimica Et Biophysica Acta (bba) - Molecular Basis of Disease**, [s.l.], v. 1864, n. 1, p.307-316, jan. 2018. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.10.029>.

BONE, Roger C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, [s.l.], v. 101, n. 6, p.1644-1655, jun. 1992. Elsevier BV.  
<http://dx.doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>.

CARABALLO, César; JAIMES, Fabián. Focus: death: organ dysfunction in sepsis: an ominous trajectory from infection to death. **The Yale Journal of Biology and Medicine**, v. 92, n. 4, p. 629, 2019.

CELES, Mara Rúbia N. et al. Reduction of gap and adherens junction proteins and intercalated disc structural remodeling in the hearts of mice submitted to severe cecal ligation and puncture sepsis\*. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 35, n. 9, p.2176-2185, set. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).  
<http://dx.doi.org/10.1097/01.ccm.0000281454.97901.01>.

CERRONE, Marina; AGULLO-PASCUAL, Esperanza; DELMAR, Mario. The intercalated disc. **Cardiac Electrophysiology: From Cell to Bedside**, [s.l.], p.198-211, 2018. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-323-44733-1.00022-5>.

CHEN, Xiao et al. Remodelling of myocardial intercalated disc protein connexin 43 causes increased susceptibility to malignant arrhythmias in ARVC/D patients. **Forensic Science International**, [s.l.], v. 275, p.14-22, jun. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.02.020>.

CKLESS, Karina et al. In situ detection and visualization of S-nitrosylated proteins following chemical derivatization: identification of Ran GTPase as a target for S-nitrosylation. **Nitric Oxide**, [s.l.], v. 11, n. 3, p.216-227, nov. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.niox.2004.06.002>.

DALTON, Allison; SHAHUL, Sajid. Cardiac dysfunction in critical illness. **Current Opinion in Anaesthesiology**, [s.l.], v. 31, n. 2, p.158-164, abr. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/aco.0000000000000572>.

DELMAR, Mario; MCKENNA, William J.. The cardiac desmosome and arrhythmogenic cardiomyopathies. **Circulation Research**, [s.l.], v. 107, n. 6, p.700-714, 17 set. 2010. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.110.223412>.

FARAH, Charlotte; MICHEL, Lauriane Y. M.; BALLIGAND, Jean-luc. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.292-316, 1 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrcardio.2017.224>.

FERNANDES, Daniel et al. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Molecular Pharmacology**, [s.l.], v. 69, n. 3, p.983-990, 2 dez. 2005. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/mol.105.015479>.

FERNANDES, Daniel et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s.l.], v. 328, n. 3, p.991-999, 10 dez. 2008. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET). <http://dx.doi.org/10.1124/jpet.108.142034>.

FERNANDES, Daniel; ASSREUY, Jamil. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.10-13, out. 2008. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/shk.0b013e3181818518>.

FLEISCHMANN, Carolin et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. current estimates and limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 193, n. 3, p.259-272, fev. 2016. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201504-0781oc>.

FLEMING, Alexander. On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzae. **British journal of experimental pathology** v. 10, n. 3, p. 226–236, 1929. PMID: PMC2048009.

FLEMING, Ingrid et al. Evidence that an l-arginine/nitric oxide dependent elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by endotoxin. **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 103, n. 1, p.1047-1052, maio 1991. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1991.tb12298.x>.

FORBES, MICHAEL S. Ultrastructure of cardiac muscle and blood vessels. In: **Heart Physiology and Pathophysiology**. Academic Press, 2001. p. 71-98.

FÖRSTERMANN, Ulrich et al. Isoforms of nitric oxide synthase: Characterization and purification from different cell types. **Biochemical Pharmacology**, [s.l.], v. 42, n. 10, p.1849-1857, out. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(91\)90581-o](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(91)90581-o).

FUNK, Duane J.; PARRILLO, Joseph E.; KUMAR, Anand. Sepsis and septic shock: A history. **Critical Care Clinics**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.83-101, jan. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003>.

FURCHGOTT, Robert F.; ZAWADZKI, John V.. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, [s.l.], v. 288, n. 5789, p.373-376, nov. 1980. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/288373a0>.

GAHHOS, Fivos N. et al. Hemodynamic responses to sepsis: Hypodynamic versus hyperdynamic states. **Journal of Surgical Research**, [s.l.], v. 31, n. 6, p.475-481, dez. 1981. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-4804\(81\)90185-2](http://dx.doi.org/10.1016/0022-4804(81)90185-2).

GEROULANOS, Stefanos; DOUKA, Evangelia T.. Historical perspective of the word “sepsis”. **Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 32, n. 12, p.2077-2077, 13 out. 2006. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-006-0392-2>.

