



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:

FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

Naiara de Assis Rabelo Ribeiro

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR
(PVAT) EM AORTAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A SEPSE AGUDA**

Belo Horizonte

2020

Naiara de Assis Rabelo Ribeiro

**CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR
(PVAT) EM AORTAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A SEPSE AGUDA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia e Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura

Belo Horizonte

2020

043

Ribeiro, Naiara de Assis Rabelo.

Caracterização do efeito do tecido adiposo perivascular (PVAT) em aortas de camundongos submetidos a sepse aguda [manuscrito] / Naiara de Assis Rabelo Ribeiro. – 2020.

87 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia e Farmacologia.

1. Tecido Adiposo. 2. Vasos Sanguíneos. 3. Aorta. 4. Sepse. 5. Ciclo-Oxygenase 2. 6. Estresse Oxidativo. I. Bonaventura, Daniella. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 532 DE NAIARA DE ASSIS RABELO RIBEIRO

"CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR (PVAT) EM AORTAS DE CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A SEPSE AGUDA"

NAIARA DE ASSIS RABELO RIBEIRO

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia **04 de dezembro de 2020**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Steyner de França Côrtes - ICB/UFMG

Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini - ICB/UFMG

Profa. Dra. Daniella Bonaventura - ICB/UFMG - Orientadora

Belo Horizonte, 04 de dezembro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Steyner de Franca Cortes, Professor do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciano dos Santos Aggum Capettini, Professor do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 04/12/2020, às 17:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0426417** e o código CRC **BF6F34E6**.

Dedico este trabalho aos meus pais, Elen e Renê, em agradecimento a TUDO o que eles fizeram e fazem por mim! Serei eternamente grata! Também dedico ao meu irmão Pedro, à minha Vó Zezé e ao Vô Adão. A toda a minha família, ao Vini, meu amor, e a todos meus amigos. Sem todos vocês essa caminhada não teria sido possível e graças a vocês toda conquista vale a pena!

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.” (Arthur Schopenhauer)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço a Deus e a Nossa Senhora por me abençoarem com saúde e vitalidade para que eu vencesse cada dia, cada desafio e incertezas.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Daniella Bonaventura, por ter me recebido e acolhido em seu laboratório; nosso laboratório (LFV), onde passei quatro anos cheios de aprendizado. Dani, agradeço por ter me dado a oportunidade de trabalhar sob sua supervisão com sugestões sempre relevantes, por todos os ensinamentos científico, didático e pessoal que você me forneceu. Agradeço também por muitas vezes você acalmar meu coração, me sugerindo novas alternativas. Obrigada por tudo!

Agradeço do fundo da minha alma aos meus primeiros mestres, meus queridos e amados pais, Elen e Renê. Vocês são exemplos de força, caráter, fé, amor e dedicação em tudo que se propõem a fazer, não tenho palavras para agradecer vocês por tudo. Obrigada por sempre me apoiar e se esforçarem ao máximo para que eu pudesse alçar voos altos. Amo muito vocês! Agradeço ao meu irmão, Pedro por sua cumplicidade, parceria e por sua alegria! Te amo! Vovó Zezé obrigada pela torcida, pelas orações e preocupações, amo a senhora! Vovô Adão, ao senhor todo o meu amor. Também agradeço a toda minha família, pelas boas vibrações e orações. Vocês são essenciais. Vini, meu amor, agradeço, por em tão pouco tempo, você ser presença constante nos meus dias se preocupando, me ouvindo desabafar e auxiliando em TUDO. AMO VOCÊ!

Agradeço às minhas amigas e parceiras do nosso “**LAR**boratório” LFV. Nati, Bia, Little e Dani, vocês têm toda a minha gratidão e carinho. Obrigada por cada segundo que passamos juntas, pelos estudos astrológicos, por cada angústia e dúvidas que vocês ajudaram a sanar, pelas discussões de ideias e resultados, pelos desabafos, pelas boas risadas e conversas, pelos momentos fora do lab, pela amizade/irmandade linda que construímos e por fim pelo lindo trabalho que produzimos juntas, afinal esse projeto não é só meu, é nosso. Nati, te agradeço por ter sido minha inspiração como profissional, por ter me trazido

para o mundo da pesquisa, por ter me levado pela mão ao nosso lab e por ter sido minha “coorientadora” e mais que meu braço direito, minhas duas mãos, obrigada por toda sua dedicação para que este projeto se concretizasse! Minha gratidão eterna a você. Little/Natinha, obrigada por todas as nossas conversas, risadas, desabafos, ideias para projetos, pela nossa sintonia, parceria ímpar e divertida, pela cumplicidade, por me salvar sempre que preciso, pelas ligações pedindo socorro e pela sua ajuda em TUDO, aprendi/aprendo/aprenderei MUITOOOOO com você! Dani, obrigada por ser esse ponto de boas energias e carinho, pelas dicas maravilhosas e por suas palavras afagam e seu abraço que vigora, obrigada pelas risadas que desopilam e por tudo!

Agradeço às amigas que o mestrado me proporcionou. Belinha, QUASE integrante do LFV, obrigada por seu carinho e por todos os almoços juntas. Netas do Zezé, AMOOO VOCÊS!!!

Obrigada minhas taurinas favoritas Cissa, Thaís e Karol, pela amizade, pelas conversas, desabafos e parceria sempre!

Agradeço também às “Nayaras” da minha vida (Nadir Nayara e Nayara Gustavo), pela amizade e por todo o apoio desde sempre e principalmente ao nosso TCC sobre PVAT e Sepse!

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia. Aos funcionários do ICB, principalmente ao Rinaldo, bioterista da Farmacologia, um excelente profissional e uma grande pessoa, minha sincera gratidão a você.

Aos professores da banca, Prof. Dr. Steyner de França Côrtes e Prof. Dr. Luciano dos Santos Aggum Capettini pelo aceite em avaliar este trabalho.

Às agências de fomento, CNPq, FAPEMIG e CAPES pelo apoio financeiro. E à UFMG, universidade pública de qualidade, onde foi desenvolvido todo esse projeto.

Aos animais, meu profundo respeito e gratidão.

RESUMO

O tecido adiposo perivascular (PVAT) reveste a camada adventícia e envolve a maioria dos vasos sanguíneos. O PVAT libera moléculas biologicamente ativas que regulam o tônus vascular. Sabendo da importância desse tecido no controle do tônus vascular e que a hipotensão sistêmica, gerada em um quadro de sepse, é a principal causa de morte, o objetivo desse trabalho foi estudar os efeitos vasoativos e inflamatórios do PVAT na hiporreatividade aórtica induzida por sepse aguda. Para tanto, utilizou-se camundongos Balb/c machos (8 semanas), que foram divididos em dois grupos: sham e séptico. No grupo séptico, a sepse foi induzida por ligadura e perfuração transversal do ceco com agulha 26G. No grupo sham, a etapa de perfuração transversal do ceco não foi realizada. 6 horas após a indução da sepse, o papel do PVAT no tônus vascular foi avaliado em aortas torácicas dos grupos sham e séptico. Nossos resultados demonstram que apesar dos grupos sham e séptico apresentarem 100% de sobrevivência, o grupo séptico apresentou leucopenia marcada por neutropenia, hipotermia, hipotensão arterial e alta pontuação de escore clínico quando comparado ao grupo sham. A vasoconstrição induzida por fenilefrina foi significativamente reduzida no grupo séptico em comparação ao grupo sham na ausência de PVAT. Entretanto, na presença do PVAT, o prejuízo na contratilidade vascular observado no grupo séptico foi reestabelecido. Ou seja, o PVAT apresentou um perfil vasoconstritor, se contrapondo a hiporreatividade causada pela sepse. Entre os mecanismos envolvidos nesse processo, sugerimos uma regulação recíproca entre espécies reativas de oxigênio, neste caso, ânion superóxido, gerado provavelmente a partir do complexo NADPH oxidase, e que por uma cascata de autoperpetuação, a COX-2 e seus derivados vasocontráteis, como tromboxano A₂ e prostaglandina F_{2α} também atuam “alimentando” essa via. Portanto sugerimos que o perfil contrátil apresentado pelo PVAT na sepse aguda (6h) se deva principalmente à participação de ânions superóxido, além de derivados da COX-2 e que ambos “autoalimentam” o ciclo favorecendo a contração observada.

PALAVRAS-CHAVE: PVAT, Sepse, hiporreatividade, COX, estresse oxidativo.

ABSTRACT

Perivascular adipose tissue (PVAT) lines the adventitial layer and surrounds most blood vessels. PVAT releases biologically active molecules that regulate vascular tone. Knowing the importance of this tissue in the control of vascular tone and that the systemic hypotension, generated in a case of sepsis, is the main cause of death, this study aimed to study the vasoactive and inflammatory effects of PVAT on aortic hyporeactivity induced by acute sepsis. For this purpose, male Balb / c mice (8 weeks) were used, which were divided into two groups: sham and septic. In the septic group, sepsis was induced by ligation and transverse perforation of the cecum with a 26G needle. In the sham group, the transverse perforation step of the cecum was not performed. 6 hours after sepsis induction, the role of PVAT in vascular tone was assessed in thoracic aortas of the sham and septic groups. Our results demonstrate that although the sham and septic groups have 100% survival, the septic group presented leukopenia marked by neutropenia, hypothermia, arterial hypotension, and a high clinical score when compared to the sham group. Phenylephrine-induced vasoconstriction was significantly reduced in the septic group compared to the sham group in the absence of PVAT. However, in the presence of PVAT, the impairment of vascular contractility observed in the septic group was reestablished. In other words, PVAT presented a vasoconstrictor profile, in contrast to the hyporeactivity caused by sepsis. Among the mechanisms involved in this process, we suggest a reciprocal regulation between reactive oxygen species, in this case, superoxide anion, probably generated from the NADPH oxidase complex, and that by a self-perpetuating cascade, COX-2 and its vasocontractable derivatives, as thromboxane A₂ and prostaglandin F_{2α} also act "feeding" this pathway. Therefore, we suggest that the contractile profile presented by PVAT in acute sepsis (6h) is mainly due to the participation of superoxide anions, in addition to derivatives of COX-2 and that both "feed" the cycle favoring the observed contraction.

KEYWORDS: PVAT, Sepsis, hyporeactivity, COX, oxidative stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Conceito atualizado Sepsis-3.....	18
Figura 2: Modelo revisado da inflamação na sepse-3.	19
Figura 3: Esquema que demonstra a relação entre leucócito-endotélio nos vasos sanguíneos.	23
Figura 4: Esquema de fagocitose e destruição intracelular dos microrganismos.....	24
Figura 5: Eicosanoides derivados do ácido araquidônico.	26
Figura 6: Ligadura e perfuração do ceco (CLP).	28
Figura 7: Esquema representando os diferentes tipos de PVAT e sua localização no organismo.	29
Figura 8: Substâncias liberadas pelo PVAT.	30
Figura 9: Desacoplamento da eNOS e aumento de NAPH oxidase na formação de ânion superóxido no PVAT.	34
Figura 10: Desenho esquemático de uma preparação do anel arterial em um banho de órgãos.	39
Figura 11: Escore clínico.	43
Figura 12: Percentual de sobrevivência dos animais submetidos a sepse e seus controles.	44
Figura 13: Avaliação temporal da pressão arterial sistólica (PAS) (A) e Delta da variação da PAS (B) dos grupos sham e séptico.	45
Figura 14: Avaliação temporal da temperatura dos grupos sham e séptico. ...	46
Figura 15: Contagem de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) dos grupos experimentais.	47
Figura 16: Peso dos baços dos grupos experimentais.	48
Figura 17: Contração vascular induzida por PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais após 6 horas da indução da sepse.	49
Figura 18: Análise do envolvimento de ânion superóxido, na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas com PVAT dos grupos experimentais. ...	51
Figura 19: Imagens representativas dos níveis de O_2^- presentes em aortas de animais sham e séptico.	52

Figura 20: Quantificação, <i>in situ</i> , da produção de O_2^- em preparações de sham e séptico.	53
Figura 21: Efeito da inibição do NADPH oxidase por apocinina, na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas com PVAT dos grupos experimentais.	54
Figura 22: Imagens representativas dos níveis de O_2^- presentes em aortas de animais sham, séptico e séptico + apocinina.	56
Figura 23: Quantificação, <i>in situ</i> , da produção de O_2^- em preparações de sham, séptico e séptico + apocinina.	57
Figura 24: Avaliação da participação da enzima ciclooxygenase (COX) na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.	58
Figura 25: Avaliação da participação da enzima COX-2 na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.	60
Figura 26: Imagens representativas dos níveis de O_2^- presentes em aortas de animais sham, séptico e séptico + nimesulida.	61
Figura 27: Quantificação, <i>in situ</i> , da produção de O_2^- em preparações de sham, séptico e séptico + nimesulida.	62
Figura 28: Efeito da participação de Tromboxano A_2 , na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.	63
Figura 29: Efeito da participação de prostaglandina $F_{2\alpha}$, na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.	64
Figura 30: Desenho esquemático sugerindo a relação recíproca entre ROS (O_2^-) e COX-2 no perfil vasocontrátil do PVAT na sepse aguda (6h).	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Grau Celsius (unidade de temperatura)
µL	microlitro (unidade de volume)
µmol/L	microcomol por litro (unidade de concentração)
AA	Ácido araquidônico
ADRF	Fator Relaxante Derivado dos Adipócitos
Ang II	Angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
AP-1	Ativação da proteína 1
APACHE	<i>Acute Physiology and Chronic Health Evaluation</i> - Avaliação aguda de fisiologia e avaliação de saúde crônica
BASES	Estudo Epidemiológico Brasileiro de Seps
BAT	Tecido Adiposo Marrom
BH ₂	Di-hidrobiopterina
BH ₄	Tetra-hidrobiopterina
CaCl ₂	Cloreto de Cálcio
CCL2/MCP-1	Proteína quimioatraente de monócitos
CCL5/RANTES	Quimiocinas que recrutam células T
CLP	<i>Cecal Ligation and Puncture</i> - Ligadura e perfuração do ceco
cNOS	Óxido Nítrico Sintase constitutiva
COX	Ciclooxigenase

DAMPs	Padrões moleculares associados aos danos
DHE	Diidroetidina
E _{max}	Efeito máximo
eNOS	Óxido Nítrico Sintase constitutiva endotelial
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
G	Gauge (calibre agulha)
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclica
gp91 ^{phox}	Subunidade catalítica de NADPH oxidase
GTP	Trifosfato de guanosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ S	Sulfeto de hidrogênio
IL-1, 6 e 8	Interleucinas
ILAS	Instituto Latino Americano de Sepsis
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
KCl	Cloreto de Potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato Monopotássico
LPS	Lipopolissacarídeos
LTA	Ácido lipoteicoico
MgSO ₄	Sulfato de Magnésio
mg/dL	Miligrama por decilitro (unidade de concentração)

mmHg	Milímetros de mercúrio (unidade de pressão)
mmol/L	Milimol por litro (unidade de concentração)
mol/L	Mol por litro (unidade de concentração)
n	Número de indivíduos da amostra
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH oxidase	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
NF-κB	Fator nuclear κB
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintases
O ²⁻	Ânion superóxido
OCT	Composto para temperatura de corte ideal
ONOO ⁻	Peroxinitrito
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PAS	Pressão arterial sistólica
PD	Pressão diastólica
pD ₂	potência do fármaco (-log EC ₅₀)
PE	Fenilefrina
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂

PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	Prostaciclina
PKG	Proteína quinase G
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrão
PVAT	Tecido Adiposo Perivascular
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SEPSIS-3	Terceiro Consenso Internacional para Seps e Choque Séptico
SL	Sub-letal
SOFA	Avaliação de falência de órgão sequencial
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona
SSC	Campanha de Sobrevivência a Seps
TLR	Toll-like receptor
TNF-α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TXA ₂	Tromboxano A ₂
US\$	Dólar dos Estados Unidos
UTIs	Unidades de tratamento intensivo
WAT	Tecido Adiposo Branco
WHO	Organização Mundial da Saúde

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 ORIGEM DO TERMO SEPSE	17
1.2 INFECÇÃO, SEPSE E CHOQUE SÉPTICO:	17
1.3 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE NO BRASIL E NO MUNDO:	19
1.4 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE:	21
1.5 MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA SEPSE.....	27
1.6 O TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR (PVAT)	28
1.7 PARTICIPAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR (PVAT) NA SEPSE	31
2. OBJETIVOS	34
3. MATERIAL E MÉTODOS	35
3.1 Animais	35
3.2 Modelo experimental de sepse polimicrobiana por CLP (Cecal Ligation and Puncture)	35
3.3 Escore clínico.....	36
3.4 Curva de sobrevivência	36
3.5 Registro da Pressão Arterial	36
3.6 Aferição de temperatura.....	37
3.7 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	37
3.8 Avaliação do peso do baço	38
3.9 Montagem de preparações isoladas	38
3.10 Reatividade Vascular	39
3.10.1 Estudo da contração induzida pela fenilefrina (PE) em anéis de aorta com e sem PVAT:.....	39
3.10.2 Estudo da participação de estresse oxidativo na resposta vascular induzida pelo PVAT em aortas de animais sépticos:	40
3.10.3 Estudo da participação de NADPH oxidase na contração induzida pela PE em anéis de aorta com PVAT:.....	40
3.10.4 Estudo da participação de prostanoídes no efeito vascular desempenhado pelo PVAT em animais sépticos:.....	40
3.11 Ensaio de fluorescência	41
3.11.1 Preparo das Lâminas – Gelatinização	41
3.11.2 Preparação das aortas para realização dos experimentos de fluorescência.....	41
3.11.3 Determinação e quantificação da produção de O ₂ ⁻ em aortas de animais sham e sépticos, na presença ou não de nimesulida e apocinina.....	41

3.12 Análise estatística	42
4. RESULTADOS	43
4.1 Escore clínico.....	43
4.2 Curva de Sobrevida	44
4.3 Pressão Arterial Sistólica (PAS).....	44
4.4 Temperatura.....	45
4.5 Contagem total e diferencial de leucócitos.....	46
4.6 Peso do baço corrigido pelo comprimento da tíbia	47
4.7 Resultados de Reatividade Vascular	48
4.7.1 Papel do PVAT na contração induzida por um agente vasoconstritor, receptor-dependente, em aortas de camundongos submetidos à 6 horas de sepse.	48
4.7.2 Participação de ânion superóxido no perfil contrátil do PVAT na contração induzida por um agente vasoconstritor, receptor-dependente, em aortas de camundongos.	50
4.7.3 Determinação e quantificação da produção de O_2^- em aortas de animais sham e sépticos.....	52
4.7.4 Participação do complexo NADPH oxidase no perfil contrátil do PVAT na contração induzida por fenilefrina em aortas de camundongos.....	53
4.7.5 Determinação e quantificação da produção de O_2^- em aortas de animais sham e sépticos, na presença ou não de apocinina.....	55
4.7.6 Participação da COX no perfil contrátil do PVAT em aortas de camundongos.	57
4.7.7 Participação da COX-2 no perfil contrátil do PVAT na contração induzida por PE em aortas de camundongos.	59
4.7.8 Determinação e quantificação da produção de O_2^- em aortas de animais sham e sépticos, na presença ou não de nimesulida.....	61
4.7.9 Participação de derivados vasoativos da COX-2 no perfil contrátil do PVAT na contração induzida por um agente vasoconstritor, receptor-dependente, em aortas de camundongos.....	63
5. DISCUSSÃO	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
7. AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO.....	87

1. INTRODUÇÃO

1.1 ORIGEM DO TERMO SEPSE

O termo sepse, originada do grego *septikós*, *que* significa putrefação, foi citado pela primeira vez nos poemas de Homero (700 a.C.), descrito por Hipócrates, considerado o pai da medicina. Esse termo era utilizado para se referir a casos de putrefação que poderiam ocorrer no organismo, sendo relacionados com doença e morte. Marcus Terentius Varro, escritor romano em 100 a.C., citou que pequenas criaturas, invisíveis aos olhos, que preenchem a atmosfera, poderiam causar doenças perigosas se inaladas. A sepse, desde os tempos antigos, é considerada uma síndrome complexa de se diagnosticar, por apresentar sintomas semelhantes a outras doenças, como citado pelo historiador, filósofo, humanista e autor renascentista Niccolò Maquiavel (1469-1527), em seu livro “O Príncipe” (1513), que ocorre “uma febre agitada, em seu início, difícil de reconhecer, mas fácil de tratar”. A partir daí, o termo sepse foi associado a alterações clínicas relacionadas, principalmente a uma infecção bacteriana. A sepse, gerou impactos importantes na história mundial, uma vez que dizimou um terço da população europeia no século XIV, na epidemia da peste em sua forma septicêmica (SALLES et al., 1999; MARTIN, 2012; ILAS, 2015).

Para melhor compreender a sepse no âmbito clínico, várias definições foram elaboradas no século passado, como por exemplo por se tratar de uma resposta do hospedeiro a uma infecção, como observado pelo médico americano William Osler (1849-1919), em que o paciente parece morrer devido à falta da resposta do corpo a uma infecção e não da infecção em si. Em 1972, essa definição de sepse foi reformulada e considerada que a “nossa resposta que faz a doença” (MARTIN, 2012).

1.2 INFECÇÃO, SEPSE E CHOQUE SÉPTICO:

Segundo o Terceiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico (*SEPSIS-3*), em 2016, a sepse foi definida como uma disfunção ameaçadora à vida em decorrência de resposta desregulada à infecção (SINGER, 2016). A partir desse consenso, as nomenclaturas selecionadas com base nas diretrizes da Campanha de Sobrevivência a Sepse (SSC-Surviving Sepsis Campaign), são: infecção, sepse e choque séptico. A sepse é uma

síndrome que é determinada tanto por fatores patogênicos quanto por fatores do hospedeiro, como sexo, raça, idade e fatores genéticos. Ela é causada por bactérias, vírus, fungos ou protozoários (ILAS, 2015). O que diferencia a sepse da infecção é uma resposta exacerbada do hospedeiro (SINGER, 2016).

Essas novas definições e critérios dessa síndrome (*SEPSIS-3*), foram divulgados em fevereiro de 2016 (SINGER, 2016). O novo conceito, que está mais focado na disfunção orgânica, preconiza que seja utilizado um score de disfunção/falência orgânica, o “*Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*”, para diagnosticar a sepse. Um paciente com sepse teria uma variação maior ou igual a 2 pontos SOFA, como visto na figura 1 (CARNEIRO; PÓVOA; GOMES, 2017).

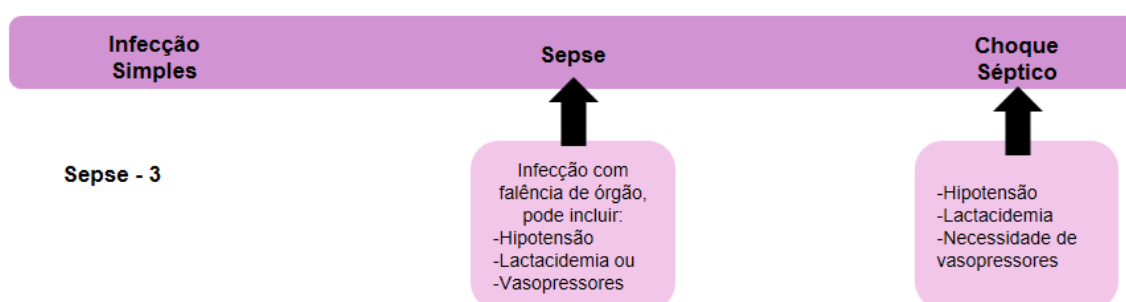


Figura 1: Conceito atualizado Sepsis-3. Adaptado de Carneiro, Póvoa e Gomes (2017).

Seguindo neste contexto, alguns trabalhos presentes na literatura questionam o modelo bifásico da sepse, ou seja, o modelo que descreve uma resposta inflamatória inicial exacerbada seguida de uma paralisia imune prolongada, resultando em aumento da morbimortalidade (DENSTAEDT; SINGER; STANDIFORD, 2018; DING; MENG; MA, 2018). Esse questionamento existe, pois já é bem conhecido que a resposta imune séptica não se ajusta a uma linha do tempo linear de inflamação aumentada com progressão para imunidade comprometida. Esse fato se dá pela sepse ser uma sequência heterogênea de situações imunes pró e anti-inflamatórias, que ocorrem de forma simultânea. Em outras palavras, por exemplo na fase aguda da sepse, não ocorre processos inflamatórios exacerbados somente, podendo ocorrer quadros hipo-inflamatórios e até um quadro de imunossupressão. Assim como na fase crônica, a resolução da inflamação é esperada, entretanto pode ocorrer uma inflamação persistente ou mesmo uma falha no processo inflamatório, devido a uma imunossupressão. O modelo da figura 2, mostra essa heterogeneidade

ilustrando a natureza simultânea desses processos. Temos como exemplo as citocinas, elas não se comportam de forma dicotomizada, ou seja, uma citocina pode contribuir para a sobrevivência, mas também pode estar presente na morte (DENSTAEDT; SINGER; STANDIFORD, 2018; DING; MENG; MA, 2018).

