



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA- UFBA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



LETÍCIA REIS DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE microRNA DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
PACIENTES COM DISFUNÇÃO CARDÍACA DECORRENTE DE SEPSE E A
CORRELAÇÃO COM AS VIAS INTRACELULARES DE SINALIZAÇÃO: ANÁLISE
IN SILICO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO**

Salvador/BA
2023

LETÍCIA REIS DE OLIVEIRA

**IDENTIFICAÇÃO DE microRNA DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM
PACIENTES COM DISFUNÇÃO CARDÍACA DECORRENTE DE SEPSE E A
CORRELAÇÃO COM AS VIAS INTRACELULARES DE SINALIZAÇÃO: ANÁLISE
IN SILICO DE POTENCIAIS BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito para obtenção do título de Mestre em Imunologia.

Orientadora: Dr^a Simone Garcia Macambira

Coorientadora: Dr^a Jaqueline França Costa

Salvador/BA
2023

O48 Oliveira, Letícia Reis de

Identificação de microRNA diferencialmente expressos em pacientes com disfunção cardíaca decorrente de sepse e a correlação com as vias intracelulares de sinalização: análise in silico de potenciais biomarcadores de diagnóstico/Letícia Reis de Oliveira. – Salvador, 2023.

76 f.: il.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone Garcia Macambira; Coorientadora: Prof^a. Dr^a Jaqueline França Costa.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto de Ciências da Saúde/Programa de Pós-Graduação em Imunologia, 2023.

Inclui referências.

1. Sepse. 2. Disfunção cardíaca. 3. Expressão gênica. 4. Biomarcadores. I. Macambira, Simone Garcia. II. Costa, Jaqueline França. III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU 577.2:616.12

DEDICATORIA

Dedico este trabalho aos meus pais Janine e Edivan, cujo amor e apoio foram fundamentais para que eu pudesse alcançar o título de mestre. Sua confiança em mim e sua constante motivação foram verdadeiras bússolas durante toda a minha jornada.

Aos meus irmãos Paloma, Júnior, Elis e Maria por toda a paciência, compreensão, auxílio, apoio em todos os momentos e aos demais familiares por sempre acreditarem em mim.

Agradeço à Paula por ter sido os meus ouvidos em tempo integral e por cada conselho nos momentos delicados, suas palavras de incentivo foram uma fonte constante de inspiração. Ao meu grande amigo Caio, por toda atenção e cuidado acompanhando cada processo deste trabalho, o seu apoio foi essencial.

A todos os amigos que permaneceram ao meu lado, compreendendo minha ausência e me encorajando nos momentos de desafio.

Todos vocês foram essenciais para manter o equilíbrio e a motivação ao longo dessa jornada.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar meu profundo agradecimento à minha orientadora Dra. Simone Garcia Macambira, pela presença constante, pelo cuidado, por seu carinho, dedicação e apoio ao longo de todo esse processo. Além de ser uma orientadora excepcional, você demonstrou interesse genuíno pelo meu crescimento acadêmico e profissional.

A minha eterna gratidão ao Ms. Victor de Barros, por toda a paciência, disponibilidade e por me ensinar tudo que sei hoje sobre o mundo da bioinformática, o seu apoio foi muito significativo e fundamental para a concretização deste trabalho. A minha amiga Lara Sousa pelo companheirismo, suporte, as nossas inúmeras trocas e por ter estado ao meu lado em todos os momentos dessa caminhada, partilhar desta conquista com você faz dela ainda mais especial.

Agradeço à minha família e aos amigos por todo o suporte emocional, pelos momentos de descontração e pela confiança depositada em mim.

Agradeço ao PPGIM por ter me recebido tão bem e por cada oportunidade concedida durante todo esse período.

Agradeço à CAPES pela concessão da bolsa.

RESUMO

Introdução: A sepse é uma condição clínica com elevado risco de morte, definida como uma disfunção orgânica decorrente de uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, sendo a disfunção cardíaca uma das principais complicações dos pacientes com sepse e está intimamente associada à elevada mortalidade induzida por esta condição clínica. Atualmente, a incidência e a mortalidade da sepse ainda são elevadas, apontando a importância do uso de biomarcadores no diagnóstico precoce e no seu prognóstico. Nesse cenário, os microRNA surgem como candidatos potenciais com alta especificidade e sensibilidade para a sepse. Diante desse contexto, o presente estudo visou investigar o perfil de expressão dos miRNA e sua correlação com as vias intracelulares envolvidas no remodelamento do miocárdio decorrente da sepse. **Métodos & Resultados :** O levantamento dos transcriptomas publicamente disponíveis em NCBI, GEO e ENA, resultou na obtenção do conjunto de dados GSE171546. Este conjunto dispõe de 20 amostras : 5 compondo o grupo controle e 15 amostras constituindo o grupo com cardiomiopatia séptica, separadas nos intervalos de tempo: 24h, 48h e 72h. A importação e análise desse conjunto de dados foram feitas a partir da plataforma online do *Galaxy*. Foi então avaliado o valor de $p < 0,05$ e *Fold change* para encontrar os Genes Diferencialmente Expressos (GDE) e microRNA Diferencialmente Expressos (MDE). A partir desta análise, 768 GDE foram encontrados no período de 24h, 312 no grupo 48h e 255 GDE no intervalo de 72h, além de dois MDE (miR-8110 e miR-574-5p). As análises de enriquecimento de vias e de ontologia genética foram feitas pelo *Webgestalt*. A verificação dos mRNA alvos dos MDE foi realizado através do *Mirwalk* e posterior construção de rede de interação entre GDE e MDE, no *Cytoscape*. **Conclusão :** Os dois miRNA identificados estão relacionados a diversas vias intracelulares envolvidas no remodelamento do miocárdio associado à disfunção cardíaca decorrente da sepse e estão diferencialmente modulados no transcriptoma analisado neste estudo, sugerindo um papel relevante como potenciais biomarcadores de prognóstico da cardiomiopatia decorrente da sepse.

Palavras-chave: Sepse; Disfunção cardíaca; Expressão gênica; Biomarcadores

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is a clinical condition with a high risk of death, defined as an organ dysfunction resulting from a dysregulated host response to infection, with cardiac dysfunction being one of the main complications in septic patients and closely associated with high mortality induced by this clinical condition. Currently, the incidence and mortality of sepsis remain high, highlighting the importance of using biomarkers for early diagnosis and prognosis. In this scenario, microRNAs emerge as potential candidates with high specificity and sensitivity for sepsis. In light of this context, the present study aimed to investigate the expression profile of miRNAs and their correlation with intracellular pathways involved in myocardial remodeling associated with sepsis. **Methods & Results:** Surveying publicly available transcriptomes in NCBI, GEO dataset, and ENA resulted in obtaining the dataset GSE171546. This dataset comprises 20 samples: 5 in the control group and 15 samples in the septic cardiomyopathy group, divided into three time intervals: 24h, 48h, and 72h. Importation and analysis of this dataset were performed using the online Galaxy platform. The p-value <0.05 and fold change were evaluated to identify Differentially Expressed Genes (DEGs) and Differentially Expressed microRNAs (DEMs). From this analysis, 768 DEGs were found at the 24h time point, 312 in the 48h group, and 255 DEGs in the 72h interval, along with two DEMs (miR-8110 and miR-574-5p). Pathway enrichment analysis and gene ontology were performed using Webgestalt. The validation of target mRNAs of DEMs was carried out through Mirwalk, followed by the construction of an interaction network between DEGs and DEMs using Cytoscape. **Conclusion:** The two identified microRNAs are related to various intracellular pathways involved in myocardial remodeling associated with cardiac dysfunction resulting from sepsis and are differentially modulated in the transcriptome analyzed in this study, suggesting a relevant role as potential prognostic biomarkers for sepsis-induced cardiomyopathy.

Keywords: Sepsis; Cardiac dysfunction; Gene expression; Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fisiopatologia da disfunção miocárdica séptica (Ehrman RR, Sullivan AN, et al; 2018).....	21
Figura 2-	Biogênese do miRNA.....	28
Figura 3-	Fluxograma de seleção do transcriptoma.....	31
Figura 4-	Fluxograma das análises conduzidas no transcriptoma para identificação dos GDE.....	35
Figura 5-	Rede de interação criada no programa do Cytoscape entre os 124 GDE e MDE expressos em 72h.....	39
Figura 6-	Rede de interação demonstrando a clusterização entre os 124 GDE e MDE expressos em 72h.....	40
Figura 7-	Rede de interação demonstrando interseção dos 129 GDE expressos nos intervalos de tempo 24h x 48hx 72h.....	41
Figura 8-	Vias intracelulares de sinalização: Toll- like receptor, JAK – STA, NF – KB, Cardiomiopatia dilatada, PI3K – AKT, Staphylococcus aureus.....	42
Figura 9-	Vias intracelulares de sinalização: TNF, IL - 17, Citocina – citocina receptor, Th17, MAPK, NOD – like.....	43
Figura 10-	Diferença entre os alvos expressos desde o início da infecção (24h) e que deixaram de ser modulados em 72h.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1-	Análise de enriquecimento de vias intracelulares do grupo de 24h através da plataforma webgestalt.....	36
Gráfico 2-	Análise de enriquecimento de vias intracelulares do grupo de 48h através da plataforma webgestalt.....	37
Gráfico 3-	Análise de enriquecimento de vias intracelulares do grupo de 72h através da plataforma webgestalt.....	37
Gráfico 4-	Diagrama de Venn.....	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIações

ADCY 2 – do inglês *Adenilato Ciclase 2*

BP – do inglês *Processos Biológicos*

CC - Componentes Celulares

CCL24 - do inglês *CC Motif Chemokine Ligand 24*

CLEC4A - do inglês *C-Type Lectin Domain Family 4 Member A*

CLRs - Receptores de lectina tipo C

CSF2RBS - do inglês *Colony Stimulating Factor 2 Receptor Subunit Beta*

DAMPs – Padrões moleculares associados a danos

DC – Débito Cárdiaco

FE – Fração de ejeção

FT - Fator tecidual

GDE – Genes diferencialmente expressos

GM-CSF - Fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos

GO – do inglês *Gene Ontology*

GSEA - Enriquecimento de Conjunto de Genes

ICAM1 - Molécula de Adesão Intercelular 1

IFN- γ - Interferon-Gama

IL – Interleucina

LPS – Lipopolissacarídeo

MAP2K6 – do inglês *Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6*

MAPK - Proteína quinase ativada por mitógeno p38

MDE – microRNA diferencialmente expresso

MIF - Fator inibidor de macrófagos

MOF – do inglês *multiple organ failure*

MYLK2 – do inglês *Myosin Light Chain Kinase 2*

NFκB - Fator nuclear Kappa B

NLRs - Receptores do tipo NOD - like

OSMR – do inglês *Oncostatin M Receptor*

PAMP - do inglês *Pathogen-associated Molecular Pattern*

PCR – Proteína C reativa

PCT - Procalcitonina

PPARs - Receptores ativados por proliferadores de peroxissomos

PRRs - do inglês *Pattern Recognition Receptor*

Rap1 - do inglês *repressor-activator protein*

RVS – Resistência vascular sistêmica

SAA3 - Antígeno amilóide sérico 3

SC – Cardiomiopatia Séptica

STAT3 - transdutor de sinal e ativador de transcrição 3

TGF-β - fator de crescimento transformador beta

TNF-a – Fator de necrose tumoral alfa

TREM-1 - do inglês *Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 1*

TRLs – Toll-likes

UTIs - Unidade de terapia intensiva

VDF – Volume diastólico final

VE – Ventrículo esquerdo

SUMÁRIO

DEDICATORIA	3
LISTA DE SIGLAS E ABREVIações	9
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. Aspectos gerais.....	14
2.2. Fisiopatologia da sepse.....	15
2.3. Disfunção cardíaca decorrente da sepse	18
2.4. Biomarcadores	22
2.4.1. Troponina	23
2.4.2. Proteína C-reativa.....	24
2.4.3. Procalcitonina (PCT).....	25
2.4.4. IL - 6	25
2.4.5. MicroRNA	26
3. HIPÓTESE	30
4. OBJETIVOS.....	30
4.1. Objetivo Geral	30
4.2. Objetivos Específicos	30
5. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO	31
5.1. Análise de dados em repositórios públicos	31
5.2. Identificação de genes diferencialmente expressos (GDE).....	33
5.3. Análise de enriquecimento de vias e ontologia de genes.....	33
5.4. Identificação de microRNAs Alta Confiança (High Confidence)	33
5.5. Análise dos genes alvos.....	34
5.6. Construção da rede de interação - <i>STRING</i> e <i>CYTOSCAPE</i>	34
6. RESULTADOS	34
6.1. Identificação de genes diferencialmente expressos (GDE).....	35
6.2. Análise de enriquecimento de vias e ontologia	35
6.3. Discussão.....	44
7. CONCLUSÃO	57
8. REFERÊNCIAS	58

1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, diferentes conceitos foram sendo elaborados e aprimorados em resposta ao conhecimento construído sobre o quadro clínico da sepse, mas que ainda não foram substancialmente precisos para definir esta complexa entidade clínica. De acordo com Esposito e cols. (2017), durante o primeiro consenso sobre a sepse em 1991, as sociedades americana e europeia para cuidados com a sepse descreveram-na como uma síndrome caracterizada por um quadro de disfunção orgânica, associada à hipoperfusão ou hipotensão, acompanhada de acidose láctica, oligúria e alteração aguda em estado mental decorrente de um quadro infeccioso. Nesta definição, considerava-se a hipotensão induzida por sepse a condição de pressão arterial sistólica <90 mmHg ou uma redução de 40 mmHg da linha de base na ausência de outra causa de hipotensão. Entretanto, o fato de outras doenças apresentarem esse mesmo quadro clínico, confundiam os especialistas na definição de um cenário legítimo de sepse e por isso, os conceitos iniciais foram questionados (CHURPEK et al., 2015).

O *Surviving Sepsis Campaign* (Campanha Sobrevivendo à Sepse) em 2001, o segundo consenso internacional sobre a sepse, foi liderado pela *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e pela *European Society of Intensive Care Medicine* (ESICM) e teve como objetivo fornecer diretrizes baseadas em evidências para o tratamento da sepse e do choque séptico. Em 2004, foi lançado novo material bibliográfico complementar ao produzido em 2001, atualizando e revisando as diretrizes com base nas melhores evidências disponíveis na época para orientar a conduta terapêutica na sepse e no choque séptico (CECCONI et al., 2018).

Um tempo mais tarde, no ano de 2016, durante o Consenso Internacional da Sepse, novas alterações conceituais foram admitidas para classificar o quadro clínico da sepse. A sepse então foi definida como uma disfunção orgânica com risco de morte devido á resposta desregulada do hospedeiro á infecção, tornando-se uma das dez principais causas de morte em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Dessa forma, no contexto dos processos orgânicos relacionados com a sua alta taxa de mortalidade, é preciso destacar as acentuadas alterações hemodinâmicas, a lesão de órgãos secundários, a falência de múltiplos órgãos e o comprometimento da resposta imune celular. Entre os vários sistemas de órgãos que entram em

falência na sepse, o coração é um dos mais afetados (HAWIGER, 2018 ; CECCONI et al., 2018).

Descoberta há mais de quatro décadas, a cardiomiopatia séptica (CS) é um distúrbio cardíaco agudo causado pela sepse que é reversível e pode ser restaurado em um estágio inicial da condição clínica (LU et al., 2019; BEESLEY et al., 2018). A disfunção cardíaca é uma das principais complicações dos pacientes com sepse e, está intimamente associada à elevada mortalidade induzida por esta condição clínica. Por conseguinte, entender as manifestações da disfunção cardíaca na sepse e os seus alvos terapêuticos específicos é imprescindível para reduzir as complicações cardiovasculares e as altas taxas de morbimortalidade. Essa compreensão pode contribuir para o desenvolvimento de terapias direcionadas que visem proteger o coração durante a sepse (VINCENT et al, Marshall JC 2014; MARTIN & DERWALL, 2017).

Atualmente, o número de casos permanece elevado a despeito dos avanços na Medicina Intensiva e na Biologia Molecular, apontando mais fortemente para a importância do uso de biomarcadores no diagnóstico precoce e no prognóstico da sepse. Muitos potenciais biomarcadores têm sido propostos, sendo a proteína C reativa sérica (PCR), procalcitonina (PCT), e IL-6 os mais utilizados, mas a sensibilidade ou especificidade não é alta o suficiente para melhorar a eficácia da intervenção terapêutica nesta condição clínica (BOU CHEBL & EL KHURI, 2017; BLOOS & REINHART, 2014; SANKAR & WEBSTER, 2013).

No âmbito de um marcador biológico com alta especificidade e sensibilidade para a sepse, os microRNA surgem como candidatos potenciais. Sua capacidade de refletir os processos inflamatórios e disfuncionais no miocárdio oferece uma oportunidade única para o diagnóstico e prognóstico precoces da sepse. Através de uma revisão narrativa, Manetti e cols. descreveram 77 miRNAs envolvidos na inflamação do miocárdio em quadro de sepse. Há um consenso de que os miRNAs tem surgido como candidatos promissores como biomarcadores, por desempenharem um papel relevante na disfunção cardíaca induzida por sepse precoce. Sendo assim, estudos adicionais são necessários para investigar o potencial dos miRNAs como ferramentas de alta sensibilidade e especificidade para o diagnóstico e prognóstico precoces da sepse, prevenindo a disfunção cardíaca em estágios iniciais, permitindo uma intervenção terapêutica oportuna e direcionada do

tratamento, auxiliando na monitorização do progresso clínico dos pacientes (MANETTI et al, 2021).

Contudo, percebe-se neste cenário, que a sepse ainda representa uma condição complexa, com progressão rápida e prognóstico desfavorável. Diversas pesquisas evidenciaram que a inflamação dos vasos e do miocárdio, em conjunto com a ativação persistente de sinais inflamatórios constituem os elos iniciais da disfunção cardíaca na sepse, mas os mecanismos moleculares não foram elucidados. Portanto, o estudo de elementos moleculares envolvidos na modulação da transdução do sinal inflamatório na lesão miocárdica durante a sepse é de grande valia para elucidar o mecanismo molecular subjacente a esta doença (SHANG et al., 2019).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Aspectos gerais

A sepse é uma síndrome de anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas, caracterizada por ser uma doença altamente heterogênea tanto em sua causa quanto em sua progressão (NEDEVA & MENASSA, 2019).

Estima-se que em média 25 milhões de pacientes são acometidos pela sepse mundialmente. Essa condição clínica é considerada uma das patologias menos conhecidas, apesar de dados apontarem como causa de morte em aproximadamente mil pessoas por hora, a cada dia, acometendo em torno de 24 mil pessoas, e anualmente sendo responsável pela perda de mais de 8 milhões de vidas. Dados coletados nos EUA desde os anos 2000, estimam entre 751.000 e 3.610.630 o número de novos casos de sepse por ano, com incidência de morte variando entre 15% e 30% (ANGUS et al. 2001; GAIESKI et al. 2013).

No Brasil, a sepse é indicada como a segunda causa de mortalidade em UTI, sua incidência anual é de cerca de 200 mil casos, com mortalidade variando entre 35 e 65%, dependendo da gravidade do caso (BARROS et al., 2016; REINHART et al., 2013).

A etiologia complexa desta síndrome pode ser atribuída a infecções adquiridas na comunidade e relacionadas à assistência à saúde na maioria dos casos com bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*), Bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella espécies*, *Pseudomonas aeruginosa*) ou fungos (*Candida spp*). Pneumonia, infecções intra-

abdominais e do trato urinário, também são consideradas algumas das causas mais comuns de sepse (GIZA et al., 2016).

Independentemente da sua etiologia, o quadro clínico da sepse é grave e potencialmente fatal causada pela resposta desequilibrada do organismo à infecção. Na realidade, o processo envolve diversas respostas compensatórias à infecção, por vezes desbalanceadas, que incluem a ativação de resposta anti-inflamatória e da cascata de coagulação, ambas com consequências sistêmicas. A sepse pode levar desde a incapacidade física, até mesmo, à morte. Uma característica marcante desta disfunção é ser sistêmica e interdependente, ou seja, a falência de um órgão leva a disfunção ou falência de outro órgão (SINGER et al, 2016; ABRAHAM & SINGER, 2007).

