

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Remodelamento do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, do disco intercalar e das proteínas contráteis no coração de camundongos submetidos à sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco

MARA RUBIA NUNES CELES

Ribeirão Preto
2008

MARA RUBIA NUNES CELES

Remodelamento do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, do disco intercalar e das proteínas contráteis no coração de camundongos submetidos à sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Marcos A. Rossi

Ribeirão Preto
2008

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO,
PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

FICHA CATALOGRÁFICA

Celes, Mara Rúbia Nunes

Remodelamento do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, do disco intercalar e das proteínas contráteis no coração de camundongos submetidos à sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco.

--Ribeirão Preto, 2008.

110 p.: il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo/USP. Área de concentração: Patologia Experimental.

Orientador: Rossi, Marcos Antonio.

1. Sépsis. 2. Choque séptico. 3. Disfunção miocárdica. 4. *Gap junctions*. 5. Junções aderentes. 6. Disco intercalar. 7. Distrofina. 8. Complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. 9. Actina. 10. Miosina.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARA RÚBIA NUNES CELES

Remodelamento do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, do disco intercalar e das proteínas contráteis no coração de camundongos submetidos à sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Patologia Experimental

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico meu trabalho, não apenas agora, mas sempre, em cada instante da minha vida, a meus pais, **Margarida e Valdionor**. Por esse amor incondicional, irrestrito, sem limites, que só os pais sabem dar. Por acreditarem em minha capacidade e me darem força pra continuar seguindo em frente, sempre!!! O que eu seria sem vocês?*

*A meus irmãos, **Francis e Rayane**, por essa força invisível que nos une que nos dá confiança e fortalece nossas raízes. Pelo carinho e amizade e por todo amor depositado em mim.*

*Aos meus sobrinhos, **Eduardo e Bruna**, meus maiores tesouros, pela alegria, pelo amor e carinho, pois mesmo longe nunca deixam de me encantar!*

Por vocês tudo... Sempre!

A Deus,

*meu bem mais precioso,
que me dá forças pra continuar lutando,
me impulsiona e me direciona a cada dia...*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Segundo André Comte-Sponville,... “a gratidão é um segundo prazer, que prolonga um primeiro, como um eco de alegria à alegria sentida, como uma felicidade a mais, para um mais de felicidade”. A gratidão é nisso o segredo da amizade, não pelo sentimento de uma dívida, pois nada se deve aos amigos, mas por superabundância de alegria comum, de alegria recíproca, de alegria partilhada.

*Fico, portanto, imensamente feliz em poder ser grata ao **Prof. Dr. Marcos Antonio Rossi**, meu orientador, pela paciência, confiança e ajuda em todos os momentos. Por todo apoio, credibilidade e disponibilidade na orientação deste trabalho. Por me mostrar que o verdadeiro mestre é aquele que compreende, estimula, comunica e enriquece com sua presença, seu saber e sua ternura.*

AGRADECIMENTOS

Aos membros da banca: Prof. Dr. Fernando Queiróz Cunha, por aceitar tão prontamente participar da minha banca de doutorado. Pelas valiosas conversas, pelo apoio e pelas contribuições científicas de tanta valia para a conclusão desta tese. Profa. Dra. Maria de Lourdes Higuchi, por aceitar participar da minha banca de doutorado, pelos poucos momentos de convívio e informações, mas que valeram muito. Prof. Dr. Aníbal Basile Filho, por aceitar participar da minha banca de doutorado, pelas sugestões e pela oportunidade de um encontro tão agradável. Prof. Dr. Paulo José Ferreira Tucci, por aceitar tão prontamente participar da minha banca de doutorado.

À Profa. Dra. Simone Gusmão Ramos, pela oportunidade de um convívio tão agradável durante todos esses anos, pelas conversas e risadas durante os cafés, pelas sugestões e pelas constantes palavras de incentivo.

Aos meus companheiros de jornada e amigos: Andriara De Rossi, Cibele Maria Prado, Érica Carolina Campos, Lenaldo Branco Rocha e mais recentemente Luiz Borges Bispo da Silva e Valdecir Blefari, companheiros imprescindíveis em todas as fases desse trabalho, na troca de experiências profissionais e por integrarem uma equipe responsável, trabalhando com seriedade, competência, carinho e entusiasmo, equipe da qual me orgulho em participar.

Às queridas técnicas do Laboratório de Patologia Cardiovascular: Lígia G. V. B. Santoro, Maria Helena Rjul e Mônica A. de Abreu, que me apoiaram incondicionalmente e muito me ajudaram desde o início da árdua tarefa de coleta dos materiais e execução das técnicas e que, com entusiasmo, bom humor, otimismo, competência e organização proporcionaram as imagens maravilhosas para esse trabalho.

Às minhas amigas do Laboratório de Patologia Pulmonar: Cristiane Tefé da Silva, Cristina T. B. Fontanezi, Elaine M. Floriano, Karina M. A. da Mata, Marcela S. Oliveira, e às mais recentes, Anelise Braido e Lucina Sampaio Amancio, agradeço pelo carinho, pelos momentos de descontração e, principalmente, pelas inimitáveis aulas dos cursos básicos e avançados.... Hoje vocês são bem mais que companheiras de laboratório e de “guerra”, são grandes amigas.

Ao querido **Diego Torres-Dueñas**, colega de trabalho e grande amigo, por sua paciência e carinho. Por nossas longas discussões, às vezes não muito científicas, mas que muito contribuíram para o meu crescimento e pela colaboração na execução desse trabalho.

Às queridas amigas e companheiras: **Andressa de Freitas e Daniela Dal Secco** pelo carinho, alegria e carisma contagiantes que intensificaram e marcaram muitos e bons momentos. Por termos compartilhado a descoberta da França juntas...

A todos os amigos do Laboratório de Inflamação: não poderia citar nomes, pois correria o risco de deixar alguém especial pra trás. Agradeço por terem me recebido tão carinhosamente no laboratório, pelo apoio científico e pela excelente companhia durante parte do meu doutorado, me proporcionando novas e valiosas amizades.

Às técnicas do Laboratório de Inflamação: **Fabíola L. A. C. Mestriner, Giuliana B. Francisco, Ana Kátia dos Santos e Diva A. M. De Souza**. Pela acolhida, carinho e aprendizado, pelas valiosas conversas e pela imensa colaboração na execução de parte dos experimentos que fizeram possível esse trabalho.

Às secretárias do Departamento de Patologia: **Neide T. Gonçalves, Rosângela C. N. Paiva, Edna Pio (in memorian) e Camila L. Zambonini**. Que sempre estiveram disponíveis para me auxiliar, pela amabilidade, gentileza, dedicação e competência.

Aos funcionários do Biotério da Patologia: **Maria Aparecida C. Apolinário (D. Cida), Ivone P. da Silva, Luciana G.A. Campanini, Paulo Henrique da Silva e Marileide de Souza (Mary)**. Por cuidarem dos nossos animais com muito respeito e carinho. Vocês que na humildade das tarefas, talvez nem percebiam a importância desse cuidado para o desenvolvimento dos nossos trabalhos.

Às funcionárias da limpeza: **Rose, Karina, Vanessa, Diraci e Beatriz (Bia)**: Por manterem nosso ambiente de trabalho limpo todos os dias. Obrigada pelo bom dia, pelo sorriso no corredor, pela limpeza das salas e pelo apagar da luzes.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – **FAPESP**, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho (processos 04/01777-0 e 04/14578-5).

“A verdadeira amizade é a alegria de dar e receber, de amar e sofrer, de confiar e de se entregar sem reservas. É estar com o outro, mesmo quando não podemos nem aumentar a alegria, nem diminuir a tristeza.”

Ricardo Barbosa de Sousa

Aos meus amigos do coração: Gislaine G. P. Gomes (Gi), Marcus Vinícius M. Gomes (Marquinho), Graziela V. Mellis (Gra), Pe. João Gualberto, Renata Madi, Rosa Maria Marangoni e Marcos Marangoni, Renata e Luciano pelo amor e constante carinho, preocupação e, acima de tudo, pelo precioso apoio em todos os sentidos e momentos, onde a distância se faz pequena em meio a tanta cumplicidade. Por que... “mesmo se um dia, distantes estivermos, unidos estaremos”...

Aos amigos de longa data: Carla Patrícia, Carlos (Kal), Ediliane, Jaqueline, Viviane Teodoro, Paula Cristina Rugani, André Pitondo, Eliana, Eduardo Calió, Gustavo (Bart), Késia, Lísia e Fabiana. Pela amizade e carinho, pelos momentos alegres, risadas, apoio, incentivo e compreensão, mas antes de tudo, por serem pessoas muito especiais.

Às minhas queridas amigas e companheiras de “cela”: Cristiane Tefé da Silva e Anelise Braido, pela amizade e carinho, pela confiança, apoio e compreensão irrestritos. Por dividirem comigo os bons e os maus momentos e por agüentarem meu humor, nem sempre tão bom... Pelas nossas longas conversas, por nossos momentos de aprendizado (mesmo por vídeo conferência) e por dividirem comigo um sentimento de cumplicidade e complacência.

Às minhas amigas e companheiras: Cibele Maria Prado, Cristiane Tefé da Silva, Cristina T. Beneli Fontanezi, Érica Carolina Campos, Karina M. A. da Mata, Marcela S. Oliveira, e mais recentemente, Anelise Braido pelo “bate papo” nos momentos de lazer, pelas conversas às vezes não muito científicas, mas altamente produtivas. Pela amizade, companheirismo e carinho e por me mostrarem que existe vida fora do laboratório...

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho!!!

Muito obrigada!!!

“As pessoas mais felizes não têm as melhores coisas.
Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que
aparecem em seus caminhos.
A felicidade aparece para aqueles que choram.
Para aqueles que se machucam.
Para aqueles que buscam e tentam sempre.
E para aqueles que reconhecem a importância das
pessoas que passam por suas vidas.”

CLARICE LISPECTOR

RESUMO

CELES, MRN. “Remodelamento do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, do disco intercalar e das proteínas contráteis no coração de camundongos submetidos à sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco”. 2008. 115f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

A sépsis e o choque séptico representam uma síndrome complexa de intensa resposta inflamatória sistêmica, com múltiplas anormalidades fisiológicas e imunológicas, comumente causadas por infecção bacteriana. A principal consequência dessa resposta é o comprometimento de muitos órgãos e tecidos. A disfunção cardíaca, decorrente de um prejuízo na contratilidade miocárdica, tem sido reconhecida como um fator importante que contribui para os altos índices de mortalidade observados na sépsis. Dados recentes do nosso laboratório indicam que alterações estruturais no miocárdio podem ser responsáveis pela disfunção cardíaca observada na sépsis. Considerando que a maquinaria contrátil interna das miofibras deve permanecer intimamente conectada com a membrana e a matriz extracelular, o presente estudo foi proposto para avaliar alterações nas comunicações intercelulares e acoplamento mecânico entre os cardiomiócitos vizinhos e avaliar a expressão de proteínas do arcabouço celular e da matriz extracelular (especificamente a laminina- $\alpha 2$) durante a sépsis grave. Nossos resultados mostraram que há uma diminuição na expressão das proteínas envolvidas na formação das *gap junctions* (conexina43) e junções aderentes (N-caderina), o que resultaria na perda da integridade estrutural dos discos intercalares, alterando o acoplamento mecânico e eletro-químico entre os cardiomiócitos vizinhos. Além disso, demonstramos que há redução na expressão de distrofina e das proteínas que constituem o complexo de glicoproteínas associadas a distrofina (CGD) durante a sépsis experimental. A redução ou perda da expressão de distrofina é o evento primário que ocorre seguido pela degeneração miofilamentar, caracterizada pela lise dos filamentos de actina e miosina. A diminuição na expressão das glicoproteínas associadas à distrofina: β -dystroglicana e laminina foram considerados eventos secundários. Os resultados sugerem que durante a sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco (CLP), há perda de proteínas importantes envolvidas tanto no remodelamento do disco intercalar quanto na expressão de glicoproteínas envolvidas na ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular. Embora estudos funcionais sejam necessários para determinar o efeito direto dessas alterações sobre o miocárdio podemos sugerir que as alterações estruturais são parcialmente responsáveis pela depressão miocárdica observada na sépsis.

Palavras-chave: sépsis, choque séptico, disfunção miocárdica, *gap junctions*, junções aderentes, disco intercalar, distrofina, complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, actina, miosina.

ABSTRACT

CELES, MRN. “Remodeling of dystrophin-glycoprotein complex, intercalated disc proteins, and contractile proteins in the hearts of mice subjected to sepsis induced by cecal ligation and puncture”. 2008. 115f. Thesis (Doctoral) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

Sepsis and septic shock represent a complex syndrome of systemic inflammatory response, with multiple physiological and immunological abnormalities, commonly caused by bacterial infection. The most important consequence of the response is the involvement of many organs and tissues. Cardiac dysfunction, caused by impairment in myocardial contractility, has been recognized as an important factor that contributes to the high mortality observed in sepsis. Evidence from our laboratory indicates that myocardial structural changes could be responsible for sepsis-induced myocardial dysfunction. Taking into account that the contractile machinery inside the myofibers must remain intimately connected with the membrane and extracellular matrix, the present investigation sought to evaluate changes in intercellular communications and mechanical coupling between the neighbor cardiomyocytes and the expression of the cell scaffold protein and extracellular matrix (specifically merosin laminin- α 2 chain) during the severe sepsis. Our results showed a decrease in the expression of proteins involved in formation of gap junctions (connexin-43) and adherens junctions (N-cadherin). These alterations may result in the loss of intercalated disc structural integrity, changing the mechanical and electrical-chemical coupling between neighboring cardiomyocytes. Additionally, we demonstrated the decrease of dystrophin and dystrophin-glycoprotein complex (DGC) components resulting from severe septic injury. The reduction or loss of dystrophin is the primary event that occurs followed by miofilamentar degeneration characterized by actin and myosin lysis. The decrease of glycoproteins associated with dystrophin: β -dystroglican and laminin were considered secondary events. The results suggest that during experimental severe sepsis induced by cecal ligation and puncture (CLP), there is loss of important proteins involved in both the remodeling of the intercalated disc and the glycoproteins expression implicated in the mechanical link between the intracellular cytoskeleton and extracellular matrix. Although the functional studies are needed to determine the direct effect of these alterations on myocardium, we can suggest that myocardial structural changes may be partly responsible for sepsis-induced cardiac depression.

Keywords: severe sepsis, septic shock, myocardial dysfunction, gap junctions, adherens junctions, intercalated disc, dystrophin, dystrophin-glycoprotein complex, actin, myosin.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	HIPÓTESE	24
2.1	OBJETIVOS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4	RESULTADOS	35
4.1	Indução de sépsis e avaliação do modelo de CLP	35
4.2	As junções celulares na sépsis induzida por CLP	51
4.3	O aparelho contrátil e suas conexões com a matriz extracelular	60
5	DISCUSSÃO	73
6	CONCLUSÃO	93
	REFERÊNCIAS	94
	ANEXOS	106

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CGD).....	23
Figura 2	Sobrevida dos animais após cirurgia de ligação e perfuração do ceco.....	36
Figura 3	Contagem de bactérias no lavado peritoneal e no sangue.....	38
Figura 4	Quantificação de citocinas e quimiocinas no lavado peritoneal e soro após indução da sépsis.....	40
Figura 5	Curva da pressão arterial média após a indução de sépsis.....	42
Figura 6	Análise histopatológica do miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave (material incluído em parafina).....	44
Figura 7	Análise histopatológica do miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave (material incluído em metacrilato).....	45
Figura 8	Diâmetro das células miocárdicas dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos.....	47
Figura 9	Distribuição de frequência dos valores do diâmetro das células miocárdicas do ventrículo esquerdo dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos.....	48
Figura 10	Alterações ultra-estruturais miocárdicas na sépsis induzida por CLP.....	50
Figura 11	Análise imunofluorescente de conexina-43 no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave.....	53
Figura 12	Análise do perfil de expressão de conexina-43 por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos.....	54
Figura 13	Análise imunofluorescente de N-caderina no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave.....	56
Figura 14	Análise do perfil de expressão de N-caderina por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos.....	57
Figura 15	Deiscência das <i>gap junctions</i> e junções aderentes nos corações sépticos.	
Figura 16	Análise imunofluorescente (confocal) de actina no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave.....	59
Figura 17	Análise imunofluorescente (confocal) de miosina no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave.....	61
Figura 18	Análise imunofluorescente de distrofina no miocárdio de animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos.....	62

Figura 19	Análise do perfil de expressão de distrofina por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos.....	66
Figura 20	Análise imunofluorescente da expressão de albumina e distrofina no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave.....	67
Figura 21	Análise imunofluorescente de β -dístroglicana no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave.....	69
Figura 22	Análise do perfil de expressão de β -dístroglicana por Western blot no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos.....	70
Figura 23	Análise imunofluorescente de laminina- α 2 no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave.....	72
Figura 24	Diagrama esquemático representando como a expressão de N-caderina e conexina-43 pode interferir com o remodelamento das junções aderentes e <i>gap junctions</i> nos corações sépticos.....	89
Figura 25	Diagrama esquemático representando a perda de distrofina, dos componentes do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CGD) e das proteínas do aparelho contrátil no miocárdio séptico.....	92

*"Quando a febre é contínua, a superfície externa
Do corpo está fria, e existe internamente uma grande
sensação de calor e sede, a afecção é mortal." (Hipócrates, 400 a.C)*

1. INTRODUÇÃO

Anualmente, cerca de 30 milhões de pessoas morrem em todo mundo devido a infecções graves. A maioria das mortes está relacionada a eventos associados com a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ser iniciada por uma série de condições, infecciosas ou não. Estimativas indicam um total de 750.000 casos de sépsis por ano nos Estados Unidos da América, com um índice de mortalidade acima de 50% (Angus et al., 2001). Um estudo epidemiológico recente de sépsis no Brasil mostrou que os dados nacionais são igualmente alarmantes. A incidência de sépsis grave e choque séptico situam-se em 27 e 23%, respectivamente, e a taxa de mortalidade global foi de 22%, sugerindo que a sépsis é o maior problema de saúde pública nas unidades de terapia intensiva do país (Silva et al., 2004).

A infecção pode ser definida como um processo patológico causado pela invasão de tecidos normalmente estéreis, fluídos ou cavidades corporais por agentes patogênicos ou potencialmente patogênicos (Levy et al., 2003). Por outro lado, a sépsis resulta da evolução de uma infecção como um *continuum* de um foco infeccioso único no organismo. Essa desordem clínica é definida pela presença de infecção e inflamação sistêmica (Levy et al., 2003). Após a exposição inicial a um estímulo infeccioso (por exemplo: endotoxinas de bactérias Gram-negativas ou exotoxinas de bactérias Gram-positivas), a cascata inflamatória é iniciada. A amplificação da resposta imunológica ocorre através da ativação de leucócitos polimorfonucleares, monócitos/macrófagos teciduais e células endoteliais que liberam uma série de mediadores biologicamente ativos, incluindo citocinas, fator ativador de plaquetas (PAF) e óxido nítrico na tentativa de eliminar o agente agressor. Estudos experimentais

realizados em humanos e animais indicaram que o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1) estão entre as citocinas mais importantes e mais precocemente produzidas durante a sépsis (Dinarello 1997, Van der Poll et al., 1999). Associado a amplificação dessa resposta ocorre também a indução e produção de mediadores regulatórios, dentre eles, as citocinas antiinflamatórias IL-10, fator de crescimento e transformação-beta (TGF- β) e inibidores solúveis como o antagonista do receptor de IL-1. O efeito desses mediadores pró e antiinflamatórios culminam com alterações fisiopatológicas em vários órgãos, denominadas de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), como estabelecido em pela Conferência de Consenso realizada em 1991, pelo *American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine* (Bone et al., 1992). Quando a homeostase do organismo não pode ser mantida, pode ocorrer uma disfunção seqüencial e progressiva de vários órgãos, fenômeno denominado de Síndrome da Disfunção de Múltiplos Órgãos (SDMO), considerada principal causa de morte entre pacientes internados em unidades de terapia intensiva (Tran et al., 1990, Deitch 1992). A presença de hipotensão sistêmica, defeitos microcirculatórios regionais, hipoxia tecidual e ativação das cascatas inflamatórias estão relacionados às lesões de múltiplos órgãos que caracterizam a evolução clínica da sépsis (Parrillo et al., 1990). Se o estímulo é particularmente intenso, o sistema cardiovascular é afetado, culminando com choque séptico (Levy et al., 2003).

O choque séptico é considerado um agravamento do quadro de sépsis, resultante de uma descompensação hemodinâmica que ocorre na presença de agentes infecciosos e mediadores inflamatórios na circulação sangüínea (Hollenberg et al., 2004). Primariamente trata-se de uma forma de choque distributivo, caracterizado por uma incapacidade de fornecimento de oxigênio aos tecidos, associado a uma vasodilatação periférica inadequada, a qual ocorre apesar do débito cardíaco preservado ou mesmo elevado (Parrillo et al., 1990). Embora muitos pacientes morram ainda nos estágios iniciais da doença, em um grande número de casos essas alterações hemodinâmicas evoluem gradualmente para um estado hipodinâmico, estágio tardio do choque, caracterizado por baixa resistência vascular periférica e hiporeatividade a vasoconstritores. Nesses casos, os pacientes freqüentemente vão a óbito por hipotensão

refratária ao tratamento farmacológico, falência de múltiplos órgãos e/ou disfunção miocárdica (Parrillo, 1993).

Nas últimas décadas, a origem da disfunção cardiovascular observada durante a sépsis tornou-se o foco principal de numerosos estudos, incluindo modelos experimentais e estudos em humanos (Snell et al., 1991, Powers et al., 1998, Krishnagopalan et al., 2002). Embora a função cardíaca esteja prejudicada na sépsis, permanece controverso se a disfunção contrátil do miocárdio é secundária às alterações estruturais. Lesão miocárdica clinicamente inaparente tem sido relatada nos pacientes através dos níveis séricos elevados de troponina cardíaca I e T (Turner et al., 1999, Arlati et al., 2000, ver Elst et al., 2000, Amman et al., 2001, Metha et al., 2004). Contudo, o mecanismo exato pelos quais os níveis de troponina estão aumentados nos pacientes sépticos permanece desconhecido. Os possíveis mecanismos são: necrose difusa, proteólise das troponinas cardíacas ou escape das mesmas para o citoplasma com dano reversível do complexo contrátil das células musculares cardíacas. Relatos anteriores em modelos experimentais mostraram uma associação entre sépsis e alterações estruturais do miocárdio (Coalson et al., 1975, Hersch et al., 1990, Gotloib et al., 1992, Schlag et al., 1992, Allard et al., 1996), tais como, necrose miocitária e edema mitocondrial ou um prejuízo na contratilidade miocárdica na ausência de lesão tecidual (Piper et al., 1997, Zhou et al., 1998).

A determinação dos mecanismos celulares diretamente dependentes da sépsis/choque séptico que poderiam conduzir a mudanças estruturais miocárdicas em seres humanos tornou-se foco de poucos estudos. Fernandes e colaboradores em 1994 avaliaram retrospectivamente 71 autópsias de pacientes sépticos usando os seguintes critérios morfológicos de inclusão: reação inflamatória em dois ou mais órgãos, esplenite aguda, pielonefrite aguda bilateral, trombos de fibrina nos pulmões, fígado e glomérulo e seqüestro de neutrófilos nos capilares pulmonares. Os autores descreveram uma miocardite infecciosa típica: 19 casos (27%) com miocardite intersticial e exsudado composto principalmente por neutrófilos, 8 casos (11%) com colonização bacteriana e 5 casos (7%) com necrose de miofibras. Os autores aventaram que esses achados seriam induzidos provavelmente por mediadores sistêmicos, responsáveis pela disfunção miocárdica na sépsis humana. Outro estudo foi desenvolvido em nosso laboratório (Rossi et al., 2007) focalizando predominantemente a maquinaria contrátil do

miocárdio, na tentativa de correlacionar a presença de alterações estruturais no miocárdio humano com a disfunção cardíaca observada na sépsis. Na avaliação do miocárdio humano com sépsis de longa duração, foram evidenciados quatro achados importantes. Primeiro, observamos nos miocárdios sépticos, maior infiltração de macrófagos com características de ativação e aumento da expressão de TNF- α em comparação a ambos os miocárdios controles, normais e com pancreatite aguda necrosante, o que poderia favorecer a redução da função cardíaca nos corações sépticos. Segundo, os miocárdios sépticos apresentaram maior acúmulo intracelular de lipídios quando comparados aos corações controles, refletindo muito provavelmente uma situação de lipotoxicidade celular, favorecendo o aparecimento de disfunção cardíaca. Terceiro, 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. Quarto, a expressão da sintase do óxido nítrico induzida (iNOS) e nitrotirosina por cardiomiócitos e macrófagos intersticiais foi marcadamente aumentada nos miocárdios sépticos em comparação com os corações controles. A expressão aumentada de iNOS e a evidência da presença significativa de peroxinitrito, através da imunorreação para nitrotirosina, um marcador da produção de peroxinitrito nos cardiomiócitos e macrófagos intersticiais, sugerem que o estresse oxidativo possa ter um papel importante no rompimento das moléculas de actina/miosina nos corações dos pacientes sépticos. Em resumo, essas observações dão suporte à hipótese de que alterações estruturais no miocárdio, classificáveis como “cardiomiopatia inflamatória”, poderiam ser responsáveis pela depressão miocárdica induzida pela sépsis.

Considerando que a manutenção da integridade estrutural do miocárdio é essencial para o correto funcionamento do coração, o estudo de alterações nas comunicações intercelulares e acoplagem mecânica entre os cardiomiócitos vizinhos tornou-se interessante, uma vez que a ocorrência desse fenômeno na sépsis poderia contribuir para a depressão miocárdica. Outro ponto importante é verificar se modificações na expressão de proteínas do arcabouço celular e da matriz extracelular durante a sépsis poderiam ter um papel importante nas alterações cardiovasculares observadas durante a sépsis.

De acordo com Perriard e colaboradores, a ruptura das proteínas constituintes do disco intercalar causaria cardiomiopatias e outras mudanças que poderiam ser fatais. (Perriard et al., 2003). O disco intercalar é importante mantenedor da integridade estrutural do miocárdio através das conexões entre os miócitos. A função contrátil cardíaca depende dos discos intercalares que são responsáveis pelo acoplamento mecânico e eletro-químico dos miócitos constituintes do coração. Os discos intercalares apresentam vários complexos juncionais: junções aderentes, desmossomos e *gap junctions* (Severs, 2000, Gutstein et al., 2003). As junções aderentes, constituídas principalmente pelas moléculas de caderina, promovem a ligação do disco intercalar ao citoesqueleto de actina e os desmossomos, principalmente compostos pelas proteínas desmoplaquinas, fixam-se aos filamentos intermediários. Ambos estão associados a um complexo de proteínas, as cateninas, que regulam as adesões célula-célula e a estrutura das junções dos discos intercalares capacitando a transmissão de força contrátil através da membrana plasmática. As *gap junctions* são canais formados pela interação de dois hemicanais ou conexons, presentes na membrana de células opostas. Cada conexon é formado pela associação de seis subunidades polipeptídicas idênticas, as conexinas, que se estendem através das membranas celulares estabelecendo a comunicação intercelular via estímulos elétricos e transferência de íons entre as células miocárdicas vizinhas.

É conhecido que reduções nas proteínas constituintes dos discos intercalares promovem um aumento das cardiomiopatias e outros defeitos fatais (Perriard et al., 2003). Por exemplo, a deleção induzida do gene da N-caderina no coração de camundongos leva a uma perda das estruturas dos discos intercalares resultando em anormalidades na morfologia e função cardíaca (Kostetiskii et al., 2005). O remodelamento das *gap junctions* e a redução dos níveis de conexina-43, proteína predominante no miocárdio dos ventrículos cardíacos pode resultar na diminuição da velocidade de condução, arritmia ventricular espontânea e morte cardíaca súbita (Gutstein et al., 2001, Danik et al., 2004, Eckardt et al., 2004, van Rijen et al., 2004). Na doença de Naxos, uma cardiomiopatia arritmogênica do ventrículo direito decorrente da deleção de γ -catenina (placoglobina), tem sido demonstrado um remodelamento das *gap junctions* provavelmente, devido a alterações nas ligações entre desmossomos, junções aderentes e o citoesqueleto (Kaplan et al., 2004).

Além das junções intercelulares, as interações entre proteínas ancoradoras do arcabouço celular, tais como, distrofina e proteínas do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, com a matriz extracelular desempenham papel importante tanto na integridade estrutural quanto funcional do miocárdio e na estabilização da transmissão de força contrátil (Katsumi et al., 2004). Mudanças tanto bioquímicas quanto estruturais induzidas pela sépsis/choque séptico podem comprometer a integridade estrutural do sarcolema nos cardiomiócitos (Rossi et al., 2007). A integridade do sarcolema é mantida pela presença das proteínas estruturais dos cardiomiócitos que compreendem: as proteínas do citoesqueleto celular (tubulina, desmina e actina), as proteínas do sistema contrátil (actina, miosina, tropomiosina e troponinas) e as proteínas do esqueleto sarcomérico (titina e α -actinina) (Kostin et al., 2000). Há ainda três grupos de proteínas estruturais que contribuem para a forma celular, resistência mecânica e transdução de sinal nos cardiomiócitos e permite a interação entre o citoesqueleto intracelular, o sistema contrátil e a matriz extracelular conferindo estabilidade estrutural à membrana do cardiomiócito: a distrofina e o complexo de glicoproteínas associadas a ela (dystroglicanas, sarcoglicanas, sarcospana, distrobrevina e sintrofina), a ligação talina-vinculina-integrina e a ligação espectrina-face interna da membrana (Kostin et al., 1998; Hein et al., 2000; Kostin, 2000, Lapidos et al., 2000).

