



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

Natália Ferreira de Araújo

**OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA E SUAS IMPLICAÇÕES
CARDIOVASCULARES EM CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES À SEPSE:
o envolvimento de NOS, NO e COX**

Belo Horizonte

2022

Natália Ferreira de Araújo

**OBESIDADE INDUZIDA POR DIETA DE CAFETERIA E SUAS IMPLICAÇÕES
CARDIOVASCULARES EM CAMUNDONGOS SOBREVIVENTES À SEPSE:
o envolvimento de NOS, NO e COX**

Tese 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 Doutora em Ciências Biológicas - Fisiologia e Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura

Belo Horizonte

2022

043

Araújo, Natália Ferreira de.

Obesidade induzida por dieta de cafeteria e suas implicações cardiovasculares em camundongos sobreviventes à sepse: o envolvimento de NOS, NO e COX [manuscrito] / Natália Ferreira de Araújo. – 2022.
170 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Daniella Bonaventura.

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

1. Fisiologia. 2. Sepse. 3. Obesidade. 4. Sistema Cardiovascular. 5. Óxido Nítrico Sintase. 6. Óxido Nítrico. I. Bonaventura, Daniella. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 612:615



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FISIOLOGIA E FARMACOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO DA DEFESA DA TESE N° 365 DE NATÁLIA FERREIRA DE ARAÚJO

"Obesidade Induzida por Dieta de Cafeteria e Suas Implicações Cardiovasculares em Camundongos Sobreviventes À Sepse: O Envolvimento de NOS, NO e COX"

NATÁLIA FERREIRA DE ARAÚJO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **09 de dezembro de 2022**, pela Banca Examinadora constituída pelos seguintes professores:

Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho, CCB/UFSC
Profa. Dra. Luciana Venturini Rossoni, ICB/USP
Prof. Dr. Rafael Menezes da Costa, CISAU/UFG
Prof. Dr. Stêfany Bruno de Assis Cau, ICB/UFMG
Profa. Dra. Daniella Bonaventura, ICB/UFMG - Orientadora

Belo Horizonte, 09 de dezembro de 2022

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Stefany Bruno de Assis Cau, Professor do Magistério Superior**, em 13/12/2022, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Daniella Bonaventura, Professora do Magistério Superior**, em 13/12/2022, às 17:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Menezes da Costa, Usuário Externo**, em 13/12/2022, às 18:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jamil Assereuy Filho, Usuário Externo**, em 13/12/2022, às 18:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luciana Venturini Rossoni, Usuário Externo**, em 14/12/2022, às 19:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



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 **1944621** e o código CRC **07C6BB4E**.

AGRADECIMENTOS

Para mim, o fim do doutorado não representa apenas o fim de um ciclo de 4 anos, mas o fim de um ciclo que começou há 11 anos atrás quando iniciei a minha carreira científica no Laboratório de Farmacologia Vasculiar (LFV), sob a orientação da Profa. Daniella Bonaventura. Posso dizer que esses 11 anos foram repletos de diversos momentos, com suas dores e delícias, desafios e conquistas. E, se eu cheguei até aqui, é porque eu nunca estive sozinha e, sim, acompanhada de muitos que tornaram essa trajetória mais leve, prazerosa e feliz!

Agradeço a Deus e a toda espiritualidade por serem o meu refúgio, a minha resposta nos momentos difíceis e de grandes decisões e onde eu verdadeiramente me encontro, como um ser que pouco sabe e está aqui para aprender e evoluir cada dia mais.

Ao meu pai, por me escutar e me apoiar em todas as minhas decisões, por ir aonde quer que eu for e por ter me ensinado os mais importantes valores que um ser humano pode ter e que irei carregar comigo para toda uma vida. E à minha mãe por ter me permitido me reconectar com ela nesse último ano e ter descoberto nela a minha fiel escudeira de todas as batalhas da vida. Ainda bem que eu escolhi vocês como os meus pais nessa existência!

Às minhas tias, QQ e Ivone, por verdadeiramente cuidarem de mim, me ouvindo, me aconselhando, me apoiando, me levantando diante das quedas e me estimulando a continuar sempre, independente do que aconteça. Ao Joanes e à Tia Piua por não medir esforços diante dos meus pedidos e por terem me escolhido como sobrinha nessa vida. Ao Tio Robson e à tia Tânia que foram tão presentes na minha vida enquanto eu estive no doutorado sanduíche e me proporcionaram viver um sonho em família no exterior.

Ao Vinícius, por me escolher todos os dias e por ser em quem eu encontro um amigo, um parceiro, um admirador, um ouvinte, um conselheiro, um ser humano íntegro e uma pessoa que realmente me impulsiona e me faz querer ser melhor todos dias. Muito Obrigada, meu bem, por sonhar os meus sonhos comigo e tornar eles gigantescos! A minha vida, sem dúvidas, é muito melhor com você!

Àqueles que me proporcionam as risadas mais sinceras, os cheirinhos mais gostosos, os apelidinhos mais criativos e que mesmo sem falar me ensinam tanto. Bibi, Pedraca, Vidi, Tó e Raicão que bom vocês estão presentes nos meus dias!

Agradeço àquela que verdadeiramente abriu a porta do laboratório para me receber há 11 anos atrás. Dani, muito obrigada por me receber de braços abertos e me dar oportunidade de conviver e trabalhar com você durante todo esse tempo. Mais do que fazer ciência de qualidade, você me ensinou a ser uma pessoa melhor! Muito Obrigada por me ouvir, aconselhar, acolher quando eu mais precisei, chamar atenção, me dar os melhores e mais aconchegantes abraços e me fazer dar boas gargalhadas! Muito Obrigada por toda confiança em mim depositada e por acreditar sempre na minha capacidade! Levarei comigo tudo aquilo que aprendi com você, por onde for, e espero que muitos alunos tenham chance de conviver e aprender com você, como eu tive! Você é um ser humano incrível e eu sou imensamente grata por ter oportunidade de ter você tão presente na minha vida nessa existência.

Agradeço às amigas que o LFV me presenteou, afinal, mais do que uma parceria, nós construímos uma amizade para a vida. Com elas eu aprendi e aprendo muito. Nati é meu exemplo de força, garra e autenticidade e que me ensina a ser resiliente frente aos obstáculos que a vida nos apresenta. Dani é meu exemplo de doçura e de excelência no que faz e àquela que tem sempre o melhor conselho; Nai é o meu porto seguro, é a quem eu recorro em todos os momentos da minha vida, é o meu verdadeiro ombro amigo. Meninas, obrigada por dividirem essa caminhada de academia e de vida comigo. Vocês fazem essa jornada realmente valer a pena!

Aos professores colaboradores, Adaliene Versiani, Silvia Guatiomosim, Jader Santos, Stéfany Cau, Luciano Capettini e Frederico Soriani, agradeço por terem aceitado participar da realização deste estudo, principalmente em uma fase que colaborar é essencial para se fazer ciência.

Aos alunos, Amanda, Sérgio, Bruno, André, Alexandre e Flávia agradeço por toda dedicação e empenho que tiveram na realização dos experimentos em colaboração e por todas as trocas de conhecimento que tivemos nas discussões acerca dos resultados.

Agradeço à PPGFisfar por ter me proporcionado a oportunidade de aprender e discutir ciência com grandes professores, que possuem um leque de conhecimento muito extenso; e de fazer amigos, dos quais eu tenho imenso orgulho por estarem fazendo pesquisa e produzindo conhecimento no Brasil e no mundo.

Aos técnicos e funcionários do ICB-UFMG, por toda ajuda e pelas conversas sobre a vida nos corredores e laboratórios, que trouxeram mais leveza para a minha rotina diária.

À Dra Anne Monique Nuyt e às colegas de laboratório do CHU Saint-Justine Research Center - Montreal, por todo intercâmbio de conhecimento e por verdadeiramente permitir que o doutorado sanduíche fosse uma grande experiência pessoal e profissional para mim.

Agradeço aos animais que permitiram que todo esse trabalho fosse desenvolvido! Minha imensa gratidão e respeito a vocês!

E, por fim, agradeço à UFMG que foi minha casa durante esses 11 anos. Eu terei sempre muito orgulho de dizer que aqui me formei acadêmico e cientificamente. Sentirei muitas saudades desse lugar!

RESUMO

Os indivíduos sobreviventes à sepse têm um risco aumentado de desenvolver doenças cardiovasculares (DCVs). Os desfechos da sepse, incluindo o desenvolvimento de DCVs, dependem de uma complexa interação entre as alterações fisiopatológicas desencadeadas pela sepse e o status de saúde pré-sepse, que inclui a existência de doenças crônicas de base. A obesidade é um importante fator de risco para DCVs e sua prevalência tem aumentado consideravelmente nos países desenvolvidos, onde a sepse é uma das causas mais importantes de mortes. Portanto, a coexistência de ambas as condições, obesidade e sepse, tem se tornado cada vez mais frequente na prática clínica. No entanto, pouco ainda se sabe sobre o impacto da obesidade no prognóstico cardiovascular de sobreviventes à sepse. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar como a obesidade induzida pela dieta cafeteria (CAF) influencia nas respostas cardiovasculares em camundongos que sobreviveram à sepse experimental. Os resultados mostraram que, apesar de não influenciar na morbimortalidade à sepse, a obesidade induzida pela dieta CAF causou alterações metabólicas e de adiposidade nos animais sobreviventes à sepse, que foram caracterizadas por aumento da adiposidade visceral associada à hipercolesterolemia e hiperleptinemia. Além disso, a obesidade induzida pela dieta CAF alterou as respostas cardiovasculares em sobreviventes à sepse. As análises do eletrocardiograma demonstraram que os animais do grupo CAF-CLP foram protegidos de prejuízos em segmentos importantes do eletrocardiograma, contudo apresentaram estreitamento do intervalo QRS, o que poderia predispor à ocorrência de arritmias. O coração isolado e os cardiomiócitos do grupo CAF-CLP apresentaram aumento da função intrínseca basal. No entanto, sob estresse farmacológico induzido por isoprenalina, a responsividade cardíaca do grupo CAF-CLP foi significativamente prejudicada. A obesidade induzida pela dieta CAF causou redução na vasoconstrição induzida por fenilefrina que foi exacerbada no grupo CAF-CLP. A hiporreatividade aórtica do grupo CAF-CLP foi mediada essencialmente por vias endoteliais, envolvendo tanto um comprometimento do estímulo contrátil, quanto um aumento do estímulo de relaxamento. O comprometimento do estímulo contrátil foi desencadeado pela redução da ativação de ERK 1/2 associada à diminuição da produção de prostanoídes vasoconstritores derivados da COX, enquanto o aumento do estímulo de relaxamento foi desencadeado pela atividade da eNOS levando à produção de NO

e, conseqüentemente, à ativação de GCs. Embora não tenha influenciado a morbimortalidade à sepse, a obesidade induzida por dieta CAF melhorou a morbimortalidade dos animais frente à um segundo desafio infeccioso com *Aspergillus fumigatus*. Em conjunto, nossos resultados mostraram que a obesidade induzida pela dieta CAF causa alterações significativas nas respostas cardiovasculares em sobreviventes de sepse, que são caracterizadas por um aumento da função cardíaca intrínseca e um prejuízo na contratilidade vascular. Apesar dessas alterações adaptativas, a obesidade induzida pela dieta CAF não influencia a morbimortalidade à sepse, contudo parece ser protetora frente à um novo quadro infeccioso.

Palavras-chave: Sobreviventes à sepse; Obesidade; Sistema Cardiovascular; Hiporresponsividade aórtica; Óxido Nítrico Sintase; Óxido Nítrico; ERK 1/2; Ciclooxigenase.

ABSTRACT

Sepsis survivors have an increased risk of development of cardiovascular diseases (CVDs). Sepsis outcomes, including the development of CVDs, depend on the complex interaction between pathophysiological alterations triggered by sepsis and pre-sepsis health status, which includes the existence of underlying chronic diseases. Obesity is an important risk factor for CVDs and its prevalence has considerably increased in the developed countries, where sepsis is one of the most important causes of mortality. Therefore, the coexistence of both conditions has become frequent in clinical practice. However, the impact of obesity on the cardiovascular outcomes of sepsis remains unclear. Thus, the aim of this study was to investigate how the cafeteria (CAF) diet-induced obesity influences the cardiovascular responses in mice that survived experimental sepsis. The results showed that CAF diet-induced obesity did not influence morbimortality from sepsis. However, it caused adiposity and metabolic alterations in the sepsis survivors animals, characterized by an increase of adiposity associated with hypercholesterolemia and hyperleptinemia. Furthermore, the CAF diet-induced obesity altered the cardiovascular responses in sepsis survivors. The analyses of electrocardiogram demonstrated that the CAF-CLP group animals were protected from impairments in the important segments of electrocardiogram; however, they showed narrowing of QRS interval, which can predispose to arrhythmias. The heart and cardiomyocytes isolated from the CAF-CLP group showed increased basal intrinsic function. However, under pharmacological stress induced by isoprenaline, the cardiac responsiveness of the CAF-CLP group was significantly impaired. CAF diet-induced obesity caused reduction in the phenylephrine-induced vasoconstriction that was exacerbated in the CAF-CLP group. Aortic hyporeactivity in the CAF-CLP group was essentially mediated by endothelium pathways involving both an impairment of contractile stimulus and an increase of relaxation stimulus. The impairment of contractile stimulus was triggered by the reduction of ERK 1/2 activation associated with decreased production of vasoconstrictors prostanoids derived from COX, while the increase of relaxation stimulus was triggered by the eNOS activity leading to NO production, and consequently sGC activation. Although it did not influence the morbimortality from sepsis, CAF diet-induced obesity improved the animals morbimortality when faced with a secondary infection with *Aspergillus fumigatus*. Taken together, our findings showed that CAF diet-induced obesity alters the

cardiovascular responses in sepsis survivors, characterized by increased intrinsic cardiac function and impaired aortic hyporesponsiveness. Despite these adaptive alterations, CAF diet-induced obesity does not influence morbimortality from sepsis; however it seems to be protective against a new infectious insult.

Keywords: Sepsis survivors; Obesity; Cardiovascular System; Aortic Hyporesponsiveness; Nitric Oxide Synthase; Nitric Oxide; ERK1/2; Cyclooxygenase

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Resumo esquemático das principais alterações cardiovasculares que ocorrem durante a sepse.....	32
Figura 2 - Resumo ilustrativo da interação complexa existente entre os vários fatores que influenciam o prognóstico, à longo prazo, dos sobreviventes à sepse.....	34
Figura 3 - Fluxograma representativo do delineamento das etapas de realização dos protocolos experimentais.....	42
Figura 4 - Resumo esquemático da realização cronológica das etapas experimentais.....	50
Figura 5 - Avaliação do consumo alimentar, peso e ganho de peso corporal, adiposidade e perfil glicêmico dos animais do grupo Controle e CAF no período experimental anterior à indução da sepse.....	63
Figura 6 - Avaliação do consumo alimentar, peso corporal e ganho de peso corporal durante todo o período experimental.....	65
Figura 7 - Avaliação do índice de adiposidade e da morfometria dos adipócitos epididimais dos grupos experimentais.....	66
Figura 8 - Avaliação do perfil glicêmico e dos parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais.....	68
Figura 9 - Avaliação da morbimortalidade à sepse e do número de células totais e neutrófilos na circulação periférica dos grupos experimentais.....	70
Figura 10 - Avaliação do peso e da deposição intersticial de colágeno cardíacos dos grupos experimentais.....	72
Figura 11 - Avaliação da atividade elétrica cardíaca dos grupos experimentais.....	74
Figura 12 - Avaliação da (B) pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), (C) derivada da pressão pela derivada do tempo máxima (dp/dtmax) e (D) mínima (dp/dtmin) dos grupos experimentais.....	75

Figura 13 - (A), (C) e (E) Dinâmica de variação da PDVE, dp/dtmin e dp/dtmax frente à estimulo com Isoprenalina. (B), (D) e (F) Valores de Emax da Isoprenalina sobre a PDVE, dp/dtmin e dp/dtmax.....	77
Figura 14 - Avaliação do (A-C) tempo e (D-E) velocidade de contração e/ou relaxamento e da (F) fração de encurtamento dos cardiomiócitos dos grupos experimentais.....	79
Figura 15 - Representação vetorial e gráfica do perfil de contratilidade dos cardiomiócitos dos grupos experimentais.....	80
Figura 16 - Relaxamento vascular induzido por ACh em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais.....	81
Figura 17 - Contração vascular induzida por PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais.....	83
Figura 18 - Efeito da remoção da camada endotelial na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	84
Figura 19 - Efeito da inibição não-seletiva da enzima NOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	86
Figura 20 - Efeito da inibição seletiva da iNOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	87
Figura 21 - Imunodeteção da iNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, com a quantificação da intensidade de fluorescência nas diferentes camadas vasculares.....	88
Figura 22 - Efeito da inibição seletiva da nNOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	89
Figura 23 - Imunodeteção da nNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, com a quantificação da intensidade de fluorescência nas diferentes camadas vasculares.....	90
Figura 24 - Imunodeteção da eNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, com a quantificação da intensidade de fluorescência nas diferentes camadas vasculares.....	92

Figura 25 - Efeito da inibição seletiva da enzima PI3K na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	93
Figura 26 - Efeito da inibição seletiva das enzimas MEK 1/2 na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	95
Figura 27 - Efeito da inibição da enzima GCs na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	96
Figura 28 - Efeito do bloqueio dos canais para K ⁺ na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	97
Figura 29 - Efeito da inibição não-seletiva da enzima COX na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	99
Figura 30 - Imunodeteção da COX-2 em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, com a quantificação da intensidade de fluorescência nas diferentes camadas vasculares.	100
Figura 31 - Efeito da catalase, enzima que catalisa a decomposição do H ₂ O ₂ , na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	101
Figura 32 - Efeito da inibição da ECA na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	103
Figura 33 - Relaxamento induzido pelo bloqueio dos canais para Ca ²⁺ nas aortas dos grupos experimentais.....	104
Figura 34 - Avaliação da morbimortalidade após um segundo desafio infeccioso com <i>Aspergillus fumigatus</i>	105
Figura 35 - Figura ilustrativa das alterações cardiovasculares desencadeadas pela obesidade induzida pela dieta de cafeteria em camundongos sobreviventes à sepse.....	130
Figura S1 - Avaliação temporal da Pressão Arterial Sistólica (PAS) dos grupos experimentais ao longo das semanas de estudo.....	157
Figura S2 - Efeito da remoção da camada endotelial na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	158

Figura S3 - Efeito da inibição não-seletiva da enzima NOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	159
Figura S4 - Efeito da inibição seletiva da iNOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	160
Figura S5 - Efeito da inibição seletiva da nNOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	162
Figura S6 - Efeito da inibição seletiva da enzima PI3K na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	163
Figura S7 - Efeito da inibição seletiva das enzimas MEK 1/2 na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	164
Figura S8 - Efeito da inibição da enzima GCs na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	165
Figura S9 - Efeito do bloqueio dos canais para K ⁺ na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	166
Figura S10 - Efeito da inibição não-seletiva da enzima COX na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	167
Figura S11 - Efeito da catalase, enzima que catalisa a decomposição do H ₂ O ₂ , na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais..	168
Figura S12 - Efeito da inibição da ECA na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais.....	169
Figura S13 - Relaxamento induzido pelo bloqueio dos canais para Ca ²⁺ nas aortas dos grupos experimentais.....	170

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição Nutricional das dietas Controle e Cafeteria.....	43
Tabela 2 - Escore murino de sepse utilizado para avaliar a progressão e severidade da doença no modelo experimental desenvolvido (Adaptada de Shrum et al. (2014)).....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

1400W	Inibidor seletivo da iNOS
7-NI	7-Nitroindazol
ACh	Acetilcolina
Akt	Proteína quinase B
ANOVA	Análise de variância
Ca ²⁺	Íon Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CO ₂	Dióxido Carbônico
COX	Ciclooxygenase
COX-1	Ciclooxygenase-1
COX-2	Ciclooxygenase-2
CW	Software CONTRACTIONWAVE
DCV	Doença cardiovascular
dP/dt	Razão da derivada da pressão pela derivada do tempo
EC ₅₀	Concentração que induz 50% do efeito máximo
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro padrão da média
ERK1/2	Proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2
GCs	Guanilato Ciclase Solúvel
GMPc	Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico
GTP	Guanosina-trifosfato
H&E	Hematoxilina-Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzida
K ⁺	íon potássio
Kcal	Quilocaloria

KCl	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
L-NAME	L-N ^G -nitroarginina metil éster
LY-294,002	Inibidor seletivo da enzima PI3K
MEK 1/2	Quinase na proteína quinase ativada por mitógeno
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NOS	Óxido Nítrico Sintase
O ₂	Oxigênio molecular
OCT	Meio <i>tissue-tek</i> (temperatura ótima para o corte)
OPD	O-fenilenodiamina
PAS	Pressão arterial sistólica
PBS	Tampão fosfato salino
PD98059	Inibidor seletivo das enzimas MEK ½
PDVE	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
PE	Fenilefrina
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂ α	Prostaglandina 2-alpha
PGI ₂	Prostaciclina
PI3K	Fosfoinosítideo 3-quinase
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
TAE	Tecido adiposo epididimal
TAM	Tecido adiposo mesentérico
TAR	Tecido adiposo retroperitoneal
TEA	Tetraetilamônio
TTOG	Teste de tolerância oral à glicose
TXA ₂	Tromboxano A ₂

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1. Sepsis: epidemiologia, conceito e suas consequências cardiovasculares.....	28
2.2. Sobrevivência à sepsis: o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a associação com doenças prévias.....	32
2.3. Obesidade e suas consequências metabólicas e cardiovasculares.....	34
2.4. Obesidade e sepsis: O que sabe dessa associação?.....	36
3. OBJETIVOS.....	39
3.1. Objetivo geral.....	39
3.2. Objetivos específicos.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1. Animais.....	41
4.2. Delineamento experimental.....	41
4.3. Desenvolvimento do modelo experimental (1ª ETAPA).....	43
4.3.1. Indução da obesidade.....	43
4.3.2. Indução da sepsis experimental	43
4.4. Caracterização do modelo experimental (2ª ETAPA).....	44
4.4.1. Parâmetros relacionados à obesidade.....	44
4.4.1.1. Avaliação do peso corporal e do consumo alimentar.....	44
4.4.1.2. Determinação do índice de adiposidade.....	45
4.4.1.3. Análise morfométrica dos adipócitos epididimais.....	45
4.4.1.4. Avaliação do perfil glicêmico.....	46
4.4.1.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos.....	46
4.4.2. Parâmetros relacionados à sepsis.....	47

4.4.2.1. Avaliação da morbimortalidade.....	47
4.4.2.2. Avaliação da presença de leucócitos na circulação periférica.....	49
4.5. Avaliação das respostas hemodinâmicas e cardíacas (3ª ETAPA).....	50
4.5.1. Avaliação do peso cardíaco.....	50
4.5.2. Análise semi-quantitativa da deposição de colágeno.....	50
4.5.3. Medida indireta da pressão arterial sistólica.....	51
4.5.4. Avaliação da atividade elétrica do coração.....	51
4.5.5. Avaliação da função cardíaca <i>ex vivo</i>	52
4.5.6. Medida da contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares.....	53
4.6. Avaliação das respostas vasculares (4ª ETAPA).....	53
4.6.1. Avaliação funcional através da reatividade vascular.....	53
4.6.2. Investigação dos mecanismos envolvidos nas respostas vasculares.....	55
4.6.2.1. Investigação do envolvimento do endotélio vascular.....	55
4.6.2.2. Investigação do envolvimento da óxido nítrico sintase (NOS).....	55
4.6.2.2.A. Efeito do L-NAME, inibidor não-seletivo da NOS, do 1400W, inibidor seletivo da isoforma induzida da NOS (iNOS) e do 7-NI, inibidor seletivo da isoforma neuronal da NOS (nNOS), na resposta vascular.....	55
4.6.2.2.B. Imunolocalização aórtica das isoformas endotelial, induzida e neuronal da NOS.....	56
4.6.2.2.C. Efeito do LY-294,002, inibidor seletivo da enzima PI3K e do PD98059, inibidor seletivo das enzimas MEK 1/2 na resposta vascular.....	57
4.6.2.3. Investigação do envolvimento do óxido nítrico (NO).....	57
4.6.2.3.A. Efeito do TEA, bloqueador não-seletivo dos canais para potássio (K ⁺) e do ODQ, inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), na resposta vascular.....	57
4.6.2.4. Investigação da participação da ciclooxigenase (COX).....	57

4.6.2.4.A. Efeito do ibuprofeno, inibidor não-seletivo das enzimas ciclooxygenases, na resposta vascular.....	57
4.6.2.4.B. Imunolocalização aórtica da isoforma COX-2.....	57
4.6.2.5. Investigação do envolvimento do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	59
4.6.2.5.A. Efeito da catalase, enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, na resposta vascular.....	59
4.6.2.6. Investigação da participação do sistema-renina angiotensina.....	59
4.6.2.6.A. Efeito do captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), na resposta vascular.....	59
4.6.2.7. Investigação do envolvimento dos canais para cálcio (Ca ²⁺)	59
4.7. Avaliação da morbimortalidade após o segundo desafio infeccioso (5 ^a ETAPA)..	59
4.8. Análise estatística.....	60
5. RESULTADOS.....	62
5.1. Caracterização do desenvolvimento da obesidade no período que antecede à sepse (pré-sepse).....	62
5.2. Caracterização do modelo experimental com base nos parâmetros relacionados à obesidade.....	64
5.3. Caracterização do modelo experimental com base nos parâmetros relacionados à sepse.....	69
5.4. Avaliação das respostas hemodinâmicas e cardíacas.....	70
5.5. Avaliação das respostas vasculares.....	80
5.5.1. Investigação dos mecanismos envolvidos nas respostas vasculares.....	83
5.5.1.1. Investigação do envolvimento do endotélio vascular.....	83
5.5.1.2. Investigação do envolvimento da Óxido Nítrico Sintase (NOS).....	85
5.5.1.3. Investigação do envolvimento do óxido nítrico (NO).....	95
5.5.1.4. Investigação da participação da ciclooxygenase (COX).....	98

5.5.1.5. Investigação do envolvimento do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).....	100
5.5.1.6. Investigação da participação do sistema renina-angiotensina.....	102
5.5.1.7. Investigação do envolvimento dos canais para cálcio (Ca ²⁺).....	103
5.6. Avaliação da morbimortalidade após o segundo desafio infeccioso.....	104
6. DISCUSSÃO.....	107
7. CONCLUSÃO.....	130
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	132
9. APÊNDICES.....	157
9.1. Apêndice A - Resultados suplementares da etapa de avaliação das respostas hemodinâmicas e cardíacas.....	157
9.2. Apêndice B - Resultados suplementares da etapa de avaliação das respostas vasculares.....	158

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A sepse continua sendo uma das principais causas de mortes evitáveis em todas as faixas etárias e gêneros (Olwal et al., 2021). De acordo com estimativas globais, 49 milhões de pessoas desenvolvem sepse todos os anos, sendo que dessas cerca de 11 milhões vêm a óbito (*World Health Organization - Sepsis*, 2017). Seguindo a alta prevalência mundial, no Brasil, mais de 1 milhão de casos de sepse foram registrados, no período de 2010 a 2019, dos quais cerca de 463 mil resultaram em óbito (Almeida et al., 2022). Dessa forma, a sepse é considerada um importante problema de saúde pública, que gera elevados custos aos cofres públicos (Genga & Russell, 2017; Neira et al., 2018; Reinhart et al., 2017)

Em 2016, no Terceiro Consenso Internacional de Definições de Sepse e Choque Séptico, a sepse passou a ser descrita como uma disfunção orgânica grave desencadeada por uma resposta inflamatória desregulada do hospedeiro a uma infecção (Singer et al., 2016). Dentre os sistemas acometidos pela sepse, está o sistema cardiovascular. Em termos cardíacos, os pacientes sépticos apresentam, frequentemente, depressão da função miocárdica, que é conhecida também como cardiomiopatia séptica (Lv & Wang, 2016; Merx & Weber, 2007). Já em termos vasculares, as alterações macro e microcirculatórias são caracterizadas por vasoplegia e hipoperfusão de diferentes órgãos (Burgdorff et al., 2018; Morelli & Passariello, 2016).

Apesar da elevada incidência de sepse na população mundial, os avanços significativos nas terapias antimicrobianas e nas abordagens clínicas aumentaram consideravelmente o número de indivíduos sobreviventes à sepse (Soussi et al., 2022). Os pacientes que sobrevivem à sepse apresentam maiores riscos de desenvolver doenças cardiovasculares (DCVs) (Angriman et al., 2022; Kosyakovsky et al., 2021). Os mecanismos, contudo, que desencadeiam esse aumento na susceptibilidade às DCVs ainda são pouco conhecidos.

Assim sendo, vários esforços têm sido realizados a fim de desvendar os mecanismos envolvidos nas complicações, à longo prazo, associadas à pós-sepse. É importante salientar que o prognóstico dos pacientes pós-sépticos depende dos efeitos provenientes da sepse, bem como de características individuais prévias à sepse, tais como o *status* de saúde (Shankar-Hari & Rubenfeld, 2016). Entre as

comorbidades que poderiam influenciar o prognóstico dos indivíduos pós-sépticos, a obesidade merece destaque, uma vez que apresenta alta prevalência mundial; é um importante problema de saúde pública e um fator de risco para o desenvolvimento de uma série de doenças crônicas, principalmente as DCVs (Koliaki et al., 2019; Powell-Wiley et al., 2021; World Health Organization - WHO, 2016).

Logo, sabendo que a sepse envolve alterações cardíacas e hemodinâmicas; que pacientes que sobrevivem à sepse apresentam maiores riscos de mortalidade e de desenvolvimento de DCVs; e que a obesidade pode ter influência no prognóstico destes pacientes, o presente estudo se propõe investigar e caracterizar o impacto da obesidade induzida por dieta de cafeteria nas funções cardiovasculares de camundongos sobreviventes à sepse, identificando possíveis alvos terapêuticos para o tratamento, sobretudo, de pacientes admitidos nas unidades de terapia intensiva (UTIs) após um quadro de sepse.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Sepsis: epidemiologia, conceito e suas consequências cardiovasculares

A sepsis é uma condição complexa e multifacetada, comum tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos, onde é uma das principais causas de mortes evitáveis em todas as faixas etárias e gêneros. Além disso, a sepsis tem sido a complicação mais comum entre pacientes acometidos pela COVID-19 (Jabaley et al., 2018; van der Slikke et al., 2020). De acordo com os dados mais recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS), 49 milhões de pessoas, no mundo, desenvolvem sepsis anualmente, sendo que dessas cerca de 11 milhões vêm a óbito (World Health Organization - WHO, 2017). Seguindo essa alta prevalência mundial, no Brasil, foram registrados mais de 1 milhão de casos de sepsis no período de 2010 a 2019, dos quais cerca de 463 mil resultaram em óbito (Almeida et al., 2022). Dessa forma, a sepsis é reconhecida como uma prioridade de saúde global, sendo a principal causa de admissões e mortes em UTIs não cardiológicas, o que gera elevados custos aos cofres públicos (Genga & Russell, 2017; Neira et al., 2018; Reinhart et al., 2017)

É bem estabelecido que o rápido diagnóstico e início do tratamento aumentam drasticamente as taxas de sobrevivência em um quadro de sepsis. Contudo, a falta de um consenso sobre as definições clínicas da sepsis e as diretrizes diagnósticas ainda permanece sendo um grande desafio (Patel & McElvania, 2019). Sepsis é um termo cunhado originalmente do grego *sipsi*, que faz referência à “decomposição animal, vegetal ou da matéria orgânica na presença de algum agente bacteriano”, sendo descrito por Homero, em seus poemas, como sinônimo de apodrecer. De acordo com Hipócrates, o primeiro a introduzir o termo na literatura médica, esse apodrecimento aconteceria no cólon liberando “princípios perigosos” que causariam o que ele denominou de auto-intoxicação (Funk et al., 2009). O conceito “putrefativo” da sepsis permaneceu até o século XIX, devido, principalmente, ao pouco conhecimento que se tinha em relação à origem e transmissão das doenças infecciosas. Foi, então, a partir dos achados de Lister e Semmelweis, envolvendo os métodos antissépticos, e de Pasteur e Koch, com a teoria dos germes, que passa a se desenvolver uma visão mais moderna da sepsis, em que a infecção é considerada o componente essencial para a ocorrência dos sinais da doença (Opal, 2011; Yuki & Murakami, 2015).

Com a visão moderna da sepse, houve um avanço nas terapias antimicrobianas e nos cuidados intensivos. Entretanto, a mortalidade dos pacientes ainda se mantinha alta. Desta forma, as respostas fisiológicas e inflamatórias do hospedeiro começaram a ser consideradas na construção do conceito de sepse. Assim, a partir da Conferência Consenso de 1991, realizada com o objetivo de uniformizar os conceitos aplicados à pacientes com sepse e sua sintomatologia, foram introduzidas clinicamente as definições de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), sepse, choque séptico e síndrome da disfunção múltipla de órgãos (MODS) (Bone et al., 1992; Namas et al., 2013; Yuki & Murakami, 2015). De acordo com essas definições, a sepse resultava de uma resposta inflamatória sistêmica, denominada SIRS, desencadeada por um processo infeccioso. Quando, por sua vez, a SIRS era associada a um quadro de disfunção de órgãos e hipotensão, recebia a denominação de sepse grave, que, quando persistente, evoluía para o choque séptico. Por fim, casos em que ocorria a evolução progressiva da falha na função dos órgãos eram denominados MODS. Portanto, a sepse era considerada fundamentalmente um processo inflamatório, que seguia um modelo contínuo de gravidade e progressão dos sintomas.

Esses conceitos foram, recentemente, revisados e uma nova definição para sepse, denominada *Sepsis-3*, foi proposta, em que a sepse passa a ser descrita como uma disfunção orgânica grave decorrente de uma resposta inflamatória desregulada do hospedeiro frente à uma infecção (Singer et al., 2016). Além disso, o choque séptico passa a ser considerado um subtipo de sepse, que é acompanhado por significativas anormalidades circulatórias e metabólicas capazes de aumentar substancialmente as taxas de mortalidade (Shankar-Hari et al., 2016). Dessa forma, essa nova definição inclui os achados de estudos mais recentes que tem demonstram que a sepse envolve a ativação precoce de respostas tanto pró-inflamatórias, quanto anti-inflamatórias, que são associadas a consideráveis alterações cardiovasculares, neuronais, hormonais, bioenergéticas e metabólicas. Logo, a letalidade da sepse passa a ser considerada potencialmente superior a de uma infecção simples, ressaltando a importância do diagnóstico rápido e adequado (Singer et al., 2016).

Como citado anteriormente, um dos principais sistemas acometidos pela disfunção orgânica associada à sepse é o sistema cardiovascular (Figura 1), sendo a disfunção cardíaca frequentemente associada a um pior prognóstico e aumento da

mortalidade entre os pacientes sépticos (Lv & Wang, 2016; Merx & Weber, 2007). A cardiomiopatia séptica, como é denominada, é definida como uma disfunção cardíaca aguda e reversível, que, normalmente, envolve um amplo espectro de alterações estruturais, elétricas e funcionais. Embora as alterações estruturais ainda não tenham sido extensamente investigadas, estudos demonstram a ocorrência de dano tecidual cardíaco durante a sepse, caracterizado por edema intersticial e intracelular, infiltrado inflamatório, dano mitocondrial, focos difusos de cardiomiócitos apresentando tumefação nuclear e citoplasmática e/ou vacuolização, e apoptose celular (Celes et al., 2012; Smeding et al., 2012).

Já em relação às alterações eletrocardiográficas, os achados clínicos mais comuns incluem: prolongamento do intervalo PR, elevação do segmento ST; redução da amplitude do complexo QRS ou estreitamento do complexo QRS com bloqueio de ramo deformado (Lv & Wang, 2016). Além disso, a sepse é um fator de risco independente para o prolongamento do intervalo QT_c, que predispõem a ocorrência de Torsades de Pointes e, conseqüentemente, o aumento da mortalidade entre pacientes sépticos (Poveda-Jaramillo, 2021). Por fim, em termos funcionais, os corações dos indivíduos sépticos, comumente, apresentam redução da fração de ejeção associada a uma ou mais das seguintes características: (1) dilatação do ventrículo esquerdo com pressão diastólica final (ou pressão de enchimento ventricular) normal ou baixa; (2) contratilidade ventricular reduzida, e (3) disfunção dos ventrículos direito e esquerdo (sistólica e diastólica) com uma resposta reduzida à infusão de volume (Martin et al., 2019). Esse prejuízo funcional também é verificado a nível celular, em que os cardiomiócitos, durante à sepse, apresentam um prejuízo significativo nos parâmetros de contratilidade (fração de encurtamento e velocidades de contração e de relaxamento) (Niederbichler et al., 2006).