2.2. Fisiopatologia da sepse

Estudos a respeito da fisiopatologia da sepse comprovam que a cascata fisiopatológica tem início quando o sistema imune do hospedeiro entra em contato com o patógeno invasor, resultando na ativação da resposta imune e, conseqüentemente, na geração e liberação de mediadores pró-inflamatórios e moléculas sinalizadoras que podem gerar uma resposta compensatória para a recuperação da homeostasia ou de caráter patológico para o hospedeiro, acompanhada de manifestações sistêmicas que, em algumas circunstâncias, pode pôr em risco a vida do indivíduo (EHRMAN et al ; 2018 ; CONWAY-MORRIS et al, 2018).

A eficácia da resposta imune em controlar o foco infeccioso desempenha um papel crucial na progressão da sepse. O controle da infecção por microrganismos é mediado pela imunidade inata e adaptativa, onde a resposta imune consiste em mecanismos celulares e bioquímicos que são rapidamente acionados durante a infecção (NDUKA et al., 2009).

Infecção, trauma, isquemia e lesões graves são fatores contribuintes para a patogênese da sepse grave, caracterizada por uma intensa produção de citocinas pró-inflamatórias, entre estas o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL)-1 β , IL-6 e IL-8. Estas citocinas desencadeiam uma resposta inflamatória satisfatória promovendo a coagulação local para limitar o dano tecidual. No entanto, a produção excessiva de mediadores pró-inflamatórios pode ser extremamente perigosa, ultrapassando a regulação normal da resposta imune desencadeando distúrbios

inflamatórios patológicos (ULLOA & TRACEY, 2005; DE JONG, VAN DER POLL & WIERSINGA, 2010). A evolução da resposta pró-inflamatória desencadeada pela infecção é normalmente balanceada pela ação de citocinas anti-inflamatórias. No entanto, a resposta inflamatória que geralmente é eficaz à infecção, torna-se desregulada durante a sepse devido a respostas de citocinas consideravelmente desequilibradas, caracterizando a chamada fase hiperinflamatória (ADIB-CONQUY M, CAVAILLON JM, 2012).

Esta fase hiperinflamatória da resposta imune marcada pela produção desregulada de citocinas pró-inflamatórias pode resultar na imunoparalisia, caracterizada por uma redução na capacidade do sistema imunológico de responder efetivamente às infecções subsequentes, aumentando o risco de complicações sistêmicas e morte. Durante esta fase, ocorrem alterações nos leucócitos e outras células do sistema imune, redução na produção de citocinas, diminuição da função fagocítica dos neutrófilos e monócitos, além da supressão da resposta imune adaptativa. Este estado de supressão ou disfunção do sistema imunológico pode ocorrer em pacientes com sepse grave ou prolongada. Esta fase é também conhecida pela síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória, na qual ocorre a produção de IL-4, IL-10, IL-13, fator transformador de crescimento β (TGF- β), fator estimulante de colônias de granulócitos e fator estimulante de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), bem como dos receptores solúveis de TNF- α e antagonistas dos receptores de IL-1 β (GIZA DE et al., 2016)

No início da resposta imune ocorre a ativação dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *Pattern Recognition Receptor*), como por exemplo os receptores semelhantes a *Toll* (TLR, do inglês *Toll Like Receptors*). Esses receptores são essenciais para ativar as defesas imunológicas do hospedeiro contra a ação dos organismos patogênicos, além de mediar o reconhecimento das moléculas altamente conservadas chamadas Padrão Moleculares Associado ao Patógeno (PAMP, do inglês *Pathogen-associated Molecular Pattern*). Também ganham destaque como receptores na indicação de risco endógeno, reconhecendo moléculas identificadas com Padrão Molecular Associado ao Dano (DAMP, do inglês *Damage Associated Molecular Patterns*) (BIANCHI ME, 2007).

No estágio inicial do processo inflamatório na sepse, prevalece a resposta imune inata mediada principalmente pelos TLR, com destaque para TLR-2 e TLR-4 que em conjunto com a molécula CD14 presente na superfície dos macrófagos

reconhecem os PAMPs. Geralmente, os peptídeos glicanos de bactérias gram-positivas são reconhecidos por receptores TLR-2, enquanto lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias gram-negativas são reconhecidos por TLR-4. Essa interação resulta na síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios por meio da ativação do fator de transcrição nuclear NF- κ B em células do sistema imune, como os neutrófilos. A sequência de eventos intracelulares decorrentes ativação destes receptores TLR-2 e TLR-4, culmina na translocação do fator de transcrição nuclear NF- κ B, promove a expressão de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-6, IL-8, de moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86 e, também, de citocina anti-inflamatória, como a IL-10. Cabe destacar que a liberação destas citocinas pró-inflamatórias e interleucinas medeia esta fase inicial através, também, da facilitação à migração e à adesão entre os neutrófilos e as células endoteliais, da ativação do sistema complemento e da cascata de coagulação, podendo levar à geração de microtrombos (BOSMANN & WARD, 2013; PAKRISHNA et al., 2011). Além disso, o TNF- α , IL-1 β podem também levar à ativação das caspases. Estas pertencem a uma família de enzimas proteolíticas heterogêneas que desempenham um papel crucial na regulação da apoptose, além de estarem envolvidas na resposta inflamatória, exacerbando a produção de citocinas pró-inflamatórias. Os transtornos como o estresse celular, a disfunção mitocondrial e o dano oxidativo observado na sepse também podem contribuir para ativação dessas enzimas proteolíticas, resultando em um quadro de apoptose elevado, contribuindo para a disfunção de múltiplos órgãos (FONT et al., 2020; KRISHNA et al., 2011; LEWIS et al., 2012).

A IL-6 desempenha um papel significativo na resposta inflamatória sistêmica, sendo considerado um marcador importante deste cenário inflamatório. Em casos de infecção, a concentração sérica da IL-6 aumenta rapidamente, caracterizando-a como uma citocina de alerta para a presença da infecção. Ao contrário da TNF- α , os níveis séricos de IL-6 estão significativamente elevados na maioria dos pacientes sépticos e são sustentados por tempo maior, refletindo a intensidade da resposta inflamatória (LOISA et al, 2003).

A IL-10 desempenha um papel crucial como a principal citocina contra-reguladora da resposta imune inata. Sua ação é de mediador anti-inflamatório, inibindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Elevadas concentrações de IL-10 reduzem expressivamente a produção de TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 pelos monócitos.

Por outro lado, a supressão de IL-10 resulta em aumento dos níveis séricos circulantes de TNF- α e IL-6 (CUNNEEN J, CARTWRIGHT M, 2004)

Outra citocina que merece atenção é a IL-17, produzida por células T CD4+ que se diferenciam das linhagens clássicas Th1 e Th2. Essa citocina tem sido reconhecida como um potente indutor da autoimunidade, devido à sua capacidade de promover a inflamação tecidual e mobilizar o sistema imune inato. Contudo, em alguns tecidos essa citocina pode desempenhar um papel protetor, estando envolvida em doenças infecciosas (MIOSSEC & KOLLS JK, 2012; RITZMANN et al., 2022).

Além destes eventos, a disfunção dos linfócitos circulantes durante a sepse caracteriza-se por linfopenia significativa e diminuição dos linfócitos CD4+, células T CD8+, células natural killer (NK) e células B, agravando o quadro clínico do paciente (GIZA DE et al., 2016).

2.3. Disfunção cardíaca decorrente da sepse

A principal disfunção cardíaca associada à sepse e/ou ao choque séptico é a cardiomiopatia séptica (CS). A incidência da CS em pacientes com sepse ou choque séptico apresenta inconsistência, com variações de 13,8 à 40% devido à escassez de estudos abrangentes e critérios diagnósticos uniformes. Em pacientes com sepse combinada com CS, a mortalidade aumenta 2 a 3 vezes, alcançando índices de até 70 a 90% (EHRMAN et al., 2018; FAN & ZHANG, 2018). Estudos epidemiológicos mostraram que homens em idade mais jovem, com nível de lactato mais alto, bem como nível de ácido láctico (> 4,0 mmol/L), e história prévia de insuficiência cardíaca ou doença cardíaca coronária, quando admitidos na UTI estão associados ao elevado risco de evoluir para CS (SATO et al., 2016).

Em 1990, Parrillo e cols definiram a CS como uma condição cardíaca caracterizada por disfunção severa do miocárdio decorrente de complicações advindas da sepse, associada a uma resposta inflamatória sistêmica exacerbada, na qual as citocinas inflamatórias podem afetar negativamente o músculo cardíaco, levando a alterações na função cardíaca (PARRILLO et al, 1990).

A cardiomiopatia séptica (CS) é constantemente diagnosticada quando existe alguma perturbação aguda na função cardíaca no contexto da sepse. No cenário atual, não existe uma definição formalizada ou consensual de CS, refletindo uma lacuna crítica de conhecimento. A complexidade do sistema cardiovascular, a

miríade de métodos de avaliação e as alterações no estado pré-séptico do coração dificultam a explicação de uma relação de causa e efeito entre a sepse e a CS (EHRMAN RR, SULLIVAN AN, et al; 2018)

O estado inflamatório acentuado é um dos principais fatores relacionado ao comprometimento do miocárdio, manifestando-se clinicamente de diversas formas, tais como disfunção sistólica ou diastólica do ventrículo esquerdo e/ou direito, redução do débito cardíaco (DC) e do aporte de oxigênio e, ainda, lesão primária do miocárdio. Sabe-se que a disfunção sistólica, medida pela fração de ejeção do ventrículo esquerdo (FEVE), está entre os primeiros parâmetros descritos para avaliar CS. A disfunção diastólica do ventrículo esquerdo também é observada em pacientes com sepse, notando-se que quanto mais acentuada é a disfunção diastólica, pior é a progressão da doença (BOISSIER & RAZAZI, 2017). Este quadro pode resultar em insuficiência cardíaca, hipotensão e outras complicações cardiovasculares graves (VIEILLARD-BARON, 2011; BEESLEY, 2018).

A insuficiência cardíaca provoca a redução da perfusão tecidual sanguínea, agravando o quadro de hipóxia na sepse. As consequências são o aumento do estresse oxidativo, a disfunção mitocondrial, a acidose láctica e o comprometimento do metabolismo tecidual, quadro altamente correlacionado à morte por choque séptico, expressão mais grave da sepse (BLANCO & MURIEL-BOMBÍN, 2008). Na fase inicial, o choque séptico pode ser considerado um choque hiperdinâmico ou choque quente, caracterizado por alto DC, baixa resistência vascular sistêmica (RVS) e extremidades quentes. Por outro lado, a fase tardia apresenta hipotensão seguida de choque hipodinâmico ou choque frio, com baixo DC, perfusão periférica inadequada, extremidades frias e, conseqüentemente, morte (KAKIHANA & ITO, 2016). Por outro lado, esta redução da RVS pode agravar o comprometimento cardiovascular, visto que a queda acentuada da pressão arterial decorrente da vasodilatação periférica intensa impede a perfusão tecidual adequada. Este estado sustentado de vasodilatação deve-se ao fato do músculo liso vascular, na sepse, não ser mais capaz de responder ao estímulo neuro-hormonal para induzir a contração. A intensa vasodilatação sistêmica arterial e venosa reduz o gradiente de pressão necessário para o retorno venoso e, conseqüentemente, diminui o DC (HAWIGER J, VEACH RA, ZIENKIEWICZ J, 2015.; BURGDORFF AM, BUCHER M, SCHUMANN J; 2018).

Observa-se que estas mudanças na pós-carga decorrentes da redução na RVS devido à vasodilatação severa influenciam a capacidade do coração em fornecer sangue aos tecidos periféricos. Desta forma, um coração com contratilidade intrínseca reduzida pode até aumentar o DC, gerando a impressão de função normal, quando verdadeiramente o desempenho sistólico está comprometido nestes pacientes com sepse (BOISSIER F, RAZAZI K, et al, 2017; FLIERL et al., 2008). Isto porque apesar de ser observado um DC elevado e um volume sistólico normal, a disfunção cardíaca é expressiva nos pacientes em choque séptico, aumentando o risco de morte. Foi descrito que a fração de ejeção (FE) é menor e que o volume diastólico final (VDF) é maior nos sobreviventes ao choque séptico, quando comparados com os não sobreviventes ao choque. Estes achados sugerem que a dilatação ventricular pode ser um mecanismo compensatório a fim de manter um DC adequado e prevenir a perda da função cardíaca (HOLLENBERG, S.M., SINGER, M 2021; KAKIHANA Y, ITO T,2016).

Na figura 1, estão apresentados de forma resumida os principais mecanismos envolvidos no comprometimento cardíaco decorrentes da sepse, conforme estudo de Ehrman e cols. (2018). Destaca-se neste esquema que a resposta inflamatória sistêmica da sepse, pode resultar em algumas alterações, tais como: disfunção endotelial, causada pela inflamação, pode levar a um aumento da permeabilidade vascular, edema e inflamação tecidual. Além disso, essa resposta inflamatória também pode levar a disfunção mitocondrial que, por sua vez, é causada pelo estresse oxidativo e pode resultar em uma diminuição da produção de ATP, que é necessário para a contração cardíaca. O estresse oxidativo que também está presente neste quadro clínico é causado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio, que podem danificar as células cardíacas. Uma outra consequência da inflamação é a disfunção de cálcio que ocorre devido a diminuição da liberação desse mineral essencial para a contração cardíaca. Além da disfunção de proteínas contráteis que pode levar a uma diminuição da contratilidade cardíaca.

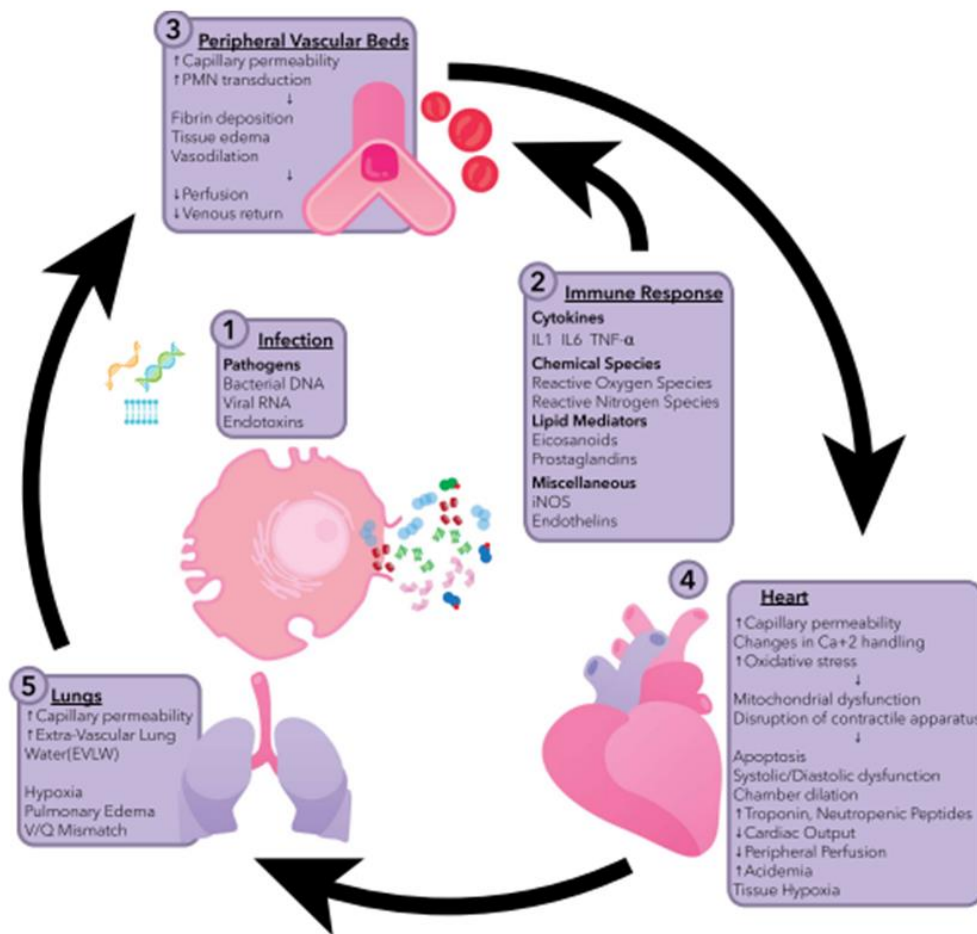


Figura 1 - Fisiopatologia da disfunção miocárdica séptica. (Ehrman RR, Sullivan AN, et al ; 2018)

Dentre os diversos fatores que desempenham um papel causal no desenvolvimento da cardiomiopatia séptica, a resposta inflamatória desregulada na sepse tem sido diretamente associada à disfunção dos cardiomiócitos. O TNF- α é primeiro mediador inflamatório a ser produzido em resposta a um estímulo infeccioso. A fim de se estabelecer uma resposta inflamatória eficaz é crucial controlar a duração e a quantidade de liberação de TNF- α . Se por um lado, a liberação em pequenas quantidades desta citocina desempenha um papel significativo na defesa do hospedeiro para restringir a disseminação de agentes patogênicos na corrente sanguínea, quando ocorre uma produção excessiva e prolongada liberação, o TNF- α torna-se prejudicial para o organismo, desregulando a resposta imune. Este desequilíbrio envolve a ativação de outros mediadores inflamatórios, promovendo lesão tecidual potencialmente letal. O aumento da expressão do TNF- α nas células cardíacas tem sido frequentemente evidenciado em estudos realizados com modelos animais de insuficiência cardíaca e em estudos

clínicos conduzidos em pacientes portadores de cardiomiopáticas. Além dos cardiomiócitos, diversos tipos celulares colaboram para o aumento da expressão de TNF- α no miocárdio durante a disfunção cardíaca, como macrófagos, células vasculares, e mastócitos (ULLOA & TRACEY, 2005; DICK & EPELMAN, 2019).

A IL-1 β também desencadeia a resposta inflamatória sistêmica em resposta ao insulto. Essa citocina promove o aumento a temperatura corporal e, por esse motivo, é nomeada pirógeno endógeno. Apresenta como importante função promover o aumento da expressão de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, mecanismo essencial para facilitar a adesão dos leucócitos e sua subsequente migração através do endotélio. No contexto do choque séptico, a IL-1 β exerce uma ação direta nos vasos sanguíneos, causando vasodilatação por meio da indução da produção rápida de fatores como o fator ativador de plaquetas, prostaglandinas e óxido nítrico (CUNNEEN &, CARTWRIGHT, 2004).

Além destes estudos que estabeleceram o papel destas citocinas no desenvolvimento de cardiomiopatia séptica, estudos recentes também revelaram uma associação temporal entre o aumento do estresse oxidativo dos cardiomiócitos e a CS. Foi observado, em modelos murinos de sepse, que a administração de agentes anti-oxidantes promoveu à reversão parcial da cardiomiopatia séptica. O uso do modelo animal, revelou que ao nível celular, as alterações decorrentes da sepse incluíram proteólise aumentada, dano mitocondrial, desregulação na produção do óxido nítrico, regulação negativa de β -adrenoceptores e comprometimento na mobilização do cálcio citosólico, ou seja, mecanismos implicados no desencadeamento da disfunção miocárdica durante a sepse que podem causar a deterioração da função cardíaca que define a septicemia (BEESLEY et al., 2018)

2.4. Biomarcadores

A definição de um biomarcador, acontece por meio de uma característica que é medida objetivamente como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica. Para ser considerado um bom biomarcador para sepse, este deve ser de fácil detecção e mensuração, prontamente disponível e barato, além de assegurar um diagnóstico altamente específico e sensível da sepse, avaliação da gravidade na ausência de sinais clínicos e controle para um bom monitoramento do curso da doença e resposta à terapia, facilitando o prognóstico (TAXA, 2011).

A realização de um diagnóstico precoce e preciso é importante, pois cada retardo na intervenção aumenta o índice de mortalidade. Entretanto, esse diagnóstico nem sempre é simples, principalmente em quadros de pacientes críticos para os quais as manifestações de sinais e sintomas clínicos nem sempre estão presentes e são de difícil compreensão (BAUER & REINHART, 2010).

É notório e indiscutível a necessidade de melhores técnicas para diagnosticar a sepse, estratificar os riscos dos pacientes e acompanhar a eficácia terapêutica da sepse. Nesse cenário, o uso de biomarcadores tem sido sugerido como um meio de alcançar esses objetivos, auxiliando no diagnóstico precoce e, conseqüentemente, na antecipação da intervenção terapêutica apropriada em pacientes com sepse em unidades de terapia intensiva. Tendo em vista também que esses biomarcadores podem, em conjunto com outras técnicas, ser úteis para o prognóstico (VINCENT, DONADELLO & SCHMIT, 2011).