A distrofina é um dos principais componentes do complexo de glicoproteínas e se localiza logo abaixo do sarcolema, co-localizada com a β -espectrina e a vinculina. Desempenha papel importante no estabelecimento de conexões entre o meio intracelular, o citoesqueleto de actina e/ou a estrutura sarcomérica e a membrana basal externa. Apresenta três funções básicas: (1) estabilização da membrana durante ciclos de contração, (2) transdução de força e (3) organização de especializações da membrana (Towbin, 1998; Lapidos et al., 2004). A porção N-terminal da distrofina liga-se à actina e a porção C-terminal liga-se à proteína transmembrana β -dystroglicana (Stevenson et al., 1998). Esta se conecta à α -dystroglicana, que por sua vez está ligada à matriz extracelular através da laminina (Winder, 2001; Ganote & Armstrong, 2002). Além dessa interação com o meio intracelular, as dystroglicanas participam também da organização da matriz extracelular (Henry & Campbell, 1996). As sarcoglicanas formam um subcomplexo de glicoproteínas transmembrana composto

por seis subunidades α , β , γ , ϵ , ζ e δ -sarcoglicanas. A função das sarcoglicanas ainda não é bem conhecida, mas sabe-se que essas glicoproteínas estabilizam a interação entre as α e β -distroglicanas (Straub et al., 1998; McNally et al., 2003). A presença de outras proteínas na membrana celular, como as integrinas, também permite a ligação entre o citoesqueleto e a matriz extracelular (Kostin et al., 1998). As integrinas, são proteínas transmembrana formadas pelas subunidades α e β , consideradas receptores de adesão celular para proteínas dentro da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágeno) e também estabelecem relação com a actina do citoesqueleto (Kostin et al., 1998; Delon & Brown, 2007). As integrinas desempenham ainda papel na organização, diferenciação e migração celular (Ross, 2002) e na resistência à tensão gerada ao longo do sarcolema durante a contração celular (Van Der Flier & Sonnenberg, 2001; Delon & Brown, 2007). A laminina, considerada o maior componente da matriz extracelular, é altamente expressa nos músculos cardíaco e esquelético, composta por duas isoformas α e β , mantém uma forte interação com a distrofina através do complexo das distroglicanas. Dessa forma, a comunicação entre os meios intra e extracelular é estabelecida (McNally et al., 2003) (Figura 1).

A organização e interação entre as glicoproteínas são importantes para o entendimento dos mecanismos celulares envolvidos na disfunção mecânica observada nas cardiomiopatias (Stevenson et al., 1998; Xi et al., 2000). Diversos estudos em humanos e em modelos animais indicam que a perda da associação entre as estruturas do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina e à laminina pode levar ao desenvolvimento de cardiomiopatia (Oliviero et al., 2002; Lapidus et al., 2004; Heydemann & McNally, 2007). A ausência de um ou mais componentes deste complexo causa degeneração muscular progressiva (Hack et al., 2000) e implica na ruptura da ligação física que ancora a actina ao citoesqueleto subsarcolemal e os sarcômeros ao sarcolema (Danialou et al., 2001), com conseqüente perda de função e morte celular (Lapidus et al., 2004). A perda de distrofina, por exemplo, é a causa da distrofia muscular de Duchenne e está freqüentemente acompanhada por cardiomiopatia. Os cardiomiócitos que perdem a distrofina são mais vulneráveis ao estresse mecânico imposto sobre a célula, resultando na perda da integridade do sarcolema e degeneração miofibrilar (miocitólise), com conseqüente disfunção contrátil (Danialou et al., 2001; Heydemann &

Mcnelly, 2007). Ainda, foi demonstrado o papel das glicoproteínas associadas à distrofina na lesão por isquemia-reperfusão no miocárdio de cães (Rodríguez et al., 2005), em hamsters deficientes de sarcoglicana (Straub et al., 1998) e em biópsias miocárdicas de humanos com cardiomiopatia dilatada (Vatta et al., 2002).

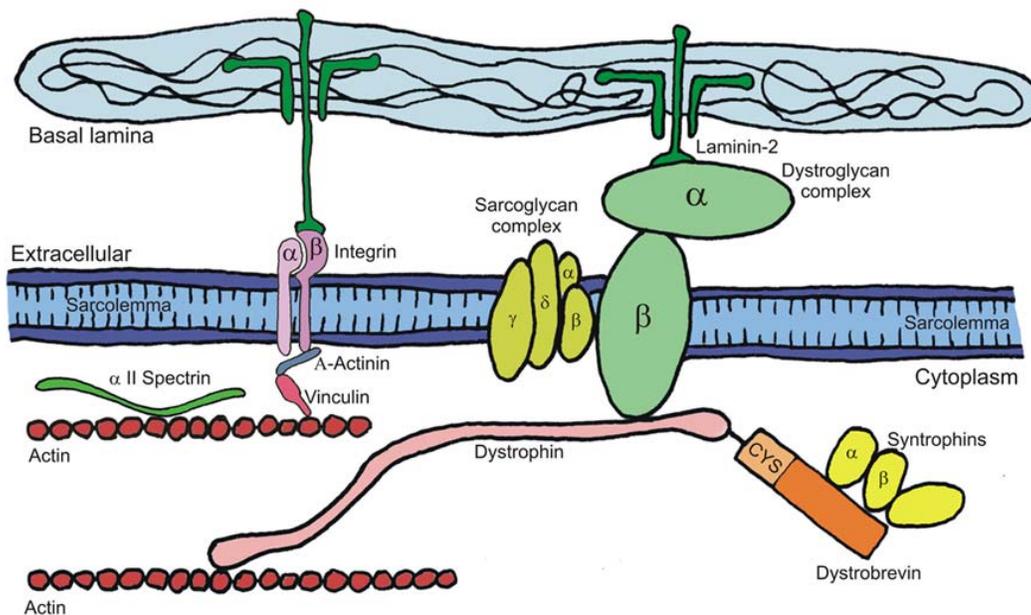


Figura 1. Complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CGD). Representação esquemática da organização das proteínas do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina.

*A hipótese é
o princípio de todo raciocínio experimental.
Sem ela não há investigação possível e nada se
pode realmente aprender: o único que se faria seria
acumular observações estéreis. (Claude Bernard, 1865)*

2. HIPÓTESE

Estudar as alterações morfológicas cardíacas observadas na sépsis polimicrobiana focalizando predominantemente as comunicações intercelulares e a maquinaria contrátil do miocárdio, e a possível correlação dessas alterações estruturais com a disfunção cardíaca observada na sépsis.

2.1 OBJETIVOS

Até o presente momento não existem dados na literatura demonstrando uma relação direta entre alterações nas comunicações intercelulares de cardiomiócitos vizinhos ou modificações na expressão de proteínas do citoesqueleto e da matriz extracelular com a disfunção miocárdica observada na sépsis. Portanto, o presente estudo foi proposto para (1) avaliar se alterações nas comunicações intercelulares e acoplagem mecânica entre os cardiomiócitos vizinhos pode ocorrer na sépsis e contribuir para a depressão miocárdica e (2) avaliar se há modificações na expressão das proteínas do arcabouço celular e da matriz extracelular e se essas possuem papel importante nas alterações cardiovasculares observadas na sépsis.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações gerais

Foram utilizados camundongos machos, selvagens C57BL/6, com aproximadamente 20g, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP) e mantidos no Biotério do Departamento de Patologia em condições de temperatura constante (23 a 25°C), com livre acesso a água e dieta sólida de laboratório. A composição aproximada da dieta normalmente comercializada é (g/100g): proteína 21,0; gordura 3,5; carboidratos 60,0; sais 5,3; complexo vitamínico 2,0 e cinzas (dados fornecidos pelo produtor). Essa dieta provê aproximadamente 3,5 kcal/g. O presente projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da FMRP-USP com protocolo nº 012/2004 em 26/04/2004 (Anexo A).

3.2 Delineamento experimental

Os animais foram divididos aleatoriamente e identificados em três grupos: animais falso-operados (sham); submetidos ao estímulo séptico moderado (ESM); e submetidos ao estímulo séptico grave (ESG). Foram utilizados 4 a 10 animais por grupo dependendo do experimento a ser realizado. O sacrifício dos animais foi realizado 0, 6, 12 e 24 horas pós-operatório, de acordo com a necessidade do experimento. Quando necessário, a quantidade de animais do grupo ESG foi aumentada devido ao alto índice de mortalidade. Somente os animais que desenvolveram sépsis foram considerados neste grupo.

3.3 Indução experimental de sépsis polimicrobiana

Utilizamos como modelo de sépsis polimicrobiana o modelo de ligação e perfuração do ceco (CLP - “Cecal Ligation and Puncture”), originalmente descrito por Wichterman e colaboradores em 1980, com algumas modificações. Resumidamente, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg) (Sigma-Aldrich Co, St. Louis, MO, EUA), em solução a 2,5%, administrados intraperitonealmente (i.p.). Posteriormente, foi realizada laparotomia mediana com aproximadamente 1 cm de extensão. O ceco foi localizado, exposto e ligado com linha de seda estéril. Após este procedimento, o mesmo foi perfurado duas vezes com agulha 18G (estímulo séptico grave - ESG), ou duas vezes com agulha 30G (estímulo séptico moderado - ESM). O grupo de animais falso-operado foi submetido ao mesmo procedimento, porém sem a ligação e perfuração do ceco. Após o processo cirúrgico, o ceco dos animais foi recolocado em sua posição e o abdômen fechado em duas camadas. Imediatamente após a cirurgia cada animal recebeu uma injeção subcutânea de 1 mL de salina e foi colocado em incubadora a 37°C por 30 minutos.

3.4 Avaliação da sobrevivência

A mortalidade foi determinada através da observação da sobrevivência dos animais durante o período de infecção, ou seja, após a indução dos diferentes estímulos sépticos. Foi estabelecido um prazo máximo de observação de 72 horas. Nesse experimento foram utilizados 10 animais por grupo.

3.5 Contagem de bactérias na cavidade peritoneal e no sangue

Seis horas após a indução dos diferentes estímulos sépticos, os animais foram mortos (n=5 animais por grupo) para coleta de sangue através do plexo orbital e lavado peritoneal por lavagem e punção da cavidade abdominal. Para a contagem de bactérias na cavidade abdominal, a pele dos animais foi limpa e esterilizada. Em seguida, 2 mL de PBS estéril foram injetados na cavidade abdominal com agulha estéril, o abdômen do animal foi levemente

massageado e posteriormente foi colhido 1 mL de solução. O lavado peritoneal foi diluído (1:100, 1:1000 e 1:10.000) em PBS estéril e 10 µl dessa solução foram semeados em placas de petri contendo meio Agar Müeller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, EUA) e incubados a 37°C por 24 horas. Para bacteremia, 10 µl do sangue coletado em condições estéreis foram semeados e as placas incubadas a 37°C por 24 horas (Difco Laboratories). Os resultados foram expressos como o Log do número de unidades formadoras de colônia (CFU) por mililitro (Log de CFU/mL).

3.6 Quantificação de citocinas e quimiocinas

As concentrações do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e da proteína inflamatória de monócito-1 α (MIP-1 α) foram quantificadas no sangue e lavado peritoneal 6 horas após a indução da sépsis (n=5 animais por grupo). Após a morte dos animais o sangue e o lavado peritoneal foram colhidos e centrifugados por 10 minutos a 800 g. As dosagens foram determinadas pelo método imunoenzimático ELISA. Resumidamente, placas de 96 poços foram cobertas com 50 µl/poço do anticorpo específico anti-TNF- α (2 µg/mL) e anti-MIP-1 α (1 µg/mL) (Pharmigen, San Diego, CA, EUA). Os anticorpos foram diluídos em solução de ligação (binding buffer) pH 9,0 e incubados por 18-24 horas a 4°C. Em seguida, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações inespecíficas foram bloqueadas com 100 µl de PBS/BSA 1% por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva padrão) contendo as concentrações para TNF- α (2000 pg/mL) e MIP-1 α (4000 pg/mL) (Pharmigen) foram adicionadas às placas (50 µl) e incubadas por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50 µl dos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados nas concentrações: TNF- α (0,1µg/mL) e MIP-1 α (0,2 µg/mL). Após 1 hora, as placas foram lavadas e, em seguida, foi adicionado o conjugado avidina-peroxidase (diluição de 1:5000) em cada poço e incubadas por 30 minutos. Após, 100 µl do substrato OPD (o-fenilenediamina-dihidroclorato, Sigma) em solução tampão substrato (pH 5,0) foi adicionado. As placas foram incubadas por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50 µl de H₂SO₄ (1 M) e a

densidade óptica (DO) medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados estão expressos em picogramas/mL.

3.7 Avaliação de pressão arterial

Após os períodos de tempo pré-determinados (0, 6, 12 e 24 horas), os animais de cada grupo (n=6 a 10 animais por grupo) foram anestesiados com tribromoetanol a 2,5% em doses de 250 mg/kg, i.p. Posteriormente a artéria carótida foi localizada e clampeada nas partes distal e proximal. Em seguida foi realizada uma incisão puntiforme na superfície anterior da artéria onde foi introduzido um cateter – cânula PE-10 (Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA). A cânula foi conectada a um transdutor de pressão arterial acoplado a interface Power Lab/415 (ADInstruments, Inc. Colorado Springs, CO, EUA) e registrada a pressão arterial média nos diferentes grupos experimentais.

3.8 Morte dos animais e coleta do material para análise histológica

Após 12 e 24 horas da indução da sépsis, os animais de cada grupo foram anestesiados por inalação de vapor de éter etílico (Mallinckrodt Baker, S.A., Xalostoc, México). A cavidade torácica foi aberta, expondo o coração ainda pulsando. Os corações foram rapidamente excisados, lavados com solução gelada (4°C) de NaCl a 0,9% (Anexo B), secos em papel filtro, pesados em balança de precisão (Denver Instrument Company, Arcada, CO, EUA) e imediatamente fixados por imersão em formol a 3,7% em PBS.

3.9 Microscopia óptica convencional

Os corações inteiros (n=4 animais por grupo) foram fixados por imersão em formol a 3,7% em PBS e mantidos em geladeira a 4°C *overnight*. Após esse período, os corações foram cortados do ápice para a base longitudinalmente em metades anterior e posterior. Em seguida, desidratados em concentrações crescentes de álcool 80%, 95% (30 minutos cada) e 100% (4 trocas de 1 hora cada). Após o último álcool, as amostras foram clarificadas em xilol (3

banhos de 30 minutos cada), dois banhos de parafina (2 horas cada) e incluídas em parafina. Cada bloco de parafina foi cortado em secções de 5 µm de espessura e, posteriormente, corados com hematoxilina e eosina (Anexo C).

3.10 Microscopia óptica de alta resolução (metacrilato)

Após 24 horas de fixação em formol a 3,7% em PBS (4°C), os corações foram cortados do ápice para a base longitudinalmente em metades anterior e posterior (n=6 animais por grupo). Esses corações foram desidratados em concentrações crescentes de álcool 70%, 95% (3 trocas de 15 minutos cada) e 100% (3 trocas de 1 hora cada), passados pela solução pré-infiltradora (24 horas), solução infiltradora (24 horas), incluídos em resina e colocados em suportes apropriados (Historesin[®], Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) (Anexo B). O material foi deixado pelo menos 24 horas em estufa a 60°C para endurecimento da resina. Cortes de 2,5 µm foram obtidos em micrótomo Sorvall JB4-A (DuPont Company, Newtown, CT, EUA), estirados em banho-maria à temperatura ambiente, colocados em lâmina de vidro e secos em platina aquecida a uma temperatura de 55-60°C por aproximadamente 24 horas. Logo após, os cortes foram corados com azul de toluidina (Anexo C).

3.11 Análise do coração e morfometria

O diâmetro dos cardiomiócitos do ventrículo esquerdo e septo interventricular foram analisados pelo programa Leica QWin Software V 3.2.0 (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Inglaterra) em conjunto com um microscópio óptico Leica DMR (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Inglaterra), videocâmera (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e um computador *on line*. Foram utilizados corações incluídos em metacrilato para esse estudo (n=6 animais por grupo). Foi mensurado o menor diâmetro de cada cardiomiócito em uma área padrão de 0,093 mm², em aumento de 400x. O corte histológico de cada coração foi dividido em cinco regiões: base do ventrículo esquerdo (face lateral livre), porção mediana do ventrículo esquerdo (face lateral livre), ápice, base do

septo e porção mediana do septo. Em cada região foram coletadas 50 medidas, totalizando 250 medidas por coração. Os corações controles foram submetidos aos mesmos procedimentos.

3.12 Análise de Imunofluorescência

Imediatamente após a anestesia dos animais, (n=4 animais por grupo), os corações foram excisados, lavados com solução gelada (4°C) de NaCl a 0,9%, secos em papel filtro e seccionados frontalmente em metades anterior e posterior. Esses corações foram colocados em meio de criopreservação Tissue-Tek (Triangle Biomedical Sciences, Durham, NC, EUA) e imediatamente congelados em isopentano (Vetec Química, Rio de Janeiro, RJ) resfriado em nitrogênio líquido. As amostras foram armazenadas à -80°C para estudo em imunofluorescência. Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos no criostato Leica CM 1850 (Leica Instruments Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha), transferidos para lâminas silanizadas e fixados em acetona gelada por 10 minutos. Depois de fixadas e secas em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 10 minutos) (Anexo B) e colocadas em Triton 0,5% em PBS durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas novamente com PBS (3 vezes de 10 minutos), e posteriormente incubadas com soro normal de cavalo 1:50 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) durante 30 minutos. Após, as lâminas foram incubadas com anticorpo primário diluído em BSA 1% e deixadas incubando *overnight* a 4°C. Foram utilizados anticorpos primários contra: conexina-43 (anticorpo monoclonal de camundongo anti-conexina-43, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA, diluição 1:200), N-caderina (anticorpo policlonal de coelho anti-N-caderina, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, diluição 1:200), actina sarcomérica (anticorpo monoclonal de camundongo anti- α -actina sarcomérica, Sigma Co., St. Louis, MO, EUA, diluição 1:400), miosina (anticorpo monoclonal de coelho anti-miosina, RDI, Inc Flanders, NJ, EUA) distrofina (anticorpo policlonal de coelho anti-distrofina, Santa Cruz Biotechnology, diluição 1:100), albumina (anticorpo monoclonal de camundongo anti-albumina conjugada com FITC, Bethyl Laboratories Inc., Montgomery, Texas, EUA, diluição 1:600), β -dístroglicana (anticorpo monoclonal de camundongo anti- β -dístroglicana, Vector

Laboratories, diluição 1:400) e merosina laminina α -2 (anticorpo monoclonal de camundongo anti- merosina laminina α -2, Vector Laboratories, diluição 1:100). As lâminas para as reações com anticorpos primários β -dístroglicana não foram fixadas com acetona. Após o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 10 minutos) e incubadas com anticorpo secundário. Foram utilizados como anticorpos secundários conjugados: α -mouse-IgG/FITC, α -mouse-IgG/AMCA, α -rabbit-IgG/Texas red (Vector Laboratories) 1:200 diluídos em HEPES 0,01 M, durante 1 hora em temperatura ambiente e posteriormente lavadas com PBS (3 vezes de 10 minutos). Para marcação de actina foi utilizada faloidina (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) 1:1000 diluída em BSA 0,1%. As lâminas foram deixadas na estufa a 37°C por 30 minutos e lavadas novamente com PBS (3 vezes de 10 minutos). A marcação nuclear foi feita com 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Molecular Probes) por 3 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS (3 vezes de 10 minutos) e montadas com Prolong[®] (Invitrogen, Molecular Probes). As lâminas com marcação para merosina laminina α -2 foram fixadas em paraformaldeído 2% por 1 minuto após anticorpo secundário, antes de serem montadas. Para a análise das lâminas marcadas com anticorpos contra actina e miosina foi utilizado microscópio confocal Leica TCS SP2 SE (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Wetzlar, Alemanha), as demais marcações foram analisadas em microscópio de fluorescência Leica DMR (Leica Microsystems). Em seguida, as imagens foram captadas por videocâmera (Leica DC300F, Leica Microsystems AG, Heerbrugg, Suíça) e analisadas com programa Leica QWin Software V 3.2.0 (Leica Imaging Systems Ltd., Cambridge, Inglaterra).

3.13 Análise quantitativa do sinal fluorescente

Para medir a densidade óptica do sinal fluorescente para as proteínas conexina-43, N-caderina, distrofina e β -dístroglicana, as secções de cada coração foram coradas com anticorpo específico e examinadas em microscópio de fluorescência com aumento de 400x. Para o exame das secções foi utilizado o filtro de excitação azul 480/40-nm e o filtro de supressão 527/30-nm para visualização das moléculas de conexina-43, N-caderina, distrofina e β -

distroglicana. As áreas do miocárdio selecionadas para análise apresentaram-se bem preservadas, com feixes de tecido muscular cardíaco compacto e cortados longitudinalmente para avaliação das moléculas de conexina-43 e N-caderina e transversalmente para análise das moléculas de distrofina e β -distroglicana. Foram utilizados 4 animais por grupo, sendo fotografadas 5-10 áreas de 0,093 mm² cada, de todos os corações. Os campos microscópicos foram escolhidos ao acaso, observando o critério de corte longitudinal ou transversal dos miócitos. As áreas foram determinadas e analisadas individualmente utilizando o programa Leica Qwin Standard (Leica Microsystems Image Solutions, Cambrigde, Inglaterra) em conjunto com o microscópio Leica DMR (Leica Microsystems, GmbH, Wetzlar, Alemanha), acoplado a uma câmera (Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, Suíça) e um microcomputador. Em geral, os níveis de *background* de fluorescência foram baixos e a imunorreatividade do material reconhecida pelos anticorpos anti-conexina-43 e anti-N-caderina foram concentradas nos pontos de aposição intercelular, enquanto a imunorreatividade do material reconhecida pelos anticorpos anti- β -distroglicana e anti-distrofina foram localizadas na região da membrana celular. O baixo *background* e o sinal fluorescente intensamente localizado favoreceram sua determinação facilitando a identificação dos locais de marcação. Dessa forma, foi possível obter a densidade óptica do sinal fluorescente das proteínas de maneira interativa. Algumas secções foram coradas com faloidina (Alexa Fluor 594 phalloidin, Molecular Probes, Eugene, EUA) para visualização de actina.

3.14 Western blotting

Para determinar as quantidades das proteínas conexina-43, N-caderina, distrofina e β -distroglicana nos corações sépticos, amostras do miocárdio dos ventrículos direito e esquerdo foram colhidas e analisadas por imunoblotting 24 horas após a indução de sépsis. Os corações foram coletados (n=6 animais por grupo), lavados em tampão PBS estéril e preparados para extração de proteínas. Para a extração das proteínas foram adicionados 400 μ l de tampão de extração (100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl, pH 7,6, 0,1% SDS e 1 mM PMSF; Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, MO, EUA) ao tecido que foi triturado com homogeneizador de tecidos

(Polytron, Glen Mills Inc. Clifton, NJ, EUA). Após este procedimento o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante contendo a solução de proteínas foi coletado e aliquoteado para dosagem de proteínas. Em seguida, amostras contendo 40 µg de proteínas foram aplicadas em gel de eletroforese SDS-PAGE a 4%, 7% ou 12% de acordo com o peso molecular da proteína a ser analisada. Terminada a corrida do gel, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-ECL; GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, EUA). A transferência completa das proteínas foi confirmada pela coloração de ambos, o gel e a membrana com corante Ponceau S (Sigma-Aldrich). A membrana de nitrocelulose carregando as proteínas foi colocada em solução de bloqueio com leite desnatado a 5% por 24 horas a 4°C. Após, a membrana foi lavada em solução tampão TBS-T (Tampão Tris-salina tamponada Tween-20, pH 7,6) e incubada *overnight* a 4°C com os seguintes anticorpos primários: anti-conexina-43 (diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-N-caderina (diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology), anti-distrofina (diluição 1:750, Santa Cruz Biotechnology) ou anti-β-distroglicana (diluição 1:500, Santa Cruz Biotechnology) diluídos em solução de leite desnatado a 5% e tampão TBS-T. Foram utilizados os mesmos anticorpos para Western blotting e imunofluorescência. Após o período de incubação, as membranas foram lavadas em tampão TBS-T e incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente com anticorpos secundários conjugados com HRP. Foram utilizados anticorpos anti-IgG de cabra produzido em coelho, 1:20.000 e anti-IgG de camundongo produzido em cavalo, 1:7.000 (Vector Laboratories). Em seguida, a membrana foi lavada novamente em tampão TBS-T e incubada com solução de revelação ECL (ECL Kit; GE Healthcare Bio-Sciences) de acordo com as especificações do fabricante. Após este processo, a membrana foi colocada em K-7 (chassi para revelação de Raios X) e exposta ao filme ECL (ECL Film; GE Healthcare Bio-Sciences) por 2 a 20 minutos. Após o escaneamento dos filmes de raio X, a quantificação das bandas específicas foi realizada usando o programa Gel-Pro Analyzer software (Silver Spring, MD, EUA). Os valores relatados são referentes à densidade óptica (DO) das bandas expressas em unidade arbitrária (UA).

3.15 Análise ultra-estrutural

A caracterização das alterações morfológicas do miocárdio dos animais submetidos à sépsis induzida por CLP foi analisada por microscopia eletrônica de transmissão (MET). O miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave (n=5 animais por grupo) foram lavados com solução salina a 0,9% gelada (4°C), recortados em blocos de aproximadamente 1mm² de área e imersos em solução de fixação com aldeído glutárico a 2,5% (Anexo B) em tampão cacodilato de sódio 0,2 M (pH 7,3) (Anexo D). As amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1% (Anexo B) em tampão cacodilato de sódio 0,2M por 2 horas. A desidratação foi realizada em série crescente de acetona (30%, 50%, 90% e 95%, 10 minutos cada e 100%, 3 trocas de 20 minutos cada). O material foi infiltrado com a mistura de resina e acetona 3:1, 1:1 e 1:3 (1 hora cada), resina pura (3 trocas de 1 hora cada) e inclusão em resina Araldite 502 (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA) (Anexo D). Cortes de 0,75 µm foram obtidos com navalha de vidro, corados com azul de toluidina e examinados em microscópio óptico para seleção das áreas posteriormente submetidas a cortes ultrafinos. Esses foram obtidos com navalha de diamante em ultramicrótomo Sorvall MT-5000 (DuPont Company, Newtown, CT, EUA), colocados em grades de cobre de 200 mesh (Polysciences Inc., Warrington, PA, EUA), duplamente contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo (Anexo C), observados e fotografados em microscópio eletrônico Zeiss EM109 (Carl Zeiss) a 80 kV.

3.16 Análise Estatística

Os dados obtidos foram analisados utilizando-se o programa estatístico GraphPad Prism 4 (Graph Pad Software In., San Diego, California, EUA). O teste *t* de *Student* foi utilizado para comparação entre duas variáveis com distribuição normal. Comparações múltiplas foram feitas pela análise de variância (ANOVA) e pós-teste de Tukey. O índice de sobrevivência foi apresentado como a porcentagem de animais vivos. O nível de significância escolhido foi de 5% e os dados são apresentados como média ± erro padrão da média (EPM).

4. RESULTADOS

4.1 *Indução de sépsis e avaliação do modelo de CLP*

Caracterização do índice de mortalidade em animais submetidos à sépsis polimicrobiana

Vinte e quatro horas após a indução da sépsis, os animais apresentaram piloereção, tremores, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação, sinais da instalação do estado de sépsis. O tempo de latência e a intensidade desses sinais dependeram dos calibres das agulhas utilizadas para as perfurações. Foi determinado que a sépsis moderada (grupo ESM) seria induzida por duas perfurações no ceco com agulha 30G, enquanto a sépsis grave (ESG) seria induzida por duas perfurações no ceco com agulha 18G.

A figura 2 mostra a curva atuarial de mortalidade dos animais submetidos à falsa cirurgia (sham), ao estímulo séptico moderado (ESM) e ao estímulo séptico grave (ESG). Os animais falso-operados apresentaram um índice de sobrevivência de 100% após o final do período de observação de 72 horas. Os camundongos submetidos ao estímulo séptico moderado mostraram 90% de sobrevivência 12 horas após a indução da sépsis. Após 24 horas, tempo definido como período de estudo, a porcentagem de sobrevivência dos animais do grupo ESM foi de 80%, declinando progressivamente para 50% ao fim do período de 72 horas. Os animais submetidos ao estímulo séptico grave apresentaram 70% de mortalidade 12 horas após a indução da sépsis, 90% após 24 horas e permaneceram com essa porcentagem até o final do período de observação, 72 horas.