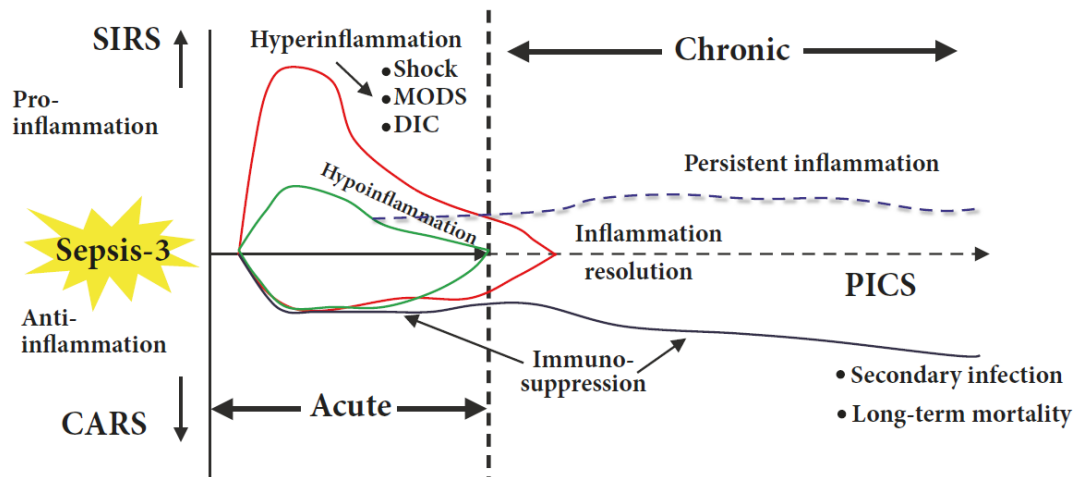


Figura 2: Modelo revisado da inflamação na sepse-3. (DING; MENG; MA, 2018).

A ausência de reconhecimento no início da síndrome facilita a evolução para a ocorrência de disfunção múltipla de órgãos/sistemas, com estágios crescentes e progressivos, podendo evoluir para o estágio mais grave, choque séptico, caracterizado por alterações circulatórias e hipovolemia responsáveis pela hipotensão persistente. O choque séptico pode ser definido, como um subconjunto da sepse, ocorrendo alterações metabólicas e circulatórias associadas a um maior risco de mortalidade do que quando comparado a sepse isolada. O choque séptico pode ser identificado quando há presença de hipotensão persistente (pressão sistólica menor ou igual a 65 mmHg), além de elevados níveis de lactato (maiores que 2 mmol/L ou 18 mg/dL), como é possível verificar na figura 1 (ILAS, 2015; HENKIN, et al., 2009; GOTUR, 2018; SINGER, 2016).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DA SEPSE NO BRASIL E NO MUNDO:

O estudo da sepse é muito importante, uma vez que essa síndrome é considerada o fator mais recorrente de admissão nas unidades de tratamento intensivo (UTIs) não coronarianas. Apresenta também alta morbi/mortalidade e

é a principal causa de morte nessas UTIs, sendo necessário considerar, este, um importante problema de saúde pública e um grande desafio para organizações de saúde (BARRETO, 2016).

A estimativa realizada pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS, 2017) é que cerca de 55,7% dos pacientes internados nas UTIs morrem por sepse. Essa altíssima taxa de mortalidade supera inclusive óbitos por acidente vascular encefálico e infarto agudo do miocárdio. Segundo Gotur (2018), a cada ano há em média 30 milhões de casos de sepse, provocando 6 milhões de mortes em todo o mundo (GOTUR, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

Um estudo realizado nas UTIs brasileiras mostrou que os casos de sepse ainda são subnotificados e que há uma grande dificuldade em se encontrar estudos epidemiológicos brasileiros mais atuais, mas dentre os disponíveis, os resultados mostram que as taxas de óbitos superam às encontradas nos demais países (BEALE et al., 2009). Um importante e impactante estudo feito em 2004, (Estudo Epidemiológico Brasileiro de Sepse - estudo BASES) mostrou que a incidência de ocorrência de sepse é de 57 para cada 1000 pacientes internados em UTIs. Além desse fato, a mortalidade em casos de choque séptico pode alcançar 52,2% (SILVA et al., 2004), superando as taxas encontradas nos demais países (BEALE, 2009).

Neste contexto, essa síndrome gera altos custos para o tratamento, isso se deve às demandas dessa condição, como por exemplo a terapia para disfunção orgânica, medicamentos que apresentam um alto custo e além disso é necessário um acompanhamento completo do paciente pela equipe de saúde. Os gastos foram em torno de US\$ 20,3 bilhões de dólares, somente no ano de 2011, como relatou a Agência de Pesquisa e Qualidade em Assistência à Saúde, nos Estados Unidos (BARRETO, 2016).

Segundo o ILAS (2015), a estimativa é que do custo total das UTIs, cerca de 20% a 40% são destinados aos cuidados com pacientes sépticos, apresentando relação com a gravidade e o tempo de internação. No Brasil, estudos estimaram que são gastos 9,6 mil dólares por paciente com sepse (ILAS, 2015). Portanto, essa síndrome é um grave problema de saúde pública, já que a mortalidade causada por ela tem aumentado anualmente, merecendo maior atenção por parte dos governos vigentes e devendo ser vista como prioridade

global de saúde (ILAS, 2015; ILAS, 2017; ZIEGLER, 2017; HENKIN, et al., 2009; BARROS, MAIA, MONTEIRO, 2016; GOTUR, 2018).

1.4 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE:

A resposta da sepsé é um mecanismo básico de defesa desencadeado pelo hospedeiro na tentativa de combater a entrada de um agente infeccioso, como por exemplo fungos, vírus e bactérias. Cada agente infeccioso ativa o sistema imunológico do hospedeiro de forma diferente, por apresentar fatores de virulência diferentes (KUMAR et al. 2013). As bactérias gram-negativas, por exemplo, apresentam como um dos fatores de virulência os lipopolissacarídeos (LPS) (RAMACHANDRAN, 2013), enquanto as bactérias gram-positivas ativam o sistema imune do hospedeiro devido ao ácido lipoteicoico (LTA) (PERCY; GRÜNDLING, 2014), ambos presentes na membrana externa destas bactérias e essenciais para a sobrevivência bacteriana (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Esses componentes bacterianos, que também podem ser chamados de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), ativam o sistema imune inato do hospedeiro, por serem reconhecidos por receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (RAMACHANDRAN, 2013). Os PRRs são expressos na superfície de fagócitos (macrófagos e neutrófilos) e células dendríticas. Quando esses receptores associados a células interagem aos PAMPs e DAMPs (padrões moleculares associados aos danos) promovem a ativação de vias de transdução de sinal e estimulam funções antimicrobianas e pró-inflamatórias nas células (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Um dos exemplos mais conhecidos de PRRs são os receptores do tipo Toll (Toll-like receptor - TLR). TLRs reconhecem muitos componentes de microrganismos, além de moléculas expressas e liberadas por células que estão em situação de estresse ou morte. Existem nove tipos distintos de TLR em humanos, o LPS é reconhecido pelo TLR4 (*Toll-like receptor 4*). Quando há esse reconhecimento, ocorre uma ativação de vias de sinalização e fatores de transcrição, como por exemplo o fator nuclear κ B (NF- κ B), que vão induzir a expressão de genes essenciais nas respostas inflamatórias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Alguns estudos mencionam que a ativação desse fator nuclear é um evento chave na patogênese da sepsé (LUSH; CEPINSKAS;

KVIETYS, 2003). Além do NF- κ B, há também a ativação da proteína 1 (AP-1). Ambos codificam moléculas inflamatórias relevantes, como as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 e IL-6, quimiocinas, como CXCL1 e CCL2 que podem atuar aumentando a afinidade das integrinas pelos leucócitos e auxiliam no movimento direcional dessas células de defesa ao local de infecção. Ocorre também o aumento de expressão de moléculas de adesão, como a E-selectina (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; SILVEIRA, FERREIRA, LAGE, 2014).

Tais citocinas desencadeiam também aumento da proliferação de moléculas de adesão nas células endoteliais vasculares, ativando-as, facilitando com que os leucócitos cheguem ao local de infecção (ROSSI, 2015; SILVEIRA, FERREIRA, LAGE, 2014). Essa interação entre os leucócitos e o endotélio ocorrem com uma família de moléculas de adesão denominadas selectinas, entre elas: E e P-selectinas (ROSSI, 2015). TNF- α e IL-1 estimulam a expressão de E-selectinas, enquanto que outros mediadores induzem a expressão de P-selectinas. Sendo assim, ligantes de E e P-selectinas presente nos leucócitos, se ligam às selectinas no endotélio. Essa ligação entre leucócito-endotélio tem baixa afinidade se desfazendo facilmente devido ao fluxo sanguíneo e se ligam em outra por toda a extensão do endotélio, fazendo então com que os leucócitos realizem o rolamento (*rolling*) até o local de infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; MCEVER, 2015, ROSSI, 2015). O tecido submetido a infecção acaba produzindo quimiocinas que interagem com receptores de leucócitos que estão no processo de rolamento, ativando integrinas, que são uma família de moléculas de adesão que formam uma forte ligação dos leucócitos com o endotélio. A partir dessa firme adesão, os leucócitos são capazes de atravessar as junções entre as células endoteliais se transportando do compartimento intravascular para o extravascular, encontrando o local da inflamação, como pode ser visualizado na figura 3 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ROSSI, 2015).

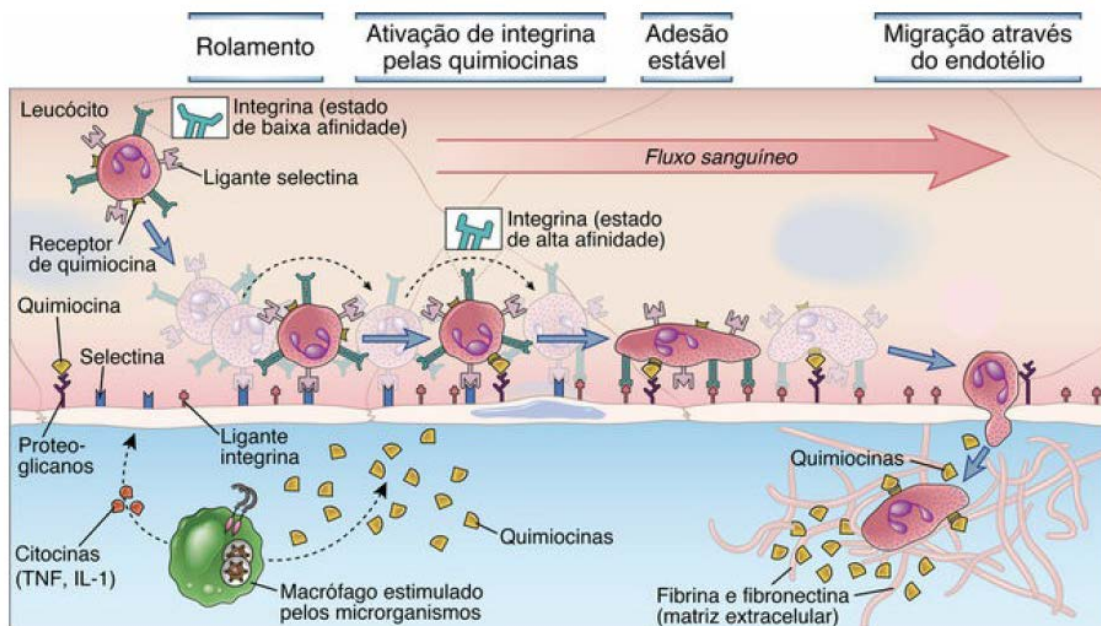


Figura 3: Esquema que demonstra a relação entre leucócito-endotélio nos vasos sanguíneos. (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Dentre as células de defesa do sistema imune, os neutrófilos, geralmente, são as primeiras células a migrarem para o local de infecção, seguido por monócitos do sangue que se transformam em macrófagos no tecido. Esse aglomerado de leucócitos nos tecidos forma um infiltrado inflamatório (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Macrófagos e neutrófilos possuem em suas vesículas uma enzima de membrana denominada fagócito oxidase, como pode ser visualizado na figura 4. Esta enzima converte oxigênio molecular em espécies reativas de oxigênio (ROS), que são agentes altamente reativos e que têm papel microbicida, mas que também podem matar outras células, como as células do hospedeiro, se estiverem em excesso (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Esse processo, no qual as ROS são produzidas é denominado “explosão respiratória”. Além de aumento de ROS, nessas vesículas também é possível encontrar óxido nítrico (NO) e enzimas proteolíticas. Todos esses mediadores têm ação citotóxica, promovendo a inativação de enzimas importantes no ciclo de Krebs, prejudicando a síntese de DNA e proliferação celular causando a destruição de patógenos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; ROSSI, 2015).

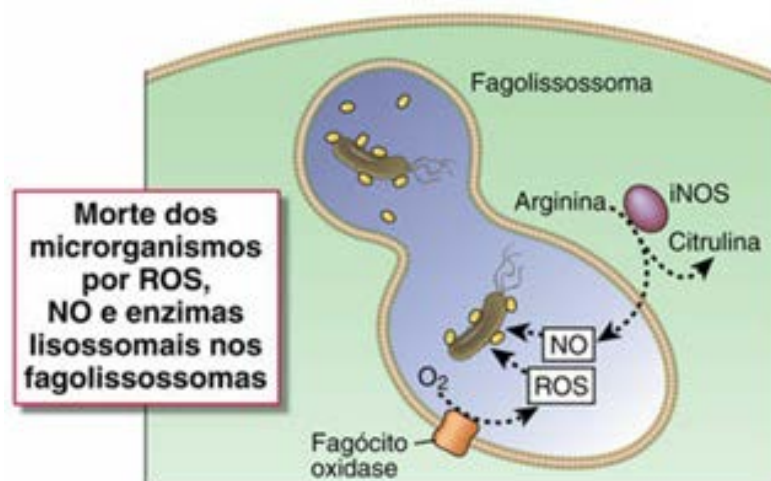


Figura 4: Esquema de fagocitose e destruição intracelular dos microrganismos. Adaptado de Abbas; Lichtman; Pillai, 2008.

Além disso, a liberação exacerbada de mediadores inflamatórios, somadas à liberação de ROS contribuem para a patogênese da sepse, pelo fato de que pode ocorrer uma redução da migração das células imunes, particularmente os neutrófilos, para o local alvo de infecção (DADKHAH et al., 2018; ROSSI, 2015).

O NO constitui um dos mais importantes mediadores relacionados a sepse. É sintetizado a partir do substrato L-arginina por ação da enzima da família citocromo P450, chamadas de Óxido Nítrico Sintases (NOS) - constitutiva (cNOS) e induzível (iNOS), gerando o óxido nítrico e L-citrulina. Em condições fisiológicas, a síntese de NO se dá a partir de estímulos solúveis como a acetilcolina ou por estresse de cisalhamento (shear-stress), ativando a NOS constitutiva endotelial (eNOS) culminando na produção de NO. O NO produzido que se difunde rapidamente para as células musculares lisas, ativando a enzima guanilato ciclase que converte trifosfato de guanossina (GTP) em monofosfato de guanossina cíclica (GMPc), aumentando a concentração deste segundo mensageiro. O GMPc ativa uma proteína quinase G (PKG) que fosforila vários resíduos proteicos citoplasmáticos levando à redução da concentração de cálcio, o que favorece a vasodilatação (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002; DUSSE et al., 2003).

Entretanto, o NO pode ser sintetizado também, pela enzima (iNOS), que tem sua expressão induzida por vários fatores, entre eles o LPS. Nessas

situações fisiopatológicas, o NO é sintetizado em grandes quantidades, com função bactericida e tumoricida, desempenhando um papel importante no sistema de defesa do hospedeiro, porém pode ser tóxico para o organismo ao reagir com ânion superóxido (O_2^-), um tipo de ROS, gerando peroxinitrito (ONOO⁻). Esse composto gerado é altamente reativo, provocando peroxidação lipídica, que quando descontrolada gera dano e morte celular (RITTER, 2003; RODRIGUES, 2007). Além disso, esse excesso de NO também causa intensa vasodilatação levando a um aumento da permeabilidade vascular com perda de fluídos para o espaço extravascular, caracterizando o extravasamento plasmático muito significativo em casos de sepse. Este fato pode levar a hipovolemia, causando grave hipotensão, além de hiporreatividade vascular (vasoplegia). Esta redução da resistência vascular, provoca queda na pressão arterial e débito cardíaco, caracterizando um dos graves sintomas da sepse, o choque séptico, que é a principal causa de morte relacionada a sepse (THIEMERMANN, 1997; JÚNIOR 1998; ROSSI, 2015). Além de todas essas ações desencadeadas pelo NO, o excesso deste mediador ainda é responsável por inibir a expressão de moléculas de adesão, além de citocinas pró-inflamatórias, o que impede a atração e adesão leucocitária, agravando mais ainda o quadro de sepse (GOMES; NETO; BISPO, 2009).

A presença de um agente invasor, leva a ativação do sistema imune inato do hospedeiro, culminando na liberação de TNF- α e IL-1. Essa ação também é estímulo para ativação de uma via metabólica, na qual fosfolípides de membrana são convertidos em ácido araquidônico (AA) pela enzima fosfolipase A₂ (BRITO, 2017). O AA, sofrendo ação da enzima ciclooxigenase (COX), gera substâncias bioativas (tromboxano (TXA₂), prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGF_{2 α}) e prostaciclina (PGI₂)) (BRITO, 2017), como pode ser visualizado na figura 5. Existem duas isoformas da enzima ciclooxigenase (COX-1 e COX-2). Em um estado fisiológico, esse papel é realizado pelas enzimas COX-1 e COX-2, que são expressas constitutivamente (KIRKBY et al., 2015; PELLIGAND et al., 2015). Entretanto após estímulos da resposta imune inata, como no caso da sepse, a COX-2 tem sua expressão aumentada (MCKENNA et al., 2016). Assim como os outros mediadores inflamatórios liberados, os prostanóides, derivados do AA, têm por objetivo a eliminação dos microrganismos invasores, como ocorre na

sepsis (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; BENNETT; GILROY, 2016; BRITO 2017; GUYTON & HALL, 2006; ROSSI, 2015).

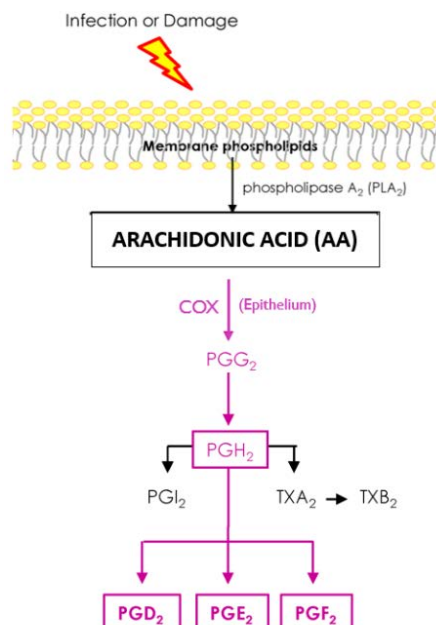


Figura 5: Eicosanóides derivados do ácido araquidônico. Adaptado de Talero et al., 2015.

Desta forma, além do NO, a prostaciclina (PGI_2) e as prostaglandinas, com exceção da $\text{PGF}_{2\alpha}$, também são substâncias que causam essa hiporreatividade vascular em modelos murinos de sepsis (ROSSI, 2015). Elas são responsáveis por causar reações pró-inflamatórias como vasodilatação, causando extravasamento de líquido para espaços intersticiais. Diferentemente das ações do TXA_2 e $\text{PGF}_{2\alpha}$ que causam vasoconstrição (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008; GUYTON & HALL, 2006; ROSSI, 2015). Portanto, o aumento da expressão de COX-2 contribui para a patogênese do choque séptico (MCKENNA et al., 2016). Na sepsis, um dos graves problemas é a produção excessiva desses mediadores, causando danos ao organismo, principalmente por causar instabilidade hemodinâmica e distúrbios metabólicos (BRITO, 2017).

A patogênese da sepsis é sustentada por uma resposta inflamatória exacerbada e como já descrito, tem aumentado a mortalidade envolvendo tal síndrome. Por isso, é necessário buscar novos alvos terapêuticos a fim de reduzir os óbitos relacionados à sepsis.

1.5 MODELO ANIMAL PARA ESTUDO DA SEPSE

Existe uma grande variedade de modelos para o estudo da sepse (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980), por exemplo: desafio endotoxínico intravenoso, injeção de organismos vivos na cavidade peritoneal, estabelecendo abscessos nas extremidades (GONG; WEN, 2019). Entretanto, a técnica de ligadura e perfuração do ceco (CLP) é um dos modelos animais para estudo da sepse mais utilizados, sendo considerado o modelo de referência para pesquisa de sepse (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). O modelo CLP, de sepse murina, ainda é considerado como "padrão ouro" na pesquisa de sepse. (MISHRA; CHOUDHURY, 2018). Foi descrito por Wichterman e colaboradores em 1980. O modelo foi criado como uma tentativa de diminuir a letalidade dos animais de outro método existente que induzia uma sepse letal.

*[...] "It is clear,
therefore, that puncturing the cecum once,
rather than twice, with an 18-gauge needle
prolongs the survival of animals, i.e.,
decreases the rapid development of lethality." [...]*
(WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980 p.198).

O modelo experimental CLP é capaz de replicar a natureza e a trajetória da sepse clínica, como por exemplo doenças de apendicite rompida ou diverticulite perfurada (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005). Esse modelo apresenta como benefícios a sua reprodutibilidade e seu potencial de controlar a gravidade da sepse através da espessura da agulha, o número de punções realizadas e utilização ou não de antibióticos. Após induzir inflamação no peritônio por CLP, citocinas e quimiocinas são induzidas em 4 horas e pico em 24 horas. Após 72 horas os níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias retornam aos valores basais, demonstrando o fim da fase aguda da sepse (GONG; WEN, 2019).

A técnica se baseia na realização de uma laparotomia na linha média abdominal para exteriorização do ceco, ligadura do ceco de forma distal à válvula ileocecal e uma punção do ceco com agulha. Há um pequeno extravasamento do conteúdo fecal no peritônio causando uma infecção com a microbiota residente, além de uma inflamação de tecido necrótico, como pode ser visualizado na figura 6 (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

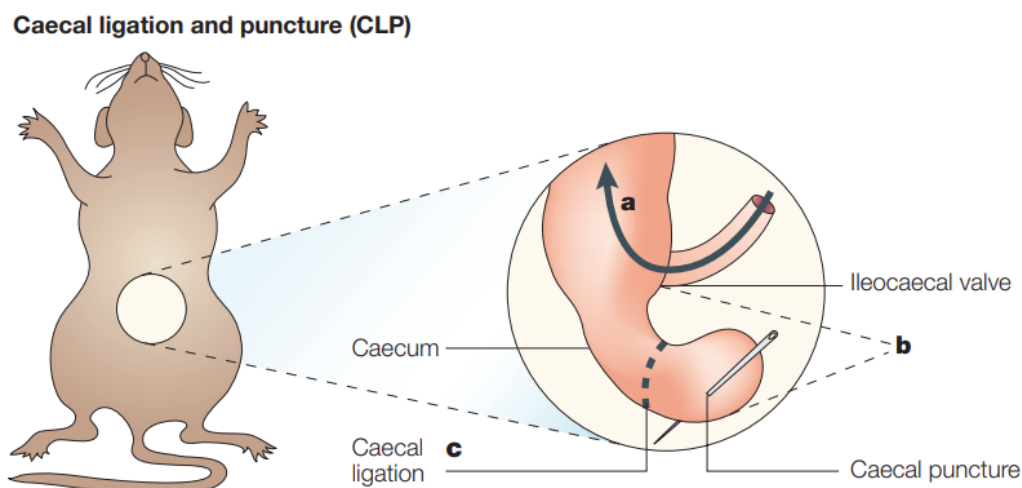


Figura 6: Ligadura e perfuração do ceco (CLP). (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

1.6 O TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR (PVAT)

O tecido adiposo perivascular (PVAT) reveste externamente os principais vasos sanguíneos e está situado ao redor da camada adventícia. Ele é um complexo conjunto de células como adipócitos, capilares, nervos e outras células como macrófagos, linfócitos, fibroblastos, espalhados por todo o organismo (MIAO; LI, 2012; BROWN et. al., 2014).