Vários marcadores plasmáticos têm sido propostos como sendo capazes de prever um processo infeccioso, mas até o momento não apresentam alta sensibilidade ou especificidade. Esses marcadores incluem a Troponina, a Proteína C Reativa (PCR) e a procalcitonina (PCT).

2.4.1. Troponina

A troponina plasmática está correlacionada com a mortalidade na sepse. Os níveis circulantes de troponina são marcadores bem estabelecidos de lesão miocárdica. A presença de níveis elevados de troponina I e troponina T existentes no plasma são observados na sepse e se correlacionam com a presença de disfunção sistólica do VE e lesão miocárdica na sepse. Entretanto, essa correlação normalmente desaparece quando a gravidade da doença é considerada (MAEDER M, 2006).

O mecanismo de liberação de troponina na sepse permanece obscuro, mas parece ser causado pelo extravasamento de líquido intracelular dos cardiomiócitos devido à inflamação e não necessariamente pela morte celular. Dessa maneira, a crescente elevação dos níveis plasmáticos de troponina parece ser um biomarcador da gravidade da doença. Entretanto, a utilidade de mensurar os valores de troponina plasmática em pacientes críticos é uma prática limitada devido à falta de especificidade e à presença de comorbidades, como insuficiência renal, que podem aumentar os níveis de troponina plasmática independentemente de fatores miocárdicos (OSTERMANN et al., 2017).

2.4.2. Proteína C-reativa

A proteína C-reativa (PCR) é uma proteína de fase aguda liberada do fígado após estimulação por citocinas, principalmente o IL-6. Na presença de infecção, a PCR tem efeitos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, pois realiza a mediação e a eliminação de patógenos, mas também inibe a interação entre células endoteliais e leucócitos. A secreção dessa proteína é iniciada 4 a 6 h após a estimulação e atinge o pico em 36 h. A PCR é um biomarcador frequentemente utilizado para o diagnóstico de infecção (MARTINI et al, 2018).

O aumento nos níveis de PCR depende de fatores como a intensidade do estímulo e da capacidade da síntese hepática, onde a magnitude da sua elevação tem ligação direta com o risco de desenvolver disfunção multiorgânica. Após eliminação do estímulo, a proteína tende a cair rapidamente, podendo permanecer persistentemente elevada se a causa-base não for revertida. O manuseio da PCR para diagnosticar diferentes tipos de infecções (bacteriana, viral ou fúngica) ainda não está totalmente claro. Entretanto, os níveis séricos do marcador, geralmente, são mais elevados em infecção bacteriana (POVOA P ET AL., 2005; LOBO SM ET AL., 2003).

Desse modo, o valor absoluto do nível sérico da PCR não é útil, pois, em alguns pacientes, com destaque para os idosos e os pacientes críticos em que outras causas de inflamação estão presentes, nesse cenário os seus valores podem estar elevados sem indicar presença de processo infeccioso. Por isso a PCR é um marcador de processos inflamatórios e não pode, por si só, ser preditiva de um processo infeccioso na sepse. Nestes pacientes, dosagens seriadas demonstrando elevação ao longo do tempo parecem ser mais úteis do que um único valor mensurado. Como a PCR não é um marcador específico de infecção, apresenta-se aumentado, também, em situações inflamatórias crônicas, tais como artrite reumatoide, espondilite anquilosante, febre reumática, pós-operatório de grandes cirurgias, doença de Crohn, neoplasias e infarto agudo do miocárdio. Na prática clínica, vem sendo utilizada para controle do tratamento e monitorização dos períodos de exacerbação destas doenças (SIERRA R et al., 2004; PIERRAKOS CH et al., 2010)

Descrita como um dos biomarcadores propostos para uso em pacientes com sepse, a PCR tem sido amplamente estudada. Entre os seus achados, as principais vantagens dos níveis séricos de PCR como biomarcador são a disponibilidade,

facilidade de uso e baixo custo dos ensaios. As principais desvantagens são que a PCR não é específica para sepse e que seus níveis podem estar aumentados em outras condições inflamatórias (VINCENT JL, DONADELLO K, SCHMIT X, 2011). A PCR necessita de especificidade, pois as concentrações podem estar aumentadas em outros distúrbios inflamatórios e infecciosos.

2.4.3. Procalcitonina (PCT)

A procalcitonina é o precursor da calcitonina que é normalmente produzida nas células C (parafoliculares) neuroendócrinas da glândula tiróide. Em indivíduos saudáveis, os níveis de procalcitonina são de 0,1 ng/ml. Esses níveis começam a subir 4 h após o início da infecção sistêmica e alcançam o pico entre 8 e 24h. Os níveis podem apresentar elevação em quadros de insuficiência renal na ausência de infecção. Os níveis de PCT estão elevados na sepse (TANG et al., 2007 ; KIIBE, ADAMS & BARLOW, 2011).

A PCT modula a resposta imune durante a infecção e a inflamação, exercendo funções quimiotáticas e regulando a liberação e produção da óxido nítrico sintetase, citocinas e de substâncias vasoativas. As endotoxinas ou mediadores inflamatórios liberados durante as infecções estimulam a secreção deste biomarcador (PIERRAKOS CH, VINCENT JL., 2010)

Apesar da relevância da PCT em processos infecciosos, sua aplicação como biomarcador da sepse apresenta uma série de limitações (ADIB-COUNQUY & MONCHI, 2007). Isto se deve à elevação dos níveis circulantes em condições não infecciosas tais como trauma mecânico grave, cirurgia ou após parada cardíaca (BLOOS et al., 2014; SPONHOLZ & SAKR, 2006).

2.4.4. IL - 6

A IL-6 desempenha relevante papel na síntese e secreção de proteínas de fase aguda da inflamação. Seus níveis plasmáticos estão extremamente bem correlacionados com a gravidade e o prognóstico da doença (SONG M, KELLUM JA 2005).

O TNF- α e a IL-1 β produzidos por células imunes ativadas, como por exemplo macrófagos e células dendríticas, em resposta a estímulos inflamatórios estimulam a secreção de IL-6 por várias células, incluindo macrófagos, células T e células B, amplificando a resposta inflamatória. A IL6 atinge níveis máximos dentro de 2 h após o estímulo infeccioso, persistindo por por tempo mais prolongado na

corrente sanguínea do que TNF e IL-1 β . Os níveis séricos de IL-6 estão diretamente relacionados com a gravidade e o desfecho da sepse nos pacientes, observando-se uma correlação entre os níveis circulantes desta interleucina, a falência de órgãos e o aumento da taxa de mortalidade em pacientes sépticos (SONG & KELLUM, 2005). Os níveis séricos de IL-6 apresentam-se diminuídos em pacientes onde a infecção é controlada, sendo preditivo de sobrevida. No entanto, assim como para outros biomarcadores de sepse, vários estímulos não infecciosos também podem induzir a liberação de IL-6, como cirurgias de grande porte ou alta complexidade, assim como em situações de traumas severos, agudizações de doenças autoimunes e rejeição do transplante. Embora a IL-6 desempenhe um papel importante na fisiopatologia da sepse, o papel desta citocina como biomarcador de sepse ainda não foi estabelecido (MIGUEL-BAYARRI et al., 2012; PEREZ-VILLA et al., 2006; TSCHAIKOWSKY et al., 2011).

2.4.5. MicroRNA

2.4.5.1. Conceito e nomenclatura

Os MiRNA são pequenos RNAs endógenos e não codificantes constituídos por 22 a 26 nucleotídeos que se ligam a regiões do mRNA por complementariedade de bases para silenciá-lo. Diversos miRNA possuem especificidade tecidual, capacidade de regulação pós-transcricionais e de modulação de processos celulares como proliferação celular, metabolismo, apoptose, desenvolvimento de órgãos e inflamação (MOHR; MOTT, 2015). Os miRNA identificados por análises de predição ou experimentalmente são depositados no banco de dados de microRNA denominado miRNAbase, com mais de 2500 miRNA maduros anotados e mais de 4000 termos de GO associados (HUNTLEY et al., 2018).

A sigla miR refere-se ao microRNA maduro, enquanto mir refere ao gene que codifica o pri-miRNA predito. O número faz referência à ordem de descoberta de cada microRNA. Os miRNA semelhantes que apresentam diferenças em apenas 1 ou 2 nucleotídeos são nomeados pelo mesmo número e recebem um sufixo alfabético (ex: miR-21a, miR-21b) enquanto miRNA idênticos que são gerados a partir de pre-miRNA que diferem em algumas bases ou gene loci diferente recebem um algarismo (ex: miR-24-1 e miR-24-2). As três primeiras letras são referentes ao organismo de origem daquele miRNA (ex: hsa pra Homo sapiens, mmu para Mus musculus...). Quando dois miRNA são identificados do mesmo precursor, utiliza-se

um asterisco para identificar a fita de miRNA oposta ao precursor. Caso ainda não existam dados suficientes para determinar os predominantes, estes são identificados pela indicação da fita de origem do miRNA maduro (3p ou 5p), a exemplo: hsa-miR-106b-5p (GRIFFITHS-JONES, 2006)

2.4.5.2. Biogênese do microRNA

Os miRNAs são transcritos pela RNA polimerase II (mais raramente pela RNA polimerase III), no núcleo celular na forma de transcritos primário com cerca de 100-1000 nucleotídeos denominados de miRNA primário (pri-miRNA) (POGRIBNY, 2018). Estes pri-miRNA possuem formato de grampo devido a regiões complementares que se auto pareiam e regiões não complementares que formam a alça do grampo (BHASKARAN & MOHAN, 2014). Os pri-miRNA são então clivados por um complexo proteico conhecido como microprocessador, que contém duas proteínas conhecidas, a Drosha e DGCR8 ou também conhecida como Pasha (BHASKARAN & MOHAN, 2014). Drosha e Pasha clivam as regiões de fita simples de RNA do pri-miRNA formando o miRNA precursor ou pré-miRNA (HÁ & KIM, 2014). O pré-miRNA é então exportado ao citoplasma através da proteína Exportin 5, onde então será reconhecido e novamente clivado pela proteína Dicer, dessa vez gerando dois miRNA de fita simples, miRNA-5p e miRNA-3p conforme representado na figura 5 (AMARAL et al., 2010). Na grande maioria dos casos, a fita 5p, também conhecida como guia, entra para um complexo proteico de silenciamento induzido por RNA (RISC), onde liga-se a proteína Argonata para formar paridade com os mRNA que levará a destruição ou inibição do RNA mensageiro (HÁ & KIM, 2014), no entanto, o silenciamento do gene através do complexo RISC pode ser guiado, em alguns casos, pela fita 3p do miRNA (BHASKARAN & MOHAN, 2014).

Estima-se que os genes miRNA representam menos de 1% do genoma humano, mas podem regular até 60% de todos os genes codificadores de proteínas. Os miRNAs inibem a expressão de seus genes-alvo por pareamento de bases com o 3' UTR de seu mRNA. Assim, um único miRNA pode afetar a transcrição de centenas de mRNAs. Desta forma, sugere-se que os miRNAs façam parte de redes regulatórias complexas na expressão gênica durante estados fisiológicos e fisiopatológicos. A expressão exacerbada de miRNA foi descrita em processos altamente regulados, como desenvolvimento, envelhecimento e morte celular, mas

também no início de doenças complexas, como infecção, inflamação e sepse (HA & KIM, 2014 ; FRIEDMAN et al., 2009 ; KROL, LOEDIGE, & FILIPOWICZ, 2010).

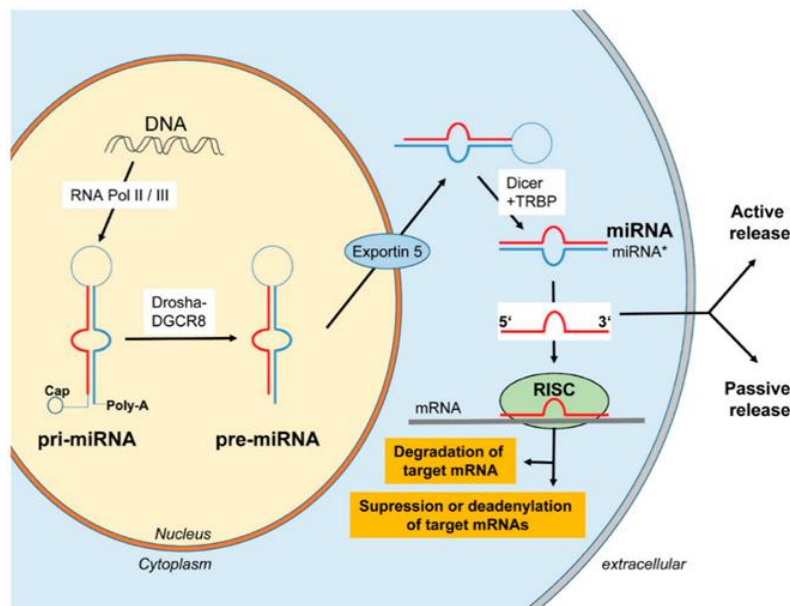


Figura 2: Biogênese de miRNA. O Pri-miRNA é transcrito através de região intrônica de gene ou gene próprio. O complexo Drosha/DGCR8 cliva as extremidades 5' e 3' não pareadas formando o Pré-miRNA. Pré-miRNA é exportado para o citoplasma para o complexo enzimático contendo a Dicer, que retira a região da alça do miRNA formando dois miRNA de fita simples. O guia e o passageiro. FONTE: (BENZ et al., 2016)

2.4.5.3. MicroRNA como biomarcador

O interesse na modulação exercida pelos miRNAs sobre as inúmeras vias de sinalização intracelular cresce exponencialmente, em particular no que tange ao seu papel na fisiopatologia das doenças. A exemplo cita-se a sepse, durante a qual foram detectadas alterações na expressão de microRNA em pacientes sépticos de diferente etiologia, evidenciando a importância destes como biomarcadores no diagnóstico e prognóstico desta síndrome (LI, HUO & Fan., 2016; DEIULIIS, 2016; LIU & ABRAHAM, 2013).

Os miRNAs estão envolvidos na imunidade inata e adaptativa em distúrbios inflamatórios como artrite reumatoide, diabetes mellitus e infecção bacteriana. Foi sugerido que vários miRNAs têm como alvo direto receptores e mediadores de ativação de importantes vias de sinalização intracelular de processos pró-inflamatórios na sepse que são expressos ou secretados por macrófagos, células dendríticas e células apresentadoras de antígenos. Entre estes alvos pode-se citar

os receptores *toll-like* (TLR), os receptores de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), ou de reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), o fator de transcrição nuclear NF- κ B, o TNF- α (CHAN et al., 2012; TAKEUCHI; AKIRA, 2010; O'CONNELL et al., 2012)

O receptor TLR4 é ativado pelo lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e apontado como um dos receptores mais relevante para o disparo da resposta imune inata na sepse. Nas células do sistema imune ativadas nesta etapa da doença, através da sinalização do TLR4, ocorre a modulação de diversos miRNAs que regulam a expressão de diferentes mRNA codificantes de componentes do sistema de sinalização dos TLR. O miR-23b pode ser citado como exemplo de miRNA que desempenha função importante na progressão da sepse, inibindo a expressão de NF- κ B, TNF- α , IL-6, ICAM-1, E-selectina e VCAM-1, que, por sua vez, tem sua própria expressão gênica regulada por esses fatores. (AVLAS et al., 2011)

Apesar de nos últimos anos, a proposta dos miRNAs como biomarcadores da sepse ter sido mais bem embasada, várias lacunas precisam ser preenchidas para sua aplicação rotina clínica como ferramenta de diagnóstico e prognóstico seja efetivada. Uma das grandes dificuldades tem origem nas variações marcantes entre os resultados referente aos padrões de regulação do miRNA nas diferentes coortes de pacientes com sepse, provavelmente devido à falta de padronização de coleta de amostras, normalização de dados e análise empregada (BENZ et al., 2016). Portanto, mais estudos metodologicamente semelhantes e avaliando as mesmas populações devem ser conduzidos no intuito de estabelecer perfis consistentes de miRNA para os diferentes estudos de casos.

Pelo exposto anteriormente, sugere-se que os microRNA desempenham um papel importante na homeostase cardiovascular, estando envolvidos em diversos processos fisiológicos e patológicos, como na CS. O perfil alterado de expressão dos miRNAs durante a sepse está associado à disfunção cardíaca, podendo influenciar negativamente o desempenho cardíaco. Esta alteração no perfil de expressão pode estar relacionada à resposta inflamatória desregulada, ao estresse oxidativo, à apoptose e à disfunção mitocondrial, eventos marcantes na evolução da sepse.

Adicionalmente, de forma favorável, os miRNAs têm a vantagem de serem detectáveis em amostras biológicas facilmente acessíveis, como o sangue, tornando sua mensuração e análise bastante viáveis. A detecção e quantificação dos miRNAs

circulantes podem fornecer informações valiosas sobre o diagnóstico e prognóstico da disfunção cardíaca, estratificando por grau de gravidade os pacientes com sepse e definindo a conduta terapêutica (O'CONNELL et al., 2012).

3. HIPÓTESE

A análise de miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com sepse representa uma ferramenta de diagnóstico precoce da disfunção cardíaca e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas eficazes, permitindo um melhor desfecho clínico com menor mortalidade

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Estudar o perfil de expressão dos miRNA e sua correlação com as vias intracelulares envolvidas no remodelamento do miocárdio associado à disfunção cardíaca decorrente da sepse.

4.2. Objetivos Específicos

- Identificar o perfil de expressão de microRNAs em conjunto de dados públicos de pacientes com disfunção cardíaca decorrente de sepse.
- Identificar as vias de sinalização intracelulares associadas ao remodelamento do miocárdio devido à disfunção cardíaca decorrente da sepse.
- Identificar genes-alvos de microRNAs implicados nas vias de sinalização associadas ao remodelamento do miocárdio.
- Correlacionar os microRNAs diferencialmente expressos com os genes moduladores nas vias intracelulares associadas ao remodelamento do miocárdio devido à disfunção cardíaca decorrente da sepse.

5. METODOLOGIA E ESTRATÉGIA DE AÇÃO

5.1. Análise de dados em repositórios públicos

As amostras de sequenciamento foram obtidas dos repositórios público do *NCBI* (www.ncbi.nlm.nih.gov/geodatasets/), Gene Expression Omnibus (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) e European Nucleotide Archives (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>). Os termos de busca utilizados na pesquisa foram: *Sepse, Heart Failure, Cardiac Dysfunction, Human, microRNA*. A partir desta pesquisa, foram selecionados os conjuntos de dados de sequenciamento, obtidos de um estudo com camundongos realizado no hospital Chao-Yang, Pequim.

O perfil de expressão por sequenciamento de alto rendimento do conjunto de dados GSE171546, foi baixado do banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO), com base no conjunto de transcritos GPL24247 cujo sequenciamento foi obtido pelo Illumina NovaSeq 6000 (*Mus musculus*), que continha 20 amostras divididas em 4 grupos. Um grupo controle com n= 5, e três subgrupos com lesão miocárdica induzida por sepse no período de 24h com n= 5, 48h com n= 5 e 72h com n= 5, conforme ilustrado na figura 3.