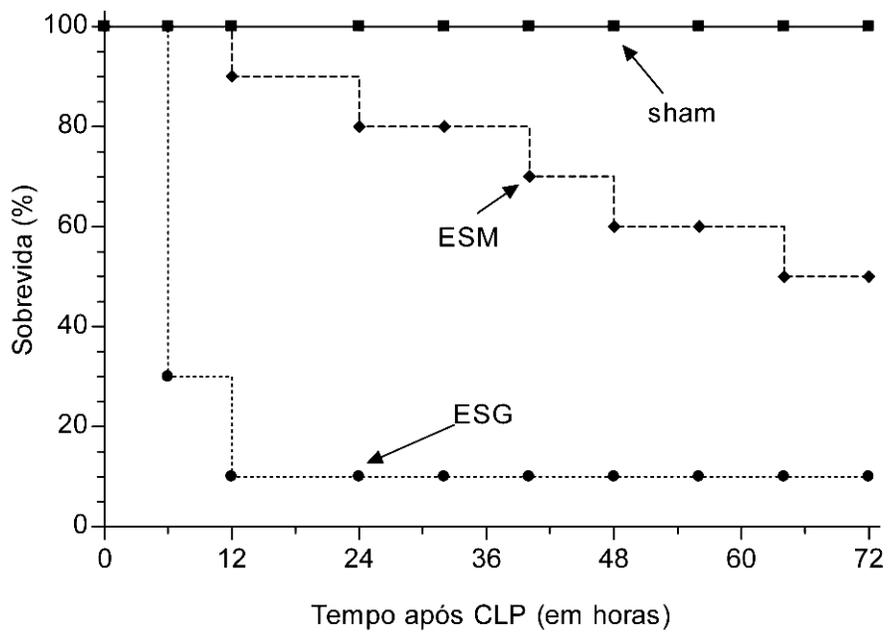


Figura 2. Sobrevida dos animais após a cirurgia de ligação e perfuração do ceco. Os dados mostram a porcentagem de sobrevida dos animais submetidos à falsa cirurgia (sham), ao estímulo séptico moderado (ESM) e ao estímulo séptico grave (ESG). A sobrevida dos animais foi acompanhada diariamente por um período de 72 horas após a indução da sépsis (n=10). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Contagem de bactérias no lavado peritoneal e no sangue

A avaliação do *clearance* bacteriano foi realizada 6 horas após a indução dos diferentes estímulos sépticos. A figura 3 mostra o número de bactérias presentes na cavidade peritoneal e no sangue dos animais submetidos à sépsis polimicrobiana. Os animais do grupo ESM apresentaram uma pequena quantidade de bactérias na cavidade peritoneal (Figura 3A) não mostrando diferença significativa quando comparados aos animais do grupo falso-operado. Entretanto, nos animais do grupo ESG o número de bactérias encontrado na cavidade peritoneal foi alto, superior aos valores observados no grupo ESM. A figura 3B mostra o número de bactérias presentes no sangue dos animais submetidos aos diferentes estímulos. Os animais do grupo ESM exibiram bacteremia leve, não diferindo estatisticamente dos valores encontrados nos animais falso-operados. Já os animais do grupo ESG apresentaram um elevado número de bactérias no sangue quando comparados aos animais do grupo ESM e do grupo falso-operado, indicando deficiência no controle do foco infeccioso.

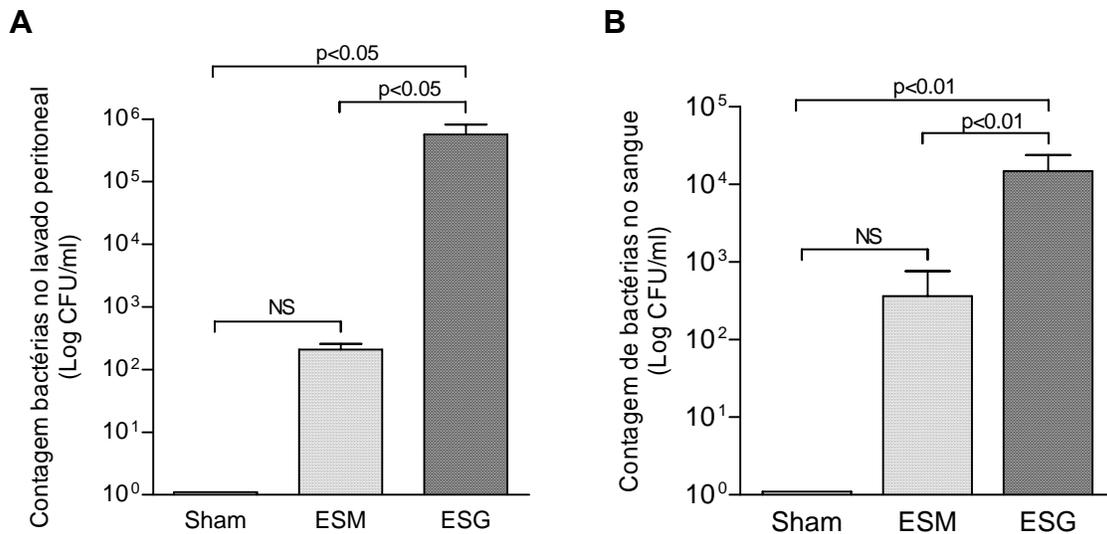


Figura 3. Contagem de bactérias no lavado peritoneal e no sangue. O número de bactérias no lavado peritoneal (**A**) e no sangue (**B**) foi quantificado 6 horas após a indução da sépsis polimicrobiana, nos animais do grupo falso-operado (sham), submetidos ao estímulo séptico moderado (ESM) e grave (ESG). O número médio de CFUs na cavidade peritoneal e no sangue dos animais do grupo ESG foi maior que os valores obtidos nos grupos ESM e sham. Os resultados são expressos como o número de unidades formadoras de colônias (CFU) por mililitro de amostra (n=5) e são representativos de dois experimentos independentes.

Quantificação de citocinas e quimiocinas

Os níveis de TNF- α e MIP-1 α foram determinados no lavado peritoneal e no soro dos animais 6 horas após a indução da sépsis polimicrobiana (Figura 4). Os níveis de TNF- α no lavado peritoneal e no soro dos animais do grupo ESM não foram estatisticamente diferentes dos valores encontrados nos animais do grupo falso-operado. Entretanto, nos animais do grupo ESG, as concentrações de TNF- α , tanto no lavado peritoneal quanto no soro foram muito acentuadas se comparadas aos valores encontrados nos grupos ESM e falso-operado. Os níveis de MIP-1 α no lavado peritoneal dos animais do grupo ESM foram significativamente maiores quando comparados aos animais falso-operados, enquanto os níveis séricos dessa quimiocina não diferiram entre si. As concentrações de MIP-1 α , tanto no soro quanto no lavado peritoneal dos animais do grupo ESG, foram muito elevadas quando comparadas a ambos os grupos, ESM e falso-operado.

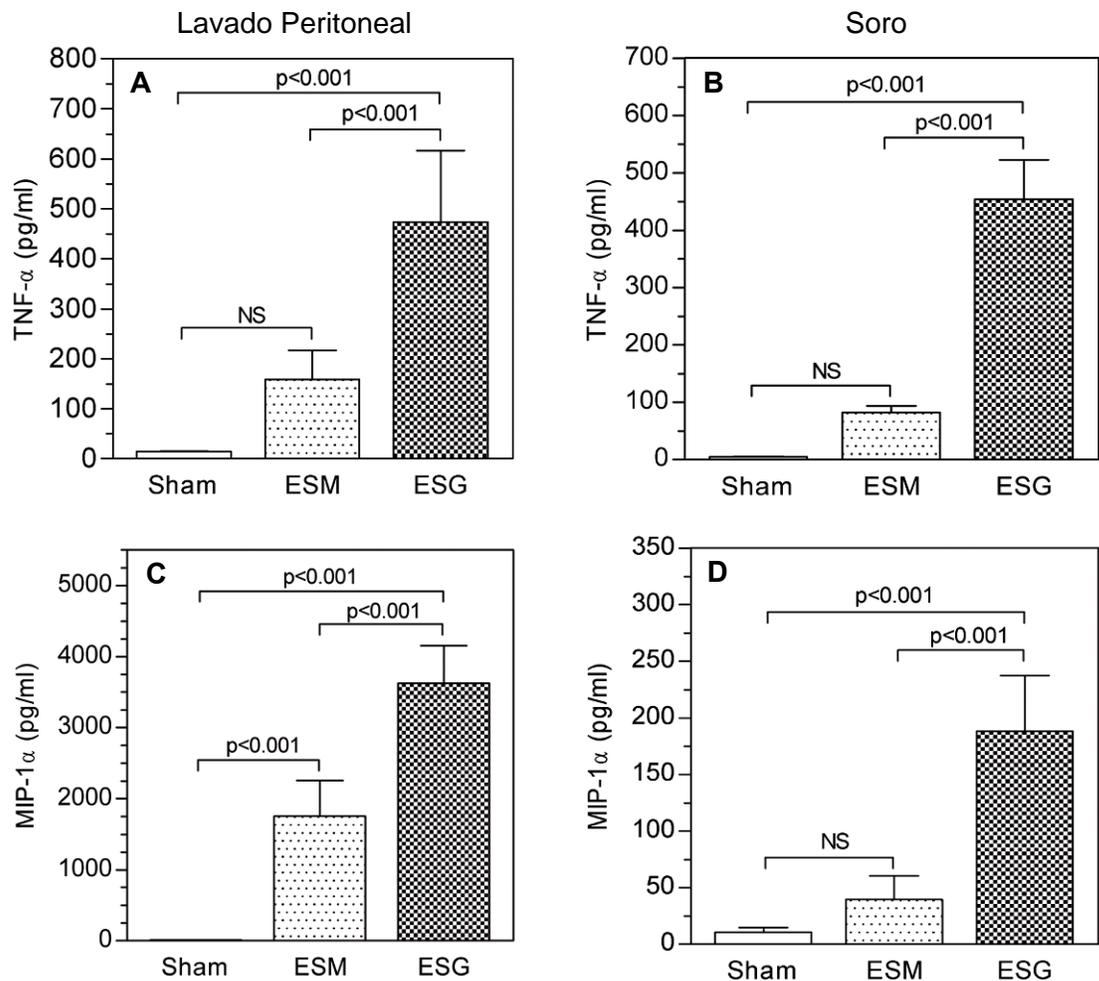


Figura 4. Quantificação de citocinas e quimiocinas no lavado peritoneal e soro após indução da sépsis. As concentrações de TNF- α (A, B) e MIP-1 α (C, D) foram avaliadas no lavado peritoneal e no soro dos animais falso-operados (sham), submetidos à sépsis moderada (ESM) e grave (ESG), 6 horas após a cirurgia. Os dados mostram um aumento significativo de TNF- α e MIP-1 α no lavado peritoneal e no soro dos animais do grupo ESG se comparados aos demais grupos ESM e sham. Os resultados são expressos em picogramas por mL (n=5) e são representativos de dois experimentos independentes.

Avaliação da pressão arterial média

A figura 5 mostra o valor médio da pressão arterial (mmHg) dos animais submetidos aos diferentes estímulos sépticos. Nos períodos experimentais de 0, 6, 12 e 24 horas após a indução de sépsis, a artéria carótida dos camundongos foi canulada e foram realizados os registros de pressão arterial média nos animais falso-operados, submetidos à sépsis moderada e a sépsis grave.

O primeiro registro da pressão arterial média foi realizado no tempo 0 (zero) do experimento, imediatamente após a indução da sépsis polimicrobiana, e mostrou valores similares entre os animais dos grupos falso-operado ($120,20 \pm 7,23$ mmHg), ESM ($114,70 \pm 7,67$ mmHg) e ESG ($117,60 \pm 6,95$ mmHg). Seis horas após a indução da sépsis, a pressão arterial média foi significativamente menor nos animais dos grupos ESM ($85,42 \pm 16,69$ mmHg) e ESG ($54,29 \pm 12,34$ mmHg), quando comparados aos animais falso-operados ($118,90 \pm 5,64$ mmHg) no mesmo período. A próxima avaliação, realizada 12 horas após a indução da sépsis, mostrou uma redução significativa da pressão arterial média nos animais dos grupos ESM e ESG ($85,57 \pm 14,35$ mmHg e $47,43 \pm 12,84$ mmHg, respectivamente) quando comparados aos valores registrados nos animais falso-operados ($117,8 \pm 4,71$ mmHg). Ao final do período de avaliação, 24 horas após a indução da sépsis polimicrobiana, a pressão arterial média dos animais do grupo ESM e do grupo falso-operado apresentaram medidas semelhantes ($119,20 \pm 8,64$ mmHg e $109,6 \pm 9,31$ mmHg, respectivamente). Entretanto, a pressão arterial média dos animais do grupo ESG permaneceu em níveis muito baixos sendo registrados valores de $65,86 \pm 23,02$ mmHg.

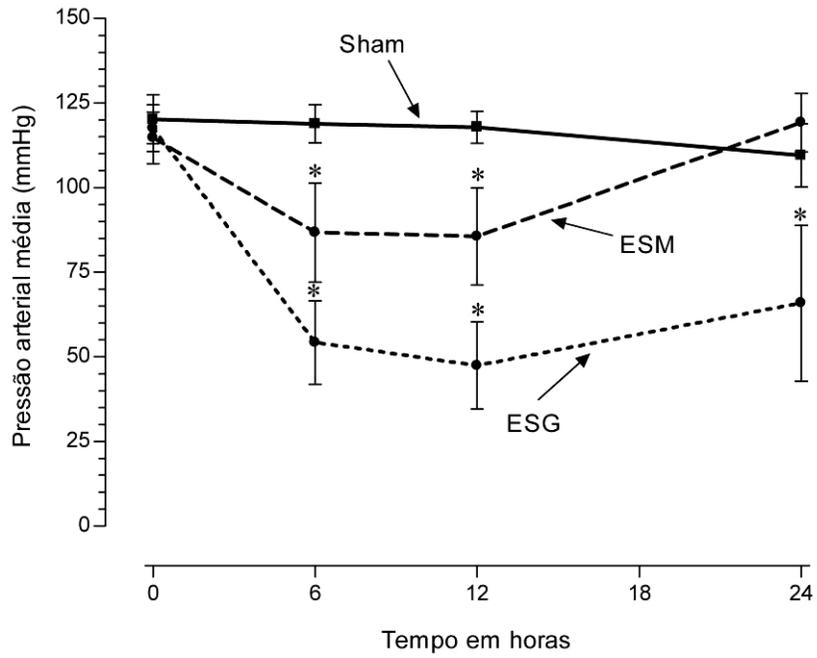


Figura 5. Curva da pressão arterial média após a indução de sépsis. O valor médio da pressão arterial carotídea foi avaliado 0, 6, 12 e 24 horas após falsa cirurgia (sham) ou indução dos estímulos sépticos: moderado (ESM) e grave (ESG). Os resultados são expressos em unidade de medida de pressão (mmHg) e são representativos de três experimentos independentes. Foram utilizados de 6 a 10 animais por grupo em cada período de avaliação.

Análise histopatológica das alterações estruturais do miocárdio

A análise histopatológica do tecido cardíaco dos animais do grupo ESG 12 horas após a indução da sépsis polimicrobiana não apresentou alterações morfológicas relevantes, visíveis ao microscópio óptico (dados não mostrados). Entretanto, 24 horas após a indução da sépsis, no miocárdio dos animais do grupo ESG observou-se a formação de focos difusos de miocitólise (Figura 6) e presença de edema, quando comparado ao miocárdio dos animais falso-operados. Não foi detectada a presença de infiltrado inflamatório no miocárdio dos animais do grupo ESG em nenhum dos períodos avaliados.

As alterações estruturais ocorridas no miocárdio durante a sépsis puderam ser observadas em maiores detalhes quando o tecido cardíaco dos animais do grupo falso-operado e ESG foram submetidos à técnica de microscopia óptica de alta resolução (metacrilato). São mostrados apenas os resultados obtidos 24 horas após a indução da sépsis grave (Figura 7), onde a formação dos focos de miocitólise e a presença de edema se tornam mais evidentes.

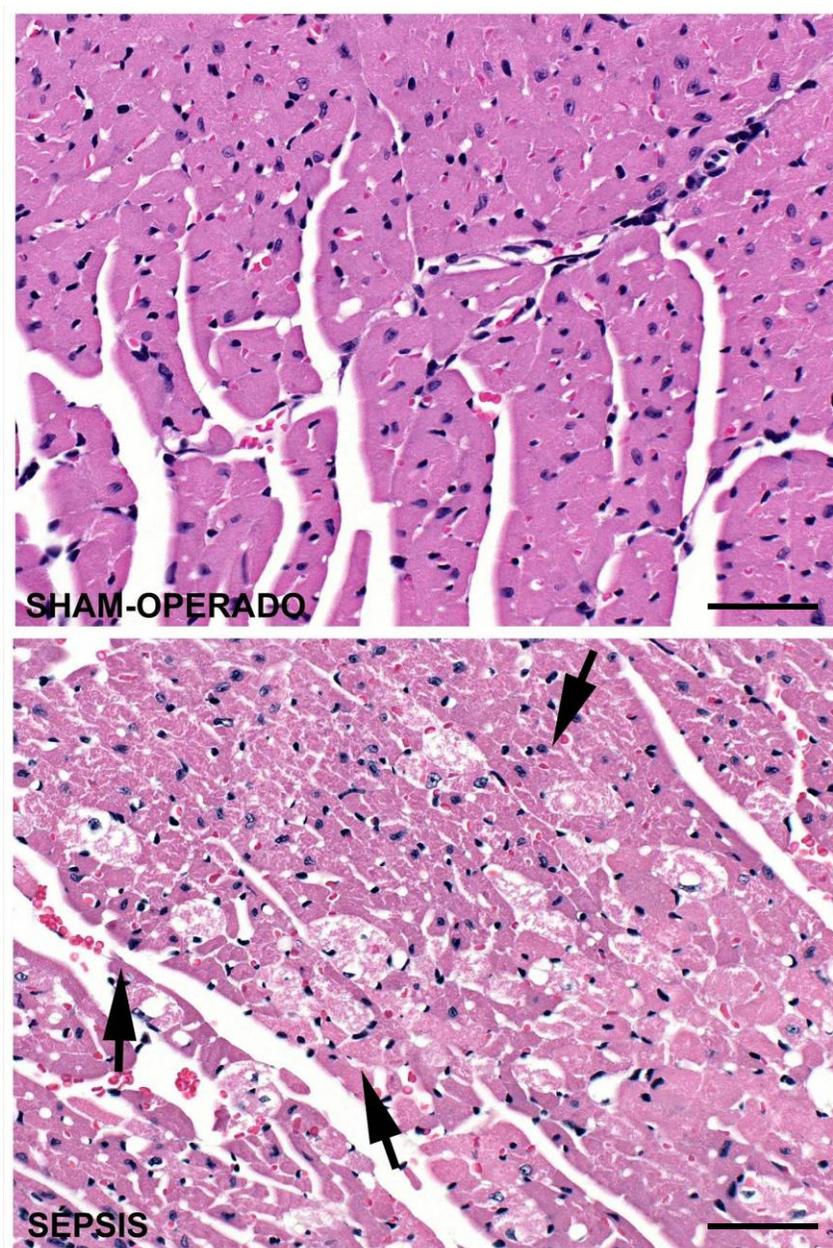


Figura 6. Análise histopatológica do miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave (material incluído em parafina). O miocárdio dos animais do grupo sham (painel superior) e ESG (painel inferior), 24 horas pós a indução de sépsis, foram corados com hematoxilina e eosina e analisados ao microscópio óptico. As setas indicam a formação de focos difusos de miocitólise no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG. Resultados representativos de três experimentos realizados separadamente. As barras indicam 50 μ m em aumento de 400x.

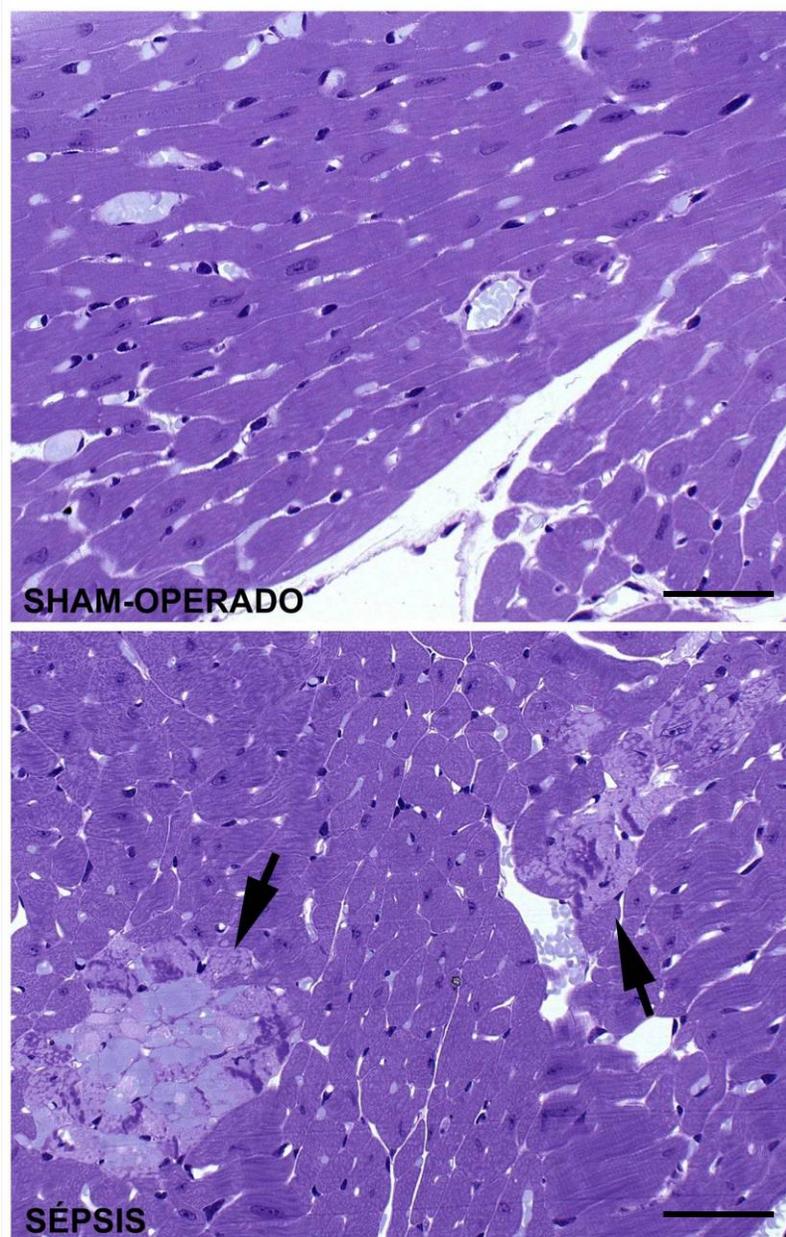


Figura 7. Análise histopatológica do miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave (material incluído em metacrilato). O miocárdio dos animais do grupo sham (painel superior) e ESG (painel inferior), 24 horas pós a indução de sépsis, foram submetidos à microscopia óptica de alta resolução (metacrilato). A formação dos focos de miocitólise e a presença de edema tornam-se mais evidentes no miocárdio séptico. Resultados representativos de três experimentos realizados separadamente. As barras indicam 50 μ m em aumento de 400x.

Avaliação morfológica das células miocárdicas

A figura 8A mostra os resultados da avaliação morfológica das células miocárdicas do ventrículo esquerdo, realizada 12 horas após a indução da sépsis. Os resultados demonstraram que os cardiomiócitos dos animais do grupo ESG apresentaram um discreto aumento no diâmetro quando comparado aos animais do grupo ESM e falso-operado. As células do miocárdio dos animais do grupo ESG encontravam-se aproximadamente 10,03% maiores que os cardiomiócitos dos animais do grupo ESM e 16,42% maiores que as células dos animais falso-operados. Após 24 horas do estímulo séptico, os diâmetros dos cardiomiócitos dos animais do grupo ESG encontravam-se visivelmente maiores, se comparados aos cardiomiócitos dos animais do grupo ESM e falso-operado, indicando aumento do edema intracelular (figura 8B). Os diâmetros dos cardiomiócitos dos animais submetidos à sépsis grave encontravam-se aproximadamente 21,15% maiores que os cardiomiócitos dos animais do grupo ESM e 31,44% maiores que as células dos animais normais.

O gráfico "box and whisker plot" (figura 8) mostra o conjunto de todos os dados, sendo particularmente útil para comparar diversos grupos. O gráfico se estende acima do *box* mostrando os maiores valores obtidos e abaixo do *box* mostrando os menores valores (relacionado à escala de quartis). A barra transversal no *box* indica a mediana dos valores. As linhas de cada extremidade representam os pontos os mais remotos.

Quando todos os valores obtidos na análise morfológica das células miocárdicas do ventrículo esquerdo, 12 e 24 horas após a indução da sépsis, são colocados em um gráfico de distribuição de frequência pode-se observar claramente um desvio à direita dos valores dos diâmetros dos miócitos no grupo ESG, se comparados aos valores dos grupos ESM e falso-operado. Esse desvio torna-se mais acentuado 24 horas após a indução da sépsis (Figura 9).

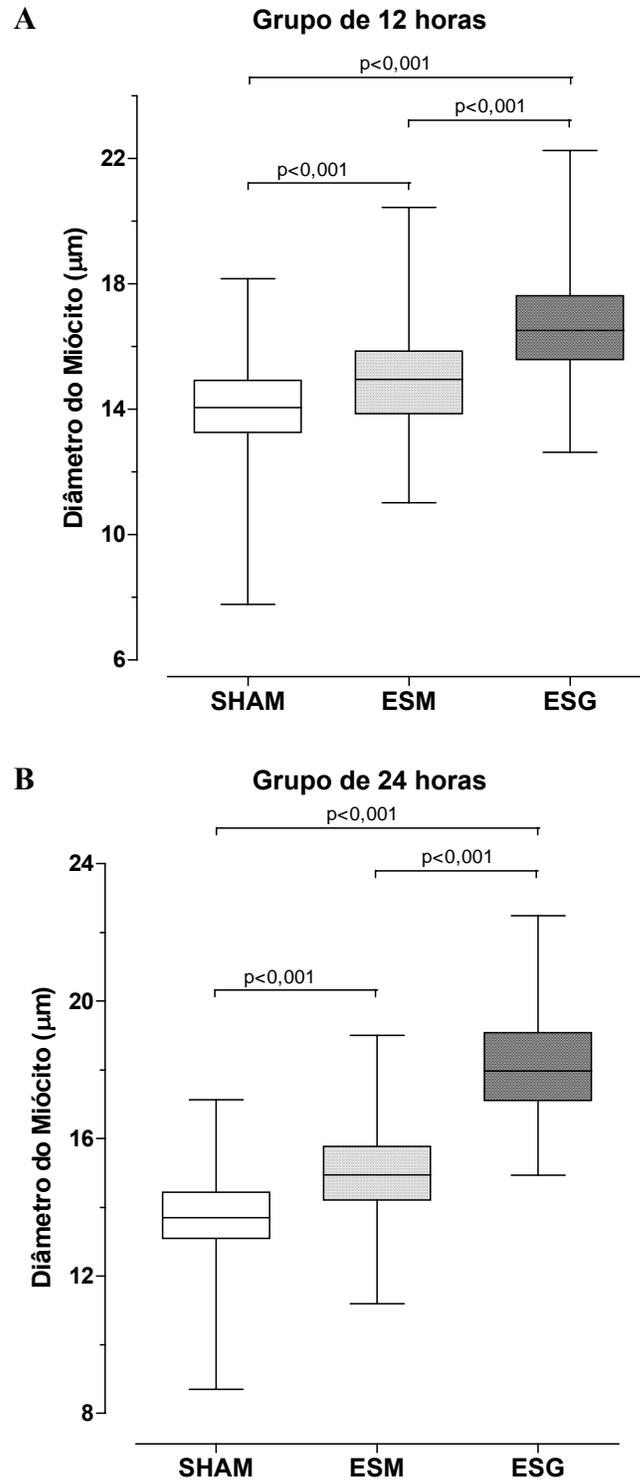


Figura 8. Diâmetro das células miocárdicas dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos. Nota-se um aumento do diâmetro das células miocárdicas do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESM e ESG, 12 (A) e 24 (B) horas após a indução de sépsis. Os resultados são expressos em micrômetros (μm) e são representativos de dois experimentos independentes. Foram utilizados 6 animais por grupo em cada período de avaliação.