O tecido adiposo foi classificado em dois tipos, tecido adiposo branco e marrom. O tecido adiposo branco (WAT – *White Adipose Tissue*) são os tecidos adiposos viscerais, localizados ao redor de pequenas artérias, como mesentérica, carótida e femoral e tecidos adiposos subcutâneos. O tecido adiposo marrom (BAT – *Brown Adipose Tissue*) é encontrado na região inter-escapular em bebês humanos e roedores e na aorta torácica, como pode ser visualizado na figura 7. O WAT é o principal depósito de lipídios e é composto por uma única e grande gotícula de gordura ou unilocular. Já o BAT tem uma grande quantidade de mitocôndrias, o que confere a ele uma larga produção de calor, este tecido é composto por várias gotículas de gordura menores ou

multiloculares. Recentemente, o tecido adiposo bege (tecido adiposo marrom e branco) foi caracterizado apresentando-se mais versátil, uma vez que têm a capacidade de armazenar lipídios e também de produzir calor em diferentes cenários. O tecido bege pode ser encontrado na aorta abdominal (BROWN et. al., 2014).

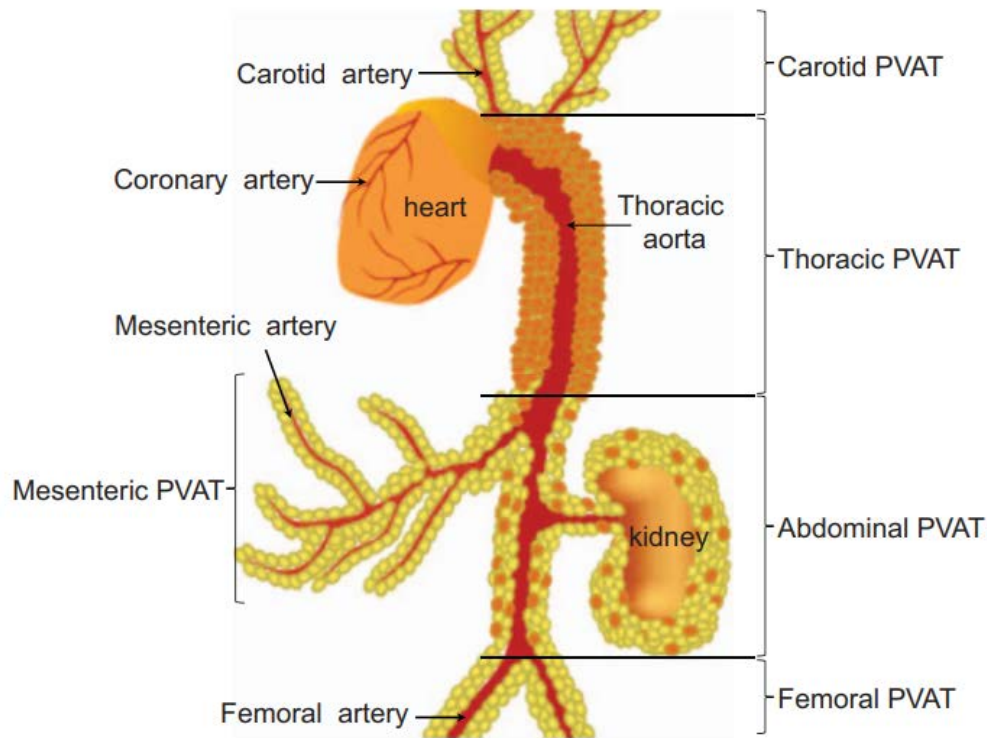


Figura 7: Esquema representando os diferentes tipos de PVAT e sua localização no organismo. (BROWN et. al., 2014).

O PVAT era conhecido por oferecer apenas uma proteção mecânica e estrutural aos vasos sanguíneos. Entretanto, em 1991, Edward E. Soltis e Lisa A. Cassis (1991), foram os primeiros que observaram que o PVAT influenciava no tônus vascular, de forma a reduzir a resposta contrátil para noradrenalina em aortas de ratos. A partir desse trabalho, o PVAT foi mais investigado, como no trabalho realizado por LÖhn e colaboradores, em 2002, observando pela primeira vez, que o PVAT liberava um fator relaxante derivado dos adipócitos (ADRF). Esse fator liberado pelo PVAT era difusível, ou seja, atuava nas células do músculo liso vascular (NAVA; LLORENS, 2019). Rajsheker et al. (2010) também encontraram evidências emergentes sugerindo que o PVAT regulava a função vascular através de numerosos mecanismos.

Atualmente já está estabelecido que o PVAT atua como um órgão endócrino e parácrino através da liberação de uma variedade de substâncias bioativas inflamatórias e outros fatores que também influenciam o tônus vascular, como pode ser visualizado na figura 8 (MIAO; LI, 2012; BOYDENS; PAUWELS; VAN DE VOORDE, 2015).

O PVAT é capaz de influenciar o tônus vascular por liberar tanto fatores vasodilatadores (como por exemplo ADRFs), quanto fatores vasoconstritores (GÁLVEZ-PRIETO et al., 2012) e estes atuarem nas camadas inferiores por serem transferíveis (NAVA; LLORENS, 2019). Entre as substâncias liberadas pelo PVAT estão as adipocinas como adiponectina, leptina e resistina, citocinas (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α), quimiocinas ((CCL2/proteína quimioatraente de monócitos 1 (MCP-1) e CCL5/quimiocinas que recrutam células T (RANTES)), além de substâncias moduladores do tônus vascular (ânion superóxido, óxido nítrico, peróxido de hidrogênio (H₂O₂), sulfeto de hidrogênio (H₂S), prostaglandinas, angiotensina II, angiotensina (1-7)) (BROWN et. al., 2014), como pode ser visto na figura 8. Tais substâncias, em situações fisiológicas, promovem um efeito benéfico/protetor e anticontrátil no tônus vascular, além de serem importantes para manter a homeostase metabólica (BOYDENS; PAUWELS; VAN DE VOORDE, 2015; CHENG, BAKAR, GOLLASCH E HUANG, 2018).

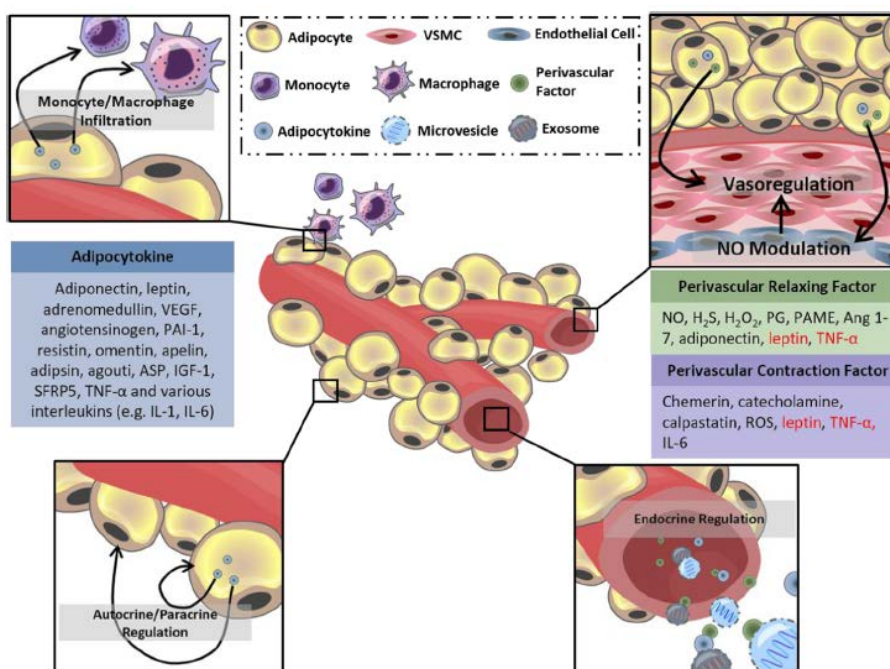


Figura 8: Substâncias liberadas pelo PVAT. Cheng, Bakar, Gollasch e Huang (2018).

O termo adipocina compreende toda substância que é sintetizada e secretada pelo tecido adiposo, podendo ser citocina ou não. As principais adipocinas sintetizadas pelo tecido adiposo são adiponectina e leptina. Entretanto existem outras, como o TNF- α , IL-6, IL-1. A adiponectina, por exemplo, tem ação anti-inflamatória, vasodilatadora e aumenta a sensibilidade à insulina. Diferentemente, a leptina apresenta papel pró-inflamatório e vasoconstritor (PRADO; LOFRANO; OYAMA; DÂMASO, 2009).

Já é muito bem conhecida a plasticidade do PVAT a diferentes situações fisiológicas e fisiopatológicas devido a alterações fenotípicas relacionada a quantidade de tecido, morfologia ou no equilíbrio de fatores vasoativos e inflamatórios secretados. Então, dependendo da situação a qual o PVAT é submetido ele pode influenciar no tônus vascular de diferentes formas (GÁLVEZ-PRIETO et al., 2012). Em outras palavras, GAO e colaboradores (2006), sugerem que o PVAT pode desempenhar um duplo papel regulador na modulação da função vascular.

Já foi demonstrado que o efeito anticontrátil do PVAT foi prejudicado na hipertensão, síndrome metabólica e obesidade (BROWN et. al., 2014; (GAO et al. 2006; ORIOWO, 2015; ZABORSKA et al., 2016). Em situações de inflamação o TNF- α liberado pelo PVAT pode reduzir a vasodilatação (ORIOWO, 2015). Também já foi visto que a COX pode ser responsável pelos efeitos pró-contráteis do PVAT na obesidade (BROWN et. al., 2014; MIAO; LI, 2012; BOYDENS; PAUWELS; VAN DE VOORDE, 2015). Conhecendo a plasticidade do PVAT e que processos inflamatórios alteram o papel fisiológico de PVAT sobre o tônus vascular, será que durante a sepse há modificação do perfil de resposta do PVAT alterando seu efeito anticontrátil fisiológico?

1.7 PARTICIPAÇÃO DO TECIDO ADIPOSEO PERIVASCULAR (PVAT) NA SEPSE

Sabendo que a sepse aguda gera uma resposta inflamatória exacerbada capaz de provocar prejuízo do tônus vascular causando hipotensão sistêmica, associada a falência do sistema cardiovascular, principalmente vasoplegia, que é a principal causa da mortalidade relacionada à sepse, é de extrema relevância estudar os efeitos vasoativo e inflamatório do tecido adiposo perivascular (PVAT) nesta situação. Além disso, é importante compreender a participação ou

proteção desse tecido em um quadro de sepse, uma vez que o PVAT é um tecido que reveste a camada adventícia e envolve a maior parte dos vasos sanguíneos e tem função endócrina/parácrina, sendo responsável pela produção de moléculas biologicamente ativas, que estão diretamente envolvidas na regulação/modulação do tônus vascular.

Em casos de sepse, o NO pode ser excessivamente produzido no PVAT, inicialmente com o objetivo protetor, mas acarretaria em alteração do tônus vascular. Já que o PVAT se encontra envolvendo e se invaginando na camada adventícia, o NO sintetizado nesse tecido atua de forma parácrina no músculo liso vascular contribuindo para uma hiporreatividade e vasodilatação (HAI-MEI et al., 2013; GÁLVEZ-PRIETO et al., 2012; THIEMERMANN, 1997).

A modulação da função vascular pelo PVAT não se limita à secreção de um fator relaxante e sim por um equilíbrio entre fatores relaxantes e contráteis, podendo assim atuar como alvo farmacológico durante a sepse aguda e desta forma auxiliar nas decisões terapêuticas mais adequadas ou até mesmo intervir objetivando a redução do número de óbitos por sepse (GAO et al., 2006; CHENG, et al., 2018). Sendo assim, além do NO, outras substâncias poderiam estar sendo liberadas no PVAT em um quadro de sepse aguda devido a uma ativação do sistema imune inato do hospedeiro, como é o caso da ativação da via da COX. Os prostanóides derivados da COX estão sim envolvidos no controle do tônus vascular e no remodelamento da parede vascular, além da agregação plaquetária e trombose (OZEN et al., 2013).

No trabalho realizado por Ahmad; Randall e Roberts (2017), em artéria coronária de suínos, foi observado que a contração induzida pelo PVAT foi parcialmente inibida por inibidores da COX, indicando participação de prostanóides contráteis derivados do PVAT. Entre eles, constataram a presença de tromboxano A₂ e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), promovendo a contração da artéria coronária. Portanto o PVAT é capaz de regular o tônus arterial coronariano de suínos através da secreção de tromboxano e PGF_{2α} (AHMAD; RANDALL; ROBERTS, 2017).

Já é sabido, também, que na sepse há um quadro importante de estresse oxidativo, causado pelo desbalanço de produção de espécies reativas de oxigênio, como por exemplo os ânions superóxidos (O₂⁻) (NAVA; LLORENS,

2019). Níveis aumentados de O_2^- foram identificados no PVAT de ratos sépticos (AWATA et. Al., 2019). O PVAT é uma fonte rica de superóxido (Gao et al., 2006), o tipo primário de espécies reativas de oxigênio, (LU et al., 2010). Gao e colaboradores (2006) observaram que o superóxido gerado a partir do PVAT potencializa a vasoconstrição à noradrenalina (GAO et al., 2006).

Em condições fisiológicas, o NO é sintetizado no PVAT pela eNOS e esse NO produzido se difunde através dos capilares e apresenta função benéfica (GAO et al. 2006). Diferentemente, em uma situação fisiopatológica, a atividade da Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato oxidase (NADPH oxidase) no PVAT é aumentada, assim como a expressão das subunidades do complexo NADPH oxidase, fonte principal de produção de ânion superóxido (GAO et al. 2006). Já foi visto que o desacoplamento da eNOS também produz O_2^- , além de causar disfunção endotelial, entre outras complicações (NAVA; LLORENS, 2019). Esse fato ocorre, principalmente com a eNOS, culminando em uma redução significativa na produção de NO e um drástico aumento na formação de espécies reativas de oxigênio. O excesso de ânion superóxido, proveniente da NADPH oxidase ou do desacoplamento de eNOS desencadeia aumento na formação de peroxinitrito ($ONOO^-$). Esse radical livre consome a tetra-hidrobiopterina (BH_4), que é um cofator essencial da eNOS. No PVAT, essa oxidação de BH_4 a BH_2 (di-hidrobiopterina), é provavelmente uma das principais causas do desacoplamento da eNOS (NAVA; LLORENS, 2019), como pode ser visualizado na figura 9.

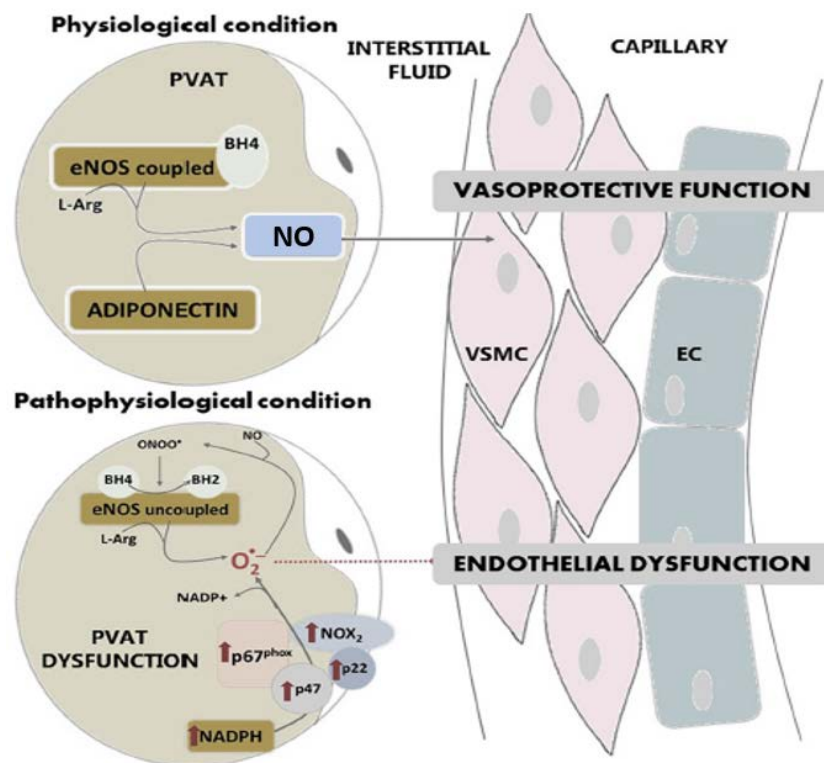


Figura 9: Desacoplamento da eNOS e aumento de NAPH oxidase na formação de ânion superóxido no PVAT. Adaptado de Nava; Llorens, 2019.

Portanto, por apresentar tais características, esse tecido poderia atuar como um alvo terapêutico tentando evitar uma hiporreatividade? Na tentativa de responder essa pergunta, a hipótese deste trabalho é que o PVAT tente reverter a vasodilatação e consequente hiporreatividade, causada pela sepse aguda, através da liberação de substâncias vasoconstritoras amenizando a falência vascular que ocorre devido ao processo inflamatório sistêmico.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral:

Avaliar o papel do PVAT no controle do tônus vascular de camundongos submetidos à sepse sub-letal aguda.

Objetivos específicos:

Avaliar na fase aguda da sepse:

1. parâmetros hemodinâmicos (pressão arterial) e inflamatórios (contagem total e diferencial de leucócitos e temperatura) que caracterizam a sepse;

2. a influência do PVAT sobre tônus vascular de aortas de animais sépticos;
3. quais fatores estariam envolvidos na resposta desencadeada pelo PVAT sobre o tônus vascular das aortas de animais séptico (ROS, atividade de COX e prostanóides com ação vascular).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos da linhagem Balb/C, com idade entre 8 e 12 semanas, obtidos do Biotério Central da UFMG. Os animais experimentais foram acondicionados em ambiente com temperatura controlada ($25\pm 24^{\circ}\text{C}$) e tiveram livre acesso a ração e água e foram divididos nos seguintes grupos experimentais: *sham* e *sépticos* 6 horas. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética Animal da Universidade Federal de Minas Gerais sob o número CEUA (383/2016).

3.2 Modelo experimental de sepse polimicrobiana por CLP (Cecal Ligation and Puncture)

Para o procedimento cirúrgico os camundongos foram anestesiados com 80 μL de uma solução contendo salina 0,9%, Cetamina 10% e Xilazina 2% (na proporção de 4:3:1, respectivamente). Após o efeito da anestesia, os camundongos foram colocados em decúbito dorsal, submetidos à tricotomia e assepsia da região abdominal com álcool 70%. Em seguida uma laparotomia mediana na região abdominal foi realizada. O ceco foi exposto e submetido à uma ligadura frouxa (permitindo o fluxo sanguíneo e impedindo o trânsito intestinal) distal à junção ileocecal com fio de nylon 5-0. Em seguida o ceco foi submetido a uma perfuração transversal com agulha 26G e leve compressão que permitiu o extravasamento de conteúdo fecal desencadeando, nos animais, a sepse sub-letal (SL). O ceco foi reintroduzido na cavidade peritoneal e então realizada a laparorrafia com fio de nylon 4-0. Nos animais do grupo controle (*sham* – falso operados) foi feita a laparotomia, exposição e manipulação do ceco com pinças, os animais deste grupo não passaram por ligadura e nem perfuração do ceco. Em seguida, passaram por laparorrafia. A sepse aguda foi avaliada 6 horas após a indução da sepse para verificar a participação do PVAT nesse processo agudo.

3.3 Escore clínico

O uso de escores clínicos é recorrente nas UTIs, como o “*Sequential Organ Failure Assessment (SOFA)*”, com o objetivo de quantificar o grau de disfunção orgânica de pacientes sépticos, além de determinar a gravidade e serem bons preditores de mortalidade durante a sepse, direcionando a assistência de profissionais de saúde. Esse tipo de observação clínica, também pode ser realizada com animais de experimentação, em diferentes estudos, podendo também prever a mortalidade e a disfunção de órgãos de animais submetidos à sepse (GONÇALVES, 2015; SHRUM et al., 2014). Desta forma, com o objetivo de avaliar a morbidade dos animais utilizados no presente estudo e caracterizar a ocorrência de sepse, utilizou-se o escore clínico elaborado por Shrum et al. (2014). No escore realizado no presente estudo, dois observadores a cegas analisaram as seguintes categorias: aparência, nível de consciência, atividade, resposta a estímulo, olhos, taxa e qualidade respiratória. A pontuação foi dada de 0 a 4, em que recebeu nota 0 o indivíduo que se apresentava normal naquela categoria e 4 quando ele se encontrava em um estado mais grave. Shrum e colaboradores assumiram o valor máximo de escore de 21(morbidade grave), no qual os animais deveriam ser sacrificados ao atingir tal pontuação (SHRUM et al., 2014).

3.4 Curva de sobrevida

Para a determinação da porcentagem sobrevida, utilizou-se o método Kaplan-Meier, que consegue estimar a probabilidade de sobrevida em vários intervalos de tempo graficamente (FERREIRA; PATINO, 2016). No presente estudo, os animais foram observados durante um período de 6 horas após a realização do procedimento cirúrgico para a indução ou não da sepse sub-letal. O percentual de sobrevida foi obtido a partir do número total de sobreviventes em relação ao número total de animais em cada grupo.

3.5 Registro da Pressão Arterial

Sabendo que a sepse causa um aumento de permeabilidade vascular, com extravasamento plasmático, gerando hipotensão, as pressões arterial

média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PD) e frequência cardíaca (FC) dos animais sham e sépticos, foram aferidas antes da cirurgia de indução da sepse e depois de 5-6 horas da cirurgia, de maneira indireta, por pletismografia de cauda (LE 5002 – Storage Pressure Meter - Panlab). Utilizou-se uma bolsa de água quente por alguns segundos para aquecer a cauda do animal para que o vaso sanguíneo desse local fosse dilatado, facilitando a identificação da pulsação pelo transdutor de pressão. Após esse procedimento, a cauda foi inserida em um cuff que ao ser acionado, inflava e a pressão sanguínea foi identificada pelo transdutor.

3.6 Aferição de temperatura

Antes da realização da cirurgia para indução de sepse e seis horas após, a temperatura dos animais foi aferida utilizando um termômetro a laser, em que o local de medida da temperatura foi a região abdominal. Para cada animal foram realizadas três medidas independentes e posteriormente a média foi calculada.

3.7 Contagem total e diferencial de leucócitos

Para a realização da contagem do número total de leucócitos, foi realizada a coleta de sangue (5 μ L) da cauda do animal, que foi adicionado e homogeneizado a uma solução de Turk, composta por ácido acético, responsável por lisar as hemácias e azul de metileno ou violeta de genciana, que cora os núcleos dos leucócitos (concentração final de 5%). A seguir, as células foram quantificadas na câmara de Neubauer com auxílio do microscópio óptico no aumento de 40x. A quantidade de células obtidas pela contagem foi corrigida pelo valor 10^4 , que corresponde ao fator de correção da câmara, e pelo fator de diluição do sangue (20x), sendo os resultados expressos como número de células/mL. Já a contagem diferencial foi realizada por meio de esfregaços sanguíneos obtidos também a partir do sangue coletado da cauda do animal. As lâminas foram coradas pelo método rápido de Panótico. O kit desse método é constituído por um reagente fixador cuja composição é triarilmetano a 0,1% (Panótico 1, que preserva as células da decomposição) e 2 soluções corantes para coloração rápida. O Panótico 2 é uma solução composta por xantenos a 0,1% e é um corante ácido, corando de róseo os componentes básicos da célula.

Já o Panótico 3, é composto por uma solução de tiazinas a 0,1% e apresenta caráter básico, corando de roxo-azulado os componentes ácidos das células. As lâminas ficaram em cada solução por 5 segundos (5 imersões de 1 segundo cada) e depois da terceira solução elas foram lavadas com água destilada e deixadas em temperatura ambiente para secar. Posteriormente, as células foram analisadas em microscópio óptico, utilizando objetiva de imersão, com aumento de 100x, sendo contadas 100 células por lâmina, diferenciadas nos seguintes tipos celulares: segmentado, linfócito, monócito, bastonete e basófilo. A quantificação de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem dessas células contadas e da quantidade de células obtidas na contagem total, sendo os resultados expressos como número de células/mL.

3.8 Avaliação do peso do baço

O peso do baço foi avaliado em animais sham e sépticos, uma vez que este órgão é responsável por remover células sanguíneas senescentes e comprometidas, além de microrganismos opsonizados da circulação e iniciar as respostas imunes adaptativas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Para isso, os animais foram eutanasiados e os baços cuidadosamente coletados para a pesagem. A tíbia direita também foi dissecada e mantida na estufa (37°C por 24 horas), seu comprimento analisado (paquímetro) e utilizado na normalização do peso do baço.