Além da cardiomiopatia séptica, as disfunções macro e microcirculatórias também são comumente associadas à mortalidade em pacientes sépticos (Lipinska-Gediga, 2016; Morelli & Passariello, 2016). Por apresentar um caráter progressivo, a hemodinâmica nos estágios iniciais da sepse é bem diferenciada da hemodinâmica nos estágios finais. A princípio, a liberação de mediadores do sistema imune, como citocinas e componentes do sistema complemento, resulta na produção de histamina, serotonina, cininas e enzimas lisossomais que, em conjunto, desencadeiam aumento da permeabilidade capilar com conseqüente extravasamento de fluidos para o meio

intersticial e hipovolemia. Esse estado é denominado de hipodinâmico e caracteriza-se pelo aumento da resistência vascular periférica e diminuição da pós-carga cardíaca (Ahrens, 2006). A fluidoterapia é comumente utilizada com intuito de reverter esse perfil hipodinâmico, induzindo um estado hiperdinâmico com aumento do retorno venoso, normalização ou elevação da pós-carga cardíaca e diminuição da resistência vascular periférica (Zanotti-Cavazzonia & Hollenberg, 2009). Apesar da melhora do funcionamento cardíaco e hemodinâmico durante a fluidoterapia, sinais de hipoperfusão teciduais podem ainda persistir. Esse estado, frequentemente denominado de choque distributivo, está relacionado à má distribuição do fluxo sanguíneo regional (esplâncnico, mesentérico e renal) e à hipóxia citotóxica que é capaz de provocar danos celulares, inclusive em células endoteliais (Ahrens, 2006; Zanotti-Cavazzonia & Hollenberg, 2009)

Vários são os mecanismos que poderiam contribuir com o estado hipodinâmico da sepse, o qual é, frequentemente, associado à redução da responsividade vascular à vasoconstritores, condição que é denominada vasoplegia (Burgdorff et al., 2018). Dentre os mecanismos já descritos, as 3 isoformas da óxido nítrico sintase (NOS) contribuem para as mudanças hemodinâmicas que ocorrem durante a sepse. Contudo, a isoforma induzida da NOS (iNOS) tem um papel-chave, sendo a principal fonte da produção de óxido nítrico (NO) que ocorre durante à sepse (Matsuda & Hattori, 2007). Além da iNOS, a ciclooxigenase-2 (COX-2) também possui um papel importante na hiporresponsividade vascular durante a sepse, uma vez que é responsável, sobretudo, pelo aumento da produção de prostanoídes vasodiladores, tais como prostaciclina (PGI₂) e prostaglandina E₂ (PGE₂) (Ozer et al., 2017; Bahar Tunctan et al., 2013). Logo, o aumento da atividade da iNOS e COX-2, o qual pode ser estimulada pela proteína quinase regulada por sinal extracelular 1/2 (ERK1/2), culmina com a superprodução de vasodiladores que são crucias para o estado hipodinâmico da sepse (Korkmaz et al., 2006).

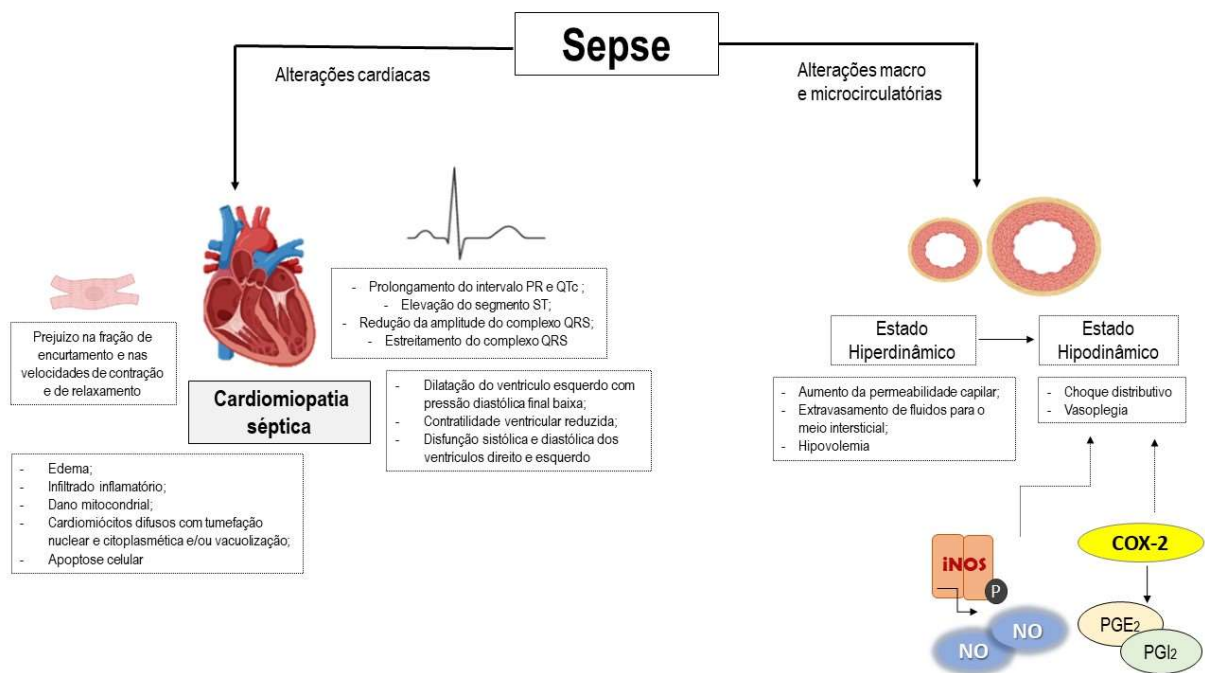


Figura 1: Resumo esquemático das principais alterações cardiovasculares que ocorrem durante a sepse. Elaborada pela autora com auxílio do biorender.com.

2.2. Sobrevivência à sepse: o risco do desenvolvimento de doenças cardiovasculares e a associação com doenças prévias

Apesar da sepse ser ainda considerada a principal causa de morte nas UTIs, os avanços significativos nas terapias antimicrobianas e na medicina intensiva permitiram a redução da mortalidade hospitalar precoce e, conseqüentemente, o aumento do número de pacientes sépticos que sobrevivem e recebem alta hospitalar (Soussi et al., 2022). De acordo com as estimativas mais recentes, 48,9 milhões de casos de sepse são registrados no mundo, anualmente, dos quais 11 milhões resultam em óbito (Rudd et al., 2020). Logo, cerca de 37,9 milhões de pacientes sobrevivem à sepse a cada ano, o que representa, em torno, de 77% do total de casos registrados. Contudo, após a sepse, esses pacientes são frequentemente acometidos por complicações físicas, cognitivas e psicológicas, que aumentam, substancialmente, as taxas de readmissões hospitalares e o risco de mortalidade entre esses indivíduos (Soussi et al., 2022). Os achados da literatura demonstram que 1 em cada 5 indivíduos sobreviventes à sepse são rehospitalizados dentro de 30 dias após a alta hospitalar (Shankar-Hari et al., 2020).

Até um terço dessas readmissões hospitalares se deve à ocorrência de infecções secundárias, uma vez que estudos demonstram que indivíduos

sobreviventes à sepse tem um risco aumentado de infecções recorrentes no primeiro ano após o episódio da sepse (T. Wang et al., 2014). Essa maior susceptibilidade à infecções está relacionada à desregulação do sistema imune, que persiste após a sepse e caracteriza-se pela ocorrência de um ciclo vicioso, marcado por inflamação de baixo grau, imunossupressão adaptativa e catabolismo protéico, que é retroestimulado a cada nova infecção (Mira et al., 2017). Além do déficit imunológico, indivíduos sobreviventes à sepse, frequentemente, apresentam prejuízos cognitivos, principalmente na atenção, percepção e memória; e distúrbios afetivos, com predomínio de casos de depressão e ansiedade (van der Slikke et al., 2020).

Uma série de estudos observacionais destacam também que indivíduos sobreviventes à sepse apresentam um maior risco do desenvolvimento e progressão de DCVs, que pode persistir elevado até 5 anos após a alta hospitalar (Jafarzadeh et al., 2016). Nesse sentido, a sepse é considerada um fator de risco, de médio e longo prazo, para as DCVs. De acordo com um estudo publicado por Kosyakovsky et al. (2021), a sepse apresenta magnitudes de risco relativo comparáveis aos de fatores de risco de DCVs já bem estabelecidos, tais como dislipidemia, hipertensão e diabetes mellitus (Kosyakovsky et al., 2021). Entre as complicações cardiovasculares mais comuns que acometem indivíduos sobreviventes à sepse estão: infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular encefálico isquêmico e hemorrágico, arritmia ventricular e morte cardíaca súbita (Ou et al., 2016).

Apesar do conhecimento da associação entre sobreviventes à sepse e a ocorrência de DCVs, os mecanismos fisiopatológicos que medeiam essa associação ainda não estão esclarecidos. Alguns estudos propõem que alterações induzidas durante a sepse, envolvendo a resposta imunológica, metabolismo, função endotelial e coagulação, poderiam acelerar o desenvolvimento de doenças crônicas, como as DCVs (Angriman et al., 2022; Kosyakovsky et al., 2021). No entanto, o prognóstico dos indivíduos sobreviventes à sepse, incluindo o desenvolvimento de doenças crônicas, não só depende dos efeitos provenientes da sepse, como também das características individuais prévias à sepse, tais como o *status* de saúde (apresentar ou não alguma doença aguda ou crônica) e os fatores de risco para infecções (idade, sexo, raça, fatores genéticos, procedimento cirúrgico e hospitalização) (Figura 2) (Shankar-Hari & Rubinfeld, 2016). Diante disso, a existência de doenças de base, principalmente aquelas com grande prevalência na população mundial, como a

obesidade, pode ser crucial para definir o prognóstico e a magnitude do risco do desenvolvimento de DCVs dos indivíduos sobreviventes à sepse (Mankowski et al., 2019).

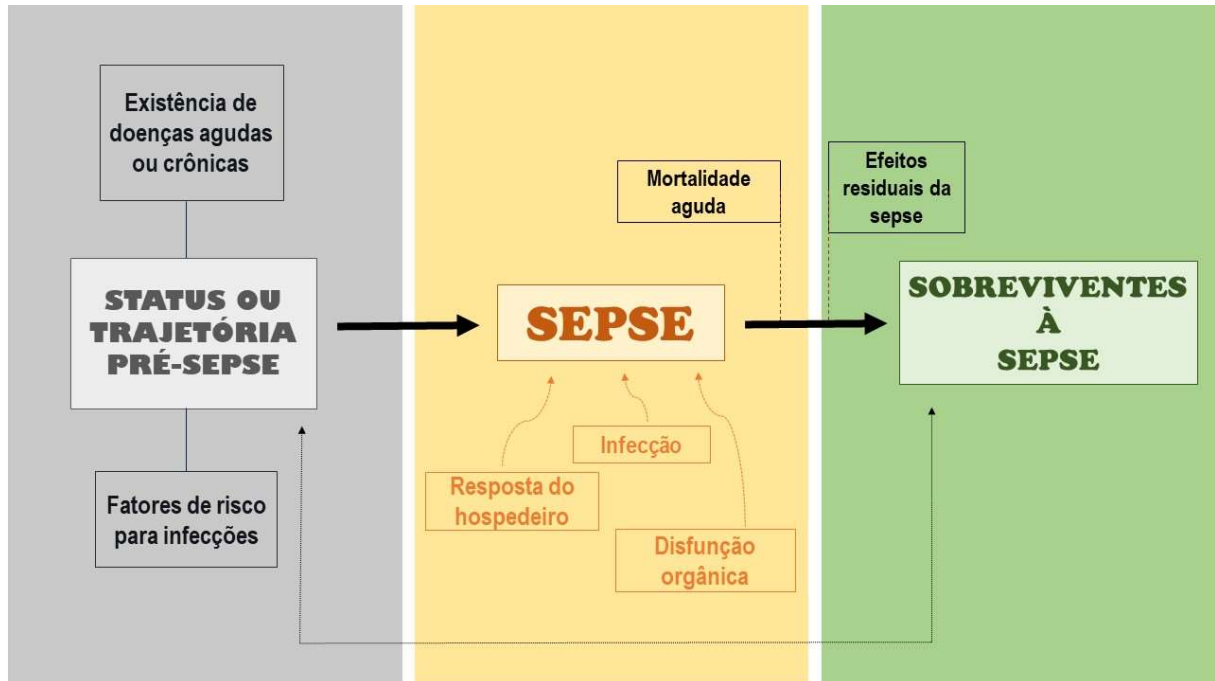


Figura 2: Resumo ilustrativo da interação complexa existente entre os vários fatores que influenciam o prognóstico, à longo prazo, dos sobreviventes à sepse. A sepse ocorre em indivíduos que apresentam variações no status de saúde pré-sepse (saudáveis ou com comorbidades). Logo, a interação complexa entre o status de saúde ou trajetória pré-sepse e as alterações fisiopatológicas que ocorrem durante a sepse influenciam no status de saúde dos sobreviventes à sepse. Elaborada pela autora com base no esquema de Shankar-Hari & Rubenfeld (2016).

2.3. Obesidade e suas consequências metabólicas e cardiovasculares

A obesidade é uma doença complexa, cuja prevalência mundial tem aumento consideravelmente nos últimos 50 anos, de modo que, atualmente, mais de um terço da população do mundo apresenta sobrepeso ou obesidade (Chooi et al., 2019; X. Lin & Li, 2021). De acordo com estimativas da OMS, em 2016, 1,9 bilhões de adultos apresentavam sobrepeso no mundo, dos quais 650 milhões eram considerados obesos (World Health Organization - WHO, 2016). No Brasil, os números também são alarmantes, sendo que os dados mais recentes revelam que a prevalência da obesidade aumentou 72% na população brasileira entre 2006 e 2019, atingindo cerca de 22,4% de todos os brasileiros na atualidade (Estivaleti et al., 2022; VIGITEL BRAZIL, 2022). Logo, a obesidade alcançou proporções epidêmicas em todo o

mundo, sendo denominada pela OMS como globesidade (em inglês, *globesity*) (Dumith et al., 2022).

A OMS define o sobrepeso e a obesidade como um anormal ou excessivo acúmulo de gordura que apresenta risco à saúde (World Health Organization - WHO, 2016). Apesar dessa definição relativamente simples, a obesidade é uma doença multifatorial, que resulta de um balanço energético positivo, ou seja, quando a quantidade de calorias consumidas excede a quantidade de calorias gastas. O excesso de energia resulta no acúmulo de gordura nos depósitos de tecidos adiposos, que se expandem em tamanho, e, conseqüentemente, causam ganho de peso corporal (Chooi et al., 2019). Existem dois principais depósitos de tecido adiposo no corpo, que são o tecido adiposo visceral e tecido adiposo subcutâneo (Ouchi et al., 2011). Em alguns indivíduos obesos, o acúmulo de gordura ocorre, predominantemente, nos tecidos adiposos viscerais intra-abdominais, o que é denominado de obesidade visceral (Cisse et al., 2021; Tchernof & Després, 2013). O excesso de adiposidade visceral - desencadeada sobretudo pela combinação do consumo de alimentos com alta densidade calórica e um estilo de vida sedentário – é associado à uma gama de alterações metabólicas, dentre as quais destacam-se: disglícemia (um termo amplo usado para se referir instabilidade dos níveis séricos de glicose), resistência à insulina e dislipidemia (que é caracterizada pela hipertrigliceridemia associada à níveis aumentados de lipoproteína de baixa densidade (LDL) e níveis reduzidos de lipoproteína de alta densidade (HDL)) (Chait & den Hartigh, 2020; Cisse et al., 2021).

Além de ser um fator de risco para desordens metabólicas, a obesidade é considerada um fator de risco independente para o desenvolvimento de DCVs, incluindo hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, doença arterial coronariana, aterosclerose, infarto do miocárdio, fibrilação atrial, arritmias ventriculares e morte súbita cardíaca (Koliaki et al., 2019; Powell-Wiley et al., 2021). De acordo com um estudo de carga global de doença (em inglês, *The Global Burden of Disease*), as DCVs são a principal causa de morte em indivíduos obesos, sendo que, em 2015, 4 milhões de pessoas obesas morreram e dois terços dessas mortes foram atribuídas às DCVs (Powell-Wiley et al., 2021; Global Burden of Disease - GBD 2017).

Embora já seja bem descrito a existência da associação entre obesidade e a ocorrência de DCVs, os mecanismos moleculares que medeiam a progressão e o desenvolvimento de DCVs em indivíduos obesos ainda não estão completamente esclarecidos (Carbone et al., 2018; Lavie et al., 2009; Ortega et al., 2016). De modo geral, as evidências demonstram que a obesidade predispõe a ocorrência de DCVs atuando direta ou indiretamente. Os efeitos diretos são mediados pelas adaptações compensatórias estruturais e funcionais induzidas pela obesidade no sistema cardiovascular, devido ao aumento dos tecidos adiposos e, conseqüentemente, à necessidade de um maior suprimento sanguíneo para esses tecidos; e, além disso, pelo papel das adipocinas na inflamação e no controle do tônus vascular, criando um estado pró-inflamatório e pró-trombótico, bem como causando dano endotelial e hipertrofia vascular. Os efeitos indiretos, por sua vez, são mediados por fatores de risco associados à síndrome metabólica considerados intermediários entre a obesidade e a ocorrência de DCVs, que são a resistência à insulina, intolerância à glicose, dislipidemia e adiposidade visceral, (Koliaki et al., 2019; Mathew et al., 2008).

2.4. Obesidade e sepse: O que sabe dessa associação?

A alta prevalência mundial da obesidade e a sua associação com desenvolvimento de desordens metabólicas, cardiovasculares e, até mesmo, infecciosas (incluindo infecções nosocomiais, respiratórias, gastrointestinais, urogenitais e de pele) tem aumentado consideravelmente o número de indivíduos obesos que são admitidos nas UTIs, onde a sepse é considerada a principal causa de morte (Falagas & Kompoti, 2006; Louie et al., 2011; Sawadogo et al., 2022). Logo, a coexistência da obesidade e da sepse tem se tornado cada dia mais frequente na prática clínica (Kolyva et al., 2014). De acordo com um estudo publicado por Pepper et al. (2016), 25% dos adultos admitidos nas UTIs dos Estados Unidos (EUA) apresentavam sobrepeso ou obesidade, sendo a sepse a causa mais comuns dessas admissões (Pepper et al., 2016).

No entanto, os efeitos potenciais da obesidade no prognóstico da sepse são ainda controversos, uma vez que vários estudos observacionais indicam que a obesidade teria efeitos benéficos à morbimortalidade à sepse, um fenômeno que é denominado paradoxo da obesidade (Danninger et al., 2022; S. Li et al., 2019; Prescott et al., 2014; Thavamani et al., 2021). O estudo publicado por Fleischmann et al. (1999) foi o primeiro a descrever o paradoxo da obesidade, em que observaram que

pacientes obesos submetidos à hemodiálise apresentavam reduzida morbidade e mortalidade quando comparados à pacientes magros (Fleischmann et al., 1999). Desde a sua primeira descrição, uma série de novas evidências suportando a existência do paradoxo vêm sendo publicadas, as quais relacionam os efeitos benéficos da obesidade em diversas outras comorbidades, incluindo insuficiência cardíaca congestiva, síndrome coronariana aguda, doença pulmonar obstrutiva crônica e tromboembolia (Jagan et al., 2020; Schmidt & Salahudeen, 2007).

Em relação à sepse, os estudos que fazem uma abordagem à longo prazo, demonstram que os efeitos benéficos da obesidade sobre a mortalidade à sepse poderiam persistir de 30 dias até um ano após a alta hospitalar (S. Li et al., 2019; Prescott et al., 2014). No entanto, é válido mencionar que a maioria desses estudos observacionais que ressaltam o papel do paradoxo da obesidade no prognóstico da sepse apresentam muitas limitações metodológicas, uma vez que são estudos retrospectivos que se baseiam em informações provenientes de banco de dados, que, normalmente, apresentam vieses. Além disso, os resultados obtidos com modelos animais não corroboram os resultados dos estudos observacionais, uma vez que, de modo geral, demonstram que a obesidade apresenta efeitos deletérios na morbimortalidade à sepse (Frydrych et al., 2019; Kaplan et al., 2016; Petroni et al., 2022; X. Wang et al., 2016). Desse modo, a realização de maiores investigações se faz necessária com intuito de desvendar os efeitos potenciais da obesidade no prognóstico da sepse, bem como os mecanismos moleculares que poderiam mediar a existência de um possível paradoxo da obesidade, o que também ainda está esclarecido na literatura.

Diante disso, sabendo que a sepse envolve alterações cardíacas e hemodinâmicas; que pacientes que sobrevivem à sepse apresentam maiores riscos de mortalidade e de desenvolvimento de DCVs; e que a obesidade, que está associada à complicações metabólicas e cardiovasculares, pode influenciar no prognóstico destes pacientes, a hipótese deste trabalho é que a obesidade induzida por dieta de cafeteria causa prejuízo nas respostas cardiovasculares de camundongos sobreviventes à sepse e que esse prejuízo causaria efeitos deletérios frente a um novo quadro infeccioso.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar as respostas cardiovasculares de camundongos obesos alimentados com dieta CAF que sobreviveram à sepse polimicrobiana experimental.

3.2. Objetivos específicos

i) Desenvolver um modelo experimental único a partir de dois modelos experimentais já bem estabelecidos: o modelo de obesidade induzida por dieta CAF e o modelo de ligadura e perfuração do ceco para indução da sepse;

ii) Caracterizar o modelo experimental desenvolvido com base nos parâmetros associados à obesidade e à sepse;

Uma vez que o modelo foi desenvolvido e caracterizado, buscamos, em camundongos obesos alimentados com dieta de cafeteria e sobreviventes à sepse,

iii) Avaliar as respostas cardíacas, em relação às características estruturais e funcionais;

iv) Avaliar as respostas de contração e relaxamento vasculares;

v) Investigar os mecanismos que medeiam as respostas vasculares;

vi) Verificar se as alterações cardiovasculares seriam protetoras ou não à morbimortalidade diante de um segundo desafio infeccioso.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados camundongos machos da linhagem BALB/cAnNCrl com 8 semanas de idade, provenientes do Biotério Central da UFMG. Os animais foram acondicionados em ambiente com temperatura ($25 \pm 4^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) controladas, apresentando livre acesso à alimento e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG, sob o protocolo de número 383/2016.

4.2. Delineamento experimental

Os protocolos experimentais foram divididos em 5 etapas principais, que estão representadas no fluxograma da figura 3 e serão descritas nos tópicos a seguir. De modo geral, na primeira etapa, foi realizado o desenvolvimento do modelo animal, por meio da indução da obesidade e da sepse experimental. Na segunda etapa foi realizada a caracterização do modelo animal desenvolvido, tanto em termos de parâmetros relacionados à obesidade, quanto de parâmetros relacionados à sepse. Na terceira etapa foi realizada a avaliação das respostas cardíacas. Já, na quarta etapa, foi realizada a avaliação das respostas vasculares e investigação dos mecanismos moleculares que poderiam desencadeá-las. E, por fim, na quinta etapa, foi realizado o segundo desafio infeccioso e verificação da morbimortalidade dos animais durante 7 dias após a infecção.

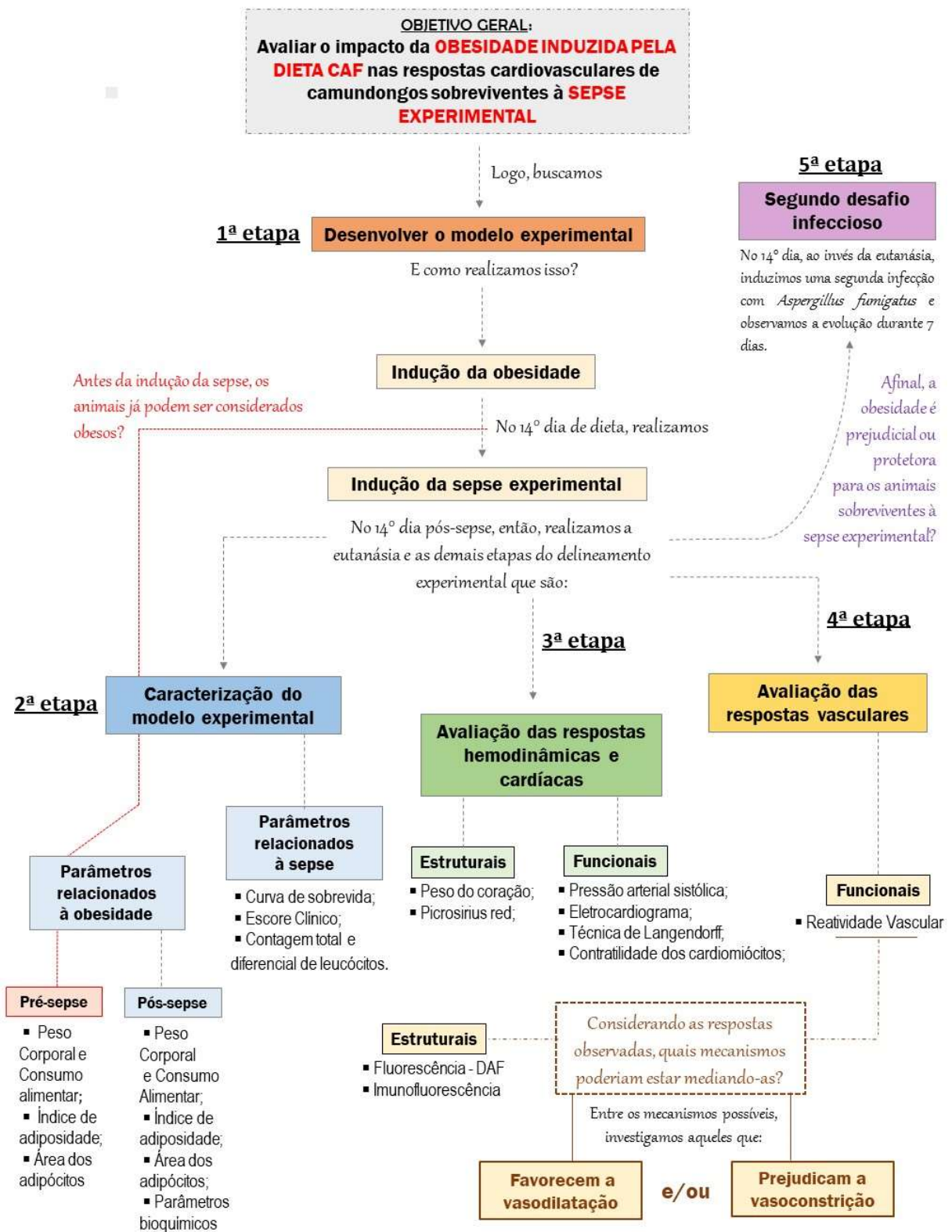


Figura 3: Fluxograma representativo do delineamento das etapas de realização dos protocolos experimentais. A partir do objetivo geral representado em cinza, os protocolos experimentais foram divididos em 5 etapas principais, sendo cada uma delas representada por uma cor específica (1ª etapa: laranja; 2ª etapa: azul; 3ª etapa: verde; 4ª etapa: ouro; e, 5ª etapa: lavanda). As setas indicam em que

momento cada uma das etapas foi realizada e os traços indicam quais protocolos foram realizados. Já os questionamentos indicam problemas que foram surgindo ao longo do desenvolvimento do presente estudo e que nortearam a realização de alguns protocolos experimentais. Além disso, a avaliação prévia à sepse de parâmetros relacionados à obesidade não foi considerada uma etapa adicional, mas uma sub-divisão da etapa de caracterização do modelo experimental. Sendo assim, ela está indicada em vermelho dentro da etapa de caracterização do modelo experimental, que está representada pela cor azul.

4.3. Desenvolvimento do modelo experimental (1ª ETAPA)

4.3.1. Indução da obesidade

Para o desenvolvimento do modelo experimental, os animais foram, inicialmente, divididos em 2 grupos: grupo controle e grupo CAF. Os animais do grupo controle foram alimentados, por 29 dias, com ração padrão para roedores de laboratório (Nuvilab CR-1, Nuvital, Colombo/PR) e tiveram livre acesso à água. Já os animais do grupo CAF foram alimentados, também por 29 dias, com dieta hipercalórica do tipo “cafeteria”. A dieta de cafeteria é composta por pellets salgados e doces. Os *pellets* salgados são compostos por 25% batata frita tipo chips industrializada, 25% amendoim torrado e moído, 30% manteiga sem sal e 20% ração padrão para roedores. Os *pellets* doces são compostos por 25% leite condensado, 25% biscoito wafer de sabor chocolate, 30% amendoim e 20% ração padrão para roedores. Além disso, os animais do grupo CAF tiveram livre acesso à água contendo açúcar refinado (105 mg/mL), em quantidade similar à encontrada nos refrigerantes (Marina Chaves de Oliveira et al., 2017). A Tabela 1 apresenta as composições nutricionais da dieta controle e de cafeteria, que foram calculadas de acordo com as informações fornecidas pelos fabricantes dos produtos.

Tabela 1. Composição Nutricional das dietas Controle e Cafeteria

Composição	Dieta Controle	Dieta de Cafeteria
Proteínas (kcal%)	31,1	11
Carboidratos (kcal%)	65,8	31
Lipídios (kcal%)	3,1	58
kcal/g de dieta	4,0	5,8

4.3.2. Indução da sepse experimental

Para a indução da sepse experimental, foi utilizado o modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP, do inglês *cecal ligation and puncture*), o qual foi descrito,

primeiramente, em 1980 e é considerado modelo padrão entre os modelos experimentais de sepse polimicrobiana, uma vez que é capaz de mimetizar a natureza e evolução da sepse em humanos (Ruiz et al., 2016; Wichterman et al., 1980). Sendo assim, os animais, após 14 dias sendo alimentados com dieta padrão ou de cafeteria, foram redivididos em 4 grupos experimentais: Controle: alimentado com dieta controle e não submetido à indução da sepse; CLP: alimentado com dieta controle e submetido à indução da sepse; CAF: alimentado com dieta de cafeteria e não submetido à indução da sepse; CAF-CLP: alimentado com dieta de cafeteria e submetido à indução da sepse.

O modelo CLP pode ser adaptado para induzir a sepse com diferentes gravidades (Rittirsch et al., 2009). A posição da perfuração, o diâmetro da agulha e o número de perfurações são fatores que influenciam na gravidade da sepse. Portanto, a escolha desses fatores no presente estudo foi feita com intuito de que o modelo de sepse com gravidade intermediária fosse induzido (Leendertse et al., 2009). Sendo assim, no 14º dia de dieta, os animais dos grupos CLP e CAF-CLP foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de 80 µL de uma solução quetamina e xilazina diluída em salina 0,9% (1,2 µL/g de quetamina 10% e 0,4 µL/g de xilazina 2%). Em seguida, foi realizada uma laparotomia mediana ventral e o ceco foi exposto e ligado distalmente à válvula ileocecal, evitando a obstrução total do intestino. O ceco foi, então, perfurado uma única vez transversalmente com a agulha 26G, em uma região intermediária entre a ligadura e a ponta do ceco. Uma vez que a perfuração foi realizada, o ceco foi pressionado suavemente, a fim de permitir o extravasamento colônico pelas perfurações e, a seguir, foi reintroduzido na cavidade abdominal, sendo realizada a laparorráfia. Os animais dos grupos controle e CAF foram anestesiados e submetidos à laparotomia e exposição do ceco, não sendo realizados a ligadura e perfuração cecal. Ao final da cirurgia, uma injeção subcutânea de 1mL de solução salina foi administrada nos animais de todos os grupos experimentais para mantê-los hidratados até o despertar da anestesia.

4.4. Caracterização do modelo experimental (2ª ETAPA)

4.4.1. Parâmetros relacionados à obesidade

4.4.1.1. Avaliação do peso corporal e do consumo alimentar

Para analisar as alterações do peso corporal, os animais foram pesados durante 28 dias, compreendendo as seguintes fases: início do período experimental (dia 0), fase pré-sepse (dias 4, 7, 11 e 14), fase aguda da sepse (dias 15,16 e 17) e fase crônica da sepse (dias 19, 22 e 28). Sendo assim, para o cálculo do delta de ganho de peso corporal, foi considerado a diferença entre o peso corporal obtido no dia “x” e o peso corporal obtido no dia 0. Para análise da ingestão alimentar, o consumo de dieta foi medido 2 vezes por semana ao longo do período de 28 dias e o consumo médio diário calculado a partir da quantidade de dieta ingerida dividida pelo número de dias em que essa ingestão ocorreu. Os resultados obtidos para a ingestão alimentar foram expressos tanto em gramas, como em kcal (ingestão calórica).

O peso corporal e o consumo alimentar também foram avaliados em animais que não passaram pelo procedimento cirúrgico, ou seja, *animais pré-sepse*, os quais foram utilizados somente com intuito de avaliar o desenvolvimento da obesidade antes da indução da sepse. Esses animais foram pesados num intervalo de 2-3 dias durante um período total de 14 dias, compreendendo o início do período experimental, representado pelo dia 0, e a fase pré-sepse, representada pelos dias 3, 6, 9, 12 e 14. Para a avaliação da ingestão alimentar, o consumo de dieta foi também medido a cada 2-3 dias durante o período de 14 dias.

4.4.1.2. Determinação do índice de adiposidade

Para o cálculo do índice de adiposidade, os camundongos foram eutanasiados, no 14º dia (*animais pré-sepse*) ou 29º dia (*animais sobreviventes à sepse*) após o início da dieta, e os tecidos adiposos epididimal (TAE), mesentérico (TAM) e retroperitoneal (TAR) foram coletados e pesados. O índice de adiposidade, expresso em porcentagem, foi, então, calculado a partir da seguinte fórmula (Matias et al., 2018):

$$\text{Índice de adiposidade (\%)} = \frac{\sum \text{Peso dos tecidos adiposos}}{\text{Peso do animal}} \times 100$$

4.4.1.3. Análise morfométrica dos adipócitos epididimais

Para a análise quantitativa da área dos adipócitos, amostras de tecido adiposo epididimal foram coletadas e imersas em solução de paraformaldeído 4% e tampão fosfato 0,1M (pH 7,2), por um período de 7 dias. A seguir, procedeu-se a etapa de desidratação com álcool etílico, diafanização com xilol e a inclusão em parafina. Os

tecidos foram, então, cortados por microtomia em secções histológicas de 5 µm de espessura. As lâminas foram coradas com Hematoxilina-Eosina (H&E) e, em seguida, fotografadas em microscópio óptico acoplado à uma câmera digital. Foram capturadas cerca de 6 imagens de diferentes regiões de cada tecido, com intuito de visualização de toda a área tecidual. As análises quantitativas foram realizadas com auxílio do software ImageJ, sendo o perímetro e a área seccional dos adipócitos obtidos pela média aritmética das medidas aleatórias de 50 adipócitos de cada animal.

4.4.1.4. Avaliação do perfil glicêmico

Para investigar possíveis alterações no metabolismo da glicose, foi realizado o teste de tolerância oral à glicose (TTOG). Sendo assim, no 14° dia (*animais pré-sepse*) ou 29° dia (*animais sobreviventes à sepse*) após o início da dieta, os animais foram deixados em jejum por 6 horas e após esse período foi administrada via oral, por gavagem, uma solução de glicose 30% em volume determinado de acordo com o peso do animal (2 mg de glicose/g de peso corporal). Os níveis glicêmicos foram medidos antes da administração da glicose (tempo 0) e 15, 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração da glicose. Essas medidas foram realizadas a partir de amostras de sangue coletados da cauda dos animais utilizando, para isso, um glicosímetro Accu-Chek® Active (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN). Os resultados obtidos foram expressos em mg de glicose por decilitro de sangue (mg/dL).

4.4.1.5. Determinação dos parâmetros bioquímicos

Na eutanásia realizada no 29° dia após o início da dieta (*animais sobreviventes à sepse*), o sangue dos animais, em jejum, foi coletado e centrifugado a 3000 rpm à 4°C por 10 minutos, para a obtenção do soro. Os níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicerídeos foram determinados por meio de ensaios enzimáticos colorimétricos (KATAL, Minas Gerais, Brasil) e expressos em mg/dL.