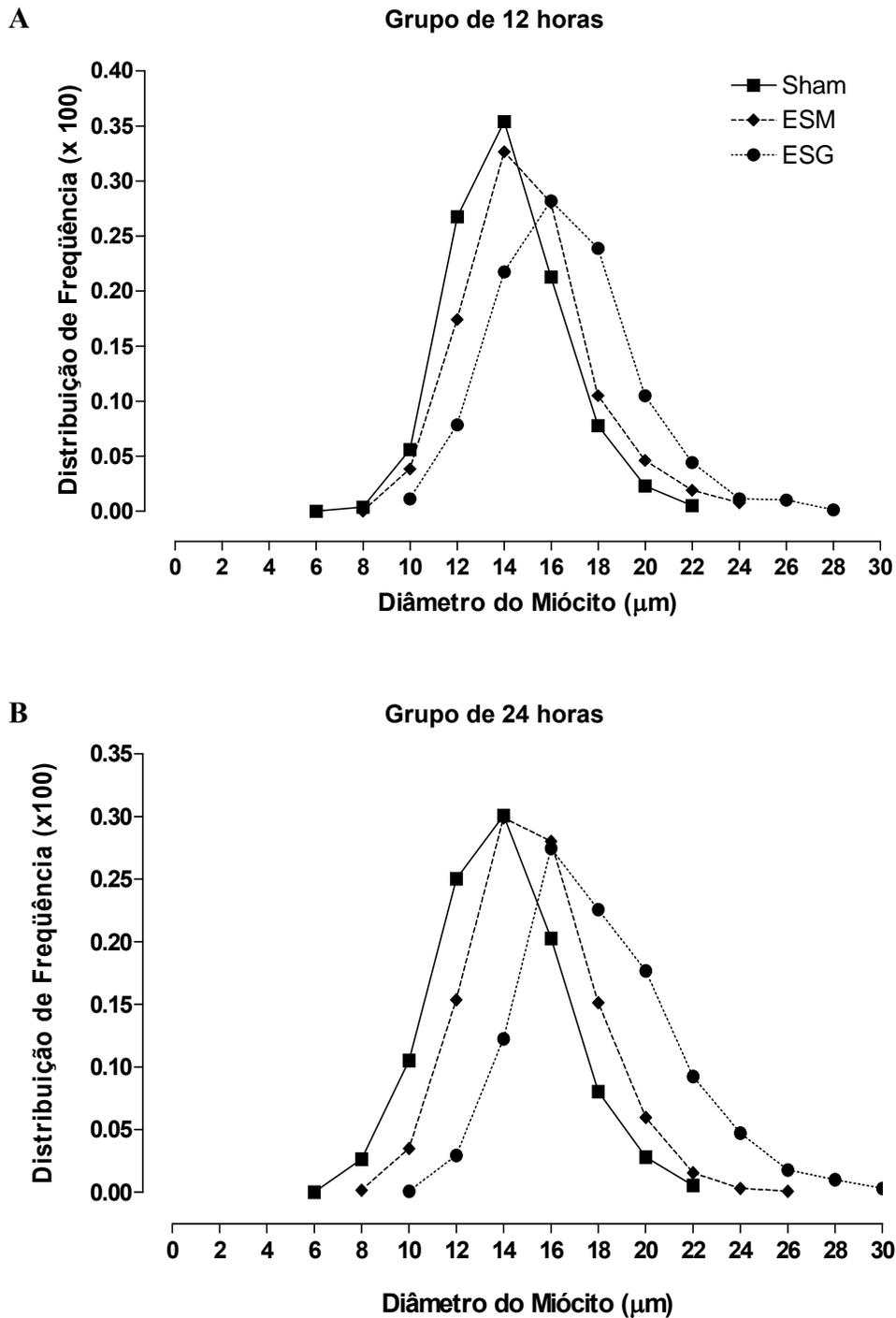


Figura 9. Distribuição de frequência dos valores do diâmetro das células miocárdicas do ventrículo esquerdo dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos. Observa-se um desvio à direita dos valores nos animais do grupo ESG, 12 (A) e 24 (B) horas após a indução da sépsis, caracterizando o aumento do diâmetro das células miocárdicas desses animais em comparação aos demais grupos.

Análise ultra-estrutural do miocárdio

O estudo ultra-estrutural revelou que o miocárdio dos animais falso-operados era indistinguível do esperado para o músculo cardíaco de mamíferos (Moore et al., 1957, Rossi et al., 1980, Severs et al., 2000) (Figura 10A). O miocárdio dos animais com sépsis grave (Figura 10 B, C e D) apresentou alterações significativas: fragmentação e desorientação de miofibrilas, edema intermiofibrilar, alterações mitocondriais caracterizadas por tumefação e diminuição da densidade da matriz, formação de bandas de contratura e ruptura do sarcolema de cardiomiócitos.

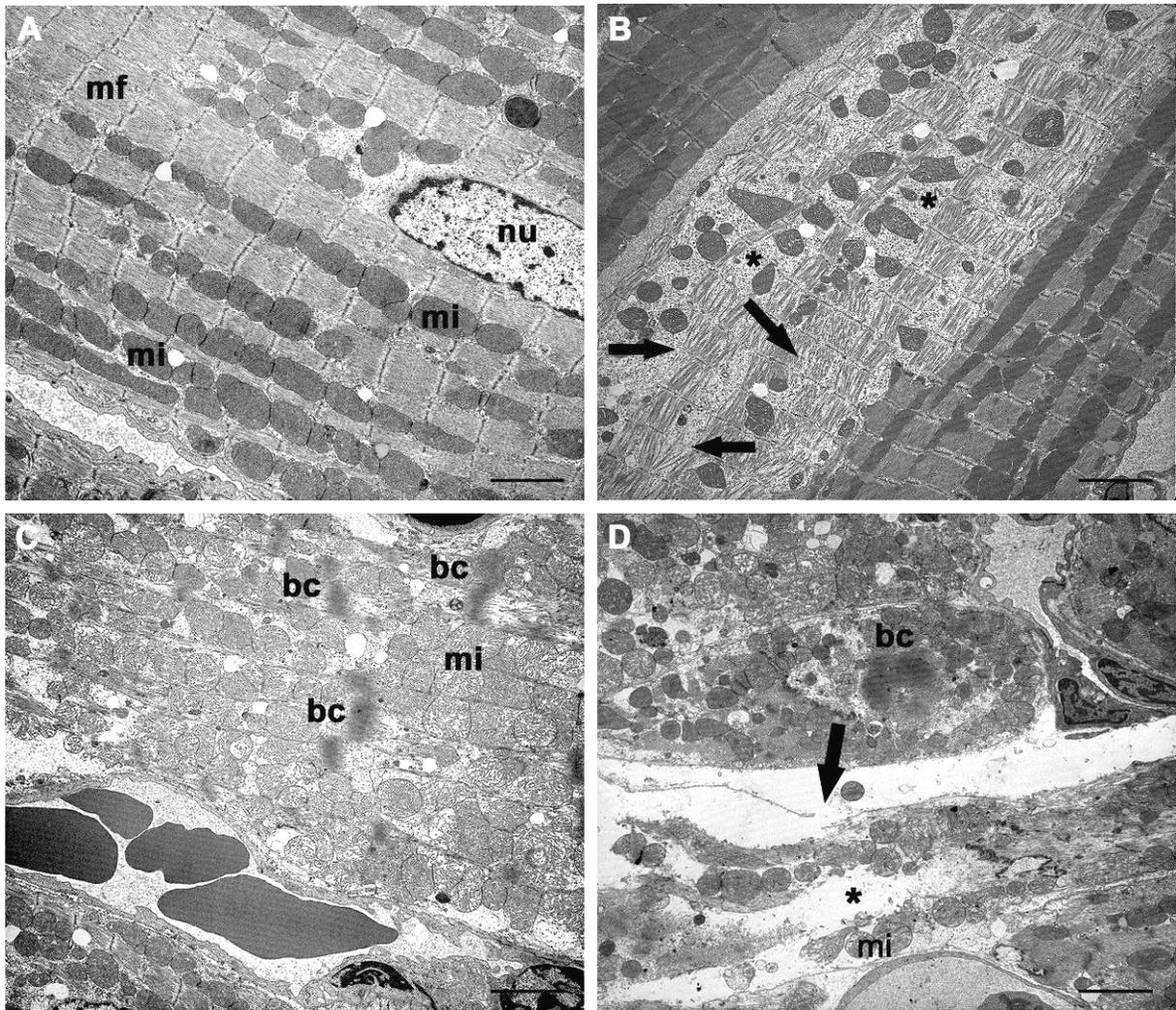


Figura 10. Alterações ultra-estruturais miocárdicas na sépsis induzida por CLP. O miocárdio ventricular dos animais falso-operados não apresentou alterações em sua estrutura miofibrilar (A). Ao contrário, os animais do grupo ESG, 24 horas após a indução da sépsis apresentaram (B) fragmentação e desorientação das miofibrilas com presença de edema intermiofibrilar, (C) tumefação mitocondrial com diminuição da matriz e bandas de contração, (D) ruptura do sarcolema e formação de bandas de contração. A fragmentação das miofibrilas e a ruptura do sarcolema está indicada pelas setas pretas, edema intermiofibrilar (*), núcleo (nu), miofibrila (mf), mitocondria (mi) e banda de contração (bc) estão indicados por letras e símbolos. Em A, a barra indica 2 μm , em B, C e D, as barras indicam 3 μm .

4.2 As junções celulares na sépsis induzida por CLP

As fibras musculares cardíacas são formadas por muitas células individuais, conectadas entre si pelos discos intercalares. Considerando o fato das membranas celulares se fundirem umas às outras de modo a formar junções comunicantes permeáveis, permitindo a difusão e a movimentação relativa de íons e pequenas moléculas ao longo dos eixos longitudinais das fibras cardíacas, pode-se afirmar que a ruptura das proteínas que formam os discos intercalares poderia causar cardiomiopatias e outras mudanças que poderiam ser fatais. (Perriard et al., 2003). Desse modo, nessa fase do estudo avaliamos o remodelamento dos discos intercalares através da análise qualitativa e quantitativa da expressão das proteínas conexina-43 (principal proteína constituinte das *gap junctions*) e N-caderina (principal proteína constituinte das junções aderentes) envolvidas com a formação dos discos intercalares.

Avaliação do perfil de expressão de conexina-43

Como mostrado na figura 11A, imagem representativa da análise qualitativa da intensidade de imunofluorescência para conexina-43 no miocárdio do ventrículo esquerdo de animais falso-operados (painel superior esquerdo) e submetidos à sépsis grave (painel superior direito), a marcação fluorescente foi claramente identificada nos pontos de aposição intercelular. Após a análise das secções imunofluorescentes coradas com anticorpo anti-conexina-43 foi observada a redução acentuada do sinal fluorescente no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG, enquanto o miocárdio dos animais falso-operados apresentou marcação abundante para essa proteína. A análise da área média (em porcentagem) e da intensidade de fluorescência (densidade óptica expressa em unidades arbitrárias, DO) de conexina-43 no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais submetidos à sépsis grave ($1,18\% \pm 0,20\%$ e $9,8 \pm 0,76$ DO, respectivamente) foi fortemente reduzida quando comparada aos valores observados no miocárdio dos animais falso-operados ($2,25\% \pm 0,21\%$ e $16,04 \pm 0,78$ DO, respectivamente). Os dados mostram uma redução de aproximadamente 47,5% de área marcada (Figura 11B) e 40% de intensidade de fluorescência (Figura 11C) no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG.

A análise quantitativa por imunoblotting foi realizada no lisado de proteínas do miocárdio dos animais controle e sépticos para estimar a quantidade relativa de conexina-43 em relação à quantidade total de proteínas. A Figura 12 mostra a quantidade de conexina-43 com valores expressos em unidades arbitrárias (UA), 24 horas após indução da sépsis polimicrobiana. Os níveis de conexina-43 encontrados no tecido cardíaco dos animais do grupo ESG ($658,90 \pm 14,80$ UA) foram significativamente reduzidos quando comparados aos valores encontrados no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado ($1420,00 \pm 34,15$ UA) e a falso-operados ($1380,00 \pm 75,24$ UA).

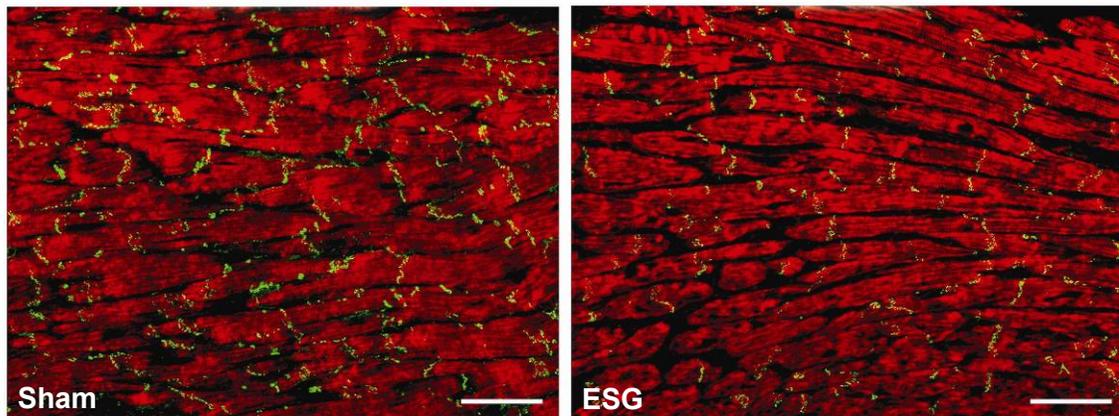
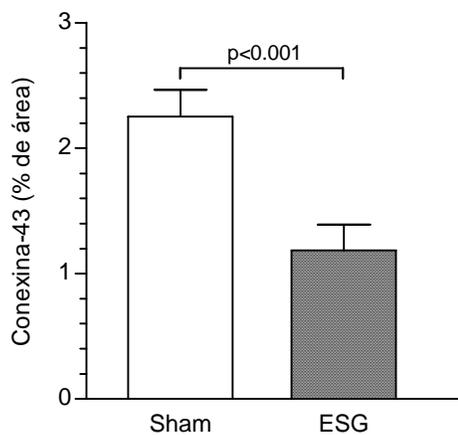
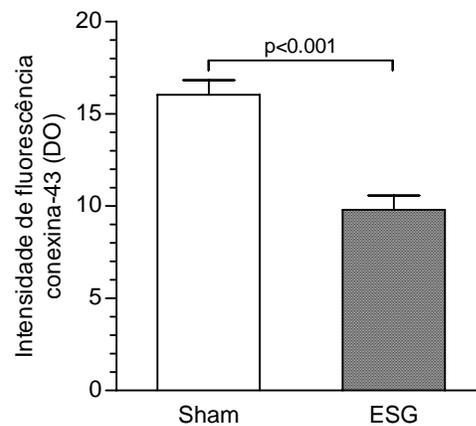
A**B****C**

Figura 11. Análise imunofluorescente de conexina-43 no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. Em (A), foto representativa da microscopia de fluorescência para conexina-43 no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo sham (painel esquerdo) e ESG (painel direito). A coloração verde (FITC) indica a presença de conexina-43 e a coloração vermelha (Texas Red) indica presença de actina. A área média (%) e a intensidade de fluorescência (DO) de conexina-43 no miocárdio dos animais do grupo ESG foram fortemente reduzidas em relação aos animais sham (B e C, respectivamente). Nos painéis de imunofluorescência as barras indicam 50 μm em aumento de 400x.

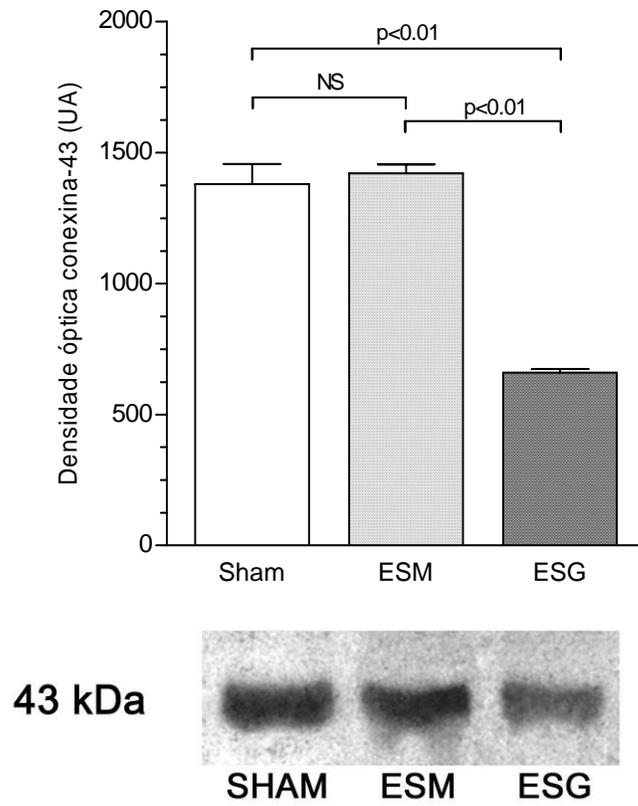


Figura 12. Análise do perfil de expressão de conexina-43 por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos. Observa-se claramente a redução nos níveis de conexina-43 no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico grave (ESG) em relação aos animais do grupo ESM e falso-operados (sham), 24 horas após a cirurgia. Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão de N-caderina

A análise qualitativa da expressão de N-caderina no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais falso-operados mostrou uma imunorreatividade amplamente distribuída. O sinal fluorescente foi observado em forma de partículas reativas, constituindo linhas orientadas transversalmente nas regiões citoplasmáticas de junção célula-célula (Figura 13A, painel superior esquerdo). Nos animais sépticos (ESG) a marcação para N-caderina foi moderadamente reduzida, em algumas áreas de junção celular foram relatadas falhas na marcação fluorescente para N-caderina indicando a perda dessa proteína (Figura 13A, painel direito).

A análise de N-caderina no tecido mostrou que os níveis de sinal fluorescente foram significativamente reduzidos no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG, se comparados aos animais falso-operados que apresentaram intensa marcação para N-caderina. A análise da área média (Figura 13B) e da intensidade de fluorescência (Figura 13C) de N-caderina no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG ($1,14\% \pm 0,17\%$ e $18,51 \pm 2,88$ DO, respectivamente) foi fortemente reduzida quando comparados aos valores encontrados no miocárdio dos animais falso-operados ($2,72\% \pm 0,95\%$ e $27,27 \pm 4,17$ DO, respectivamente). Os dados mostram uma redução de aproximadamente 58% de área marcada (%) e 32% de intensidade de fluorescência (DO) no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG.

A figura 14 mostra a quantificação de N-caderina por imunoblotting realizada de forma semelhante à conexina-43. Observa-se nesse gráfico redução significativa nos níveis de N-caderina em ambos os grupos; ESM ($798,20 \pm 74,92$ UA) e ESG ($660,60 \pm 146,30$ UA) em comparação aos valores encontrados para os animais falso-operados ($1424,00 \pm 487,60$ UA). Esses dados confirmam a diminuição da expressão N-caderina avaliada por imunofluorescência.

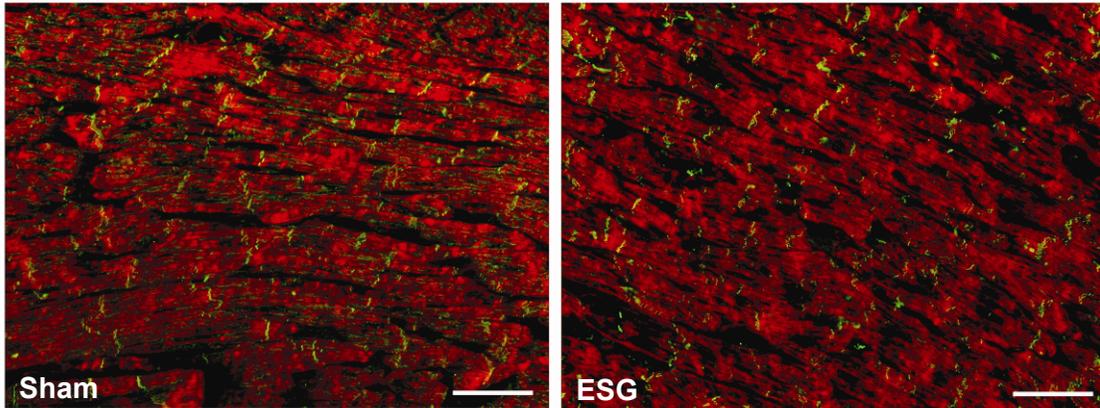
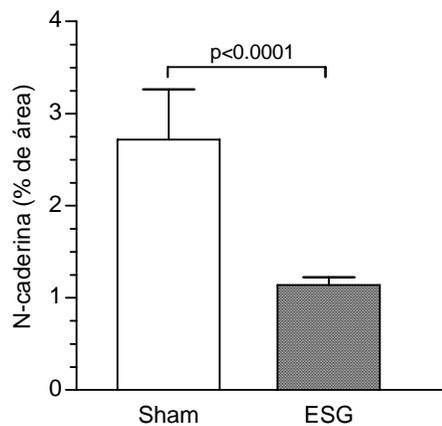
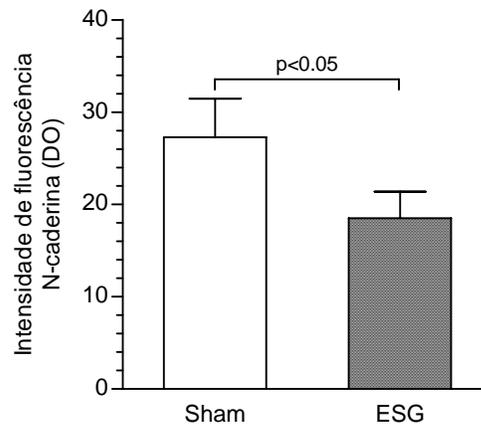
A**B****C**

Figura 13. Análise imunofluorescente de N-caderina no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. Em (A), foto representativa da microscopia de fluorescência para N-caderina miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo sham (painel esquerdo) e ESG (painel direito). A coloração verde (FITC) indica a presença de N-caderina e a coloração vermelha (faloidina - AlexaFluor 568) indica presença de actina. Em **B** e **C**, respectivamente, observa-se uma redução acentuada nos valores de área média (%) e intensidade de fluorescência (DO) para N-caderina no miocárdio dos animais do grupo ESG em relação aos animais falso-operados (sham). Nos painéis de imunofluorescência as barras indicam 50 μ m com aumento de 400x.

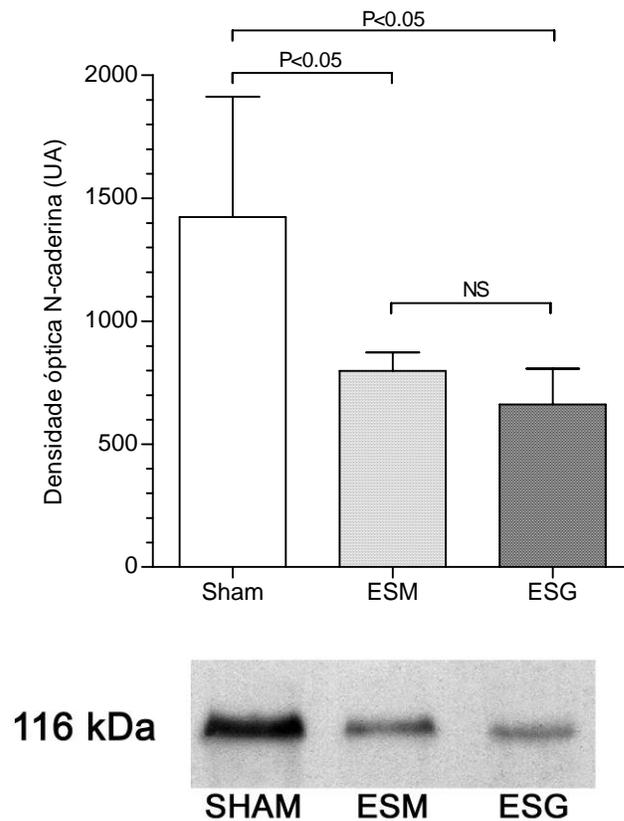


Figura 14. Análise do perfil de expressão de N-caderina por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos. Observa-se um decréscimo acentuado nos níveis de N-caderina no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico grave (ESG) e moderado (ESM), se comparados aos animais do grupo falso-operado (sham), 24 horas após a cirurgia. Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Análise ultra-estrutural dos discos intercalares

A análise ultra-estrutural do miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave foi realizada para verificar a presença de possíveis alterações nos discos intercalares 24 horas após a indução de sépsis. A análise dos fragmentos do miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais falso-operados mostrou em maiores detalhes a ultra-estrutura do cardiomiócito, evidenciando os discos intercalares onde foi possível identificar que as regiões das *gap junctions* (GJ) e das junções aderentes *fascia adherens* (FA) não apresentavam alterações estruturais. Entretanto, a análise dos corações sépticos mostrou que aproximadamente 30 a 50% (análise subjetiva) dos discos intercalares dos miócitos cardíacos dos animais do grupo ESG apresentaram-se parcialmente deiscentes ou separados (Figura 15).

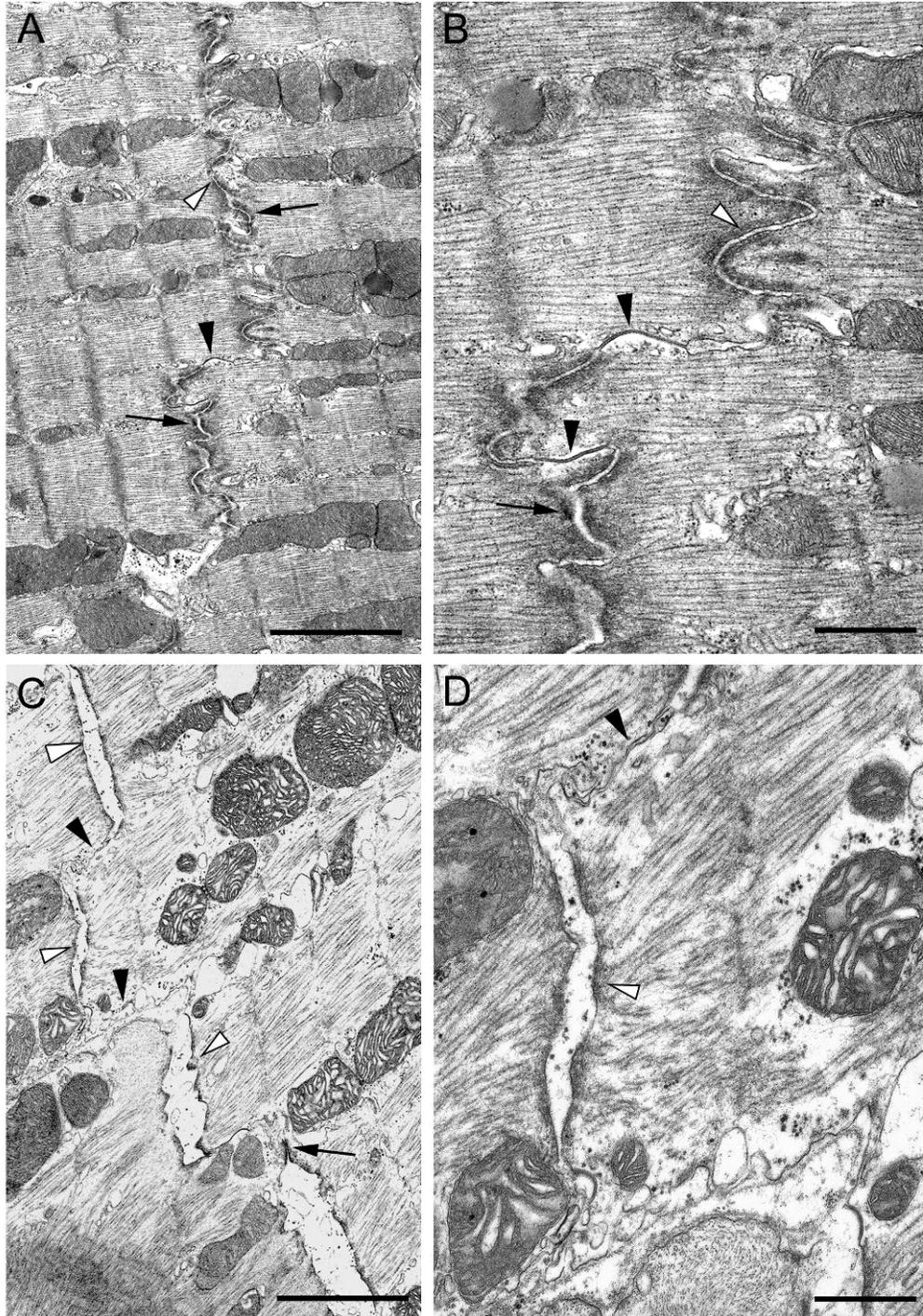


Figura 15. Deiscência das *gap junctions* e junções aderentes nos corações sépticos. Os discos intercalares no miocárdio dos animais falso-operados não apresentaram alterações estruturais (A, B). Em contraste, os discos intercalares do miocárdio ventricular esquerdo dos animais do grupo ESG apareceram parcialmente deiscentes ou separados (C, D). As *gap junctions* estão indicadas pelas cabeças de seta pretas, as junções aderentes são indicadas pelas cabeças de seta brancas e os desmossomos são indicados pelas setas. Em A e C, a barra indica 2 μm , em B e D, a barra indica 0,5 μm .

4.3 O aparelho contrátil e suas conexões com a matriz extracelular

O tecido muscular tanto cardíaco quanto esquelético é caracterizado pela propriedade de contração e distensão de suas células. Durante esse processo, a maquinaria contrátil interna do miócito deve permanecer intimamente conectada à membrana celular e à matriz extracelular. Sem essa associação, os movimentos poderiam ser transmitidos inadequadamente e os miócitos sofreriam sérios riscos de lesões em suas membranas (Hein et al., 2000). Sendo assim, a partir desse ponto focaremos as estruturas do aparelho contrátil e de ancoragem do sistema miofilamentar – distrofina e o complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CGD) – com a matriz extracelular, representada pela laminina- α 2.