3.9 Montagem de preparações isoladas

Os animais sham e sépticos foram eutanasiados por decapitação após 6 horas da indução da sepse. A aorta torácica foi isolada e anéis de 3-4 mm de comprimento, contendo ou não tecido adiposo perivascular, foram montados entre dois ganchos de metal, sendo um deles conectado a um transdutor de força para registro da tensão isométrica e o outro fixado à cuba. As respostas foram registradas num polígrafo (Letica Scientific Instruments). Os anéis foram acondicionados em câmaras para órgãos isolados contendo 10mL de solução fisiológica de Krebs-Henseleit modificado com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 135,0; KCl 5,0; KH₂PO₄ 1,17; CaCl₂ 2,5; MgSO₄ 1,4; NaHCO₃ 20,0; glicose 11,0; em pH 7,4 sob gaseificação com mistura carbogênica (95%

O₂ e 5% CO₂), a 37°C, como pode ser visualizado na figura 10. A tensão basal foi previamente determinada a partir de uma curva de tensão e a melhor tensão basal, para ambos grupos de aortas, foi de 0,4 gramas. Os anéis de aorta foram então submetidos à esta tensão basal por 60 minutos. A cada 15 minutos a tensão foi reajustada, quando necessário, bem como a solução de Krebs trocada para retirada de metabólitos teciduais e nutrição do tecido.

3.10 Reatividade Vascular

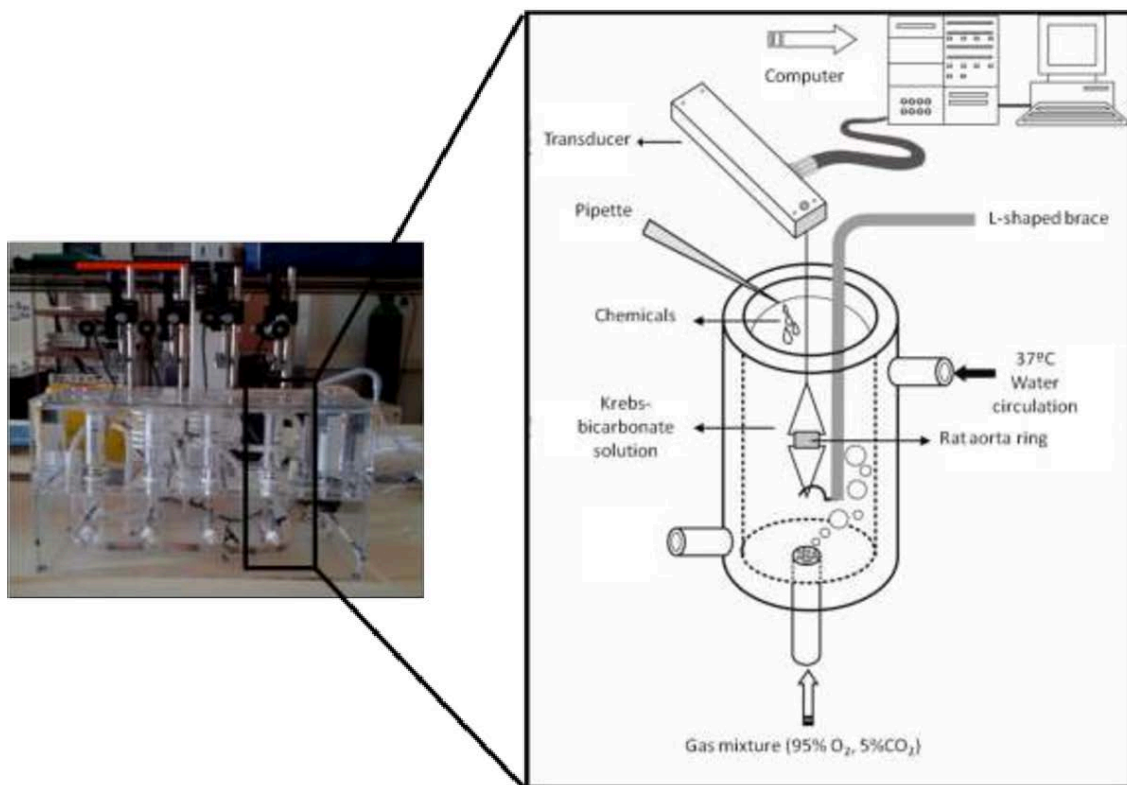


Figura 10: Desenho esquemático de uma preparação do anel arterial em um banho de órgãos. Modificado de Yildiz et al, 2013.

3.10.1 Estudo da contração induzida pela fenilefrina (PE) em anéis de aorta com e sem PVAT:

Com o objetivo de avaliar se a sepse altera o perfil vasoativo de PVAT sobre respostas de contração vascular, curvas concentração-efeito cumulativas para a PE (10^{-10} mol/L a 10^{-4} mol/L) foram realizadas em anéis de aorta, com e sem PVAT, de animais sham e sépticos.

3.10.2 Estudo da participação de estresse oxidativo na resposta vascular induzida pelo PVAT em aortas de animais sépticos:

Partindo do princípio que tanto o processo inflamatório, per si, levam ao aumento de estresse oxidativo, investigamos se o estresse oxidativo estaria envolvido no papel do PVAT sobre o tônus vascular durante a sepse. Para tanto, as aortas foram previamente incubadas com o sequestrador de ânions superóxido, tiron (10^{-3} mol/L, por 30 minutos). Em seguida, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para PE (10^{-10} mol/L a 10^{-4} mol/L) em anéis de aorta com PVAT, de animais sham e sépticos.

3.10.3 Estudo da participação de NADPH oxidase na contração induzida pela PE em anéis de aorta com PVAT:

O complexo enzimático, NADPH oxidase, foi investigado uma vez que este é o principal responsável pela síntese de ânions superóxido no sistema vascular (RITTER, 2003). Dessa forma, as aortas foram previamente incubadas com o apocinina (10^{-4} mol/L, por 30 minutos), que atua inibindo a agregação dos componentes enzimáticos desse complexo, o que acarreta redução na síntese de ânion superóxido. Em seguida, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para PE (10^{-10} mol/L a 10^{-4} mol/L) em anéis de aorta com PVAT, de animais sham e sépticos.

3.10.4 Estudo da participação de prostanóides no efeito vascular desempenhado pelo PVAT em animais sépticos:

Uma vez que a sepse desencadeia uma intensa resposta inflamatória e que o processo inflamatório pode acarretar em aumento na expressão de enzimas como ciclooxigenase induzida (COX-2), avaliou-se se os produtos destas enzimas (prostanóides e tromboxano), participam do papel do PVAT sobre o controle do tônus vascular. Para tanto as preparações foram pré-incubadas, por 30 minutos, com as seguintes ferramentas farmacológicas: ibuprofeno (10^{-5} mol/L), que é inibidor não seletivo da enzima ciclooxigenase ou nimesulida (10^{-6} mol/L), inibidor seletivo da COX-2. Subsequentemente, para investigar se os produtos da COX, como tromboxano A_2 e prostaglandina $F_{2\alpha}$ estavam envolvidos, as aortas foram pré-incubadas com seratrodistate (10^{-6} mol/L), antagonista do receptor para tromboxano A_2 ou AH6809 (10^{-5} mol/L), antagonista do receptor para prostaglandina $F_{2\alpha}$, respectivamente. Após as pré-

incubações, curvas concentração-efeito cumulativas para PE (10^{-10} mol/L a 10^{-4} mol/L) foram realizadas em anéis de aorta com PVAT, de animais sham e séptico.

3.11 Ensaio de fluorescência

3.11.1 Preparo das Lâminas – Gelatinização

As lâminas foram lavadas por 20 minutos em água corrente. Deixou-se secar em temperatura ambiente. Para o preparo da gelatina, em um homogeneizador aquecido, foi adicionado na seguinte sequência: 2 litros de água, temperatura aproximada de 60° a 70° C, 1 grama de sulfato de cromo e 10 gramas de gelatina microbiológica.

As lâminas foram acondicionadas em cestas que as deixaram separadas, e estas foram submersas, por 30 minutos, em um recipiente contendo a gelatina pronta. Após o período de 30 minutos, as lâminas foram retiradas da gelatina e deixadas a temperatura ambiente por 24 horas para secarem.

3.11.2 Preparação das aortas para realização dos experimentos de fluorescência.

Anéis de aortas de animais sham e sépticos foram embebidos em Optimal Cutting Temperature (OCT), que é uma resina para congelamento rápido de tecidos e corte em criostato (Tissue-Tek; Qaigen, Hilden, Alemanha) e armazenados em freezer comum (-20°C). As aortas congeladas foram seccionadas com 10 µm de espessura, em criostato, e aderidas em lâminas previamente gelatinizadas.

3.11.3 Determinação e quantificação da produção de O_2^- em aortas de animais sham e sépticos, na presença ou não de nimesulida e apocinina.

Para a determinação do O_2^- tecidual, utilizou-se a sonda fluorescente seletiva para esta espécie reativa de oxigênio (ROS), diidroetidina (DHE). O DHE é capaz de penetrar livremente nas células e, na presença do O_2^- , sofre oxidação a etídio, composto que, ao intercalar-se ao DNA das células, pode emitir fluorescência (Miller et al., 1998). No presente protocolo, o DHE foi excitado a um comprimento de onda de 535 nm e apresentou um espectro de emissão em 610 nm, sendo sua fluorescência visualizada, em microscopia, na cor vermelha.

Incubou-se nos cortes já aderidos, drogas de interesse: apocinina e nimesulida, à 37°C em estufa, por 30 minutos. Apocinina (10^{-4} mol/L), que atua inibindo a agregação dos componentes enzimáticos desse complexo, o que acarreta redução na síntese de ânion superóxido) e nimesulida (10^{-6} mol/L) inibidor seletivo da COX-2. Posteriormente, foi adicionado em cada corte, a sonda DHE (2,5 μ mol/L), previamente diluída em PBS (pH 7,4). As lâminas foram incubadas com DHE, protegidas da luz e em estufa a 37°C, por 30 minutos. Decorrido o período de incubação, as lâminas foram lavadas com PBS (1 vez) e os cortes foram fixados com formaldeído 4%, também sobre proteção da luz e à 37°C, por 10 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS, por três vezes consecutivas e sobre os cortes foi colocado o meio de montagem composto de glicerina 60-70% diluída em PBS e lamínula. Finalmente as lâminas puderam ser seladas com esmalte transparente para evitar o extravasamento do meio de montagem, deixadas secar por alguns minutos e, então, levadas até o microscópio para que as imagens pudessem ser capturadas. O microscópio de fluorescência utilizado foi o Zeiss LSM880 (Axio Imager A2, Carl Zeiss, Alemanha), sendo mantido os mesmos padrões de calibragem para os grupos sham e séptico. A análise quantitativa das imagens, por sua vez, foi realizada através do software Image J (1.45), nos núcleos celulares do tecido analisado, o PVAT. Essa análise foi realizada através de normalização desses núcleos pela área e os resultados expressos como intensidade de fluorescência (% de emissão por núcleos celulares).

3.12 Análise estatística

Os gráficos e análises estatísticas dos resultados encontrados foram feitos por meio do programa GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Corporation, versão 8.0.2). As curvas foram plotadas e, conseqüentemente, a EC_{50} (concentração que induz 50% da resposta) e o efeito máximo (E_{max}) determinados utilizando o método de regressão não linear dos mínimos quadrados (MEDDINGS; SCOTT; FICK, 1989). Para a análise da potência do agonista, utilizou-se os valores de pD_2 , ($-\log EC_{50}$), expressos como a média $\pm$ erro padrão da média (EPM), os quais foram comparados, para mais de dois grupos, por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-

teste de *Sidak*. Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Escore clínico

De acordo com os resultados obtidos na **figura 11**, os animais do grupo sham, apesar de não terem sido submetidos à indução da sepse, apresentaram escores clínicos diferentes de 0 nas 4 primeiras horas ($4,50 \pm 0,69$), o que pode ser justificado pelo fato de que os animais desse grupo passaram pelo estresse cirúrgico. Mas com o passar do tempo, o escore desse grupo diminuiu consideravelmente (Sham: 5h: $3,44 \pm 0,57$; 6h: $2,11 \pm 0,35$). Os animais do grupo séptico, de forma diferente do grupo Sham, apresentaram valor consideravelmente mais alto de escore nas 4 primeiras horas ($7,44 \pm 0,77$). Além disso, esse grupo manteve sua pontuação significativamente elevada até as 6 horas (Séptico: 5h: $8,56 \pm 0,76$; 6h: $9,06 \pm 0,72$). Considerando que a pontuação do escore é diretamente proporcional à morbidez, esses resultados permitem a confirmação da piora dos aspectos clínicos no grupo séptico quando comparado ao grupo sham.

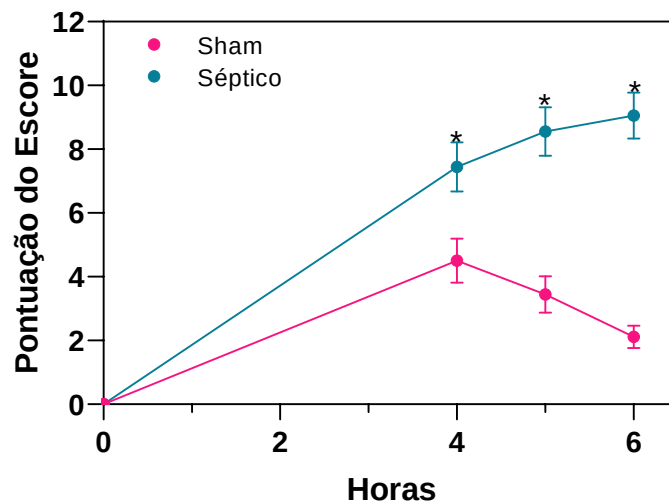


Figura 11: Escore clínico. O gráfico avalia os parâmetros para predição de morbi/mortalidade e disfunção de órgãos dos grupos sham e séptico. Cada círculo representa a média $\pm$ EPM do escore clínico obtido para um n de 9 para cada grupo. *representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao resultado observado no grupo sham nos mesmos tempos.

4.2 Curva de Sobrevida

Apesar dos valores do escore clínico terem resultado significativamente mais elevados no grupo séptico que no grupo sham, a sobrevida foi equivalente entre os grupos, em que a porcentagem de sobrevivência de ambos os grupos foi de 100%. Ou seja, em 6 horas de sepse não houve perda de nenhum animal, como pode ser visualizado na **figura 12**.

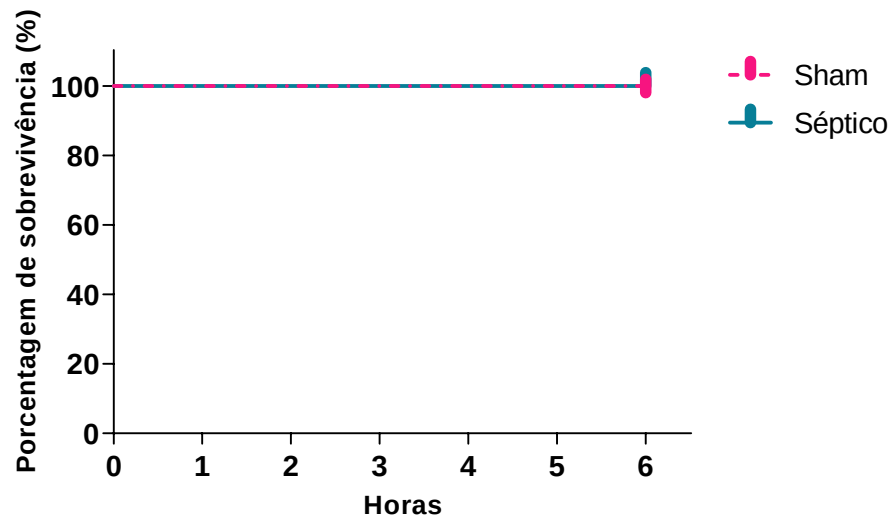


Figura 12: Percentual de sobrevida dos animais submetidos a sepse e seus controles. Todos os animais foram avaliados 6 horas após a cirurgia. (n=49 para cada grupo).

4.3 Pressão Arterial Sistólica (PAS)

No tempo 0, ou seja, antes da cirurgia de indução de sepse, a pressão arterial sistólica (PAS) desses animais eram semelhantes entre os grupos sham ($115,51 \pm 3,41$) e séptico ($115,38 \pm 4,12$). Porém, após 5-6 horas da indução da sepse, foi possível observar uma hipotensão significativa do grupo séptico ($87,61 \pm 1,93$), quando comparada ao grupo sham ($109,12 \pm 4,57$) (Figura 13 – A). Isso fica evidenciado na figura 13 – B, em que é possível observar o gráfico da variação da pressão arterial sistólica entre os grupos sham e séptico. O grupo séptico apresentou uma redução da PAS significativamente maior ($-27,77 \pm 4,17$) quando comparada ao grupo sham ($-6,39 \pm 4,86$).

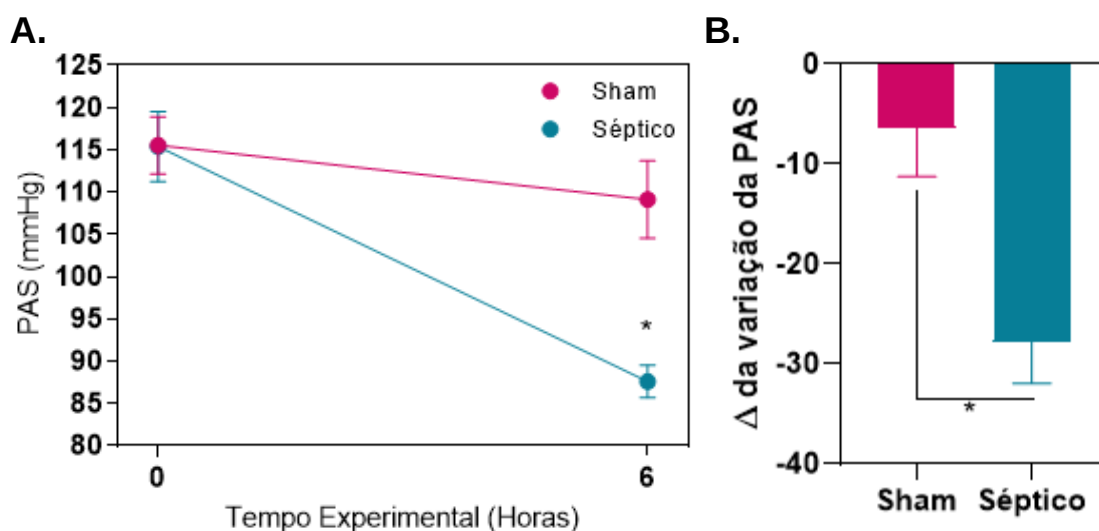


Figura 13: Avaliação temporal da pressão arterial sistólica (PAS) (A) e delta da variação da PAS (B) dos grupos sham e séptico. Cada círculo/barra representa a média $\pm$ EPM da pressão sistólica obtida para um n de sham (n=8) e séptico (n=7). *representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo sham.

4.4 Temperatura

Os animais tiveram a temperatura aferida com termômetro a laser na região abdominal antes da indução da sepse e 5-6 horas após. Os animais do grupo séptico além de hipotensos eles também se encontravam hipotérmicos, como pode ser observado na **figura 14**. No tempo 0, ou seja, antes da cirurgia de indução de sepse, a temperatura desses animais eram semelhantes entre os grupos sham ($35,94 \pm 0,05$) e séptico ($36,03 \pm 0,12$). Porém, após 5-6 horas da indução da sepse, foi possível observar uma hipotermia do grupo séptico ($35,40 \pm 0,00$), quando comparada ao grupo sham ($35,68 \pm 0,10$).

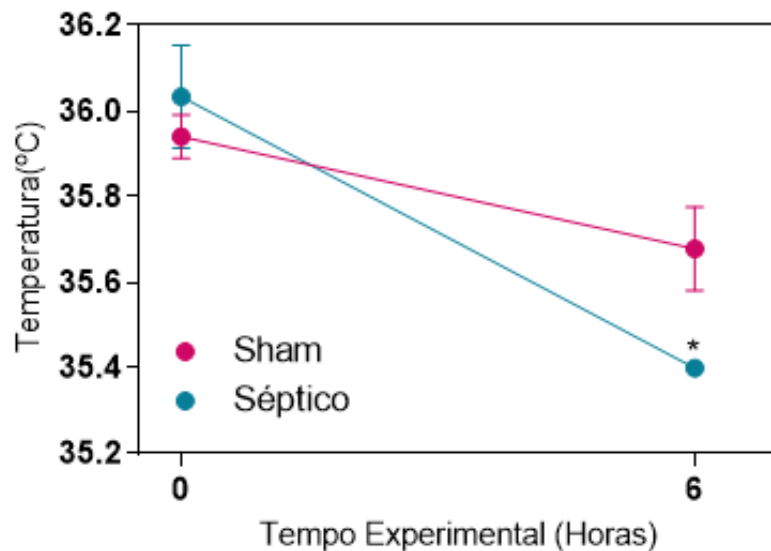


Figura 14: Avaliação temporal da temperatura dos grupos sham e séptico. Cada círculo representa a média $\pm$ EPM da temperatura corporal obtido para um n de 5 para sham e 3 para séptico. *representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo sham.

4.5 Contagem total e diferencial de leucócitos

Outra forma de caracterizar a sepse e avaliar quantitativamente as alterações leucocitárias apresentadas pelos grupos experimentais, foi realizar o leucograma dos animais. Na **figura 15**, foi possível observar que o número total de leucócitos estava significativamente diminuído no grupo séptico quando comparado ao grupo sham, o que revela a ocorrência de uma leucopenia no grupo submetido à sepse. Essa leucopenia, por sua vez, parece estar associada a uma redução significativa da porção de neutrófilos (neutropenia), uma vez que foi observado, somente para esse tipo celular, um resultado semelhante ao encontrado para a contagem total de leucócitos. Sendo assim, esse resultado sugere a ocorrência de um processo inflamatório extremamente agudo no grupo séptico uma vez que em 6 horas as células inflamatórias estão reduzidas sistemicamente porque, provavelmente, estão migrando para o sítio infeccioso.

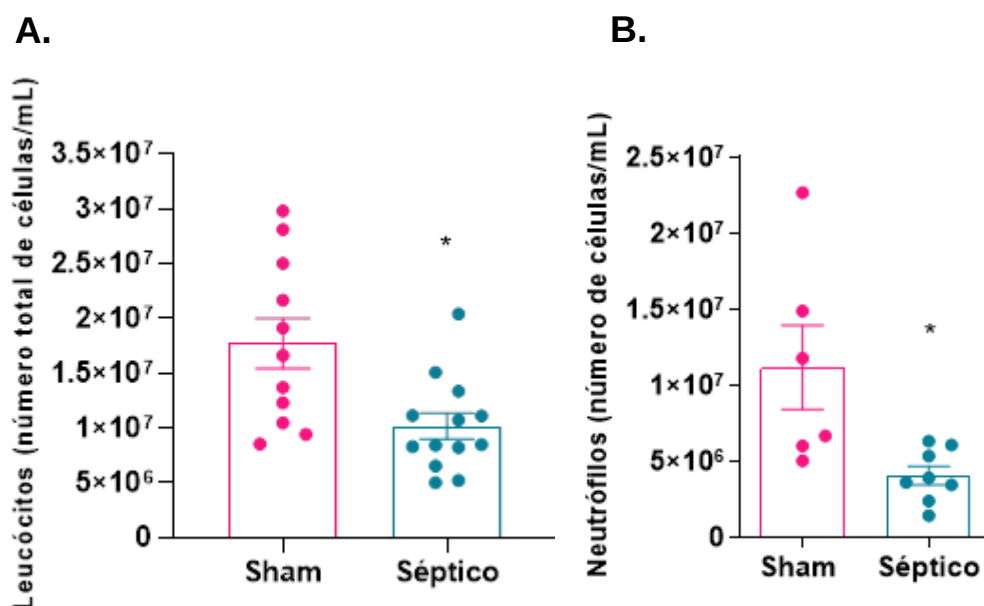


Figura 15: Contagem de leucócitos totais (A) e de neutrófilos (B) dos grupos experimentais. Cada barra representa a média $\pm$ EPM do número de células/ml de sangue obtido para um n de 6-8 diferentes animais de cada grupo experimental estudado. *representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham.

4.6 Peso do baço corrigido pelo comprimento da tíbia

Uma vez que foi percebida uma alteração no leucograma dos animais do grupo séptico, que a sepse gera disfunção orgânica e que o baço é um órgão essencial na resposta imune em infecções e responsável por remover células senescentes da circulação, assim como células opsonizadas, realizou-se a avaliação do peso desse órgão. Os resultados demonstraram que o peso do baço desses animais foi similar entre os grupos, não apresentando diferença significativa entre eles, podendo inferir que em 6 horas de sepse ainda não foi possível detectar alteração no peso desse órgão, como pode ser visualizado na **figura 16**.