Já os níveis séricos das adipocinas (leptina, adiponectina, resistina e quemerina), foram determinados por meio do ensaio de ELISA (R&D Systems Europe Ltd., Abington, Reino Unido), conforme as instruções fornecidas pelo fabricante. Inicialmente, foram adicionados às placas de 96 poços 100 µL/poço de solução do anticorpo de captura específico para cada citocina. As placas permaneceram incubando com o anticorpo de captura à temperatura de 4°C *overnight* em local úmido e protegido da luz. Após esse período, cada poço foi lavado 3 vezes com solução PBS

(*Phosphate Buffered Saline*)/Tween 0,1% e, a seguir, foram adicionados 200 μ L da solução de bloqueio (BSA (*Bovine Serum Albumine*)1%). As placas foram, então, colocadas em agitador horizontal e permaneceram incubando com a solução de bloqueio durante 1 hora. Decorrido esse tempo e após nova lavagem, o controle negativo (o branco, que é BSA 1%), as amostras de soro diluídas e os padrões das adipocinas (curva padrão) foram adicionados aos poços previamente determinados. As placas foram incubadas *overnight* em condições similares às descritas anteriormente. As alíquotas de soro adicionadas foram diluídas (em PBS contendo BSA 0,1%) nas seguintes proporções: 1:2 para leptina, 1:12000 para adiponectina, 1:500 para quemerina e 1:100 para resistina. Transcorrido o tempo necessário, as placas foram lavadas e, a seguir, foram adicionados 100 μ L/poço da solução contendo o anticorpo de detecção, permanecendo incubando por 2 horas. Após nova lavagem, as placas foram incubadas com a solução de estreptavidina conjugada com a peroxidase por 30 minutos. Finalizado esse tempo, as placas foram novamente lavadas e foi adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD) e peróxido de hidrogênio 30% (H_2O_2) para que a reação pudesse ocorrer. A reação foi interrompida por meio da solução *stop* contendo ácido sulfúrico (H_2SO_4) 1 mol/L. O produto da oxidação de ODP foi, então, detectado por colorimetria em um leitor de placas de ELISA no comprimento de onda de 490 nm, sendo os resultados expressos em picogramas de proteína por mL de sangue.

4.4.2. Parâmetros relacionados à sepse

4.4.2.1. Avaliação da morbimortalidade

Para a avaliação da sobrevivência, os animais foram observados, a cada 12 horas, durante um período de 15 dias após a realização do procedimento cirúrgico para a indução ou não da sepse. Os resultados obtidos foram expressos em porcentagem (%) de sobrevivência.

Já para a avaliação da progressão e severidade da sepse, foi realizado o escore clínico, baseado no escore murino de sepse (em inglês, *Murine Sepsis Score* (MSS)) descrito e validado por Shrum *et al.* (2014) e que consiste essencialmente em características observacionais (Shrum *et al.*, 2014). Sendo assim, nos dias 0 (antes da cirurgia), 1, 2, 3 e 15 (após a cirurgia), os camundongos, dentro de suas respectivas gaiolas, foram avaliados por dois observadores distintos, aos quais não foi informado

a que grupo experimental os animais pertenciam (ou seja, a observação foi realizada às cegas). A avaliação, conforme demonstrado na tabela 2, consistiu na classificação em níveis de gravidade (0 - menor gravidade a 4 - maior gravidade) das seguintes variáveis: aparência; nível de consciência; atividade; resposta ao estímulo; olhos; e qualidade e frequência respiratória. Ao final da avaliação, em cada dia considerado, os valores de classificação (0 a 4) admitidos para cada uma das variáveis foram somados e, posteriormente, foi realizada uma média aritmética das somas totais das avaliações dos observadores. O valor médio obtido para cada animal corresponde ao escore clínico. Além da análise do escore clínico geral, foi realizada também uma análise dos escores obtidos para cada variável individualmente, com intuito de avaliar quais das variáveis observadas estaria impactando mais na progressão e severidade da sepse.

Tabela 2. Escore murino de sepse utilizado para avaliar a progressão e severidade da doença no modelo experimental desenvolvido (Adaptada de Shrum et al. (2014))

VARIÁVEL	0	1	2	3	4
APARÊNCIA	Ausência de piloereção	Piloereção em algumas parte do corpo	Piloereção na maior parte do dorso	Piloereção pode ou não estar presente. Aparenta estar inchado	Piloereção pode ou não estar presente. Aparenta estar magro e fraco
NÍVEL DE CONSCIÊNCIA	Ativo	Ativo, mas evita ficar de pé	Visivelmente lento, porém é ainda capaz de se movimentar	Atividade está prejudicada. Só se movimenta quando provocado	Atividade está bastante prejudicada. Não se movimenta quando provocado
ATIVIDADE	Realiza normalmente suas atividades (comer, beber, escalar ou correr)	Atividade um pouco reduzida, mas ainda se locomove no fundo da caixa	Atividade e suprimida. Estacionário com alguns movimentos investigativos	Nenhuma atividade. Estacionário	Nenhuma atividade. Apresentando tremores
RESPOSTA AO ESTÍMULO	Responde imediatamente ao toque e ao estímulo auditivo	Nenhuma ou lenta resposta ao estímulo auditivo. Rápida resposta ao toque (move-se bastante para escapar)	Nenhuma resposta ao estímulo auditivo. Moderada resposta ao toque (move-se pouco)	Nenhuma resposta ao estímulo auditivo. Nenhuma ou lenta resposta ao toque	Nenhuma resposta ao estímulo auditivo. Nenhuma ou lenta resposta ao toque. Não altera sua posição quando tocado

OLHOS	Abertos	Não completamente abertos, possivelmente com secreções	Parcialmente fechados, possivelmente abertos	Majoritariamente ou completamente fechados, possivelmente com secreções	Fechados ou purulentos
FREQUÊNCIA RESPIRATÓRIA	Normal	Ligeiramente reduzida, porém ainda não quantificável visualmente	Moderadamente reduzida, porém ainda em uma taxa superior à taxa passível de ser quantificada visualmente	Severamente reduzida e passível de ser quantificada visualmente (0,5 segundos entre os ciclos respiratórios)	Extremamente reduzida (> 1s entre os ciclos respiratórios)
QUALIDADE RESPIRATÓRIA	Normal	Períodos breves de esforço respiratório	Dificuldade respiratória. Ausência de respiração ofegante.	Dificuldade respiratória com períodos ofegantes intermitentes	Respiração ofegante

4.4.2.2. Avaliação da presença de leucócitos na circulação periférica

Para avaliar a presença de leucócitos na circulação periférica, foi realizada a contagem total e diferencial dos leucócitos no 15º dia após a indução ou não da sepse. Para a contagem do número total de leucócitos, foi realizada a coleta de sangue (5µL) da cauda do animal, que foi adicionado e homogeneizado ao líquido de Turk (concentração final de 5%), que é capaz de provocar hemólise. A seguir, as células foram quantificadas na câmara de Neubauer com auxílio do microscópio ótico no aumento de 40x. Os valores obtidos foram corrigidos por 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 de sangue.

A contagem diferencial de leucócitos, por sua vez, 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 e as células foram examinadas em microscópio ótico através da objetiva de imersão (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.

Uma vez que o modelo experimental utilizado foi caracterizado e que o objetivo do presente estudo é investigar as alterações cardiovasculares de camundongos

obesos e sobreviventes à sepse, todos protocolos experimentais, descritos a seguir, foram realizados considerando o período experimental de 15 dias após o procedimento cirúrgico para indução ou não da sepse, que também corresponde a 29 dias após o início da dieta (Figura 4).

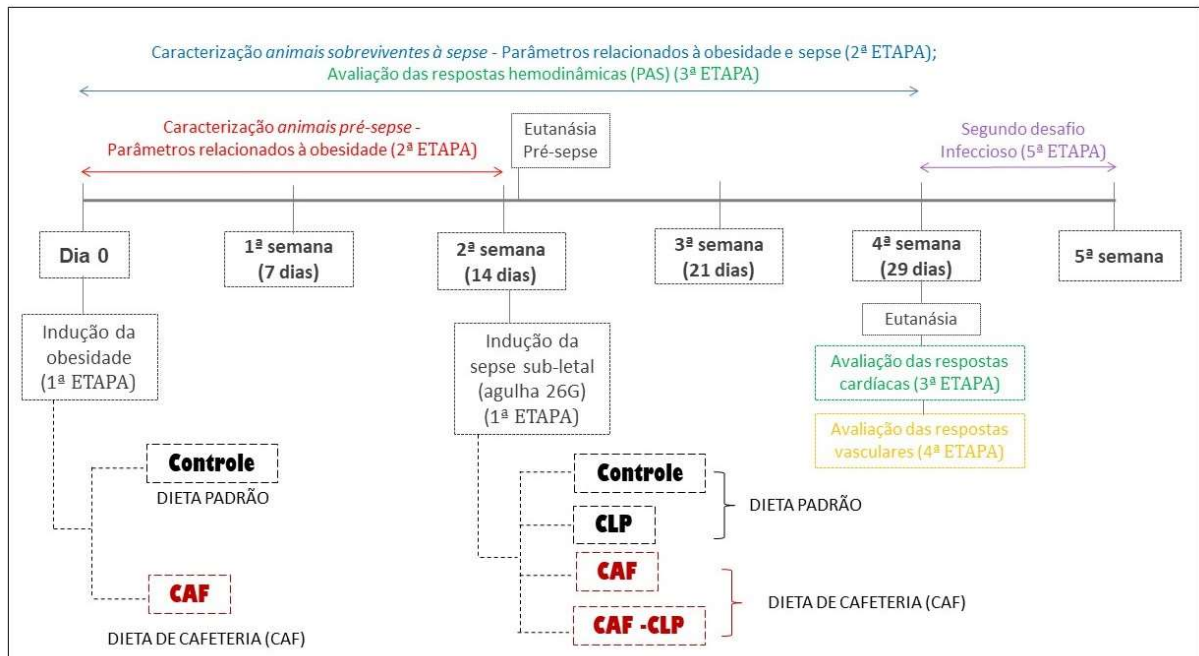


Figura 4: Resumo esquemático da realização cronológica das etapas experimentais. Elaborado pela autora.

4.5. Avaliação das respostas hemodinâmicas e cardíacas (3ª ETAPA)

4.5.1. Avaliação do peso cardíaco

Para a análise do peso, os corações foram cuidadosamente coletados e pesados em balança analítica. A tíbia direita também foi dissecada e mantida na estufa à 37°C por 24 horas para a secagem. Passado esse período de tempo, o comprimento da tíbia foi medido com auxílio de um paquímetro e utilizado na correção do peso do coração. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de peso do coração por milímetros de comprimento da tíbia.

4.5.2. Análise semi-quantitativa da deposição de colágeno

Para avaliar a deposição de colágeno no coração, foi realizada a marcação com PicrosiriusRed, que é um corante histológico que marca o colágeno total presente no tecido em vermelho. Para isso, os corações foram coletados, embebidos em Tissue-Tek Optimum Cutting Temperature (Tissue-Tek® O.C.T., Qaigen, Hilden, Alemanha), e armazenados à temperatura de -20°C. Os corações congelados foram seccionados

em cortes com 10 µm de espessura e aderidos em lâminas previamente lavadas em água corrente e gelatinizadas. A seguir, foi realizado um protocolo de hidratação e desidratação do tecido, com intuito de minimizar o *background* de marcação do corante no interstício cardíaco, otimizando a qualidade das imagens e das análises. Após a etapa de hidratação, os cortes foram incubados com a solução de PicrosiriusRed por 45 minutos. Passado este tempo, os cortes passaram por mais uma etapa de desidratação e, por fim, foram incubados com solução de ácido clorídrico a 0,01 mol/L por 90 minutos. As lâminas foram, então, seladas com Entellan™ (Merck) e as imagens foram capturadas em microscópio de campo claro, em aumento de 40x, e analisadas utilizando o software Image ProPlus (versão 4.5.0.29). Toda a marcação vermelha presente no tecido foi considerada deposição de colágeno total e o valor foi normalizado pela respectiva área selecionada para análise.

4.5.3. Medida da pressão arterial sistólica

Para análise da pressão arterial sistólica (PAS), as medidas foram realizadas, uma vez por semana durante todo o período experimental, ou seja, 4 semanas consecutivas (29 dias), utilizando o método não invasivo de pletismografia de cauda (Pletismógrafo LE5002; Panlab®, Barcelona, Espanha). Para isso, os camundongos foram colocados em um contensor, ao qual já estavam ambientados, e tiveram a cauda aquecida para a dilatação da artéria caudal. Após o aquecimento, a cauda foi encaixada em um *cuff* de insuflação acoplado a um sensor de pulso para a captação do pulso arterial. O valor médio da PAS, expresso em mmHg, foi calculado a partir da média aritmética de 10 aferições consecutivas obtidas para cada animal.

4.5.4. Avaliação da atividade elétrica do coração

Para verificar a atividade elétrica do coração dos camundongos, foi realizado o eletrocardiograma (ECG), utilizando um eletrocardiógrafo veterinário não invasivo com a aquisição de 12 canais simultâneos (ECG-PC versão 2.07, Tecnologia Eletrônica Brasileira - TEB, Belo Horizonte-MG, Brasil). Para isso, os camundongos foram inicialmente anestesiados com isoflurano (1-2%), usando um inalador anestésico veterinário (Brasmed, São Paulo, Brasil). Uma vez anestesiados, os camundongos foram colocados em posição supina e os eletrodos posicionados nos membros anteriores e posteriores. Os traçados de ECG foram registrados, durante cerca de 10

minutos/animal, na velocidade de 50 mm/s e sensibilidade de 2N. Os parâmetros foram analisados em intervalos de 5 minutos do tempo total de registro, compreendendo 3 momentos (TO, T5 e T10), e a derivação II foi considerada para essa análise. Entre os parâmetros avaliados no presente estudo estão: frequência cardíaca (FC), intervalo PR (PRi), duração do complexo QRS e intervalo QT corrigido (QTc).

4.5.5. Avaliação da função cardíaca *ex vivo*

Para avaliar a função cardíaca *ex vivo*, foi utilizada a técnica de Langendorff com pressão constante (Bell et al., 2011). Para isso, os camundongos foram heparinizados (1000 UI/kg; i.p.) e, após 10 minutos, eutanasiados por decapitação. A cavidade torácica foi exposta e os corações retirados e colocados em uma placa de Petri contendo solução nutritora de *Krebs-Henseleit* (composição em mmol/L: NaCl 113,00; KCl 4,70; KH₂PO₄ 1,10; MgCl₂.6H₂O 1,10; NaHCO₃ 22,00; C₆H₁₂O₆ 11,00; CaCl₂ 1,35) mantida à 4°C e pH de 7,4. Os corações foram expostos a uma solução nutritora fria com intuito de diminuir o metabolismo do miocárdio e o consumo de O₂ durante o tempo entre a eutanásia e a canulação da aorta. Em seguida, a aorta ascendente foi seccionada na altura de sua primeira ramificação e fixada a uma agulha de aço inoxidável conectada ao sistema de perfusão que leva a solução nutritora às artérias coronarianas. Os corações foram perfundidos, de maneira retrógrada, com solução nutritora a um fluxo constante de 3 mL/min, mantida a 37°C e aerada constantemente com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂).

Para analisar os parâmetros de contratilidade do ventrículo esquerdo, o átrio esquerdo foi retirado e um balão de látex, conectado a um transdutor de pressão e um amplificador (AVS projects, SP, Brasil), foi introduzido até o ventrículo esquerdo. Depois de introduzido, o balão foi inflado para ajustar a pressão sistólica do ventrículo esquerdo em aproximadamente 100 mmHg (Kaakinen et al., 2017). As preparações cardíacas permaneceram 30 minutos estabilizando e, a seguir, os valores basais de pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) e a dP/dt (razão da derivada da pressão pela derivada do tempo) máxima e mínima foram registrados pelo transdutor de pressão. Em seguida, uma curva dose-resposta para isoprenalina nas concentrações de 10⁻¹⁰ mol/L a 10⁻⁵ mol/L foi realizada e os valores registrados. Os registros foram realizados por meio do software AQCAD 2.2.4 e interpretados através do software ANCAD.

4.5.6. Medida da contratilidade dos cardiomiócitos ventriculares

A análise da contratilidade celular cardíaca foi feita de acordo com o protocolo previamente descrito por Scalzo *et al.* (2022) (Scalzo et al., 2022). Para isso, os camundongos foram eutanasiados e seus corações rapidamente removidos e retro-perfundidos, via método de Langendorff, com solução de Tyrode modificada livre de cálcio (Ca^{2+}). Posteriormente, os corações foram perfundidos com solução de Tyrode contendo 50 $\mu\text{mol/L}$ CaCl_2 e colagenase (tipo 2 – 1 mg/mL) por um período de 15 minutos. Após essa etapa de digestão enzimática, as câmaras ventriculares foram separadas e submetidas à digestão mecânica, sendo, em seguida, filtradas para remoção do tecido que não foi digerido. A concentração extracelular de Ca^{2+} foi aumentada após três ciclos de centrifugação e troca de tampão, chegando a 500 $\mu\text{mol/L}$ ao final do processo. Logo após, as células foram novamente centrifugadas e mantidas em solução de Tyrode.

As imagens foram obtidas através de uma câmera CMOS digital de alta velocidade (SILICON VIDEO 642 M, EPIX, Inc. Illinois, EUA) acoplada à um microscópio de campo claro com incubadora (modelo ChamlideIC-CU: 109, Live Cell Instrument, Nowan-gu, KOR), utilizada para manter os cardiomiócitos em temperatura controlada (37°C). Os cardiomiócitos adultos foram estimulados eletricamente por meio de eletrodos de platina (1Hz, 30V) com pulsos de 5 ms de duração. A sequência de imagens foi gravada a 200 fps durante 1 minuto pela câmera, com resolução de 640x200 pixels.

Para a obtenção dos parâmetros de contratilidade celular, as imagens foram processadas e analisadas pelo método de fluxo óptico denso por meio do software CONTRACTIONWAVE (CW) (Scalzo et al., 2021). O CW utiliza os princípios do fluxo óptico, utilizando o algoritmo Gunnar Farneback (Farneback, 2003), para detectar a velocidade de todos os pixels entre um par de imagens. Sendo assim, a velocidade de contratilidade foi obtida através do fluxo óptico calculado a partir de todos os pontos (pixels) em cada imagem. Já a velocidade final foi obtida pela média da magnitude de movimento do cardiomiócito de cada imagem e plotado em um gráfico de velocidade por tempo.

4.6. Avaliação das respostas vasculares (4ª ETAPA)

4.6.1. Avaliação funcional através da reatividade vascular

Para a realização dos experimentos de reatividade vascular, os camundongos foram eutanasiados por decapitação e a porção torácica da aorta foi cuidadosamente isolada e transferida para uma placa de Petri, contendo solução nutriente de *Krebs-Henseleit* modificado (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), para a remoção do tecido adiposo perivascular. As aortas foram seccionadas em anéis de 2-3 mm de comprimento e, após a secção, dois ganchos metálicos foram inseridos paralelamente no lúmen dos anéis vasculares. Em seguida, as preparações foram montadas em cubas para órgão isolado, sendo banhadas com solução de *Krebs-Henseleit*, mantida aquecida à 37°C, com pH estável de 7,4 e continuamente aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Para o registro da tensão isométrica, um dos ganchos foi conectado a uma haste metálica fixa e o outro a um transdutor de força isométrica. Dessa forma, qualquer alteração no diâmetro dos vasos pôde ser percebida pelo transdutor de força que, então, transmitiu o sinal para um sistema de aquisição de dados (Powerlab 4/35, ADInstruments, Austrália) que, ao estar acoplado a um computador, possibilitou o registro dos resultados.

Após a montagem das preparações nas cubas para órgão isolado, as preparações permaneceram em repouso por 60 minutos para a estabilização da tensão basal de 3,9 mN (0,4 gramas). Durante este período, a solução de *Krebs-Henseleit* foi renovada a cada 15 minutos, a fim de evitar o acúmulo de metabólitos e restaurar os nutrientes requeridos para a manutenção do metabolismo vascular. Passado o período de estabilização, os anéis de aortas foram estimulados com cloreto de potássio (KCl - EC₅₀: 0,09 mol/L) com intuito de determinar a viabilidade tecidual. A seguir, as aortas foram estimuladas com fenilefrina (PE - EC₅₀: 10⁻⁷ mol/L) e, após a obtenção do platô de contração, a acetilcolina (ACh - EC₅₀: 10⁻⁶ mol/L) foi adicionada a fim de verificar a integridade endotelial. Para a avaliação das respostas vasculares no presente estudo, foram consideradas preparações com endotélio íntegro e que, para isso, deviam apresentar uma resposta de relaxamento para ACh superior à 80% no teste da integridade endotelial.

Para a caracterização das respostas contráteis vasculares, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10⁻¹⁰ mol/L - 10⁻⁴ mol/L). Já para a caracterização das respostas de relaxamento, as aortas foram pré-contraídas com

fenilefrina (EC_{50} : 10^{-7} mol/L) e curvas cumulativas concentração-resposta para ACh (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

A partir dos resultados obtidos na caracterização, foi realizada a investigação dos mecanismos moleculares que poderiam estar mediando as respostas contratéis observadas nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse. Essa investigação, basicamente, se baseou na avaliação de mediadores que podem contribuir com a hiporresponsividade aórtica, os quais, geralmente, ou favorecem a vasodilatação, ou prejudicam a maquinaria contrátil e/ou a produção de vasoconstritores (Duan et al., 2015; Levy et al., 2010). Diante disso, a seguir, serão descritos, com mais detalhes, os mecanismos moleculares investigados no presente estudo.

4.6.2. Investigação dos mecanismos envolvidos nas respostas vasculares

4.6.2.1. Investigação do envolvimento do endotélio vascular

Objetivo: avaliar se a camada endotelial estaria participando da hiporresponsividade aórtica observada nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

O endotélio foi removido mecanicamente através do atrito entre as paredes internas do vaso e um dos ganchos metálicos, já previamente inserido no lúmen do anel aórtico. Após o período de estabilização, foi realizado o teste de integridade endotelial, em que a ausência do endotélio foi considerada para aortas que apresentaram no máximo 20% de relaxamento para ACh. Uma vez confirmada a ausência de endotélio, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

4.6.2.2. Investigação do envolvimento da óxido nítrico sintase (NOS)

4.6.2.2.A. Efeito do L-NAME, inibidor não-seletivo da NOS, do 1400W, inibidor seletivo da isoforma induzida da NOS (iNOS) e do 7-NI, inibidor seletivo da isoforma neuronal da NOS (nNOS), na resposta vascular.

Objetivo: avaliar se enzima NOS e, mais especificamente, as isoformas iNOS e nNOS estão envolvidas na hiporresponsividade aórtica observada nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

Anéis de aortas com endotélio foram incubados com L-NAME (10^{-4} mol/L) ou 1400W (10^{-4} mol/L) ou 7-NI (10^{-4} mol/L) por 30 minutos. Passado o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

4.6.2.2.B. Imunolocalização aórtica das isoformas endotelial, induzida e neuronal da NOS

Objetivo: detectar e avaliar a localização subcelular da eNOS, iNOS e nNOS nas aortas de camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

A avaliação da presença e localização subcelular das isoformas da NOS foi realizada por meio da técnica de imunofluorescência. Para isso, as aortas torácicas foram cuidadosamente isoladas e dissecadas, embebidas em OCT e armazenadas à temperatura de -20°C . As aortas congeladas foram, então, seccionadas em cortes com $10\ \mu\text{m}$ de espessura e aderidas em lâminas previamente lavadas em água corrente e gelatinizadas. Uma vez que as lâminas estavam preparadas, os cortes foram fixados com acetona gelada por 5 minutos e, a seguir, lavados, durante 5 minutos, 2 vezes com PBS 1x. Com intuito de impedir as ligações inespecíficas dos anticorpos a componentes teciduais, os cortes foram incubados com tampão de bloqueio (Triton X-100 0,1% + BSA 1% em PBS) por 10 minutos. Decorrido o tempo necessário para o bloqueio, os cortes foram lavados 1 vez com PBS e incubados com os anticorpos primários específicos anti-eNOS (1:200, *mouse*, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA), anti-iNOS (1:200, *mouse*, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) e anti-nNOS (1:200, *rabbit*, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA), por 90 minutos, protegidos da luz e à temperatura ambiente. Passado o período de incubação com os anticorpos primários, os cortes foram lavados, durante 5 minutos, 2 vezes com PBS 1x, e, posteriormente, incubados com os anticorpos secundários conjugados às sondas fluorescentes Alexa Fluor® 488 ou 647 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) por 60 minutos, protegidos da luz e à temperatura ambiente. Após o período de incubação com os anticorpos secundários, os cortes foram lavados, durante 5 minutos, 3 vezes com PBS 1x. As lâminas foram, então, montadas com o meio de montagem contendo DAPI (*Fluoromount-G™ Mounting Medium*; Invitrogen, Massachusetts USA), que é uma sonda fluorescente que se liga fortemente ao DNA e, portanto, evidencia os núcleos das células.

As imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Nikon ECLIPSE Ti, Nikon Corporation, New York, USA), com excitação no comprimento de 488 nm ou 647 nm e emissão, respectivamente, no 519 nm ou 667 nm. A aquisição das imagens foi realizada mantendo os mesmos padrões de calibragem para todos os grupos experimentais. A análise quantitativa das imagens foi realizada por meio do software ImageJ (1.45), onde foi mensurada a intensidade de fluorescência vascular total e das camadas vasculares (íntima, média e adventícia) separadamente. A intensidade de fluorescência foi corrigida pela densidade integrada (que já está corrigida pela área selecionada) e pelo background e expressa como intensidade relativa de fluorescência (unidade arbitrárias).

4.6.2.2.C. Efeito do LY-294,002, inibidor seletivo da enzima PI3K e do PD98059, inibidor seletivo das enzimas MEK 1/2 na resposta vascular

Objetivo: avaliar se as vias de sinalização PI3K-Akt e MEK/ERK 1/2, que são capazes de aumentar atividade da enzima NOS, poderiam estar mediando a hiporresponsividade aórtica observada nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

Anéis de aortas com endotélio foram incubados com LY-294,002 (10^{-5} mol/L) ou PD98059 (10^{-5} mol/L) por 30 minutos. Decorrido o período de incubação, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L).

4.6.2.3. Investigação do envolvimento do óxido nítrico (NO)

4.6.2.3.A. Efeito do TEA, bloqueador não-seletivo dos canais para potássio (K^+) e do ODQ, inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), na resposta vascular

Objetivo: avaliar a participação dos canais para K^+ e da enzima GCs na hiporresponsividade aórtica observada nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

Anéis de aortas com endotélio foram incubados com TEA (10^{-3} mol/L) ou ODQ (10^{-6} mol/L) por 30 minutos. Após o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L) foram realizadas.

4.6.2.4. Investigação da participação da ciclooxigenase (COX)

4.6.2.4.A. Efeito do ibuprofeno, inibidor não-seletivo das enzimas ciclooxigenases, na resposta vascular

Objetivo: avaliar se a ativação das ciclooxigenases poderia estar envolvida na hiporresponsividade aórtica observada nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

Anéis de aortas foram incubados com Ibuprofeno (10^{-5} mol/L) por 30 minutos. Após o período de incubação, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10^{-10} mol/L - 10^{-4} mol/L).

4.6.2.4.B. Imunolocalização aórtica da isoforma COX-2

Objetivo: detectar e avaliar a localização subcelular da COX-2 nas aortas de camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

Para avaliar a presença e a localização subcelular das isoformas COX-1 e COX-2, foi realizada a técnica de imunofluorescência. As etapas para a realização deste protocolo experimental são similares às descritas para as isoformas da NOS no tópico 4.6.2.2.B. No entanto, após o bloqueio das ligações inespecíficas, os cortes foram incubados com os anticorpo primário anti-COX-2 (1:200, *rabbit*, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) por 90 minutos, protegidos da luz e à temperatura ambiente. Decorrido o tempo necessário para a incubação com o anticorpo primário, foi realizada a incubação com os anticorpos secundário conjugados à sonda fluorescente Alexa Fluor® 488 (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, USA) por 60 minutos, protegidos da luz e à temperatura ambiente. A seguir, foi realizada a montagem das lâminas e, quando finalizada, foi feita a aquisição das imagens em microscópio de fluorescência (Nikon ECLIPSE Ti, Nikon Corporation, New York, USA), com excitação no comprimento de onda de 488 nm e um espectro de emissão no 519 nm. Durante a aquisição das imagens, os padrões de calibragem foram mantidos iguais para todos os grupos experimentais. A análise quantitativa das imagens foi realizada por meio do software ImageJ (1.45), em que foi mensurada a intensidade de fluorescência vascular total e das camadas vasculares (íntima, média e adventícia) separadamente. A intensidade de fluorescência foi corrigida pela densidade integrada (que já está corrigida pela área selecionada) e pelo background e expressa como intensidade relativa de fluorescência (unidade arbitrárias).

4.6.2.5. Investigação do envolvimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

4.6.2.5.A. Efeito da catalase, enzima que catalisa a decomposição do peróxido de hidrogênio à água e oxigênio, na resposta vascular

Objetivo: verificar se o H₂O₂ participa da hiporresponsividade aórtica observada nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

Anéis de aortas com endotélio foram incubados com Catalase (300 U/mL) por 30 minutos. Após o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10⁻¹⁰ mol/L - 10⁻⁴ mol/L) foram realizadas.

4.6.2.6. Investigação da participação do sistema-renina angiotensina

4.6.2.6.A. Efeito do captopril, inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), na resposta vascular

Objetivo: avaliar se peptídeos com ação vasodilatadora, derivados da atividade da ECA, poderiam estar envolvidos na hiporresponsividade aórtica observada nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

Anéis de aortas com endotélio foram incubados com captopril (10⁻⁵ mol/L) por 30 minutos. Passado o período de incubação, curvas cumulativas concentração-resposta para PE (10⁻¹⁰ mol/L - 10⁻⁴ mol/L) foram realizadas.

4.6.2.7. Investigação do envolvimento dos canais para cálcio (Ca²⁺)

Objetivo: verificar se os canais para cálcio do tipo L estariam mediando a hiporresponsividade aórtica observada nos camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse.

Para a avaliação do envolvimento dos canais para Ca²⁺, após o teste para confirmar a integridade endotelial, os anéis de aortas foram lavados, estabilizados na tensão basal e, a seguir, foram pré-contraídos com KCl (EC₅₀:30 mmol/L). Uma vez alcançado o platô de contração, foram realizadas curvas cumulativas concentração-resposta para Verapamil (10⁻¹⁰ mol/L - 10⁻⁴ mol/L), que é um bloqueador de canais para Ca²⁺ com alta afinidade para canais do tipo T e L.

4.7. Avaliação da morbimortalidade após o segundo desafio infeccioso (5ª ETAPA)

Para a indução do segundo desafio infeccioso, foram utilizados conídios de *Aspergillus fumigatus*, linhagem A1163, conforme descrito por (Malacco et al., 2019). Os fungos foram semeados em placa de Petri contendo meio completo (YAG) (2% p/v

de glicose, 2% p/v de ágar, 0,5% p/v de extrato de levedura e elementos de traço) e incubados em estufa à 37°C durante 48 horas. Após o período de incubação, foi preparada uma suspensão de conídios com 30 mL de salina tamponada (PBS 1x), em condição estéril. Os conídios suspensos foram filtrados utilizando uma membrana de nylon estéril de 40 µm, para remover fragmentos de hifas. A suspensão filtrada foi centrifugada a 1400 g, ressuspensa em 1 mL de PBS 1x estéril e os conídios foram contados em câmara de Neubauer. Antes da inoculação, a concentração foi ajustada para 3×10^8 conídios em 40 µL de suspensão fúngica.

A infecção foi realizada, no 15º dia após a indução da sepse, em animais dos grupos CLP e CAF-CLP, que foram anestesiados com isoflurano e infectados via intranasal (i.n.). Os animais foram observados até o término do efeito do anestésico. A letalidade e o peso corporal foram escolhidos como parâmetros clínicos de progressão da doença e foram avaliados diariamente durante 7 dias após a infecção.

4.8. Análise estatística

Os gráficos e análises estatísticas foram feitos por meio do programa GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Corporation, versão 9.0.0, 2020). Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) e comparados por meio da análise de variância de duas vias (*two-way*) ANOVA seguida do pós-teste de *Holm-Sidak*, quando duas variáveis independentes foram consideradas; ou por meio do teste t de Student, quando somente uma variável independente foi considerada. Para a análise da sobrevivência, nas 1ª e 5ª etapas, foi usado o teste log-rank (teste χ^2) para comparar as taxas de sobrevivência. Para análise das respostas vasculares, na 4ª etapa, a EC₅₀ (a concentração que induz 50% da resposta máxima) e o efeito máximo (E_{max}) foram determinados utilizando o método de regressão não linear dos mínimos quadrados (Meddings et al., 1989). A análise da potência do agonista, por sua vez, foi realizada utilizando os valores de pD₂ (-log EC₅₀). Os resultados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização do desenvolvimento da obesidade no período que antecede à sepse (pré-sepse)

O consumo alimentar do grupo CAF foi significativamente aumentado, somente entre os dias 10 a 14 de dieta, em relação ao grupo controle (Figura 5A). Contudo, quando consideramos o consumo calórico, o grupo CAF, a partir do 4º dia de dieta, ingeriu significativamente mais calorias que o grupo controle (Figura 5B). Associado a isso, o grupo CAF apresentou um aumento significativo de peso corporal (Figura 5C) e de ganho de peso corporal (Figura 5D) comparado ao grupo controle ao longo de todo período experimental considerado.

Similarmente ao que foi observado para o ganho de peso corporal, o índice de adiposidade também foi significativamente maior no grupo CAF quando comparado ao grupo controle (Figura 5E). No entanto, esse achado não corrobora os resultados obtidos na análise morfométrica dos adipócitos epididimais, visto que não houve diferença significativa entre as médias das áreas dos adipócitos do grupo CAF e do grupo controle (Figuras 5F e 5G).

Além de não provocar um aumento significativo no tamanho dos adipócitos do grupo CAF, o período experimental de 14 dias de dieta, aparentemente, não foi suficiente para causar alterações no perfil glicêmico desses animais, uma vez que a curva glicêmica obtida para o grupo CAF não apresentou diferença significativa em relação à curva obtida para o grupo controle (Figura 5H).

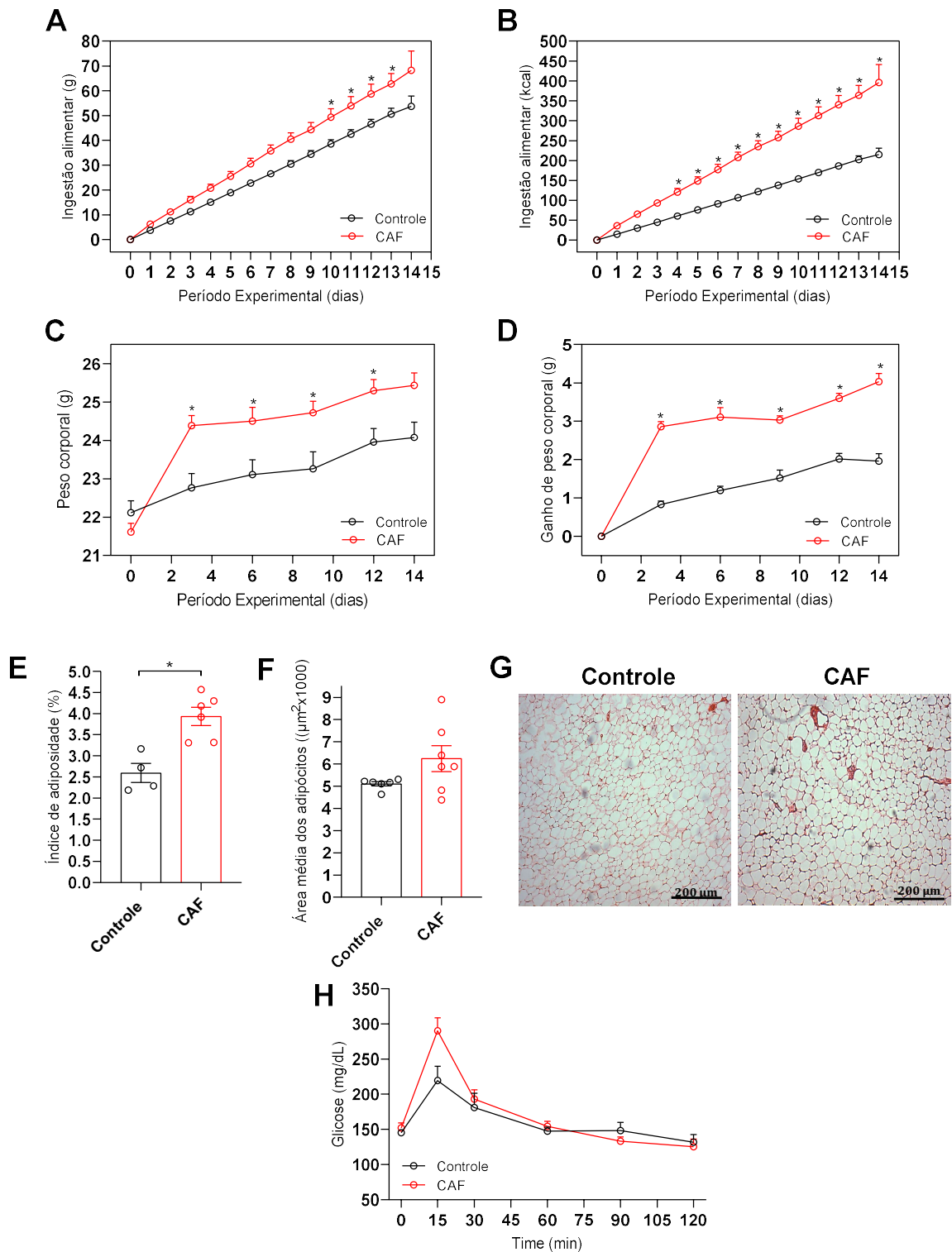


Figura 5: Avaliação do consumo alimentar, em (A) gramas e (B) kcal, (C) peso corporal, (D) ganho de peso corporal, (E) índice de adiposidade, (F e G) área média dos adipócitos do TAE e (H) perfil glicêmico dos animais do grupo Controle e CAF no período experimental anterior à indução da sepse. Os valores representam a média \pm EPM obtida para um n de 4-16 animais de cada grupo experimental estudado. * $p < 0,05$ em relação ao resultado obtido para o grupo Controle (A, B, C, D e H: Two-way ANOVA seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*; E e F: teste t de Student).