Avaliação do perfil de expressão de actina e miosina

O padrão de expressão das proteínas de contração muscular, actina e miosina, foram distintos entre os grupos dos animais falso-operados e submetidos à sépsis polimicrobiana. A análise das secções imunofluorescentes do miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais falso-operados mostrou o sinal fluorescente para actina (Figura 16, painel superior) e miosina (Figura 17, painel superior) distribuído regularmente através das células musculares cardíacas. Por outro lado, no tecido cardíaco dos animais sépticos (ESG), a localização do sinal fluorescente para actina (Figura 16, painel inferior) e miosina (figura 17, painel inferior) foi desordenada e difusa com redução da expressão de miosina no tecido, indicando um desarranjo da estrutura dos sarcômeros. Em algumas células, a marcação fluorescente para miosina e actina foi perdida, mostrando “falhas” na continuidade das proteínas contráteis do miocárdio ou colapso da estrutura miofilamentar cardíaca. Essas características correspondem a formação de focos difusamente espalhados de ruptura das moléculas de actina e miosina, representando a lise focal dos miofilamentos.

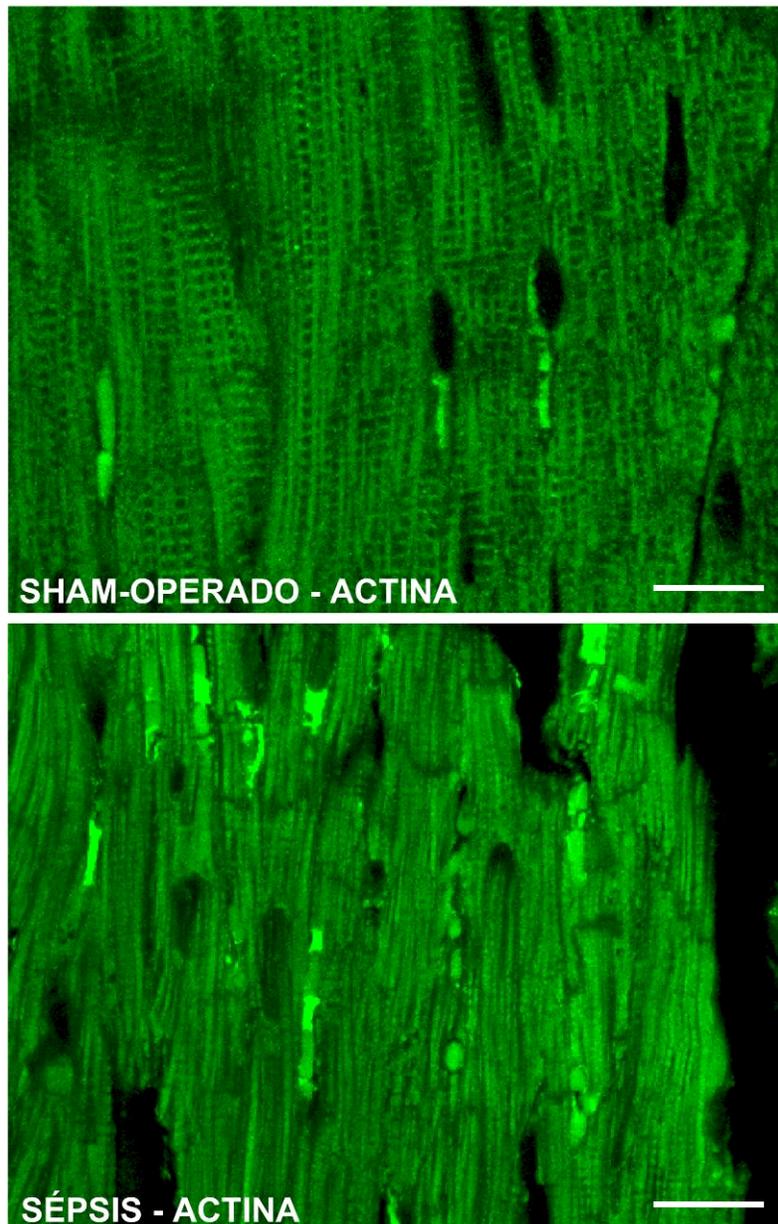


Figura 16. Análise imunofluorescente (confocal) de actina no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. A marcação fluorescente verde (FITC) indica presença de actina sarcomérica no tecido cardíaco de animais falso-operados (painel superior) e submetidos ao estímulo séptico grave (painel inferior). Nota-se a desorganização do padrão de expressão de actina no miocárdio dos animais sépticos com ruptura da estrutura miofilamentar, se comparado ao tecido dos animais falso-operados. Resultados representativos de três experimentos realizados separadamente. As barras indicam 50 μm em aumento de 400x.

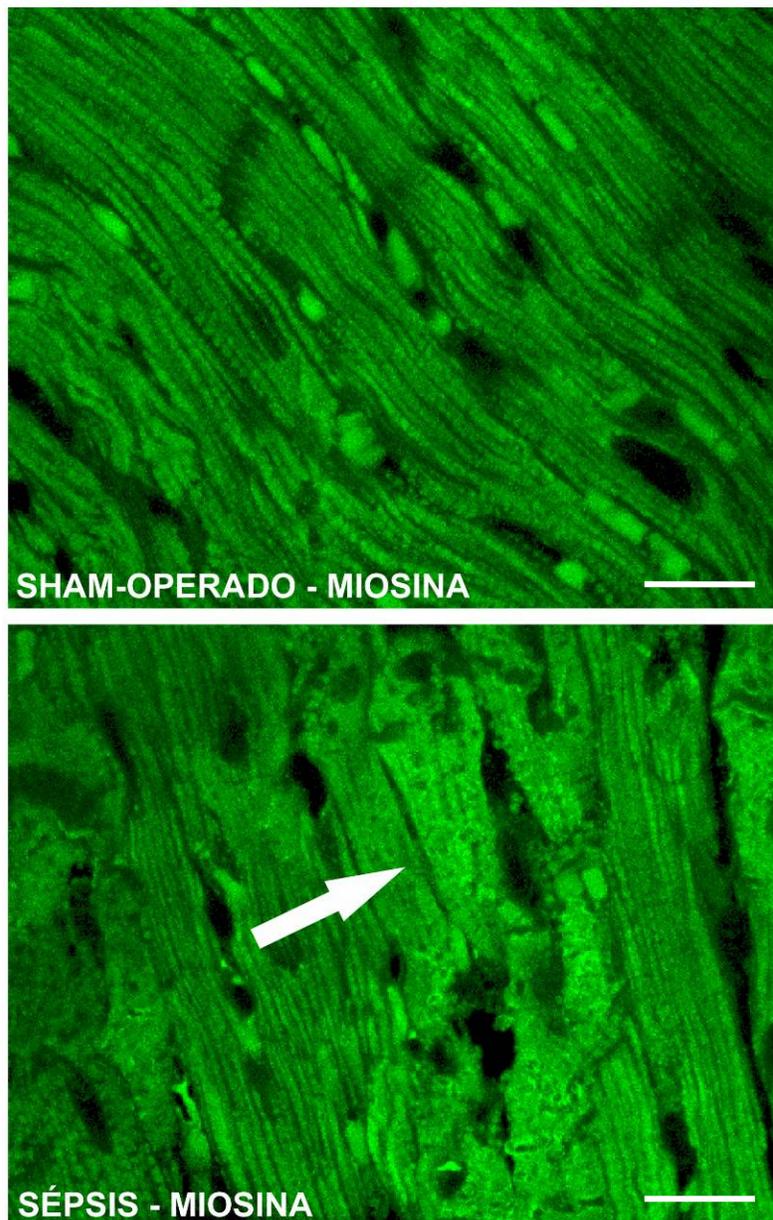


Figura 17. Análise imunofluorescente (confocal) de miosina no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. A marcação fluorescente verde (FITC) indica presença de miosina no tecido cardíaco de animais falso-operados (painel superior) e submetidos ao estímulo séptico grave (painel inferior). Observa-se a redução da expressão de miosina no tecido com formação de focos difusamente espalhados de ruptura dessa molécula, representando a lise focal dos miofilamentos (seta). Resultados representativos de três experimentos realizados separadamente. As barras indicam 50 μm em aumento de 400x.

Avaliação do perfil de expressão de distrofina

Como mostrado na figura 18A, imagem representativa da análise qualitativa da intensidade de imunofluorescência para distrofina, no miocárdio do ventrículo esquerdo de animais do grupo falso-operado (painel esquerdo) e do grupo ESG (painel direito), a marcação fluorescente foi visivelmente identificada logo abaixo do sarcolema, delimitando a face interna da membrana plasmática. Após a análise das secções coradas com anticorpo anti-distrofina foi observada uma redução acentuada do sinal fluorescente no tecido cardíaco dos animais do grupo ESG se comparado aos animais falso-operados que mostraram marcação abundante para essa proteína.

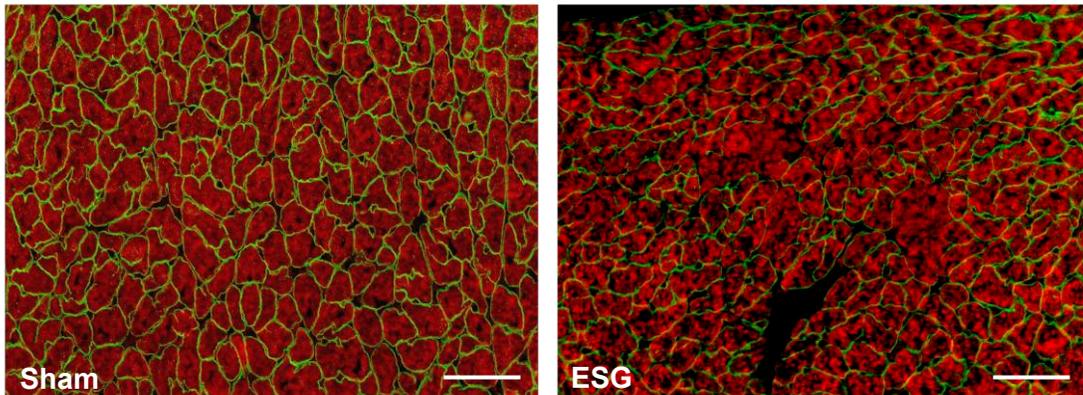
De acordo com a figura 18A, a análise da intensidade de fluorescência (figura 18B) e a mensuração da proporção de área média ocupada pela marcação fluorescente para distrofina (figura 18C) mostraram-se significativamente reduzidas no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico grave ($19,96 \pm 0,45$ DO e $10,50\% \pm 1,59\%$, respectivamente), quando comparados aos valores obtidos no grupo controle ($33,76 \pm 1,40$ DO e $17,51\% \pm 3,09\%$, respectivamente). Houve uma redução de aproximadamente 40% de área marcada (%) e 41% de intensidade de fluorescência (DO) no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG em relação aos animais falso-operados.

A análise quantitativa por imunoblotting foi realizada no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos. A Figura 19 mostra a quantidade de distrofina em unidades arbitrárias (UA) 24 horas após a indução da sépsis. Os níveis de distrofina encontrados no tecido cardíaco dos animais do grupo ESG ($2812,0 \pm 351,9$ UA) foram significativamente reduzidos quando comparados aos valores encontrados no miocárdio dos animais do grupo ESM ($4686,0 \pm 474,3$ UA) e falso-operados ($5642,0 \pm 331,4$ UA). Esses dados corroboram com os resultados obtidos na análise por imunofluorescência (Figura 18A) onde observamos uma diminuição na expressão de distrofina no tecido cardíaco dos animais submetidos ao estímulo séptico grave (ESG).

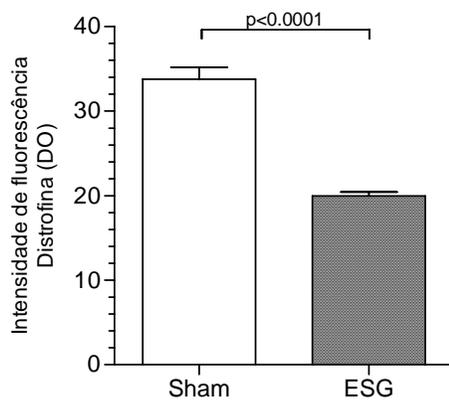
A figura 20 mostra a dupla marcação imunofluorescente para distrofina e albumina realizada para avaliar a integridade estrutural do sarcolema. No miocárdio ventricular

esquerdo dos animais falso-operados observamos um padrão uniforme de distribuição de distrofina ao longo da face interna da membrana celular e a presença de albumina foi restrita ao interstício, próxima aos pequenos vasos. Ao contrário, no miocárdio dos animais sépticos (ESG) houve uma perda significativa da expressão de distrofina, com conseqüente acúmulo de albumina no citoplasma das células demonstrando claramente a presença de modificações na permeabilidade celular dos cardiomiócitos.

A



B



C

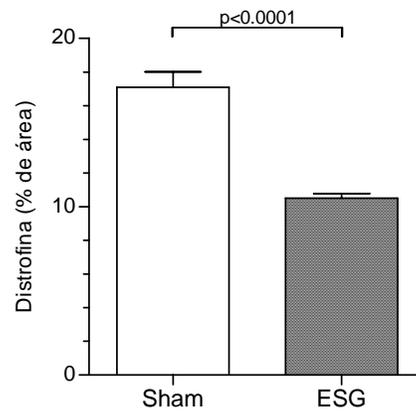


Figura 18. Análise imunofluorescente de distrofina no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. Em (A), foto representativa da microscopia de fluorescência para distrofina no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo sham (painel esquerdo) e ESG (painel direito). A coloração verde (FITC) indica a presença de distrofina e a coloração vermelha (faloidina – AlexaFlour 568) indica presença de actina. A área média (%) e a intensidade de fluorescência (DO) de distrofina no miocárdio dos animais do grupo ESG foram fortemente reduzidas em relação aos animais sham (B e C, respectivamente). Nos painéis de imunofluorescência as barras indicam 50 μ m em aumento de 400x.

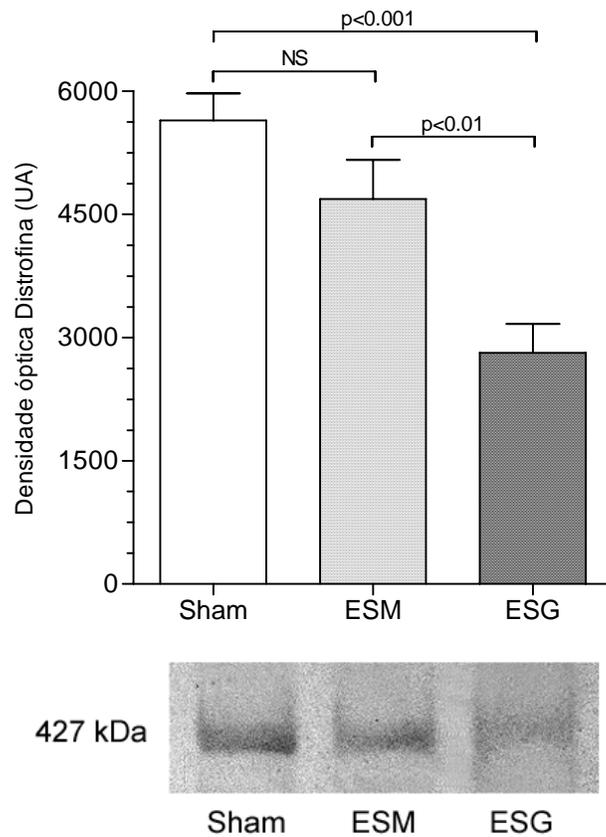


Figura 19. Análise do perfil de expressão de distrofina por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos. Nota-se claramente a redução nos níveis de distrofina no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico moderado (ESM) e grave (ESG) em relação aos animais do grupo falso-operado (sham), 24 horas após a cirurgia. Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

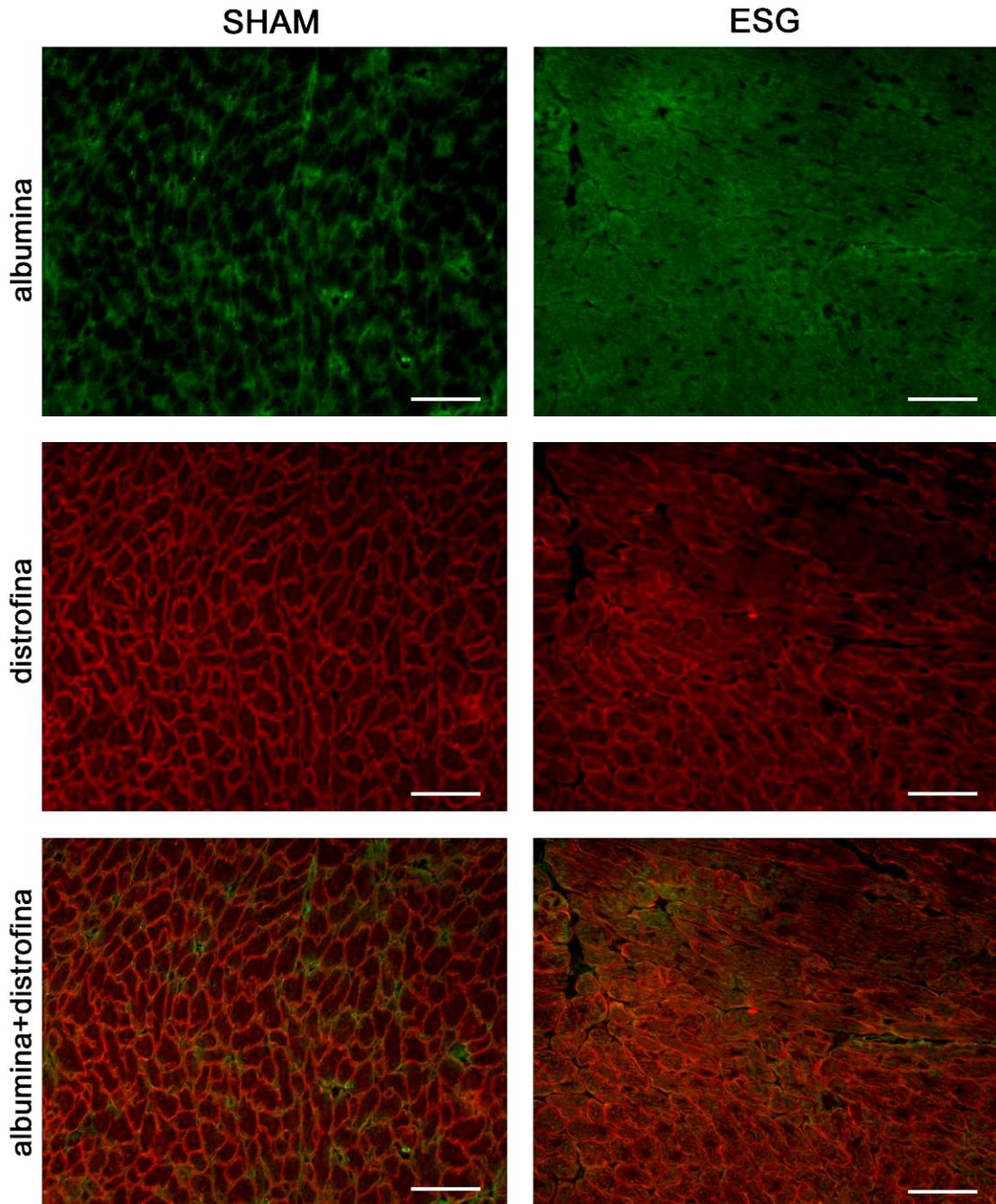


Figura 20. Análise imunofluorescente da expressão de albumina e distrofina no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. Observa-se uma perda significativa da expressão de distrofina (em vermelho – Texas Red), com conseqüente acúmulo de albumina (em verde – FITC) no citoplasma das células cardíacas dos animais do grupo ESG em relação aos animais falso-operados (sham), demonstrando claramente a presença de alterações na permeabilidade celular dos cardiomiócitos. Nos painéis de imunofluorescência as barras indicam 50 μ m em aumento de 400x.

Avaliação do perfil de expressão de β -dístroglicana

Como mostrado na figura 21A, a reação de imunofluorescência para β -dístroglicana mostrou uma imunorreatividade amplamente distribuída nas amostras de miocárdio dos animais falso-operados. O sinal fluorescente foi identificado ao longo da membrana citoplasmática, uma vez que a β -dístroglicana é uma proteína estrutural de membrana.

A análise quantitativa das secções imunofluorescentes mostrou uma redução moderada do sinal fluorescente no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG, enquanto os animais falso-operados apresentaram marcação abundante para essa proteína. A avaliação da área média (em porcentagem) e da intensidade de fluorescência (DO) para β -dístroglicana no miocárdio dos animais do grupo ESG ($10,27\% \pm 0,31\%$ e $18,45 \pm 0,61$ DO), foi moderadamente reduzida se comparada aos valores obtidos nos animais falso-operados ($13,02\% \pm 0,76\%$ e $24,00 \pm 1,20$ DO). Os resultados mostram uma redução de aproximadamente 21% de área marcada e 23% de intensidade de fluorescência no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG (Figuras 21B e 21C, respectivamente).

As concentrações relativas de β -dístroglicana foram mensuradas em relação à quantidade total de proteína. A figura 22 mostra a quantidade de β -dístroglicana com valores expressos em unidades arbitrárias (UA) 24 horas após a indução da sépsis polimicrobiana. Os níveis de β -dístroglicana avaliados no miocárdio dos animais do grupo ESG ($2272,0 \pm 240,60$ UA) foram significativamente diminuídos quando comparados aos valores encontrados no grupo ESM ($3898,0 \pm 449,7$ UA) e falso-operado ($3858,0 \pm 430,6$ UA). Os animais submetidos ao estímulo séptico moderado não apresentaram redução nos níveis de proteína quando comparados aos controles.

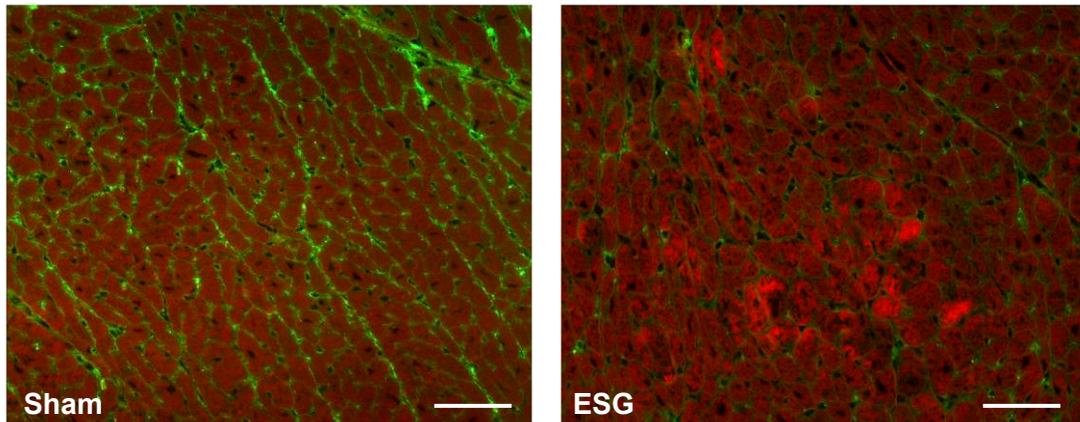
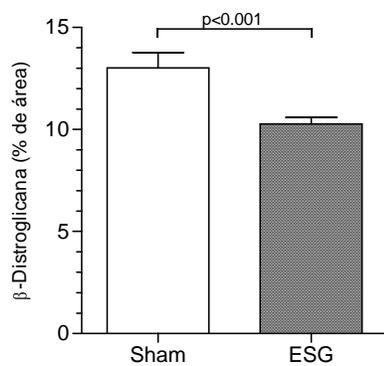
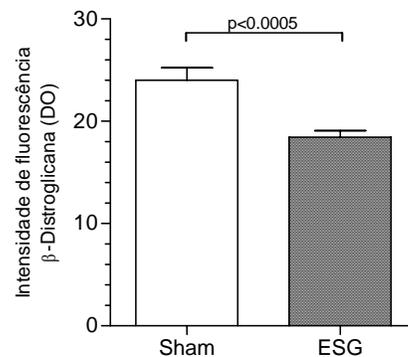
A**B****C**

Figura 21. Análise de imunofluorescência de β-distroglicana no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. Em (A), foto representativa da microscopia de fluorescência para β-distroglicana no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo sham (painel esquerdo) e ESG (painel direito). A coloração verde (FITC) indica a presença β-distroglicana e a coloração vermelha (faloidina – AlexaFluor 568) indica presença de actina. A área média (%) e a intensidade de fluorescência (DO) de β-distroglicana no miocárdio dos animais do grupo ESG reduziu moderadamente em relação aos animais sham (B e C, respectivamente). Nos painéis de imunofluorescência as barras indicam 50 μm em aumento de 400x.

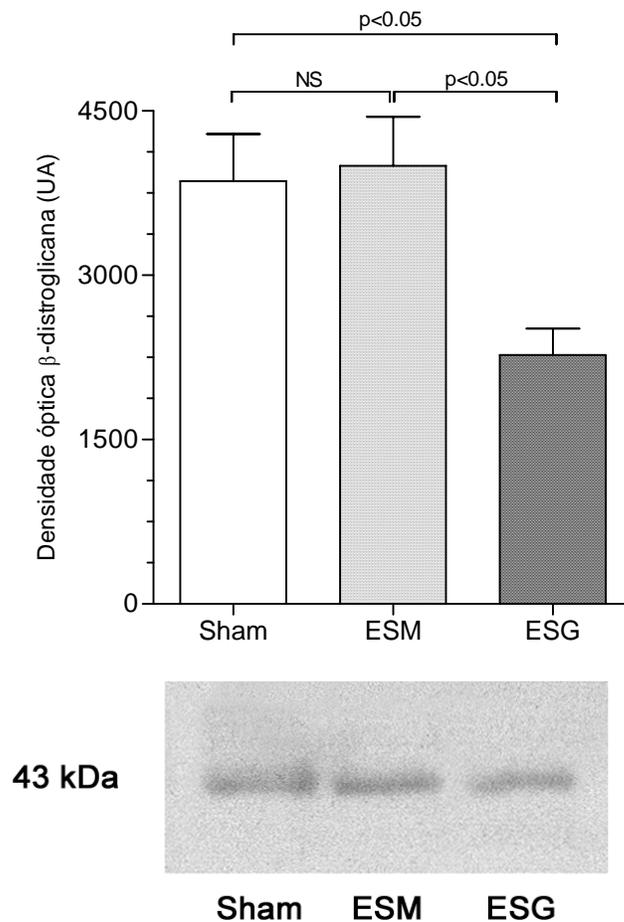


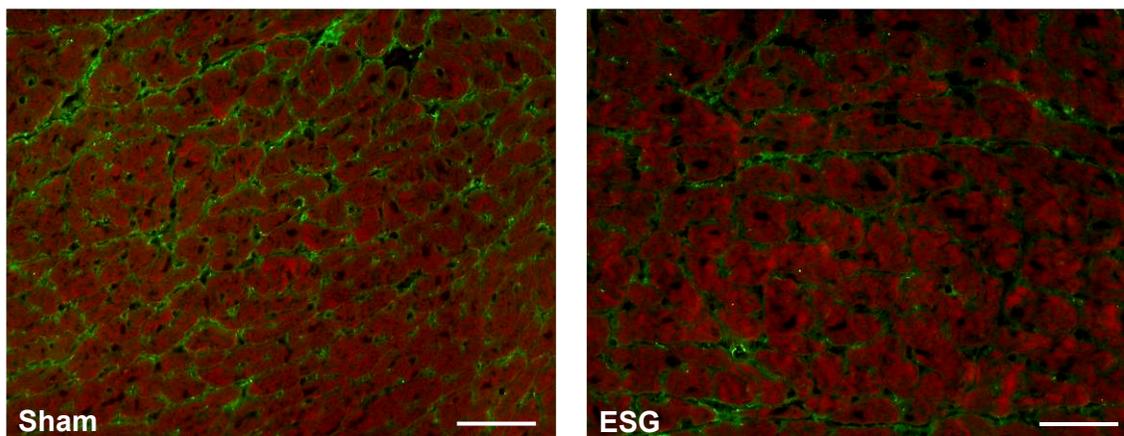
Figura 22. Análise do perfil de expressão de β -distroglicana por Western blotting no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos. Nota-se a redução nos níveis de β -distroglicana no miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico grave (ESG) em relação aos animais do grupo ESM e falso-operados (sham), 24 horas após a cirurgia. Os resultados (n=6) são expressos em unidades arbitrárias (UA).

Avaliação do perfil de expressão de laminina- α 2

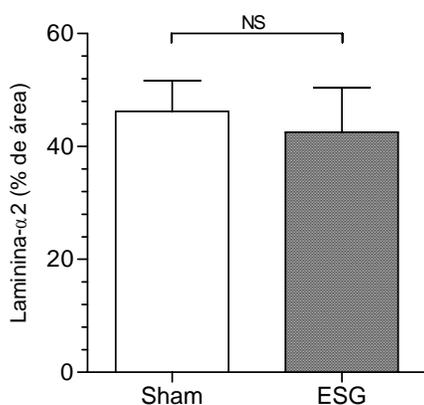
A caracterização e a imunolocalização de laminina- α 2 (merosina) (Figura 23A) foram realizadas no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. O sinal fluorescente no miocárdio dos animais falso-operados foi visivelmente identificado na matriz extracelular, delimitando a região externa da membrana basal dos cardiomiócitos (painel esquerdo). A indução de sépsis grave levou a uma redução na imunorreatividade para esta molécula (painel direito).