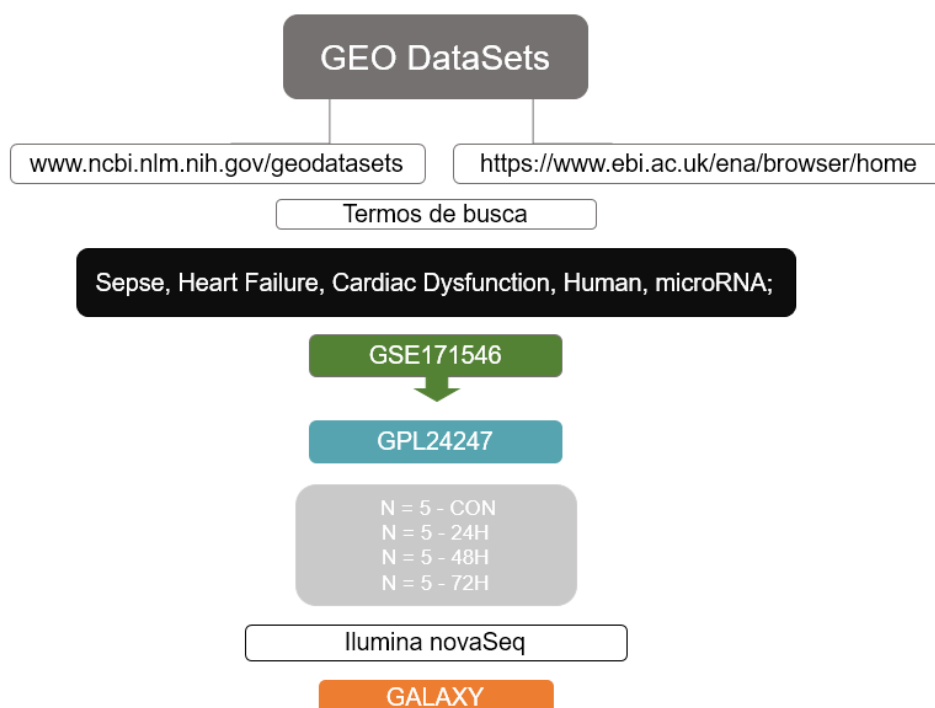


Figura 3: Fluxograma de seleção do transcriptoma.

O estudo referente ao conjunto de dados GSE171546 consiste na análise transcriptômica de séries temporais da lesão miocárdica induzida por sepse em camundongos, tendo como objetivo a elucidação da patogênese molecular da cardiomiopatia séptica em camundongos C57BL/6 e identificar genes e vias que podem ser potenciais alvos terapêuticos para o tratamento da cardiomiopatia séptica. Esta avaliação foi realizada a partir de perfis de mRNA cardíaco de camundongos C57BL/6 utilizados como modelo de sepse por ligadura e punção cecal (CLP), nos momentos 24, 48 e 72 horas.

O “Arquivo de Leitura das Sequências” (SRA, do inglês *Sequence Read Archive*) foi então enviado para a plataforma Galaxy (usegalaxy.org) através da importação dos dados utilizando a plataforma *Run Selector*. A partir desta importação e já com o sequenciamento das 20 amostras, foi avaliada a qualidade da sequência com ferramentas que fazem parte do pacote de programas disponíveis a plataforma Galaxy.

A primeira ferramenta utilizada foi o *FASTQC* com o intuito de fornecer um controle de qualidade nos dados brutos de sequência provenientes de pipelines de sequenciamento de alto rendimento. A partir desta avaliação, foi possível obter uma impressão rápida dos dados e detectar algum problema no sequenciamento antes de dar início as demais etapas da análise *in silico*. Após o processamento das 20 amostras, o relatório de qualidade da sequência não apresentou nenhum problema. Em seguida foi utilizada a ferramenta *TRIMMOMATIC* a fim de realizar cortes nos dados de extremidade dupla e única do Illumina, eliminando as leituras ruins e desnecessárias. Resumidamente, essas duas ferramentas foram utilizadas com o único objetivo de avaliar e manter a qualidade da sequência.

Após finalizar a etapa de análise de qualidade dos dados, o alinhamento do genoma foi realizado com a ferramenta *HISAT2*, também disponível na plataforma Galaxy. O *HISAT2* fornece várias estratégias de alinhamento projetadas especificamente para mapear diferentes tipos de leituras de RNA-seq que foi feito com o sequenciamento. Em seguida, o *FEATURECOUNTS* foi utilizado para contar essas leituras de gDNA-seq e RNA-seq para as características genômicas

O passo seguinte foi feito com o auxílio da ferramenta *DESeq2*, onde as amostras de sequenciamento foram separadas em dois fatores, para posterior processamento: fator 1 – Grupo com disfunção cardíaca x fator 2 – Grupo controle a fim de comparar os genes inibidos e os genes induzidos. Desta maneira, foi

realizado o processamento dos fatores de cada amostra referente aos períodos de 24h x 48h x 72h. Por meio deste processamento no *DESeq2*, foram identificados os RNA diferencialmente expressos, os ID dos genes, o log₂ (FC), o erro padrão e o valor de *p*.

5.2. Identificação de genes diferencialmente expressos (GDE)

A conversão dos dados brutos obtidos no *DESeq* foi feita através da ferramenta Biomart disponível no *ENSEMBL* (<https://www.ensembl.org>), por meio de um arquivo txt contendo a lista de ID dos genes. Após a conversão dos dados dos três grupos (24h, 48h, 72h), foram considerados genes diferencialmente expressos (GDE) apenas os que possuíam um valor de *p* <0,05 e cuja expressão apresentou Fold Change (FC) menor que -2,0 ou maior que +2,0.

5.3. Análise de enriquecimento de vias e ontologia de genes

As análises de enriquecimento de vias e ontologia de genes foram feitas com a ferramenta *online WEBGESTALT* (WEB-based Gene Set Analysis Toolket - <http://webgestalt.org/option.php>) que permite as análises de enriquecimento a partir de comparações entre dados de interesse com banco de dados, como por exemplo, *GO* (Gene Ontology) e *KEGG* (ZHANG et al. 2005; WANG et al. 2013). Desta forma, foram obtidos os genes que envolvidos nos diferentes termos da Ontologia Genética, conforme previsto pela Análise de Enriquecimento de Conjunto de Genes (GSEA), apontando o número de genes envolvidos nos diferentes processos biológicos, componentes celulares e funções moleculares.

Com o uso da ferramenta Diagrama de Venn, foi possível calcular as interseções da lista de elementos dos três grupos do estudo. O programa gerou uma saída textual indicando quais elementos estavam em cada interseção ou eram exclusivos de uma determinada lista. Ao final, obteve-se uma saída gráfica na forma de um diagrama de Venn/Euler.

5.4. Identificação de microRNAs Alta Confiança (High Confidence)

Os miRNA diferencialmente expressos (MDE) foram classificados utilizando-se a versão do miRBase 22, onde estão catalogados miRNA precursores e maduros do genoma humano. Este banco de dados é utilizado para pesquisa de sequências e anotações de miRNA publicados. Foram utilizados como parâmetros os miRNA classificados nesta ferramenta como de alta confiança, segundo critérios de

mapeamento das *reads* e dados de sequenciamento. Os miRNA *High Confidence* são aqueles que já foram previamente identificados e validados por outros trabalhos científicos.

5.5. Análise dos genes alvos

Após identificação dos MDE *High Confidence*, foi utilizada a ferramenta de análise miRWalk 3.0 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>) para verificar os mRNA alvos dos MDE.

5.6. Construção da rede de interação - *STRING* e *CYTOSCAPE*

A rede de interação proteína – proteína foi construída na plataforma *STRING* (<https://string-db.org>). Nesta, os *clusters* de genes obtidos por meio desta interação, representa as vias e processos que são compartilhados entre os genes diferencialmente expressos. A partir destas informações, foi construída uma rede de interações entre GDE e MDE através do programa *CYTOSCAPE* v.3.7.2. A rede apresenta os miRNA como atributo e os mRNA modulados por seus respectivos miRNA como alvos. Os miRNA e mRNA são representados pelos nodos, enquanto as linhas indicam as interações existentes entre eles.

Para obtenção dos dados referentes aos microRNA diferencialmente expressos, os miRNA foram filtrados dentro dos RNA diferencialmente expressos do transcriptoma. Foram considerados diferencialmente expressos apenas os miRNA (MDE) que possuíam um valor de $p < 0,05$ e cuja expressão apresentar Fold Change (FC) menor que -2,0 ou maior que +2,0. Dados clínicos referentes às amostras encontradas na plataforma utilizada na análise foram usados para correlacionar os resultados das análises de expressão com o grau de severidade da doença.

6. RESULTADOS

Após as etapas realizadas no *GALAXY*, com o auxílio das ferramentas *FASTQC*, *TRIMMOMATIC*, *HISAT2*, *DESeq* e *FEATURECOUNTS*, houve a conversão desses dados brutos utilizando o Biomart disponível na plataforma ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/index.html>) para posterior identificação dos genes diferencialmente expressos (GDE).

6.1. Identificação de genes diferencialmente expressos (GDE)

A identificação dos GDE no conjunto de transcritos GPL24247 foi realizada em 3 intervalos de tempo diferentes: 24h, 48h e 72h respectivamente. Os genes considerados diferencialmente expressos foram aqueles que apresentaram um valor de $p < 0,05$ e cuja expressão apresentou Fold Change (FC) menor que -2,0 ou maior que +2,0 para serem regulados positivamente ou negativamente.

Os que foram considerados genes diferencialmente expressos (GDE), foram filtrados de acordo com cada intervalo de tempo (24h, 48h, 72h) levando em consideração o período de exposição a sepse. Após análise, foram totalizados 768 GDE no período de 24h sendo que desses, 421 tiveram sua expressão regulada positivamente e 347 com expressão regulada negativamente. O grupo de 48h apresentou 312 GDE, sendo 188 regulados positivamente e 124 regulados negativamente. No intervalo de 72h, foram encontrados 255 GDE, sendo 173 regulado positivamente e 82 regulado negativamente. A maior expressão de GDE no contexto da sepse foi observada no período de 24 horas após a infecção, como demonstrado no fluxograma a seguir (Figura 4).

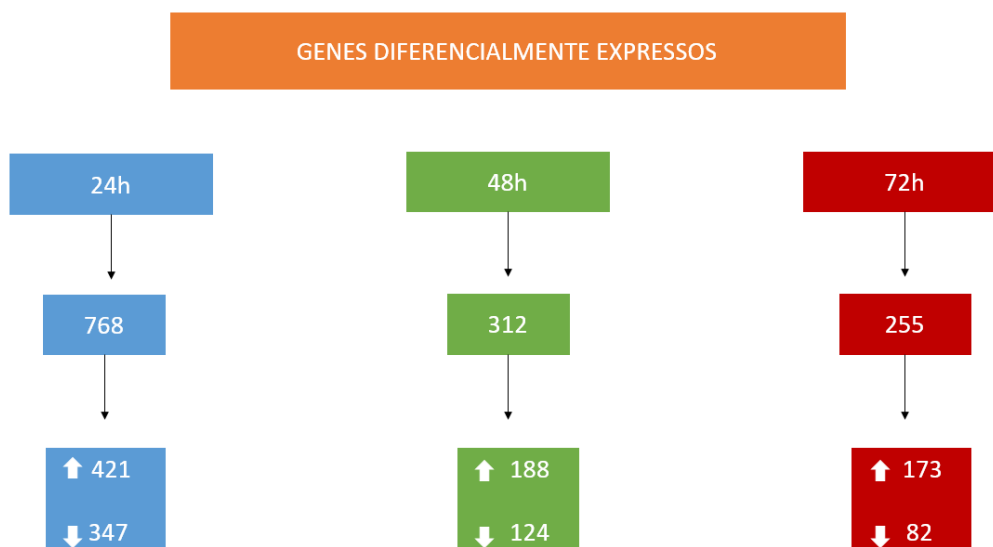


Figura 4: Fluxograma representando os Genes Diferencialmente Expressos (GDE) encontrados nos grupos de 24h, 48h e 72h, respectivamente, obtidos por meio da análise do valor de $p < 0,05$ e *fold change* menor que -2,0 ou maior que + 2,0.

6.2. Análise de enriquecimento de vias e ontologia

A partir da análise de enriquecimento de vias realizado pela plataforma online do WEBGESTALT, foi possível identificar por meio de gráficos as vias de

sinalização que foram expressas e enriquecidas de acordo com período de exposição à infecção e desenvolvimento do quadro clínico da sepse. As vias intracelulares que foram induzidas estão representadas pela cor azul e as vias que foram inibidas, representadas pela cor laranja (Gráfico 1)

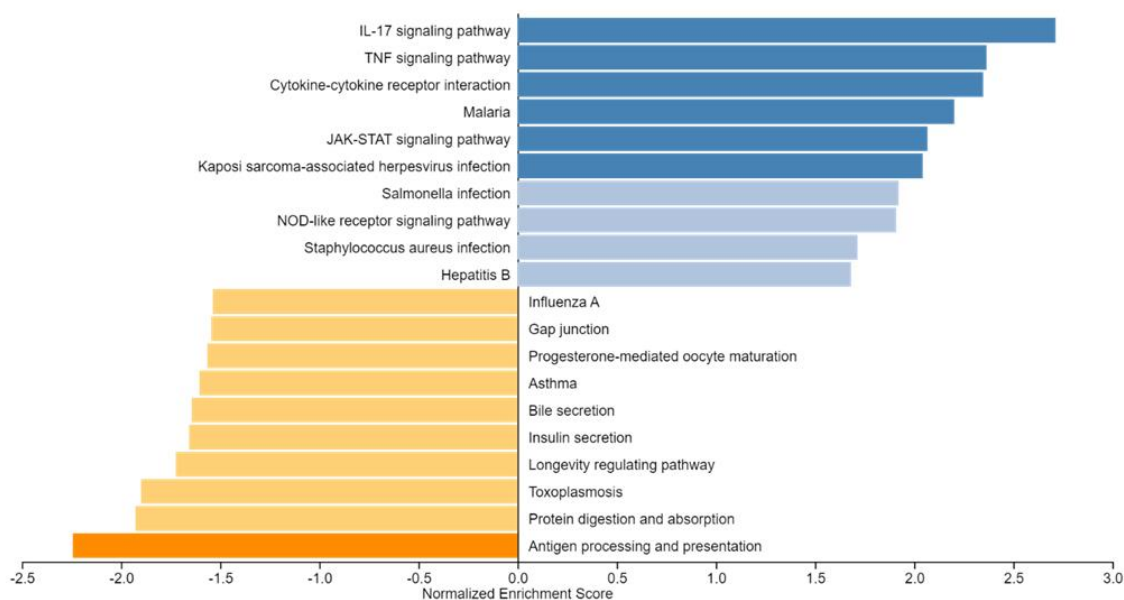


Gráfico 1- Análise de enriquecimento de vias intracelulares do grupo de 24h através da plataforma webgestalt. As vias estão enriquecidas (azul) e as vias que estão inibidas (laranja) organizadas de acordo ao valor de $p < 0,05$ fold change menor que -2,0 ou maior que +2,0.

Após 24h da indução da sepse, foi observado que as vias de sinalização intracelular enriquecidas estão relacionadas a cardiomiopatia séptica, sendo estas: vias ativadas pelas citocinas IL-17 e TNF- α , vias decorrentes da ativação da JAK – STAT, via de transdução do sinal do receptor tipo NOD e a via ativada pelo reconhecimento da infecção por *Staphylococcus aureus* através dos receptores de reconhecimento de padrões moleculares de patógenos.

No período de 48h, observou-se que o enriquecimento da via do *Staphylococcus aureus* foi intensificado e a via da IL-17 manteve o mesmo padrão verificado em 24h. A via de sinalização do PPAR e do receptor de células B foi enriquecida, enquanto que a via de apresentação e processamento de antígeno inibida. (Gráfico 2)

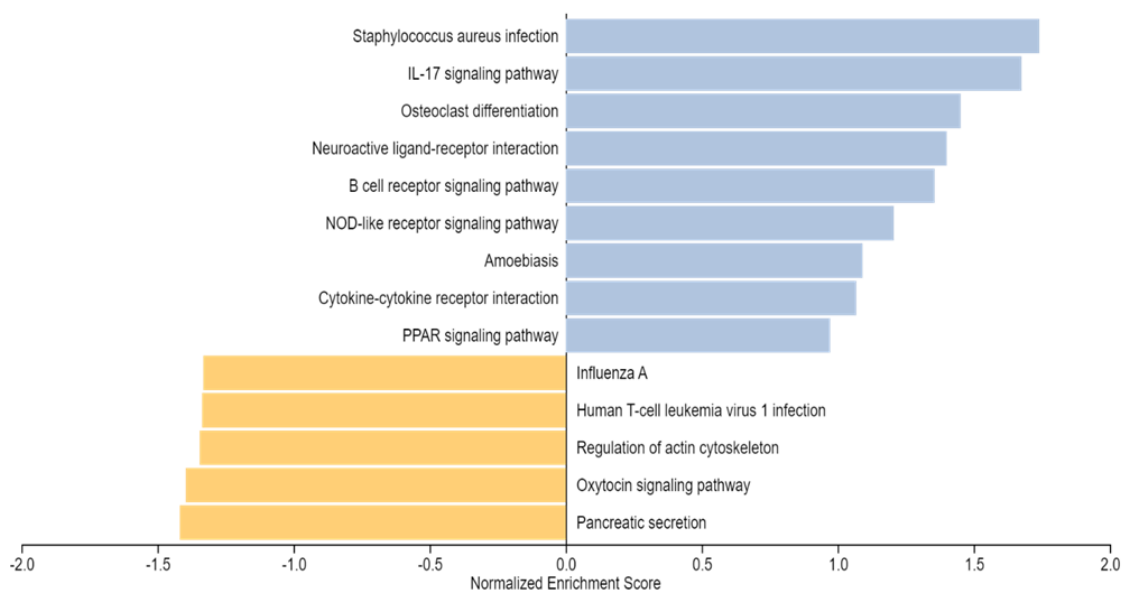


Gráfico 2 - Análise de enriquecimento de vias intracelulares do grupo de 48h através da plataforma webgestalt. As vias estão enriquecidas (azul) e as vias que estão inibidas (laranja) organizadas de acordo ao valor de $p < 0,05$ fold change menor que -2,0 ou maior que +2,0.

No período de 72h após a infecção, as vias que permaneceram induzidas desde o primeiro período de análise, intervalo de 24h, foram a via da IL-17 e a via de sinalização do *Staphylococcus aureus*. Três importantes vias na modulação da resposta inflamatória tiveram a expressão gênica inibida: MAPK e PI3K – Akt e a via da Apelina (Gráfico 3)

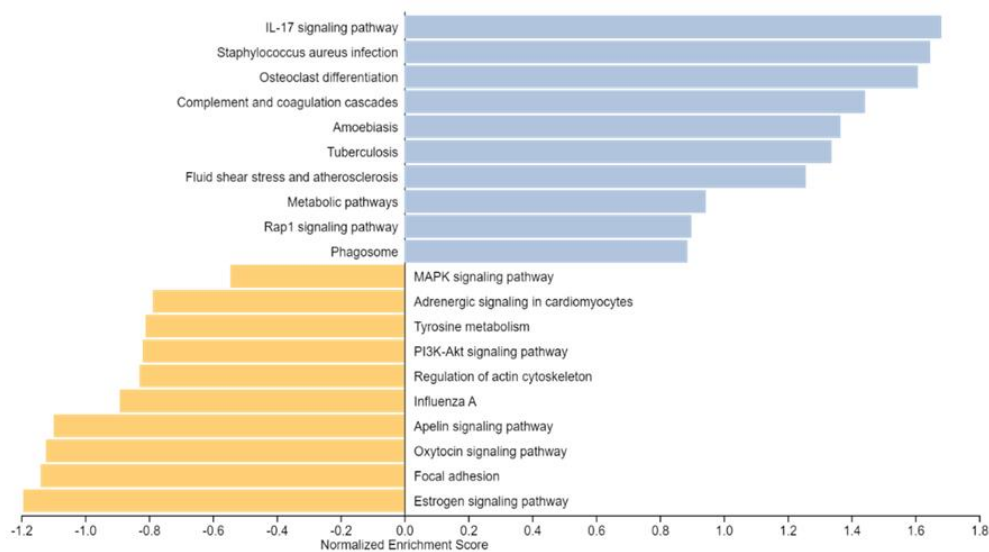


Gráfico 3 - Análise de enriquecimento de vias intracelulares do grupo de 72h através da plataforma webgestalt. As vias estão enriquecidas (azul) e as vias que estão inibidas (laranja) organizadas de acordo ao valor de p .

Os resultados da análise de ontologia (GO) demonstraram que os GDE foram significativamente enriquecidos em Processos Biológicos (BP), Componentes Celulares (CC) e Função Molecular (MF). A análise indicou que os PB enriquecidos mais significativos nos três períodos relacionavam-se à regulação biológica, processos metabólicos e resposta a estímulos. A maioria dos genes do conjunto estavam relacionados com os CC no núcleo e na membrana celular. Quanto à FC, parte expressiva dos genes do conjunto estavam envolvidos com interação de proteínas.

Por meio do diagrama de Venn (gráfico 4), foi possível detectar interseções de elementos dos 3 grupos, em seus respectivos intervalos de tempo, 24h, 48h e 72h, objetivando obter informações sobre os elementos expressos concomitantemente nos três grupos. Foi possível observar por meio do gráfico e da lista textual de todos esses elementos que 136 destes apresentaram interseções.