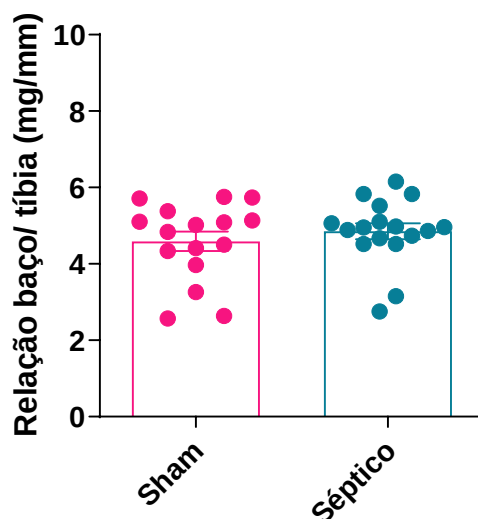


Figura 16: Peso dos baços dos grupos experimentais. Cada barra representa a média $\pm$ EPM da relação do peso do baço pelo comprimento da tíbia obtida para n diferente entre os animais de cada grupo experimental estudado (sham n=16; séptico: n=17).

4.7 Resultados de Reatividade Vascular

4.7.1 Papel do PVAT na contração induzida por um agente vasoconstritor, receptor-dependente, em aortas de camundongos submetidos à 6 horas de sepse.

Em curvas concentração efeito para fenilefrina (PE), observou-se que na ausência de PVAT, a sepse causa um prejuízo na contração reduzindo valores de Emax quando comparado ao sham. Entretanto, na presença do PVAT, de forma interessante foi visto que o prejuízo identificado no grupo séptico deixou de existir, e então o PVAT passa a ter um papel compensatório, favorecendo a contração desse grupo, alterando os valores de Emax e pD₂. Também é importante perceber que no grupo sham, o PVAT continua com seu papel anticontrátil fisiológico característico, já que na presença desse tecido, a contração da aorta induzida por PE é reduzida quando comparada ao Sham sem PVAT, como pode ser melhor visualizado nos gráficos de Emax e pD₂ da **figura 17** (sham PVAT + Emax: $2,24 \pm 0,17$ / pD₂: $6,98 \pm 0,088$ n=7; sham PVAT - Emax: $2,81 \pm 0,16$ / pD₂: $7,36 \pm 0,12$ n=4; séptico PVAT + Emax: $3,00 \pm 0,12$ / pD₂: $7,264 \pm 0,09$ n=10; séptico PVAT - Emax: $2,13 \pm 0,20$ / pD₂: $7,1 \pm 0,14$ n=4).

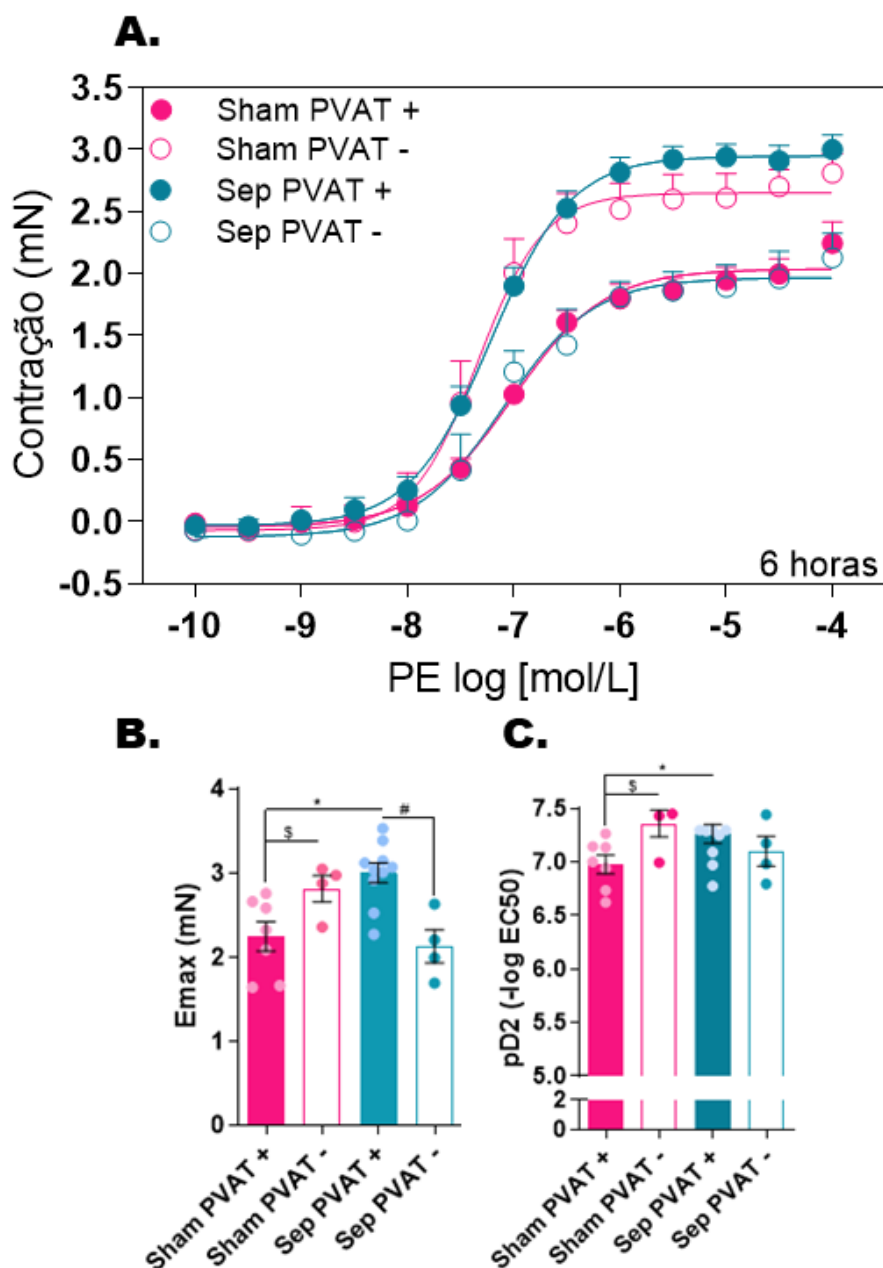


Figura 17: Contração vascular induzida por PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais após 6 horas da indução da sepse. (A) Curvas cumulativas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE realizadas em aortas de camundongos. **(B-C)** Representação gráfica dos valores de Emax da contração induzida por PE e pD₂, respectivamente. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo Sham (SEP PVAT + X Sham PVAT+). \$ representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo Sham (Sham PVAT – X Sham PVAT +). # representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo Séptico (SEP PVAT - X SEP PVAT +).

Visto que em 6 horas de sepse, o PVAT recuperou o prejuízo na contração do grupo séptico, os resultados seguintes foram realizados somente na presença

desse tecido, com o objetivo de investigar quais vias contráteis estariam envolvidas no efeito do PVAT sobre o tônus vascular. Sabendo que o processo inflamatório é capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, como ânion superóxido, ocasionando estresse oxidativo, investigou-se se este estaria relacionado ao papel do PVAT no controle do tônus vascular durante a sepse aguda.

4.7.2 Participação de ânion superóxido no perfil contrátil do PVAT na contração induzida por um agente vasoconstritor, receptor-dependente, em aortas de camundongos.

O processo de sepse realmente leva à geração de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, uma vez que foi observado uma redução dos valores de Emax quando as aortas do grupo séptico foram incubadas com TIRON, sequestrador de ânions superóxido. Entretanto, não alterou os valores de pD₂, indicando um envolvimento parcial de ânion superóxido no papel contrátil do PVAT, como pode ser visualizado na **figura 18** (Sham Emax: 2,24 ± 0,17 / pD₂: 6,98 ± 0,088 n=7; Sham + Tiron Emax: 2,39 ± 0,08 / pD₂: 6,85 ± 0,11 n=5; Séptico Emax: 3,00 ± 0,12 / pD₂: 7,264 ± 0,09 n=10; Séptico + Tiron Emax: 2,42 ± 0,08 / pD₂: 7,27 ± 0,14 n=5).

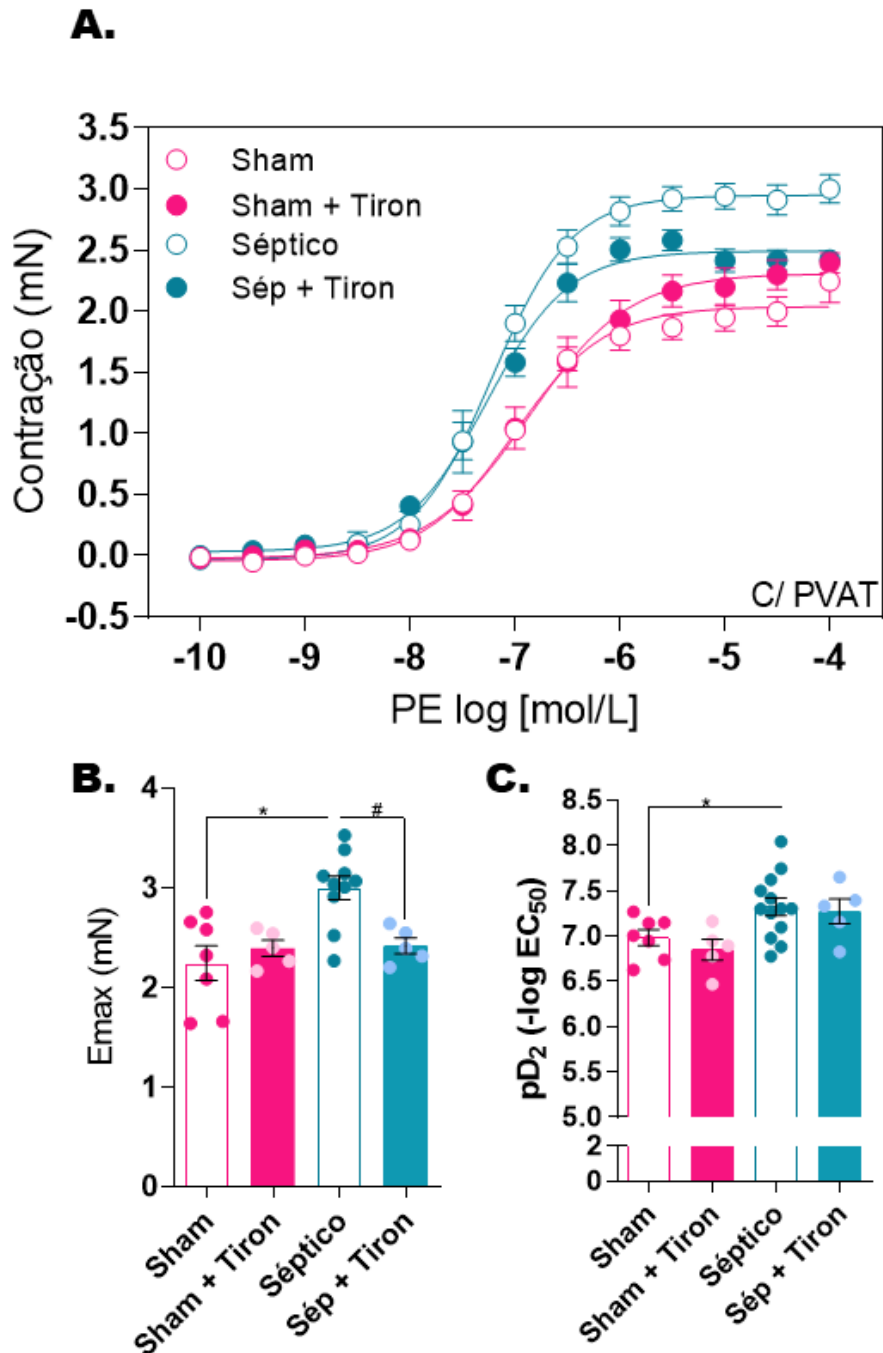


Figura 18: Análise do envolvimento de ânion superóxido, na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas com PVAT dos grupos experimentais. (A) Curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE realizadas em aortas de camundongos na presença e na ausência de TIRON (sequestrador de ânion superóxido). **(B-C)** Representação gráfica dos valores de Emax da contração induzida por PE e pD₂, respectivamente. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham (SEP PVAT + X Sham PVAT+). \$ representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham (Sham PVAT – X Sham PVAT +). # representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Séptico (SEP PVAT - X SEP PVAT +).

4.7.3 Determinação e quantificação da produção de O_2^- em aortas de animais sham e sépticos

No ensaio com a sonda fluorescente DHE (seletiva para ânion superóxido) foi detectado aumento significativo da intensidade de fluorescência no PVAT das aortas de animais do grupo séptico ($54563,64 \pm 1887,33$; $n=4$) quando comparado a animais do grupo sham ($20857,27 \pm 3400,42$; $n=3$), confirmando a biodisponibilidade dessa espécie reativa de oxigênio no PVAT e determinando a existência de estresse oxidativo nos animais sépticos (**FIGURA 19 e 20**).

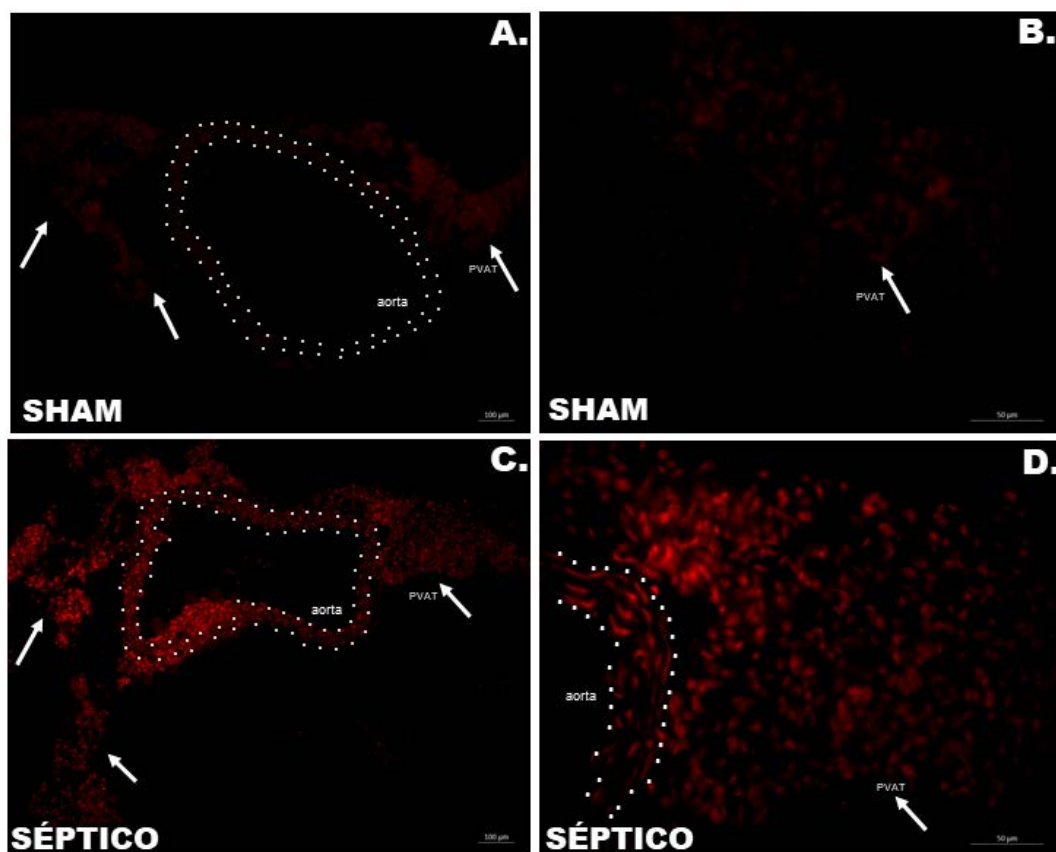


Figura 19: Imagens representativas da presença de O_2^- em aortas de animais sham e séptico. A determinação da presença de O_2^- foi realizada por meio da exposição das aortas à sonda DHE que fluoresce em vermelho. As imagens foram obtidas de preparações independentes (Sham: $n=3$ Séptico: $n=4$). **(A e C)** estão em aumento de 10X e **(B e D)** em aumento de 40X. As setas brancas indicam o PVAT, tecido no qual as fotos foram capturadas no aumento de 40x. O pontilhado branco delimita a aorta.

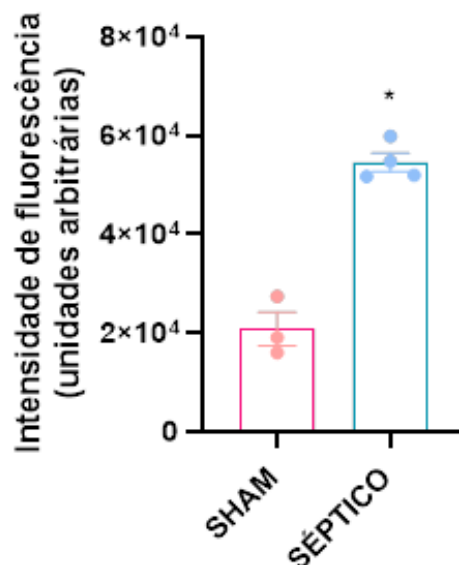


Figura 20: Quantificação, *in situ*, da produção de O_2^- em preparações de sham e séptico. Cada barra representa a média $\pm$ EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela sonda DHE. (sham: n=3; séptico: n=4). * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao resultado obtido para o grupo sham.

Uma vez verificada a participação de ânion superóxido, o próximo passo foi analisar a participação de NADPH oxidase, que é um complexo enzimático mais envolvido com a geração de ânion superóxido nos vasos sanguíneos. A **APOCININA** atua inibindo a agregação dos componentes enzimáticos desse complexo, e consequentemente sua função.

4.7.4 Participação do complexo NADPH oxidase no perfil contrátil do PVAT na contração induzida por fenilefrina em aortas de camundongos.

Ao incubar as aortas com APOCININA, na presença de PVAT, houve uma queda significativa dos valores de E_{max} da contração do grupo séptico, se igualando a resposta obtida pelo grupo sham, mas sem alterações significativas nos valores de pD_2 , semelhante ao observado em presença de **tiron**, indicando a participação parcial desse complexo enzimático e também a geração de ânion superóxido, como pode ser visualizado na **figura 21** (Sham E_{max} : $2,24 \pm 0,17$ / pD_2 : $6,98 \pm 0,088$ n=7; Sham + Apocinina E_{max} : $2,33 \pm 0,19$ / pD_2 : $6,99 \pm 0,15$ n=9; Séptico E_{max} : $3,00 \pm 0,12$ / pD_2 : $7,264 \pm 0,09$ n=10; Séptico + Apocinina E_{max} : $2,05 \pm 0,17$ / pD_2 : $7,04 \pm 0,13$ n=8).

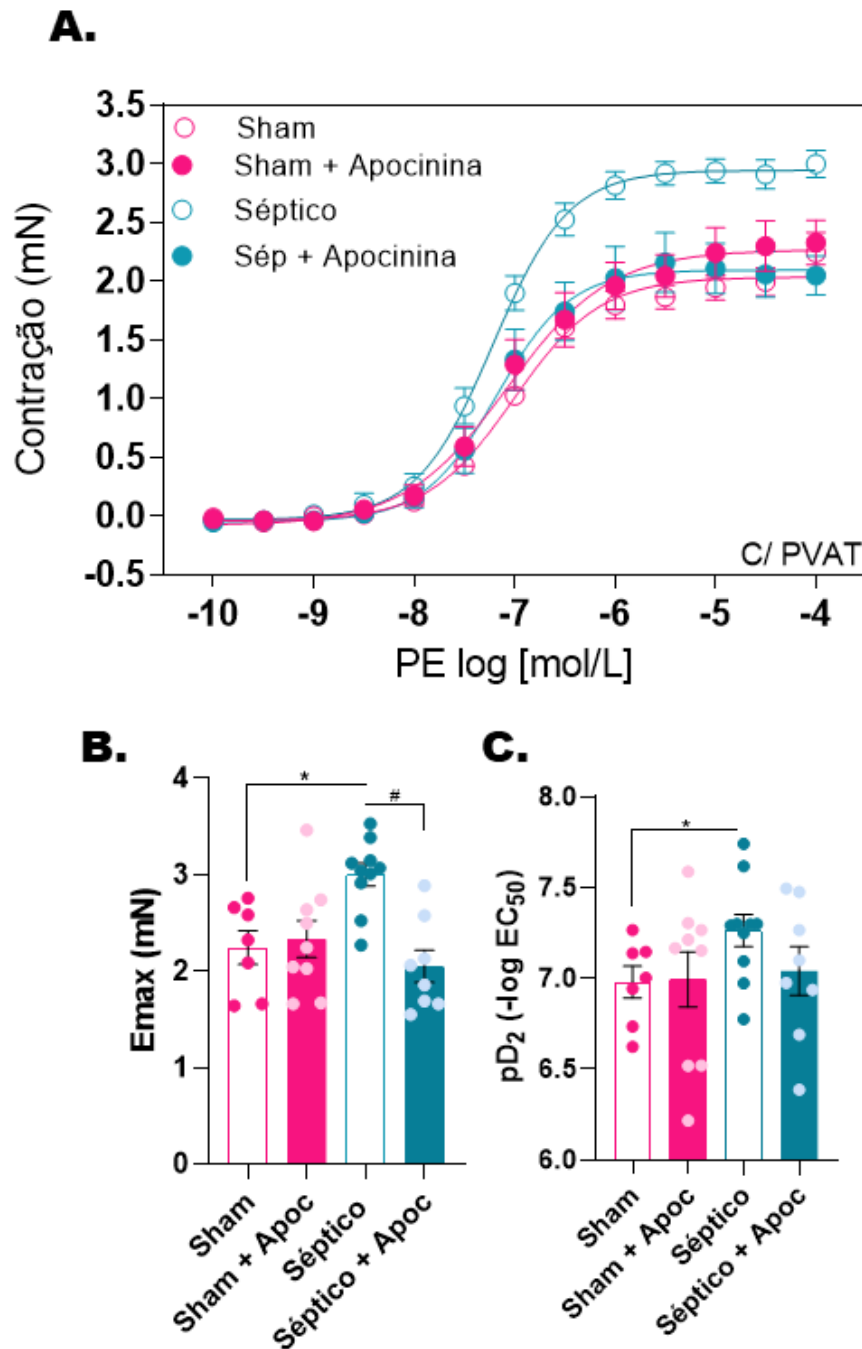


Figura 21: Efeito da inibição do NADPH oxidase por apocinina, na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas com PVAT dos grupos experimentais. (A) Curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE realizadas em aortas de camundongos na presença e na ausência de APOCININA. **(B-C)** Representação gráfica dos valores de Emax da contração induzida por PE e pD₂, respectivamente. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham (SEP PVAT + X Sham PVAT+). # representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Séptico (SEP PVAT - X SEP PVAT +).

4.7.5 Determinação e quantificação da produção de O_2^- em aortas de animais sham e sépticos, na presença ou não de apocinina

Para confirmar a participação do complexo NADPH oxidase na geração de ânion superóxido, os cortes foram incubados com apocinina, anteriormente à incubação com DHE. Observou-se que a apocinina reduziu a intensidade de fluorescência dos núcleos marcados com DHE no grupo séptico de forma parcial (Séptico + Apocinina: $32456,80 \pm 5257,33$; $n=4$). (Sham + Apocinina: $40741,19 \pm 3382,64$; $n=4$) (**Figura 22 e 23**).