GRANGER, D L et al. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.264-273, 1 jan. 1990. American Society for Clinical Investigation. <http://dx.doi.org/10.1172/jci114422>.

GREER, Jr. Pathophysiology of cardiovascular dysfunction in sepsis. **British Journal of Anaesthesia Education**, [s.l.], v. 15, n. 6, p.316-321, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1093/bjaceaccp/mkv003>.

GUTSTEIN, D. E.. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. **Journal of Cell Science**, [s.l.], v. 116, n. 5, p.875-885, 1 mar. 2003. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00258>.

HATFIELD, Kelly M. et al. Assessing variability in hospital-level mortality among U.S. medicare beneficiaries with hospitalizations for severe sepsis and septic shock\*. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 46, n. 11, p.1753-1760, nov. 2018. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0000000000003324>.

HOCHSTADT, Aviram; MEROZ, Yuval; LANDESBURG, Giora. Myocardial dysfunction in severe sepsis and septic shock: more questions than answers?. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.526-535, jun. 2011. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1053/j.jvca.2010.11.026>.

HOFFMAN, Brenton D.; YAP, Alpha S.. Towards a dynamic understanding of cadherin-based mechanobiology. **Trends in Cell Biology**, [s.l.], v. 25, n. 12, p.803-814, dez. 2015.

Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.09.008>.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H.. The biotin switch method for the detection of s-nitrosylated proteins. **Science Signaling**, [s.l.], v. 2001, n. 86, p.1-10, 12 jun. 2001. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

<http://dx.doi.org/10.1126/stke.2001.86.p11>.

JUNQUEIRA, Luiz C.; CARNEIRO, José. Histologia básica. 10ª edição. **Rio de Janeiro**, 2004.

KAKIHANA, Yasuyuki et al. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. **Journal of Intensive Care**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.1-10, 23 mar. 2016. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1186/s40560-016-0148-1>.

KAWASAKI, Takumi; KAWAI, Taro. Toll-Like Receptor signaling pathways. **Frontiers in Immunology**, [s.l.], v. 5, p.1-18, 25 set. 2014. Frontiers Media SA.

<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00461>.

KESSLER, Elise L.; NIKKELS, Peter GJ; VAN VEEN, Toon Ab. Disturbed Desmoglein-2 in the intercalated disc of pediatric patients with dilated cardiomyopathy. **Human Pathology**, [s.l.], v. 67, p.101-108, set. 2017. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2017.07.012>.

KOTFIS, Katarzyna et al. A worldwide perspective of sepsis epidemiology and survival according to age: Observational data from the ICON audit. **Journal of Critical Care**, [s.l.], v. 51, p.122-132, jun. 2019. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcrc.2019.02.015>.

LAGU, Tara et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.754-761, mar. 2012. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

<http://dx.doi.org/10.1097/ccm.0b013e318232db65>.

LEVY, Mitchell M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International sepsis definitions conference. **Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 29, n. 4, p.530-538, 28 mar. 2003. Springer Science and Business Media LLC.

<http://dx.doi.org/10.1007/s00134-003-1662-x>.

LI, Jifen et al. Cardiac-specific loss of n-cadherin leads to alteration in connexins with conduction slowing and arrhythmogenesis. **Circulation Research**, [s.l.], v. 97, n. 5, p.474-481, 2 set. 2005. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

<http://dx.doi.org/10.1161/01.res.0000181132.11393.18>.

LINDBERG, Oscar; GEER, Lina de; CHEW, Michelle S.. Nonadherence to antibiotic guidelines in patients admitted to ICU with sepsis is associated with increased mortality. **European Journal of Anaesthesiology**, [s.l.], v. 37, n. 2, p.113-120, fev. 2020. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).

<http://dx.doi.org/10.1097/eja.0000000000001140>.

MACDONALD, Bryan T.; TAMAI, Keiko; HE, Xi. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling: Components, mechanisms, and diseases. **Developmental Cell**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.9-26, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>.

MACHADO, Flavia R et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, [s.l.], v. 17, n. 11, p.1180-1189, nov. 2017. Elsevier BV.

[http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099\(17\)30322-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1473-3099(17)30322-5).

MACLEAN, Lloyd D. et al. Patterns of septic shock in man—a detailed study of 56 patients. **Annals of Surgery**, [s.l.], v. 166, n. 4, p.543-562, out. 1967. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/0000658-196710000-00004>.

MÁRQUEZ-ROSADO, Lucrecia et al. Connexin43 phosphorylation in brain, cardiac, endothelial and epithelial tissues. **Biochimica et Biophysica Acta (bba) - Biomembranes**, [s.l.], v. 1818, n. 8, p.1985-1992, ago. 2012. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.028>.