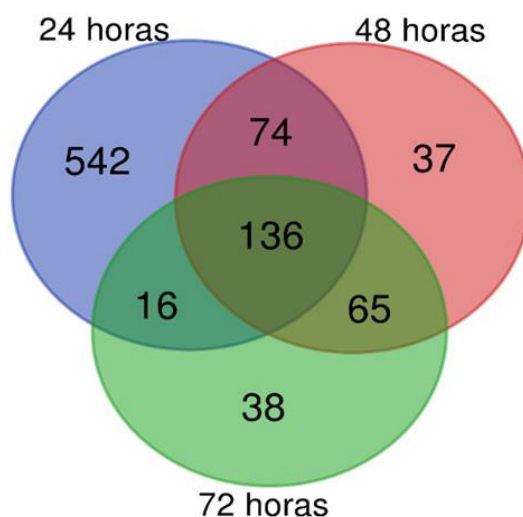


Gráfico 4 – Diagrama de Venn demonstrando as interseções entre os três grupos. Onde em azul está representado o grupo de 24h com 542 elementos encontrados, apresentando 74 interseções com o grupo de 48h e 16 interseções com o grupo de 72. Em vermelho está o período de 48h apresentando 37 elementos com 65 interseções com o grupo de 72h e em verde o período de 72h apresentando 38 elementos. Foi observado 136 interseções em comum com os três grupos.

Os miRNA diferencialmente expressos nesse conjunto de dados foram mapeados e quantificados segundo ferramentas disponíveis no Galaxy, para posterior análise do *High Confidence* utilizando a ferramenta miRWalk onde foram verificados mRNA alvos dos MDE. Dois microRNAs foram identificados como

diferencialmente expressos e, classificados segundo miRWalk, como alvos previstos de interação em um quadro clínico de sepse. Os miRNAs mmu-miR - 8110 e o miRNA mmu-miR - 574 – 5p mostraram-se diferencialmente expressos no período de 72h modulando a expressão de 124 genes-alvo e desses MDE.

Para identificação dos miRNA e o mecanismo de modulação dos genes mais importantes desta rede, utilizamos o aplicativo do *Cytoscape* denominado de *CytoHubba*. Este aplicativo calcula pontos mais centrais da rede e os genes com maior interação, mostrando também a menor distância entre esses pontos. O ponto central (*hub*) de maior importância está representado pelos 2 miRNAs (mmu-miR - 8110 e o mmu-miR - 574 – 5p) e 124 GDE sendo representados por meio dos os *clusters* conforme demonstrado na figura 5.

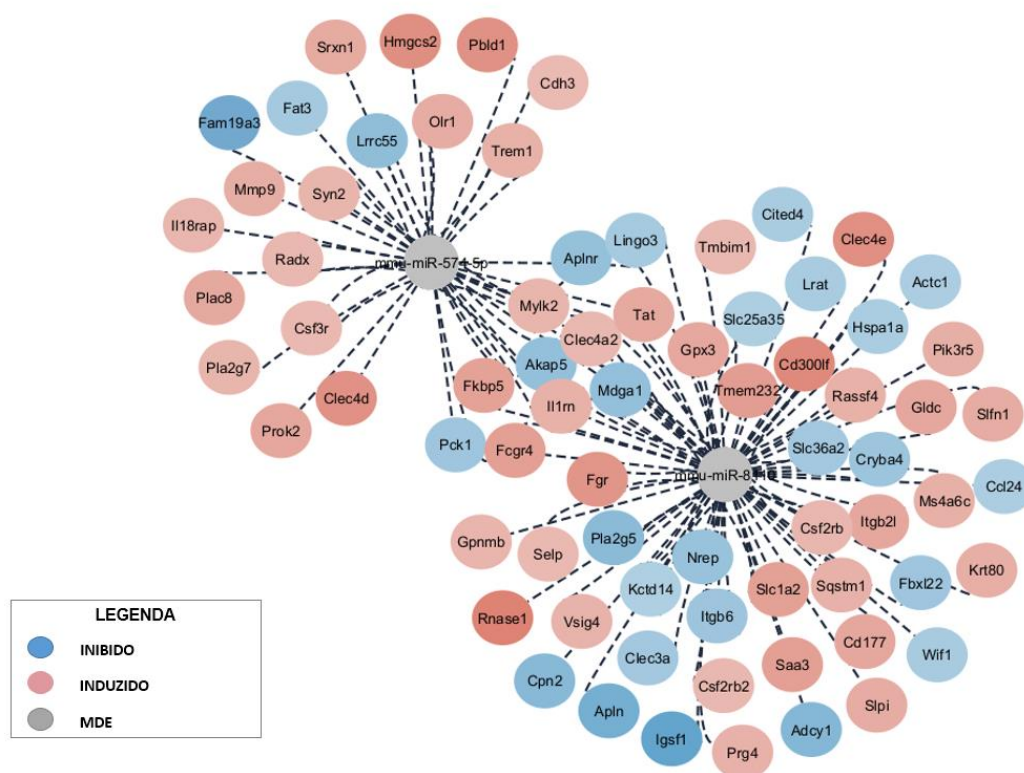


Figura 5: Rede de interação criada no programa do Cytoscape, demonstrando as 124 interações existentes entre os genes-alvo encontrados no período de 72h e os dois microRNA que foram se modulando desde o início da infecção, mas se mostraram diferencialmente expressos, de acordo com o valor de p. e valor de FC, apenas no período de 72h.

Neste período, a via de sinalização intracelular enriquecida, segundo expressão do KEGG, que apresentou alvos envolvidos no processo patológico da CS, foi a via da Apelina. Os 5 principais alvos modulados por esta via são *Aplnr*, *Mylk2*, *Pik3r5*, *Apln* e *Adcy1*.

Após esses achados, uma *clusterização* (agrupamento) foi realizada entre os alvos encontrados com o intuito de identificar grupos de *clusters* (alvos) que possuem perfis de expressão semelhante com base em atributos ou características específicas, como perfis de expressão gênica e similaridade estrutural. Através desta análise, foi possível identificar 8 alvos que expressam características semelhantes ao serem modulados pelos miRNAs mmu-miR - 8110 e o mmu-miR - 574 – 5p, conforme ilustrado na figura 6.

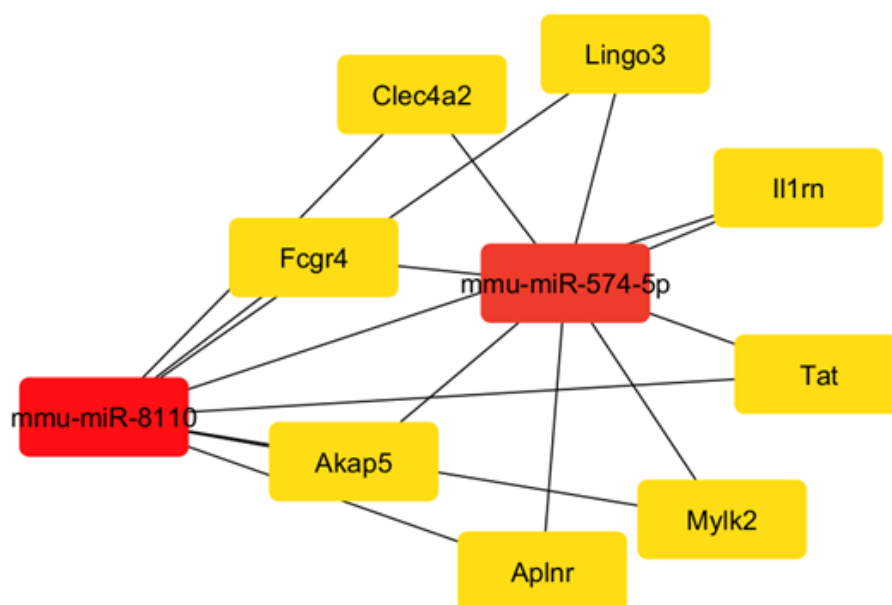


Figura 6 - Rede de interação criada no programa do Cytoscape, demonstrando uma clusterização realizada com os achados de GDE e MDE de 72h. Com o intuito de filtrar os principais genes regulados por esses microRNA.

Posteriormente, com o auxílio da ferramenta *STRING*, algumas redes de interação entre GDE e MDE foram construídas e exportadas para o *Cytoscape*, permitindo a visualização do comportamento da expressão destes alvos em função da progressão da infecção. Desta forma, identificou-se quais destes *clusters* estão presentes em todos os intervalos de tempo e quais vias de sinalização foram induzidas por essa expressão (Figura 7)

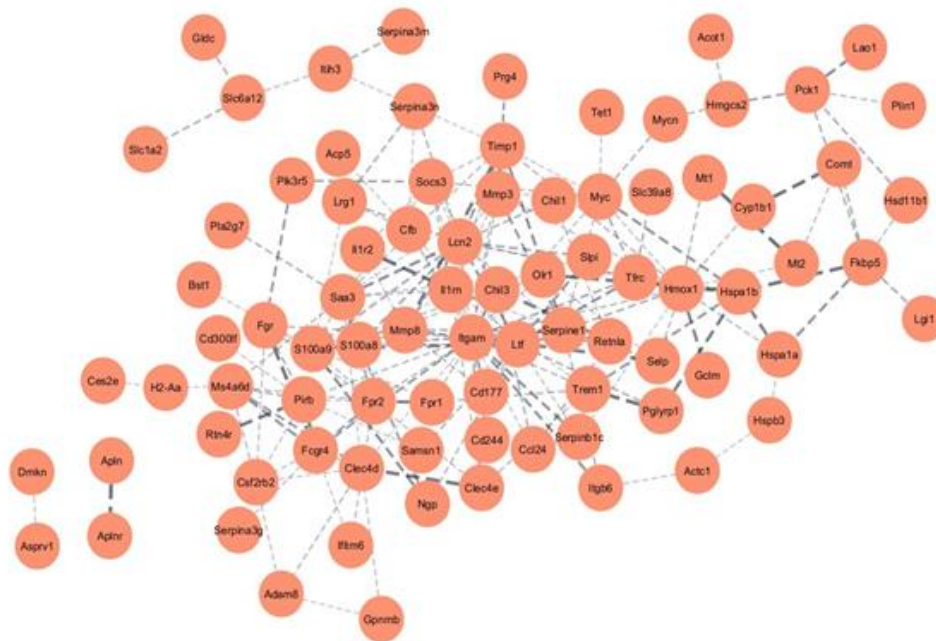


Figura 7 - Rede de interação criada no programa do Cytoscape, demonstrando a interseção dos 129 GDE que estão sendo expressos nos três intervalos de tempo: 24 x 48h x 72h. 129 GDE

Entre as vias induzidas nos primeiros momentos após a infecção e que permaneceram sendo moduladas por esses genes-alvos até o intervalo de 72h, estão a via de infecção pelo *Staphylococcus aureus* e a via de sinalização da Apelina.

Durante as primeiras 24h a partir do insulto inicial, algumas vias de sinalização foram sendo enriquecidas, enquanto os GDE estavam sendo modulados através dessa expressão. Entre as vias exclusivas de 24h que foram sendo enriquecidas, estão: *Toll Like receptor*, NF – KB, TNF, IL – 17, ligação citocina – citocina, MAPK, NOD-LIKE, Th17, P13K-akt, JAK-STAT, *Staphylococcus aureus* e a cardiomiopatia dilatada modulada pelo TNF. (Figuras 8 e 9).

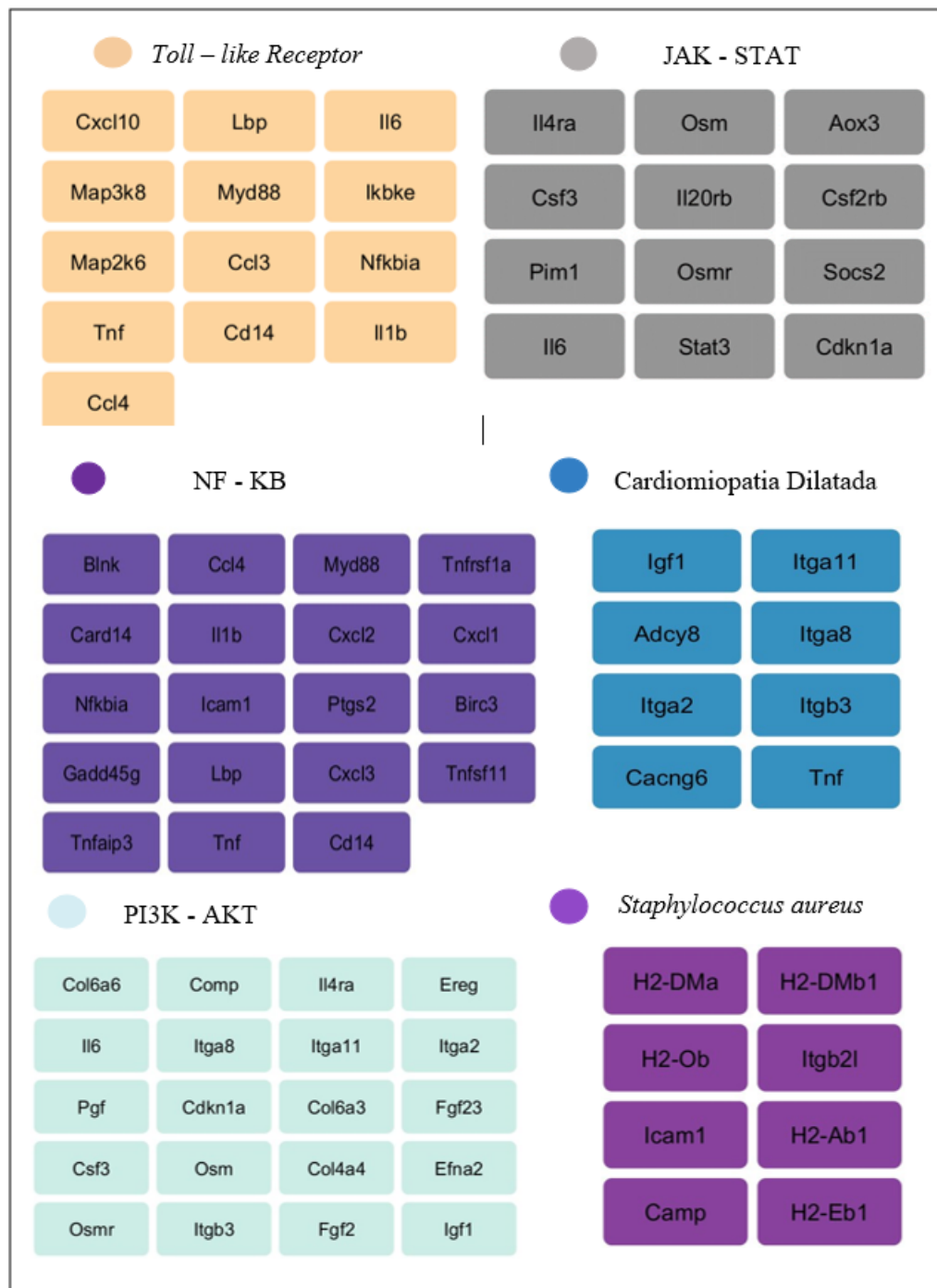


Figura 8 – Vias intracelulares de sinalização que foram ativadas no primeiro momento da infecção, responsáveis por modular o grau da resposta inflamatória a partir do primeiro estímulo. As principais vias representadas são: Toll- like receptor com 13 GDE, JAK – STAT com 12 GDE, NF – KB com 19 GDE, Cardiomiopatia dilatada com 8 GDE, PI3K – AKT com 21 GDE e a via do Staphylococcus aureus sendo modulada por 8 GDE.

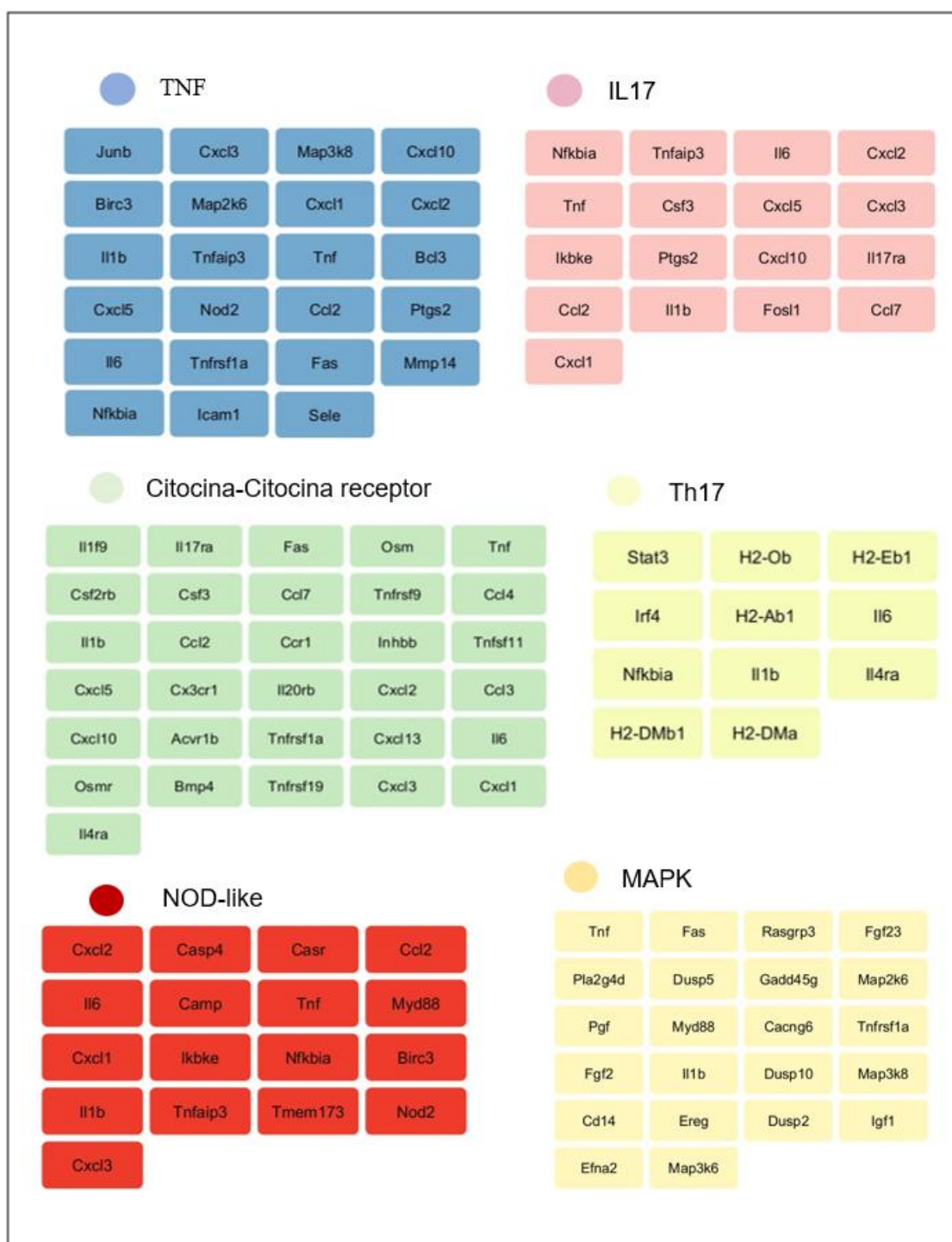


Figura 9 – Vias intracelulares de sinalização que foram ativadas no primeiro momento da infecção, responsáveis por modular o grau da resposta inflamatória a partir do primeiro estímulo. As principais vias representadas são: TNF com 23 GDE, IL - 17 com 17 GDE, Citocina – citocina receptor 31 GDE, Th17 com 11 GDE, MPK com 22 GDE, NOD – like com 17 GDE.