5.2. Caracterização do modelo experimental com base nos parâmetros relacionados à obesidade

Com o intuito de acompanhar a evolução temporal dos parâmetros, o consumo alimentar e o peso corporal foram mensurados ao longo de todo período experimental, ou seja, nas fases: pré-sepse, aguda da sepse e crônica da sepse. Como mostrado na Figura 6A, o consumo alimentar do grupo CAF foi significativamente maior que o do grupo controle somente em alguns dias da fase pré-sepse (do dia 8 ao dia 15 de dieta), corroborando os achados descritos no tópico 5.1. Resultados similares foram observados para o grupo CAF-CLP, que apresentou o consumo alimentar aumentado em relação ao grupo CLP, durante toda a fase pré-sepse e no início da fase aguda da sepse. Contudo, em relação ao consumo alimentar calórico (Figura 6B), ambos os grupos, CAF e CAF-CLP, consumiram significativamente mais que os grupos controle e CLP, respectivamente, durante todo o período experimental considerado. Além disso, nenhuma diferença foi verificada no consumo alimentar nas demais comparações feitas entre os grupos controle e CLP; e CAF e CAF-CLP.

Já em relação ao peso corporal, o ganho de peso corporal do grupo CAF foi significativamente maior que o do grupo controle na fase pré-sepse, o que corrobora os dados descritos no tópico 5.1 (Figuras 6C e 6D). Apesar da perda de peso corporal de ambos os grupos na fase aguda da sepse (fase pós-cirúrgica) (Figura 6E), o peso corporal do grupo CAF se manteve significativamente maior que o do grupo controle ao longo de todo o período experimental. De maneira similar, o ganho de peso corporal do grupo CAF-CLP também foi significativamente maior que o do grupo CLP na fase pré-sepse e essa diferença permaneceu ao longo de todo o período experimental (Figuras 6C e 6D). Contudo, os grupos que foram submetidos à sepse apresentaram tendência de perda de peso corporal comparado aos grupos que não foram submetidos à sepse (*Two-way ANOVA* - Fator sepse: $p < 0,05$), de modo que a perda de peso corporal verificada no grupo CLP foi significativamente maior que a do grupo controle (Figura 6E). Além disso, o ganho de peso corporal do grupo CAF-CLP foi significativamente reduzido, durante a fase aguda da sepse, em relação ao grupo CAF, permanecendo diminuído até o final do período experimental considerado (Figura 6D).

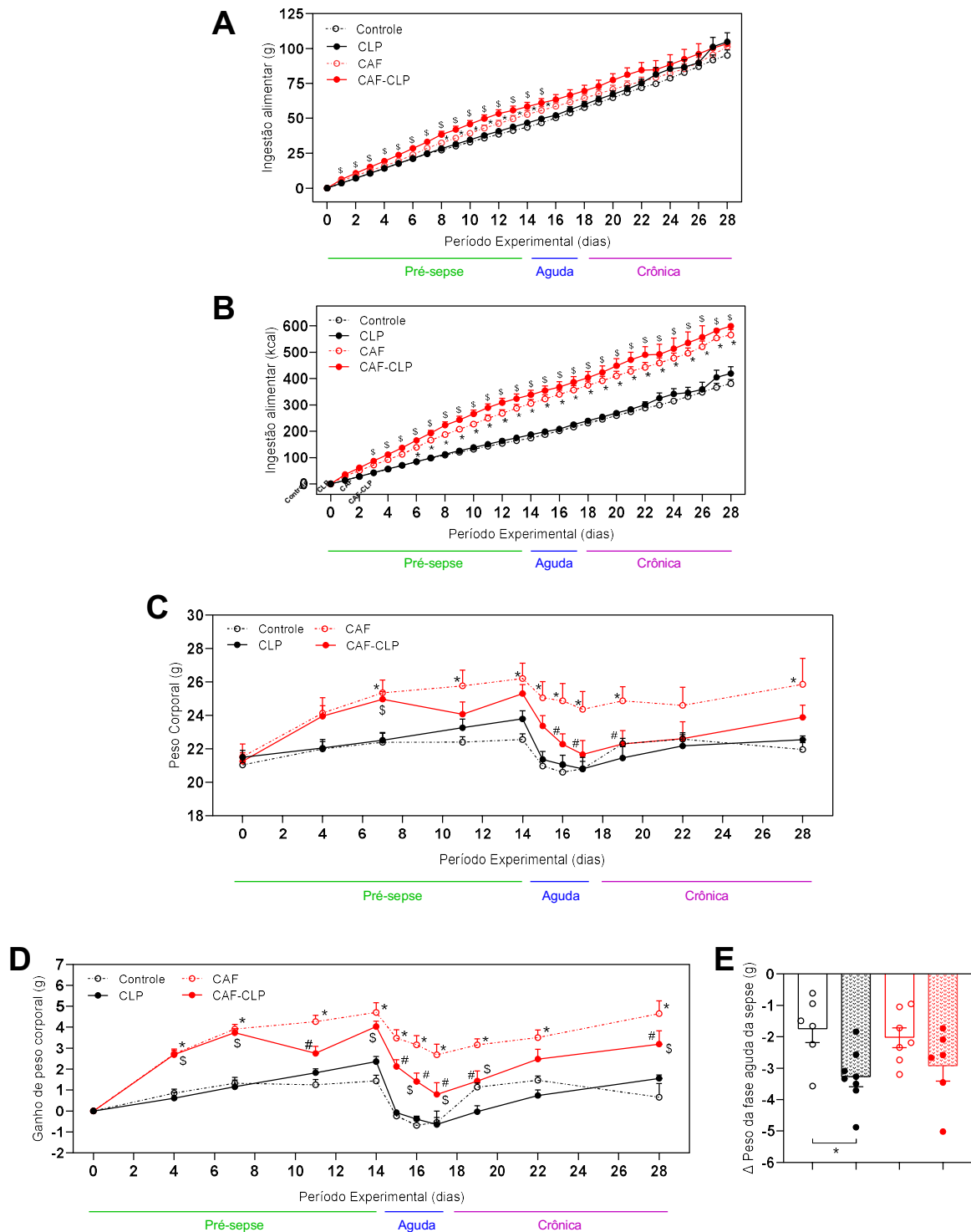


Figura 6: Avaliação do consumo alimentar (n=11-25), em (A) gramas e (B) kcal, (C) peso corporal (n=6-10), (D) ganho de peso corporal (n=6-10) e (E) delta do peso corporal (n=6-8) dos grupos experimentais. Os dados são expressos como média \pm EPM. * p<0,05 em relação ao grupo Controle. # p<0,05 em relação ao grupo CAF; \$ p<0,05 em relação ao grupo CLP (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

A perda de peso corporal, durante a fase aguda da sepse, impactou na adiposidade dos grupos CLP e CAF-CLP ao final do período experimental, uma vez que o índice de adiposidade e a área média dos adipócitos obtidos para os grupos CLP e CAF-CLP foram significativamente menores do que os obtidos, respectivamente, para os grupos controle e CAF. Contudo, o índice de adiposidade e a área média dos adipócitos dos grupos CAF e CAF-CLP foram significativamente maiores que os obtidos para os grupos controle e CLP respectivamente (Figuras 7A, 7B e 7C).

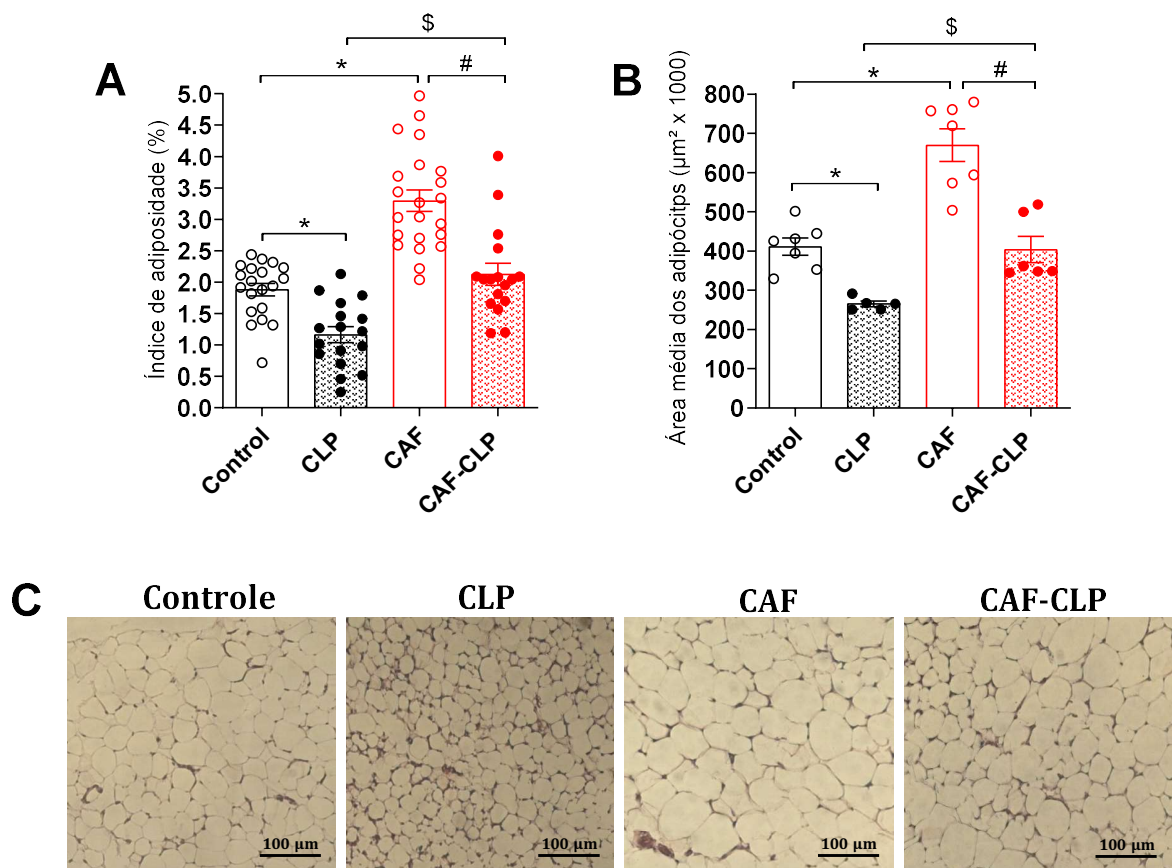


Figura 7: Avaliação do (A) índice de adiposidade (n=17-22) e da (B e C) morfometria dos adipócitos epididimais (n=5-7) dos grupos experimentais. Os dados são expressos como a média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Em relação aos parâmetros bioquímicos, não foi observada diferença significativa na curva glicêmica entre os grupos controle e CLP (Figura 8A). Contudo, considerando os grupos CAF e CAF-CLP, o pico glicêmico do grupo CAF, aos 15

minutos de teste, foi significativamente maior que o do grupo CAF-CLP, não sendo verificadas diferenças na glicemia nos demais tempos da curva (Figura 8B). Quando plotamos as curvas glicêmicas de todos os grupos experimentais em um mesmo gráfico, não verificamos nenhuma diferença significativa no perfil glicêmico entre os grupos, com exceção do grupo CAF-CLP, que apresentou uma redução significativa dos níveis de glicose em relação ao grupo CLP aos 30 minutos de teste (Figura 8C). É importante ressaltar que, apesar dessas diferenças observadas no TTOG, principalmente no que se refere ao grupo CAF-CLP, nenhuma diferença significativa foi verificada nos níveis séricos de glicose (em jejum) entre os grupos experimentais (Figura 8D).

Com relação aos níveis séricos de colesterol total, os grupos CAF e CAF-CLP apresentaram níveis de colesterol total significativamente maiores que os dos grupos controle e CLP respectivamente (Figura 8E). Já considerando os níveis séricos de triglicerídeos, um aumento significativo foi verificado no grupo CLP quando comparado ao grupo controle. Além disso, como esperado, um aumento significativo foi visualizado nos níveis de triglicerídeos do grupo CAF em relação ao grupo controle. No entanto, nenhuma diferença significativa foi observada entre os níveis de triglicerídeos dos grupos CLP e CAF-CLP (Figura 8F).

Quanto aos níveis séricos das adipocinas, não foram observadas diferenças nos níveis de adiponectina e quemerina entre os grupos experimentais (Figuras 8H e 8J). Para os níveis de leptina, por sua vez, foi verificado um aumento significativo nos grupos CAF e CAF-CLP, quando comparados aos grupos controle e CLP, respectivamente. Além disso, os níveis de leptina do grupo CLP se mostraram significativamente aumentados em relação ao grupo controle (Figura 8G). Já em relação aos níveis de resistina, de maneira distinta ao verificado para leptina, o grupo CLP apresentou níveis de resistina significativamente diminuídos comparados aos níveis do grupo controle. Essa diminuição não foi verificada no grupo CAF-CLP, que apresentou níveis de resistina significativamente maiores que os do grupo CLP e semelhantes ao obtido para o grupo CAF (Figura 8I).

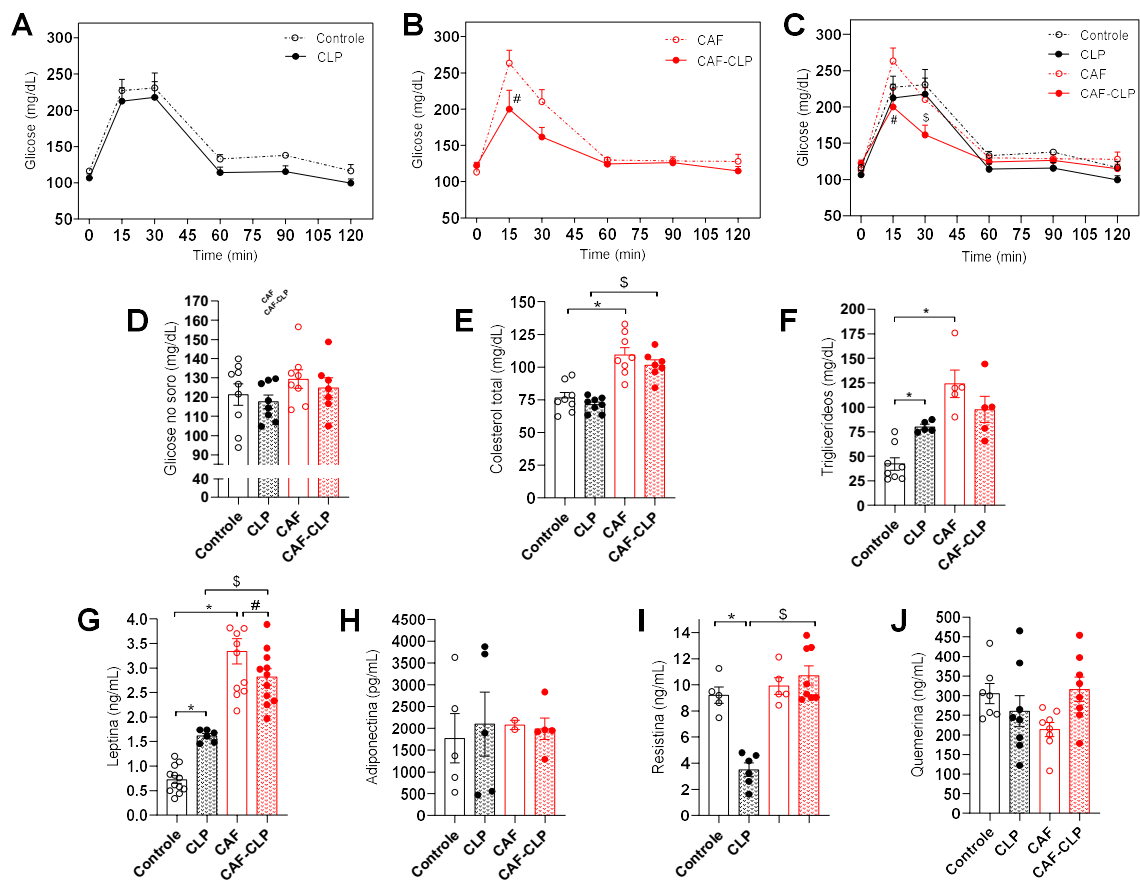


Figura 8: Avaliação do perfil glicêmico e dos parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais. (A), (B) e (C) Curva glicêmica, ao longo do tempo, obtida para um n de 3-7 de cada grupo experimental estudado. **(D), (E) e (F)** Níveis séricos de glicose, colesterol total e triglicerídeos obtidos para um n de 5-9 animais de cada grupo experimental estudado. **(G), (H), (I) e (J)** Níveis séricos das adipocinas (G- leptina; H- adiponectina; I- resistina; J- quemerina) obtidos para um n de 2-12 animais de cada grupo experimental estudado. Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Esses resultados, em conjunto, demonstram que, apesar da perda significativa de peso corporal de ambos os grupos durante a fase aguda da sepse, o grupo CAF-CLP apresentou alterações significativas na adiposidade e metabolismo em relação ao grupo CLP, que incluem o aumento significativo do índice de adiposidade, da área dos adipócitos epididimais, dos níveis de colesterol total e dos níveis de leptina e resistina. Essa diferença entre os grupos se dá possivelmente por um efeito isolado da dieta CAF, uma vez que alterações similares para a maioria desses parâmetros foram observadas no grupo CAF quando comparado ao grupo Controle.

5.3. Caracterização do modelo experimental com base nos parâmetros relacionados à sepse

Como mostrado na Figura 9A, o escore clínico dos grupos CLP e CAF-CLP aumentou significativamente, no 1º dia após a indução da sepse, quando comparados aos grupos controle e CAF, respectivamente. Nos dias 2 e 3 após a indução da sepse, o escore clínico dos grupos CLP e CAF-CLP reduziu consideravelmente de modo que a diferença de escore existente no 1º dia entre os grupos CAF e CAF-CLP, não foi observada no 2º e 3º dia. Apesar da redução verificada, o escore clínico do grupo CLP permaneceu aumentado em relação ao grupo controle até o 3º dia após a indução da sepse.

É válido mencionar que os grupos controle e CAF, apesar de não serem submetidos à indução da sepse, apresentaram escores clínicos diferentes de 0 no 1º dia do período experimental considerado. Além disso, o escore clínico do grupo CAF permaneceu diferente de 0 nos demais tempos em que o escore também foi mensurado. Essa atribuição de valores diferentes de 0 ao escore clínico dos grupos Controle e CAF não se deve à ocorrência de infecção pós-cirúrgica, mas aos critérios utilizados por cada observador (como o escore foi feito às cegas, o observador pode, por exemplo, ter identificado uma alteração do pêlo, causada pela dieta, como piloereção) e/ou ao fato de os animais desses grupos apresentarem respostas inflamatórias sistêmicas ao estresse cirúrgico que foram submetidos, que envolve a laparotomia ventral e exposição do ceco.

A similaridade da gravidade da sepse verificada entre os grupos CLP e CAF-CLP, através da avaliação da morbidade pelo escore clínico, corrobora os achados obtidos na análise da sobrevivência, em que os grupos apresentaram percentuais de sobrevivência semelhantes (CLP: 60,87%; CAF-CLP: 63,04%), com a mortalidade ocorrendo majoritariamente entre o 1º e 3º dia após a indução da sepse. Como esperado, os percentuais de sobrevivência dos grupos CLP e CAF-CLP foram significativamente menores que os obtidos para os grupos controle e CAF, que apresentaram 100% de sobrevivência (Figura 9B).

Assim como verificado para escore clínico e análise de sobrevivência, os resultados obtidos, através da contagem total de leucócitos, não mostraram diferença significativa entre os grupos CLP e CAF-CLP. Contudo, ambos os grupos

apresentaram um aumento significativo do número total de leucócitos, quando comparados aos grupos controle e CAF, respectivamente (Figura 9C). Essa leucocitose nos grupos CLP e CAF-CLP, por sua vez, foi associada a um aumento da quantidade de neutrófilos, uma vez que, somente para esse tipo celular, foi observado um resultado semelhante ao encontrado para a contagem total de leucócitos (Figura 9D).

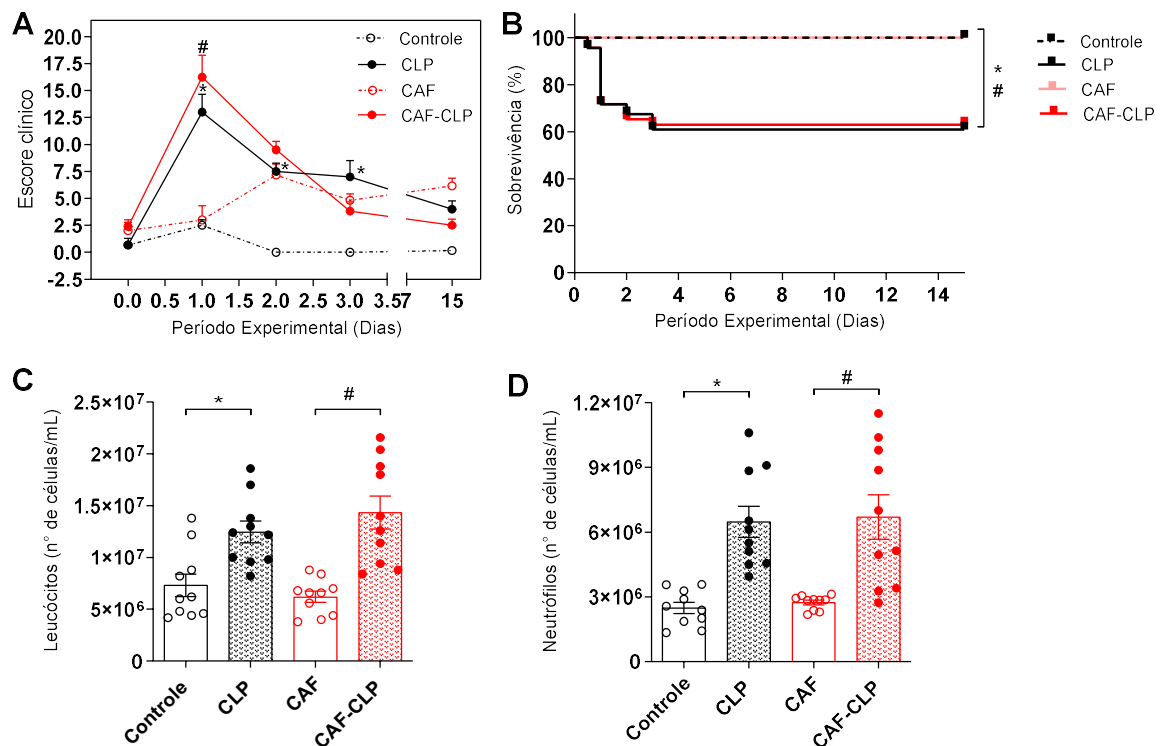


Figura 9: Avaliação da morbimortalidade à sepse e do número de células totais e neutrófilos na circulação periférica dos grupos experimentais. (A) Escore clínico obtido para um n de 3-5 animais de cada grupo experimental estudado. **(B)** Curva comparativa do percentual de sobrevivência obtido para um n de 33-46 animais de cada grupo ao longo do período experimental considerado. **(C)** Número de células totais ou de **(D)** neutrófilos por mL de sangue obtido para um n de 10 diferentes animais de cada grupo experimental estudado. Os dados são expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF (A, C e D: *Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*; B: teste log-rank (teste χ^2)).

5.4. Avaliação das respostas hemodinâmicas e cardíacas

Como mostrado na Figura S1 do Apêndice A, não houve diferença significativa na pressão arterial sistólica (PAS) entre os grupos experimentais ao longo das semanas de estudo.

Já em relação as características estruturais dos corações dos animais, os resultados mostraram que a indução da sepse levou à uma redução significativa do peso cardíaco do grupo CLP quando comparado ao grupo controle (Figura 10). No entanto, essa redução não foi verificada para o peso cardíaco do grupo CAF-CLP, que, apesar da indução da sepse, permaneceu similar ao peso cardíaco do grupo CAF. Além disso, por influência da dieta, os pesos dos corações dos grupos CAF e CAF-CLP foram significativamente maiores que os pesos dos corações dos grupos controle e CLP, respectivamente.

Uma vez que foi verificado um aumento do peso dos corações nos grupos que receberam dieta CAF, o que pode ser indicativo da ocorrência de remodelamento hipertrófico cardíaco, nós decidimos avaliar como estaria a deposição de matriz extracelular no interstício dos corações dos animais. Os resultados obtidos com a marcação com Picrossirius Red não mostraram diferença significativa na deposição de colágeno no tecido cardíaco entre os grupos experimentais (Figura 10B e 10C). Logo, o aumento de peso dos corações nos animais dos grupos que receberam dieta CAF não estaria associado ao aumento na deposição de matriz extracelular.

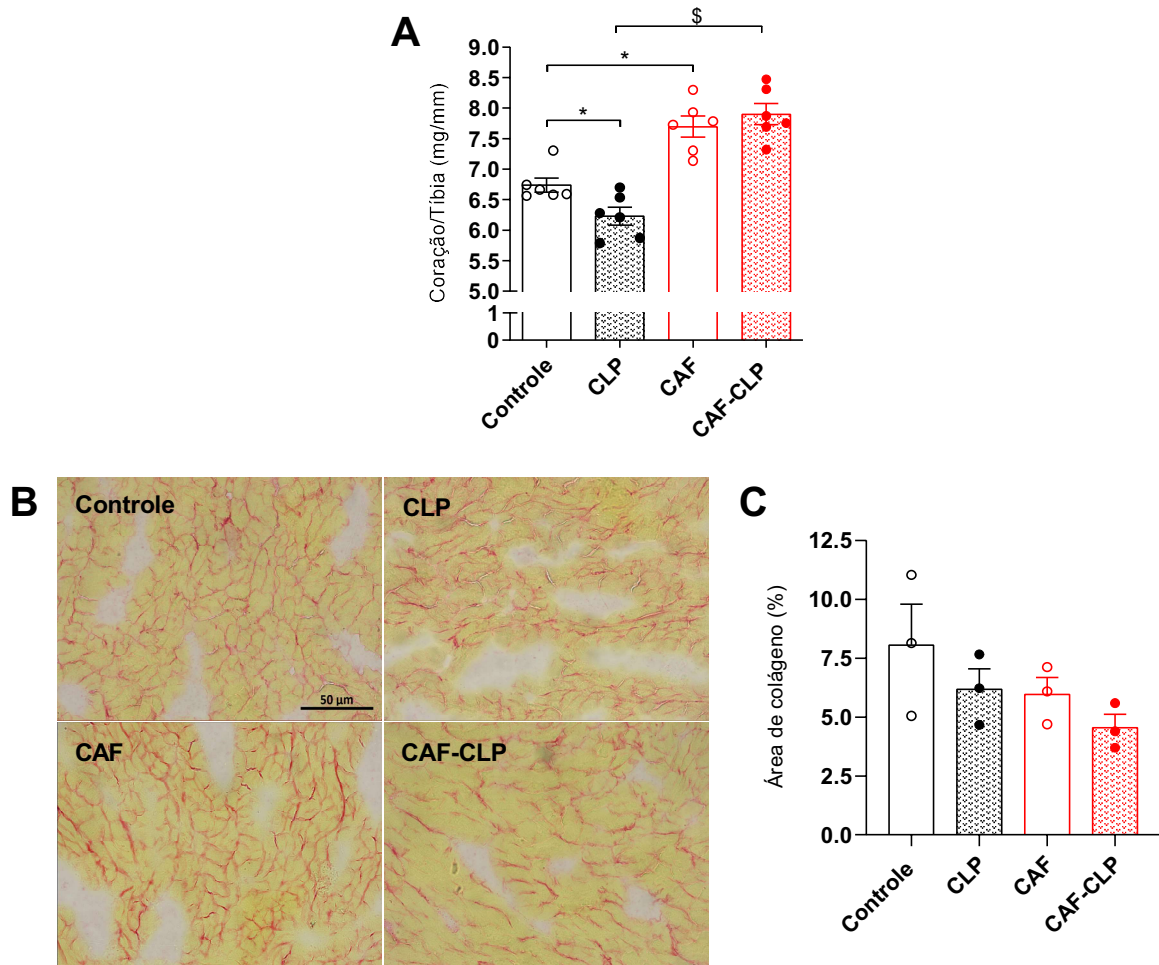


Figura 10: Avaliação do peso e da deposição intersticial de colágeno cardíacos dos grupos experimentais. (A) Peso do coração corrigido pelo comprimento da tíbia obtida para um n de 5-6 animais de cada grupo experimental estudado. **(B)** Imagens representativas do tecido cardíaco dos grupos experimentais obtidas no aumento 40x, evidenciando as fibras colágeno que aparecem marcadas em vermelho. **(C)** Área percentual de deposição de colágeno obtida para um n de 3 animais de cada grupo experimental estudado. Os valores representam a média \pm EPM. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (A e C: *Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Além dessas características estruturais cardíacas, avaliamos também a atividade elétrica dos corações dos animais, uma vez que ela é a responsável por coordenar a contração e o relaxamento em cada ciclo cardíaco. Como visualizado nas figuras 11C, 11D e 11E, os resultados obtidos no eletrocardiograma demonstraram que o grupo CLP apresentou uma diminuição significativa na duração de todo o ciclo cardíaco, representado pelo complexo QRS e pelos intervalos PR e QT_c , em relação ao grupo controle, sendo observada também uma tendência de aumento da

frequência cardíaca ($p=0.0556$). Essa redução do ciclo cardíaco, no entanto, não foi verificada no grupo CAF-CLP, que, a propósito, apresentou uma duração do intervalo PR significativamente maior que o grupo CAF, sem alterações observadas entre os grupos na duração do complexo QRS e intervalo QT_c . Quando comparamos, por sua vez, os grupos CLP e CAF-CLP, observamos que, apesar de não apresentarem diferença na duração do complexo QRS, os intervalos PR e QT_c são significativamente aumentados no grupo CAF-CLP quando comparado ao CLP. Em relação a um efeito isolado da dieta, podemos perceber que a dieta CAF levou a uma redução do intervalo PR e do complexo QRS no grupo CAF quando comparado ao grupo controle, sem nenhuma alteração observada no intervalo QT_c . Além disso, os grupos CAF e CAF-CLP apresentaram uma frequência cardíaca significativamente menor que a dos grupos controle e CLP, respectivamente (Figura 11B).

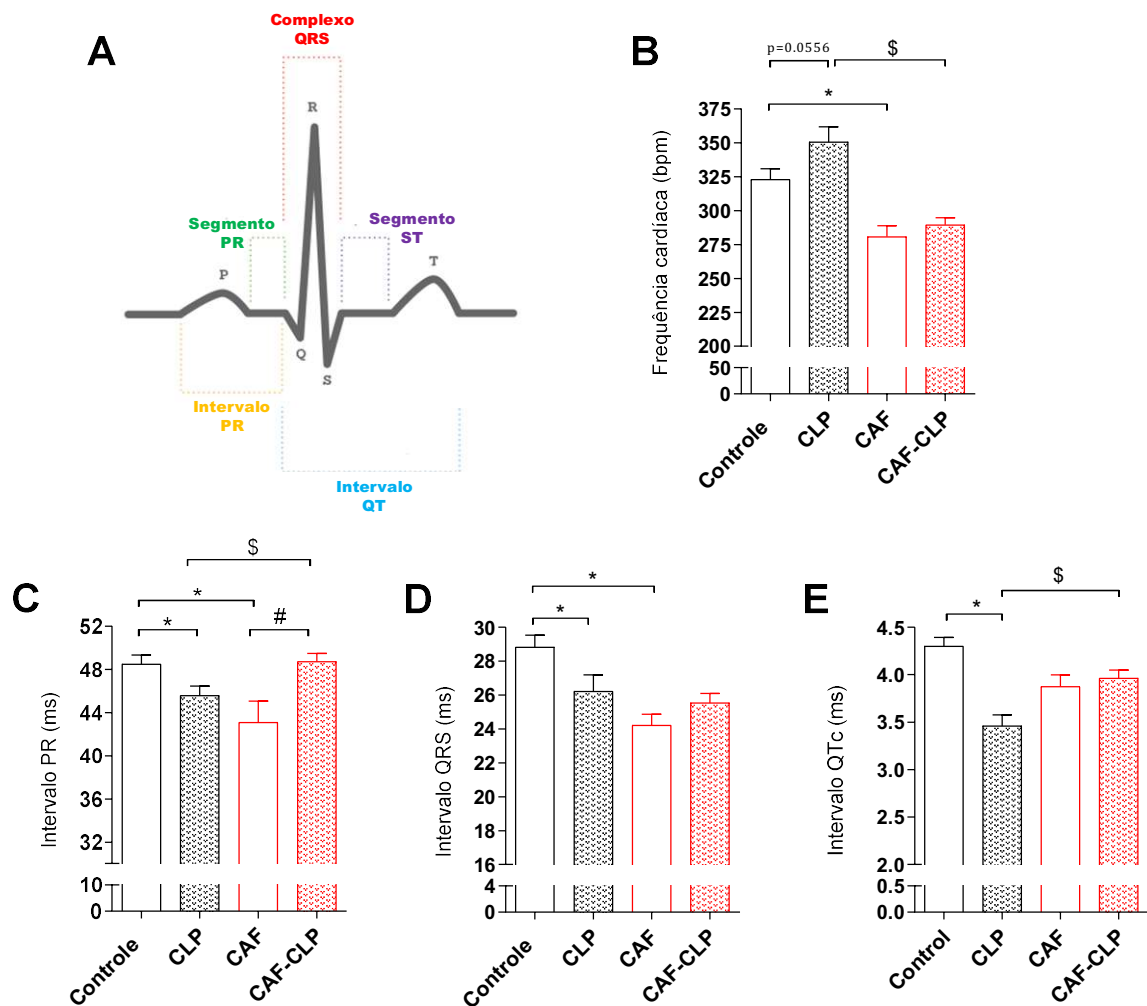


Figura 11: Avaliação da atividade elétrica cardíaca dos grupos experimentais. (A) Representação esquemática do ciclo cardíaco visualizado no eletrocardiograma (Adaptado de <https://www.alivecor.com/education/ecg.html>). (B) Frequência cardíaca e duração dos intervalos (C) PR, (D) QRS e (E) QT_c obtidos para um n de 4-7 animais de cada grupo experimental estudado. Os valores representam a média ± EPM. * p<0,05 em relação ao grupo Controle; # p<0,05 em relação ao grupo CAF; \$ p<0,05 em relação ao grupo CLP (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Uma vez que verificamos diferenças na atividade elétrica cardíaca entre os grupos experimentais, decidimos avaliar como estaria a função do coração isolado através da técnica de Langendorff. Nossos resultados demonstraram que a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) do grupo CAF-CLP foi significativamente maior que a obtida para o grupo CLP, não sendo verificada, no entanto, diferença significativa na PDVE nas comparações feitas entre os demais grupos (controle e CLP; CAF e CAF-CLP e controle e CAF) (Figura 12A). Em concordância com esse achado, a razão da derivada da pressão pela derivada do

tempo (dp/dt) máxima (dp/dt_{max}) e mínima (dp/dt_{min}) se mostraram significativamente maiores no grupo CAF-CLP quando comparado ao grupo CLP, não sendo observadas também diferenças significativas na dp/dt_{max} e dp/dt_{min} entre os demais grupos (Controle e CLP; CAF e CAF-CLP; e Controle e CAF) (Figuras 12B e 12C). Diante disso, é possível afirmar que a obesidade induzida por dieta CAF aumentou significativamente as atividades inotrópicas e lusitrópicas basais dos corações dos animais sobreviventes à sepse.