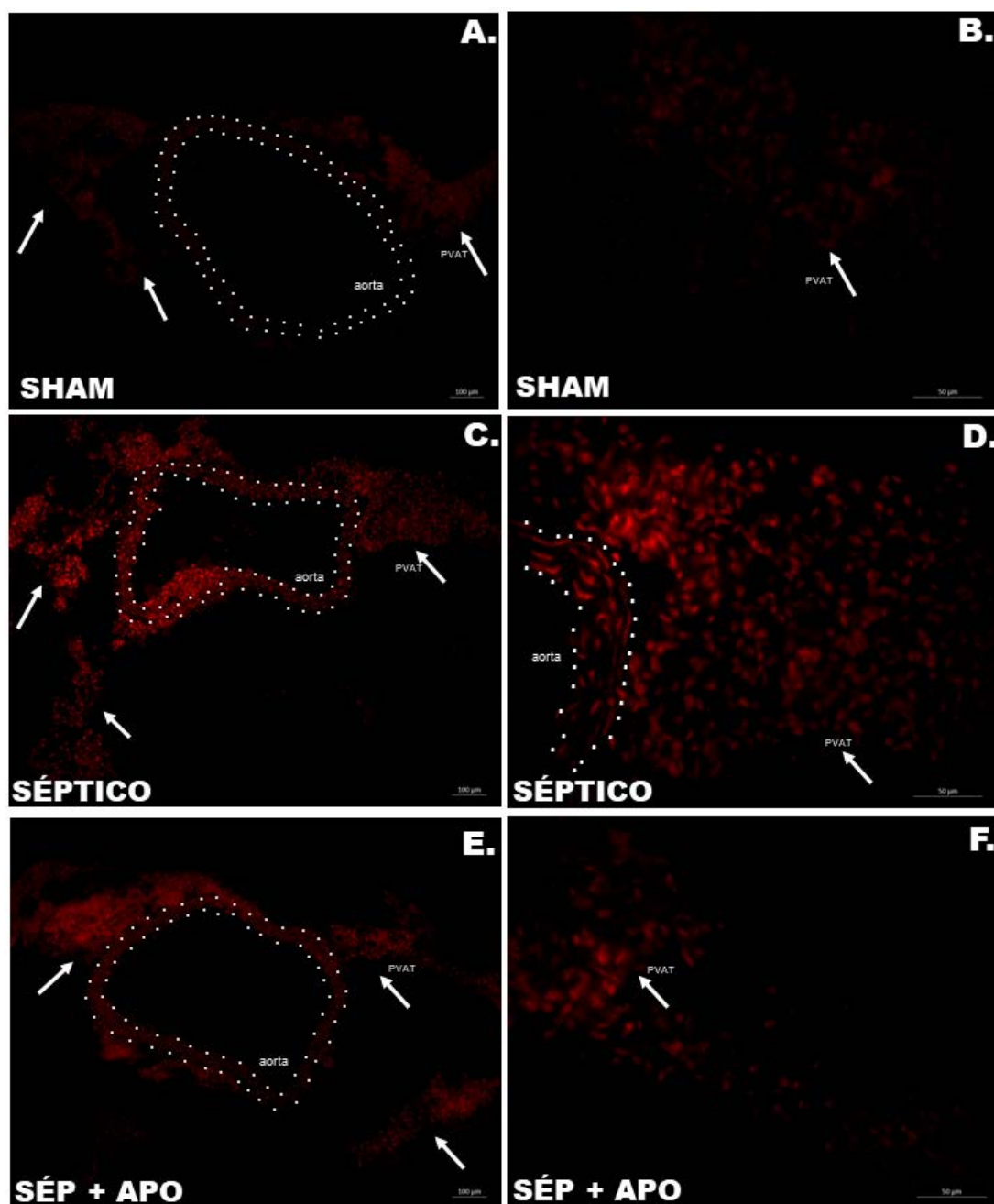


Figura 22: Imagens representativas da presença de O_2^- em aortas de animais sham, séptico e séptico + apocinina. A determinação da presença de O_2^- foi realizada por meio da exposição das aortas à sonda DHE que fluoresce em vermelho. As imagens foram obtidas de preparações independentes (Sham: n=3; Séptico: n=4; Séptico + apocinina: n=4). **(A, C e E)** estão em aumento de 10X e **(B, D e F)** em aumento de 40X. As setas brancas indicam o PVAT, tecido no qual as fotos foram capturadas no aumento de 40x. O pontilhado branco delimita a aorta.

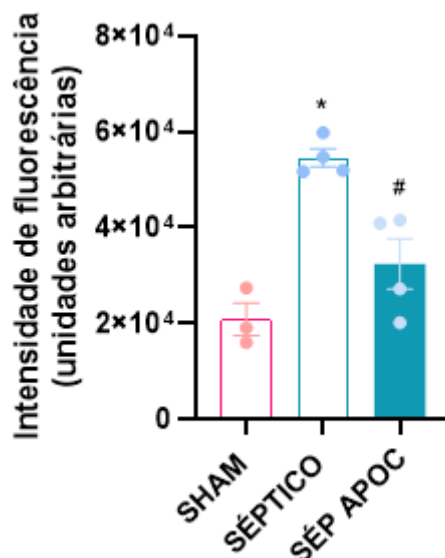


Figura 23: Quantificação, *in situ*, da produção de O_2^- em preparações de sham, séptico e séptico + apocinina. Cada barra representa a média $\pm$ EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela sonda DHE. (sham: n=3; séptico: n=4; séptico + apocinina= 4). * representa a diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao resultado obtido para o grupo sham. # representa a diferença significativa ($p<0,05$) em relação ao resultado obtido para o grupo séptico.

Sabendo que a sepse causa uma inflamação sistêmica intensa, e que a enzima ciclooxygenase (COX) poderia estar envolvida na geração de seus derivados vasocontráteis, investigou-se se essa enzima e tais derivados estariam relacionadas ao papel contrátil do PVAT no controle do tônus vascular durante a sepse aguda.

4.7.6 Participação da COX no perfil contrátil do PVAT em aortas de camundongos.

Para investigar a participação dessa enzima, utilizou-se **IBUPROFENO**, inibidor não seletivo da COX, na presença de PVAT. Na presença de ibuprofeno, observou-se redução dos valores de E_{max} e pD_2 , indicando um envolvimento total de COX no papel contrátil do PVAT (**figura 24** - Sham E_{max} : $2,24 \pm 0,17$ / pD_2 : $6,98 \pm 0,088$ n=7; Sham + Ibuprofeno E_{max} : $2,41 \pm 0,15$ / pD_2 : $6,86 \pm 0,09$ n=6; Séptico E_{max} : $3,00 \pm 0,12$ / pD_2 : $7,264 \pm 0,09$ n=10; Séptico + Ibuprofeno E_{max} : $2,61 \pm 0,04$ / pD_2 : $6,85 \pm 0,05$ n=5).

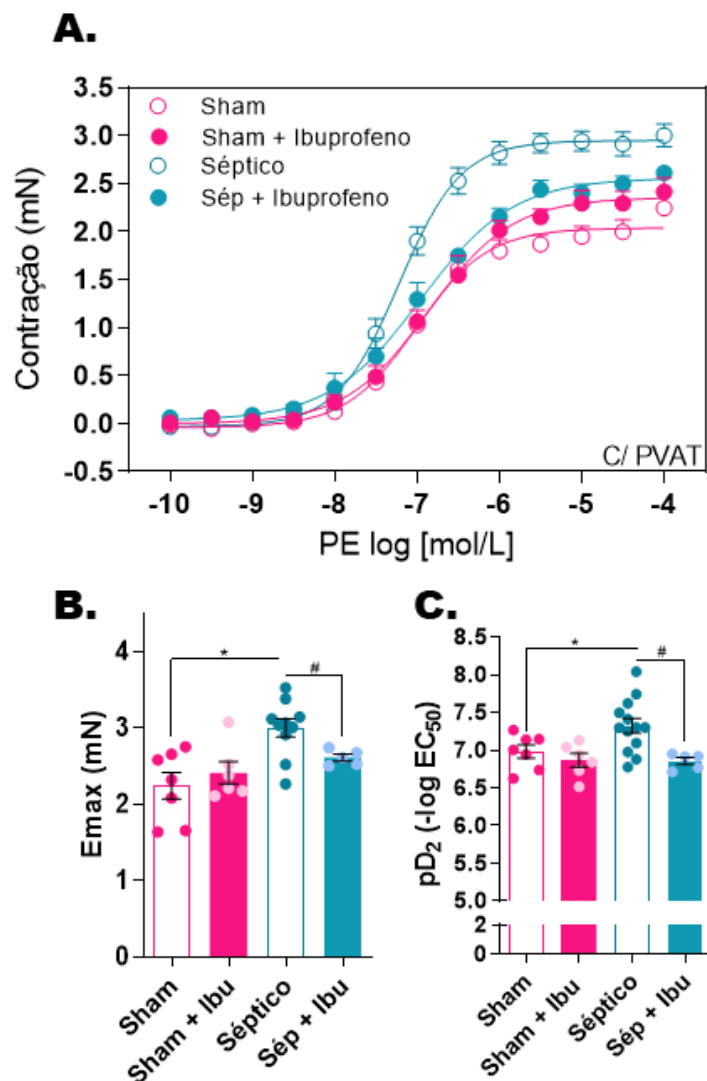


Figura 24: Avaliação da participação da enzima ciclooxygenase (COX) na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. (A) Curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE em aortas de camundongos na presença e na ausência de IBUPROFENO. **(B-C)** Representação gráfica dos valores de Emax induzida por PE e pD₂, respectivamente. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo Sham (SEP PVAT + X Sham PVAT+). # representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo Séptico (SEP PVAT - X SEP PVAT +).

Sabendo que há participação de COX, na resposta contrátil envolvendo PVAT, o próximo passo foi verificar se os efeitos eram devidos a ativação de COX-2, já que ela tem sua expressão aumentada em processos inflamatórios.

4.7.7 Participação da COX-2 no perfil contrátil do PVAT na contração induzida por PE em aortas de camundongos.

NIMESULIDA, que é um inibidor seletivo para COX-2, reduziu os valores de Emax e pD₂, indicando um envolvimento total de COX-2 no papel contrátil do PVAT, como pode ser visualizado na **figura 25** (Sham Emax: $2,24 \pm 0,17$ / pD₂: $6,98 \pm 0,088$ n=7; Sham + Nimesulida Emax: $2,02 \pm 0,10$ / pD₂: $6,90 \pm 0,20$ n=5; Séptico Emax: $3,00 \pm 0,12$ / pD₂: $7,264 \pm 0,09$ n=10; Séptico + Nimesulida Emax: $2,35 \pm 0,18$ / pD₂: $6,88 \pm 0,07$ n=6).

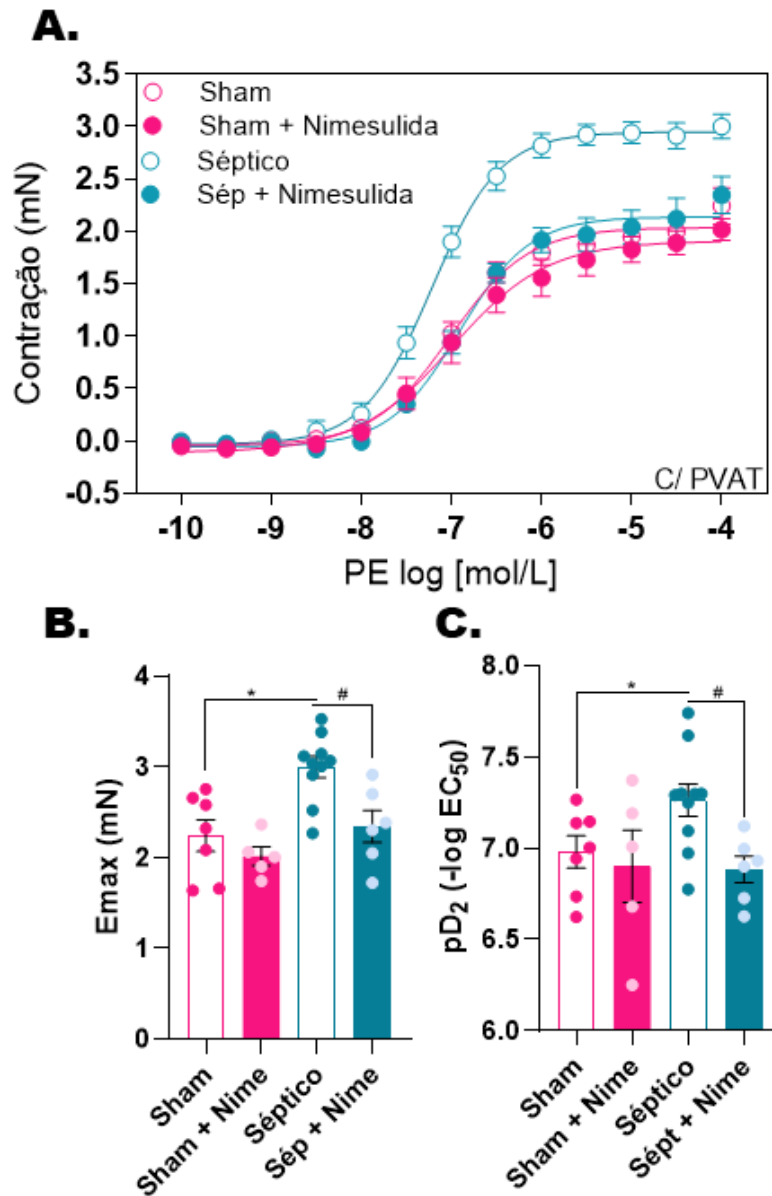


Figura 25: Avaliação da participação da enzima COX-2 na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. (A) Curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE em aortas de camundongos na presença e na ausência de NIMESULIDA. **(B-C)** Representação gráfica dos valores de Emax e pD₂, respectivamente, induzidos por PE. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo Sham (SEP PVAT + X Sham PVAT+). # representa diferença significativa (p<0,05) em relação ao grupo Séptico (SEP PVAT - X SEP PVAT +).

4.7.8 Determinação e quantificação da produção de O_2^- em aortas de animais sham e sépticos, na presença ou não de nimesulida

Também foi visualizado uma redução importante da intensidade de fluorescência dos núcleos do PVAT, em cortes incubados com nimesulida, indicando a participação de COX-2 e seus derivados na geração de ânion superóxido. (Séptico + Nimesulida: $36736,73 \pm 3019,56$; $n=4$); (Sham + Nimesulida: $37401,62 \pm 2622,64$; $n=4$) (**FIGURA 26 e 27**).

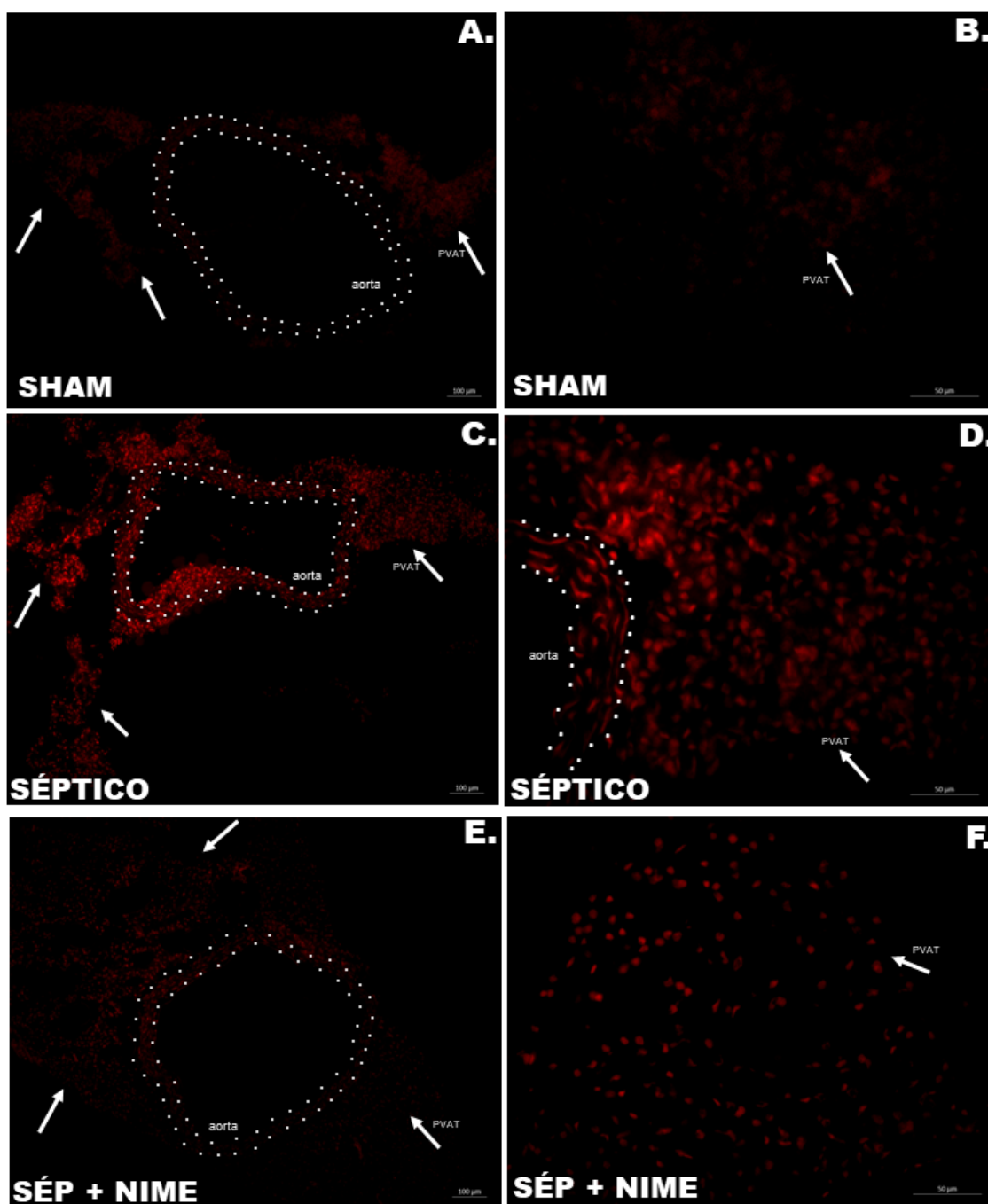


Figura 26: Imagens representativas da presença de O_2^- presentes em aortas de animais sham, séptico e séptico + nimesulida. A determinação da presença de O_2^- foi realizada por meio da exposição das aortas à sonda DHE que fluoresce em vermelho. As imagens foram obtidas de preparações independentes (Sham: n=3; Séptico: n=4; Séptico + nimesulida: n=4). **(A, C e E)** estão em aumento de 10X e **(B, D e F)** em aumento de 40X. As setas brancas indicam o PVAT, tecido no qual as fotos foram capturadas no aumento de 40x. O pontilhado branco delimita a aorta.

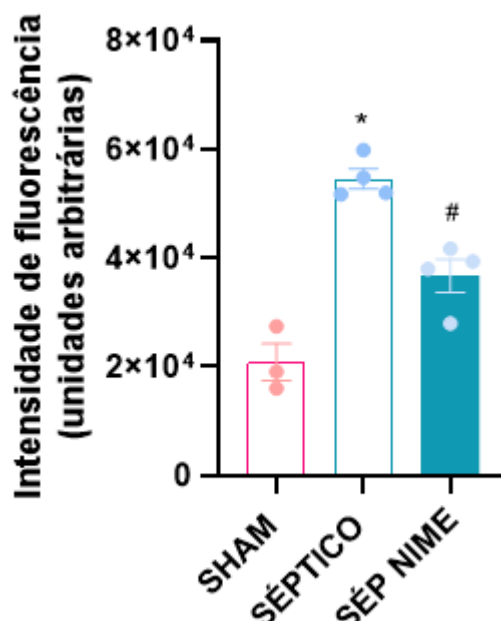


Figura 27: Quantificação, *in situ*, da produção de O_2^- em preparações de sham, séptico e séptico + nimesulida. Cada barra representa a média $\pm$ EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela sonda DHE. (sham: n=3; séptico: n=4; séptico + nimesulida= 4). * representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao resultado obtido para o grupo sham. # representa a diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao resultado obtido para o grupo séptico.

Comprovou-se que há participação de COX-2, mas será que seus derivados vasocontráteis, como por exemplo tromboxano A_2 e prostaglandina $F_{2\alpha}$ também participam dessa resposta vasocontrátil envolvendo PVAT?

4.7.9 Participação de derivados vasoativos da COX-2 no perfil contrátil do PVAT na contração induzida por um agente vasoconstritor, receptor-dependente, em aortas de camundongos.

Aortas dos grupos sham e séptico foram incubadas com **SERATRODASTE**, antagonista seletivo de receptor para tromboxano A_2 e **AH6809**, antagonista seletivo de receptor para prostaglandina $F_{2\alpha}$, ambos na presença de PVAT. Os resultados indicam participação de tromboxano A_2 , já que no grupo séptico houve uma redução da contração e consequentemente redução dos valores de E_{max} e também de pD_2 , quando incubado com SERATRODASTE (**Figura 28** - Sham E_{max} : $2,24 \pm 0,17$ / pD_2 : $6,98 \pm 0,088$ n=7; Sham + Seratrodaste E_{max} : $2,25 \pm 0,17$ / pD_2 : $6,98 \pm 0,14$ n=8; Séptico E_{max} : $3,00 \pm 0,12$ / pD_2 : $7,264 \pm 0,09$ n=10; Séptico + Seratrodaste E_{max} : $2,58 \pm 0,14$ / pD_2 : $6,74 \pm 0,11$ n=8).

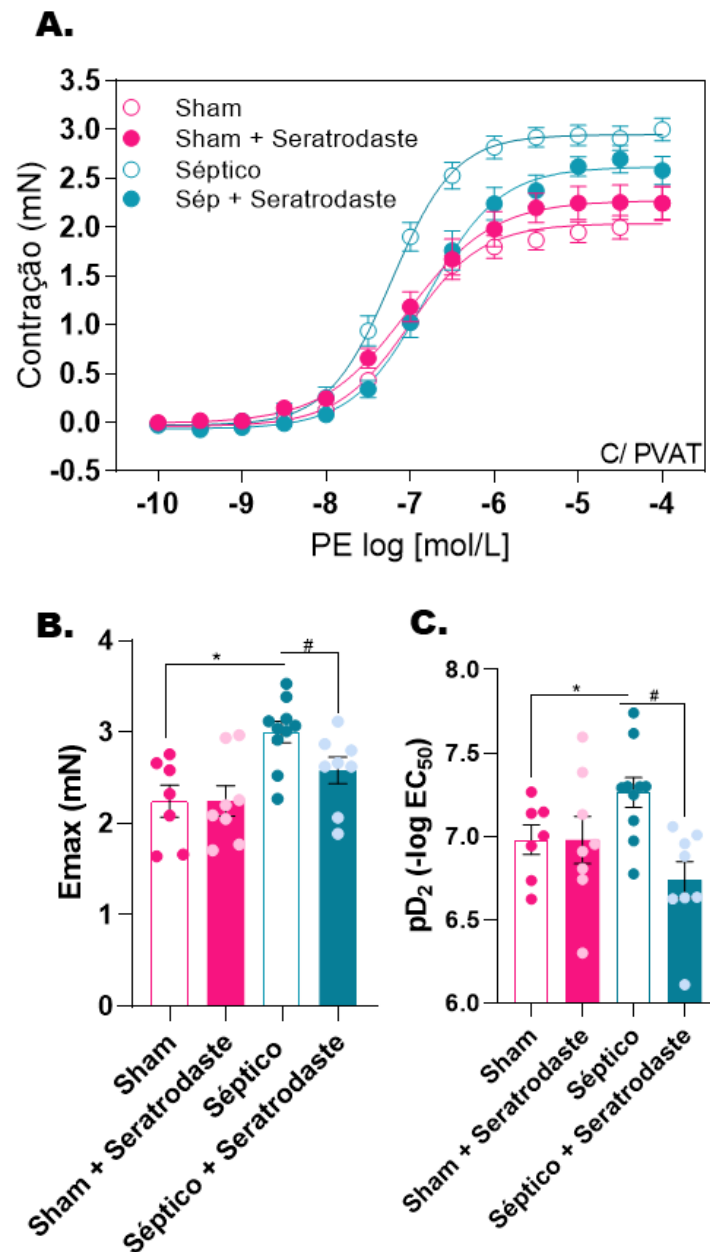


Figura 28: Efeito da participação de Tromboxano A₂, na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. (A) Curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE em aortas de camundongos na presença e na ausência de SERATRODASTE (antagonista do receptor para tromboxano A₂). **(B-C)** Representação gráfica dos valores de Emax e pD₂, respectivamente, da contração induzida por PE. Os valores representam a média ± EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham (SEP PVAT + X Sham PVAT+). # representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Séptico (SEP PVAT - X SEP PVAT +).

De forma semelhante, quando incubado com **AH6809**, os resultados indicam participação também de prostaglandina $F_{2\alpha}$, já que no grupo séptico houve uma redução significativa da contração e consequentemente redução dos valores de Emax e pD_2 (**Figura 29** - Sham Emax: $2,24 \pm 0,17$ / pD_2 : $6,98 \pm 0,088$ n=7; Sham + AH6809 Emax: $2,46 \pm 0,18$ / pD_2 : $6,87 \pm 0,10$ n=8; Séptico Emax: $3,00 \pm 0,12$ / pD_2 : $7,264 \pm 0,09$ n=10; Séptico + AH6809 Emax: $2,20 \pm 0,16$ / pD_2 : $6,84 \pm 0,20$ n=7).