Ainda no cytoscape, foi possível observar os 47 alvos que foram expressos desde o período de 24h e continuaram sendo modulados em 72h. (Figura 10-A). Além da verificação de 21 genes alvos que estavam sendo expressos no início da

infecção e tiveram a sua expressão inibida conforme o momento que a infecção perdurava. Conforme representado na figura abaixo (Figura 10-B)

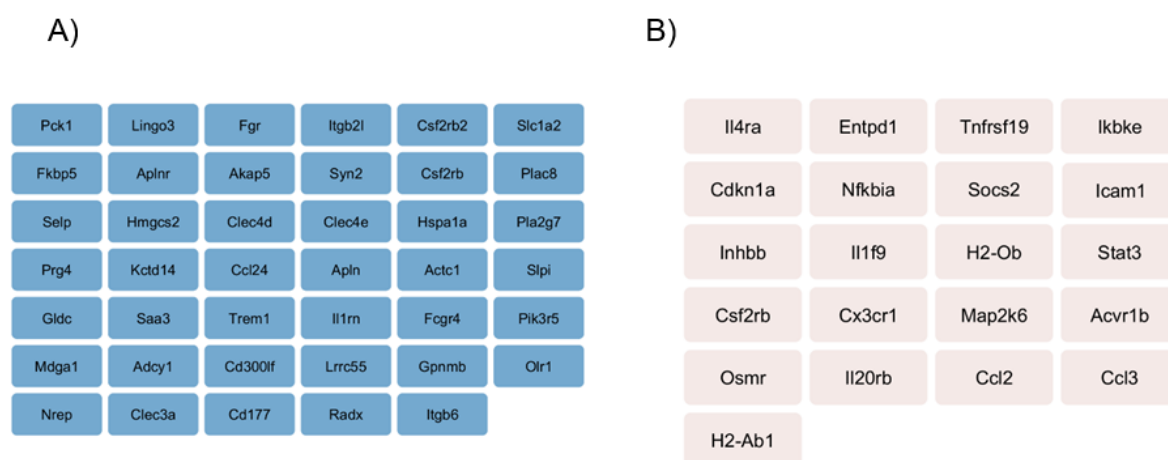


Figura 10: A) 47 alvos que foram expressos desde o início da infecção, no período de 24h e continuaram sendo expressos até o período de 72h. B) 21 alvos que estavam sendo expressos no período de 24h e foram inibidos conforme a resposta à infecção acontecia.

6.3. Discussão

Por apresentar manifestações clínicas altamente variáveis, muitas vezes é difícil realizar um diagnóstico e um prognóstico preciso e precoce da sepse, aumentando significativamente a taxa de mortalidade entre estes pacientes. Estudos apontam que o choque séptico diminui a sobrevivência do indivíduo em até 7,6% mediante cada hora de atraso no tratamento adequado dessa condição clínica. Desta forma, o cenário ainda permanece obscuro devido ao pouco conhecimento sobre a fisiopatologia da sepse e a lacuna na identificação de biomarcadores de alta sensibilidade e especificidade para sepse, bem como de novos agentes terapêuticos eficazes. (LEVY et al., 2001; ANGUS et al., 2013).

A disfunção cardíaca decorrente da sepse desponta como um dos principais eventos agravantes de severidade na evolução do quadro clínico destes pacientes. A prevalência de disfunção miocárdica em pacientes com sepse entre 10% e 70%, sendo um indicativo de alto risco para disfunção orgânica advinda da cardiomiopatia séptica (Beesley et al., 2018). Este cenário representa um desafio adicional no manejo terapêutico de pacientes com sepse, agravando a complexidade do quadro.

Portanto, o aumento vertiginoso no número de pessoas acometidas por sepse e da elevada estimativa de novos casos e no número de óbitos, torna-se urgente definir estratégias para o diagnóstico e prognóstico precoce e preciso destes

pacientes. Por isto, o presente estudo visou avaliar o perfil de expressão dos miRNA na cardiomiopatia séptica através da análise in sílico do conjunto de dados GSE171546 depositado no banco de dados Gene Expression Omnibus (GEO), identificando os genes-alvos implicados nas vias de sinalização associadas à modulação da resposta inflamatória e o remodelamento do miocárdio em três intervalos de tempo, 24 horas, 48 horas e 72 horas após a indução da infecção em modelo experimental murino de sepse decorrente da administração de LPS.

O conjunto de dados utilizado nesse trabalho, foi disponibilizado por Xiao Yan e colaboradores (2021). Este estudo consistiu na análise transcriptômica de séries temporais de lesão miocárdica induzida decorrente da sepse em camundongos. No presente estudo, uma nova análise foi realizada deste mesmo conjunto de dados, utilizando os conhecimentos mais recentes sobre o comportamento dos microRNAs, usufruindo da disponibilidade de inovações tecnológicas e metodológicas na área de Bioinformática. Essa abordagem possibilitou uma nova interpretação dos dados, explorando novas perspectivas e conhecimentos gerados pela compreensão mais aprofundada dos mecanismos de ação dos microRNAs e seu papel na disfunção cardíaca decorrente da sepse.

Inicialmente, identificou-se os genes diferencialmente expressos de acordo à exposição aos três intervalos de tempo (Figura 4). Na comparação entre os períodos 24h x 48h x 72h de exposição à infecção, observa-se que no período inicial houve a maior concentração de GDE regulados positiva e negativamente, indicando a resposta imune estava exacerbada compatível com o quadro infecciosos recente. Há dados na literatura que corroboram com este achado, uma vez que sugerem que um aumento na regulação transcricional dos genes é amplamente ditada pelas diferenças nas vias de transdução de sinal acionadas em função natureza dos estímulos iniciadores da ativação dos receptores PRR (SMALÉ & NATOLI, 2014). Por fim, esta resposta complexa e dinâmica neste estágio crítico inicial da doença, envolvendo diversos mecanismos fisiológicos compensatórios a fim de conter a infecção, pode estar relacionada à presença de mediadores inflamatórios e ao reconhecimento de patógenos por receptores específicos do sistema imunológico.

No estudo aqui apresentado, sugere-se que a durante a progressão da sepse, entre o período de 24h X 72h, o organismo foi tentando reestabelecer homeostase através da regulação na expressão dos genes, por vezes predominantemente negativa, para controlar a resposta inflamatória exacerbada,

evitando o dano tecidual. Em 2015, Ahmed e cols. descreveram alterações na expressão de genes em resposta a um estímulo inflamatório. Os genes ativados foram divididos em duas categorias com base no padrão de sua ativação transcricional: genes de resposta primária e secundária. Sendo que os genes de resposta primária foram ativados rapidamente após a estimulação, enquanto a ativação de genes de resposta secundária é muito mais lenta. (AHMED, WILLIAMS HANNIGAN, 2015).

Na etapa seguinte do presente estudo, foi realizada a análise de enriquecimento de vias no *WEBGESTALT*, Esta análise possibilitou identificar o comportamento na indução das vias de sinalização mediante a expressão dos GDE. O racional teórico que justifica esta etapa da investigação reside na própria fisiopatologia da sepse. A modulação e coordenação da resposta imunoinflamatória por citocinas e outros mediadores é essencial para a defesa do hospedeiro, desencadeando eventos moleculares subjacentes complexos e culminam na expressão gênica alterada. A desregulação dessa resposta pode acarretar a sepse, levando à liberação excessiva ou inadequada de mediadores e, por fim, a danos nas células e órgãos do hospedeiro. (MACDONALD, GALLEY, WEBSTER et al., 2003).

De acordo com os resultados apresentados no gráfico 1, as vias mais enriquecidas no momento 24 horas após o início da infecção foram as vias das citocinas IL – 17 e TNF, sugerindo que são enriquecidas por um maior agrupamento de genes do conjunto. Identificada, no presente estudo, como a via de sinalização de maior expressão no período de 24h e persistente em 72h, a via da IL-17 é uma citocina pró-inflamatória secretada por um subtipo de linfócito, as células Th17, sendo sua expressão ligada a infecções bacterianas. Em uma resposta inflamatória, o efeito da IL-17 nas células pode resultar no aumento da produção de quimiocinas. Apesar do papel da IL-17 na sepse ainda ser pouco conhecido, sabe-se que esta citocina durante a infecção pode agir tanto de forma pró-inflamatória através do recrutamento de neutrófilos, quanto de forma citoprotetora e anti-inflamatória em determinados contextos, isto dependendo da natureza da doença inflamatória. No âmbito da citoproteção, os mecanismos desencadeados pela IL-17 envolvem a inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e IL-1, bem como, a interação desta interleucina com as células epiteliais, promovendo a ativação destas células para aumentar a produção de fatores de crescimento, quimiocinas, peptídeos antimicrobianos e mucinas. Essas substâncias ajudam a

fortalecer a barreira epitelial, protegendo os tecidos contra danos e ajudando na cicatrização. (FLIERL et al., 2008; RENDON et al., 2012).

A segunda via classificada como a mais enriquecida neste estudo durante o primeiro estímulo, foi a via de ativação do TNF (Gráfico 1). O TNF- α é considerado um mediador necessário para que o processo infeccioso evolua para choque séptico, isto é comprovado na literatura por evidências como sua capacidade de desencadear alterações hemodinâmicas e metabólicas que provocam hipotensão, coagulação intravascular, necrose hemorrágica e lesão tecidual. (HOTCHKISS et al., 2003). Interpretando os resultados encontrados desde o período de 24h até o de 48h, marcado pela evolução da sepse (Gráfico 2), a expressão da via de sinalização do TNF- α foi detectada apenas no período de 24h, dados coerentes com os achados clínicos que demonstraram níveis séricos de TNF- α atingem valores mais elevados durante o desenvolvimento agudo do choque séptico, sendo praticamente indetectáveis em pacientes com sepse grave (CUNNEEN J, CARTWRIGHT M et al., 2004).

Ainda entre os achados sobre as vias induzidas nas primeiras horas da infecção e modulando a resposta imune inflamatória, pode-se citar de alguns fatores importantes. A exarcebação da resposta imune inflamatória nas primeiras 24h, aconteceu a partir da expressão e da interação entre as vias da JAK – STAT, NOD-like receptor e *Staphylococcus aureus*. (Gráfico 1), ativadas pela ativação dos receptores de citocinas ou receptores TLR e PRR, amplificando a resposta inflamatória na sepse. Essa amplificação está ligada a um mecanismo adaptativo do organismo para combater a infecção promovendo a produção de mais citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e alerta de adesão celular, mas também pode contribuir para a disfunção de órgãos múltiplos, incluindo a disfunção cardíaca observada na cardiomiopatia séptica.

O enriquecimento subsequente das vias do receptor de NOD-LIKE e da via do *Staphylococcus aureus* é um indicativo de reconhecimento específico de componentes bacterianos. O fato destas vias estarem enriquecidas do período 24h até o momento 72h (Gráfico 3), apontando para a participação na evolução do quadro da sepse. O receptor de NOD-LIKE (NLR) pertence a uma família de receptores intracelulares que desempenham um papel fundamental no reconhecimento de padrões microbianos e na ativação da resposta a inflamação. Isso desencadeia a ativação de cascatas de sinal intracelular, culminando na

produção de citocinas, adesão celular e outras vias envolvidas na resposta imune a fim de conter a inflamação. A via do *Staphylococcus* refere-se à ativação dessa via de sinal específica em resposta à presença dessa bactéria, que é um importante patógeno associado à sepse. Caracterizada por possuir componentes bacterianos, como lipopeptídeos e toxinas, que podem ser reconhecidos pelos receptores do sistema imunológico, a presença do *Staphylococcus aureus* leva à ativação de vias inflamatórias e imunes. (CHEN et al., 2009)

A via do PPAR apresentou-se enriquecida a partir do intervalo de 48h (Gráfico 2). Corroborando com os achados deste estudo, Crossland (2021) demonstrou que o PPAR α regula positivamente a expressão de I κ B, um fator que suprime a translocação nuclear e a atividade transcricional do NF- κ B, bem como inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em linfócitos T e a indução de moléculas reguladoras anti-inflamatórias do sistema imune inato (CROSSLAND et al., 2021). Com base nessas informações e diante dos achados do presente estudo, o enriquecimento da via do PPAR após 48h do início da sepse pode ser um indicativo de resposta compensatória à reação imune exacerbada que caracteriza a fase inicial da infecção com o intuito de gerar uma ação protetora e evitar possíveis danos gerados desta progressão como a disfunção de múltiplos órgãos.

O achado de indução das vias de sinalização da cascata de coagulação e Rap1 72 horas do início da infecção (Gráfico 3) sugere um papel relevante destas vias na progressão à cardiomiopatia séptica e na resposta compensatória tardia. À ativação da cascata de coagulação como uma via enriquecida após essas primeiras horas relaciona-se à coagulação sanguínea desregulada, levando a formação de diversos coágulos que contribui para a disfunção cardiovascular na cardiomiopatia séptica. Ressalta-se que a coagulação intravascular disseminada (CID) é um fenômeno frequentemente observado em pacientes sépticos, levando à formação de microtrombos nos vasos sanguíneos e prejudicando a perfusão tecidual. (SMITH et al, 2015).

O enriquecimento da via de sinalização Rap1 proteína repressora-ativadora (do inglês: *repressor-activator protein*) no presente estudo tem relevância para identificação de biomarcadores de diagnóstico e prognóstico da CS. Esta via induz o recrutamento de células inflamatórias, como neutrófilos e macrófagos, para o local da infecção, favorecendo à resposta inflamatória exacerbada na sepse. Além dos indícios de que a via da Rap1 está implicado na sinalização adrenérgica em

miócitos cardíacos, em outras células do sistema cardiovascular observou-se que os diferentes subtipos Rap1 estão emergindo como novos reguladores de processos significativos no sistema cardiovascular, desde a formação e permeabilidade dos vasos sanguíneos, agregação plaquetária, até o crescimento e sobrevivência de miócitos cardíacos, sugerindo uma via potencial para complicações cardiovasculares devido a alterações em Rap1a (JEYARAJ et al., 2011)

Outro achado relevante refere-se à expressão inibida das vias MAPK, PI3K-Akt e Apelina após 72 horas do início da infecção (Gráfico 3). A via de sinalização MAPK (proteína quinase ativada por mitógeno) está envolvida em diversas respostas celulares, incluindo a resposta à inflamação. Sua inibição após 72 horas da infecção sugere uma tentativa do organismo em controlar a inflamação excessiva e a ativação contínua das células inflamatórias, prevenindo danos teciduais adicionais e favorecendo a resolução da resposta inflamatória. Além disso, esta via envolve a participação da proteína cinase regulada por sinal extracelular (ERK1/2) e da proteína quinase ativada por mitógeno p38 (MAPK), ambas comprometidas com a produção de IL-6 em neutrófilos ativadoos. (ZHANG & NING, 2021).

A inibição da via de sinalização PI3K-Akt pode afetar a função celular, incluindo a resposta inflamatória e a sobrevivência das células cardíacas, refletindo no comprometimento da função cardíaca observada na CS, visto que desempenha um papel essencial na regulação do metabolismo celular e na resposta imune. A via da PI3K-Akt desempenha um papel cardioprotetor importante, prevenindo a disfunção sistólica, redução do DC e, conseqüentemente, a disfunção orgânica sistêmica advinda da perfusão tecidual sanguínea inadequada. A expressão inibida após 72h do início da sepse pode agravar a extensão da área de morte celular, disfunção contrátil do miocárdio, desregulação do metabolismo energético e maior inflamação. Esses efeitos influenciarão a progressão da cardiomiopatia séptica e podem resultar em piora da função cardíaca, disfunção sistêmica e aumento do risco de mortalidade (JIANG S et al., 2013)

A inibição da via da Apelina aqui detectada reflete um indicativo de agravamento da disfunção cardíaca, contribuindo para a cardiomiopatia séptica. A Apelina é um peptídeo bioativo com propriedades anti-inflamatórias e vasodilatadoras, conhecido por modular a função cardíaca e contribuir para a homeostase vascular. O estudo de Luo e cols (2018) fortalece esta interpretação quando demonstraram que o tratamento com Apelina reduziu o dano cardíaco

induzido por sepse através da diminuição dos níveis plasmáticos de IL-6, TNF- α e IL-1 β , inibindo a apoptose miocárdica ao inibir as vias de sinalização TLR4 e NLRP3, e, desta forma, exercendo um efeito cardioprotetor na sepse (LUO Q et al, 2018).

A análise de ontologia de genes revelou que os miRNA tem como alvos processos biológicos envolvidos com regulação biológica, processos metabólicos e resposta a estímulos. Este achado está em sintonia com as vias enriquecidas que foram identificadas pelo *Webgestalt*, especialmente a via da JAK-STAT. Os componentes celulares e funções moleculares alvos também estão de acordo com as vias enriquecidas, evidenciando que os alvos afetam principalmente genes de resposta ao tipo de estímulo e fatores de transcrição ativados.

Por meio da plataforma online *Diagrama de Venn* (gráfico 4), foi possível detectar interseções da lista de elementos dos 3 grupos, em seus respectivos intervalos de tempo 24h x 48h x 72h, buscando obter informações sobre as interseções dos elementos, a fim de identificar e compreender as relações e sobreposições entre os diferentes conjuntos. A partir do diagrama de Venn, foi possível representar visualmente essas interações do GDE, além de observar por meio de gráfico e lista textual todos esses elementos, onde 136 destes apresentaram interseções durante todo o período de exposição à infecção.

Os miRNA diferencialmente expressos, foram mapeados e quantificados segundo ferramentas disponíveis no *Galaxy*. Logo em seguida a avaliação do *High Confidence* foi realizada utilizando a plataforma *miRWalk* onde foi verificado mRNA alvos dos MDE. Ao analisarmos a expressão desses mediadores, dois principais microRNAs foram sendo modulados nos intervalos de tempo desde o início da infecção até o período de 72h onde permaneceram diferencialmente expressos para a cardiomiopatia séptica. Tivemos a expressão diferencial do miR-8110 e do miR-574-5p. (Figura 5)

O miR-8110 foi filtrado a partir do valor de *p* e do valor de FC, e encontrado através da interação molecular (binding) disponível no *Mirwalk*. A partir desta interação, foi possível rastrear alvos com probabilidade de ligação permitindo a identificação e predição das complementaridades entre as sequências de microRNAs e genes alvos, o que é fundamental para a compreensão da regulação gênica e para aplicações em pesquisas e medicina. Entretanto, apesar de ser um alvo previsto de interação existente, o miR-8110 ainda não foi testado na prática clínica. Já o miR-574-5p é um miRNA encontrado no grupo dos miRNA já validados

e testados em laboratório, fazendo parte dos parâmetros passíveis de investigação na sepse.

Em relação ao miR-574-5p, pode-se inferir que sua expressão diferencial desde o período experimental de 24 horas tem um papel cardioprotetor. Esta inferência toma por base estudos anteriores. Wang e cols. (2012) foram os primeiros a relatar que o miR574-5p sérico está correlacionado com a morte de pacientes com sepse e que apresenta potencial como biomarcador de prognóstico em pacientes gravemente enfermos e/ ou sépticos. (WANG et al., 2012). No estudo de Liu e cols. (2021), foi demonstrado que a regulação negativa do miR-574-5p inibe a viabilidade das células HK-2 e prediz o início de lesão renal aguda em pacientes com sepse (LIU S et al., 2021). Wu e cols (2020) demonstraram que miR-574-5p tem sido identificado como um miRNA oncogênico e está envolvido na neurogênese, além de ter um papel importante na regulação da função cardíaca, podendo ser um alvo terapêutico potencial para doenças cardíacas (WU J et al., 2021).

Os *hub genes* foram utilizados para identificar os mRNA e miRNA que apresentavam um papel mais central na rede de interações. Genes que apresentam maior quantidade de correlações, tendem a ser fundamentais para esta rede (CHIN et al., 2014). Os mRNA presentes na rede hub são aqueles diferencialmente modulados no transcriptoma analisado neste estudo. Logo, os miRNA que apresentaram maior correlação foram aqueles que de fato mais influenciaram na transcrição destes genes.

Através do *Cytoscape* foi possível visualizar por meio da rede de interação, o comportamento desses genes-alvo e as vias de sinalização que estavam sendo moduladas mediante resposta à infecção. Os dois MDE encontrados neste estudo, estiveram diferencialmente modulados de acordo ao valor de p. e FC, apenas no intervalo de 72h. Isto é um indicativo de que à medida que esses MDE foram sendo produzidos, foram interagindo com seus alvos e inibindo a transcrição de genes em proteína. Desta maneira, com o auxílio do *Cytoscape* foi possível identificar o comportamento desses genes-alvo durante todo o quadro da sepse.

A primeira rede criada (figura 5), foi entre os GDE e MDE expressos no período de 72h. Foram detectadas 124 interações existentes entre os genes-alvos e os dois miRNAs. Neste período, a via de sinalização intracelular que estava sendo enriquecida de acordo a expressão do *KEGG Pathways* e apresentando alvos envolvidos nesse processo patológico da cardiomiopatia séptica, foi a via da Apelina.