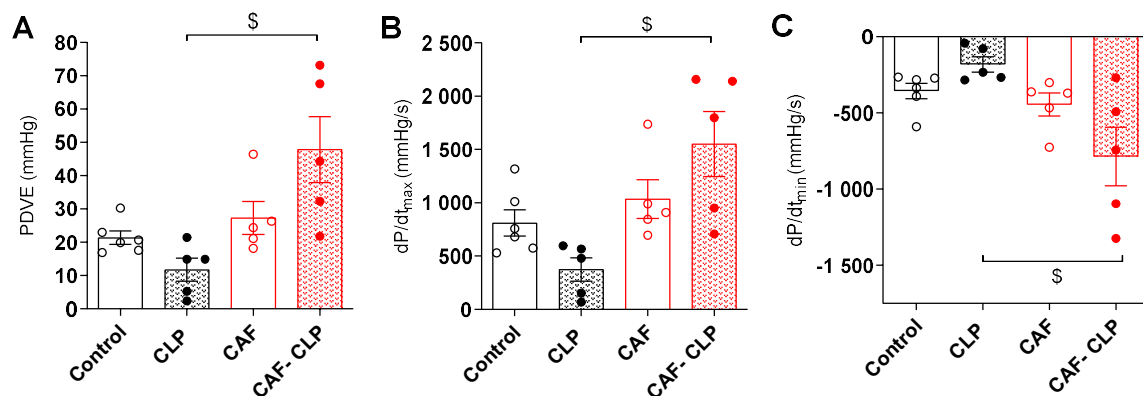


Figura 12: Avaliação da (A) pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE), (B) derivada da pressão pela derivada do tempo máxima (dp/dt_{max}) e (C) mínima (dp/dt_{min}) dos grupos experimentais. Cada barra representa a média \pm EPM dos valores obtida para n de 5-6 animais de cada grupo estudado. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Tendo em vista as diferenças na função contrátil basal do ventrículo esquerdo verificadas entre os grupos experimentais, decidimos avaliar se a dinâmica de comportamento dos parâmetros de função ventricular (PDVE, dp/dt_{max} e dp/dt_{min}) permaneceria a mesma quando os corações fossem submetidos a um estresse farmacológico com isoprenalina, que é um agonista β não seletivo. De maneira interessante, os resultados demonstraram que, diferentemente do encontrado para a função contrátil basal, diante de um estresse farmacológico, a porcentagem de mudança da PDVE, dp/dt_{max} e dp/dt_{min} foi significativamente maior no grupo CLP em comparação ao grupo CAF-CLP (Figuras 13A, 13C e 13E). Esse achado pode ser melhor visualizado nos gráficos de E_{max} de contração da isoprenalina - também representado em porcentagem de mudança - em que os valores para o grupo CLP mostram um aumento significativo em relação aos obtidos para o grupo CAF-CLP (Figuras 13B, 13D e 13F). É válido salientar que também foi verificado um aumento

significativo da PDVE e da dp/dt_{\max} do grupo CLP quando comparado ao grupo controle, não sendo observada diferença significativa entre os grupos na dp/dt_{\min} . Já nas comparações feitas entre os grupos controle e CAF e os grupos CAF e CAF-CLP, não foram observadas diferenças significativas nos valores de E_{\max} para os 3 parâmetros de função ventricular.

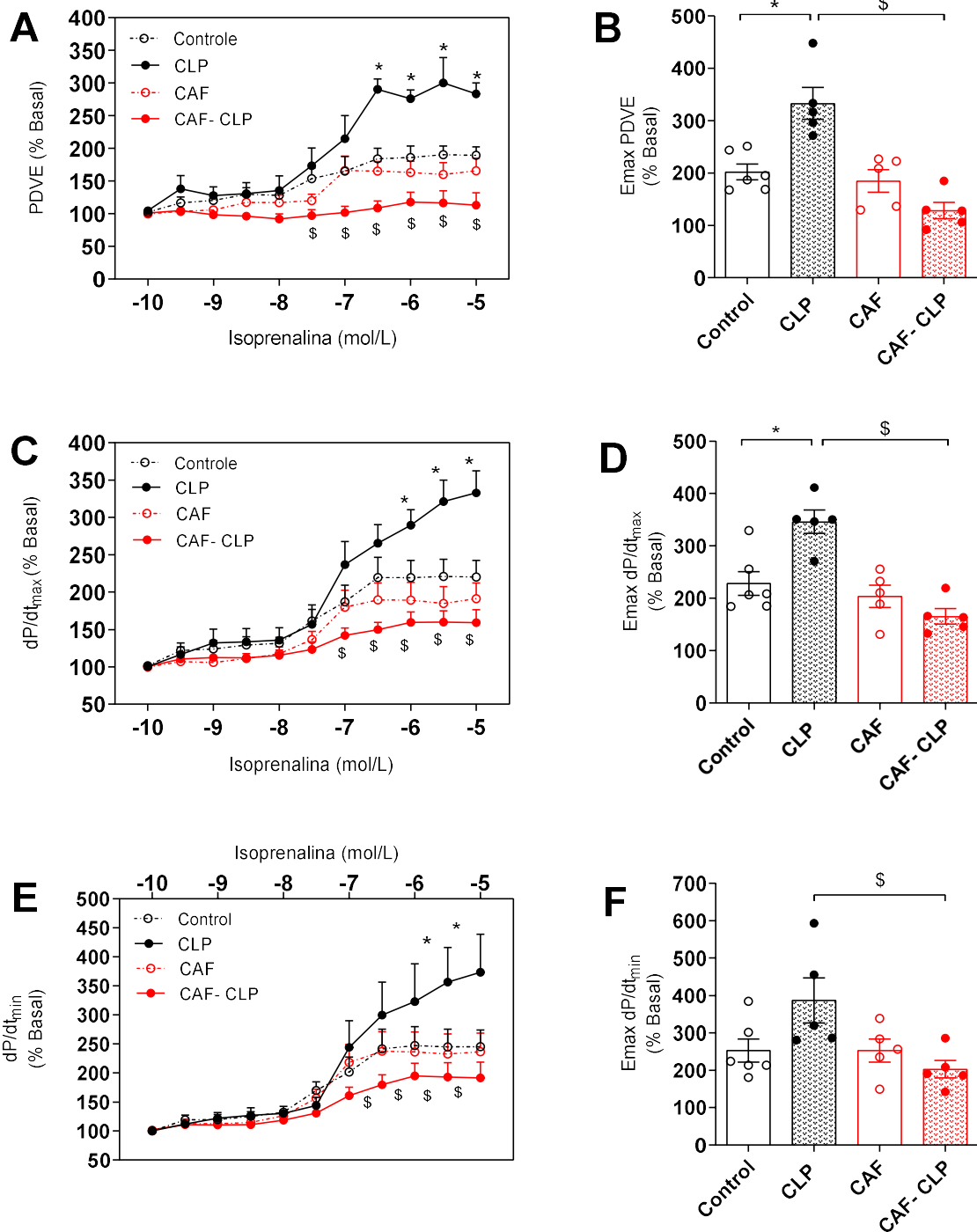


Figura 13. (A), (C) e (E) Dinâmica de variação da PDVE, dp/dt_{min} e dp/dt_{max} frente à estimulo com Isoprenalina. (B), (D) e (F) Valores de E_{max} da Isoprenalina sobre a PDVE, dp/dt_{min} e dp/dt_{max} . Os valores representam a média \pm EPM obtida para um n de 5 diferentes animais de cada grupo estudado. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

Considerando que foram verificadas diferenças significativas na função do coração isolado entre os grupos experimentais, buscamos, então, investigar se essas diferenças também seriam observadas, em nível celular, ou seja, na função dos cardiomiócitos. De acordo com os nossos resultados, o tempo de contração dos cardiomiócitos diminuiu significativamente nos grupos CLP e CAF-CLP quando comparados aos grupos controle e CAF, respectivamente (Figura 14A). O tempo de relaxamento, por sua vez, apresentou uma redução significativa somente no grupo CLP quando comparado ao grupo controle, não sendo observada diferença significativa no tempo de relaxamento entre os demais grupos (Figura 14B). Esse resultado acabou se refletindo no tempo total de contração-relaxamento celular, para o qual foi verificada somente uma redução significativa no grupo CLP em relação ao grupo controle (Figura 14C).

Baseado nos achados anteriores e considerando que a velocidade é uma razão da distância percorrida pelo tempo, era esperado que a velocidade de contração estaria aumentada nos grupos CLP e CAF-CLP (quando comparados aos grupos controle e CAF, respectivamente) e a velocidade de relaxamento estaria aumentada somente no grupo CLP (quando comparado ao grupo controle). Entretanto, os resultados demonstraram que o grupo CLP apresentou uma redução significativa da velocidade de contração em relação ao grupo Controle (Figuras 14D, 15A e 15B). Além disso, tanto a velocidade de contração quanto a de relaxamento foram significativamente maiores no grupo CAF-CLP quando comparado aos grupos CLP e CAF (Figuras 14D,14E, 15A e 15B).

Portanto, se os cardiomiócitos do grupo CAF-CLP apresentam o mesmo tempo para contrair, porém com uma velocidade maior, em relação aos cardiomiócitos do grupo CLP, supõe que a fração de encurtamento seja maior no grupo CAF-CLP comparado ao grupo CLP. Em concordância com este fato, os resultados, visualizados na Figura 14F, demonstraram que a fração de encurtamento foi significativamente maior no grupo CAF-CLP comparado ao grupo CLP. Ademais, o grupo CLP apresentou uma redução significativa na fração de encurtamento comparado ao grupo controle.

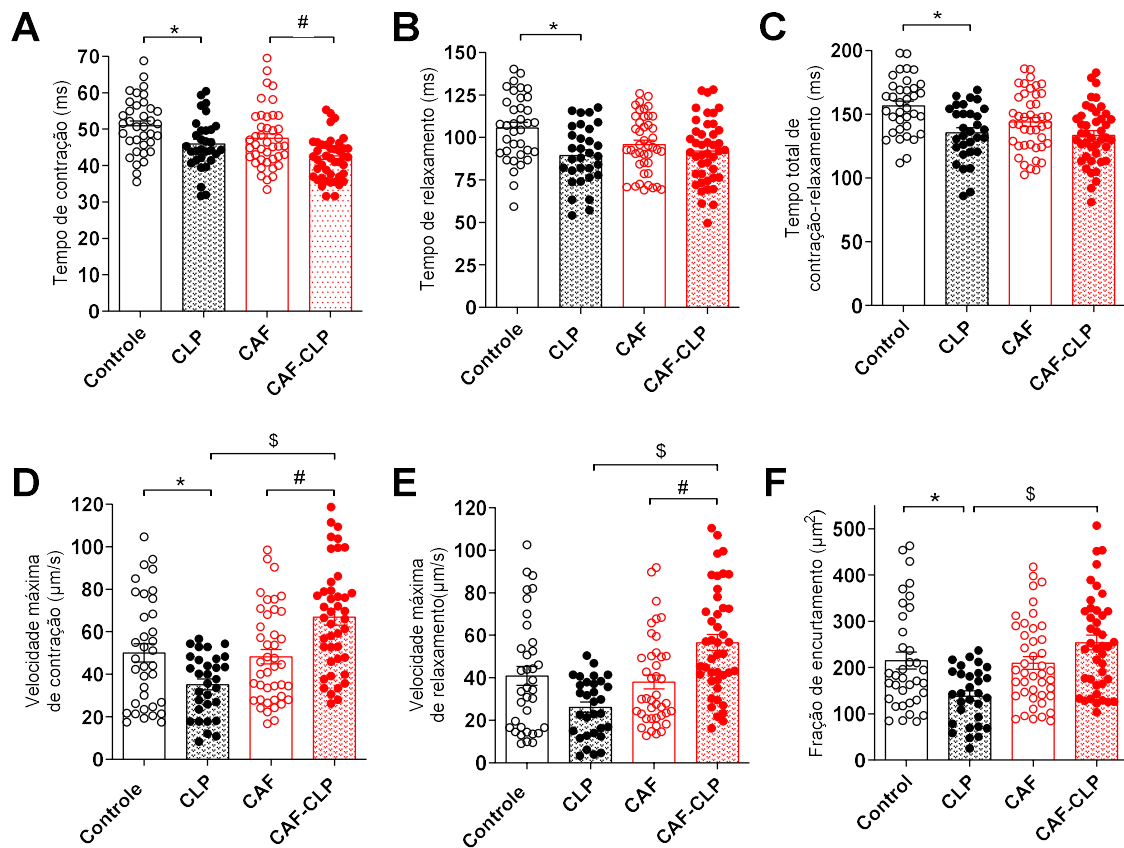
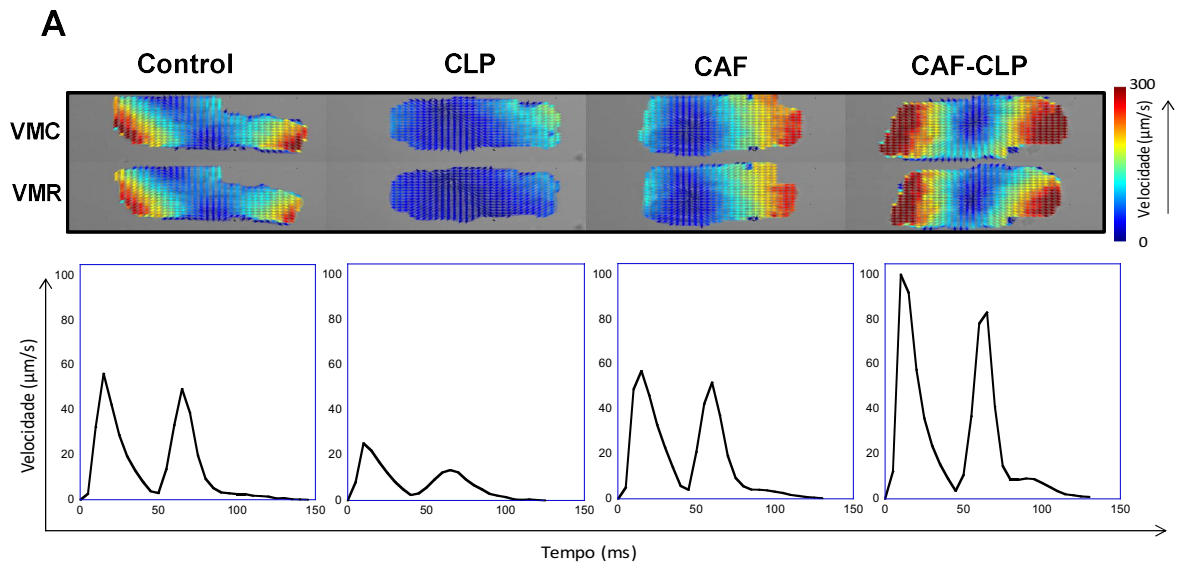


Figura 14: Avaliação do (A-C) tempo e (D-E) velocidade de contração e/ou relaxamento e da (F) fração de encurtamento dos cardiomiócitos dos grupos experimentais. Cada barra representa a média \pm EPM dos valores de tempo, velocidade e fração de encurtamento obtida n de 3 animais de cada grupo experimental estudado. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).



B

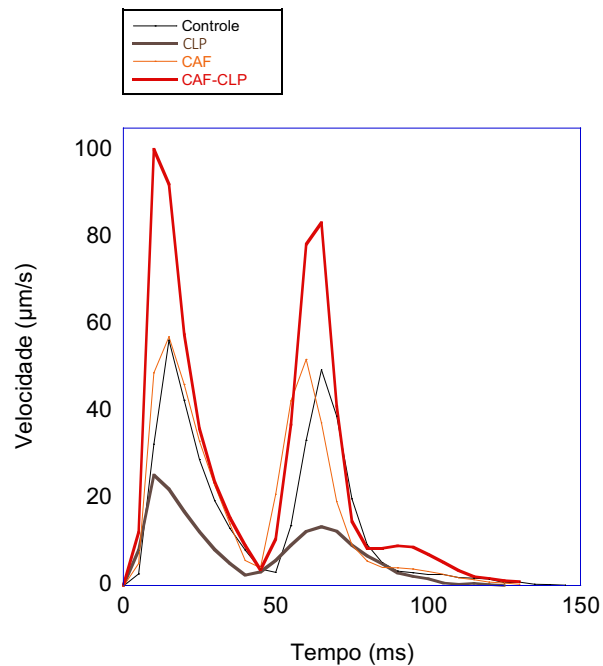


Figura 15. Representação vetorial e gráfica do perfil de contratilidade dos cardiomiócitos dos grupos experimentais. (A) Representação vetorial da velocidade espacial celular em relação à velocidade máxima de contração (VMC) e velocidade máxima de relaxamento (VMR); e dinâmica da contratilidade dos cardiomiócitos mediante um ciclo de contração-relaxamento. **(B)** Sobreposição dos resultados encontrados para a dinâmica de contratilidade dos cardiomiócitos, durante um ciclo de contração-relaxamento, de todos os grupos experimentais.

5.5. Avaliação das respostas vasculares

Uma vez que alterações nas respostas cardíacas foram verificadas entre os grupos experimentais, decidimos investigar se as respostas vasculares também

estariam alteradas. Inicialmente, avaliamos o relaxamento induzido pela ACh, que desencadeia a vasodilatação por meio da interação com o receptor muscarínico M3 presente na membrana das células endoteliais. Como mostrado na Figura 16A, as respostas de relaxamento a ACh foram similares para as aortas dos grupos controle e CLP, não sendo, portanto, verificada diferença significativa nos valores de potência e de E_{max} da ACh entre os grupos (Figuras 16D e 16E). Um resultado semelhante também foi obtido para os grupos CAF e CAF-CLP, entre os quais os valores de potência e de E_{max} da ACh também não apresentaram diferença significativa (Figuras 16D e 16E). Quando, então, plotamos as curvas cumulativas concentração-resposta para ACh em um mesmo gráfico, não observamos diferença significativa no relaxamento induzido por esse vasodilatador entre os grupos experimentais (Figura 16C).

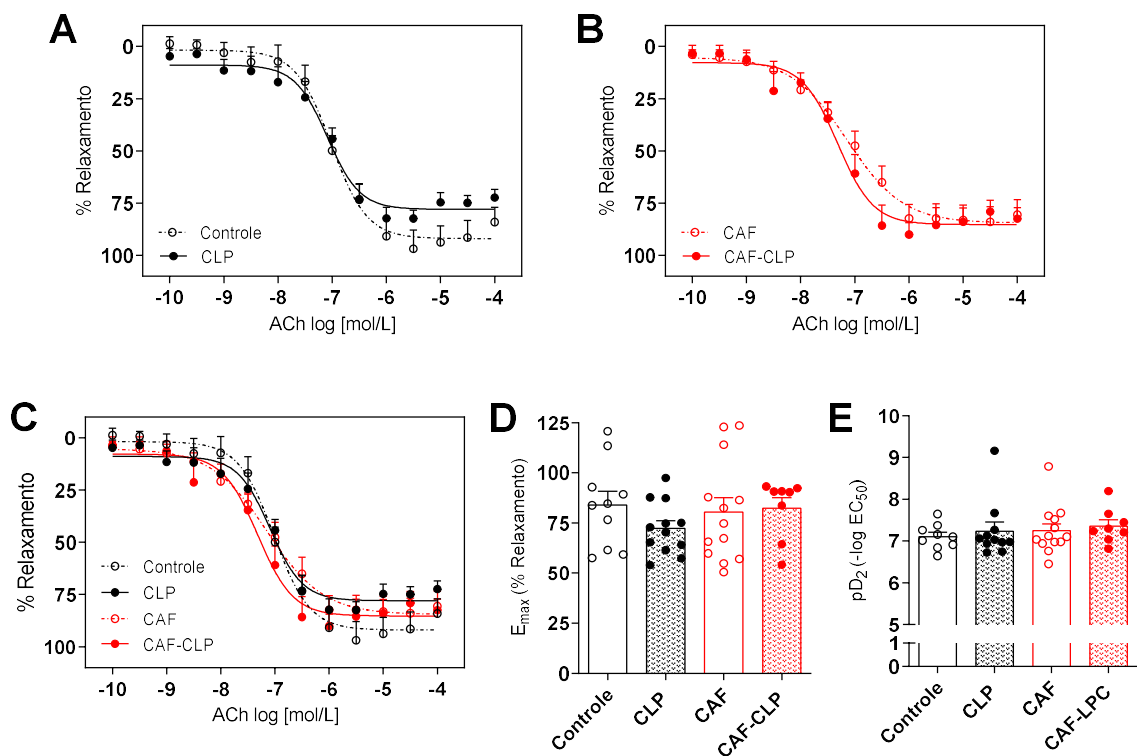


Figura 16: Relaxamento vascular induzido por ACh em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido por ACh para os grupos submetidos à **(A)** dieta padrão e à **(B)** dieta CAF. **(C)** Sobreposição dos resultados encontrados para os todos os grupos experimentais. **(D)** e **(E)** Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da ACh obtida para um n de 8-13 preparações independentes.

Visto que não foram observadas alterações nas respostas de relaxamento a ACh entre os grupos experimentais, decidimos avaliar como estariam as respostas contráteis. Para isso, realizamos curvas cumulativas concentração-resposta para PE, que é um agonista α 1-adrenérgico. Os resultados obtidos mostraram que a contração vascular induzida pela PE foi similar entre os grupos controle e CLP, não sendo verificada diferença significativa nos valores de potência e de E_{max} entre os grupos (Figuras 17A e 17D). Já, em relação aos grupos CAF e CAF-CLP, verificamos uma redução significativa do E_{max} de contração da PE no grupo CAF-CLP quando comparado ao grupo CAF (Figuras 17B e 17D). Quando, por sua vez, plotamos as curvas cumulativas concentração-resposta para PE de todos os grupos em um mesmo gráfico, observamos uma diminuição significativa do E_{max} de contração para PE nos grupos CAF e CAF-CLP quando comparados aos grupos controle e CLP, respectivamente (Figuras 17C e 17D), sugerindo. Esse achado sugere que a dieta CAF, isoladamente, provoca hiporreatividade vascular à PE e essa hiporreatividade parece ser acentuada no grupo CAF-CLP, uma vez que o valor de E_{max} da PE nesse grupo foi significativamente menor que os valores de E_{max} em todos os demais grupos (Figuras 17D). Além disso, a potência da PE no grupo CAF-CLP foi significativamente reduzida quando comparada a do grupo CLP, o que não foi verificado na comparação entre os grupos controle e CAF (Figura 17E).

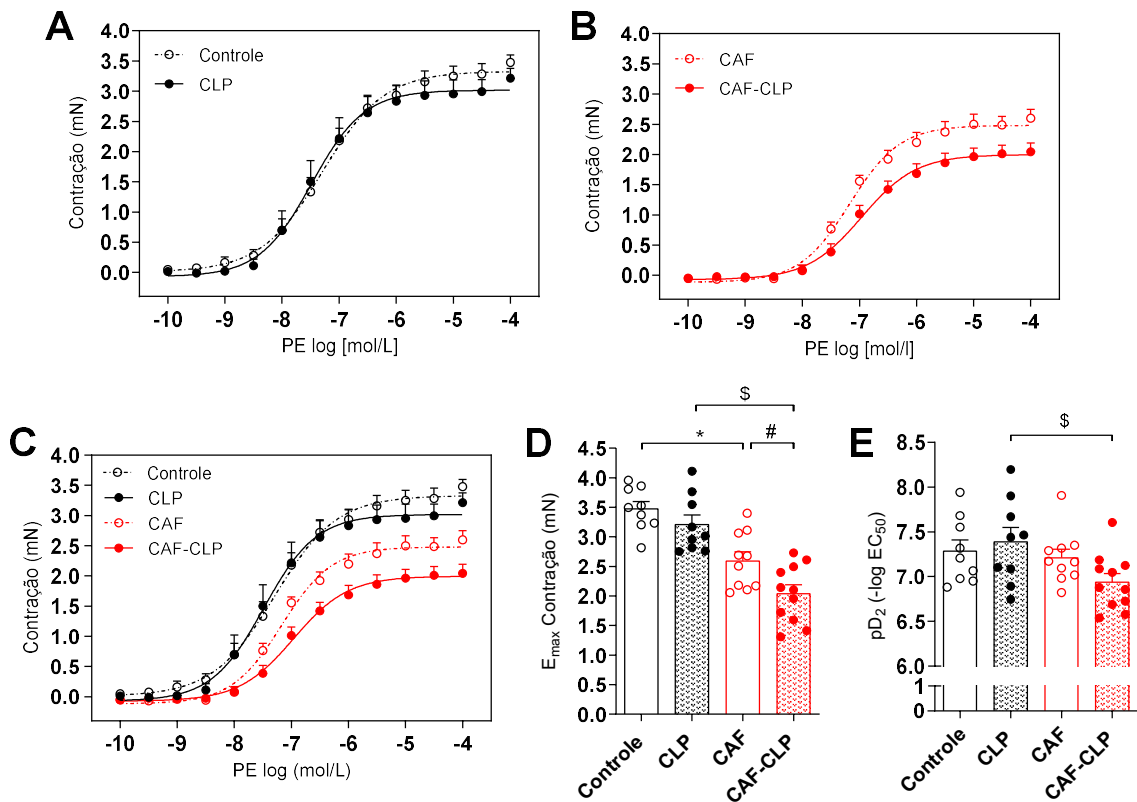


Figura 17. Contração vascular induzida por PE em anéis de aortas com endotélio dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos submetidos à **(A)** dieta padrão e à **(B)** dieta CAF. **(C)** Sobreposição dos resultados encontrados para os todos os grupos experimentais. **(D)** e **(E)** Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 9-11 preparações independentes. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

A fim de entender, então, a hiporreatividade vascular à PE nos animais obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse, nós realizamos o estudo dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos nessa resposta. Considerando que o nosso objetivo, nesta etapa, foi avaliar e comparar os mecanismos que medeiam as respostas vasculares nos animais sobreviventes à sepse, decidimos apresentar, no texto principal, somente os resultados obtidos para os grupos CLP e CAF-CLP. Os resultados referentes aos grupos controle e CAF podem ser encontrados no material suplementar, que se encontra no Apêndice B do presente trabalho.

5.5.1. Investigação dos mecanismos envolvidos nas respostas vasculares

5.5.1.1. Investigação do envolvimento do endotélio vascular

Dado que a camada endotelial é importante no controle do tônus vascular, em condições fisiológicas e fisiopatológicas, buscamos, inicialmente, avaliar se o endotélio estaria influenciando na hiporreatividade vascular à PE em aortas de camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse. Os resultados mostraram que em ambos os grupos, CLP e CAF-CLP, a retirada do endotélio aumentou significativamente tanto os valores E_{max} da PE, quanto os valores de potência desse vasoconstritor (Figuras 18A,B,D e E). Contudo, esse aumento foi proporcionalmente maior no grupo CAF-CLP, de modo que, nas aortas sem endotélio, os valores de E_{max} e potência da PE do grupo CAF-CLP foram restabelecidos ao nível dos obtidos para o grupo CLP (Figura 18C, D e E). Sendo assim, é possível concluir que o endotélio está essencialmente envolvido na hiporresponsividade aórtica observada no grupo CAF-CLP, uma vez que, na ausência da camada endotelial, essa resposta vascular foi completamente revertida.

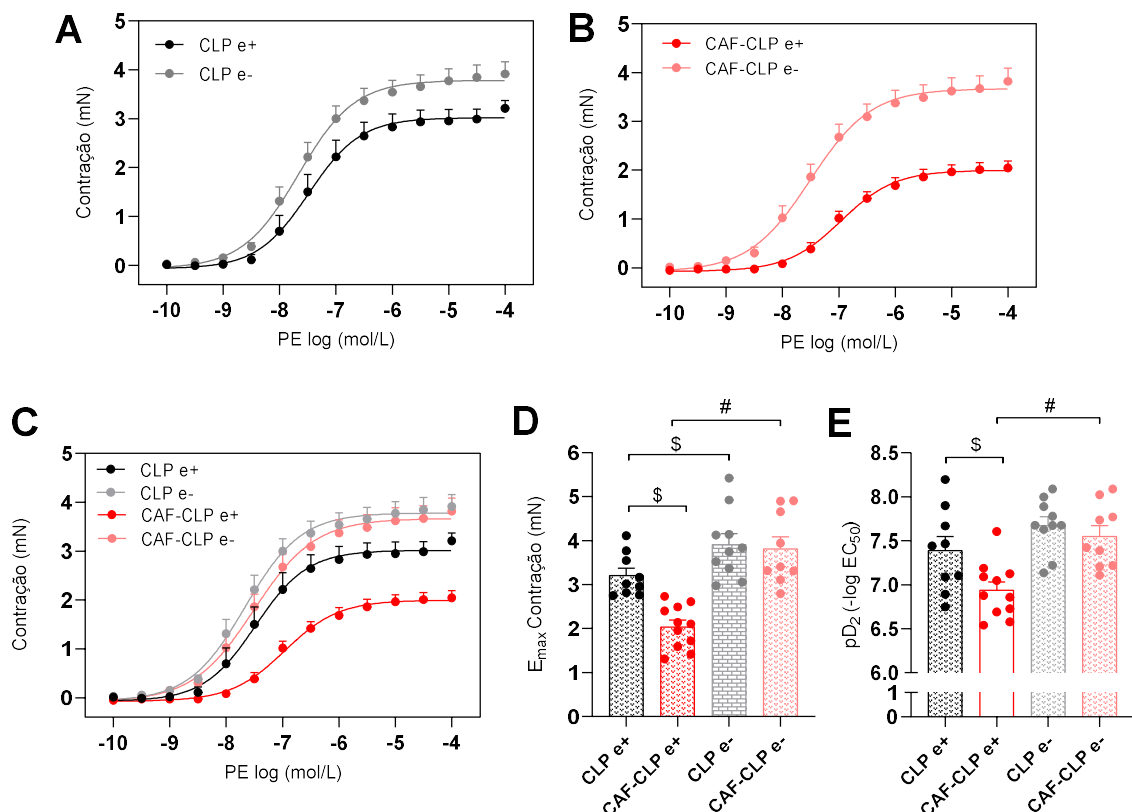


Figura 18. Efeito da remoção da camada endotelial na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas com e sem endotélio. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência

do endotélio. **(D)** e **(E)** Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 9-11 preparações independentes. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF-CLP e+; \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP e+ (*Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

5.5.1.2. Investigação do envolvimento da Óxido Nítrico Sintase (NOS)

Visto que o endotélio está envolvido na hiporreatividade vascular a PE em camundongos obesos alimentados com dieta CAF e sobreviventes à sepse, o próximo passo da nossa investigação foi avaliar quais seriam os mediadores vasodilatadores produzidos pelo endotélio que estariam envolvidos nessa resposta observada. Em vasos de condutância, como a aorta, o NO, que é produzido, sobretudo, pelo endotélio, se destaca como o principal mediador vasorelaxante. Logo, investigamos se a enzima produtora do NO, a NOS, estaria envolvida na hiporreatividade vasculara PE observada no grupo CAF-CLP. Os resultados mostraram que a incubação prévia com L-NAME aumentou significativamente os valores de E_{max} e de potência da PE de ambos os grupos, CLP e CAF-CLP (Figuras 19A,B,D e E). No entanto, esse aumento foi proporcionalmente maior no grupo CAF-CLP, principalmente no que se refere ao valor de E_{max} da PE (Figura 19A,B e D). Logo, quando plotamos as curvas cumulativas concentração-resposta para PE de ambos os grupos, é possível verificar que a incubação prévia com L-NAME reverteu completamente a redução do E_{max} de contração da PE observada no grupo CAF-CLP (Figura 19C e D). Porém, a diferença significativa no valor de potência da PE em relação ao grupo CLP se manteve apesar da incubação com L-NAME (Figura 19E). Sendo assim, é possível inferir que a atividade da NOS está parcialmente envolvida na hiporreatividade vascular a PE observada no grupo CAF-CLP.

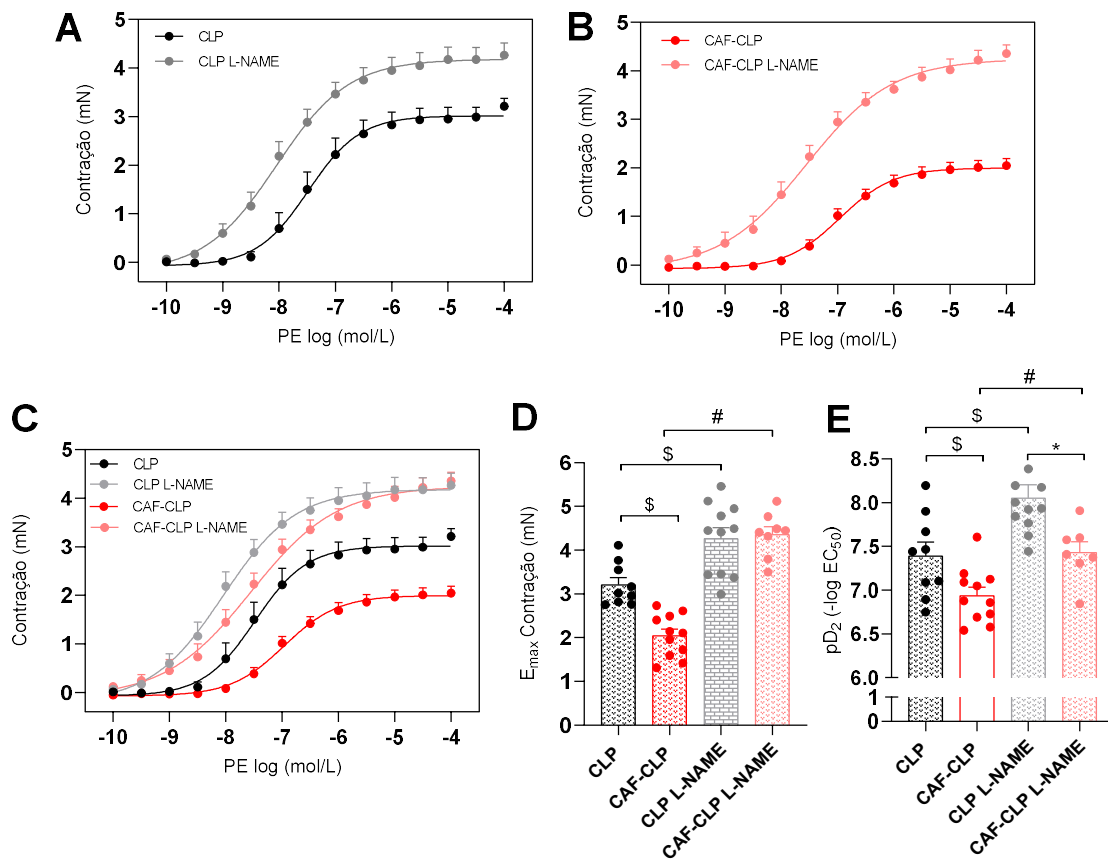


Figura 19. Efeito da inibição não-seletiva da enzima NOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com L-NAME. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de L-NAME. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 7-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF-CLP; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP L-NAME (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Considerando a participação parcial da NOS na diminuição da contração a PE em animais do grupo CAF-CLP, decidimos investigar quais isoformas dessa enzima estariam envolvidas na resposta vascular observada. Primeiramente, avaliamos o envolvimento da isoforma induzida da NOS (iNOS) na hiporreatividade vascular à PE observada no grupo CAF-CLP. De acordo com os nossos resultados, a incubação com 1400W não modificou o perfil de contração vascular da PE nos grupos CLP e CAF-CLP (Figuras 20A e B). Logo, a diferença significativa de E_{max} da PE existente entre eles permaneceu após a inibição da iNOS, não sendo verificadas também alterações nos valores de potência desse vasoconstritor (Figuras 20C, D e E). Diante

disso, é possível concluir que a atividade da iNOS não está envolvida na hiporresponsividade vascular a PE verificada no grupo CAF-CLP.