A análise quantitativa do sinal fluorescente nas secções coradas com anticorpo anti-laminina- α 2 mostrou que a redução nos níveis dessa proteína no tecido cardíaco dos animais submetidos à sépsis grave não foram acentuados (Figuras 23B e 23C). Tanto a avaliação da porcentagem de área ocupada pela marcação fluorescente (%) quanto a intensidade de fluorescência (DO) não apresentaram redução significativa de laminina- α 2 no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais submetidos à sépsis grave ($42,52\% \pm 7,86\%$ e $92,06 \pm 16,96$ DO, respectivamente) se comparados aos valores encontrados no miocárdio dos animais falso-operados ($46,20\% \pm 5,45\%$ e $113,5 \pm 4,73$ DO, respectivamente).

A



B



C

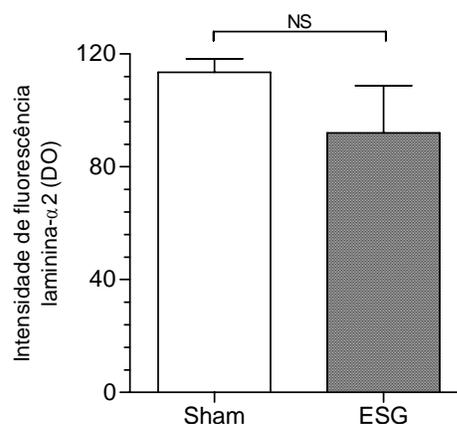


Figura 23. Análise imunofluorescente de laminina- α 2 no miocárdio de animais falso-operados e submetidos à sépsis grave. Em (A), foto representativa da microscopia de fluorescência para laminina- α 2 no miocárdio do ventrículo esquerdo dos animais do grupo sham (painel esquerdo) e ESG (painel direito). A coloração verde (FITC) indica a presença laminina- α 2 e a coloração vermelha (faloidina – AlexaFluor 568) indica presença de actina. A área média (%) e a intensidade de fluorescência (DO) de laminina- α 2 no miocárdio dos animais do grupo ESG e dos animais sham (B e C, respectivamente) não apresentaram diferença significativa. Nos painéis de imunofluorescência as barras indicam 50 μ m em aumento de 400x.

5. DISCUSSÃO

O modelo de sépsis induzido por ligação e perfuração do ceco

O modelo de sépsis induzido por ligação e perfuração do ceco (CLP) em roedores tem sido amplamente utilizado para investigação de vários aspectos da sépsis e do choque séptico. Esse modelo assemelha-se consideravelmente à situação clínica de perfuração intestinal, incluindo a peritonite infecciosa devido ao extravasamento da flora intestinal para a circulação sistêmica a partir do foco séptico. Nesse modelo é possível padronizar, através da variação do número de furos e calibre da agulha utilizada, diferentes graus de intensidade e de evolução da infecção (Hubbard et al., 2005). No presente estudo, os animais submetidos à sépsis grave apresentaram altos índices de mortalidade durante todo o período analisado (72 horas). Em comparação, os animais submetidos ao estímulo séptico moderado apresentaram índices de mortalidade menores, variando entre 90% de sobrevida em 12 horas e 50% em 72 horas. Os camundongos do grupo ESG apresentaram índices de sobrevida de 10% nas primeiras 24 horas após a indução da sépsis, em contraste com os 80% de sobrevida observados nos animais do grupo ESM. Os animais falso-operados apresentaram 100% de sobrevivência durante o período analisado.

Durante o processo infeccioso, uma complexa cascata de eventos é iniciada após a invasão do hospedeiro por microrganismos patogênicos (Medzhitov and Janeway, 2000). Nesse contexto, os neutrófilos possuem um papel crucial na defesa do hospedeiro, pois são as primeiras células a migrarem para o sítio primário da infecção e são capazes de destruir os microrganismos através da produção de agentes bactericidas, incluindo espécies reativas do oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (Yamashiro et al., 2001). A migração dos neutrófilos do sangue para o foco inflamatório ou infeccioso, envolve uma série de fases ordenadas e sequenciais que culminam com o extravasamento dessas células para seu destino final nos

tecidos. Alterações em uma dessas fases podem comprometer significativamente a migração normal dos leucócitos para o foco infeccioso que é extremamente importante para o controle local do crescimento bacteriano e, por conseguinte, para a disseminação bacteriana. Recentemente, Benjamim e colaboradores (2002) observaram que há falência na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal na sépsis grave induzida por CLP em ratos. Outro estudo relatou que a mortalidade e a falência de migração dos neutrófilos dos animais submetidos ao estímulo séptico grave foram revertidas pela associação de aminoguanidina (AG), inibidor seletivo de NO (iNOS), com outros procedimentos terapêuticos, como lavagem peritoneal ou a terapia antimicrobiana (Torres-Dueñas et al., 2006), sugerindo que a falência da migração de neutrófilos é fundamental para a evolução do processo séptico. Corroborando com essa hipótese, nossos resultados demonstraram que 6 horas após a indução da sépsis ocorre falência da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de animais submetidos à sépsis grave em comparação com animais submetidos à sépsis moderada com índices de migração elevados (dados não mostrados).

O *clearance* bacteriano é um parâmetro importante para definir a capacidade dos animais em conter o foco infeccioso sem permitir o extravasamento de bactérias ou de seus produtos para a corrente sanguínea, uma vez que a entrada desses produtos na circulação resulta na produção e liberação sistêmica de vários mediadores pró-inflamatórios durante a sépsis (Cavaillon et al., 2003). No presente estudo, avaliamos o *clearance* bacteriano 6 horas após a indução da sépsis. Nossos resultados mostraram que os animais do grupo ESG apresentaram deficiência em controlar o foco infeccioso, o que foi evidenciado pelas culturas positivas do lavado peritoneal e do sangue. O número de bactérias encontradas na cavidade abdominal e no soro dos animais do grupo ESG foi significativamente maior que os valores encontrados nos animais do grupo ESM, cujos números de CFU, no exsudato e no sangue foram muito baixos, não diferindo dos animais falso-operados.

Observamos em nossos resultados que o prejuízo na migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal observado nos animais do grupo ESG está associado a um déficit no controle do foco infeccioso, presença de bactérias na corrente sanguínea e altos índices de mortalidade. Por outro lado, nos animais submetidos à sépsis moderada, a infecção bacteriana

restringiu-se à cavidade peritoneal, o recrutamento de neutrófilos não foi afetado e foram observados altos índices de sobrevivência nos animais desse grupo.

Durante a sépsis uma cascata de eventos imunológicos é iniciada através do reconhecimento de um ou mais componentes do microrganismo invasor, os quais estimulam a liberação local e sistêmica de uma ampla gama de mediadores inflamatórios endógenos. Dentre eles destacam-se as citocinas TNF- α e IL-1 β e quimiocinas, como a proteína inflamatória de macrófagos-1 α (MIP-1 α), quimiocina derivada de queratinócitos (KC, homóloga de IL-8 em murinos) e proteína inflamatória de macrófagos-2 (MIP-2) (Bayston & Cohen, 1990). Essas moléculas são essenciais para orientar o recrutamento e a ativação das populações de leucócitos para os tecidos infectados ou inflamados. Os leucócitos recrutados são cruciais na defesa e erradicação dos microrganismos invasores, mas durante a inflamação excessiva como ocorre na sépsis, há produção exacerbada de produtos antimicrobianos pelos leucócitos o que contribui para lesão tecidual e intensifica a inflamação, o que contribuiria para a disfunção e falência de órgãos (Cavaillon et al., 2003). Estudos realizados em modelos animais de endotoxemia (Redl et al., 1991) e em voluntários humanos (Taveira et al., 1993, Suffredini et al., 1995) detectaram concentrações plasmáticas elevadas de, primariamente TNF- α , seguida de IL-6 e IL-8 após a injeção de LPS bacteriano. Tais alterações em humanos foram associadas ao mau prognóstico dos pacientes sépticos. Níveis elevados de quimiocinas também foram relatados no plasma de pacientes sépticos e em voluntários humanos após a injeção de LPS. Foram evidenciados altos níveis de MIP-1 α e MIP-1 β (O'Grady et al., 1999) e proteína que promove atração de monócitos-1 e 2 (MCP-1 e MCP-2) (Bossink et al., 1995). A produção excessiva desses mediadores foi associada a um prognóstico ruim na sépsis, contribuindo para desativar os leucócitos circulantes e limitar o seu recrutamento para o foco inflamatório (Cavaillon et al., 2003).

A avaliação dos níveis de expressão de TNF- α obtidos do lavado peritoneal e do soro, 6 horas após a indução da sépsis, foram significativamente altos nos animais do grupo ESG quando comparados aos níveis encontrados nos animais dos grupos ESM e falso-operado. As concentrações dessa citocina nos animais do grupo ESM não foram significativamente diferentes dos níveis observados nos animais falso-operados. A expressão da MIP-1 α no

lavado peritoneal e no soro, 6 horas após a indução da sépsis, foi significativamente maior nos animais do grupo ESG quando comparados aos animais dos grupos ESM e falso-operado. Os níveis de MIP-1 α no lavado peritoneal dos animais do grupo ESM foram mais elevados em comparação com os valores obtidos nos animais falso-operados enquanto, os níveis de MIP-1 α no soro, não foram diferentes dos valores observados nos controles.

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que tem sido implicada na morbidade e mortalidade associada ao choque séptico (Pittet et al., 1995, Walley et al., 1996). A patogênese da disfunção cardíaca tem sido fortemente atribuída aos efeitos miocárdicos do TNF- α local ou circulante (Kumar et al., 2001). Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o TNF- α produz efeitos depressores tanto precoces (Finkel et al., 1992, Walley et al., 1994, Sugishita et al., 1999), quanto tardios (DeMeules et al., 1992) no miocárdio. Resultados recentes do nosso laboratório demonstraram um aumento na expressão de TNF- α no miocárdio de corações sépticos humanos, onde observamos que a marcação foi localizada nos miócitos, nos macrófagos intersticiais e nas células endoteliais e musculares lisas dos vasos (Rossi et al., 2007). A depressão miocárdica induzida pelo TNF- α envolve a atenuação da força de contração nos cardiomiócitos individuais através da diminuição da sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio mediado pelos altos níveis de óxido nítrico produzidos pela enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (DeMeules et al., 1992). De forma semelhante, o MIP-1 α , membro da família CC de quimiocinas, tem demonstrado exercer significativo efeito ativador e quimiotático sobre os macrófagos (Standiford et al., 1993, Davatelis et al., 1988), incluindo a liberação de TNF- α e, diferente de outros membros da família, parece regular a função de neutrófilos polimorfonucleares (Fahey et al., 1992).

Um crescente acúmulo de evidências indica que os altos níveis de citocinas inflamatórias e quimiocinas no sangue atuam mediando o colapso cardiovascular e a falência de múltiplos órgãos observados na sépsis grave (Walley et al., 1996, Hotchkiss e Karl, 2003). A compreensão dos mecanismos de atuação das citocinas inflamatórias e sua relação com a lesão do miocárdio são extremamente importantes para pesquisa cardiovascular básica e clínica. Nesse contexto, o TNF é uma citocina pró-inflamatória que tem sido implicada na patogênese de doenças cardiovasculares, incluindo infarto agudo do miocárdio, insuficiência

cardíaca crônica, aterosclerose, miocardite viral e disfunção cardíaca associada à sépsis (Levini et al., 1990, Neumann et al., 1995, Oral et al., 1995, Yokoyama et al., 1997, Saggiaro et al., 2007). Os nossos resultados demonstraram que os níveis sanguíneos de TNF- α nos camundongos submetidos à sépsis grave foram superiores aos valores obtidos nos animais dos grupos ESM e falso-operados, indicando o papel do TNF- α na disfunção cardíaca na sépsis grave. Embora inicialmente descrito apenas como um produto de macrófagos induzidos por lipopolissacarídeo (LPS), evidências mais recentes indicam que os próprios miócitos cardíacos produzem quantidades substanciais de TNF- α em resposta a isquemia, bem como ao LPS (Giroir et al., 1992, Kapadia et al., 1995). Levine e colaboradores (Levini et al., 1990) correlacionaram os níveis circulantes de TNF- α com a gravidade da insuficiência cardíaca crônica em pacientes e postularam que o TNF pode contribuir para a patogênese da insuficiência cardíaca. De fato, o miocárdio produz TNF por grama de tecido (em resposta à endotoxina), tanto quanto o fígado ou o baço, os quais possuem grandes populações de macrófagos e são fontes importantes de TNF (Kapadia et al., 1995). Adicionalmente, nossos resultados mostraram que os cardiomiócitos dos animais do grupo ESG apresentaram forte marcação fluorescente para TNF- α , 24 horas após a indução da sépsis, e que essa marcação foi distribuída por todo o tecido (dados não mostrados). Kapadia e colaboradores (Kapadia et al., 1995) demonstraram que a produção de TNF no miocárdio induzido por endotoxinas é quase uniformemente distribuído entre os cardiomiócitos e os macrófagos residentes. Assim, a produção local de TNF é uma fonte em potencial dessa citocina, podendo afetar a função miocárdica durante a sépsis.

A indução da sépsis por ligação e perfuração do ceco causou um decréscimo tempo-dependente da pressão arterial média nos animais sépticos, mais pronunciada nos animais do grupo ESG. A pressão arterial média foi significativamente reduzida nos camundongos dos grupos ESG e ESM, tanto 6 horas (redução de 54,3% e 28,2%, respectivamente) quanto 12 horas (59,7% e 27,3%, respectivamente) após a indução da sépsis quando comparados aos índices de pressão registrados nos animais falso-operados. Vinte e quatro horas após a indução da sépsis, a pressão arterial média dos camundongos do grupo ESG foi menor, quando comparada às dos animais dos grupos ESM e falso-operado (redução de 44,8% e 39,9%,

respectivamente) sendo que a pressão arterial média dos animais falso-operados e submetidos ao estímulo séptico moderado não apresentaram diferença. Nossos resultados estão de acordo com os estudos realizados por Tao e colaboradores (2004) que demonstraram uma diminuição progressiva da pressão arterial média e da resistência vascular periférica associada a uma depressão na contratilidade miocárdica de camundongos sépticos.

As variáveis analisadas 6 horas após a indução da sépsis, tais como a quantificação de bactérias na cavidade peritoneal e no sangue e a mensuração das citocinas locais e sistêmicas, foram avaliadas para caracterizar o processo séptico. Esses parâmetros representam os primeiros efeitos da influência da indução da sépsis em níveis moleculares ou bioquímicos. As variáveis analisadas 24 horas após a CLP, tais como, a expressão de conexina-43, N-caderina, distrofina, β -dístroglicana e laminina- α 2, analisadas por Western blotting e imunofluorescência e as alterações ultra-estruturais, representam conseqüências morfológicas da sépsis. Todas as influências da injúria e do estresse exerceram seus efeitos primeiramente em níveis moleculares ou bioquímicos. Há um retardo entre o estresse e as mudanças morfológicas na injúria ou morte celular. A duração desse retardo varia de acordo com a sensibilidade dos métodos usados para detectar tais mudanças. As alterações morfológicas no presente estudo foram somente detectadas em período tardio do processo séptico, 24 horas após a injúria. Devido a marcante e persistente queda da pressão arterial ser uma característica importante da sépsis/choque séptico, a medida da pressão sangüínea carotídea foi avaliada durante todo o período do experimento: imediatamente após a indução dos estímulos sépticos (tempo 0), 6, 12 e 24 horas após a cirurgia.

Análise histopatológica e ultra-estrutural e alterações das proteínas contráteis actina e miosina no miocárdio dos animais sépticos

No presente estudo, focalizamos as alterações morfológicas que ocorrem no tecido cardíaco dos animais durante a sépsis induzida por CLP. Vinte e quatro horas após a indução da sépsis grave, observam-se claramente a presença de focos disseminados de miocitólise com ruptura das proteínas miofilamentares actina e miosina. Essas mudanças não foram observadas 12 horas após a cirurgia CLP (dados não apresentados), possivelmente porque não houve

tempo suficiente para o aparecimento de alterações morfológicas visíveis. Avaliamos também a presença de edema intracelular no miocárdio dos animais falso-operados e submetidos aos diferentes estímulos sépticos, pois a presença de tumefação celular poderia refletir modificações na permeabilidade sarcolemal (Coalson et al., 1975, Gotloib et al., 1992, Piper et al., 1997). A indução da sépsis grave promoveu um aumento significativo do menor diâmetro das células miocárdicas ventriculares dos animais do grupo ESG 24 horas após a indução da sépsis, quando comparados aos valores encontrados nos grupos ESM e falso-operado (aumento de 21,15% e 31,44%, respectivamente). Em estudo semelhante, Coalson e colaboradores, avaliando um modelo de sépsis induzida por infusão de bactérias em primatas não humanos, observaram no miocárdio desses animais a formação de edema no endotélio capilar e acúmulo de líquidos intra e extracelular, edema mitocondrial e depleção generalizada de glicogênio após a sépsis (Piper et al., 1997). Avaliando o impacto da sépsis sobre o tecido cardíaco, Stahl e colaboradores observaram a presença de ruptura miofibrilar em secções histológicas do ventrículo esquerdo de cães 4 dias após a indução de sépsis peritoneal. Segundo esse autor, essa ruptura poderia estar associada à perda de miofilamentos protéicos (Stahl et al., 1990). Em outro estudo, Mela e colaboradores (1974) relataram a presença de edema inter e intrafibrilar no miocárdio ventricular de cães endotóxicos, e que essas alterações na estrutura miofilamentar e no espaço interfibrilar poderiam contribuir para deprimir a função cardíaca *in vivo* durante a sépsis. Alterações no espaçamento entre as miofibras poderiam ocorrer em função da presença de edema intracelular, o que poderia induzir decréscimo na sensibilidade dos miofilamentos ao cálcio e diminuição do desenvolvimento tensão (Metzger e Moss, 1988).

Adicionalmente, a avaliação da ultra-estrutura miocárdica mostrou a presença de alterações significativas nas estruturas que compõe as miofibrilas cardíacas e os discos intercalares do miocárdio dos animais submetidos ao estímulo séptico grave. Observamos o aparecimento lesões focais (uma célula lesada circundada por duas células normais) com edema intermiofibrilar, fragmentação e desorientação de miofibrilas, formação de bandas de contratura e ruptura do sarcolema. Uma das “marcas registradas” da sépsis/choque séptico é a presença de microcirculação disfuncional que produz distúrbios no fluxo regional e

oxigenação anormal dos tecidos, o que pode causar isquemia relativa em vários órgãos, incluindo o coração (Hinshaw 1996, Rossi & Santos 2003, Chagnon et al., 2006). A natureza focal das lesões sugere que a microcirculação poderia estar envolvida, isto é, o sítio primário da doença poderia ocorrer em nível capaz de causar lise focal de miofilamentos em grupos discretos de miócitos cardíacos, contribuindo dessa forma para a disfunção cardíaca na sépsis.

A redução das proteínas das gap junctions e junções aderentes e o remodelamento estrutural do disco intercalar no miocárdio dos animais sépticos

A disfunção miocárdica tem sido observada em diferentes modelos animais de sépsis e endotoxemia (Abel, 1989). Entretanto, os mecanismos celulares e moleculares que levam a essa disfunção ainda não foram totalmente esclarecidos. Alterações na liberação de cálcio durante a contração muscular (Soulsby et al., 1978, Hess et al., 1980, Hess et al., 1981), diminuição nos estoques energéticos (Hess et al., 1979, Adams et al., 1985), altas concentrações de óxido nítrico (Finkel et al., 1992, Brady et al., 1992) e algumas citocinas tais como TNF- α (Odeh et al., 1993, Meldrum et al., 1998) têm sido postuladas como alguns dos eventos que levariam a falência cardíaca durante a sépsis e o choque séptico. Outra possibilidade seria que as comunicações intercelulares, mediadas pelas *gap junctions* estariam alteradas durante a sépsis (Fernandez-Cobo et al., 1999). Esse fato foi recentemente confirmado: demonstramos que há perda de proteínas importantes envolvidas no remodelamento do disco intercalar durante a sépsis induzida por CLP (Celes et al., 2007).

Em nosso estudo, a indução da sépsis grave em camundongos promoveu uma diminuição significativa nos níveis de conexina-43, principal proteína constituinte das *gap junctions* e de N-caderina, principal proteína das junções aderentes. Tal resposta foi observada 24 horas após a indução dos diferentes estímulos sépticos. A análise da expressão de conexina-43 mostrou um decréscimo acentuado dessa proteína nos corações dos animais submetidos à sépsis grave quando comparados aos valores encontrados nos animais dos grupos ESM e falso-operado (redução de 52,3% e 53,6%, respectivamente). A expressão de conexina-43 nos corações dos animais dos grupos ESM e falso-operado foi similar. Adicionalmente, a análise da expressão de N-caderina mostrou uma diminuição acentuada nos

corações de ambos os grupos, ESG e ESM, em comparação com a expressão dessa proteína nos corações dos animais falso-operados (redução de 53,2% e 43,9%, respectivamente). A análise das secções imunofluorescentes indicou a perda de ambas, conexina-43 e N-caderina, no ventrículo esquerdo dos animais do grupo ESG. Mais especificamente, a imunofluorescência revelou que a área e a intensidade média (densidade óptica) de ambas as partículas reativas de conexina-43 e N-caderina estavam diminuídas nos discos intercalares. A área média de conexina-43 diminuiu 47,5%, enquanto a intensidade de fluorescência diminuiu 38,9%. A área média de N-caderina reduziu 57,9%, enquanto a densidade óptica reduziu 32,1%. Esses achados sugerem que a quantidade de conexina-43 nos canais das *gap junctions* e de N-caderina nas junções aderentes está reduzida nos corações sépticos.

De nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo demonstrando alterações na expressão de conexina-43 e N-caderina no miocárdio de animais sépticos. Uma depressão significativa nos níveis de mRNA para conexina-43 no miocárdio de ratos após endotoxemia induzida pela injeção de LPS ou após isquemia regional/reperfusão hepática foi previamente demonstrada (Fernandez-Cobo et al., 1999). Além disso, baseados em experimentos *in vitro* com linhagem celular embriogênica de origem cardíaca (H9c2), estes autores sugeriram que os níveis elevados de TNF- α detectados no soro de ratos tratados com LPS poderiam reduzir a atividade promotora do gene de conexina-43 transfectados para essas células. A diminuição da expressão da conexina-43 nos corações de camundongos submetidos à sépsis grave pode ser atribuída, pelo menos em parte, aos altos níveis séricos de TNF- α . Esse efeito pode contribuir para a promoção da depressão cardíaca por TNF- α através da redução do acoplamento eletroquímico dos cardiomiócitos.

Outro fato importante observado foi a deiscência dos discos intercalares no miocárdio dos animais submetidos à sépsis grave. A deiscência das junções aderentes e das *gap junctions* estaria relacionada à perda das moléculas de conexina-43 e N-caderina, uma vez que estas proteínas são as mais abundantes e importantes componentes de tais estruturas (Kostetskii et al., 2005). A redução nos níveis de conexina-43 poderia causar alterações na organização estrutural das *gap junctions* devido à perda dos conexons, explicando a deiscência das *gap junctions* observada no estudo ultra-estrutural e, desse modo, perturbar a comunicação direta

entre duas células miocárdicas adjacentes nos corações dos animais sépticos. Quanto à molécula de N-caderina, os níveis reduzidos dessa proteína no tecido cardíaco poderiam alterar estruturalmente o “zíper” de adesão das junções aderentes dos discos intercalares, podendo dessa forma explicar a deiscência observada no estudo ultra-estrutural do disco intercalar.

As conseqüências funcionais dos nossos achados não estão claras até o presente momento, pois não sabemos se a perda de expressão de conexina-43 e N-caderina localizadas nos discos intercalares causaram comprometimento do acoplamento eletro-químico e mecânico entre as células miocárdicas. No entanto, a ocorrência de hipotensão e choque circulatório em ratos sépticos sugere depressão miocárdica. Poder-se-ia argumentar que a dilatação cardíaca provocada por outros mecanismos levaria ao remodelamento do disco intercalar e, assim, precederia as alterações observadas. Todavia, os corações dos camundongos do grupo ESG, 24 horas após a indução da sépsis grave, não se apresentaram dilatados em comparação aos falso-operados: a espessura da parede ventricular esquerda e a área da câmara do ventrículo esquerdo (secção coronária média dos ventrículos) foram semelhantes em ambos os grupos (dados não mostrados). Estudos anteriores demonstraram que a perda difusa de conexina-43 no ventrículo de animais *knock-out* produziu um substrato altamente arritmico com morte cardíaca súbita e lentidão da velocidade de condução (Gutstein et al., 2001, Danik et al., 2004, van Rijen et al., 2004). A expressão reduzida de conexina-43 no miocárdio ventricular foi demonstrada na falência cardíaca e em corações hipertrofiados e isquêmicos (Wang & Gerdes 1999, Peters et al., 1993). A isquemia miocárdica leva à desfosforilação da conexina-43 e a perda de sua localização no disco intercalar, o que muito provavelmente contribui para a falência cardíaca e as arritmias (Beardslee et al., 2000).

Nossos resultados mostram uma diminuição significativa na expressão de N-caderina nos corações dos camundongos submetidos à sépsis grave. Como as junções aderentes estão envolvidas na manutenção das conexões entre as fibras adjacentes do miocárdio, a diminuição da expressão de N-caderina pode ter implicação nas interações célula-célula e, subseqüentemente, na alteração da acoplagem mecânica entre os cardiomiócitos (Zuppinger et al, 2000). Estudos recentes, usando o miocárdio adulto de animal *knock-out* condicionado para

N-caderina, mostraram que a perda completa de N-caderina resultou em subsequente decréscimo de alguns componentes do disco intercalar, tais como a conexina-43, sugerindo que a expressão de conexina-43, de alguma forma, é dependente da expressão de N-caderina (Kostetskii et al., 2005, Li et al., 2006, Tansey et al., 2006). Os decréscimos na quantidade de N-caderina e de conexina-43 no miocárdio de camundongos sépticos podem estar, de certa forma, inter-relacionados: nossos dados mostram redução da expressão de N-caderina nos ventrículos dos animais do grupo ESG e ESM em contraste com a reduzida expressão de conexina-43 apenas nos ventrículos dos animais do grupo ESG, o que pode representar um suporte adicional para essa hipótese.

O remodelamento do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina no miocárdio dos animais sépticos

Os cardiomiócitos são células especializadas em converter energia química em trabalho mecânico, o que resulta em deformação das miofibrilas. O sistema contrátil dentro das miofibrilas está intimamente conectado à membrana e à matriz extracelular através das proteínas que compõem o complexo de glicoproteínas associadas à distrofina e a laminina, sendo que qualquer interferência na estrutura e nas funções das mesmas pode acarretar a perda de função e a morte celular (Lapidos et al., 2004). Com base nesses dados, outro ponto importante abordado em nosso estudo foi a avaliação do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CDG), cuja principal função é proporcionar forte ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular, incluindo a maquinaria contrátil, e a matriz extracelular (Lapidos et al., 2004), o que contribui para a manutenção da forma celular, para a resistência mecânica e para a transdução de força contrátil dos cardiomiócitos, permitindo a interação entre o citoesqueleto intracelular, o sistema contrátil propriamente dito e a matriz extracelular (Hein et al., 2000; Kostin, 2000).

O presente estudo demonstrou uma sensibilidade diferente dos componentes do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina após a indução de sépsis por ligação e perfuração do ceco. Particularmente, a imunofluorescência revelou que a distrofina, um componente do citoesqueleto localizado logo abaixo da membrana, é a mais sensível entre as

estruturas que conectam a actina do citoesqueleto dos cardiomiócitos e a matriz extracelular representada pela laminina. Além disso, os dados mostraram que ocorre dissolução da actina sarcomérica e da miosina como parte do processo de miocitólise ou degeneração miofibrilar. A análise quantitativa do sinal fluorescente das moléculas de distrofina e β -dístroglicana revelou que a porcentagem de área média e a intensidade de fluorescência de ambas estavam diminuídas no miocárdio séptico. A área média ocupada pela distrofina diminuiu 40%, enquanto a intensidade de fluorescência reduziu 41%. A área média de β -dístroglicana reduziu 21% enquanto a intensidade de fluorescência reduziu 23%. Esses dados sugerem que a quantidade de distrofina e β -dístroglicana está reduzida nos miocárdios sépticos indicando a possível perda dessas proteínas. A quantificação de distrofina por *imunoblotting* revelou que a indução da sépsis promoveu uma redução nos níveis de distrofina 24 horas após a indução dos diferentes estímulos sépticos. A expressão de distrofina foi acentuadamente reduzida nos corações dos animais do grupo ESG quando comparados aos valores obtidos nos animais dos grupos ESM e falso-operado (redução de 40% e 50%, respectivamente). A expressão de distrofina nos corações dos camundongos do grupo ESM e falso-operado foram semelhantes. Adicionalmente, a expressão de β -dístroglicana apresentou um decréscimo acentuado nos corações dos animais do grupo ESG em comparação aos animais dos grupos ESM e falso-operado (redução de 42% e 41%, respectivamente). Nossos achados sugerem que a redução ou ausência de distrofina, no tecido cardíaco dos animais submetidos à sépsis grave pode ser um indicativo de lesão miocitolítica com perda de proteínas e conseqüente desestabilização do miócito. Recentemente, demonstramos em nosso laboratório que a distrofina foi o componente do complexo de glicoproteínas mais sensível à lesão miocárdica provocada pelo isoproterenol, seguida pela lise dos miofilamentos (Campos et al., 2008, *in press*).