Os 5 principais genes alvos identificados nesta interação foram *Apln*, *Aplnr*, *Mylk2*, *Pik3r5* e *Adcy*.

Como mencionado anteriormente, a via de sinalização da Apelina está implicada em vários processos cardíacos, incluindo a regulação da função contrátil do músculo cardíaco, o controle da pressão arterial e a resposta inflamatória (Luo et al., 2018). Entre os GDE que foram sendo expressos a partir desta interação, está o *APLN* que é o gene da apelina, sua expressão pode ser induzida em várias condições, incluindo estresse, hipóxia e inflamação. A ativação de vias de sinalização específica, NF- κ B e proteína quinase Akt, pode modular a expressão de *APLN* em resposta a estímulos fisiológicos e patológicos que atua através de seu receptor específico (PRZEWLOCKA-KOSMALA, 2016)

Outros achados relevantes desta etapa ainda podem ser discutidos. O *MYLK2* (Myosin Light Chain Kinase 2) é um gene de codificação de proteínas e está intimamente implicado no nível de contração muscular global e função cardíaca, daí o desenvolvimento das cardiomiopatias serem associadas a alterações na expressão deste gene. Um outro gene diferencialmente expresso foi o *ADCY 2* (Adenilato Ciclase 2) relacionado à produção de citocinas anti-inflamatórias. Já a família do gene *Pik3r5* está relacionada ao crescimento celular, proliferação, diferenciação, motilidade, sobrevivência e tráfego intracelular (*The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis*)

Ainda com o auxílio do *Cytoscape*, uma segunda rede de interação foi criada através do processo de *clusterização*. Neste, a partir da interação dos MDE com os GDE que estavam sendo modulados por esses miRNAs, foram selecionados *clusters* (conjunto de elementos alvos) que apresentaram perfis de expressão semelhante com base em atributos ou características específicas, tais como expressão gênica e similaridade estrutural. Conforme a figura 6, foi possível identificar alguns alvos que se expressaram com características semelhantes ao serem modulados por esses dois miRNAs.

O *IL1RN* é o gene que codifica a proteína Interleucina 1 Receptor Antagonista (IL-1Ra), um membro da família de citocinas da IL-1. A IL-1Ra é um regulador natural do sistema imunológico que atua inibindo a atividade da IL-1 através da competição pelos receptores de IL-1, modulando a fase aguda da inflamação. A relevância do gene *IL1RN* como modulador anti-inflamatório foi proposto por Zhu e cols (2015) quando descreveram que o pré-tratamento com

flagelina promoveu proteção antissepse por meio da ativação da via TLR-5, IL-1RN e VCAN, associada ao reparo endotelial e, assim, contribuir para a sobrevivência à sepse. (ZHU J et al., 2015).

O gene CLEC4A (C-Type Lectin Domain Family 4 Member A) codifica o receptor tipo C de lectina e, também, está envolvido na modulação da resposta inflamatória, encontrado principalmente em células do sistema imunológico, como macrófagos, monócitos e células dendríticas, (BLACK, LAURENCE, JEREMIE, 2019).

Com o auxílio do *STRING*, a rede de interação proteína – proteína foi construída, na qual os *clusters* de genes obtidos representam as vias e processos que são compartilhados entre os GDE. Essa rede foi exportada para o *Cytoscape* com o intuito de visualizar o comportamento na expressão desses alvos quando modulados pelos miRNAs em relação à progressão da infecção, identificando quais desses clusters estão presentes em todos os intervalos de tempo e quais vias de sinalização foram induzidas por essa expressão (figura 7). Foi possível visualizar as interseções desses genes diferencialmente expressos, desde o período de 24h até 72h. Foram encontrados 129 GDE comuns aos três intervalos de tempo. Mediante esses achados, identificou-se que as seguintes vias do *Staphylococcus aureus* e *Apelina* foram induzidas desde o início do período de observação experimental, 24 horas após a indução.

Uma das questões clinicamente mais relevantes após o diagnóstico de sepse é saber qual patógeno invasor é responsável pela infecção aguda. O *Staphylococcus aureus* é, atualmente, uma das causas mais frequentes associada à morbidade e mortalidade por agente infeccioso, provocando uma ampla variedade de doenças, desde infecções cutâneas moderadamente graves a pneumonia fatal e quadro de sepse. (Cheung et al., 2021) Segundo o estudo *Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients*, houve uma prevalência bem semelhante de infecções bacterianas entre pacientes com sepse quando comparado Gram positivas (*Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Pseudomonas espécies* e *Escherichia coli*), sendo que o número de casos relacionados ao desenvolvimento do quadro séptico a partir da infecção por bactérias Gram positivas mostrou ser mais frequente (VINCENT et al., 2006). Esses achados corroboram com os resultados encontrados no presente estudo, onde foi possível observar o enriquecimento dessa via desde o início da infecção até a progressão da sepse.

Uma via adicional modulada pela interação dos miRNA e genes alvos, foi a via da Apelina. O pequeno número de estudos relatados, que foram realizados predominantemente em animais, indica que a via de sinalização da Apelina pode estar envolvida na regulação do tônus vascular, função contrátil cardíaca e equilíbrio na distribuição de fluidos nos compartimentos do corpo (CHANDRASEKARAN, DAR, MCDONAGH, 2008). No contexto da disfunção cardíaca decorrente da sepse, esses achados são um indício de que a Apelina pode atuar através de um efeito inotrópico positivo, aumentando a contratilidade na tentativa de sustentar o DC a fim de compensar a disfunção cardíaca durante a CS.

A análise de investigação das vias intracelulares de sinalização que são enriquecidas nas primeiras 24h da CS, possibilita uma compreensão valiosa sobre os eventos iniciais desencadeados pela infecção e pela resposta inflamatória. Essas vias desempenham um papel central na regulação de processos biológicos importantes. Pensando na relevância dessa análise, uma rede de interação foi realizada com as vias que foram ativadas nesse estágio inicial da doença, proporcionando uma visão mais abrangente dos procedimentos envolvidos neste quadro. Entre as vias de sinalização que foram sendo enriquecidas em 24h, estão : *Toll Like receptor*, NF – KB, TNF, IL – 17, citocina – citocina receptor, MAPK, NOD - like, Th17, P13K-akt, JAK-STAT, *Staphylococcus aureus* e a cardiomiopatia dilatada sendo regulada principalmente pelo TNF. Interações foram observadas entre vários genes alvos presentes nas vias e que serviram para modular a resposta à infecção. (Figuras 8 e 9).

De acordo com esses achados, no período de 24h os PAMPs, incluindo os TLR, foram regulados positivamente, juntamente com uma diversidade de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como TNF, IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-17, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL2, CCL3. Essas moléculas desempenham papéis cruciais na resposta inflamatória, recrutando e ativando células do sistema imunológico para combater a infecção. Além disso, destaca-se a ativação de vias de transdução de sinal, incluindo NF κ B, MAPK, JAK – STAT que são vias intracelulares envolvidas na regulação da expressão gênica e na resposta imunológica.

Em última análise, foi realizada uma rede de interação entre os genes alvos modulados desde as primeiras 24h após o estímulo infeccioso e que permaneceram sendo expressos até o período de 72h (Figura 10-A). Entre os alvos que já foram validados e testados na prática clínica, encontramos uma proteína, TREM 1 que

amplifica respostas inflamatórias mediadas por neutrófilos e monócitos desencadeadas por infecções bacterianas. Entre as vias relacionadas estão o sistema imunológico inato e a via de sinalização do receptor Toll-like. Já foi descrito o papel do gene do TREM-1 em quadro de infecção em *E. Coli*, onde foi demonstrado que a suplementação com a proteína recombinante suína sTREM-1 atenuou a inflamação através da regulação negativa da expressão de citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 e TNF- α . Estes resultados indicam que a proteína recombinante suína sTREM-1 pode prevenir respostas hiperinflamatórias mediadas por TREM-1 após exposição ao LPS. (LI et al., 2017)

A quimiocina CCL24 que também se manteve expressa, está envolvida na regulação do sistema imunológico e na resposta inflamatória, além de estar relacionado a proliferação de cardiomiócitos, também é um marcador de inflamação característico do envelhecimento cardíaco. O eixo CCL24/CCR3 foi descrito por desempenhar um papel crucial no remodelamento patológico do coração durante a insuficiência cardíaca induzida pela angiotensina II (WANG et al., 2022). (Figura 10-A)

Outro alvo dessa rede, o SAA3 - antígeno amilóide sérico 3, é um ligante inflamatório que pode estimular a produção de IL-6 e TNF- α . Anteriormente, já foi relatada a regulação positiva de MALAT1 induzida por IL-6 em cardiomiócitos em resposta ao tratamento com LPS, onde houve aumento da expressão de TNF- α via SAA3, relacionado ao processo inflamatório (ZHUANG et al., 2017). (Figura 10-A)

Algumas outras vias muito importantes que também foram expressas durante todo o intervalo de tempo desde a exposição em 24h à progressão da infecção até 72h e que permaneceram sendo moduladas pelos miR-8110 e miR-574-5p encontrados neste estudo, temos a via da Apelina, que é uma via relacionada doenças cardiovasculares e a via do gene OLR1 cuja regulação acontece através da via de sinalização do AMP cíclico e é um gene que está associado a doenças como infarto do miocárdio. O ITGB2L que são tipos de proteínas integrais da superfície celular e desempenha um papel importante na resposta imune, defeitos neste gene causam deficiência de adesão leucocitária. O CSF2RBS é um receptor de superfície celular que desempenha um papel na resposta imune e controla a produção e diferenciação de células progenitoras hematopoiéticas. Em condições não estimuladas, interage constitutivamente com

JAK1 e a ligação e subsequente ativação da via JAK-STAT. (*The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis*). (Figura 10-A)

Entre os genes alvos que foram modulados apenas no intervalo de 24h e com a progressão do quadro clínico deixaram de ser expressos (figura 10-B), temos o gene que codifica a Molécula de Adesão Intercelular 1 (ICAM1) e que apresenta relação com via de sinalização de citocinas no sistema imunológico. Em um estudo, Lv et al, descreveram que a expressão de ICAM-1 foi regulada positivamente em células endoteliais de camundongos YAP-CKO (camundongos com deleção de YAP) após o desafio com LPS, indicando um aumento na resposta inflamatória e na ativação endotelial. (LV Y et al., 2018)

A via do STAT3 (transdutor de sinal e ativador de transcrição 3) também mostrou-se modulada positivamente no início da infecção. O STAT3 pode desencadear uma variedade de transcrições gênicas em resposta à estimulação de citocinas e fatores de crescimento, que desempenha um papel importante em muitos processos biológicos celulares envolvidos em respostas anti/pró-inflamatórias. Lei e colaboradores (2021) relataram sobre a ativação de STAT3 estar envolvida no prognóstico de pacientes sépticos e que a ativação intra-hepática de STAT3 pode prever o resultado em ratos induzidos por CLP durante a fase aguda da sepse. (LEI W et al., 2021). (figura 10-B),

O eixo CCL2-CCR2 é uma das principais vias de sinalização de quimiocinas que tem recebido atenção especial por sua função no desenvolvimento e progressão de doenças cardiovasculares. Uma grande quantidade de pesquisas em animais e humanos forneceram evidências de que o eixo CCL2-CCR2 é importante na progressão da doença cardiovascular, e o sucesso dos estudos de direcionamento farmacológico do eixo CCL2-CCR2 promete uma transição gradual para ensaios clínicos. (ZHANG H et al, 2022). (figura 10-B)

OSMR (Oncostatin M Receptor) é um gene de codificação de proteínas. Entre suas vias relacionadas estão a sinalização Akt e a sinalização da família Interleucina-6. A ligação OSMR recruta Janus quinases JAK1 e JAK2, levando à ativação de transdutores de sinal e à ativação de fatores de transcrição conhecidos como STATs através de vários locais de ancoragem. Também induzem cascatas de

proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) (quinase relacionada ao sinal extracelular ERK, p38 e c-Jun N-terminal quinase JNK). Além das vias JAK/STAT e MAPK/ERK, as vias fosfatidilinositol-3-quinase/AKT (PI3K/AKT) e proteína quinase C delta (PKC δ) que também são ativadas. (LANTIERI F, BACHETTI T , 2022). (figura 10-B)

O MAP2K6 (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6) também esteve expresso no início da resposta inflamatória. Esta proteína fosforila e ativa p38 MAP quinase em resposta a citocinas inflamatórias ou estresse ambiental. Como um componente essencial da via de transdução de sinal mediada pela p38 MAP quinase, esse gene está envolvido em muitos processos celulares, incluindo ativação da transcrição e apoptose. (*The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis*) (figura 10-B)

7. CONCLUSÃO

O presente estudo sobre o perfil de expressão das vias intracelulares de sinalização induzidas e inibidas de acordo ao momento da infecção e associada a expressão dos microRNAs diferencialmente expressos, miR-8110 e miR-574, podem contribuir para o desenvolvimento de ferramentas precoces para o diagnóstico precoce e preciso da cardiomiopatia séptica, uma vez que os achados estão relacionados a modulação de vias relevantes para o desenvolvimento da CS. A identificação e validação destes biomarcadores *in vivo* contribuirá também para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficazes, preservando a função cardíaca na sepse e, conseqüentemente, prevenindo a CS.

Estes achados reforçam a importância de uma abordagem terapêutica multifacetada no paciente com sepse a fim de modular a resposta à inflamação, restaurar o equilíbrio metabólico, preservar a função cardíaca, contribuindo para um desfecho clínico satisfatório de baixa morbimortalidade.

8. REFERÊNCIAS

ABRAHAM, Edward; SINGER, Mervyn. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Crit Care Med** , [s. l.], n. 10, ed. 35, p. 2408-16, 2007.

ADIB-CONQUY, M; CAVAILLON, J-M. [Host inflammatory and anti-inflammatory response during sepsis]. **Pathol Biol (Paris)**, [s. l.], v. 60, ed. 5, p. 306-13, 2012.

AHMED, Afsar U. et al. Transcriptional Activation of Inflammatory Genes: Mechanistic Insight into Selectivity and Diversity. **Biomolecules**, [s. l.], v. 5, ed. 4, p. 3087–3111, 2015.

AKIRA, Shizuo *et al.* Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, [s. l.], n. 4, ed. 124, p. 783-801, 2006.

AMARAL, Bruna Aguiar do et al. MicroRNAs: biogenesis, functions and its potential role in oral carcinogenesis. **Odontol. Clín.-Cient**, [s. l.], v. 9, ed. 2, p. 105-109, 2010.

ANGUS, D C *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, [s. l.], n. 7, ed. 29, p. 1303-10, 2001.

ANGUS, Derek C; POLL, Tom van der. Severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med** , [s. l.], n. 9, ed. 369, p. 840-51, 2013.

AVLAS, Orna *et al.* Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility. **Antioxid Redox Signal** , [s. l.], n. 7, ed. 15, p. 1895-909, 2010.

BARROS, Lea Lima dos Santos *et al.* Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva. **Cad. saúde colet**, [s. l.], n. 4, ed. 24, 2016.

BAUER, Michael; REINHART, Konrad. Molecular diagnostics of sepsis--where are we today?. **Int J Med Microbiol**, [s. l.], n. 6, ed. 300, p. 411-3, 2010.

BEESELEY , Sarah J *et al.* Septic Cardiomyopathy. **Crit Care Med** , [s. l.], n. 4, ed. 46, p. 625-634, 2018.

BENZ, Fabian Benz *et al.* Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Sepsis. **Int J Mol Sci**, [s. l.], n. 1, ed. 17, 2016.

BERRIOS, Ronaldo A Sevilla *et al.* Correlation of left ventricular systolic dysfunction determined by low ejection fraction and 30-day mortality in patients with severe sepsis and septic shock: a systematic review and meta-analysis. **J Crit Care**, [s. l.], n. 4, ed. 29, p. 495-9, 2014.

BHASKARAN , M; MOHAN, M. MicroRNAs: history, biogenesis, and their evolving role in animal development and disease. **Vet Pathol**, [s. l.], v. 51, ed. 4, p. 759-74, 2014.

BIANCHI, Marco E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of Leukocyte Biology**, [s. l.], v. 81, ed. 1, 2007.

BLACK, Laurence M.; WERSFTDGHGJ, Qwwaedsefgh. Renal Inflammation and Fibrosis: A Double-edged Sword. **J Histochem Cytochem**, [s. l.], n. 9, ed. 67, p. 663–681, 2019.

BLANCO, Jesús *et al.* Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. **Critical Care** , [s. l.], v. 12, ed. 6, 2008.

BLOOS, Frank *et al.* Rapid diagnosis of sepsis. **Virulence** , [s. l.], v. 5, ed. 1, 2013.

BOISSIER, Florence *et al.* Left ventricular systolic dysfunction during septic shock: the role of loading conditions. **Intensive Care Medicine**, [s. l.], v. 43, ed. 5, 2017.

BOSMANN, Markus; WARD, Peter A. The inflammatory response in sepsis. **Trends Immunol**, [s. l.], n. 3, ed. 34, p. 129-36, 2023.

BURGDORFF, A.-M. *et al.* Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. **Journal of International Medical Research**, [s. l.], v. 46, ed. 4, 2018.

CALVANO, Steve E Calvano *et al.* A network-based analysis of systemic inflammation in humans. **Nature**, [s. l.], n. 7061, ed. 437, p. 1032-7, 2005.

CARABALLO, César *et al.* Organ Dysfunction in Sepsis: An Ominous Trajectory From Infection To Death. **Yale J Biol Med** , [s. l.], v. 92, ed. 4, 2019.

CECCONI, Maurizio *et al.* Sepsis and septic shock. **Lancet**, [s. l.], n. 10141, ed. 392, p. 75-87, 2018.

CELES, Mara Rúbia N *et al.* Disruption of sarcolemmal dystrophin and beta-dystroglycan may be a potential mechanism for myocardial dysfunction in severe sepsis. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 90, ed. 4, 2010.

CHAN, James K *et al.* Alarmins: awaiting a clinical response. **J Clin Invest**, [s. l.], v. 122, ed. 8, p. 2711-9, 2012.

CHANDRASEKARAN, Badrinathan; MCDONAGH, Owais Dar, Theresa. The role of apelin in cardiovascular function and heart failure. **Eur J Heart Fail** , [s. l.], n. 8, ed. 10, p. 725-32, 2008.

CHEN, Grace *et al.* NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. **Annu Rev Pathol**, [s. l.], p. 365-98, 2009.

CHEN, HU *et al.* RETRACTED: LncRNA MALAT1 regulates sepsis-induced cardiac inflammation and dysfunction via interaction with miR-125b and p38 MAPK/NFκB. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 55, ed. 69, 2018.

CHEUNG, Gordon YC *et al.* Patogenicidade e virulência de Staphylococcus aureus. **Virulência**, [s. l.], n. 1, ed. 12, p. 547–569, 2021.

CHIN, Chia-Hao *et al.* CytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome. **BMC Systems Biology** , [s. l.], v. 8, ed. 4, 2014.

CHURPEK, Matthew M *et al.* Incidence and Prognostic Value of the Systemic Inflammatory Response Syndrome and Organ Dysfunctions in Ward Patients. **Am J Respir Crit Care Med**, [s. l.], n. 8, ed. 192, p. 958-64, 2015.

CONWAY-MORRIS , Andrew *et al.* Immune Activation in Sepsis. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 34, ed. 1, 2018.

CROSSLAND, Hannah *et al.* The Regulatory Roles of PPARs in Skeletal Muscle Fuel Metabolism and Inflammation: Impact of PPAR Agonism on Muscle in Chronic Disease, Contraction and Sepsis. **Int J Mol Sci**, [s. l.], n. 18, ed. 22, 2021.

CUNNEEN, Jane; CARTWRIGHT, Martina. The puzzle of sepsis: fitting the pieces of the inflammatory response with treatment. **AACN Clin Issues** , [s. l.], n. 1, ed. 15, p. 18-44, 2004.

DEIULIIS, J A *et al.* MicroRNAs as regulators of metabolic disease: pathophysiologic significance and emerging role as biomarkers and therapeutics. **International Journal of Obesity**, [s. l.], v. 40, ed. 1, 2016.

DICK , Sarah A *et al.* Chronic Heart Failure and Inflammation: What Do We Really Know?. **Chronic Heart Failure and Inflammation**, [s. l.], v. 119, ed. 1, 2016.