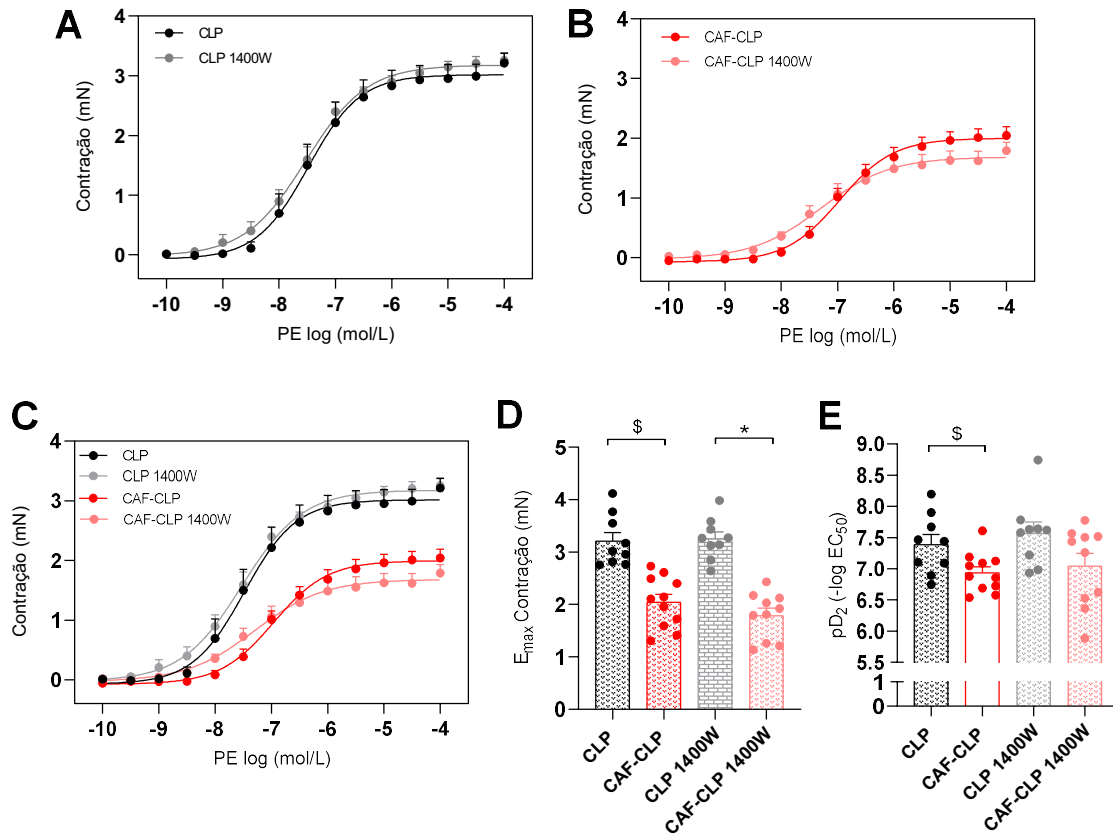


Figura 20: Efeito da inibição seletiva da iNOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com 1400W. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de 1400W. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 9-10 preparações independentes. \$ p<0,05 em relação ao grupo CLP; * p<0,05 em relação ao grupo CLP 1400W (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Com intuito de confirmar os resultados funcionais, avaliamos, pela técnica de imunofluorescência, a localização *in situ* da iNOS nas aortas dos grupos CLP e CAF-CLP e se existe alguma diferença na imunomarcagem dessa isoforma entre eles. Os resultados demonstraram que a iNOS está presente em todas as camadas vasculares (íntima, média e adventícia) de ambos os grupos (Figuras 21A e B). Contudo, corroborando os achados funcionais, não foi verificada diferença significativa na

intensidade de fluorescência emitida pela imunomarcção da iNOS entre eles (Figura 21C).

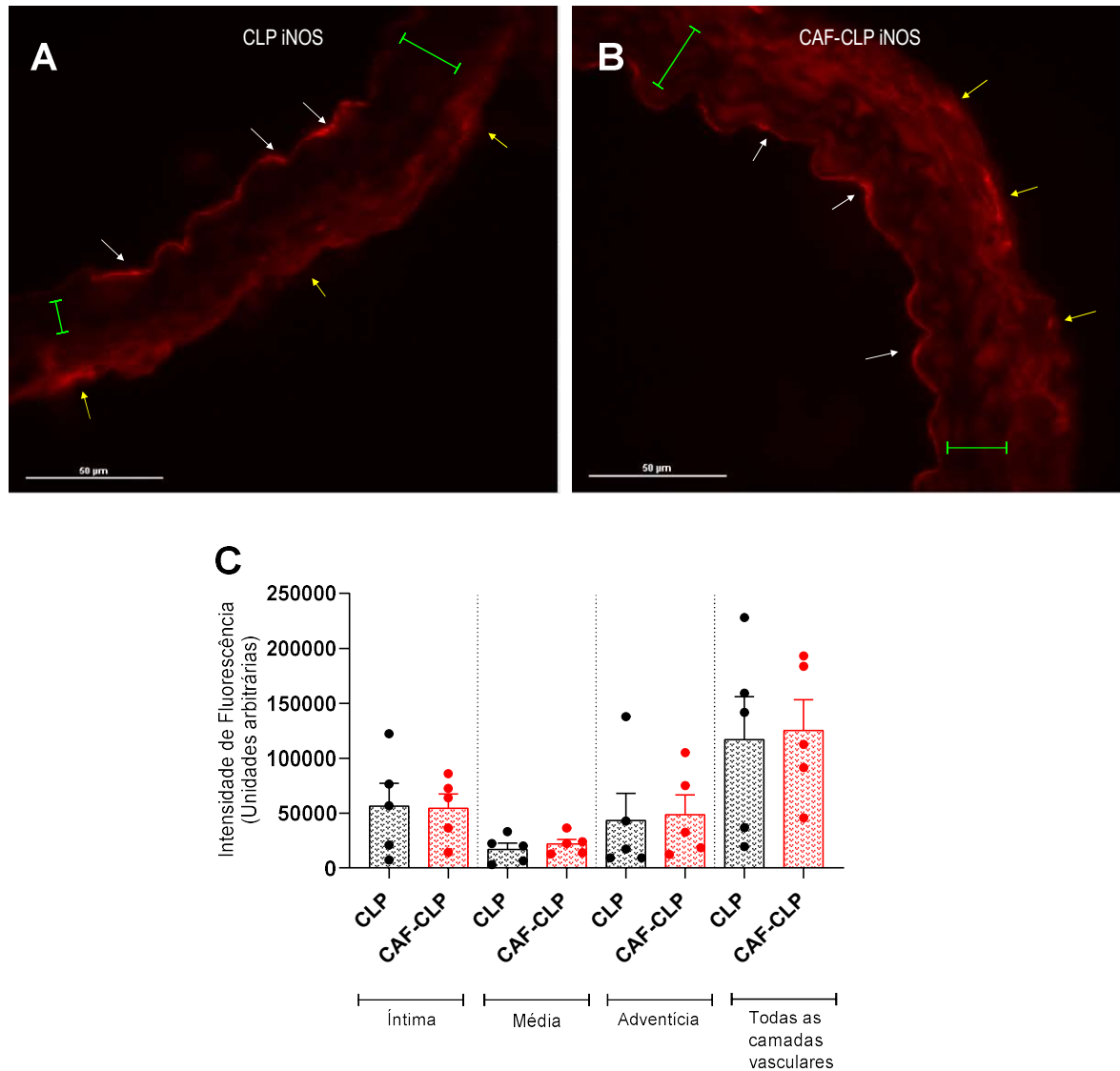


Figura 21: Imunodeteção da iNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, com a quantificação da intensidade de fluorescência nas diferentes camadas vasculares. (A) e (B) Imagens representativas (obtidas no aumento de 40X) da imunomarcção da iNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, respectivamente. As setas brancas indicam a camada íntima; os traços verdes indicam a camada média; e as setas amarelas indicam a camada adventícia. **(C)** Cada barra representa a média \pm EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela imunomarcção da iNOS obtida para um n=5 preparações diferentes de cada grupo experimental.

Considerando que a iNOS não participa da redução da resposta contrátil a PE no grupo CAF-CLP, nós decidimos avaliar se a isoforma neuronal da NOS (nNOS)

estaria contribuindo com essa resposta vascular. Similarmente ao verificado para iNOS, nos grupos CLP e CAF-CLP, a incubação com 7-NI não alterou significativamente a resposta de contração vascular à PE (Figuras 22A e B). Portanto, a diferença significativa do E_{max} da PE existente entre os grupos CLP e CAF-CLP persistiu após a incubação com 7-NI, não sendo verificadas também alterações nos valores de potência desse vasoconstritor (Figuras 22C, D e E). Deste modo, é possível concluir que, assim como a iNOS, a nNOS não está envolvida na hiporreatividade vascular a PE observada no grupo CAF-CLP.

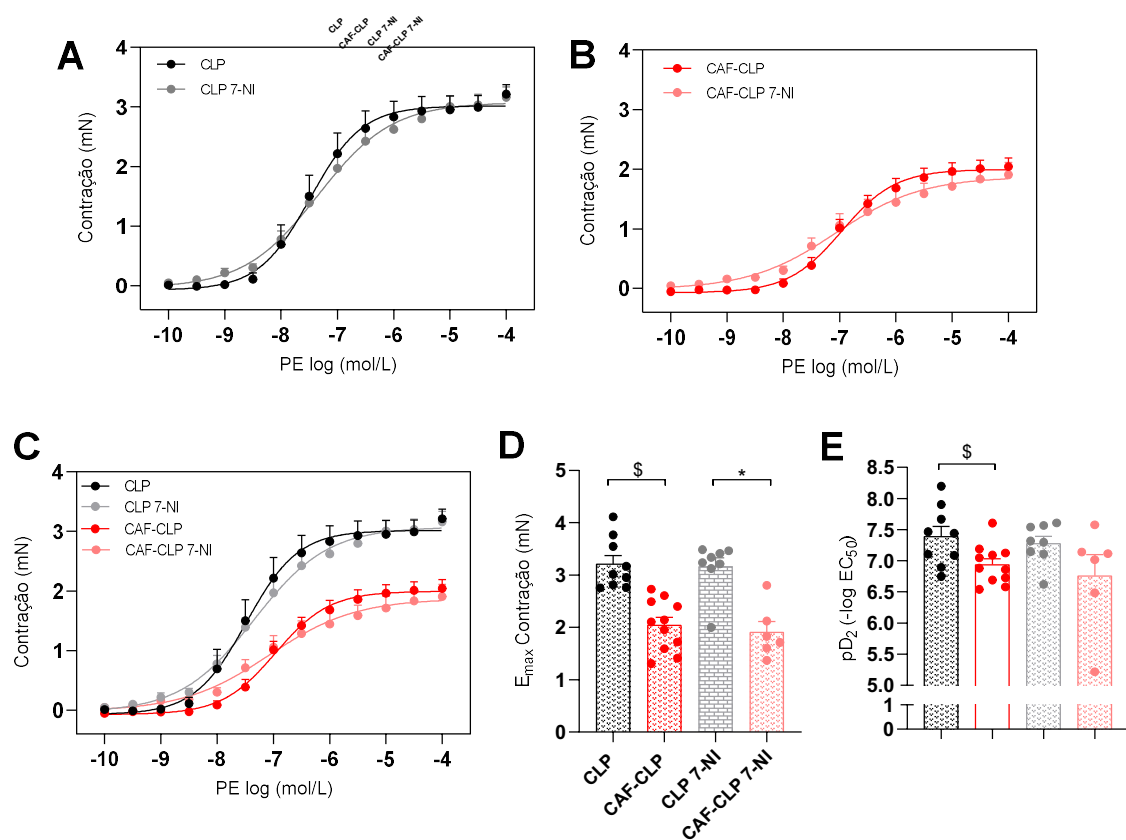


Figura 22: Efeito da inibição seletiva da nNOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com 7-NI. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de 7-NI. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 6-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP 7-NI (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

A fim de confirmar os achados obtidos no estudo funcional com a incubação com 7-NI, nós analisamos, através da técnica de imunofluorescência, a localização *in*

situ da nNOS, bem como se haveria diferença na imunomarcaco dessa isoforma entre os grupos CLP e CAF-CLP. De acordo com os nossos resultados, a nNOS está presente em todas as camadas vasculares (ntima, média e adventícia) das aortas de ambos os grupos (Figuras 23A e B) e, corroborando os achados funcionais, não foi observada diferença significativa na intensidade de fluorescência emitida pela imunomarcaco para nNOS entre eles (Figura 23C).

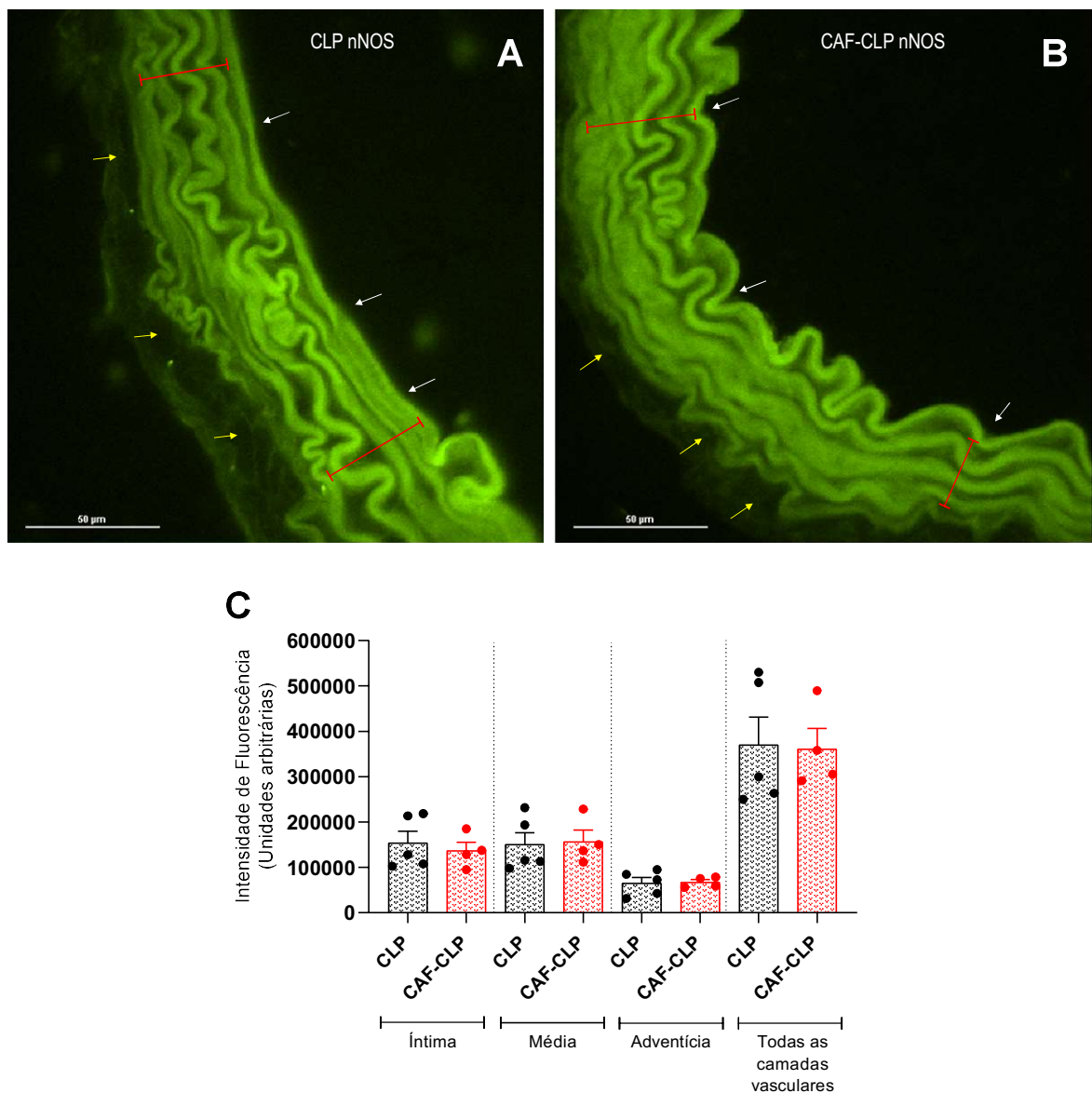


Figura 23: Imunodetecco da nNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, com a quantificao da intensidade de fluorescência nas diferentes camadas vasculares. (A) e (B) Imagens representativas (obtidas no aumento de 40X) da imunomarcaco da nNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, respectivamente. As setas brancas indicam a camada íntima; os traços vermelhos indicam a camada média; e as setas amarelas indicam a camada adventícia. **(C)** Cada barra representa a média

± EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela imunomarcção da nNOS obtida para um n=5 preparações diferentes de cada grupo experimental.

Considerando que os resultados obtidos para iNOS e nNOS sugerem que a isoforma endotelial da NOS (eNOS) participa da redução da resposta contrátil à PE observada no grupo CAF-CLP. Diante disso, nós decidimos verificar, através da técnica de imufluorescência, a localização *in situ* da eNOS nas aortas dos grupos CLP e CAF-CLP e se haveria diferença na imunomarcção dessa isoforma entres eles. Os resultados demonstraram que a eNOS está presente em todas as camadas vasculares (íntima, média e adventícia) das aortas de ambos os grupos (Figuras 24A e B). Porém, a intensidade de fluorescência emitida pela imunomarcção da eNOS não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 24C).

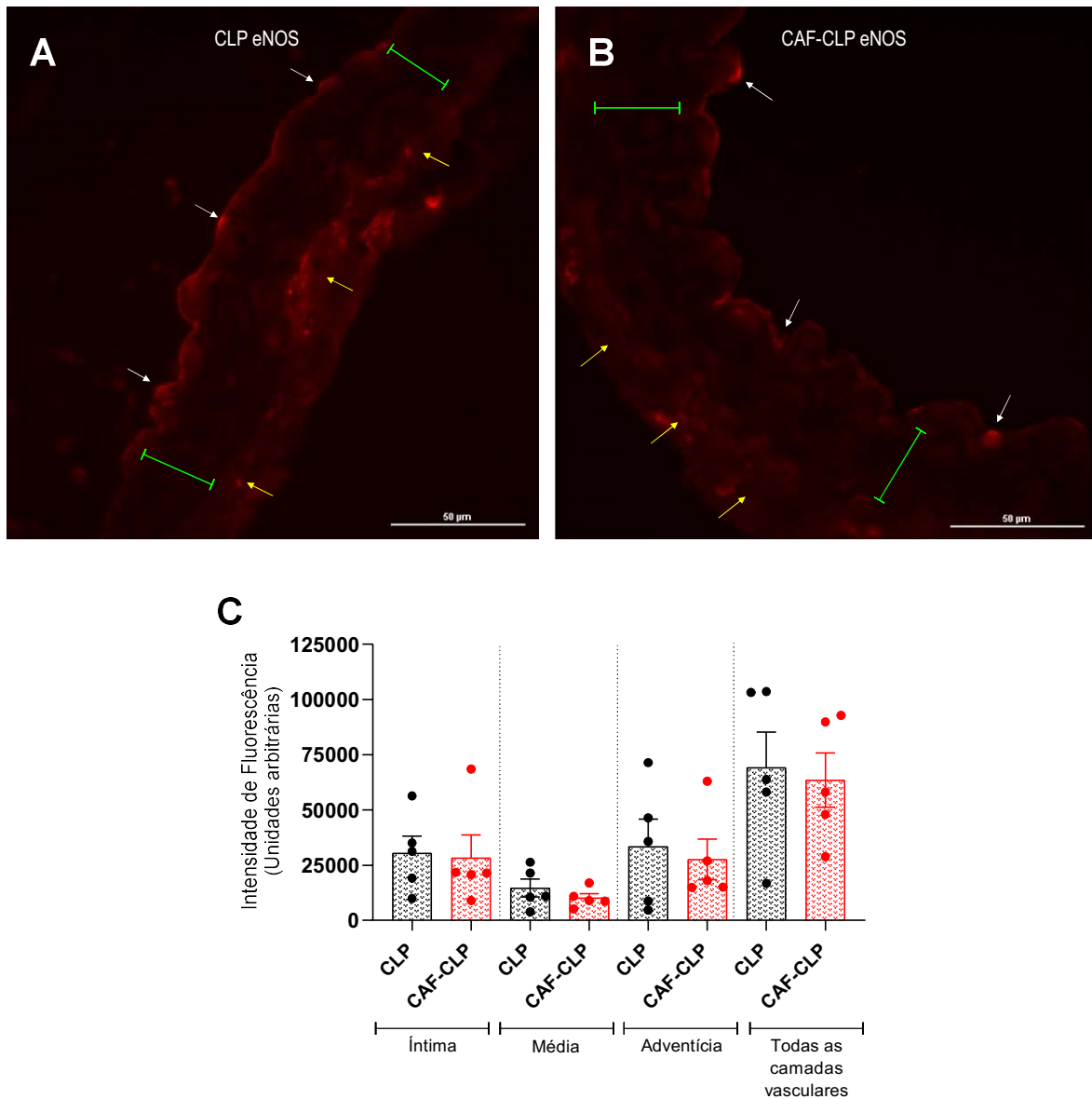


Figura 24: Imunodeteccção da eNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, com a quantificação da intensidade de fluorescência nas diferentes camadas vasculares. (A) e (B) Imagens representativas (obtidas no aumento de 40X) da imunomarcaçção da eNOS em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, respectivamente. As setas brancas indicam a camada íntima; os traços verdes indicam a camada média; e as setas amarelas indicam a camada adventícia. **(C)** Cada barra representa a média \pm EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela imunomarcaçção da eNOS obtida para um n=5 preparaçções diferentes de cada grupo experimental.

Uma vez confirmado que a NOS está parcialmente envolvida na hiporreatividade vascular observada no grupo CAF-CLP e que esse envolvimento, possivelmente, se deve à atividade da isoforma endotelial, decidimos investigar as

possíveis vias de sinalização que estariam levando à ativação da NOS. Inicialmente, avaliamos a participação da via de sinalização PI3K-Akt. Os resultados mostraram que, nas aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, a incubação prévia com LY-294,002 reduziu significativamente os valores de E_{max} de contração da PE, não sendo verificada nenhuma alteração nos valores de potência desse vasoconstritor (Figuras 25A, B, D e E). No entanto, a diferença significativa nos valores de E_{max} da PE existente entre os grupos CLP e CAF-CLP persistiu após a incubação com o LY-294,002 (Figura 25C e D). Portanto, esses achados sugerem que a via de sinalização PI3K-Akt não está envolvida na hiporreatividade vascular à PE observada em animais do grupo CAF-CLP.

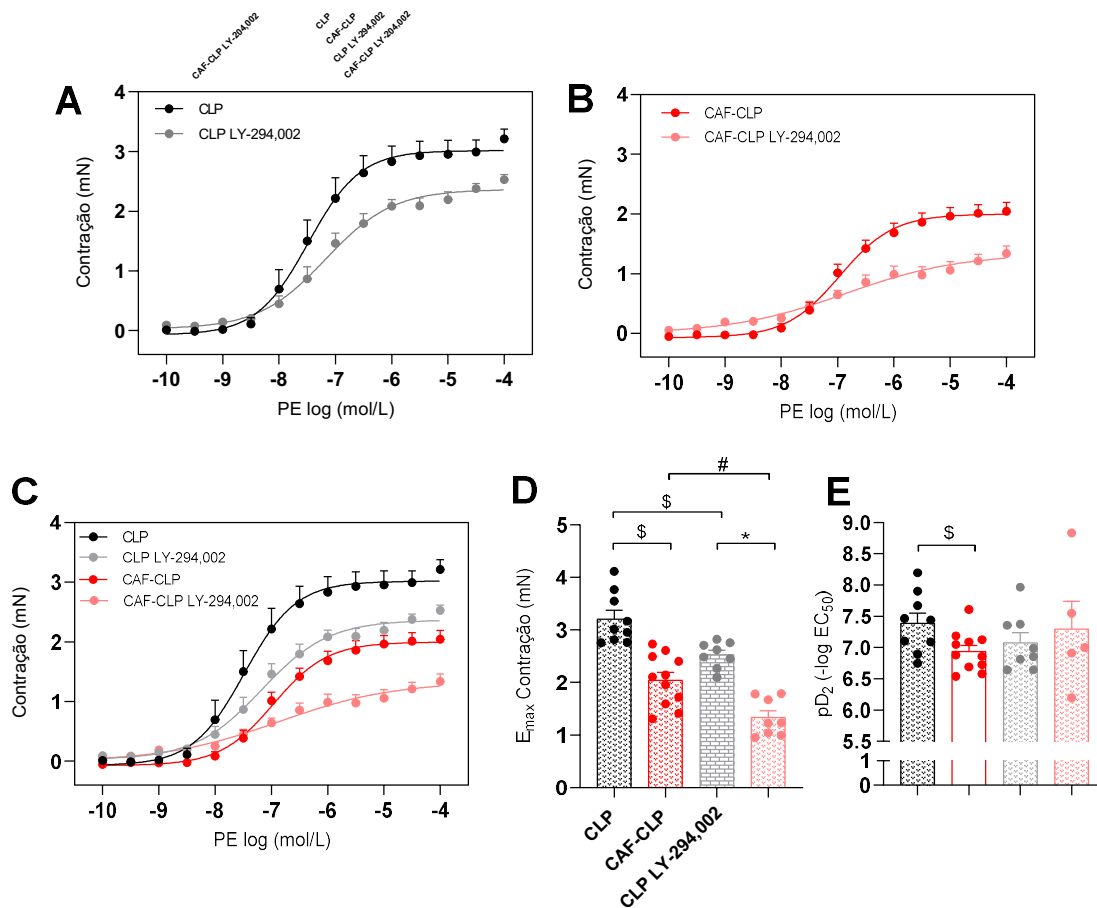


Figura 25. Efeito da inibição seletiva da enzima PI3K na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com LY-294,002. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de LY-294,002. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 5-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; # $p < 0,05$

em relação ao grupo CAF-CLP; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP LY-294,002 (*Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Considerando que a via de sinalização PI3K-Akt não está envolvida na hiporresponsividade vascular à PE verificada no grupo CAF-CLP, nós decidimos investigar a participação da via de sinalização MEK/ERK 1/2. De acordo com os nossos resultados, a incubação prévia com PD98059 reduziu significativamente a resposta contrátil da PE nos grupos CLP e CAF-CLP (Figuras 26A e B). Porém, a redução da resposta de contração da PE foi proporcionalmente maior no grupo CLP comparado ao grupo CAF, de modo que a diferença significativa nos valores de E_{max} da PE entre os grupos deixou de existir após a incubação com PD98059 (Figuras 26A, B, C e D). A diferença significativa nos valores de potência da PE existente entre os grupos, no entanto, persistiu após a incubação com esse inibidor (Figura 26E). Portanto, é possível sugerir que a via de sinalização MEK/ERK 1/2 está parcialmente envolvida na hiporresponsividade vascular observada no grupo CAF-CLP, mas, de modo distinto ao que era esperado, esse envolvimento de MEK/ERK 1/2, possivelmente, não se dá através da ativação de NOS.

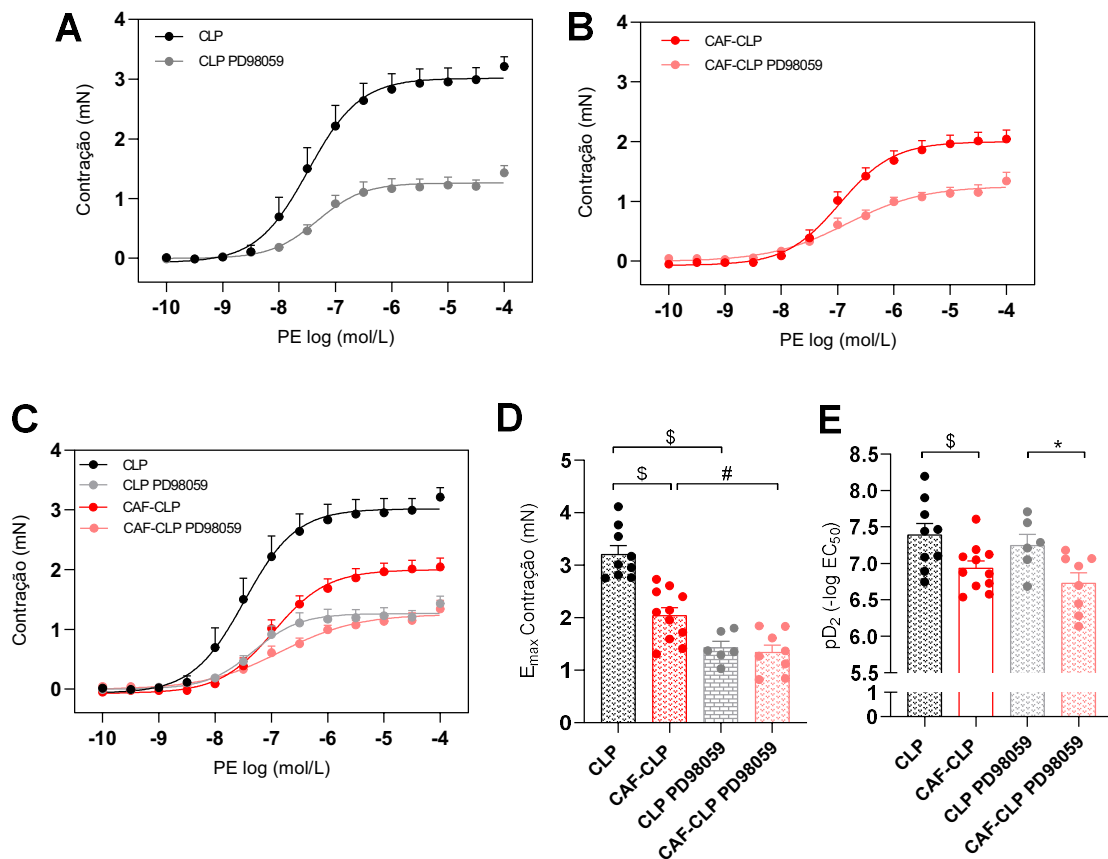


Figura 26. Efeito da inibição seletiva das enzimas MEK 1/2 na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com PD98059. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de PD98059. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 6-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF-CLP; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP PD98059 (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

5.5.1.3. Investigação do envolvimento do óxido nítrico (NO)

Uma vez produzido pela NOS no endotélio, o NO se difunde para as células musculares lisas, onde é capaz de interagir com o grupamento heme da GCs, ativando-a. Considerando isso, nós decidimos avaliar se a atividade da GCs estaria envolvida na diminuição da contração à PE observada no grupo CAF-CLP, através da incubação prévia com ODQ, inibidor seletivo da GCs. Os resultados mostraram que a incubação com ODQ aumentou significativamente o valor de potência da PE no grupo CLP, sem, no entanto, alterar o E_{max} desse vasoconstritor (Figuras 27A, D e E). No

grupo CAF-CLP, por sua vez, a incubação com ODQ aumentou significativamente o E_{max} de contração PE, sem produzir nenhuma alteração significativa na potência desse vasoconstritor (Figuras 27B, D e E). Logo, quando sobrepomos as curvas PE, é possível perceber que a inibição da GCs reverteu a hiporreatividade vascular no grupo CAF-CLP (Figuras 27C e D). Apesar disso, a diferença significativa nos valores de potência da PE existente entre os grupos persistiu após a incubação com ODQ (Figura 27E). Sendo assim, é possível concluir que a atividade da GCs está parcialmente envolvida na hiporresponsividade vascular a PE observada no grupo CAF-CLP.

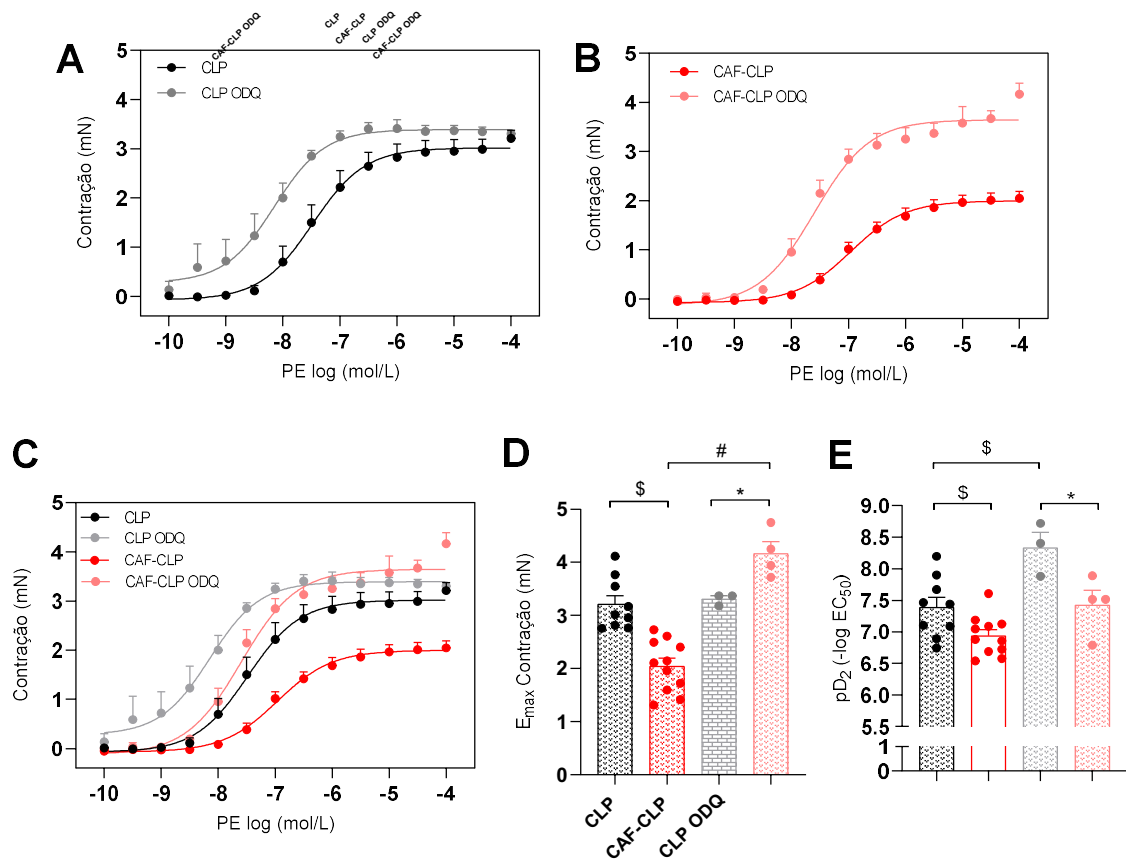


Figura 27. Efeito da inibição da enzima GCs na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com ODQ. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de ODQ. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 3-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF-CLP; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP ODQ (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Além da ativação da GCs, o NO desencadeia vasodilatação por meio da ativação direta dos canais para K^+ . Desta forma, nós decidimos investigar também se os canais para K^+ estariam envolvidos na redução da resposta contrátil à PE observada nas aortas de animais do grupo CAF-CLP. Os resultados mostraram que a incubação com TEA não foi capaz de alterar significativamente a resposta contrátil a PE de ambos grupos, CLP e CAF-CLP (Figuras 28A e B), de modo que a diferença de E_{max} e potência da PE existente entre eles permaneceu após a incubação com TEA (Figuras 28C, D e E). Portanto, pode-se concluir que, de maneira similar ao que foi observado para o grupo CAF, os canais para K^+ não participam da hiporresponsividade vascular a PE do grupo CAF-CLP.