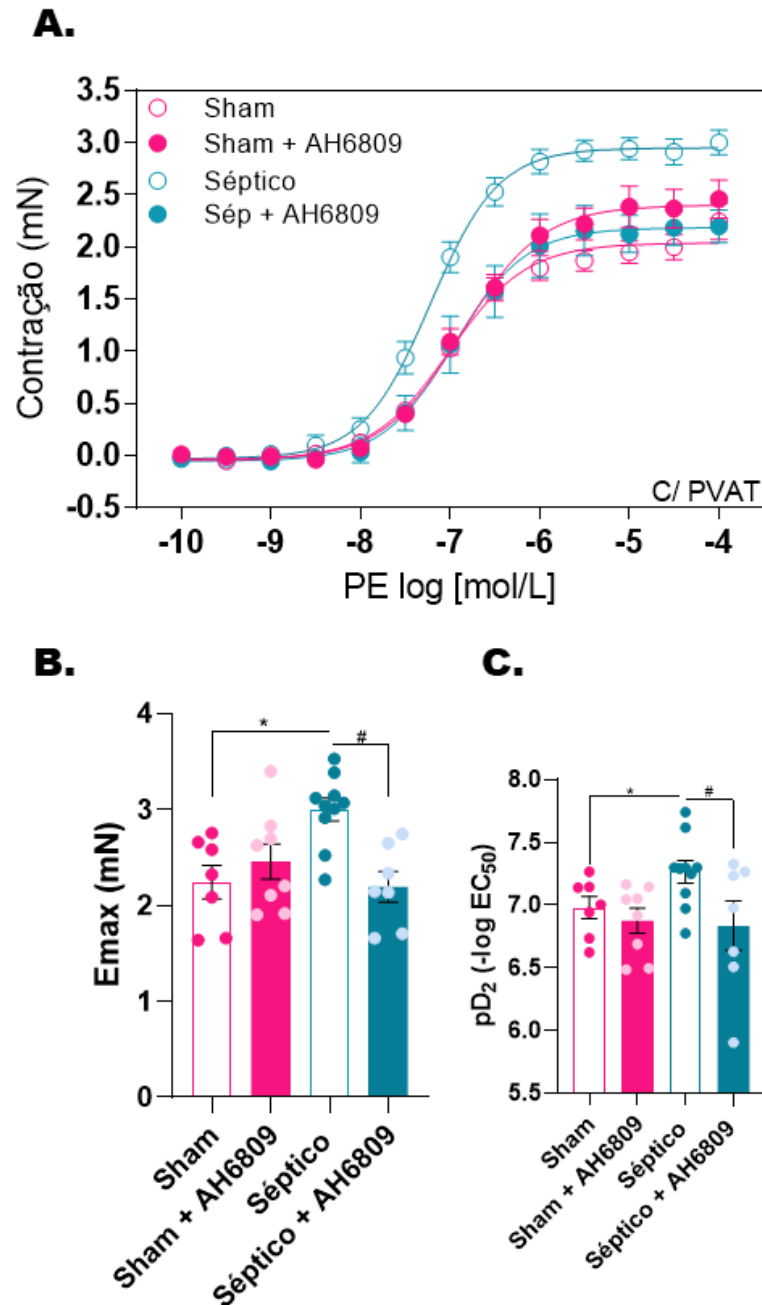


Figura 29: Efeito da participação de prostaglandina $F_{2\alpha}$, na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. (A) Curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE em aortas de camundongos na presença e na ausência de AH6809 (antagonista do receptor para prostaglandina $F_{2\alpha}$). **(B-C)** Representação gráfica dos valores de Emax da contração induzida por PE e pD₂, respectivamente. Os valores representam a média $\pm$ EPM obtida em preparações independentes. *representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Sham (SEP PVAT + X Sham PVAT+). # representa diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo Séptico (SEP PVAT - X SEP PVAT +).

5. DISCUSSÃO

A sepse é uma síndrome com alta morbi/mortalidade nas principais UTIs do Brasil e do mundo. Segundo a World Health Organization (WHO) (2020), anualmente mais de 30 milhões de indivíduos apresentam sepse, podendo matar mais de 6 milhões de pessoas, além de gerar altos custos para os cofres públicos. Sua identificação precoce é importante para que altere esse panorama. Uma forma de identificar tal situação, mas também modificar desfechos negativos e inclusive indicar o melhor tratamento é a implementação de escores clínicos (ILAS, 2017).

Na prática clínica da sepse, em UTIs, os escores clínicos são abundantemente utilizados. É muito relevante o seu uso, uma vez que através deles pode-se prever o prognóstico e quantificar a gravidade do quadro do indivíduo e além de, claro, direcionar as intervenções terapêuticas (GONÇALVES, 2015; KEEGAN; SOARES, 2016). Na pesquisa, os escores também ajudam a caracterizar tais condições em animais experimentais. Com o objetivo de criar medidas semelhantes para modelos animais experimentais Shrum et al. (2014), desenvolveram o escore utilizado no presente trabalho, no qual foi possível avaliar quantitativamente o estado clínico e a gravidade dos animais submetidos à sepse polimicrobiana.

No escore utilizado, avaliou-se variáveis como aparência, ou seja, presença ou não de piloereção, atividade espontânea, resposta ao estímulo do toque e auditivo, além de taxa e qualidade da respiração. Em nosso trabalho, a avaliação dos escores clínicos foi realizada 3, 4, 5 e 6 horas após a indução da sepse. Assim como Shrum et al. (2014), no presente trabalho observou-se, através do escore clínico, a piora de estado dos animais que passaram por indução de sepse por CLP com o decorrer do tempo. A diferença, é que no presente trabalho, a sepse foi avaliada apenas em sua fase aguda, ou seja, 6 horas após a indução, e o trabalho realizado por Shrum et al. (2014) avaliou até 21 horas após. É escasso, na literatura, trabalhos que fazem uso de escore de gravidade do quadro clínico para modelos de animais experimentais com sepse, mas sabe-se que um elevado escore clínico está diretamente relacionado com maior morbidade e uma possível mortalidade (GONÇALVES, 2015). Entretanto, nesse trabalho, utilizando a metodologia de sepse (CLP), apesar de ter sido

observado uma piora no prognóstico dos animais, estes tiveram 100% de sobrevivência no período de 6 horas.

A mortalidade de indivíduos com sepse em hospitais, normalmente, está relacionada a distúrbios circulatórios, como hipotensão persistente (ou seja, não se resolve mesmo com uso de vasopressores) e má perfusão tecidual. Esse último é considerado como o principal contribuinte para a falência progressiva de órgãos (SHIH et al., 2017; MISHRA; CHOUDHURY, 2018; BURGDORFF; BUCHER; SCHUMANN, 2018).

Sendo assim, outro parâmetro importante para caracterizar a sepse, além de ser uma variável importante dentro do escore clínico humano, é a pressão arterial. Já é bastante conhecido que em casos de sepse, a presença de componentes bacterianos, como o LPS, induz a expressão de iNOS e a partir dessa enzima o NO é sintetizado em larga concentração, gerando assim intensa vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, perda de fluidos para o espaço extravascular, causando assim hipovolemia e hipotensão. O NO tem sido citado como o principal mediador envolvido na hipotensão (SHIH et al., 2017; SHARAWY, 2014; ARAÚJO, 2012). De acordo com Saramago et al., 2019, o NO está intimamente relacionado ao desequilíbrio hemodinâmico e essa relação é provada quando a hipotensão induzida por LPS é atenuada em camundongos knockout para iNOS (SARAMAGO et al., 2019).

Segundo o ILAS (2017), hipotensão é definida quando a pressão arterial sistólica (PAS) se encontra menor que 90 mmHg, corroborando com os dados obtidos no presente estudo. Após 6 horas da indução da sepse, a PAS se encontrava $87,69 \text{ mmHg} \pm 1,98$. Esse resultado corrobora com o obtido por Araújo et al., 2012, que detectaram uma hipotensão significativa 5–7 h pós-CLP em ratos Wistar (ARAÚJO et al., 2012).

No presente estudo, a temperatura dos animais sépticos (6 horas) se encontrava reduzida quando comparada ao sham. Segundo Saramago e colaboradores (2019), a hipotensão e a hipotermia na sepse estão fortemente relacionadas, uma vez que podem até ser acionados pelo mesmo tipo celular em órgãos periféricos e ambas ocorrem simultaneamente. A sepse, tanto em humanos, quanto em animais experimentais, é uma resposta complexa, com

alterações importantes de temperatura corporal, podendo gerar febre, mas hipotermia também (SARAMAGO et al., 2019). A febre é um processo importante e até benéfico para o indivíduo, por esse fato a hipotermia poderia estar associada a um aumento da mortalidade (WIEWEL et al., 2016). Também observado por Kushimoto et al. (2013), pacientes com temperatura $\leq 36,5$ °C tiveram escores SOFA (disfunção orgânica) maior, quando comparados com pacientes com temperatura $> 37,5$ °C. Entretanto, no presente trabalho, a mortalidade em 6 horas de sepse, foi de 0%, mesmo com animais sépticos hipotérmicos (SARAMAGO et al., 2019; WIEWEL et al., 2016).

De acordo com Remick & Xioa (2006), camundongos e ratos podem desenvolver hipotermia quando passam por indução a sepse. Além disso, os anestésicos Cetamina e Xilazina induzem uma rápida diminuição da temperatura corporal (podendo alcançar até 30°C), após poucos minutos da aplicação e apresentam uma lenta recuperação dessa hipotermia, podendo alcançar até 10 horas do horário da aplicação. A queda de temperatura identificada nas primeiras 5 horas é praticamente devido a anestesia. A partir desse horário, já se inicia a hipotermia induzida, ou seja, devido a própria sepse. A hipotermia causada pela sepse, juntamente com a causada pela anestesia é significativamente mais potente do que apenas pela anestesia. Aquecer os animais após o processo cirúrgico é capaz de reverter a hipotermia pós-operatória (REMICK; XIOA, 2006). Os animais experimentais utilizados no presente estudo, além de terem sido anestesiados com Cetamina e Xilazina (potentes anestésicos que inclusive causam hipotermia), foram aquecidos com uma bolsa térmica até o momento que se recuperaram dos efeitos dos anestésicos. Essa ação pode justificar a taxa de 100% de sobrevivência, além de uma hipotermia não tão grave.

Como já mencionado no presente trabalho, na fase aguda da sepse, pode ocorrer tanto processos inflamatórios exacerbados, quanto quadros hipoinflamatórios, gerando até imunossupressão (DENSTAEDT; SINGER; STANDIFORD, 2018; DING; MENG; MA, 2018). Como também foi relatado pelo ILAS (2015), que dentre os sinais e sintomas da sepse, estão presente leucocitose (aumento de leucócitos totais) ou leucopenia (redução de leucócitos totais). Nesse trabalho, foi detectado a presença de leucopenia, marcado pela redução de neutrófilos. Os neutrófilos são a primeira linha de defesa quando é

detectado a presença de um agente infeccioso (SHEN, 2017). Portanto, eles reconhecem, atacam e matam esses agentes por fagocitose. Em uma situação em que os seus níveis estão reduzidos, como é o caso desse estudo, há uma suscetibilidade aumentada a infecções e uma reduzida capacidade de combatê-la, além de ter forte relação com a gravidade da sepse (WARNOCK, 2016). Na clínica, pacientes neuropênicos são considerados uma emergência médica, uma vez que apresentam comprometimento na capacidade de responder à infecção (OAKLEY; HILL; CHOWDHURY, 2010).

Finalizando a caracterização da sepse e considerando que o leucograma de animais sépticos estava alterado, buscou-se investigar se havia alteração, também, no peso do baço desses animais, uma vez que este é um órgão linfóide e apresenta um papel relevante na regulação do sistema imunológico uma vez que ele é a origem das células imunes recrutadas por estímulos inflamatórios (SILVA, 2019; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Porém de forma surpreendente, não houve diferença no peso dos baços em animais sépticos quando comparado ao sham, 6 horas pós-sepse.

O tecido adiposo perivascular (PVAT) há algum tempo já é bem descrito como sendo mais que um tecido de suporte de vaso. Atualmente, ele é considerado um componente importante e ativo na vasculatura, com funções essenciais e relevantes na fisiologia, mas também em processos patológicos (BROWN, 2014). Logo, como um dos objetivos desse estudo foi avaliar, na fase aguda da sepse, a influência do PVAT sobre o tônus vascular de aortas de animais sépticos, realizou-se experimentos de reatividade vascular na ausência e na presença desse tecido. Sendo assim, nossos resultados confirmam dados da literatura que mostram que em quadros como a sepse ocorre uma hiporreatividade, que tem como consequência mudança no tônus vascular (BROWN, 2014). Essa redução na reatividade vascular prejudica o tratamento e interfere na eficácia dos agentes vasoativos (DUAN et al. 2015), muitas vezes levando o indivíduo ao óbito. Esse prejuízo do tônus vascular durante a sepse envolve muitos mecanismos, como o excesso de NO, peróxido nítrico, prostaciclina (derivada de COX-2) (KIMMOUN; DUCROCQ; LEVY, 2013). Porém, no presente estudo, observou-se que quando o PVAT está presente, há uma importante reversão da hiporreatividade. O PVAT apresenta nessa situação, um papel

compensatório, sugerindo liberação de substâncias vasoconstritoras na aorta de animais sépticos por esse tecido, visto que quando na ausência do PVAT a contração foi reduzida.

Diferente do que foi visto por Barp; Benedet; Assreuy (2020), que o PVAT da aorta de animais sépticos produziu NO e ROS, além de exibir uma maior densidade de nNOS e eNOS. O PVAT, nesse caso, contribuiu para um efeito anti-contrátil na aorta (BARP; BENEDET; ASSREUY, 2020). Essa hiporresponsividade, causada pela sepse, também foi vista por Awata et al. (2019), em ratos Wistar após passarem pelo protocolo CLP. Entretanto, tal grupo também observou uma ação anti-contrátil do PVAT em aortas com endotélio intacto e sem endotélio, favorecendo vasoplegia (AWATA et al., 2019). A novidade do presente trabalho é que o PVAT atua evitando uma hiporreatividade de forma benéfica na sepse, provavelmente a partir da liberação de substâncias vasoconstritoras.

Dados da literatura exibem que em alguns processos patológicos, como na obesidade, o PVAT perca seu efeito anti-contrátil fisiológico por alterar as estruturas e funções desse tecido favorecendo liberação de ROS, outras substâncias vasoconstritores e fatores pró-inflamatórios (BROWN, 2014; COSTA, 2017; OWEN, 2013). Entretanto, sabendo que um fator de risco importante para a morte em indivíduos sépticos é a vasodilatação induzida pela sepse e acompanhada por hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, consideramos esse efeito contrátil que o PVAT favorece, compensatório.

Quais seriam as substâncias e mecanismos envolvidos nesse efeito contrátil oferecido pelo PVAT? Na tentativa de responder essa pergunta e sabendo que na sepse há um desequilíbrio entre a geração de substâncias oxidantes e antioxidantes, denominado estresse oxidativo, com consequente geração de ROS (MANTZARLIS; TSOLAKI; ZAKYNTHINOS, 2017) pesquisou-se se nos animais sépticos havia formação de ânion superóxido pelo PVAT, uma vez que Gao e colaboradores (2006), observaram que o PVAT apresentava um papel contrátil através da liberação de ânion superóxido.

Para detectar a presença dessa espécie reativa, os anéis aórticos foram incubados com TIRON, um sequestrador de ânion superóxido e notou-se então uma participação parcial dessa espécie reativa no efeito contrátil do PVAT. A presença de ânion superóxido também foi confirmada por ensaio de

fluorescência. Gao et al. (2006) também notaram que a fonte geradora do ânion superóxido detectado no tecido estudado, era o complexo enzimático NADPH oxidase. Para confirmar este fato no presente trabalho, incubou-se com APOCININA, inibidor desse complexo, e foi observado um envolvimento parcial, e confirmado via fluorescência para a sonda DHE, que também foi incubado com esse inibidor, assim como visto por Simões et al. (2015).

Além das espécies reativas de oxigênio, na sepse, principalmente no modelo CLP, ocorre também aumento de expressão de COX-2 (DADKHAH et al., 2018). Assim como observou Dadkhah et al. (2018), no presente trabalho também verificamos que a COX-2 participa, através da geração de prostanóides vasoconstritores derivados da COX, uma vez que ao inibir com nimesulida (inibidor seletivo de COX-2) reduziu a contração aórtica via PVAT. Na obesidade, Meyer et al. (2013) observaram que a ciclooxigenase (COX) é responsável pelos efeitos contráteis do PVAT principalmente por gerar tromboxano A₂ (TXA₂). Em 2011, Yuhki e colaboradores, observaram que em uma situação de sepse, causando um estado vascular hiporresponsivo, o TXA₂ atuou mantendo o tônus vascular, inibindo a iNOS nas células do músculo liso vascular. No presente trabalho, detectou-se a geração de TXA₂ e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). Muitos trabalhos da literatura vêm a geração desses mediadores vasocontráteis derivados da COX, como tendo uma ação maléfica para o sistema cardiovascular (BADR,1992; YUNKI et al., 2011, TAKAYAMA, 2005). Entretanto, em 6 horas de sepse, no presente estudo, observou-se que tais mediadores apresentam uma ação benéfica do PVAT por compensar a hiporreatividade causada pela sepse.

Além disso, neste trabalho, verificou-se que além de gerar TXA₂ e PGF_{2α}, a COX-2 também influencia na geração de ROS, entre elas ânion superóxido (O₂⁻). Através de ensaio de fluorescência para DHE, pra avaliar a biodisponibilidade de ânion superóxido (O₂⁻), observou-se que ao inibir a COX-2 com nimesulida (inibidor seletivo para COX-2) verificou-se redução de O₂⁻. Essa redução, também foi vista por Simões e colaboradores (2015) e Muzaffar et al. (2004). Existe, então, uma possível “conversa” entre ROS e COX?

Já é bem conhecida a participação de ROS e COX-2 em processos patológicos, como já foi descrito nesse trabalho. Porém a regulação recíproca de NADPH oxidase/ROS e COX-2 em situações como na hipertensão (HERNANZ et al., 2013), exposição ao chumbo causando hipertensão (SIMÕES et al., 2015),

em cardiomiócitos expostos ao LPS (PENG; LU; FENG, 2004) é relativamente recente. Além disso, ainda não foi visto na literatura essa relação recíproca ocorrendo no PVAT de camundongos sépticos. Sabe-se que o complexo NADPH oxidase é a principal fonte de ROS nas células da parede dos vasos e que, além disso, ROS e prostanóides derivados da COX compartilham muitos estímulos e vias de sinalização. O TXA₂ e o PGF_{2α}, por exemplo, regulam positivamente a produção de ROS por NADPH oxidase. Além disso, a COX-2, *per si*, pode desencadear a geração de ROS através de co-oxidação (HERNANZ et al., 2013).

O estresse oxidativo também regula positivamente a expressão de COX-2 e o tratamento com antioxidante, como a apocinina, reduz a expressão de COX-2 (SIMÕES et al., 2015). Esses mediadores apresentam uma grande importância na parede vascular. A regulação recíproca pode ter um papel crítico por meio de uma cascata de autoperpetuação prejudicial em processos patológicos como a hipertensão (HERNANZ et al., 2013). Na sepse, esse “ciclo vicioso” poderia ser benéfico? Muzaffar e colaboradores (2004), observaram que em artérias pulmonares de porcos, o estímulo por LPS (ou seja, uma endotoxemia), juntamente com IL-1α, além de TNF-α produziram um aumento de TXA₂ e PGF_{2α}. E que um análogo de TXA₂ era capaz de promover aumento de formação de ânion superóxido, uma vez que regulou positivamente a subunidade catalítica de NADPH oxidase (gp91^{phox}) promovendo vasoconstrição, além de adesão leucocitária e plaquetária (MUZAFFAR et al., 2004).

No presente trabalho, como também observado por Hernaz et al. (2013) e Muzaffar et al. 2004, sugere-se que TXA₂ e PGF_{2α} regulam positivamente a expressão de NADPH oxidase, levando a produção de ânion superóxido e deste modo, sugerimos ser a primeira vez em um trabalho, que uma possível ação “benéfica” dessa cascata de autoperpetuação de ROS ↔ COX-2 foi visualizada no PVAT de animais com sepse aguda, alterando a reatividade vascular, especificamente favorecendo a contração aórtica.

A sepse é uma síndrome complexa que devido a sua incidência e letalidade, torna-se um grave problema de saúde pública mundial que deve ser

melhor compreendida, uma vez que a eficácia da terapêutica/tratamento depende da agilidade e correto diagnóstico dessa síndrome. Na sepse, são observadas alterações nos diversos sistemas, destacando aqui o sistema cardiovascular, principalmente por causar alterações hemodinâmicas importantes como vasodilatação intensa, hipotensão e hiporreatividade, levando os pacientes a óbito. Com o intuito de entender a hiporreatividade presente em quadros de sepse, foi importante compreender o papel do PVAT no controle do tônus vascular, uma vez que em condições fisiológicas, o mesmo auxilia tanto no mecanismo de vasodilatação quanto na vasoconstrição. Em nosso estudo, sugerimos que a sepse provoca hipotensão, hipotermia e hiporreatividade vascular, provavelmente com aumento na produção e expressão de substâncias vasodiladoras como por exemplo óxido nítrico, ROS, prostaciclina. Também foi visto leucopenia, derivada principalmente por uma redução de neutrófilos (neutropenia).

Por fim, o PVAT, a partir de estímulos inflamatórios derivados da sepse, como por exemplo LPS, apresentou perfil contrátil compensatório, se contrapondo a hiporreatividade causada pela sepse. Esse fato confirma mais uma vez sua alta plasticidade, através da liberação de agentes vasoconstritores, como uma regulação recíproca entre espécies reativas de oxigênio, neste caso, ânion superóxido, gerado provavelmente a partir do complexo NADPH oxidase, e que por uma cascata de autoperpetuação, a COX também está envolvida, principalmente a isoforma COX-2 e seus derivados vasocontráteis, como tromboxano A₂ e prostaglandina F_{2α} também “alimentando” essa via. Portanto sugerimos que o perfil contrátil apresentado pelo PVAT na sepse aguda (6h) se deva principalmente à participação de ânions superóxido, além de derivados da COX-2 e que ambos “autoalimentam” o ciclo favorecendo a contração observada.

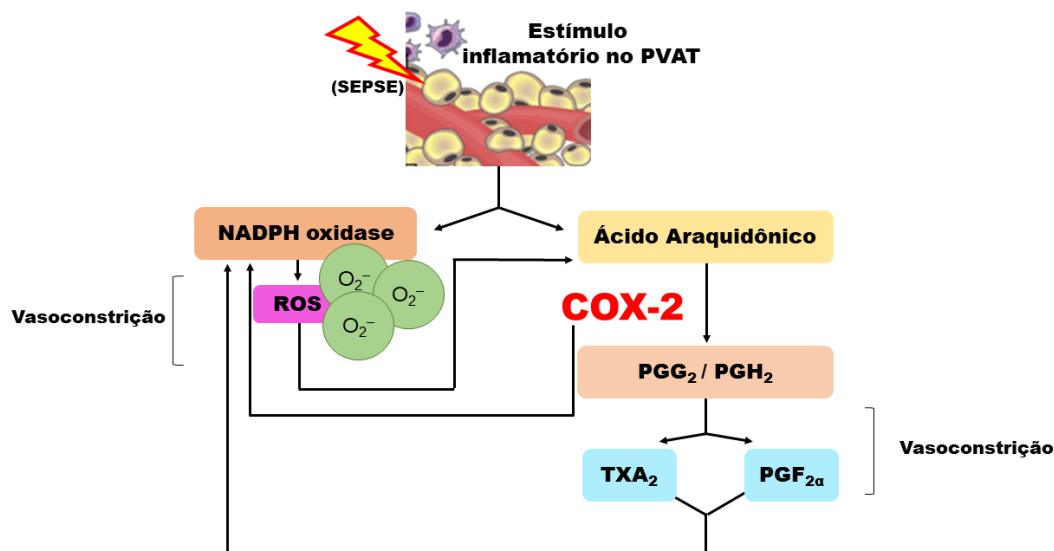


Figura 30: Desenho esquemático sugerindo a relação recíproca entre ROS (O₂⁻) e COX-2 no perfil vasocontrátil do PVAT na sepse aguda (6h). A figura ilustra que após sofrer um estímulo inflamatório, como em um caso de sepse aguda, o PVAT apresente um perfil contrátil devido, principalmente, à presença de duas vias contráteis muito conhecidas. Na via à esquerda, ocorre a geração de ânion superóxido (O₂⁻) e uma das principais fontes é o complexo NADPH oxidase, causando estresse oxidativo. A clássica via do ácido araquidônico é visualizada à direita, que este ao ser metabolizado pela COX-2, gera derivados vasodilatadores e vasoconstritores, como tromboxano A₂ (TXA₂) e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}). A própria COX-2 é capaz de ativar o NADPH oxidase por sua capacidade de co-oxidação. Além disso, os derivados vasoconstritores, TXA₂ e PGF_{2α} também podem regular positivamente NADPH oxidase gerando espécies reativas de oxigênio, que promovem a liberação de ácido araquidônico, produzindo ainda mais substâncias derivadas da COX, o que por sua vez aumentaria ainda mais a formação de O₂⁻, que sabidamente promove vasoconstrição.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, 2008.