A distrofina se localiza logo abaixo do sarcolema e liga a actina à matriz extracelular através do complexo de glicoproteínas. Tem como função principal estabelecer uma ponte de ligação para a transferência da força mecânica gerada no sistema contrátil à matriz extracelular ou transmitir estímulo mecânico para o meio intracelular. Outra função fisiológica da distrofina é a de prevenir a expansão excessiva do sarcolema durante a contração muscular (Xi et al., 2000). Dessa maneira, a distrofina protege a célula do estresse mecânico o qual provoca

dano à integridade celular e prejudica o desempenho da função contrátil do coração (Rybakova et al., 2000; Danialou et al., 2001). Um estudo recente demonstrou sensibilidades diferentes das proteínas relacionadas à membrana na isquemia miocárdica experimental através da ligadura da artéria coronária esquerda em cães: a distrofina foi mais acometida do que as demais proteínas transmembrana, distroglicanas, sarcoglicanas, sarcospana, distrobrevina e sintrofina, e que a perda de ligação com o restante do citoesqueleto desestabiliza e deixa os miócitos mais vulneráveis ao dano isquêmico (Rodríguez et al., 2005). De forma semelhante, utilizando modelo de lesão miocárdica induzida por isoproterenol, mostramos que a distrofina foi a estrutura mais sensível entre as proteínas do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina que conecta a matriz extracelular ao citoesqueleto dos cardiomiócitos. A redução na expressão ou colapso de γ -sarcoglicana, β -dystroglicana, β 1-integrina e laminina foram considerados epifenômenos, ou seja, essas estruturas desempenharam um papel secundário no processo de miocitólise (Campos et al., 2008, *in press*). Em cultura de cardiomiócitos de camundongos neonatos submetidos a hipóxia (Iizuka et al., 1993) e em modelos murinos de isquemia prolongada (Armstrong et al., 2001), foi demonstrada ativação de serino e tiol-proteases, incluindo as calpaínas, o que resultou na degradação das proteínas espectrina e distrofina levando, subsequentemente, à fragilidade da membrana celular durante a transição de lesão reversível para irreversível, culminando com a morte celular, indicando uma correlação entre a perda de proteínas estruturais e a injúria celular.

Mutações no gene da distrofina são responsáveis por desordens neuromusculares ligadas ao cromossomo-X, dentre elas a distrofia muscular de Duchene (DMD) e a distrofia muscular de Becker (BMD) bem como a cardiomiopatia dilatada ligada ao cromossomo-X (X-LCM) (Towbin, 1998). Tais distrofias são caracterizadas predominantemente pela doença muscular que abrange desde a forma mais branda (BMD) à forma mais severa (DMD). Em ambos os casos, a molécula de distrofina encontra-se severamente reduzida ou ausente nas musculaturas esquelética e cardíaca (Petrof et al., 1993). Na ausência de distrofina, os elementos transmembrana que compõem o complexo de glicoproteínas (CGD) ficam desestabilizados. Dessa forma, a ligação mecânica entre o sarcolema e a matriz extracelular fica comprometida,

promovendo um mecanismo de perda das proteínas da membrana plasmática, geralmente com níveis de cálcio elevados (Gillis, 1996, Gillis, 1999).

O subcomplexo distroglicana forma o núcleo central do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CGD), conectando os componentes do citoesqueleto à matriz extracelular (Henry & Campell 1996). Esse subcomplexo é composto por duas subunidades α - e β - distroglicana, que são codificadas por um único gene, o *Dag1* e posteriormente traduzidas e clivadas em duas proteínas. A α -distroglicana é uma proteína periférica de membrana que se liga a laminina- α 2 na lâmina basal, enquanto a β -distroglicana, proteína integral de membrana ancora a α -distroglicana à membrana celular através da região N-terminal do seu domínio extracelular e se liga à distrofina, proteína do citoesqueleto através da região C-terminal do seu domínio intracitoplasmático (Campbell & Stull 2003). Dessa forma, o subcomplexo distroglicana sustenta a forte ligação entre a matriz extracelular e o citoesqueleto intracelular. Embora defeitos no gene *Dag1* não tenham sido identificados como a causa primária de doenças hereditárias em humanos, anormalidades no subcomplexo distroglicana têm sido observadas em distrofias musculares graves (Campbell & Stull 2003). A correta glicosilação da α -distroglicana é essencial para sua ligação à molécula de laminina; defeitos nesse processo perturbam esta ligação resultando na ruptura da ancoragem da membrana celular à matriz extracelular (Ervasti & Campbell 1991). Esses dados são sustentados por achados que mostram que anticorpos dirigidos contra resíduos de carboidratos de α -distroglicanas envolvidos na ligação da laminina, induziram um fenótipo distrófico em células musculares de cultura (Brown et al., 1999). Matsumura e colaboradores, em 2003, investigando os efeitos do processamento proteolítico da β -distroglicana e seus efeitos na ligação da matriz extracelular à membrana plasmática, observaram que o processamento proteolítico da β -distroglicana foi ativado na musculatura esquelética, cardíaca e lisa, o que resultou na ruptura parcial do subcomplexo distroglicana nesses tecidos. Esses resultados sugerem que a proteólise da β -distroglicana leva à ruptura da ligação entre a membrana celular e a matriz extracelular através do subcomplexo distroglicana, mostrando sua importância no mecanismo molecular da degeneração muscular observada em hamsters com cardiomiopatia.

No presente trabalho, observamos que a expressão da laminina ainda estava presente nas áreas de miocitólise. Destacamos ainda que, 24 horas após a indução da sépsis grave houve redução dos níveis dessa proteína, embora, essa redução não fosse tão pronunciada quanto à observada para a distrofina e a β -dístroglicana. A laminina (merosina) é uma glicoproteína presente na matriz extracelular, encontrada também na lâmina basal de cardiomiócitos que atua na modulação da adesão celular através de sua interação com receptores celulares, tais como as integrinas (Henry & Campbell, 1996). Por outro lado, as moléculas de laminina fixam a α -dístroglicana ao complexo de glicoproteínas associadas à distrofina, formando uma ligação transmembrana entre a matriz extracelular e o citoesqueleto intracelular (laminina- α 2 \rightarrow glicoproteínas associadas à distrofina (CGD) \rightarrow distrofina \rightarrow actina), sendo considerada um estabilizador mecânico da membrana plasmática das células musculares (Towbin, 1998). A perda da ligação entre a matriz extracelular e a actina é um fator determinante para necrose das miofibras (Kido et al., 2004; Allikian & McNally, 2007). A diminuição da expressão da laminina ocorre durante a transição para insuficiência cardíaca e predispõe os cardiomiócitos à apoptose, similar ao que ocorre nas distrofias musculares (Berk et al., 2007).

Considerações finais

Face os resultados de nosso estudo, duas questões importantes devem ser consideradas. Primeira questão: "Qual é o mecanismo de redução das proteínas das *gap junctions* e das junções aderentes e do remodelamento estrutural dos discos intercalares nos corações de camundongos submetidos à sépsis grave?"

Um estudo recente demonstrou a redução e redistribuição de conexina-43 e N-caderina no coração de coelhos após isquemia e reperfusão utilizando sistema de Langerdorff (Tansey et al., 2006). Considerando que um ponto chave do choque séptico é a presença de disfunção da microcirculação que produz distúrbios regionais de fluxo e oxigenação anormal dos tecidos (Hinshaw 1996, Rossi et al., 2003, Chagnon et al., 2006), a redução de conexina-43 e N-caderina e conseqüente remodelamento do disco intercalar no miocárdio de animais sépticos podem ser atribuídos à isquemia global. Além disso, tendo em vista que a depleção de cálcio causa separação parcial dos cardiomiócitos no disco intercalar (Greve et al., 1985) e que o TNF- α altera a homeostase intracelular do cálcio (Zhang et al., 2005), essa citocina pode estar envolvida na patogênese das alterações dos discos intercalares no miocárdio dos animais sépticos. Essas alterações provavelmente são reversíveis e associadas a danos não letais caracterizados por edema celular, denominado degeneração vacuolar ou hidrópica, refletindo claramente um distúrbio da função das membranas. A perda da integridade da membrana celular e o resultante intercâmbio de constituintes do espaço intra e extracelular como íons e proteínas é considerado um sinal de lesão celular. No entanto, é difícil definir o estágio a partir do qual a célula passa a ser irreversivelmente danificada e condenada à morte. A figura 24 mostra um diagrama esquemático representando como as moléculas de conexina-43 e N-caderina podem interferir com o remodelamento das junções aderentes e das *gap junctions* nos corações sépticos.

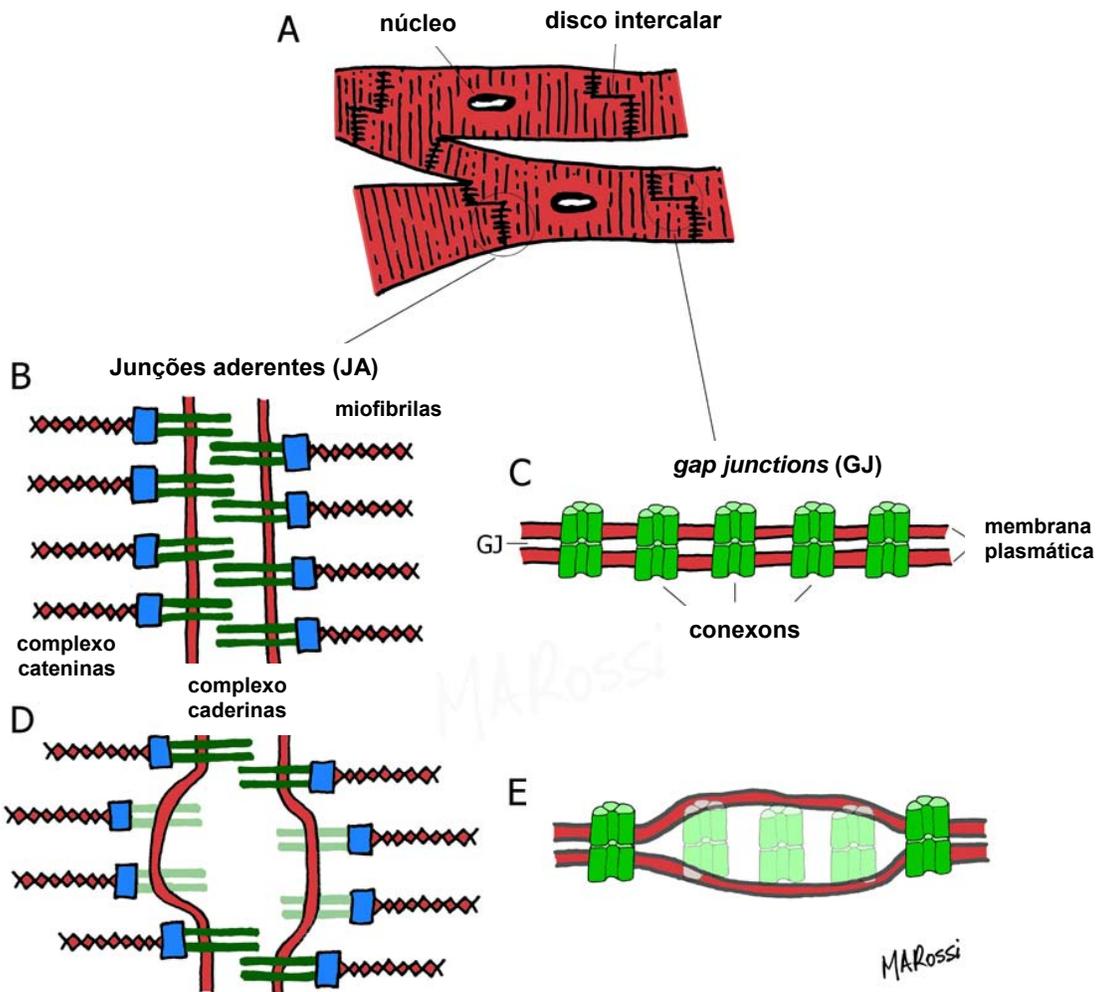


Figura 24. Diagrama esquemático representando como a expressão de N-caderina e conexina-43 podem interferir com o remodelamento das junções aderentes e gap junctions nos corações sépticos. No miocárdio dos animais falso-operados, a N-caderina (B), representada pelas barras verdes, interage formando uma estrutura de adesão em forma de “zíper”, crítica na adesão célula-célula. No miocárdio dos animais sépticos (D), o decréscimo na expressão de N-caderina (perda representada pelas barras em verde claro) promove o enfraquecimento da estrutura de zíper, representada esquematicamente pela deiscência do disco intercalar, de acordo com os resultados encontrados na microscopia eletrônica. No miocárdio dos animais falso-operados (C), seis polipeptídios de conexina-43 (no esquema, representado somente por três) formam um hemicanal na membrana de cada célula adjacente que se unem para formar um canal funcional (conexon) tipo *gap junction*. No miocárdio dos animais sépticos (E), o decréscimo na expressão de conexina-43 (perda de conexons representada em verde claro), permite a formação da deiscência das *gap junctions*, representada de acordo com os resultados da microscopia eletrônica.

Segunda questão: “Qual o mecanismo intrínseco da perda de distrofina e glicoproteínas associadas nas células musculares cardíacas e qual seria a relação dessa perda com a disfunção miocárdica observada na sépsis?”.

A depressão cardíaca observada durante a sépsis é, provavelmente, de origem multifatorial (Merx and Weber, 2007). Entretanto, existem dois mecanismos principais que tentam explicar essa disfunção cardíaca. O primeiro sugere que a sépsis está associada à alterações da perfusão tecidual miocárdica, o que resulta em lesão isquêmica do miocárdio séptico (Kumar et al., 2001). Levy e colaboradores estudando modelo murino de sépsis induzida por CLP, observaram uma diminuição da capacidade de trabalho do coração, aumento da captação de glicose pelas células miocárdicas e perfusão miocárdica preservada, refletindo alterações importantes no fluxo coronariano e no metabolismo miocárdico. Groeneveld e colaboradores demonstraram que, apesar do fluxo coronariano estar normal ou aumentado durante o choque séptico, pode haver uma distribuição heterogênea do mesmo, acarretando isquemia focal, a qual seria mascarada pela manutenção do consumo global de oxigênio. O segundo mecanismo está associado à presença de fatores depressores do miocárdio (Kumar et al., 2001). Dentre os mediadores inflamatórios produzidos que potencialmente contribuem para a depressão miocárdica estão as citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β (Grocott-Mason et al., 1998). Bryant e colaboradores, avaliando o miocárdio de camundongos geneticamente modificados, que expressam TNF- α em excesso exclusivamente nos miócitos cardíacos, observaram que esses animais desenvolveram disfunção cardíaca grave, mostrando que a produção local de TNF- α pode estar diretamente envolvida na disfunção cardíaca (Bryant et al., 1998). A elevação dos níveis de TNF- α , tanto circulantes quanto locais, pode atuar: (1) induzindo a transcrição de genes inflamatórios através da translocação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B) do citoplasma para o núcleo (Han et al., 1999), (2) ativar as vias de apoptose dependentes de TNF- α (Krown et al., 1996) e (3) induzir o aumento sustentado do influxo de cálcio nas células musculares cardíacas e esqueléticas (Thompson et al., 2000, Rodeberg et al., 1996, Song et al., 1993, Szabo et al., 1997), evidenciando os mecanismos pelos quais o TNF- α é capaz de mediar a disfunção cardíaca na sépsis.

O aumento do cálcio nas células musculares cardíacas (Thompson et al., 2000) pode levar a ativação intracelular de proteases dependentes de cálcio, dentre elas a calpaína, como observado em modelos de queimadura, endotoxemia (Sayeed, 2000) e em camundongos com distrofia muscular (*mdx*) (Spencer et al., 1995). A calpaína é uma cisteíno-protease dependente de cálcio capaz de degradar tanto proteínas de membrana quanto do citoesqueleto, mais precisamente a distrofina (Barta et al., 2005), o que prejudica a integridade do sarcolema dos cardiomiócitos, contribuindo para o avanço da falência cardíaca (Toyo-Oka et al., 2004).

Estudos realizados em humanos com distrofia muscular de Duchene e em modelos murinos de distrofia muscular demonstraram que a perda de distrofina desestabiliza o complexo de glicoproteínas associadas ao sarcolema, desestruturando o miócito (Straub et al., 1997, Vatta et al., 2002, Toyo-Oka et al., 2004, Heydemann & McNally, 2007). Simultaneamente, ocorre perda da integridade sarcolemal que permite o influxo de moléculas para o interior da célula. Em particular, tem sido observado aumento dos níveis de cálcio no músculo esquelético deficiente de distrofina (Bodensteiner & Engel, 1978; Gillis et al., 1996). Nesse contexto, um ou ambos os eventos contribuiriam para a patogênese da distrofia muscular. Straub e colaboradores (1997) demonstraram em camundongos *mdx* (geneticamente deficientes de distrofina) que a desestabilização do sarcolema pode alterar a permeabilidade da membrana aumentando o conteúdo de cálcio intracelular que estimularia a atividade das calpaínas, contribuindo dessa forma para a destruição da musculatura.

Em nosso estudo, não avaliamos as concentrações ou atividade das calpaína no músculo cardíaco, entretanto, as altas concentrações de TNF- α circulante e a presença dessa citocina no tecido cardíaco dos animais sépticos poderiam induzir o aumento do cálcio citosólico (Thompson et al., 2000), o que levaria à ativação das calpaínas. Essa enzima por sua vez, atuaria na proteólise não só da distrofina, mas também das moléculas de actina e miosina, contribuindo para a lise dos miofilamentos, desestabilização dos miócitos e conseqüente perda de função. A Figura 25 mostra um esquema hipotético da perda de distrofina, dos componentes do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CGD) e das proteínas do aparelho contrátil no miocárdio séptico.

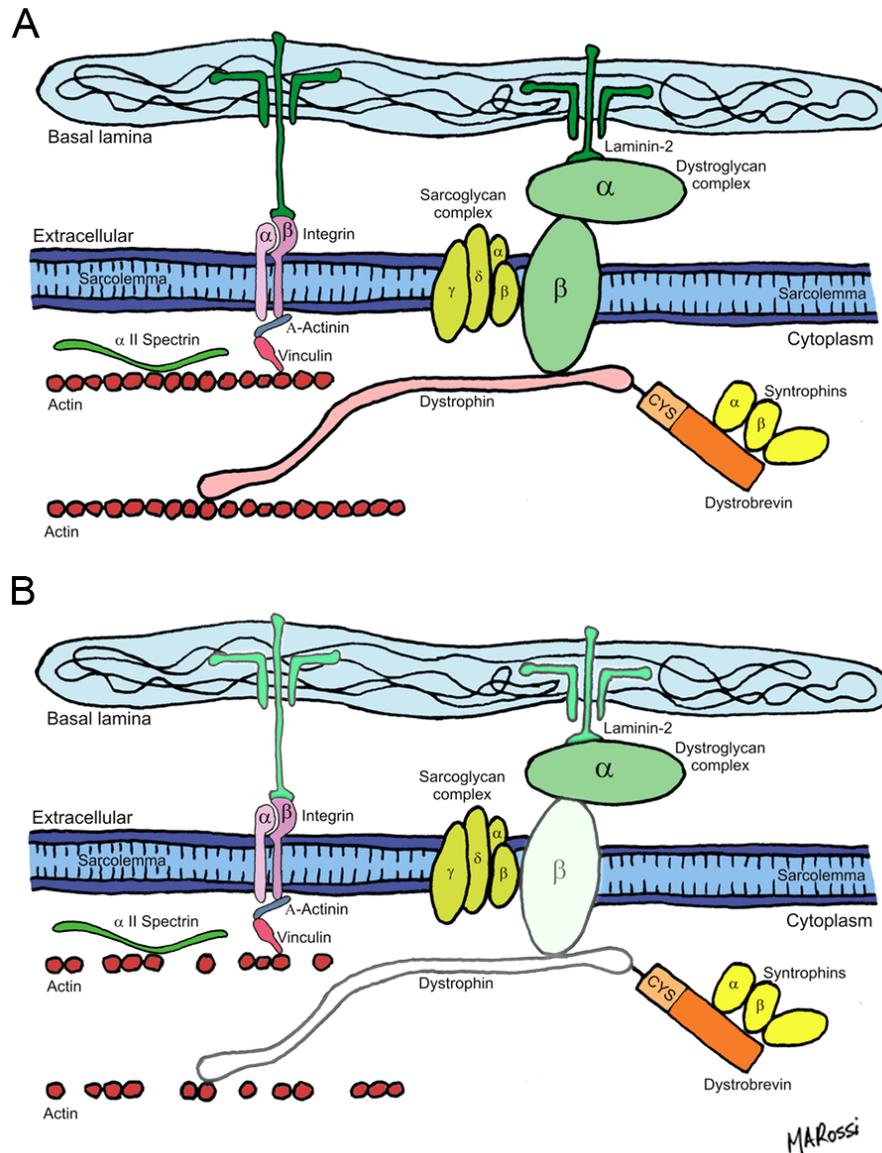


Figura 25. Diagrama esquemático representando a perda de distrofina, dos componentes do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina (CGD) e das proteínas do aparelho contrátil no miocárdio séptico. Em (A), representação esquemática da organização das proteínas do aparelho contrátil (representada apenas pela actina) e dos componentes do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina. Em (B), as alterações na organização e expressão das proteínas do aparelho contrátil (representada pela actina), de distrofina e dos componentes do complexo de glicoproteínas associadas à distrofina resultariam em perda de conexão com a matriz extracelular (representada pela laminina- α 2) alterando a morfologia e função celular.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostraram que há uma redução na expressão das proteínas envolvidas na formação das *gap junctions* (conexina43) e *junções aderentes* (N-caderina), o que resultaria na perda da integridade estrutural dos discos intercalares, alterando o acoplamento mecânico e eletro-químico entre os cardiomiócitos vizinhos contribuindo para a disfunção miocárdica observada na sépsis. Além disso, demonstramos que há redução da expressão de distrofina e diminuição das proteínas que constituem o complexo de glicoproteínas associadas à distrofina durante a sépsis experimental. A redução ou perda da expressão de distrofina é o evento que ocorre associado a degeneração miofilar e lise dos cardiomiócitos. A diminuição na expressão das glicoproteínas associadas à distrofina, β -dístroglicana e laminina foram considerados eventos secundários. Os resultados sugerem que na sépsis induzida por ligação e perfuração do ceco (CLP) há perda de proteínas importantes envolvidas tanto no remodelamento do disco intercalar quanto na expressão de glicoproteínas envolvidas na ligação mecânica entre o citoesqueleto intracelular e a matriz extracelular. Embora estudos funcionais sejam necessários para determinar o efeito direto dessas mudanças sobre o miocárdio, nossos achados sugerem que as alterações estruturais seriam, pelo menos em parte, responsáveis pela depressão miocárdica observada na sépsis.

7. REFERÊNCIAS*

Abel FL. Myocardial function in sepsis and endotoxin shock. *Am J Physiol.* 1989;257:R1265-R1281.

Adams HR, Baxter CR, Parker JL. Reduction of intrinsic contractile reserves of the left ventricle by Escherichia coli endotoxin shock in guinea-pigs. *J Mol Cell Cardiol.* 1985;17:575-585.

Allard MF, Hogg JC, Walley KR. Myocardial morphometric changes related to decreased contractility after endotoxin. *Am J Physiol.* 1996;270:H1446-H1452.

Allikian MJ, McNally EM. Processing and assembly of the dystrophin glycoprotein complex. *Traffic.* 2007;8:177-183.

Amman P, Fehr T, Minder EI, Günter C, Bertel O. Elevation of troponin in sepsis and septic shock. *Intensive Care Med.* 2001;27:965-969.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care sepsis. *Crit Care Med.* 2001;29:1303-1310.

Arlati S, Brenna S, Prencipe L, Marochi A, Casella GP, Lanzani M, Gandini C. Myocardial necrosis in ICU patients with non-cardiac disease: a prospective study. *Intensive Care Med.* 2000;26:31-37.

Armstrong SC, Latham CA, Shivell CL, Ganote CE. Ischemic loss of sarcolemmal dystrophin and spectrin: correlation with myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol.* 2001;33(6):1165-1179.

Barta J, Tóth A, Edes I, Vaszily M, Papp JG, Varró A, Papp Z. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol Cell Biochem.* 2005;278(1-2):1-8.

Bayston KF, Cohen I. Bacterial endotoxin and current concepts in the diagnosis and treatment of endotoxaemia. *J Med Microbiol.* 1990;31:73-83.

Beardslee MA, Lerner DL, Tadros PN, et al. Dephosphorylation and intracellular redistribution of ventricular connexin43 during electrical uncoupling induced by ischemia. *Circ Res.* 2000;87:656-662.

* As referências estão de acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors (Vancouver Style). Disponível em: <http://www.icmje.org>

Benjamim CF, Silva JS, Fortes ZB, Oliveira MA, Ferreira SH, Cunha FQ. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. *Infect Immun*. 2002;70:3602-3610.

Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. ECM remodeling in hypertensive heart disease. *J Clin Invest*. 2007;117:568-575.

Bodensteiner JB, Engel AG. Intracellular calcium accumulation in Duchenne dystrophy and other myopathies: a study of 567,000 muscle fibers in 114 biopsies. *Neurology*. 1978;28:439-446.

Bone, R.C.; Balk, R.A.; Cerra, F.B.; Dellinger, R.P.; Fein, A.M.; Knaus, W.A.; Schein, R.M.; Sibbald, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest*. 1992;101:1644-1655.

Bossink AW, Paemen L, Jansen PM, Hack CE, Thijs LG, Van Damme J. Plasma levels of the chemokines monocyte chemoattractant proteins-1 and -2 are elevated in human sepsis. *Blood*. 1995;15;86(10):3841-3847.

Brady AJB, Poole-Wilson PA, Harding SE, Warren JB. Nitric oxide production within cardiac myocytes reduces their contractility in endotoxemia. *Am J Physiol*. 1992;263:H1963-H1966.

Brown SC, Fassati A, Popplewell L, Page AM, Henry MD, Campbell KP, Dickson G. Dystrophic phenotype induced in vitro by antibody blockade of muscle alpha-dystroglycan-laminin interaction. *J Cell Sci*. 1999;112:209-216.

Bryant D, Becker L, Richardson J, Shelton J, Franco F, Peshock R, Thompson M, Giroir B. Cardiac failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation*. 1998;97(14):1375-1381.

Campbell KP, Stull JT. Skeletal muscle basement membrane-sarcolemma-cytoskeleton interaction minireview series. *J Biol Chem*. 2003;278:12599-12600.

Campos EC, Romano MMD, Prado CM, Rossi MA. Isoproterenol induces primary loss of dystrophin: correlation with myocardial injury. *Int J Exp Pathol*. 2008 (*in press*).

Cavaillon JM, Adib-Conquy M, Fitting C, Adrie C, Payen D. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis*. 2003;35:535-544.

Celes MR, Torres-Dueñas D, Alves-Filho JC, Duarte DB, Cunha FQ, Rossi MA. 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. *Crit Care Med*. 2007;35:2176-2185.

Chagnon F, Bentourkia M, Lecomte R, Lessard M, Lesur O. Endotoxin-induced heart dysfunction in rats: Assessment of myocardial perfusion and permeability and the role of fluid resuscitation. *Crit Care Med*. 2006;34:127-133.

Coalson JJ, Hinshaw LB, Guenter CA, Berrel EL, Greenfield LJ. Pathophysiologic responses of the subhuman primate in experimental septic shock. *Lab Invest*. 1975;32:561-569.

D'Amore, PA, Brown Jr. RH, Ku PT, Hoffman EP, Watanabe H, Arahata K, Ishihara T, Folkman J. Elevated basic fibroblast growth factor in the serum of patients with Duchenne muscular dystrophy. *Ann Neurol.* 1994;35:362-365.

Danielou G, Comtois AS, Dudley R, Karpati G, Vincent G, Des Rosiers C, Petrof BJ. Dystrophin-deficient cardiomyocytes are abnormally vulnerable to mechanical stress-induced contractile failure and injury. *FASEB J.* 2001;15:1655-1657.

Danik SB, Liu F, Zhang J, Suk HJ, Morley GE, Fishman GI, Gutstein DE. Modulation of cardiac gap junction expression and arrhythmic susceptibility. *Circ Res.* 2004;95:1035-1041.

Davatelis G, Tekamp-Olson P, Wolpe SD, Hermsen K, Luedke C, Gallegos C, Coit D, Merryweather J, Cerami A. Cloning and characterization of a cDNA for murine macrophage inflammatory protein (MIP), a novel monokine with inflammatory and chemokinetic properties. *J Exp Med.* 1988;167(6):1939-1944.