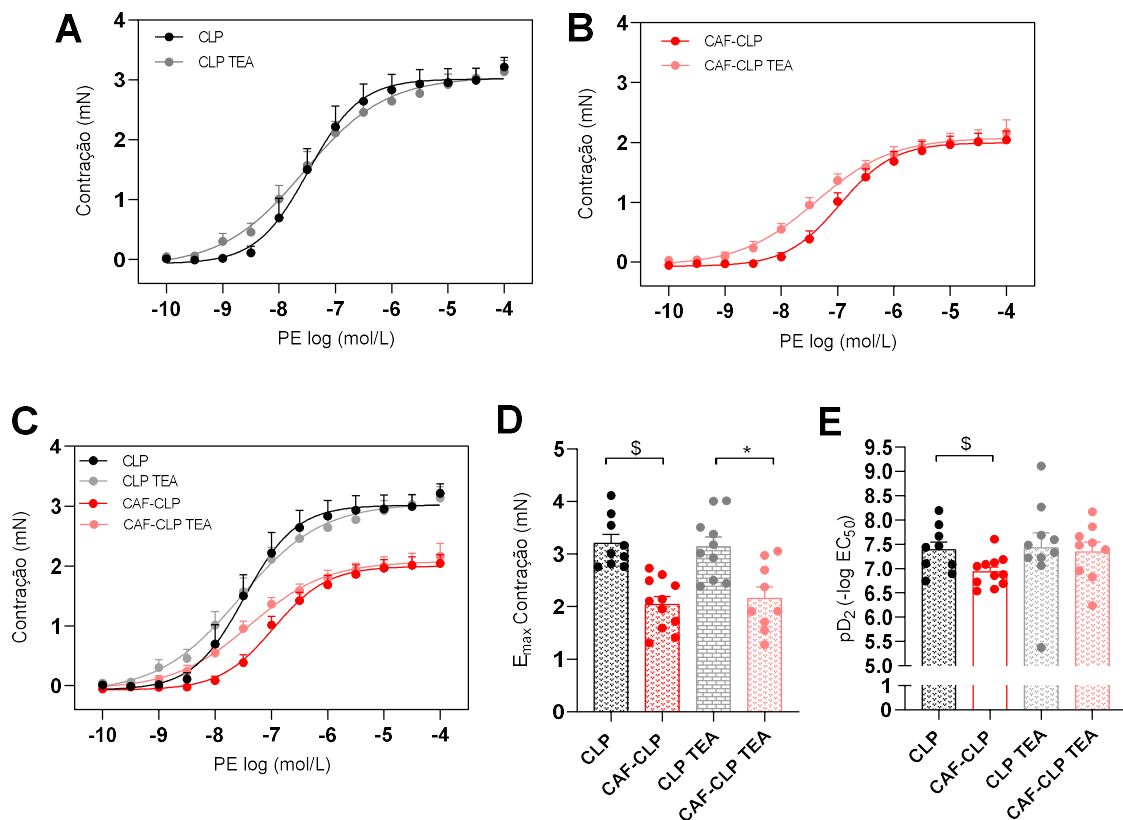


Figura 28. Efeito do bloqueio dos canais para K^+ na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP **(A)** e CAF-CLP **(B)** em anéis de aortas incubados ou não com TEA. **(C)** Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de TEA. **(D)** e **(E)** Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n

de 9-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP TEA (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

5.5.1.4. Investigação da participação da ciclooxigenase (COX)

Visto que o NO está apenas parcialmente envolvido na diminuição da contração vascular à PE no grupo CAF-CLP, buscamos investigar quais outros mediadores endoteliais também estariam mediando essa resposta. Dentre os mediadores possíveis, avaliamos o envolvimento dos prostanóides derivados da COX, através da incubação prévia das preparações com ibuprofeno. Os resultados mostraram que a incubação com ibuprofeno não alterou a resposta à PE do grupo CAF-CLP (Figura 29B). No entanto, a incubação com esse inibidor reduziu significativamente o E_{max} de contração da PE no grupo CLP, sem nenhuma alteração no valor da potência desse vasoconstritor (Figuras 29A, D e E). Deste modo, quando plotamos as curvas cumulativas concentração-resposta para PE de ambos os grupos num mesmo gráfico, observamos que as curvas das aortas dos grupos CLP e CAF-CLP incubadas com ibuprofeno estão sobrepostas, apresentando, assim, valores de E_{max} da PE similares (Figuras 29C, D e E). Em outras palavras, a incubação com ibuprofeno foi capaz de reduzir os valores de E_{max} da PE do grupo CLP a um nível similar aos valores obtidos para o grupo CAF-CLP (Figura 29D). Portanto, é possível concluir que a atividade de COX está envolvida na hiporresponsividade aórtica a PE do grupo CAF-CLP. No entanto, diferente do que era esperado, esse envolvimento não parece ser mediado por um aumento na produção de prostanóides vasodilatadores, mas, possivelmente, por um prejuízo na produção de prostanóides vasoconstritores.

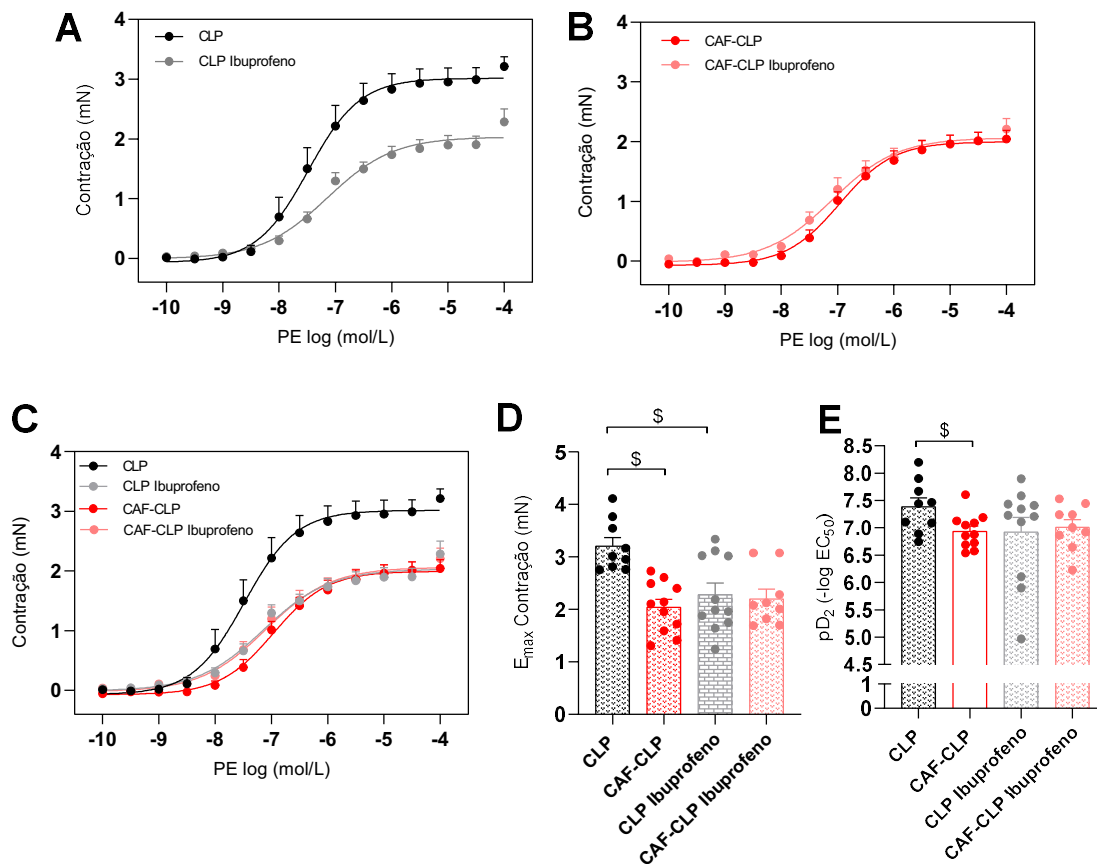


Figura 29. Efeito da inibição não-seletiva da enzima COX na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com Ibuprofeno. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de Ibuprofeno. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 9-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

Com intuito de confirmar os resultados obtidos no estudo funcional com ibuprofeno, nós analisamos, através da técnica de imunofluorescência, a localização *in situ* da COX-2, bem como possíveis diferenças na imunomarcção em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP. De acordo com os nossos resultados, a COX-2 está presente em todas as camadas vasculares (íntima, média e adventícia) das aortas de ambos os grupos (Figuras 30A e B). No entanto, de maneira surpreendente, foi observado um aumento significativo na intensidade de fluorescência emitida pela imunomarcção da COX-2, nas camadas íntima e média, do grupo CAF-CLP, em comparação com o grupo CLP (Figura 30C). Esse aumento nas camadas, individualmente, acabou

refletindo na média geral de todas as camadas vasculares, cuja intensidade de fluorescência emitida pela imunomarcção de COX-2 mostrou uma tendência de aumento no grupo CAF-CLP, quando comparado ao grupo CLP (Figura 30C).

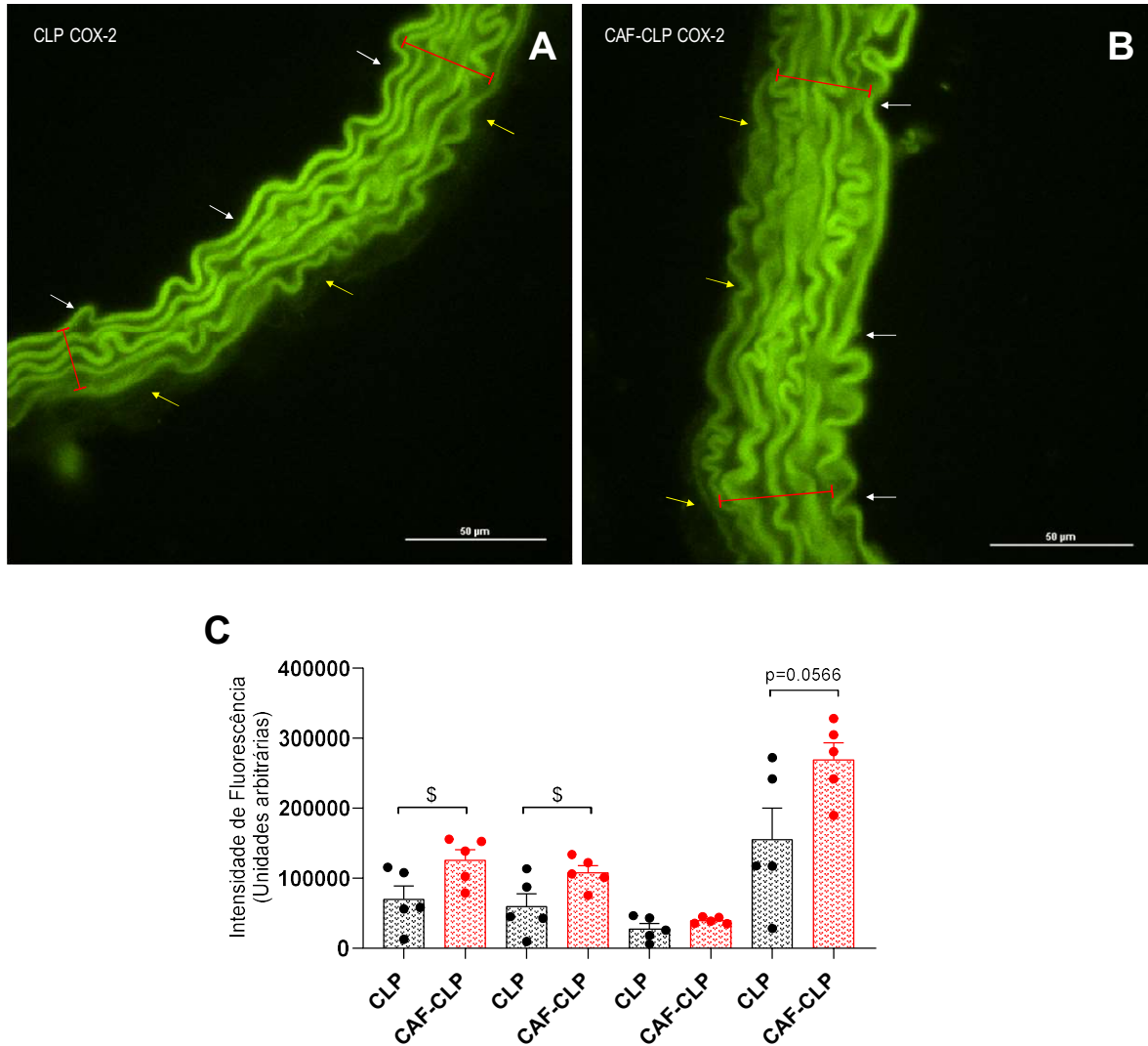


Figura 30: Imunodeteção da COX-2 em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, com a quantificação da intensidade de fluorescência nas diferentes camadas vasculares. (A) e (B) Imagens representativas (obtidas no aumento de 40X) da imunomarcção da COX-2 em aortas dos grupos CLP e CAF-CLP, respectivamente. As setas brancas indicam a camada íntima; os traços vermelhos indicam a camada média; e as setas amarelas indicam a camada adventícia. (C) Cada barra representa a média \pm EPM da intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, emitida pela imunomarcção da COX-2 obtida para n=5 preparações diferentes de cada grupo experimental.

5.5.1.5. Investigação do envolvimento do peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Além do NO, o endotélio é capaz de produzir o H_2O_2 , que, dependendo de sua concentração, pode desencadear tanto a vasoconstrição, quanto a vasodilatação. Baseados nesta informação, decidimos avaliar se o H_2O_2 estaria envolvido na hiporreatividade vascular à PE observada no grupo CAF-CLP. Com base nos nossos resultados, a incubação com catalase não alterou significativamente o perfil de contração da PE em ambos os grupos, CLP e CAF-CLP (Figuras 31A e B). Deste modo, a diferença significativa nos valores de E_{max} da PE existente entre eles persistiu após a incubação prévia com catalase (Figuras 31C e D), não sendo verificadas também alterações nos valores de potência desse vasoconstritor (Figura 31E). Esses achados, portanto, indicam que o H_2O_2 não participa da hiporresponsividade vascular à PE observada nas aortas dos animais do grupo CAF-CLP.

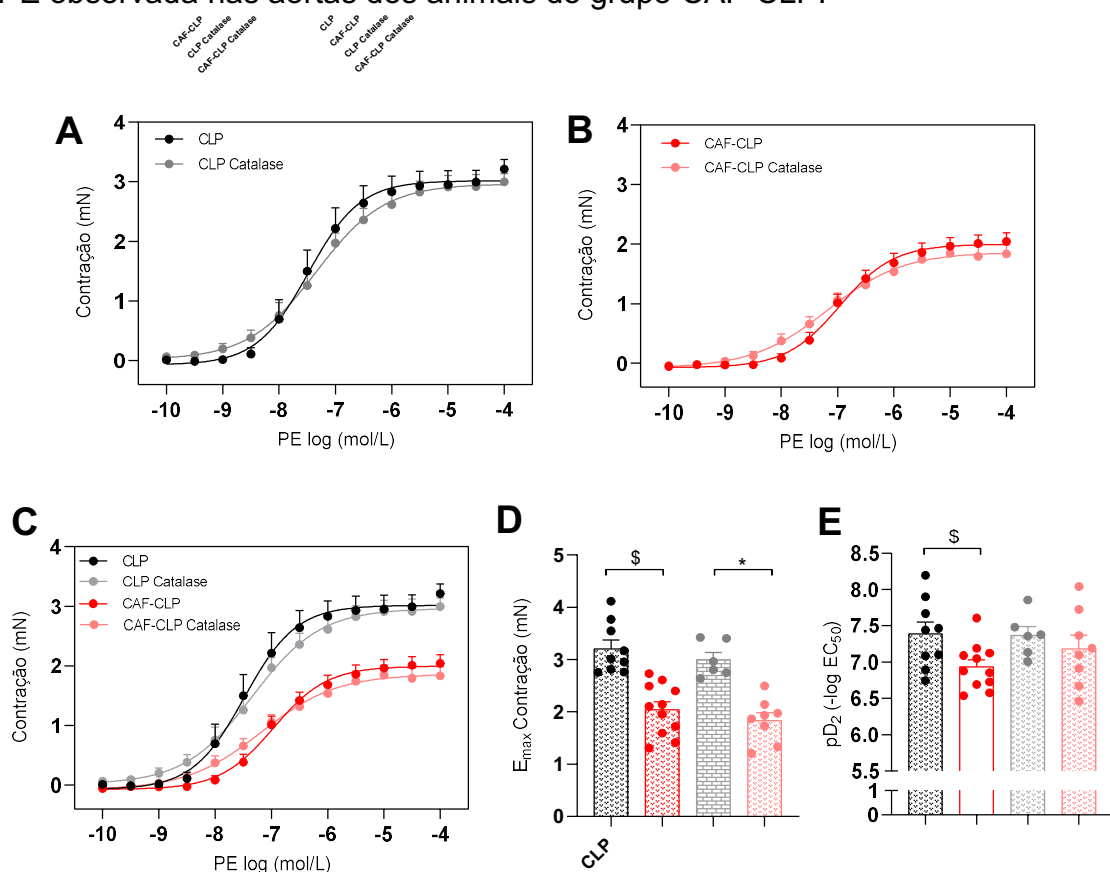


Figura 31. Efeito da Catalase, enzima que catalisa a decomposição do H_2O_2 , na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com Catalase. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de Catalase. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos

valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 6-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP Catalase (*Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

5.5.1.6. Investigação da participação do sistema renina-angiotensina

Considerando que a atividade do sistema renina-angiotensina tem sido relacionada às alterações vasculares que ocorrem em quadros de obesidade e sepse, nós buscamos avaliar se o sistema renina-angiotensina estaria envolvido na hiporresponsividade aórtica verificada no grupo CAF-CLP. Em relação ao grupo CLP, por sua vez, a incubação com captopril reduziu, de maneira significativa, os valores de potência da PE (Figura 32A e E), não sendo verificadas alterações nos valores de E_{max} desse vasoconstritor (Figura 32D). Já, no grupo CAF-CLP, a incubação com captopril não alterou significativamente a contração vascular a PE (Figura 32B). Sendo assim, como não houve alterações nos valores E_{max} da PE dos dois grupos, a diferença significativa de E_{max} da PE existente entre eles persistiu após a incubação com captopril (Figuras 32C e D). Além disso, as curvas cumulativas concentração-resposta para PE de ambos os grupos permaneceram não sobrepostas após a exposição a esse inibidor (Figura 32C), sugerindo, deste modo, que o sistema-renina-angiotensina local não está envolvido na hiporresponsividade vascular a PE observada no grupo CAF-CLP.

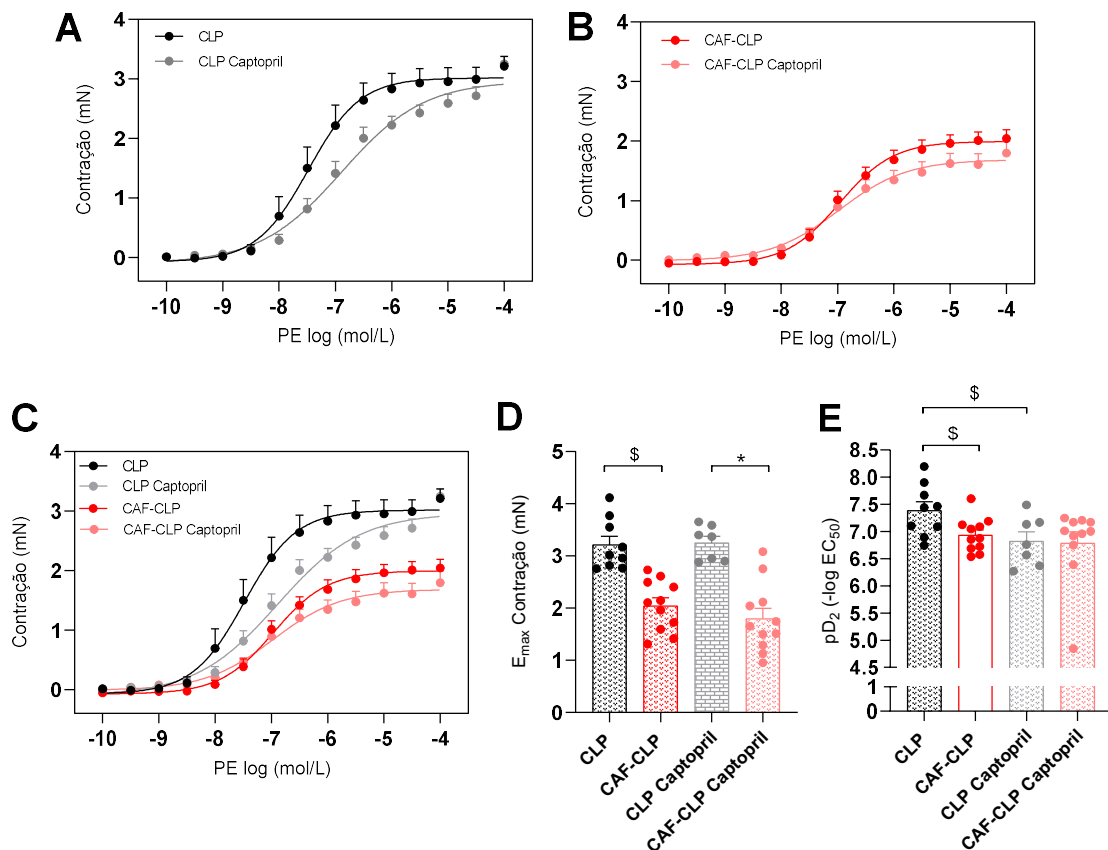


Figura 32. Efeito da inibição da ECA na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos CLP (A) e CAF-CLP (B) em anéis de aortas incubados ou não com Captopril. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos CLP e CAF-CLP na presença e na ausência de Captopril. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 7-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP Captopril (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

5.5.1.7. Investigação do envolvimento dos canais para cálcio (Ca^{2+})

Tendo em vista que, diferentemente do NO, outros mediadores vasodilatadores endoteliais não estão envolvidos na hiporresponsividade vascular à PE no grupo CAF-CLP e que a via de sinalização contrátil parece estar prejudicada e, deste modo, contribuindo ativamente com essa resposta vascular, nós decidimos investigar se estaria ocorrendo alguma alteração na função dos canais para Ca^{2+} nas aortas dos animais do grupo CAF-CLP. Os resultados mostraram que a resposta de relaxamento vascular induzida pelo bloqueio dos canais para Ca^{2+} foi similar entre os grupos CLP e CAF-CLP (Figura 33A), não sendo verificada diferença significativa nos valores de potência e E_{max} do Verapamil entre os grupos (Figura 33B e C). Logo, esses achados

demonstram que a hiporresponsividade vascular a PE no grupo CAF-CLP não envolve alterações de funcionamento dos canais para Ca^{2+} .

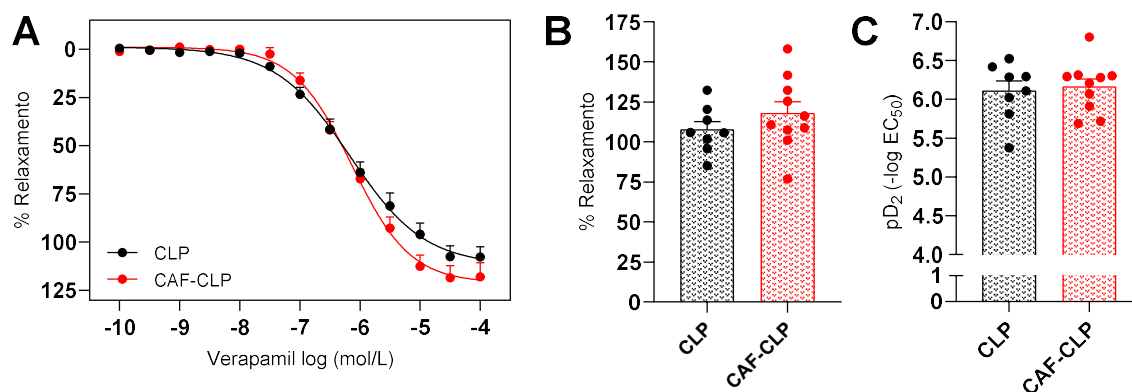


Figura 33: Relaxamento induzido pelo bloqueio dos canais para Ca^{2+} nas aortas dos grupos experimentais. (A) As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo Verapamil em anéis de aortas dos grupos CLP e CAF-CLP pré-contraídos com KCl (30 mmol/L). (B) e (C) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para n preparações independentes (CLP: $n=8$; CAF-CLP: $n=10$).

5.6. Avaliação da morbimortalidade após o segundo desafio infeccioso

Como mostrado na figura 34A, ambos os grupos, CLP e CAF-CLP, apresentaram uma diminuição do peso corporal nos dois primeiros dias após a infecção intranasal com *Aspergillus fumigatus*. No entanto, essa redução do peso corporal foi significativamente menor no grupo CAF-CLP, de modo que no quarto dia após a infecção, quando já estão restabelecendo o peso corporal, a porcentagem de peso corporal do grupo CAF-CLP se mostra significativamente maior que a do grupo CLP. Essa diferença entre os grupos fica ainda mais evidente na figura 34B, que demonstra que a área sobre a curva (AUC) da variação temporal do peso corporal do grupo CAF-CLP é significativamente maior que a do grupo CLP, o que sugere, portanto, que a diminuição do peso corporal nos 7 dias após a infecção foi maior no grupo CLP que no grupo CAF-CLP.

Os achados obtidos para o peso corporal corroboram com os obtidos para a sobrevivência, uma vez que, como pode ser visualizado na figura 34C, não houve diferença significativa na sobrevivência à infecção com *Aspergillus fumigatus* entre os grupos CLP e CAF-CLP. Contudo, os animais do grupo CLP (Sobrevivência: 66,7%)

parecem apresentar uma tendência menor de sobrevida à um quadro infeccioso secundário, quando comparado aos animais do grupo CAF-CLP (Sobrevida: 80%).

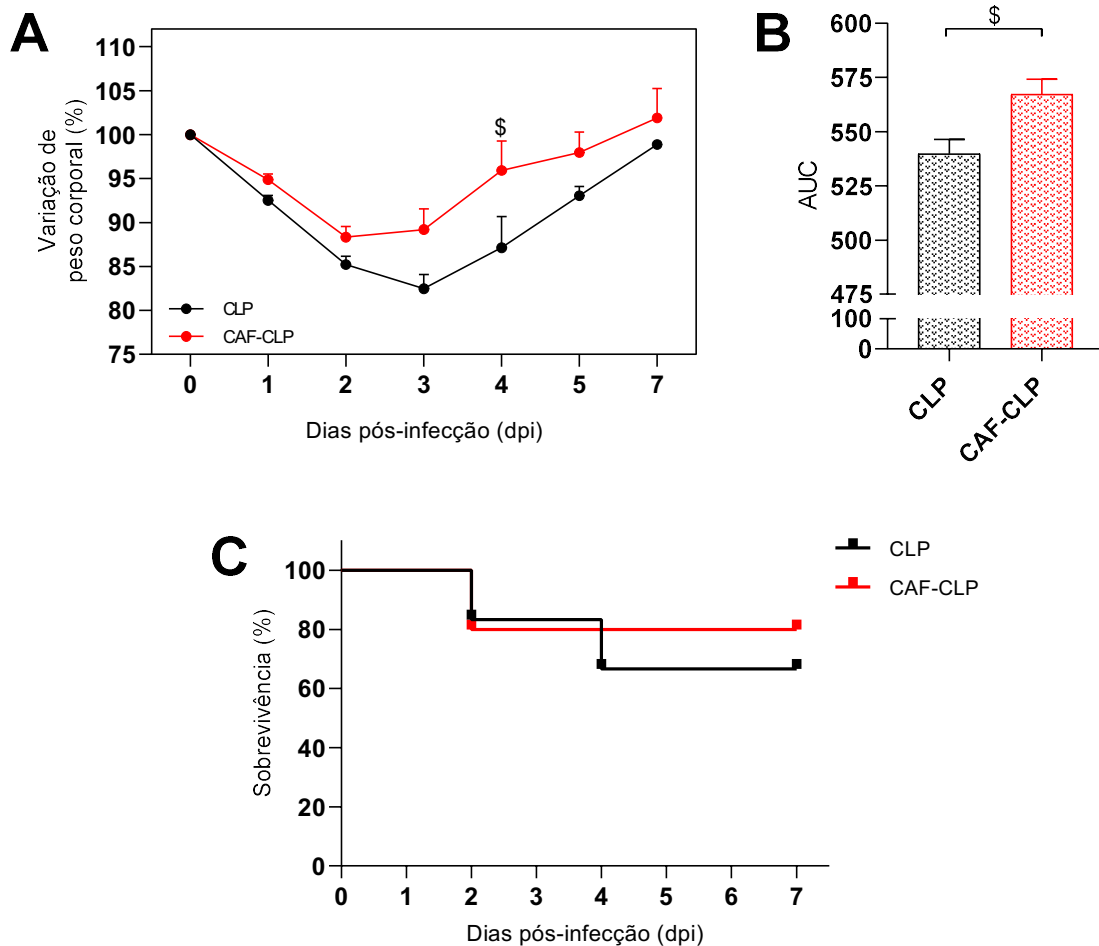


Figura 34: Avaliação da morbimortalidade após um segundo desafio infeccioso com *Aspergillus fumigatus*. (A) Variação de peso corporal (percentual) obtida, durante os 7 dias após a infecção, para um n de 5 (CAF-CLP) ou 6 (CLP) animais de cada grupo experimental. (B) Área sobre a curva da variação temporal do peso corporal obtida para um n de 5 (CAF-CLP) ou 6 (CLP) animais de cada grupo experimental. (C) Curva comparativa do percentual de sobrevida obtida para um n de 5 (CAF-CLP) ou 6 (CLP) animais de cada grupo experimental. Os dados são expressos como a média \pm EPM. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (A: *Two-way* ANOVA seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*; B: teste t de Student).

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, a prevalência mundial da obesidade aumentou significativamente, sobretudo, nos países ocidentais, onde a sepse se destaca como uma das principais causas de morte (Cava et al., 2020; De La Rica et al., 2016). Logo, a coexistência de ambas as condições tem se tornado cada vez mais frequente na prática clínica, o que tem impulsionado a realização de estudos que buscam desvendar os efeitos potenciais da obesidade no prognóstico da sepse (Kolyva et al., 2014). Com tal finalidade, os estudos publicados mais recentemente têm utilizado modelos murinos de obesidade induzida por dieta, que são capazes de reproduzir a causa mais comum de obesidade em humanos: os desequilíbrios alimentares (Cichon et al., 2021; C. Li et al., 2021; Martins et al., 2022; Su et al., 2021; Yeh et al., 2022). Na maioria desses estudos, os animais são expostos à dieta rica em lipídeos (em inglês, *high-fat diet*), que é reconhecida por promover alterações fisiopatológicas associadas à obesidade, tais como: aumento do peso e da adiposidade corporal, desordens metabólicas e complicações cardiovasculares (de Moura e Dias et al., 2021; Matias et al., 2018).

Alterações fisiopatológicas similares também têm sido descritas para animais expostos à dieta de cafeteria (dos Reis Costa et al., 2022). Contudo, esse tipo de intervenção dietética vem sendo considerada um modelo mais robusto de obesidade induzida por dieta, uma vez que: reflete a variedade de alimentos altamente palatáveis e calóricos presentes na dieta ocidental; promove a obesidade e as desordens metabólicas a ela associadas de maneira mais eficiente que as tradicionais dietas ricas em lipídeos; e envolve a alimentação hedônica, que consiste em comportamentos alimentares desregulados desencadeados por respostas neuroadaptativas de prazer e recompensa, que são comuns em algumas formas de obesidade humana (Bortolin et al., 2018; Sampey et al., 2011; Shafat et al., 2009). Considerando esses fatores e que, até o momento, a dieta de cafeteria não tem sido utilizada como ferramenta de estudo para avaliar o impacto da obesidade no prognóstico da sepse, nós escolhemos essa abordagem dietética como modelo experimental de indução da obesidade.

Apesar do impacto a longo prazo da ingestão de dietas hipercalóricas ser bem estabelecido, estudos demonstram que essas dietas também são capazes de

provocar respostas fisiológicas e metabólicas imediatas. Lahav et al. (2021) verificaram que a ingestão de dieta *high-fat* por um curto prazo de tempo (3 dias) provocou ganho significativo de peso corporal, acompanhado por aumento dos tecidos adiposos epididimais, da glicemia em jejum e dos níveis de colesterol total (Lahav et al., 2021). Em um outro estudo, Oliveira et al. (2012) demonstraram que, embora não tenham apresentado ganho de peso corporal, animais que receberam dieta rica em carboidratos refinados (em inglês, *high carbohydrate diet*) exibiram, já no 1° dia após o início da dieta, um aumento significativo da adiposidade visceral e dos níveis séricos de glicose, colesterol e triglicerídeos (Marina C. Oliveira et al., 2013). Além disso, esses animais apresentaram intolerância oral a glicose na 1° semana após o início da dieta, que permaneceu até a 12° semana de dieta.

Em relação à dieta de cafeteria, poucos são os estudos publicados que demonstram os efeitos da ingestão dessa a dieta a curto prazo. Rodríguez et al. (2012) demonstraram que ratos alimentados com dieta de cafeteria, por 2 semanas, apresentaram aumento significativo do consumo alimentar calórico, que foi associado ao aumento do peso corporal, da adiposidade visceral e, conseqüentemente, do índice de adiposidade (Rodríguez et al., 2004). De maneira similar, em um estudo publicado recentemente, dos Reis Costa et al. (2022) observaram que, em camundongos alimentados com dieta de cafeteria, houve um aumento significativo do consumo calórico alimentar e do ganho de peso corporal a partir da 1° semana de dieta e permaneceu até a 4° semana. Nessa semana final do período experimental, os autores também verificaram um aumento significativo do índice de adiposidade, da área dos adipócitos epididimais e dos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol total, bem como a ocorrência de intolerância oral à glicose (dos Reis Costa et al., 2022).

Corroborando os achados dos estudos prévios, nossos resultados mostraram que camundongos alimentados com dieta de cafeteria apresentaram, a partir do 3° dia de dieta, um ganho de peso corporal significativamente maior que camundongos que receberam dieta padrão, o que permaneceu até o 14° dia de dieta. Esse ganho de peso corporal foi associado ao aumento significativo do índice de adiposidade dos animais que receberam dieta de cafeteria, o que, no entanto, não foi acompanhado por um aumento da área dos adipócitos epididimais. A ausência de diferença na área

dos adipócitos entre os grupos controle e CAF, possivelmente, se deve à uma limitação metodológica, uma vez que, na obesidade, a expansão dos tecidos adiposos ocorre tanto em tamanho (hipertrofia), como em número (hiperplasia). Logo, a análise quantitativa da área dos adipócitos, como a que foi realizada, não inclui a contagem do número de adipócitos por campo analisado. Além disso, quando há um aumento do tamanho e número de adipócito teciduais, mudanças na área média geral podem passar despercebidas. Sendo assim, com intuito de confirmar os resultados obtidos, análises futuras, que permitam quantificar a frequência de distribuição das mudanças de tamanho e número dos adipócitos, como a descrita por Parlee et al. (2014), se fazem necessárias (Parlee et al., 2014).

De maneira distinta ao que foi observado nos estudos prévios, os camundongos alimentados com dieta de cafeteria por 2 semanas não desenvolveram intolerância oral à glicose. Esse achado pode estar relacionado ao curto tempo de dieta, uma vez que dos Reis Costa et al. (2022) observaram intolerância oral à glicose em camundongos da mesma linhagem alimentados com dieta de cafeteria por 4 semanas (dos Reis Costa et al., 2022). Apesar da tolerância oral à glicose ser considerada uma mudança metabólica típica da obesidade, não podemos desconsiderar a ocorrência da obesidade nos animais no período de 14 dias após o início da dieta, ou seja, previamente à sepse. Atualmente, não existe um marcador específico ou um consenso na literatura para definir a presença ou a ausência de obesidade em ratos ou camundongos. Contudo, a maioria dos estudos já publicados consideram as diferenças no ganho de peso corporal e no índice de adiposidade como os principais parâmetros para determinar o desenvolvimento da obesidade (de Moura e Dias et al., 2021; Leopoldo et al., 2016; Matias et al., 2018; Svensson et al., 1996). Portanto, o aumento significativo no ganho de peso corporal e no índice de adiposidade verificado nos camundongos alimentados com dieta de cafeteria por 14 dias já indica a ocorrência de obesidade previamente à indução da sepse.

Com o aumento da adiposidade visceral nos camundongos que receberam dieta de cafeteria, fica evidente que o tecido adiposo é um componente dinâmico e modificável, que, portanto, pode sofrer um processo de remodelamento, em que a morfologia dos adipócitos é alterada, quando homeostase metabólica é fortemente perturbada (Marques & Langouche, 2013; Parlee et al., 2014). Em modelos murinos,

independente da dieta ingerida, o estado hipercatabólico produzido pela sepse é caracterizado por uma redução do peso corporal e das massas magra e gorda. A diminuição da massa gorda é associada com uma redução no tamanho médio dos adipócitos dos depósitos de tecido adiposo subcutâneo, epididimal e renal (Crowell et al., 2017; Marques et al., 2013).

Um estudo realizado por Frydrych et al. (2019) mostrou que camundongos que foram alimentados com dieta padrão ou com dieta *high-fat* apresentaram uma rápida perda de peso corporal após a indução da sepse (Frydrych et al., 2019). Contudo, essa perda de peso corporal foi significativamente maior no grupo que recebeu dieta *high-fat* comparado ao grupo que recebeu dieta padrão. Além disso, os animais que receberam dieta padrão começaram a ganhar peso no 7º dia após a indução da sepse, de modo que, no 28º dia, já haviam recuperado todo o peso corporal perdido. Os animais que receberam dieta *high-fat*, no entanto, começaram a ganhar peso no 18º dia após a indução da sepse, porém, diferente dos animais que receberam dieta padrão, não conseguiram recuperar todo o peso corporal perdido até o 28º dia. Os autores ainda ressaltam que esse padrão de resposta foi similar nos animais sham (Frydrych et al., 2019).