EHRMAN , Robert R *et al.* Pathophysiology, echocardiographic evaluation, biomarker findings, and prognostic implications of septic cardiomyopathy: a review of the literature. **Crit Care** , [s. l.], n. 1, ed. 22, 2018.

ESPOSITO, Silvano *et al.* Sepsis and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. **J Glob Antimicrob Resist**, [s. l.], ed. 10, p. 204-212, 2017.

ESSANDOH, Kobina *et al.* MiRNA-Mediated Macrophage Polarization and its Potential Role in the Regulation of Inflammatory Response. **Shock**, [s. l.], n. 2, ed. 46, p. 122-31, 2016

FENG, Yan; CHAO, Wei. Receptores toll-like e inflamação miocárdica. **Int J Inflamar**, [s. l.], 2011.

FLIERL, Michael A *et al.* Adverse functions of IL-17A in experimental sepsis. **FASEB J**, [s. l.], n. 7, ed. 22, p. 2198-205, 2008.

FLIERL, Michael A *et al.* Molecular Events in the Cardiomyopathy of Sepsis. **Mol Med**, [s. l.], v. 14, ed. 5-6, p. 327–336, 2008.

FONT, Michael D *et al.* Sepsis and Septic Shock: Basics of diagnosis, pathophysiology and clinical decision making. **Med Clin North Am**, [s. l.], n. 4, ed. 104, p. 573-585, 2020.

FRIEDMAN, Robin C. Friedman *et al.* Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, [s. l.], n. 1, ed. 19, p. 92–105, 2009.

GAIESKI, David F. *et al.* Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Crit Care Med**, [s. l.], n. 5, ed. 41, p. 1167-74, 2013.

GIZA, Dana Elena *et al.* Cellular and viral microRNAs in sepsis: mechanisms of action and clinical applications. **Cell Death Differ**, [s. l.], n. 12, ed. 23, p. 1906-1918, 2016.

GRIFFITHS-JONES, Sam *et al.* MiRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. **Nucleic Acids Res**, [s. l.], ed. 34, p. 140-4, 2006.

GUO, Hailei *et al.* MicroRNA-495 serves as a diagnostic biomarker in patients with sepsis and regulates sepsis-induced inflammation and cardiac dysfunction. **Eur J Med Res**, [s. l.], n. 37, ed. 24, 2019.

HA, Minju; KIM, V. Narry. Regulation of microRNA biogenesis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 8, p. 509–524, 2014.

HAMMOND, Scott M. An overview of microRNAs. **Adv Drug Deliv Rev**, [s. l.], ed. 87, p. 3-14, 2015 .

HAWIGER, J. *et al.* New paradigms in sepsis: from prevention to protection of failing microcirculation. **J Thromb Haemost**, [s. l.], n. 10, ed. 13, p. 1743–1756, 2015.

HAWIGER, Jacek. Heartfelt sepsis: microvascular injury due to genomic storm. **Kardiol Pol** , [s. l.], v. 76, ed. 8, p. 1203-1216, 2018.

HOLLENBERG, Steven M; SINGER, Mervyn. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy. **Nat Rev Cardiol** , [s. l.], n. 6, ed. 18, p. 424-434, 2021.

HOTCHKISS, Richard S; KARL, Irene E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med** , [s. l.], n. 2, ed. 348, p. 138-50, 2003.

HUNTLEY, Rachael P. *et al.* Expanding the horizons of microRNA bioinformatics. **Rna**, v. 24, n. 8, p. 1005–1017, 2018

JEYARAJ , Selvi C *et al.* Rap1 GTPases: an emerging role in the cardiovascular. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 88, ed. 3, 2011.

JIANG, Jiang *et al.* α -Lipoic acid attenuates LPS-induced cardiac dysfunction through a PI3K/Akt-dependent mechanism. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 16, ed. 1, 2013.

JONG, Hanna Katrien de *et al.* The systemic pro-inflammatory response in sepsis. **J Innate Immun**, [s. l.], n. 5, ed. 2, p. 422-30, 2010.

KAKIHANA, Yasuyuki *et al.* Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. **J Intensive Care**, [s. l.], n. 22, ed. 4, 2016.

KIBE, Savitri *et al.* Diagnostic and prognostic biomarkers of sepsis in critical care. **J Antimicrob Chemother**, [s. l.], p. 33-40, 2011.

KRISHNA, Sheila; MILLER, Lloyd S. Innate and adaptive immune responses against *Staphylococcus aureus* skin infections. **Semin Immunopathol** , [s. l.], n. 2, ed. 34, p. 261-80, 2012.

KROL , Jacek *et al.* The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. **Nat Rev Genet**, [s. l.], n. 9, ed. 11, p. 597-610, 2010.

KUMAR, Himanshu; AKIRA, Taro Kawai, Shizuo. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochem Biophys Res Commun** , [s. l.], n. 4, ed. 388, p. 621-5, 2009

LANDESBERG, Giora *et al.* Myocardial Dysfunction in Severe Sepsis and Septic Shock: No Correlation With Inflammatory Cytokines in Real-life Clinical Setting. **Chest**, [s. l.], n. 1, ed. 48, p. 93-102, 2015.

LANTIERI, Francesca; BACHETTI, Tiziana. OSM/OSMR and Interleukin 6 Family Cytokines in Physiological and Pathological Condition. **Int J Mol Sci** , [s. l.], n. 19, ed. 23, 2022.

LEI, Wangrui *et al.* Targeting STAT3: A crucial modulator of sepsis. **J Cell Physiol**, [s. l.], n. 11, ed. 236, p. 7814-7831, 2021.

LEVY, Mitchell M *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, [s. l.], n. 4, ed. 31, p. 1250-6, 2003.

LEWIS, D H *et al.* The immunopathology of sepsis: pathogen recognition, systemic inflammation, the compensatory anti-inflammatory response, and regulatory T cells. **J Vet Intern Med**, [s. l.], n. 3, ed. 26, p. 457-82, 2021.

LI, Hui *et al.* Expression and Purification of a Functional Porcine Soluble Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1. **Anim Biotechnol** , [s. l.], n. 4, ed. 28, p. 237-241, 2017.

LIN, Huan *et al.* Current Status of Septic Cardiomyopathy: Basic Science and Clinical Progress. **Front Pharmacol**, [s. l.], n. 210, ed. 11, 2020.

LIU, Gang *et al.* MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, [s. l.], n. 2, ed. 33, p. 170-7, 2013.

LIU, Shanshan *et al.* Downregulation of miR-574-5p inhibits HK-2 cell viability and predicts the onset of acute kidney injury in sepsis patients. **Insuficiência renal** , [s. l.], v. 43, ed. 1, 2021.

LOBO, Suzana M A *et al.* C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. **Chest**, [s. l.], n. 6, ed. 123, p. 2043-9, 2003.

LOISA, P *et al.* Anti-inflammatory cytokine response and the development of multiple organ failure in severe sepsis. **Acta Anaesthesiol Scand**, [s. l.], n. 3, ed. 47, p. 319-25, 2003.

LU, Nian-Fang *et al.* Elevated Plasma Histone H4 Levels Are an Important Risk Factor in the Development of Septic Cardiomyopathy. **Balkan Med J**, [s. l.], n. 2, ed. 37, p. 72-78, 2020.

LUO, Qiancheng *et al.* Apelin protects against sepsis-induced cardiomyopathy by inhibiting the TLR4 and NLRP3 signaling pathways. **Int J Mol Med** , [s. l.], n. 2, ed. 42, p. 1161-1167, 2018.

LV, Yang *et al.* YAP Controls Endothelial Activation and Vascular Inflammation Through TRAF6. **Circ Res**, [s. l.], n. 1, ed. 123, p. 43-56, 2018.

MACDONALD, J; WEBSTER, H F Galley, N R. Oxidative stress and gene expression in sepsis. **Br J Anaesth**, [s. l.], n. 2, ed. 90, p. 221-32, 2003.

MAEDER, Micha *et al.* Sepsis-associated myocardial dysfunction: diagnostic and prognostic impact of cardiac troponins and natriuretic peptides. **Chest**, [s. l.], n. 5, ed. 129, p. 1349-66, 2006.

MALMSTRÖM, Erik *et al.* The Long Non-Coding Antisense RNA JHDM1D-AS1 Regulates Inflammatory Responses in Human Monocytes. **Front Cell Infect Microbiol**, [s. l.], n. 934313, ed. 12, 2022.

MANETTI, Alice Chiara *et al.* MicroRNAs and Sepsis-Induced Cardiac Dysfunction: A Systematic Review. **Int J Mol Sci**, [s. l.], n. 1, ed. 22, 2020.

MARLIES, Ostermann *et al.* Cardiac Troponin Release is Associated with Biomarkers of Inflammation and Ventricular Dilatation During Critical Illness. **SHOCK**, [s. l.], v. 47, ed. 6, 2017.

MARTIN, L. *et al.* Molekulare Mechanismen, Diagnose und Therapie der septischen Kardiomyopathie. **Heart in sepsis**, [s. l.], v. 66, ed. 7, 2017.

MARTINI, Alvise *et al.* A prospective evaluation of the Infection Probability Score (IPS) in the intensive care unit. **J Infect**, [s. l.], n. 5, ed. 56, p. 313-8, 2008.

MASLOVE, David M; WONG, Hector R. Gene expression profiling in sepsis: timing, tissue, and translational considerations. **Trends Mol Med**, [s. l.], n. 4, ed. 20, p. 204-13, 2014.

MEDZHITOV, R; JANEWAY JR, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunol Rev**, [s. l.], ed. 173, p. 89-97, 2000.

MIGUEL-BAYARRI, V *et al.* Prognostic value of the biomarkers procalcitonin, interleukin-6 and C-reactive protein in severe sepsis. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 36, ed. 8, 2012.

MIOSSEC, Pierre; KOLLS, Jay K. Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. **Nat Rev Drug Discov** , [s. l.], n. 10, ed. 11, p. 763-76, 2012.

MOHR, Ashley M.; MOTT, Justin L. Overview of microRNA biology. **Seminars in Liver Disease**, v. 35, n. 1, p. 3–11, 2015.

MORRIS, Kevin V. *et al.* The rise of regulatory RNA. **Nature Reviews Genetics**, [s. l.], v. 15, ed. 6, 2014.

NDUKA, O Okorie; E PARRILLO, Joseph. The pathophysiology of septic shock. **Crit Care Clin** , [s. l.], n. 4, ed. 25, p. 677-702, 2009.

NEDEVA, Christina *et al.* Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 7, ed. 108, 2019.

O'CONNELL , Ryan M *et al.* MicroRNA Regulation of Inflammatory Responses. **Annual Review of Immunology**, [s. l.], v. 30, ed. 295, 2012.

PARK, Inhye *et al.* C-type lectin receptor CLEC4A2 promotes tissue adaptation of macrophages and protects against atherosclerosis. **Nat Commun**, [s. l.], n. 1, ed. 13, p. 215, 2022.

PARRILLO, J E et al. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann Intern Med**, [s. l.], v. 113, ed. 3, p. 227-42, 1990.

PATHAN, Nazima *et al.* Myocardial depressant effects of interleukin 6 in meningococcal sepsis are regulated by p38 mitogen-activated protein kinase. **Crit Care Med**, [s. l.], n. 7, ed. 39, p. 1692-711, 2011.

PEREZ-VILLA, F *et al.* Elevated levels of serum interleukin-6 are associated with low grade cellular rejection in patients with heart transplantation. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 38, ed. 9, 2006.

PIERRAKOS , Charalampos *et al.* Sepsis biomarkers: a review. **Critical Care volume**, [s. l.], v. 14, ed. 1, 2010.

POGRIBNY, Igor P. MicroRNAs as biomarkers for clinical studies. **Experimental Biology and Medicine**, v. 243, n. 3, p. 283–290, 2018

POLL, Tom van der; OPALA, Steven M. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infect Dis** , [s. l.], n. 1, ed. 8, p. 32-43, 2008.

PÓVOA, P *et al.* C-reactive protein as a marker of infection in critically ill patients. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 11, ed. 2, 2005.

PRZEWLOCKA-KOSMALA, Monika *et al.* Reduced circulating apelin in essential hypertension and its association with cardiac dysfunction. **Journal of Hypertension**, [s. l.], v. 29, ed. 5, 2011.

REINHA, Konrad *et al.* The Burden of Sepsis: A Call in Support of World Sepsis Day 2013. **Department of Anesthesiology and Intensive** , [s. l.], v. 25, ed. 1, 2013.

RITZMANN, Felix *et al.* IL-17 Cytokines and Chronic Lung Diseases. **Cells**, [s. l.], ano 14, ed. 11, 2022.

RUDIGER, Alain ; SINGER, Mervyn. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. **Crit Care Med**, [s. l.], n. 6, ed. 35, p. 1599-608, 2007.

SANFILIPPO, Filippo *et al.* Diastolic dysfunction and mortality in septic patients : a systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Med**, [s. l.], n. 6, ed. 41, p. 1004-13, 2015.

SANKAR, Vinoth; WEBSTER, Nigel R. Clinical application of sepsis biomarkers. **J Anesth**, [s. l.], n. 2, ed. 27, p. 269-83, 2013.

SATO, Ryota *et al.* Prevalence and risk factors of sepsis-induced cardiomyopathy:: A retrospective cohort study. **Medicine (Baltimore)**, [s. l.], n. 39, ed. 95, 2019.

SATO, Ryota; NASU, Michitaka. A review of sepsis-induced cardiomyopathy. **J Intensive Care**, [s. l.], n. 48, ed. 3, 2015.

SCHUETZ, Philipp *et al.* Serum procalcitonin, C-reactive protein and white blood cell levels following hypothermia after cardiac arrest: a retrospective cohort study. **Eur J Clin Invest**, [s. l.], n. 4, ed. 40, p. 376-81, 2010.

SHANG, Xiuling et al. Resveratrol Protects the Myocardium in Sepsis by Activating the Phosphatidylinositol 3-Kinases (PI3K)/AKT/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway and Inhibiting the Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) Signaling Pathway. **Med Sci Monit**, [s. l.], v. 25, p. 9290–9298, 2019.

SIERRA, Rafael; QQEWRTSD, Weqrstdtf. C-reactive protein used as an early indicator of infection in patients with systemic inflammatory response syndrome. **Intensive Care Med**, [s. l.], n. 11, ed. 30, p. 2038-45, 2004.

SINGER, Mervyn *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA Network**, [s. l.], 2016.

SMALE, Stephen T; NATOLI, Gioacchino. Transcriptional control of inflammatory responses. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, [s. l.], n. 11, ed. 6, 2014.

SMITH, Stephanie A. *et al.* How it all starts: initiation of the clotting cascade. **Crit Rev Biochem Mol Biol.**, [s. l.], n. 4, ed. 50, p. 326-336, 2016.

SONG, Mingchen; KELLUM, John A. Interleukin-6. **Crit Care Med**, [s. l.], v. 33, ed. 12, p. 463-5, 2005.

SPONHOLZ, Christoph *et al.* Diagnostic value and prognostic implications of serum procalcitonin after cardiac surgery: a systematic review of the literature. **Crit Care**, [s. l.], n. 5, ed. 10, 2206.

TAKEUCHI, Osamu; AKIRA, Shizuo. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, [s. l.], v. 140, ed. 60, p. 805-20, 2010.

TALWAR, Shefali *et al.* Gene expression profiles of peripheral blood leukocytes after endotoxin challenge in humans. **Physiol Genomics**, [s. l.], n. 2, ed. 25, p. 203-215, 2017.

TANG , Benjamin *et al.* Accuracy of procalcitonin for sepsis diagnosis in critically ill patients: systematic review and meta-analysis. **THE LANCET**, [s. l.], v. 7, ed. 3, 2007.

Taxa MM. Prefácio biomarcadores na doença crítica. **Crit Care Clin.** 2011;27:xiii–xv.

The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analysis. Stelzer G, Rosen R, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Iny Stein T, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary, D, Warshawsky D, Guan - Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M e Lancet D Current Protocols in Bioinformatics(2016), 54:1.30.1 - 1.30.33.

TREIBER, Thomas *et al.* Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. **Nat Rev Mol Cell Biol** , [s. l.], n. 1, ed. 20, p. 5-20, 2019.

TSCHAIKOWSKY, Klaus; WEQREWREER, Wefgfhg. Predictive value of procalcitonin, interleukin-6, and C-reactive protein for survival in postoperative patients with severe sepsis. **J Crit Care**, [s. l.], n. 1, ed. 26, p. 54-64, 2010.

TZENG, Huei-Ping. Negative inotropic effects of high-mobility group box 1 protein in isolated contracting cardiac myocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, [s. l.], n. 3, ed. 294, 2008.

ULLOA, Luis; TRACEY, Kevin J. The "cytokine profile": a code for sepsis. **Trends Mol Med**, [s. l.], n. 2, ed. 11, p. 56-63, 2005.

VIEILLARD-BARON, Antoine *et al.* Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. **Critical Care Medicine**, [s. l.], v. 1701, ed. 6, 10 jun. 2008. VIEILLARD-BARON, A. Septic cardiomyopathy. **Annals of Intensive Care**, [s. l.], v. 1, n. 6, 2011.

VINCENT, Jean-Louis *et al.* Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. **Crit Care Med**, [s. l.], v. 34, ed. 2, p. 344-53, 2006.

VINCENT, Jean-Louis *et al.* Biomarkers in the critically ill patient: C-reactive protein. **ELSEVIER**, [s. l.], v. 241, ed. 51, 27 abr. 2011.

VINCENT, Jean-Louis. Assessment of the worldwide burden of critical illness. the intensive care over nations (ICON) audit, [s. l.], ed. 2, p. 380-6, 2014.

WANG , Huijuan *et al.* Serum miR-574-5p: a prognostic predictor of sepsis patients. **Shock**, [s. l.], v. 37, ed. 3, 2012.

WANG, Zhen *et al.* CCL24/CCR3 axis plays a central role in angiotensin II-induced heart failure by stimulating M2 macrophage polarization and fibroblast activation. **Cell Biol Toxicol** , [s. l.], 2022.

WEAVER, Casey T *et al.* IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages. **Annu Rev Immunol** , [s. l.], ed. 25, p. 821-52, 2007.

WU, Jiangbin *et al.* MicroRNA-574 regulates FAM210A expression and influences pathological cardiac remodeling. **EMBO Molecular Medicine**, [s. l.], v. 13, ed. 2, 2021.

YANG , Wuhai. Eletrólitos Eutéticos Hidratados com Solvation Shells Orientados a Ligantes para Baterias Orgânicas de Zinco de Ciclagem Longa. **JOULE**, [s. l.], 15 jul. 2020.

ZHANG, Haixia *et al.* Role of the CCL2-CCR2 axis in cardiovascular disease: Pathogenesis and clinical implications. **Front Immunol** , [s. l.], ed. 13, 2022.

ZHANG, Qichun *et al.* Hydrated Eutectic Electrolytes with Ligand-Oriented Solvation Shells for Long-Cycling Zinc-Organic Batteries. **CityU Scholars A Research Hub of Excellence**, [s. l.], v. 4, n. 1557-1574, ed. 7, 1 maio 2020.

ZHANG, Yun-yu; NING, Bo-tao. Signaling pathways and intervention therapies in sepsis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [s. l.], 2021.

ZHOU, Qun *et al.* Apelin/APJ system: A novel therapeutic target for oxidative stress-related inflammatory diseases (Review). **Int J Mol Med**, [s. l.], n. 5, ed. 37, p. 1159-69, 2016.

ZHU, Jiang *et al.* The Bacterial Component Flagellin Induces Anti-Sepsis Protection Through TLR-5, IL-1RN and VCAN During Polymicrobial Sepsis in Mice. **Cell Physiol Biochem** , [s. l.], n. 2, ed. 36, p. 446-56, 2015.

ZHU, Jingfa *et al.* MicroRNA-98 protects sepsis mice from cardiac dysfunction, liver and lung injury by negatively regulating HMGA2 through inhibiting NF- κ B signaling pathway. **Cell cycle**, [s. l.], v. 18, ed. 16, 2019.

ZHUANG, Y-T Zhuang *et al.* IL-6 induced lncRNA MALAT1 enhances TNF- α expression in LPS-induced septic cardiomyocytes via activation of SAA3. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, [s. l.], n. 2, ed. 21, p. 302-309, 2017.