Agency for Healthcare Research and Quality. Disponível em: <<https://www.ahrq.gov/>>. Acesso em 09 de nov. 2018.

AHMAD, Abdulla A.; RANDALL, Michael D.; ROBERTS, Richard E. Sex differences in the role of phospholipase A2-dependent arachidonic acid pathway in the perivascular adipose tissue function in pigs. **The Journal Of Physiology**, [s.l.], v. 595, n. 21, p. 6623-6634, 24 set. 2017.

ARAÚJO, A. et al. Augmented nitric oxide production and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase during cecal ligation and perforation. **Nitric Oxide**, [S.L.], v. 27, n. 1, p. 59-66, jun. 2012.

AWATA, W. et al. Perivascular adipose tissue contributes to lethal sepsis-induced vasoplegia in rats. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 863, p. 1-10, nov. 2019.

BADR, K. Sepsis-associated renal vasoconstriction: potential targets for future therapy. **Am J Kidney Dis**. v. 20, n. 3, p 207-213. 1992.

BARP, C.; BENEDET, P.; ASSREUY, J. Perivascular adipose tissue phenotype and sepsis vascular dysfunction: Differential contribution of NO, ROS and beta 3-adrenergic receptor. **Life Sci**. v.254. p. 1-44. 1 de ago de 2020.

BARRETO, Maynara Fernanda; DELLAROSA, Mara Solange Gomes; KERBAUY, Gilselena, GRION, Cíntia Magalhães Carvalho. Sepsis in a university hospital: a prospective study for the cost analysis of patients' hospitalization. **Rev Esc Enferm USP**, Londrina, 50(2):299-305, 2016.

BARROS, Lea Lima Dos Santos; MAIA, Cristiane Do Socorro Ferraz; MONTEIRO, Marta Chagas. Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em unidade de terapia intensiva. **Cad. saúde colet.**, Rio de janeiro, v. 24, n. 4, p. 388-396, 2016.

BATISTA, Rodrigo Siqueira, et al. Sepse: atualidades e perspectivas. **Revista Brasileira Terapia Intensiva**, São Paulo, v.23, n. 2, abr./ jun. 2011. Disponível

em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbti/v23n2/a14v23n2.pdf>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

BEALE, R.; REINHART, K.; BRUNKHORST, F. M.; DOBB, G.; LEVY, M.; MARTIN, G.; MARTIN, C.; RAMSEY, G.; SILVA, E. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry: Lessons from an International Sepsis Registry. **Infection**, [s.l.], v. 37, n. 3, p. 222-232, 28 abr. 2009.

BENNETT M, GILROY DW. 2016. Lipid mediators in inflammation. **Microbiol Spectrum** 4(6): MCHD-0035. 2016.

BOYDENS, Charlotte; PAUWELS, Bart; VAN DE VOORDE, Johan. Effect of resveratrol and orchidectomy on the vasorelaxing influence of perivascular adipose tissue. **Heart Vessels**. v. 31, n. 4, p. 608-615, abr./ 2015.

BRITO, Camila de Fátima Carvalho. **Papel da ciclooxygenase-1 no choque endotóxico**. 2017. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2017.

BROWN, Nicholas K.; ZHOU, Zhou; ZHANG, Jifeng; ZENG, Rong; WU, Jiarui; EITZMAN, Daniel T.; CHEN, Y. Eugene; CHANG, Lin. Perivascular Adipose Tissue in Vascular Function and Disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [s.l.], v. 34, n. 8, p. 1621-1630, ago. 2014.

BURAS, Jon A.; HOLZMANN, Bernhard; SITKOVSKY, Michail. Animal Models of sepsis: setting the stage.: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s.l.], v. 4, n. 10, p. 854-865, out. 2005.

BURGDORFF, A.-M.; BUCHER, M.; SCHUMANN, J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. **Journal Of International Medical Research**, [S.L.], v. 46, n. 4, p. 1303-1310, 14 jan. 2018.

CARNEIRO, António Henriques; PÓVOA, Pedro; GOMES, José Andrade. Dear Sepsis-3, we are sorry to say that we don't like you. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [s.l.], v. 29, n. 1, p. 4-8, 2017.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. **Óxido nítrico**. Revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira* [serial online], v. 17, n. 6, p. 417-423, nov./dez. 2002.

CHENG, CK. et al. Perivascular adipose tissue: the sixth man of the cardiovascular system. **Cardiovascular drugs and therapy**. v. 32, n. 5, p. 481-502, out. 2018.

COSTA, R. et al. Increased mitochondrial ROS generation mediates the loss of the anti-contractile effects of perivascular adipose tissue in high-fat diet obese mice. **Br J Pharmacol**. v. 174. n. 20. p. 3527-3541. 2017.

DADKHAH, A. et al. Assessing the effect of *Mentha longifolia* essential oils on COX-2 expression in animal model of sepsis induced by caecal ligation and puncture. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 56, n. 1, p. 495-504, 1 jan. 2018.

DENSTAEDT, Scott J.; SINGER, Benjamin H.; STANDIFORD, Theodore J. Sepsis and Nosocomial Infection: patient characteristics, mechanisms, and modulation.: Patient Characteristics, Mechanisms, and Modulation. **Frontiers In Immunology**, [s.l.], v. 9, p. 1-16, 23 out. 2018.

DING, Renyu; MENG, Yulan; MA, Xiaochun. The Central Role of the Inflammatory Response in Understanding the Heterogeneity of Sepsis-3. **Biomed Research International**, [s.l.], v. 2018, p. 1-10, 7 jun. 2018.

DINIZ, M. et al. Mechanisms underlying sodium nitroprusside-induced tolerance in the mouse aorta: Role of ROS and cyclooxygenase-derived prostanoids. **Life Sciences**, [S.L.], v. 176, p. 26-34, maio 2017.

DUAN, C. et al. Advances in Vascular Hyporeactivity After Shock: The Mechanisms and Managements. **Shock**, [S.L.], v. 44, n.6, p. 524-534, 2015.

DUSSE, Luci Maria Sant'Ana; VIEIRA, Lauro Mello; CARVALHO, Maria das Graças. Nitric oxide revision. **J. Bras. Patol. Med. Lab**. vol.39, n.4, pp.343-350, 2003.

FERREIRA, Cláudia de Souza. **O SISTEMA NADPH OXIDASE DE NEUTRÓFILOS E A FORMAÇÃO DE AGES (PRODUTOS FINAIS DE**

GLICAÇÃO AVANÇADA) EM RATOS DIABÉTICOS. 2011. 80 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Alfenas. Alfenas. 2011.

FERREIRA, Juliana Carvalho; PATINO, Cecilia Maria. What is survival analysis, and when should I use it? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, [S.L.], v. 42, n. 1, p. 77-77, fev. 2016. FapUNIFESP (SciELO).

GÁLVEZ-PRIETO, Beatriz; DUBROVSKA, Galyna; CANO, M. Victoria; DELGADO, Mercedes; ARANGUEZ, Isabel; GONZÁLEZ, M. Carmen; RUIZ-GAYO, Mariano; GOLLASCH, Maik; FERNÁNDEZ-ALFONSO, Maria S. A Reduction in the Amount and Anti-Contractile Effect of Periadventitial Mesenteric Adipose Tissue Precedes Hypertension Development in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension Research**, [s.l.], v. 31, n. 7, p. 1415-1423, 2008.

GÁLVEZ-PRIETO, Beatriz; SOMOZA, Beatriz; GIL-ORTEGA, Marta; GARCÍA-PRIETO, Concha F.; HERAS, Ana I. de Las; GONZÁLEZ, M. Carmen; ARRIBAS, Silvia; ARANGUEZ, Isabel; BOLBRINKER, Juliane; KREUTZ, Reinhold. Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. **Frontiers In Pharmacology**, [s.l.], v. 3, p. 1-8, 2012.

GAO, y et al. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 71, n. 2, p.363-373, 15 jul. 2006.

GOMES, Marco Antônio Mota; NETO, Nilton Cavalcanti Macêdo; BISPO, Irving Gabriel Araújo. Interleucina-6, Moléculas de Adesão Intercelular-1 e Microalbuminúria na Avaliação da Lesão Endotelial: Revisão de Literatura. **Rev SOCERJ**. 2009;22(6):398-403 novembro/dezembro. 2009.

GONG, Wei; WEN, Haitao. Sepsis Induced by Cecal Ligation and Puncture. **Mouse Models Of Innate Immunity**, [s.l.], p. 249-255, 2019.

GOTUR, Deepa B. Sepsis in a panorama: what the cardiovascular physician should know. **Methodist debakey cardiovasc j.**, Texas. v. 14, n. 2, p. 89-100, abr./jun. 2018.

GUYTON, Arthur C; HALL, John Edward. Guyton & Hall. Tratado de Fisiologia Médica. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.

HAI-MEI, Liu et al. Andrographolide Protects Against Lipopolysaccharide-Induced Vascular Hyporeactivity by Suppressing the Expression of Inducible Nitric Oxide in Periaortic Adipose. **Journal Of Cardiovascular Pharmacology**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.154-159, ago. 2013.

HENKIN, C. S. et al. Sepsis: uma visão atual. **Scientia medica**, Porto alegre, v. 19, n. 3, p. 135-145, set. 2009.

HERNANZ, R. et al. New roles for old pathways? A circuitous relationship between reactive oxygen species and cyclo-oxygenase in hypertension. **Clinical Science**, [S.L.], v. 126, n. 2, p. 111-121, 13 set. 2013.

INSTITUTO LATINO-AMERICANO PARA ESTUDOS DE SEPSE. **Sepsis: um problema de saúde pública**. Conselho Federal de Medicina, Brasília, p. 90, 2015. Disponível em: <[http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/upload/Livro-ILAS\(Sepsis-CFM-ILAS\).pdf](http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/upload/Livro-ILAS(Sepsis-CFM-ILAS).pdf)>. Acesso em: 31 out. 2018.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. **Implementação de protocolo gerenciado de sepsis protocolo clínico: Atendimento ao paciente adulto com sepsis / choque séptico**. jun. de 2017. Disponível em: <<http://www.ilas.org.br/assets/arquivos/ferramentas/protocolo-de-tratamento.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2018.

JÚNIOR, G. A.P. et al. Fisiopatologia da sepsis e suas implicações terapêuticas. Medicina, Ribeirão. Preto, 31: 349-362, jul./set. 1998.

KEEGAN, Mark T.; SOARES, Marcio. What every intensivist should know about prognostic scoring systems and risk-adjusted mortality. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [S.L.], v. 28, n. 3, p. 264-269, 2016.

KIMMOUN, Antoine; DUCROCQ, Nicolas; LEVY, Bruno. Mechanisms of Vascular Hyporesponsiveness in Septic Shock. **Current Vascular Pharmacology**, [S.L.], v. 11, n. 2, p. 139-149, 1 mar. 2013.

KIRKBY, Nicholas S. et al. Systematic study of constitutive cyclooxygenase-2 expression: role of nf-kb and nfat transcriptional pathways.: Role of NF-κB and

NFAT transcriptional pathways. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 113, n. 2, p. 434-439, 28 dez. 2015.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. Robbins. **Patologia básica**. 9. ed. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 910, 2013.

KUSHIMOTO, S. et al. The impact of body temperature abnormalities on the disease severity and outcome in patients with severe sepsis: an analysis from a multicenter, prospective survey of severe sepsis. **Critical Care**, [S.L.], v. 17, n. 6, p. 1-9, 2013.

LÖHN, Matthias; DUBROVSKA, Galyna; LAUTERBACH, Birgit; LUFT, Friedrich C.; GOLLASCH, Maik; SHARMA, Arya M. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **The Faseb Journal**, [s.l.], v. 16, n. 9, p. 1057-1063, jul. 2002.

LU, Chao; SU, Li-ying; LEE, Robert M.k.w.; GAO, Yu-jing. Mechanisms for perivascular adipose tissue-mediated potentiation of vascular contraction to perivascular neuronal stimulation: the role of adipocyte-derived angiotensin ii.: The role of adipocyte-derived angiotensin II. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 634, n. 1-3, p. 107-112, maio 2010.

LUND, D. et al. Role of angiotensin II in endothelial dysfunction induced by lipopolysaccharide in mice. **American Journal Of Physiology-heart And Circulatory Physiology**, [s.l.], v. 293, n. 6, p. 726-731, dez. 2007.

LUSH, C. et al. Regulation of intestinal nuclear factor- κ B activity and E-selectin expression during sepsis: a role for peroxynitrite.: A role for peroxynitrite. **Gastroenterology**, [s.l.], v. 124, n. 1, p. 118-128, jan. 2003.

MANTZARLIS, K; TSOLAKI V.; ZAKYNTHINOS E. Role of Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction in Sepsis and Potential Therapies. **Oxid Med Cell Longev**. p. 1-10, 2017.

MARTIN, Greg S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Review Of Anti-infective Therapy**, [s.l.], v. 10, n. 6, p.701-706, jun. 2012.

MCEVER, Rodger P. Selectins: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall.: initiators of leucocyte adhesion and signalling at the vascular wall. **Cardiovascular Research**, [s.l.], v. 107, n. 3, p. 331-339, 20 maio 2015.

MCKENNA, S.et al. Perinatal Endotoxemia Induces Sustained Hepatic COX-2 Expression through an NFkB-Dependent Mechanism. **Journal of Innate Immunity**, 8(4), 386–399. 2016.

MEDDINGS, J. B.; SCOTT, R. B.; FICK, G. H. Analysis and comparison of sigmoidal curves: application to dose-response data.: application to dose-response data. **American Journal Of Physiology-gastrointestinal And Liver Physiology**, [s.l.], v. 257, n. 6, p. 982-989, 1 dez. 1989.

MEDERLE, K. et al. The angiotensin II AT1 receptor-associated protein Arap1 is involved in sepsis-induced hypotension. **Critical Care**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 130-139, 2013.

MEIJER, R. et al. Perivascular Adipose Tissue and Its Role in Type 2 Diabetes and Cardiovascular Disease. **Current Diabetes Reports**, [s.l.], v. 11, n. 3, p. 211-217, 5 abr. 2011.

MEYER, M. et al. Regulation of Vascular Smooth Muscle Tone by Adipose-Derived Contracting Factor. **PLoS One**. v.8, n.11, p. 1-10, nov. 2013.

MIAO, Chao-yu; LI, Zhi-yong. The role of perivascular adipose tissue in vascular smooth muscle cell growth. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 165, n. 3, p.643-658, 10 jan. 2012.

MILLER, J. et al. Making fat: the role of the bithorax complex. *A. Dros. Res. Conf. 39 Suppl.:* 845C. (1998).

MISHRA, Santosh Kumar; CHOUDHURY, Soumen. Experimental Protocol for Cecal Ligation and Puncture Model of Polymicrobial Sepsis and Assessment of Vascular Functions in Mice. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 161-187, 2018.

MUZAFFAR, S. et al. Iloprost inhibits superoxide formation and gp91phox expression induced by the thromboxane A2 analogue U46619, 8-isoprostane F2 α , prostaglandin F2 α , cytokines and endotoxin in the pig pulmonary

artery. **British Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 141, n. 3, p. 488-496, fev. 2004.

NARDI, G. M., & BONATO de Arruda, T. Compreendendo as alterações do Sistema Renina-Angiotensina nas fases iniciais da sepse. *Jornada Integrada Em Biologia*, 15. 2014.

NAVA, Eduardo; LLORENS, Silvia. The Local Regulation of Vascular Function: from an inside-outside to an outside-inside model.: From an Inside-Outside to an Outside-Inside Model. **Frontiers In Physiology**, [s.l.], v. 10, p. 1-15, 12 jun. 2019.

OAKLEY, Catherine; HILL, Alison; CHOWDHURY, Simon. Benefits of a network approach to managing neutropenic sepsis. **Cancer Nursing Practice**, [S.L.], v. 9, n. 5, p. 17-21, 3 jun. 2010.

ORIOWO, Mabayoje A. Perivascular Adipose Tissue, Vascular Reactivity and Hypertension. **Medical Principles And Practice**, [s.l.], v. 24, n. 1, p. 29-37, 2015.

OZEN, G. et al. Control of human vascular tone by prostanoids derived from perivascular adipose tissue. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, [s.l.], v. 107, p. 13-17, dez. 2013.

PELLIGAND, L. et al. Effect of Cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 inhibition on furosemide-induced renal responses and isoform immunolocalization in the healthy cat kidney. **Bmc Veterinary Research**, [s.l.], v. 11, n. 1, p. 1-11, dez. 2015.

PENG, Tianqing; LU, Xiangru; FENG, Qingping. NADH oxidase signaling induces cyclooxygenase-2 expression during lipopolysaccharide stimulation in cardiomyocytes. **The Faseb Journal**, [S.L.], v. 19, n. 2, p. 1-25, 16 nov. 2004.

PERCY, Matthew G.; GRÜNDLING, Angelika. Lipoteichoic Acid Synthesis and Function in Gram-Positive Bacteria. **Annual Review Of Microbiology**, [s.l.], v. 68, n. 1, p. 81-100, 8 set. 2014.

PRADO, Wagner Luiz do; LOFRANO, Mara Cristina; OYAMA, Lila Missae; DÂMASO, Ana Raimunda. Obesidade e adipocinas inflamatórias: implicações práticas para a prescrição de exercício: implicações práticas para a prescrição

de exercício. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, [s.l.], v. 15, n. 5, p. 378-383, out. 2009.

RAJSHEKER, S. et al. Crosstalk between perivascular adipose tissue and blood vessels. **Current Opinion In Pharmacology**, [s.l.], v. 10, n. 2, p. 191-196, abr. 2010.

RAMACHANDRAN, Girish. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis. **Virulence**, [s.l.], v. 5, n. 1, p. 213-218, 5 nov. 2013.

RANG, H.; DALLE, M.; RITTER, J. Farmacologia, 7ª edição, Elsevier, 2011.

REMICK, D.; XIOA, H. Hypothermia and Sepsis. **Frontiers In Bioscience**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1006-1013, 2006.

RITTER, Cristiane. **Estresse oxidativo e o desenvolvimento de sepse**. 2003. 87f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas - Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2003.

RODRIGUES, Nilsa Regina Damaceno. **Medidas de indicadores de estresse oxidativo e de remodelamento cardíaco em camundongos expostos à poluição atmosférica ambiental durante o desenvolvimento embrionário e pós-natal**. 2007. 79f. Dissertação (Mestrado) – Ciências, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2007.

ROSSI, Livia Caroline Resende. **Estudo sobre a participação dos receptores b1 e b2 para cininas na fisiopatologia da sepse polimicrobiana experimental**. 2015. 128 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação Fisiologia e Farmacologia. Departamento de Microbiologia. Universidade Federal de Minas Gerais - Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte. 2015.

SILVA, Renée de Nazaré Oliveira da. **Efeito protetor do baço contra a resposta inflamatória do tecido adiposo perivascular do leito mesentérico de camundongos obesos**. 2018. 30 f. Tese (Doutorado) – Programa de pós graduação em Farmacologia. Universidade de São Paulo, Agência USP de Gestão da Informação Acadêmica (AGUIA) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2018.

RUSSELL, James A.; RUSH, Barret; BOYD, John. Pathophysiology of Septic Shock. **Critical Care Clinics**, [s.l.], v. 34, n. 1, p.43-61, jan. 2018.

SALGADO, Diamantino Ribeiro; ROCCO, José Rodolfo; SILVA, Eliézer; VINCENT, Jean-louis. Modulation of the renin–angiotensin–aldosterone system in sepsis: a new therapeutic approach? a new therapeutic approach? **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 11-20, 9 dez. 2009.

SALLES, M. J. C. et al. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis – revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Rev ass med brasil**, São Paulo, v. 1, n. 45, p. 86-92, 1999.

SARAMAGO, E. et al. Molecular hydrogen potentiates hypothermia and prevents hypotension and fever in LPS-induced systemic inflammation. **Brain, Behavior, And Immunity**, [S.L.], v. 75, p. 119-128, jan. 2019.

SEPSIS. World Health Organization. Abril de 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>>. Acesso em: 03 mai. 2020.

SHARAWY, Nivin. Vasoplegia in septic shock: do we really fight the right enemy? **Journal Of Critical Care**, [S.L.], v. 29, n. 1, p. 83-87, fev. 2014.

SHEN, X. et al. Neutrophil dysregulation during sepsis: an overview and update. **Journal Of Cellular And Molecular Medicine**, [S.L.], v. 21, n. 9, p. 1687-1697, 28 fev. 2017.

SHIH, C. et al. Effects of SPAK on vascular reactivity and nitric oxide production in endotoxemic mice. **European Journal Of Pharmacology**, [S.L.], v. 814, p. 248-254, nov. 2017.

SHRUM, Bradly et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. **Bmc Research Notes**, [s.l.], v. 7, n. 1, p. 233-245, 2014.

SILVA, Eliézer et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care** 8:R251-R260, 2004.

SILVEIRA, S.; FERREIRA, L. e LAGE, M. Fisiopatologia da sepsis: revisão de literatura. **PUBVET**, Londrina, V. 8, N. 9, Ed. 258, Art. 1709, maio, 2014.

SINGER, Mervyn et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, [s.l.], v. 315, n. 8, p.801-811, 23 fev. 2016. American Medical Association (AMA).

SIMÕES, M. et. al. MAPK pathway activation by chronic lead-exposure increases vascular reactivity through oxidative stress/cyclooxygenase-2-dependent pathways. **Toxicology And Applied Pharmacology**, [S.L.], v. 283, n. 2, p. 127-138, mar. 2015.

SOLTIS, Edward E.; CASSIS Lisa A. Influence Of Perivascular Adipose Tissue On Rat Aortic Smooth Muscle Responsiveness. **Clin. And Exper. Hyper.-Theory And Practice**, A13(2), 277-296. 1991.

SURVIVING SEPSIS CAMPAIGN Disponível em: <<http://www.survivingsepsis.org/Guidelines/Pages/default.aspx>>. Acesso em: 13 dez. 2018.

TAKAYAMA K. et al. Thromboxane A2 and prostaglandin F2alpha mediate inflammatory tachycardia. **Nat Med**. v.11, n.4, p.562-566. mai. 2005.

TALERO, E. et al. Bioactive Compounds Isolated from Microalgae in Chronic Inflammation and Cancer. **Marine Drugs**, [s.l.], v. 13, n. 10, p. 6152-6209, 30 set. 2015.

THIEMERMANN, Christoph. **Nitric oxide and septic shock**. General Pharmacology: The Vascular System, v. 29, n. 2, p. 159-166, ago./ 1997.

WARNOCK, Clare. Neutropenic sepsis: prevention, identification and treatment. **Nursing Standard**, [S.L.], v. 30, n. 35, p. 51-60, 27 abr. 2016.

WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. Sepsis and septic shock- a review of laboratory models and a proposal. **J. Surg. Res.**, 29: 189–201, 1980.

WIEWEL, M. et al. Risk factors, host response and outcome of hypothermic sepsis. **Critical Care**, [S.L.], v. 20, n. 1, p. 1-9, 14 out. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Sepsis**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>. Acesso em: 10 set. 2020.

YILDIZ, Oguzhan; SEYREK, Melik; GUL, Husamettin. Pharmacology of Arterial Grafts for Coronary Artery Bypass Surgery. *Artery Bypass*, [s.l.], p.327-337, 13 mar. 2013. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/54723>.

YUHKI, K. et al. Roles of prostanoids in the pathogenesis of cardiovascular diseases: novel insights from knockout mouse studies. **Pharmacology & Therapeutics**, [S.L.], v. 129, n. 2, p. 195-205, fev. 2011.

ZABORSKA, K e; WAREING, M; EDWARDS, G; AUSTIN, C. Loss of anti-contractile effect of perivascular adipose tissue in offspring of obese rats. **International Journal Of Obesity**, [s.l.], v. 40, n. 8, p. 1205-1214, 22 abr. 2016.

ZIEGLER, Maria Fernanda. **Com taxa de letalidade de 55,7%, sepse é a doença que mais mata em UTIs**. 2017. Disponível em: <<http://agencia.fapesp.br/com-taxa-de-letalidade-de-557-sepse-e-a-doenca-que-mais-mata-em-utis-/26621/>>. Acesso em: 13 fev. 2020.

7. AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Farmacologia Vascular (LFV) do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), com suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).