MARTIN, Greg S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, [s.l.], v. 348, n. 16, p.1546-1554, 17 abr. 2003. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmoa022139>.

MONCADA, Salvador et al. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1991. American Society for Pharmacology & Experimental Therapeutics (ASPET).

NABEEBACCUS, Adam; SHAH, Ajay M.. Biochemistry and physiology of cardiac muscle. **Medicine**, [s.l.], v. 42, n. 8, p.413-417, ago. 2014. Elsevier BV.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mpmed.2014.05.005>.

NOORMAN, Maartje et al. Cardiac cell–cell junctions in health and disease: Electrical versus mechanical coupling. **Journal of Molecular And Cellular Cardiology**, [s.l.], v. 47, n. 1, p.23-31, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yjmcc.2009.03.016>.

OCHOA, Juan B. et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Annals of Surgery**, [s.l.], v. 214, n. 5, p.621-626, nov. 1991. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/0000658-199111000-00013>.

OLIVEIRA, Filipe Rodolfo Moreira Borges de. **INFLUÊNCIA DO AMBIENTE REDOX EM PARÂMETROS INFLAMATÓRIOS DA PNEUMOSEPSE**. 2019. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

OPAL, S. M.; POLL, T. van Der. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. **Journal of Internal Medicine**, [s.l.], v. 277, n. 3, p.277-293, 13 fev. 2015. Wiley.  
<http://dx.doi.org/10.1111/joim.12331>.

PALATINUS, Joseph A. et al. ZO-1 determines adherens and gap junction localization at intercalated disks. **American Journal of Physiology-heart and Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 300, n. 2, p.583-594, fev. 2011. American Physiological Society.  
<http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00999.2010>.

PALMER, R. M. J.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S.. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, [s.l.], v. 327, n. 6122, p.524-526, jun. 1987. Springer Science and Business Media LLC.  
<http://dx.doi.org/10.1038/327524a0>.

PARKER, Margaret M.. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Annals of Internal Medicine**, [s.l.], v. 100, n. 4, p.483-490, 1 abr. 1984. American College of Physicians. <http://dx.doi.org/10.7326/0003-4819-100-4-483>.

PARRATT, J. R.. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, [s.l.], v. 41, n. 1, p.31-39, 1 jan. 1998. Oxford University Press (OUP).  
[http://dx.doi.org/10.1093/jac/41.suppl\\_1.31](http://dx.doi.org/10.1093/jac/41.suppl_1.31).

RHEE, Chanu et al. Incidence and trends of sepsis in us hospitals using clinical vs claims data, 2009-2014. **Journal of the American Medical Association**, [s.l.], v. 318, n. 13, p.1241-1249, 3 out. 2017. American Medical Association (AMA).  
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.2017.13836>.

RHETT, J. Matthew; JOURDAN, Jane; GOURDIE, Robert G.. Connexin 43 connexon to gap junction transition is regulated by zonula occludens-1. **Molecular Biology of The Cell**, [s.l.], v. 22, n. 9, p.1516-1528, maio 2011. American Society for Cell Biology (ASCB).  
<http://dx.doi.org/10.1091/mbc.e10-06-0548>.

RIBATTI, Domenico. William Harvey and the discovery of the circulation of the blood. **Journal of Angiogenesis Research**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-2, 2009. Publiverse Online S.R.L. <http://dx.doi.org/10.1186/2040-2384-1-3>.

ROARK, EILEEN F. et al. Evidence for endogenous proteases, mRNA level and insulin as multiple mechanisms of N-cadherin down-regulation during retinal development. **Development**, v. 114, n. 4, p. 973-984, 1992.

ROSSI, Marcos A. et al. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. **Shock**, [s.l.], v. 27, n. 1, p.10-18, jan. 2007. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health).  
<http://dx.doi.org/10.1097/01.shk.0000235141.05528.47>.

RUDIGER, Alain; SINGER, Mervyn. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. **Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 35, n. 6, p.1599-1608, jun. 2007. Ovid

Technologies (Wolters Kluwer Health).

<http://dx.doi.org/10.1097/01.ccm.0000266683.64081.02>.

SAKR, Yasser et al. Sepsis in intensive care unit patients: worldwide data from the intensive care over nations audit. **Open Forum Infectious Diseases**, [s.l.], v. 5, n. 12, p.1-9, 19 nov. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/ofid/ofy313>.

SALES JÚNIOR, João Andrade L. et al. Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s.l.], v. 18, n. 1, p.9-17, mar. 2006. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-507x2006000100003>.

SANFILIPPO, Filippo et al. Diastolic dysfunction and mortality in septic patients: a systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 41, n. 6, p.1004-1013, 24 mar. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00134-015-3748-7>.