Deitch EA. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg.* 1992;216:117.

Delon I, Brown NH. Integrins and the actin cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 2007;19:43-50.

DeMeules JE, Pigula FA, Mueller M, Raymond SJ, Gamelli RL. Tumor necrosis factor and cardiac function. *J Trauma.* 1992;32:686-692.

Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest.* 1997;112:S321-329.

Eckardt D, Theis M, Degen J, Ott T, van Rijen HV, Kirchhoff S, Kim JS, de Bakker JM, Willecke K. Functional role of connexin43 gap junction channels in adult mouse heart assessed by inducible gene deletion. *J Mol Cell Cardiol.* 2004;36:101-110.

Ervasti JM, Campbell KP. Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell.* 1991;66:1121-1131.

Fahey TJ 3rd, Tracey KJ, Tekamp-Olson P, Cousens LS, Jones WG, Shires GT, Cerami A, Sherry B. Macrophage inflammatory protein 1 modulates macrophage function. *J Immunol.* 1992;148(9):2764-2769.

Fernandes CJ Jr, Iervolino M, Neves RA, Sampaio ELM, Knobel E. Interstitial myocarditis in sepsis. *Am J Cardiol.* 1994;74:958.

Fernandez-Cobo, M, Gingalewski C, Drujan, D, De Maio A. Downregulation of connexin 43 gene expression in rat heart during inflammation. The role of tumour necrosis factor. *Cytokine.* 1999;11:216-224.

Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart are mediated by nitric oxide. *Science.* 1992;257:387-389.

Ganote CE, Armstrong SC. Dystrophin-associated protein complex and heart failure. *Lancet.* 2002;359:905-906

Gillis, JM. Membrane abnormalities and Ca homeostasis in muscles of the mdx mouse, an animal model of the Duchenne muscular dystrophy: a review. *Acta Physiol Scand.* 1996;156:397-406

Gillis JM. Understanding dystrophinopathies: an inventory of the structural and functional consequences of the absence of dystrophin in muscles of the mdx mouse. *J Muscle Res Cell Motil.* 1999;20:605–625.

Giroir, B. P., J. H. Johnson, T. Brown, G. L. Allen, and B. Beutler. The tissue distribution of tumor necrosis factor biosynthesis during endotoxemia. *J Clin Invest.* 1992;90: 693-698.

Gotloib L, Shostak A, Galdi P, Jaichenko J, Fudin R. Loss of microvascular negative charges accompanied by interstitial edema in septic rats' heart. *Circ Shock.* 1992;36(1):45-56.

Greve G, Rotevatn S, Saetersdal T, Oksendal AN, Jynge P. Ultrastructural studies of intercalated disc separations in the rat heart during the calcium paradox. *Res Exp Med (Berl).* 1985;185:195-206.

Grocott-Mason RM, Shah AM. Cardiac dysfunction in sepsis: new theories and clinical implications. *Intensive Care Med.* 1998;24(4):286-295.

Groeneveld AB, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Bronsveld W, Nauta JJ, Thijs LG. Maldistribution of heterogeneous coronary blood flow during canine endotoxin shock. *Cardiovasc Res.* 1991;25(1):80-88.

Gutstein DE, Liu F-Y, Meyers MB, Choo A, Fishman GI. The organization of adherens junctions and desmosomes at the cardiac intercalated disc is independent of gap junctions. *J Cell Sci.* 2003;116:875-885.

Gutstein DE, Morley GE, Tamaddon H, Vaidya D, Schneider MD, Chen J, Chien KR, Stuhlmann H, Fishman GI. Conduction slowing and sudden arrhythmic death in mice with cardiac-restricted inactivation of connexin43. *Circ Res.* 2001;88:333-339.

Hack AA, Lam M-Y J, Cordier L, Shoturma DI, Ly CT, Hadhazy MA, Hadhazy MR, Sweeney HL, McNally EM. Differential requirement for individual sarcoglycans and dystrophin in the assembly and function of the dystrophin-glycoprotein complex. *J Cell Sci.* 2000;113:2535-2544.

Han Y, Weinman S, Boldogh I, Walker RK, Brasier AR. Tumor necrosis factor-alpha-inducible IkappaBalpha proteolysis mediated by cytosolic m-calpain. A mechanism parallel to the ubiquitin-proteasome pathway for nuclear factor-kappaB activation. *J Biol Chem.* 1999;274(2):787-794.

Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J. The role of the cytoskeleton in the heart failure. *Cardiovasc Res.* 2000;45:273-278.

Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan: an extracellular matrix receptor linked to the cytoskeleton. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:625-631.

Henry MD, Campbell KP. Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11:602–607.

- Hersch M, Gnidec AA, Bersten AD, Troster M, Rutledge FS, Sibbald WJ: Histologic and ultrastructural changes in nonpulmonary organs during early hyperdynamic sepsis. *Surgery*. 1990;107:397-410.
- Hess ML, Baxter CR, Parker JL. Myocardial subcellular function in shock. *Tex Rep Biol Med*. 1979;39:193-207.
- Hess ML, Krause SM, Komwatana P. Myocardial failure and excitation-contraction uncoupling in canine endotoxin shock: role of histamine and sarcoplasmic reticulum. *Circ Shock*. 1980;7:277-287.
- Hess ML, Krause SM. Contactile protein dysfunction as a determinant of depressed cardiac contractility during endotoxin shock. *J Mol Cell Cardiol*. 1981;13:715-723.
- Heydemann A, McNally EM. Consequences of disrupting the dystrophin-sarcoglycan complex in cardiac and skeletal myopathy. *Trends Cardiovasc Med*. 2007;17:55-59.
- Hinshaw LB. Sepsis/septic shock. Participation of the microcirculation: an abbreviated review. *Crit Care Med*. 1996;24:1072-1078.
- Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, Astiz ME, Chalfin DB, Dasta J F, Heard SO, Martin C, Napolitano LM, Susla GM, Totaro R, Vincent JL, Zanotti-Cavazzoni S. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Crit Care Med*. 2004;32:1928-1948.
- Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*. 2003;348(2):138-50.
- Hsu HK, Tao YP, Chen XY, Huang J, Liu MS. Changes in the activities of protein kinases A, C, and M in dog heart and liver following endotoxin administration. *Life Sci*. 1994;54:1163-1168.
- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue III LW, Bland KI, Chaudry IH. Cecal ligation and puncture. *Shock*. 2005;24:52-57.
- Iizuka K, Kawaguchi H, Kitabatake A. Effects of thiol protease inhibitors on fodrin degradation during hypoxia in cultured myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25(9):1101-1109.
- Kapadia, S., J. Lee, G. Torre-Amione, H. H. Birdsall, T. S. Ma, and D. L. Mann. Tumor necrosis factor- gene and protein expression in adult feline myocardium after endotoxin administration. *J Clin Invest*. 1995;96: 1042-1052.
- Kaplan SR, Gard JJ, Ptoonorarios N, Tsatsopoulou A, Spiliopoulou C, Anastasakis A, Squarcioni CP, McKenna WJ, Thiene G, Basso C, Brousse N, Fontaine G, Saffitz GE. Remodeling of myocyte gap junctions in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy due to a deletion in plakoglobin (Naxos disease). *Heart Rhythm*. 2004;1:3-11.
- Katsumi A, Orr AW, Tzima E, Schwartz MA. Integrins in mechanotransduction. *J Biol Chem*. 2004;279:12001-12004.

Kaye D, Pimental D, Prasad S, Maki T, Berger HJ, McNeil PL, Smith TW, Kelly RA. Role of transiently altered sarcolemmal membrane permeability and basic fibroblast growth factor release in the hypertrophic response of adult rat ventricular myocytes to increased mechanical activity in vitro. *J Clin Invest.* 1996;97:281-291.

Kido M, Otano H, Kyoji S, Sumida T, Fujiwara H, Okada T, Imamura H. Ischemic preconditioning-mediated restoration of membrane dystrophin during reperfusion correlates with protection against contraction-induced myocardial injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;287:H81-90.

Kostetskii I, Li J, Xiong Y, Zhou R, Ferrari VA, Patel VV, Molkenstein JD, Radice JL. Induced deletion of the N-cadherin gene in the heart leads to dissolution of the intercalated disc structure. *Circ Res.* 2005;96:346-354.

Kostin S, Scholz D, Shimada T, Maeno Y, Mollnau H, Hein S, Schaper J. The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell Tissue Res.* 1998;294:449-460

Kostin S, Hein S, Arnon E, Scholz D, Schaper J. The cytoskeleton and related proteins in the human failing heart. *Heart Fail Rev.* 2000;5:271-280.

Kostin S, Rieger M, Dammer S, Hein S, Richter M, Klövekorn WP, Bauer EP, Schaper J. Gap junction remodeling and altered connexin43 expression in failing human heart. *Mol Cell Biochem.* 2003;242:135-144.

Krishnagopalan S, Kumar A, Parrillo JE, Kumar MA. Myocardial dysfunction in the patient with sepsis. *Curr Opin Crit Care.* 2002;8:376-388.

Krown KA, Page MT, Nguyen C, Zechner D, Gutierrez V, Comstock KL, Glembotski CC, Quintana PJ, Sabbadini RA. Tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis in cardiac myocytes. *J Clin Invest.* 1996;98(12):2854-2865.

Kumar A, Krieger A, Symeonides S, Kumar A, Parrillo JE. Myocardial dysfunction in septic shock: Part II. Role of cytokines and nitric oxide. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 2001;15:485-511.

Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J Exp Med.* 1996;183:949-958.

Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM. The Dystrophin Glycoprotein Complex: Signaling Strength and Integrity for the Sarcolemma. *Circ Res.* 2004;94:1023-1031.

Levine, B., J. Kalman, L. Mayer, H. Fillit, and M. Packer. Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1990;323: 236-241.

Levy MM, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G. International Sepsis Definitions Conference. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med.* 2003;29:530-538.

- Levy RJ, Piel DA, Acton PD, Zhou R, Ferrari VA, Karp JS, Deutschman CS. Evidence of myocardial hibernation in the septic heart. *Crit Care Med*. 2005;33(12):2752-2756.
- Li J, Patel VV, Radice GL. Dysregulation of cell adhesion proteins and cardiac arrhythmogenesis. *Clin Med Res*. 2006;4:42-52.
- Liu M, Slutsky AS. Anti-inflammatory therapies: application of molecular biology techniques in intensive care medicine. *Intensive Care Med*. 1997;23:718-731.
- Liu MS, Xuan YT. Mechanisms of endotoxin-induced impairment in Na⁺-Ca²⁺ exchange in canine myocardium. *Am J Physiol*. 1986;251:R1078-R1085.
- Liu MS. Mechanisms of myocardial membrane alterations in endotoxin shock: roles of phospholipase and phosphorylation. *Circ Shock*. 1990;30:43-49.
- Mc Donough KH, Lang CH, Spitzer JJ. Depressed function of isolated hearts from hemodynamic septic rats. *Circ Shock*. 1984;12:241-251.
- McNally E, Allikian M, Wheeler MT, Mislow JM, Heydemann A. Cytoskeletal defects in cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:231-241.
- Medzhitov R, Janeway Jr C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev*. 2000;173:89-97.
- Mehta MJ, Khan IA, Gupta V, Jani K, Gowda RM, Smith PR. Cardiac troponin I predicts myocardial dysfunction and adverse outcome in septic shock. *Int J Cardiol*. 2004;95:13-17.
- Mela L, Hinshaw LB, Coalson JJ. Correlation of cardiac performance, ultrastructural morphology, and mitochondrial function in endotoxemia in the dog. *Cir Shock*. 1974;1:265-272.
- Meldrum DR. Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol*. 1998;274:R577-R595.
- Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation*. 2007;116(7):793-802.
- Metzger JM, Moss RL. Thin filament regulation of shortening velocity in rat skinned skeletal muscle: effects of osmotic compression. *J Physiol*. 1988;398:165-175.
- Moore DH, Ruska H. Electron microscope study of mammalian cardiac muscle cells. *J Biophys Biochem Cytol*. 1957; 25;3(2):261-268.
- Neumann, F. J., I. Ott, M. Gawaz, G. Richardt, H. Holzapfel, M. Jochum, and A. Schomig. Cardiac release of cytokines and inflammatory responses in acute myocardial infarction. *Circulation*. 1995;92: 748-755.
- Odeh M. Tumor necrosis factor-alpha as a myocardial depressant substance. *Int J Cardiol*. 1993;42:231-238.
- O'Grady NP, Tropea M, Preas HL 2nd, Reda D, Vandivier RW, Banks SM, Suffredini AF. Detection of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta during experimental endotoxemia and human sepsis. *J Infect Dis*. 1999;179(1):136-141.

Oliviero P, Chassagne C, Salichon N, Corbier A, Hamon G, Marotte F, Charlemagne D, Rappaport L, Samuel J-L. Expression of laminin $\alpha 2$ chain during normal and pathological growth of myocardium in rat and human. *Cardiovasc Res*. 2002;46:346-355.

Oral, H., S. Kapadia, M. Nakano, G. Torre-Amione, J. Lee, D. Lee-Jackson, J. B. Young, and D. L. Mann. Tumor necrosis factor- and the failing human heart. *Clin Cardiol*. 1995;18: S20-27.

Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med*. 1990;113:227-242.

Parrillo JE. Pathogenic mechanism of septic shock. *N Engl J Med*. 1993;328:1471-1477.

Perriard JC, Hirschy A, Ehler E. Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med*. 2003;13:30-38.

Peters NS, Green PA, Poole-Wilson NJ. Reduced content of connexin43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human heart. *Circulation*. 1993;88:864-875.

Petrof, BJ, Shrager, JB, Stedman, HH, Kelly AM, Sweeney HL. Dystrophin protects the sarcolemma from stresses developed during muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:3710-3714.

Piper RD, Li FY, Myers ML, Sibbald WJ: Structure-function relationships in the septic rat heart. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997;156:1473-1482.

Pittet O, Rangel-Frausto MS, Li N, Tarara D, Costigan M, Rempe L, Jebson P, Wenzel RP. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, severe sepsis and septic shock: Incidence, morbidities are outcomes in surgical ICU patients. *Intensive Care Med*. 1995;21:302-309.

Powers FM, Farias S, Minami H, Martin AF, Solaro RJ, Law WR. Cardiac myofilament protein function is altered during sepsis. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:967-978.

Rangel-Frausto MS, Pittet O, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of systemic inflammatory response syndrome (SIRS): A prospective study. *JAMA*. 1995;273:117-123.

Redl H, Schlag G, Bahrami S, Schade U, Ceska M, Stütz P. Plasma neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 and neutrophil elastase in a primate bacteremia model. *J Infect Dis*. 1991;164(2):383-388.

Rodeberg DA, Babcock GF. Role of calcium during lipopolysaccharide stimulation of neutrophils. *Infect Immun*. 1996;64(7):2812-2816.

Rodríguez M, Cai W-J, Kostin S, Lucchesi BR, Schaper J. Ischemia depletes dystrophin and inhibits protein synthesis in the canine heart: Mechanisms of myocardial ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol*. 2005;38:723-733.

Ross R S. The extracellular connections: the role of integrins in myocardial remodeling. *J Card Fail.* 2002;8:S326-331.

Rossi MA, Oliveira JS, Zucoloto S, Pissaia O, Costa RS. Effect of protein-calorie malnutrition on catecholamine levels and weight of heart in rats. *J Neural Transm.* 1980;48(2):85-99.

Rossi MA, Santos CS. Sepsis related microvascular myocardial damage with the giant cell inflammation and calcification. *Virchows Arch.* 2003;443:87-92.

Rossi MA, Celes MR, Prado CM, Saggiaro FP. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. *Shock.* 2007; 27:10-18.

Rybakova IN, Patel JR, Ervasti JM. The dystrophin complex forms a mechanically strong link between the sarcolemma and costameric actin. *J Cell Biol.* 2000;150:1209-1214.

Saggiaro FP, Rossi MA, Duarte MI, Martin CC, Alves VA, Moreli ML, Figueiredo LT, Moreira JE, Borges AA, Neder L. Hantavirus infection induces a typical myocarditis that may be responsible for myocardial depression and shock in hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis.* 2007;195(10):1541-1549.

Sayed MM. Signaling mechanisms of altered cellular responses in trauma, burn, and sepsis: role of Ca^{2+} . *Arch Surg.* 2000;135(12):1432-1442.

Schlag G, Redl H, van Vuuren CJ, Davies J. Hyperdynamic sepsis in baboons: II. Relation of organ damage to severity of sepsis evaluated by a newly developed morphological scoring system. *Circ Shock.* 1992;38:253-263.

Severs NJ. The cardiac muscle cell. *Bioessays.* 2000; 22:188-199.

Silva E, Pedro M de A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF; Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M; Avezum A; Rocha PC, de Matos GF; Bento AM; Correa AD Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit Care.* 2004;8:R251-260.

Snell RJ, Parrillo JE. Cardiovascular dysfunction in septic shock. *Chest.* 1991;99:1000-1009.

Song SK, Karl IE, Ackerman JJ, Hotchkiss RS. Increased intracellular Ca^{2+} : a critical link in the pathophysiology of sepsis? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 May 1;90(9):3933-3937.

Soulsby ME, Bruni FD, Looney TJ, Hess ML. Influence of endotoxin on myocardial calcium transport and the effect of augmented venous return. *Circ Shock.* 1978;5:23-34.

Spencer MJ, Croall DE, Tidball JG. Calpains are activated in necrotic fibers from mdx dystrophic mice. *J Biol Chem.* 1995;270(18):10909-10914.

Stahl TJ, Alden PB, Ring WS, Madoff RC, Cerra FB. Sepsis-induced diastolic dysfunction in chronic canine peritonitis. *Am J Physiol.* 1990;258(3 Pt 2):H625-633.

Standiford TJ, Rolfe MW, Kunkel SL, Lynch JP 3rd, Burdick MD, Gilbert AR, Orringer MB, Whyte RI, Strieter RM. Macrophage inflammatory protein-1 alpha expression in interstitial lung disease. *J Immunol.* 1993;151(5):2852-2863.

Standiford TJ, Kunkel SL, Lukacs NW, Greenberger MJ, Danforth JM, Kunkel RG, Strieter RM. Macrophage inflammatory protein-1 alpha mediates lung leukocyte recruitment, lung capillary leak, and early mortality in murine endotoxemia. *J Immunol.* 1995;155(3):1515-1524.

Stevenson S, Rothery S, Cullen MJ, Severs NJ. Spatial relationship of the C-terminal domains of dystrophin and beta-dystroglycan in cardiac muscle support a direct molecular interaction at the plasma membrane interface. *Circ Res.* 1998;82:82-93.

Straub V, Rafael JA, Chamberlain JS, Campbell KP. Animal models of muscular dystrophy show different patterns of sarcolemmal disruption. *J Cell Biol.* 1997;139:375-385.

Straub V, Duclos F, Venzke DP, Lee JC, Cutshall S, Leveille CJ, Campbell KP. Molecular pathogenesis of muscle degeneration in the delta-sarcoglycan-deficient hamster. *Am J Pathol.* 1998;153:1623-1630.

Suffredini AF, Reda D, Banks SM, Tropea M, Agosti JM, Miller R. Effects of recombinant dimeric TNF receptor on human inflammatory responses following intravenous endotoxin administration. *J Immunol.* 1995;155(10):5038-5045

Sugishita K, Kinugawa K, Shimizu T, Harada K, Matsui H, Takahashi T, Serizawa T, Kohmoto O. Cellular basis for the acute inhibitory effect of IL-6 and TNF- α on excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:1457-1467.

Szabó C, Haskó G, Németh ZH, Vizi ES. Calcium entry blockers increase interleukin-10 production in endotoxemia. *Shock.* 1997;7(4):304-307.

Tansey EE, Kwaku KF, Hammer PE, Cowan DB, Federman M, Levitsky S, McCully JD. Reduction and redistribution of gap and adherens junction proteins after ischemia and reperfusion. *Ann Thorac Surg.* 2006;82:1472-1479.

Tao W, Deyo DJ, Traber DL, Johnston WE, Sherwood ER. Hemodynamic and cardiac contractile function during sepsis caused by cecal ligation and puncture in mice. *Shock.* 2004;21:31-37.

Taveira da Silva AM, Kaulbach HC, Chuidian FS, Lambert DR, Suffredini AF, Danner RL. Shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of Salmonella endotoxin. *N Engl J Med.* 1993;328(20):1457-1460.

Thompson M, Kliewer A, Maass D, Becker L, White DJ, Bryant D, Arteaga G, Horton J, Giroir BP. Increased cardiomyocyte intracellular calcium during endotoxin-induced cardiac dysfunction in guinea pigs. *Pediatr Res.* 2000;47(5):669-676

Torres-Dueñas D, Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. *Shock.* 2006;25:267-276.

Towbin JA. The role of cytoskeletal proteins in cardiomyopathies. *Curr Opin Cell Biol.* 1998;10:131-139.

Toyo-Oka T, Kawada T, Nakata J, Xie H, Urabe M, Masui F, Ebisawa T, Tezuka A, Iwasawa K, Nakajima T, Uehara Y, Kumagai H, Kostin S, Schapper J, Nakazawa M, Ozawa K. Translocation and cleavage of myocardial dystrophin as a common pathway to advanced heart failure: a scheme for the progression of cardiac dysfunction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:7381-7385.

Tran DD, Groeneveld AB, van der Meulen J. Age, chronic disease, sepsis, organ system failure, and mortality in a medical intensive care unit. *Crit Care Med.* 1990;18: 474.

Turner A, Tsamitros M, Bellomo R. Myocardial cell injury in septic shock. *Crit Care Med.* 1999;27:1775-1780.

Van Der Flier A, Sonnenberg A. Function and interaction of integrins. *Cell Tissue Res.* 2001;305:285-298.

Van der Poll T, van Deventer JH. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of the sepsis. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13:413-426.

Van Rijen HV, Eckardt D, Degen J, Theis M, Ott T, Willecke K, Jongsma HJ, Opthof T, de Bakker JM. Slow conduction and enhanced anisotropy increase the propensity for ventricular tachyarrhythmias in adult mice with induced deletion of connexin43. *Circulation.* 2004;109:1048-1055.

Vatta M, Stetson SJ, Perez-Verdia A, Entman ML, Noon GP, Torre-Amione G, Bowles NE, Towbin JA. Molecular remodeling of dystrophin in patients with end-stage cardiomyopathies and reversal in patients on assistance-device therapy. *Lancet.* 2002; 359:936-941.

Ver Elst KM, Spapen HD, Nguyen DN, Garbar C, Huyghens LP, Gorus FK. Cardiac troponins I and T are biological markers of left ventricular dysfunction in septic shock. *Clin Chem.* 2000;46:650-657.

Walley KR, Herbert PC, Wakai Y, Wilcox PG, Road JD, Cooper DJ. Decrease in left ventricular contractility after tumor necrosis factor-alpha infusion in dogs. *J Appl Physiol.* 1994;76:1060-1067.

Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ, Strieter RM, Kunkel SL. Balance inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun.* 1996;64:4733-4738.

Wang X, Gerdes AM. Chronic pressures overload hypertrophy and failure in guinea pigs: III. Intercalated disc remodeling. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:333-343.

Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980;29:189-201.

Winder SJ. The complexities of dystroglycan. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:118-124.

Wu LL, Liu MS. Altered ryanodine receptor of canine cardiac sarcoplasmic reticulum and its underlying mechanism in endotoxin shock. *J Surg Res.* 1992b;53:82-90.

Wu LL, Liu MS. Heart sarcolemmal Ca²⁺ transport in endotoxin shock, I: impairment of ATP-dependent Ca²⁺ transport. *Mol Cell Biochem.* 1992a;112:125-133.

Xi H, Shin W, Suzuki JI, Nakajima T, Kawada T, Uehara Y, Nakazawa M, Toyooka T. Dystrophin Disruption might be related to myocardial cell apoptosis caused by Isoproterenol. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;36:S25-29.

Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol.* 2001;69:698-704.

Yokoyama T, Nakano J, L. Bednarczyk, B. W. McIntyre, M. Entman, and D. L. Mann. Tumor necrosis factor- provokes a hypertrophic growth response in adult cardiac myocytes. *Circulation.* 1997;95: 1247-1252.

Zhang M, Xu YJ, Saini HK, et al. TNF-alpha as a potential mediator of cardiac dysfunction due to intracellular Ca²⁺-overload. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;327:57-63.

Zhou M, Wang P, Chaudry IH: Cardiac contractility and structure are not significantly compromised even during the late hemodynamic stage of sepsis. *Shock.* 1998;9:352-358.

Zuppinger C, Eppenberger-Eberhardt M, Eppenberger HM. N-cadherin: structure, function and importance in the formation of new intercalated disc-like cell contacts in cardiomyocytes. *Heart Fail Rev.* 2000;5:251-257.

ANEXOS

ANEXO A – Carta do Comitê de Ética



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

"CAMPUS" DE RIBEIRÃO PRETO
TELEFONE: PABX 602.3000 – FAX: (0XX16) 633.1586
14049-900 – RIBEIRÃO PRETO – ESTADO DE SÃO PAULO

Folha de Informação rubricada sob Nº.....
do processo Nº (a).....

Interessada: MARA RÚBIA NUNES CELES

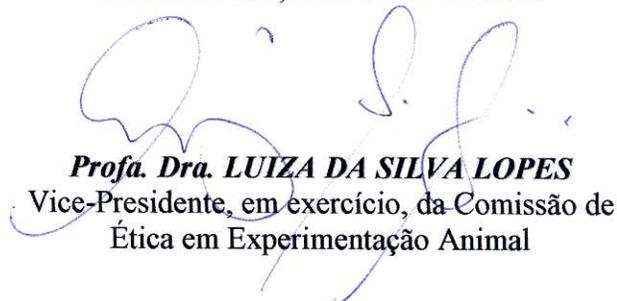
Orientador: Prof. Dr. MARCOS ANTONIO ROSSI

Assunto: Avaliação do projeto de pesquisa: *“Sépsis e choque séptico: Alterações funcionais e morfológicas do coração. Estudo experimental em camundongos”*.

INFORMAÇÃO

O projeto intitulado *“Sépsis e choque séptico: Alterações funcionais e morfológicas do coração. Estudo experimental em camundongos”*, foi analisado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em sua 12ª Reunião Ordinária, realizada em 26 de abril de 2004, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, de acordo com o Protocolo Nº 012/2004.

Ribeirão Preto, 26 de abril de 2004.



Profa. Dra. LUIZA DA SILVA LOPES
Vice-Presidente, em exercício, da Comissão de
Ética em Experimentação Animal

ANEXO B – Reagentes e soluções

A) SOLUÇÃO DE NaCl 0,9% - SALINA

Foram dissolvidos 9g de NaCl em 1 litro de água destilada.

B) PBS

Foram dissolvidos 8,17g de NaCl, 0,36g de fosfato de sódio monobásico, 1,05g de fosfato de sódio dibásico e completado para um volume final de 1 litro com água destilada. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 2M.

C) SOLUÇÃO ÁLCOOL-ÁCIDO

Foram misturados 99 mL de álcool 70% e 1 mL de ácido clorídrico concentrado.

D) SOLUÇÃO EOSINA-FLOXINA

Foram misturados 62,5 mL de solução estoque de eosina a 1%, 6,25% mL de solução estoque de floxina a 1% e 487,5% mL de ácido acético glacial.

E) SOLUÇÃO PRÉ-INFILTRADORA

Foram misturadas partes iguais de solução infiltradora e álcool 100%.

F) SOLUÇÃO INFILTRADORA

Foram misturados 100 mL de Historesin (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha) e 1 g de Hardner (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha).

G) SOLUÇÃO PARA INCLUSÃO

Foram misturados 15 mL de solução infiltradora e 1 mL de Hardner II (Leica Instruments GmbH, Heidelberg, Alemanha).

H) SOLUÇÃO AZUL DE TOLUIDINA

Foram misturados 1g de azul de toluidina e 1g de tetraborato de sódio a 100 mL de água destilada quente. A solução foi estocada, à temperatura ambiente, em frasco de vidro vedado.

ANEXO C – Fixadores e Colorações

A) FORMOL A 3,7% EM PBS

Foram misturados 10 mL de formol a 3,7% e 90 mL de PBS para um volume final de 100 mL.

B) COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA DE HARRIS

As lâminas são deixadas na solução de hematoxilina por 5 a 8 segundos e lavadas com 2 trocas de água corrente. Em seguida, são passadas pela água amoniacal por 30 segundos e lavadas com 2 trocas de água corrente. Por último, são desidratadas, diafanizadas e montadas.

B) COLORAÇÃO HEMATOXILINA E EOSINA

As lâminas foram desparafinizadas em séries decrescentes de álcoois e lavadas em água corrente. Em seguida, coradas pela Hematoxilina de Harris por 3-5 minutos. Lavadas em água corrente e diferenciadas em solução álcool ácido a 1% e lavadas por 15 minutos. Após, foram coradas em solução de eosina-floxina por 10 a 30 segundos e passadas em álcool 95% para a retirada do excesso de corante. As lâminas foram desidratadas, diafanizadas e montadas.

C) COLORAÇÃO AZUL DE TOLUIDINA

Os cortes foram cobertos com algumas gotas de solução corante por 3-5 minutos em platina aquecida a 55-60°C, lavados em água corrente e secos em platina aquecida.