SANTOS, Daniele O. dos et al. Reduced expression of adherens and gap junction proteins can have a fundamental role in the development of heart failure following cardiac hypertrophy in rats. **Experimental and Molecular Pathology**, [s.l.], v. 100, n. 1, p.167-176, fev. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2015.12.009>.

SAPHIR, Otto; KARSNER, Howard T. An anatomical and experimental study of segmentation of the myocardium and its relation to the intercalated discs. **The Journal of medical research**, v. 44, n. 5, p. 539, 1924.

SATO, Priscila Y. et al. Loss of plakophilin-2 expression leads to decreased sodium current and slower conduction velocity in cultured cardiac myocytes. **Circulation Research**, [s.l.], v. 105, n. 6, p.523-526, 11 set. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/circresaha.109.201418>.

SHANKAR-HARI, Manu et al. Risk factors at index hospitalization associated with longer-term mortality in adult sepsis survivors. **Jama Network Open**, [s.l.], v. 2, n. 5, p.1-14, 31 maio 2019. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.4900>.

SHEIKH, Farah; ROSS, Robert S.; CHEN, Ju. Cell-cell connection to cardiac disease. **Trends in Cardiovascular Medicine**, [s.l.], v. 19, n. 6, p.182-190, ago. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcm.2009.12.001>.

SHOJA, Mohammadali M. et al. Leonardo da Vinci's studies of the heart. **International Journal of Cardiology**, [s.l.], v. 167, n. 4, p.1126-1133, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2012.09.078>.

SILVA, Eliézer et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.251-260, 2004. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/cc2892>.

SINGER, Mervyn et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Journal of the American Medical Association**, [s.l.], v. 315, n. 8, p.801-

824, 23 fev. 2016. American Medical Association (AMA).  
<http://dx.doi.org/10.1001/jama.2016.0287>.

SIPS, Patrick Y. et al. Reduction of cardiomyocyte S-nitrosylation by S-nitrosoglutathione reductase protects against sepsis-induced myocardial depression. **American Journal of Physiology-heart and Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 304, n. 8, p.1134-1146, 15 abr. 2013. American Physiological Society. <http://dx.doi.org/10.1152/ajpheart.00887.2012>.

SOGAYAR, Ana M C et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, [s.l.], v. 26, n. 5, p.425-434, 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.2165/00019053-200826050-00006>.

SZABÓ, Csaba et al. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. **British Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 108, n. 3, p.786-792, mar. 1993. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1993.tb12879.x>.

THIEMERMANN, Christoph. Nitric oxide and septic shock. **General Pharmacology: The Vascular System**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.159-166, ago. 1997. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0306-3623\(96\)00410-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0306-3623(96)00410-7).

VAN BREEMEN, V. L.. Intercalated discs in heart muscle studied with the electron microscope. **The Anatomical Record**, [s.l.], v. 117, n. 1, p.49-63, set. 1953. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/ar.1091170106>.

VERMIJ, Sarah H.; ABRIEL, Hugues; VAN VEEN, Toon A. B.. Refining the molecular organization of the cardiac intercalated disc. **Cardiovascular Research**, [s.l.], p.259-275, 8 jan. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/cvr/cvw259>.

VINCENT, J. -I. et al. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. **Intensive Care Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 7, p.707-710, jul. 1996. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/bf01709751>.

VINCENT, Jean-louis et al. Effects of nitric oxide in septic shock. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [s.l.], v. 161, n. 6, p.1781-1785, jun. 2000. American Thoracic Society. <http://dx.doi.org/10.1164/ajrccm.161.6.9812004>.

VINCENT, Jean-louis. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **Journal of the American Medical Association**, [s.l.], v. 302, n. 21, p.2323-2329, 2 dez. 2009. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2009.1754>.

YENDE, Sachin et al. Long-term host immune response trajectories among hospitalized patients with sepsis. **Jama Network Open**, [s.l.], v. 2, n. 8, p.1-15, 7 ago. 2019. American Medical Association (AMA). <http://dx.doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2019.8686>.

ZANOTTI-CAVAZZONI, Sergio L; HOLLENBERG, Steven M. Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. **Current Opinion in Critical Care**, [s.l.], v. 15, n. 5, p.392-397, out. 2009. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/mcc.0b013e3283307a4e>.

ZHU, Hongjun et al. Inhibiting N-cadherin-mediated adhesion affects gap junction communication in isolated rat hearts. **Molecules and Cells**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.193-200, 23 ago. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s10059-010-0107-y>.

ZIESMANN, Markus T.; MARSHALL, John C.. Multiple Organ Dysfunction: The Defining Syndrome of Sepsis. **Surgical Infections**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.184-190, fev. 2018. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/sur.2017.298>.