De maneira semelhante ao que foi verificado por Frydrych et al. (2019), os grupos CLP e CAF-CLP apresentaram, no presente estudo, uma rápida perda de peso corporal após a indução da sepse (Frydrych et al., 2019). Apesar dessa perda de peso corporal não ter sido significativamente distinta entre os grupos, o grupo CAF-CLP, diferente do grupo CLP, não conseguiu, até o 14º dia, recuperar o peso corporal perdido. Frydrych et al. (2019) sugerem que essa dificuldade em recuperar o peso corporal no grupo que recebeu dieta hipercalórica se deve à uma limitada reserva fisiológica, que consiste na capacidade de uma célula, tecido ou sistema orgânico responder a situações de estresse fisiológico (Frydrych et al., 2019). Os grupos controle e CAF também perderam peso corporal após a laparotomia ventral, contudo ambos os grupos conseguiram reestabelecer o peso corporal até o 14º dia após o procedimento cirúrgico. É válido salientar que os grupos CLP e CAF-CLP apresentaram uma tendência de perda de peso corporal maior que os grupos controle e CAF, respectivamente. Corroborando o que já foi descrito na literatura, essa tendência de perda de peso corporal nos grupos CLP e CAF-CLP foi associada à uma

redução da área média dos adipócitos e, conseqüentemente, do índice de adiposidade (Crowell et al., 2017). Logo, apesar do ganho de peso corporal após a fase aguda da sepse, os grupos CLP e CAF-CLP apresentaram o índice de adiposidade e a área média dos adipócitos significativamente diminuídas em relação aos grupos controle e CAF, respectivamente. Contudo, tanto o índice de adiposidade, quanto a área média dos adipócitos permaneceram aumentados no grupo CAF-CLP em relação ao grupo CLP, indicando que o grupo CAF-CLP permaneceu obeso em relação ao grupo CLP. Possivelmente isso se deve à ingestão calórica dos animais que continuou significativamente aumentada no grupo CAF-CLP comparado ao grupo CLP após a indução da sepse.

Além de ser um importante estoque de gordura, o tecido adiposo é capaz de sintetizar uma variedade de moléculas de sinalização, as adipocinas, que estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, como na regulação do metabolismo da glicose e de lipídeos, do gasto energético, da ingestão alimentar e das respostas imunes (Francisco et al., 2018; Vankrunkelsven et al., 2022). Logo, quando a homeostase metabólica é perturbada, não só a morfologia, mas também as funções basais dos adipócitos, relacionadas à síntese das adipocinas, são alteradas. Isso fica claro no estudo de Hillenbrand et al. (2016), os quais observaram que os níveis de adipocinas são nitidamente modificados durante a sepse quando comparados aos níveis pré-sépticos (Hillenbrand et al., 2016). Embora ainda não sejam conclusivos, estudos têm demonstrado que os níveis séricos de leptina, resistina e quemerina - que são adipocinas com características pró-inflamatórias - aumentam durante a fase aguda da sepse e tendem a reduzir significativamente após a essa fase (Karampela et al., 2022; Loosen et al., 2019; Ulusoy et al., 2021). De maneira distinta, os níveis circulantes de adiponectina, que apresenta característica anti-inflamatória, parecem ser significativamente reduzidos durante a sepse e também normalizados após essa fase (Hillenbrand et al., 2016; Loosen et al., 2019).

No presente estudo, nós não observamos diferença significativa nos níveis circulantes de adiponectina e quemerina entre os grupos experimentais, o que corrobora os achados de estudos prévios que demonstram que os níveis das adipocinas tendem a ser normalizados após a fase aguda da sepse. Contudo, a ausência de diferença não era esperada na comparação dos níveis de adiponectina

entre os grupos que foram alimentados com dieta padrão com os que foram alimentados com dieta de cafeteria, uma vez que a obesidade induzida por essa intervenção dietética promove aumento dos níveis de adiponectina (Pérez-Matute et al., 2007). Em relação à leptina, nós verificamos aumento significativo de seus níveis séricos no grupo CLP comparado ao grupo controle, demonstrando que os níveis dessa adipocina aumentaram durante a fase aguda da sepse, porém, diferente do descrito na literatura, permaneceram elevados após essa fase. Bornstein et al. (1998) sugerem que esse aumento persistente dos níveis de leptina poderia estar relacionado à um papel importante desempenhado por essa adipocina em indivíduos sobreviventes à sepse, o qual deve ser melhor investigado (Bornstein et al., 1998). Como esperado para o efeito da dieta de cafeteria, os níveis de leptina foram significativamente aumentados nos grupos CAF e CAF-CLP comparados aos grupos controle e CLP, respectivamente (MacEdo et al., 2012). No entanto, o grupo CAF-CLP mostrou níveis de leptina reduzidos em relação ao grupo CAF, o que pode estar associado à redução da adiposidade visceral verificada no grupo CAF-CLP após a indução da sepse. Por fim, em relação à resistina, nós observamos diminuição significativa de seus níveis no grupo CLP, o que não ocorreu no grupo CAF-CLP. Esse achado difere do que foi descrito em estudos prévios, uma vez que essa redução dos níveis de resistina pode ter ocorrido durante a fase aguda da sepse e persistido após essa fase. Porém, vale ressaltar que somente níveis elevados de resistina tem sido associados à um prejuízo no prognóstico da sepse (Bonenfant et al., 2022).

Considerando a sua importância na regulação do metabolismo da glicose e dos lipídeos, é lógico assumir que as alterações nos níveis das adipocinas são acompanhadas por alterações nos níveis glicêmicos e lipídicos. No entanto, até o momento, poucos estudos que avaliam os perfis glicêmicos e lipídicos de sobreviventes à sepse foram publicados. Em relação as alterações glicêmicas observadas após a indução da sepse, existem dois principais estágios: um estágio inicial, denominado hiperdinâmico e hipermetabólico, que é caracterizado por hiperglicemia e sensibilidade reduzida à insulina; e um estágio mais tardio, denominado hipodinâmico e hipometabólico, que é caracterizado por hipoglicemia, insensibilidade à insulina e ausência de tolerância oral à glicose (Ferreira et al., 2017). Apesar dessas alterações no metabolismo da glicose durante a sepse, os níveis glicêmicos tendem a ser normalizados nos sobreviventes à sepse, uma vez que as

variações na glicemia se mostraram maiores e mais frequentes em pacientes que não sobrevivem à sepse do que em pacientes que sobrevivem (Szrama et al., 2009). Já, em relação ao perfil lipídico, os níveis de colesterol e triglicerídeos tendem a ser reduzidos durante a sepse e esse grau de redução está diretamente relacionado à severidade da sepse. Ademais, estudos vem demonstrando que a hipocolesterolemia é persistente e pode se estender para até quatro semanas após o episódio da sepse (Delirrad et al., 2020; Laudanski, 2021).

Neste estudo, nós não verificamos diferenças significativas no perfil glicêmico e na glicemia em jejum entre os grupos experimentais, demonstrando que possíveis variações glicêmicas que ocorreram nos grupos CLP e CAF-CLP durante a fase aguda da sepse foram normalizadas após essa fase. Entretanto, esses achados não eram esperados na comparação entre os grupos alimentados com dieta padrão e os grupos alimentados com dieta de cafeteria, uma vez que a obesidade induzida por essa abordagem dietética é capaz de promover intolerância oral a glicose e hiperglicemia (dos Reis Costa et al., 2022; Rodriguez et al., 2004). Em relação ao perfil lipídico, como esperado, somente os grupos CAF e CAF-CLP apresentaram aumento dos níveis séricos de colesterol total comparados aos grupos controle e CLP, respectivamente, o que sugere que possíveis alterações nos níveis de colesterol durante sepse foram normalizadas (dos Reis Costa et al., 2022; Rodríguez et al., 2004). Contudo, os níveis de triglicerídeos se mostraram significativamente aumentados no grupo CLP comparado ao grupo controle, o que não foi verificado entre os grupos CAF e CAF-CLP, demonstrando que, possivelmente, o aumento dos níveis de triglicerídeos durante a fase aguda da sepse não foi normalizado no grupo CLP.

Resultados obtidos de estudos clínicos e pré-clínicos ainda são controversos quanto os efeitos da obesidade na gravidade e progressão da sepse. Kaplan et al. (2016) mostraram que camundongos alimentados com dieta *high-fat*, por 6-7 semanas, apresentavam redução no tempo e probabilidade de sobrevivência, após a indução da sepse, em comparação com os camundongos alimentados com dieta padrão (Kaplan et al., 2016). De modo similar, em um estudo de coorte retrospectivo, Papadimitriou-Olivgeris et al. (2016) observaram que pacientes obesos, quando

admitidos na UTI devido à um quadro de sepse, apresentavam taxas de mortalidade maiores comparados aos pacientes não obesos (Papadimitriou-Olivgeris et al., 2016).

De maneira distinta, Siegl et al. (2014) verificaram que camundongos alimentados com dieta *high-fat*, por 12 semanas, tiveram um aumento significativo no tempo e na probabilidade de sobrevivência em relação aos camundongos alimentados com dieta padrão. Associado a essa melhora, os autores observaram, 24 horas após a indução dessa condição, um aumento significativo do número de neutrófilos nos animais *high-fat* em comparação com os animais dieta padrão. Esses achados levaram os autores a sugerir que, possivelmente, os neutrófilos têm um papel-chave na melhora da severidade e progressão da sepse nos animais *high-fat* (Siegl et al., 2014). O papel protetor da obesidade também foi descrito por Prescott et al. (2014), os quais, através de um estudo de coorte retrospectivo, verificaram que a obesidade reduziu a mortalidade, a curto e longo prazos, em pacientes que foram hospitalizados após um quadro de sepse (Prescott et al., 2014).

Sabendo dessa controvérsia existente entre os achados da literatura, nós decidimos verificar a morbimortalidade dos animais experimentais, buscando entender qual o impacto da obesidade induzida pela dieta de cafeteria na severidade e progressão da sepse. Contrariando os achados de estudos prévios, nossos resultados demonstraram que a obesidade induzida pela dieta de cafeteria não influencia no tempo e na probabilidade de sobrevivência à sepse, uma vez ambos os grupos, CLP e CAF-CLP, apresentaram percentuais de mortalidade similares. Os nossos resultados corroboram os achados de um estudo de coorte retrospectivo recentemente publicado por Tay-Lasso et al. (2022), que observaram que pacientes considerados obesos (IMC: ≥ 30 kg/m²), admitidos, no hospital, com complicações desencadeadas por um quadro de sepse, tem um risco de mortalidade similar quando comparados à pacientes considerados magros (IMC: < 30 kg/m²) (Tay-Lasso et al., 2022).

A obesidade induzida pela dieta de cafeteria também mostrou não influenciar na gravidade da sepse, já que as variações temporais das pontuações do escore clínico foram similares entre os grupos CLP e CAF-CLP, ocorrendo uma piora dos sinais clínicos no 1º dia após a indução da sepse e significativa melhora desses sinais

no 2° e 3° dias, o que persistiu até o 14° dia. Apesar dessa ausência de diferença entre os grupos, o escore clínico do grupo CLP se manteve significativamente aumentado, até o 3° dia após a indução da sepse, comparado ao do grupo controle, o que não foi observado para o grupo CAF-CLP quando comparado ao grupo CAF. Isso sugere que, embora a severidade da sepse seja similar entre os grupos, o grupo CAF-CLP parece ter um tempo de recuperação menor que o do grupo CLP. Assim como escore clínico, a contagem total de leucócitos também foi utilizada para avaliação da severidade da sepse nos animais experimentais. De maneira similar aos resultados obtidos no escore clínico, a contagem de leucócitos circulantes, particularmente representada pelos neutrófilos, se mostrou significativamente aumentada em ambos os grupos CLP e CAF-CLP, quando comparados aos grupos controle e CAF, respectivamente. Esses achados demonstram que o aumento do número de neutrófilos que, possivelmente, ocorreu na fase aguda da sepse persistiu nos animais do grupo CLP e CAF-CLP, o que ressalta a importância dessas células na sobrevivência à sepse, conforme previamente sugerido por Siegl et al. (2022).

Uma vez que a obesidade induzida por dieta de cafeteria não influencia significativamente na morbimortalidade à sepse, nós nos questionamos se ela poderia impactar nas respostas cardiovasculares de animais sobreviventes à sepse. Em um estudo de coorte de base populacional recentemente publicado, Angriman et al. (2022) verificaram que adultos sobreviventes à sepse apresentavam maior incidência de complicações cardiovasculares (Angriman et al., 2022). Esses achados são consistentes com os já descritos em uma série de outros estudos prévios que, em geral, vem destacando a existência de uma potencial associação entre a sepse e a ocorrência de eventos cardiovasculares adversos (Jafarzadeh et al., 2016; Ou et al., 2016; M. H. Wu et al., 2019; Yende et al., 2014). Logo, a sepse tem demonstrado ser um fator de risco importante para o desenvolvimento e progressão das DCVs à longo prazo. Dentre as desordens cardiovasculares mais comuns observadas em indivíduos sobreviventes à sepse estão: infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, acidente vascular encefálico, arritmias ventriculares e morte cardíaca súbita (Kosyakovsky et al., 2021; Ou et al., 2016).

Apesar do conhecimento da associação entre sepse e complicações cardiovasculares subsequentes, pouco ainda se sabe sobre essas desordens

cardiovasculares em modelos animais. Em relação às características estruturais cardíacas, nós observamos uma redução significativa do peso dos corações de camundongos do grupo CLP, quando comparado ao do grupo controle. Esses achados corroboram os já descritos por Busch et al. (2021), os quais verificaram que, quatro dias após a indução da sepse, o peso dos corações de camundongos sépticos se mostrava significativamente reduzido em relação aos de camundongos sham, levando-os a propor a ocorrência de atrofia cardíaca desencadeada pela sepse (Busch et al., 2021). Isso, no entanto, parece não ocorrer nos corações de camundongos alimentados com dieta de cafeteria e sobreviventes à sepse, uma vez que o peso dos corações dos animais do grupo CAF-CLP foi significativamente maior quando comparado ao do grupo CLP, aumento esse que também foi observado no grupo CAF, quando comparado ao grupo controle. Logo, nossos resultados sugerem que a atrofia cardíaca desencadeada pela sepse não ocorreu nos animais do grupo CAF-CLP, o que possivelmente se deve à uma hipertrofia cardíaca ocasionada pela obesidade induzida pela dieta de cafeteria. A fim de confirmar esses resultados, maiores estudos, avaliando o número e a área dos cardiomiócitos, se fazem necessários, já que nenhuma alteração na deposição de colágeno na matriz extracelular foi verificada entre os grupos experimentais.

Além das características estruturais cardíacas, nós também investigamos a atividade elétrica dos corações dos animais experimentais. Nossos resultados demonstraram um encurtamento do complexo QRS e dos intervalos PR e QT_c no grupo CLP, quando comparado ao grupo controle. Esses resultados sugerem a ocorrência de uma diminuição da sístole eletrocardíaca, que foi, primeiramente, descrita por Breijo-Marquez (2008), sendo caracterizada por uma estimulação atrioventricular acelerada associada à uma repolarização ventricular precoce e encurtada (Breijo-Marquez, 2008). De acordo com esse autor, a denominação “diminuição da sístole eletrocardíaca” advém do fato de que, em muitos estudos, a sístole elétrica cardíaca é considerada como o período que se inicia no ramo ascendente da onda P (que representa o início da despolarização atrial) e termina no ramo descendente da onda T (que representa o final da repolarização ventricular), até atingir o traçado da linha isoeletrica do eletrocardiograma (R. Breijo-Márquez, 2021). Esse tipo de padrão eletrocardiográfico, em que há o encurtamento do intervalo PR ao lado do encurtamento do intervalo QT_c, pode ser ou não acompanhado de

sintomas, dentre os quais destacam-se: síncope (perda total da consciência), taquicardia, fibrilação ventricular ou mesmo morte súbita (Breijo-Marquez, 2008; R. Breijo-Márquez, 2021). A propósito, nossos resultados demonstraram uma tendência de aumento da frequência cardíaca no grupo CLP, o que é um indicativo da ocorrência de taquicardia nos animais desse grupo.

De maneira distinta ao grupo CLP, o grupo CAF-CLP não apresentou encurtamento dos intervalos PR e QT_c, sendo verificado somente um encurtamento do complexo QRS, o que parece ser um efeito da obesidade, uma vez que o grupo CAF apresentou um encurtamento de QRS similar. Além do encurtamento do complexo QRS, o grupo CAF-CLP apresentou uma redução da frequência cardíaca, o que também parece ser um efeito da obesidade induzida pela dieta de cafeteria, já que o grupo CAF mostrou uma diminuição similar. O estreitamento do complexo QRS, na ausência de aumento da frequência cardíaca, sugere um aumento da condução ventricular, que, normalmente, tem origens supraventriculares ou no feixe de His (Gun Song, 2022). Esse perfil pode propiciar o surgimento de arritmias de entrada ou arritmias desencadeadas pelo Ca²⁺ diastólico, como as derivadas de pós-despolarizações atrasadas (em inglês, *delayed afterdepolarizations* (DADs)) (Wehrens, 2007). Contudo, para saber a origem do encurtamento do complexo QRS, maiores informações, sobre a eletrofisiologia celular e dinâmica de Ca²⁺ das células cardíacas do grupo CAF-CLP, são necessárias.

Sendo assim, em relação à atividade elétrica, é possível inferir que camundongos alimentados com dieta de cafeteria e sobreviventes à sepse não apresentam alterações significativas dos principais segmentos e ondas do eletrocardiograma, quando comparado aos camundongos alimentados com dieta padrão e sobreviventes à sepse. Além disso, tanto a dieta de cafeteria por si só, quanto a sepse, provocam alterações que sugerem condução acelerada cardíaca e, no caso dos animais do grupo CLP, um aumento da frequência cardíaca. Essas alterações possivelmente estão relacionadas às alterações autonômicas e inflamatórias desencadeadas por ambas, sepse e obesidade (Alamili et al., 2015; Triggiani et al., 2017). Logo, o impacto do sistema autonômico e inflamatório sobre a atividade elétrica cardíaca e dos cardiomiócitos precisa ser melhor elucidado.

Uma vez que foi verificada alterações na atividade elétrica cardíaca entre os grupos experimentais, decidimos avaliar, então, como estaria a função do coração e dos cardiomiócitos isolados. Nossos resultados não demonstraram alteração significativa nos parâmetros funcionais, tanto do coração, quanto dos cardiomiócitos isolados, entre os grupos controle e CAF. De modo semelhante, nenhuma alteração significativa foi verificada nos parâmetros de função ventricular (PDVE, dp/dt_{max} e dp/dt_{min}) entre os grupos controle e CLP. Contudo, o grupo CLP mostrou uma redução significativa na velocidade de contração dos cardiomiócitos, o que foi acompanhada por redução na fração de encurtamento e no tempo de contração, em comparação ao grupo Controle.

Estudos prévios demonstram que o prejuízo da função cardíaca, denominada de cardiomiopatia séptica, é uma importante complicação da sepse (H. Lin et al., 2020). De maneira similar aos nossos achados, Niederbichler et al. (2006) verificaram que os cardiomiócitos de camundongos submetidos à indução da sepse apresentavam uma redução significativa da velocidade de contração, acompanhada de uma redução na fração de encurtamento e, diferentemente, de um aumento no tempo máximo de contração (Niederbichler et al., 2006). Apesar de ser uma intercorrência comum associada à sepse, a disfunção cardíaca é considerada um evento agudo e potencialmente reversível, podendo essa reversão ocorrer ainda durante o estágio inicial da sepse (H. Lin et al., 2020). Logo, os resultados do presente estudo demonstram que, possivelmente, o prejuízo da função cardíaca, em nível celular, ocorreu durante a fase aguda da sepse nos animais do grupo CLP e não foi posteriormente revertido. Diante disso, como já mencionado por Lv & Wang (2016), é importante que análises mais detalhadas - avaliando a função cardíaca antes, durante e depois da sepse - sejam realizadas, uma vez que existe a possibilidade de que a disfunção cardíaca não seja completamente reversível em indivíduos sobreviventes à sepse (Lv & Wang, 2016).

Em relação ao grupo CAF-CLP, por sua vez, nós observamos aumento significativo de todos os parâmetros de função ventricular (PDVE, dp/dt_{max} e dp/dt_{min}) e, portanto, das respostas inotrópicas e lusitrópicas cardíacas, quando comparado ao grupo CLP. Esse padrão de resposta também foi observado para a função dos cardiomiócitos, em que as velocidades de contração e de relaxamento e a fração de

encurtamento dos cardiomiócitos do grupo CAF-CLP se mostraram significativamente aumentadas em relação ao grupo CLP, sem nenhuma alteração observada no tempo de contração e de relaxamento. O aumento das velocidades de contração e de relaxamento no grupo CAF-CLP também foi significativo quando comparado ao grupo CAF, demonstrando que as alterações desses parâmetros não são só um efeito da obesidade induzida pela dieta de cafeteria, mas um efeito, em conjunto, obesidade e da sepse. É importante ressaltar que esses achados são contrários ao que era esperado, uma vez que alguns estudos da literatura demonstraram que a obesidade, incluindo àquela induzida em curto prazo de tempo, pode ter efeitos deletérios nos corações de camundongos após a sepse, levando ao aumento dos níveis de marcadores inflamatórios, que poderiam agravar os danos morfológicos e funcionais já provocados pela sepse (DeMartini et al., 2017; Petroni et al., 2022; Petronilho et al., 2016). Portanto, de maneira distinta ao que foi demonstrado por estes estudos prévios, nossos resultados revelam que a obesidade induzida pela dieta de cafeteria melhora, em geral, a função basal intrínseca dos corações de camundongos sobreviventes à sepse.

Além de analisar a função contrátil do ventrículo esquerdo em condições basais, nós decidimos verificá-la também após estresse farmacológico com isoprenalina. De modo contrário ao observado em condições basais, o grupo CAF-CLP demonstrou redução significativa de todos os parâmetros de função ventricular em comparação ao grupo CLP. Além desse aumento em relação ao grupo CAF-CLP, o grupo CLP apresentou um aumento significativo da PDVE e dp/dt_{max} em comparação ao grupo controle. Logo, o grupo CAF-CLP, apesar de ter uma função cardíaca aumentada em condições basais, apresentam capacidade de resposta, inotrópica e lusitrópica, significativamente reduzida frente ao estímulo farmacológico e, quando comparado ao grupo CLP. Sendo assim, é arriscado afirmar que a obesidade induzida por dieta de cafeteria é protetora para a função cardíaca dos animais sobreviventes à sepse, uma vez que o aumento verificado da função cardíaca intrínseca pode apenas ser um mecanismo fisiológico compensatório, devido à ativação de sistemas neuro-humorais, induzido pela obesidade, que, apesar de serem efetivas a curto prazo, podem desencadear consequências adversas a longo prazo, que predisõem o desenvolvimento da insuficiência cardíaca (Eichhorn & Bristow, 1996; Mann & Bristow, 2005).

Associado ao prejuízo na função cardíaca, já é bem estabelecido que a sepse provoca disfunção vascular, que é caracterizada, no geral, por diminuição da responsividade vascular à vasoconstritores clinicamente utilizados, o que é denominado vasoplegia (Mishra & Choudhury, 2018). Em relação aos vasos de condutância, tais como a aorta e a artéria mesentérica superior, Barp et al. (2020) observaram que, 24 horas após a indução da sepse, a resposta contrátil desses vasos à um estímulo vasoconstritor foi significativamente reduzida em ratos sépticos, quando comparados à ratos *naive* (Barp et al., 2020). Esses resultados corroboram os obtidos em outros estudos, em que hiporesponsividade vascular desencadeada pela sepse também foi verificada nos tempos de 6, 12 e 20 horas após a indução da sepse (T. C. Peng et al., 2018; Rungsung et al., 2022; Singh et al., 2018).

Contudo, ainda não está claro se essa hiporesponsividade vascular à agentes vasoconstritores persiste ou não em sobreviventes à sepse. Em um estudo publicado por Merdji et al. (2021), o prejuízo da resposta contrátil à PE verificado em aortas de animais sépticos durante a fase aguda persistiu até 90 dias após a indução da sepse (Merdji et al., 2021). P. de Souza et al. (2016), por sua vez, não verificaram diferença significativa na resposta contrátil à PE entre as aortas dos grupos controle e sobrevivente à sepse, após 30 e 60 dias da indução da sepse. Contudo, no tempo de 60 dias após a indução da sepse, a resposta contrátil à angiotensina II das aortas dos animais do grupo sobrevivente à sepse foi significativamente aumentada, em comparação à do grupo controle (de Souza et al., 2016). Sendo assim, apesar da diferença em relação aos resultados apresentados por estes dois estudos, ambos demonstram que os impactos da sepse sobre a função vascular podem persistir a longo prazo, ressaltando, assim, a importância de estudos adicionais para entender melhor as respostas vasculares após a sepse.

Baseado nesses estudos, nós decidimos avaliar as respostas vasculares nos camundongos sobreviventes à sepse e se a obesidade induzida pela dieta de cafeteria poderia ter alguma influência sobre elas. De maneira similar aos achados descritos por P. de Souza et al. (2016), nossos resultados não mostraram diferença significativa na resposta contrátil induzida pela PE entre os grupos controle e CLP. Contudo, em relação aos grupos CAF e CAF-CLP, nós verificamos uma redução significativa da resposta contrátil à PE no grupo CAF-CLP, em comparação ao grupo CAF. Esse

prejuízo da resposta contrátil do grupo CAF-CLP ficou ainda mais evidente, quando avaliamos, em um mesmo gráfico, as curvas cumulativas concentração-resposta para PE de todos os grupos experimentais, uma vez que verificamos que a resposta contrátil do grupo CAF se mostrou significativamente reduzida em relação ao grupo Controle, e essa redução foi ainda maior no grupo CAF-CLP, cuja resposta contrátil foi significativamente diminuída comparada ao grupo CLP. Logo, esses achados, em conjunto, sugerem que a obesidade induzida pela dieta de cafeteria causou um prejuízo na resposta contrátil à PE, que foi acentuado nos animais sobreviventes à sepse. Em outras palavras, como já era esperado, a obesidade induzida pela dieta cafeteria foi capaz de alterar a função contrátil vascular dos animais sobreviventes à sepse.

É válido salientar que, apesar das alterações verificadas na resposta contrátil à PE, nenhuma diferença significativa foi observada na resposta de relaxamento induzida pela ACh entre os grupos experimentais. Esse perfil de hiporresponsividade vascular à PE, sem alterações na resposta de relaxamento à ACh, que verificamos nos animais alimentados com dieta de cafeteria, corrobora os achados obtidos, previamente, por dos Reis Costa et al. (2022), os quais também observaram uma redução da resposta contrátil a PE, na ausência de disfunção endotelial, em aortas de animais alimentados com dieta de cafeteria por 4 semanas (dos Reis Costa et al., 2022). De fato, alguns estudos vêm demonstrando que as dietas hipercalóricas podem induzir uma redução significativa na resposta contrátil aórtica frente à um estímulo vasoconstritor (Battault et al., 2018; Jerez et al., 2012; Santos et al., 2017). De acordo com Jerez et al. (2012), essa hiporresponsividade vascular poderia ser um mecanismo compensatório adaptativo em resposta às alterações hemodinâmicas, particularmente, o aumento da pressão arterial, causadas pela obesidade. Esses autores também sugerem que o estímulo produzido pelo agente vasoconstritor levaria à uma ação vascular neutralizadora e contrária, através da liberação de vasodilatadores derivados do endotélio, o qual poderia ser considerado o principal mediador da hiporresponsividade aórtica associada à obesidade (Jerez et al., 2012).

Sabendo da importância endotelial na hiporreatividade vascular associada à obesidade, nós decidimos avaliar se o endotélio poderia estar envolvido na hiporreatividade aórtica verificada no grupo CAF-CLP. Os nossos resultados

mostraram que a remoção da camada endotelial foi capaz de reverter completamente a redução da resposta contrátil a PE observada no grupo CAF-CLP. Logo, corroborando o que foi descrito por Jerez et al. (2012), a camada endotelial é um mediador essencial na hiporresponsividade aórtica em animais obesos alimentados com dieta de cafeteria e sobreviventes à sepse (Jerez et al., 2012).

O endotélio é considerado um importante órgão endócrino, parácrino e autócrino, que desempenha um papel-chave na regulação do tônus vascular, através da liberação de fatores que podem modular a contração e o relaxamento das células musculares lisas. São vários os fatores vasoativos liberados pelo endotélio (Sandoo et al., 2015; Zaborska et al., 2017). Entre os vasodilatadores, o NO merece destaque, uma vez que tem sido descrito mediando a hiporreatividade vascular associada à obesidade ou à sepse.

Em relação à obesidade, um estudo publicado por Battault et al. (2018) demonstrou que a hiporresponsividade vascular à PE, em aortas de ratos alimentados com dieta rica em açúcares e gorduras, envolve a ativação da eNOS e, conseqüente, produção do NO (Battault et al., 2018). Quando produzido pela eNOS nas células endoteliais, o NO difunde-se para as células musculares lisas, onde é capaz de interagir diretamente com os canais para K^+ (Bolotina et al., 1994), hiperpolarizando a membrana e reduzindo o influxo de Ca^{2+} ; ou ativando a GCs, que é capaz de catalisar a reação de conversão de guanossina-trifosfato (GTP) à guanossina 3',5'-monofosfato cíclico (GMP_c), que atuará como segundo mensageiro na ativação da proteína quinase dependente de GMP_c (PKG) (Gao, 2010). A PKG fosforila uma série de resíduos protéicos que culminando com a diminuição dos níveis globais citoplasmáticos de Ca^{2+} , levando à defosforilação da cadeia leve da miosina e, conseqüentemente, à redução da atividade vasopressora da PE (Lincoln et al., 2001; Santos et al., 2017).

Diferente do descrito para obesidade, onde a eNOS parece ter um papel essencial, os estudos demonstram que, na sepse, as isoformas iNOS e nNOS estão, majoritariamente, envolvidas na hiporreatividade vascular. Korkmaz et al. (2011) verificaram que a hiporreatividade vascular frente à um estímulo vasoconstritor, em aortas de ratos submetidos à endotoxemia, envolvia a via de sinalização mediada pelo aumento da expressão e atividade da iNOS, levando à produção do NO e,

consequente, aumento das atividades de GCs e PKG, culminando com a redução da responsividade vascular (Korkmaz et al., 2011). Já, um estudo publicado por Nardi et al. (2014), mostrou que a sepse induzia um aumento da expressão da nNOS e da GCs e uma alta produção de GMP_c , fatores esses que, em conjunto, poderiam explicar a disfunção vascular observada em ratos sépticos (Nardi et al., 2014).

Considerando, então, a importância da via de sinalização - mediada por NOS, NO, GCs e PKG - na hiporreatividade vascular associada à obesidade ou à sepse, nós decidimos avaliar o envolvimento dessa via na hiporreatividade vascular observada no grupo CAF-CLP. De acordo com os nossos resultados, a redução na resposta contrátil à PE das aortas do grupo CAF-CLP foi parcialmente revertida pela inibição não-seletiva da NOS, o que demonstra que esta enzima está envolvida na hiporreatividade vascular do grupo CAF-CLP. Contudo, as inibições seletivas da iNOS e da nNOS não foram capazes de restaurar a resposta contrátil a PE do grupo CAF-CLP. Logo, as isoformas iNOS e nNOS não estão envolvidas na hiporresponsividade vascular à PE do grupo CAF-CLP. Esses achados foram também confirmados pela técnica de imunofluorescência, em que não foi observada diferença significativa na intensidade de fluorescência emitida pela imunomarcagem da iNOS e da nNOS entre os grupos CLP e CAF-CLP.

Associado a esses resultados, a inibição da GCs reverteu parcialmente a resposta contrátil a PE do grupo CAF-CLP, o que não foi observado quando houve o bloqueio dos canais para K^+ . Portanto, em conjunto, esses achados nos levam a sugerir que a hiporreatividade vascular à PE observada em aortas do grupo CAF-CLP se deve, em parte, à ativação da via de sinalização composta por eNOS, NO e GCs. No entanto, para confirmar o envolvimento dessa via de sinalização, estudos adicionais se fazem necessários, em que poderiam ser avaliados: 1) a expressão e atividade da eNOS (Battault et al., 2018), uma vez que as análises de imunofluorescência não demonstraram diferença significativa na intensidade de fluorescência emitida pela imunomarcagem da eNOS entre os grupos CLP e CAF-CLP; e 2) os níveis de NO e GMP_c (Nardi et al., 2014).

A atividade da eNOS pode ser dinamicamente regulada por modificações pós-traducionais, que ocorrem em respostas à estímulos fisiológicos ou fisiopatológicos.

Dentre essas modificações, a fosforilação protéica merece destaque, podendo a eNOS ser fosforilada em diferentes sítios, que incluem os resíduos de serina, treonina e tirosina, que irão definir se a enzima será ativada ou inativada (Qian & Fulton, 2013). Estudos tem mostrado que a proteína quinase B (Akt) - que é uma serina/treonina quinase multifuncional ativada pela fosfoinosítideo 3-quinase (PI3K) - é capaz de fosforilar e ativar a eNOS, levando à produção do NO. Isso tem levado a via de sinalização PI3K/Akt/eNOS ser considerada importante para a manutenção do tônus vascular e integridade endotelial (X. Q. Peng et al., 2010).

Baseado nessas informações e considerando que a atividade da eNOS está, possivelmente, envolvida na hiporreatividade aórtica à PE do grupo CAF-CLP, nós decidimos verificar se a via de sinalização PI3K/Akt poderia também estar participando dessa resposta vascular. No entanto, a inibição seletiva da enzima PI3K não foi capaz de reverter a redução da resposta contrátil à PE observada no grupo CAF-CLP, em comparação ao grupo CLP, sugerindo que a via de sinalização PI3K/Akt não está envolvida na hiporresponsividade vascular.

Outra via de sinalização, cujo envolvimento na regulação da fosforilação da eNOS e produção do NO vem sendo descrito, é a via composta pelas proteínas quinases MEK 1/2 e ERK1/2, que tem sido mostrada estimulando a função endotelial, principalmente a vasodilatação, migração celular e angiogênese (J. Wu et al., 2021). Em relação ao seu papel durante a sepse, alguns estudos, com modelos experimentais de endotoxemia, já demonstraram que a ativação da via de sinalização MEK1/2-ERK1/2 leva ao aumento da expressão e atividade da NOS, particularmente a iNOS, e, conseqüente, aumento da produção de NO, o que poderia contribuir para a hiporreatividade vascular à agentes vasoconstritores e diminuição da pressão arterial em ratos endotoxêmicos (Korkmaz et al., 2006, 2011; B. Tunctan et al., 2007).

Sabendo disso, investigamos se esta via estaria envolvida na hiporresponsividade aórtica observada no grupo CAF-CLP. Os nossos resultados demonstraram que a inibição seletiva das enzimas MEK1/2 reduziu significativamente a resposta contrátil à PE em ambos os grupos, CLP e CAF-CLP. Contudo, essa diminuição da resposta contrátil à PE foi proporcionalmente maior no grupo CLP, de modo que, quando avaliamos, em um mesmo gráfico, as curvas cumulativas

concentração-resposta para PE dos dois grupos, verificamos que a diferença significativa de E_{max} da PE existente entre os grupos foi abolida, porém a diferença de potência da PE persistiu. Logo, esses achados sugerem que a via de sinalização MEK1/2-ERK1/2 está parcialmente envolvida na hiporreatividade vascular à PE do grupo CAF-CLP. No entanto, diferentemente do que era esperado, esse envolvimento possivelmente não se dá pela ativação da eNOS e estímulo da produção do NO.

De acordo com relatos da literatura, a via de sinalização MEK1/2-ERK1/2, além de mediar a vasodilação por meio da ativação da NO e estímulo da produção do NO, também tem um papel importante nas respostas contráteis dependentes do endotélio. Quando fosforilada, ERK1/2 está ativa e é capaz de modular a atividade de caldesmon e calponina, que são proteínas responsáveis pela regulação da interação dos filamentos de actina e miosina e que, dessa forma, promovem a contração vascular (Bhattacharya et al., 2011; Sousa-Lopes et al., 2020). Sendo assim, nós sugerimos que possivelmente a atividade de ERK1/2 está reduzida em aortas do grupo CAF-CLP, em comparação ao grupo CLP, e que isso levaria à uma menor fosforilação de caldesmon e calponina, prejudicando, assim, a resposta contrátil vascular à PE. Logo, mais estudos são necessários na tentativa de avaliar se, de fato, existe diferença significativa na fosforilação e, portanto, na ERK1/2 entre os grupos CLP e CAF-CLP.

Além do NO, outros fatores vasoativos produzidos no endotélio são os prostanóides vasodilatadores derivados da COX, que são a prostaciclina (PGI_2) (que é prioritariamente vasodilatadora) e a prostaglandina E_2 (PGE_2) (que pode ser tanto vasoconstritora, quanto vasodilatadora). Esses prostanóides podem ser produzidos pelas isoformas da COX, COX-1 e COX-2, que, apesar de ter um alto nível de homologia, têm atividades e expressões reguladas de maneira diferente (Félétou et al., 2011). Em condições fisiológicas, a COX-1 é expressa em muitos tecidos, enquanto a COX-2 apenas em alguns poucos tecidos, e ambas produzem níveis baixos de prostanóides suficientes para a manutenção da homeostase. Contudo, em condições fisiopatológicas, tais como inflamação e dano de órgão, a expressão da COX-2 é consideravelmente aumentada, elevando, conseqüentemente, à produção de prostanóides, o que pode gerar efeitos deletérios (Ozer et al., 2017). Estudos vem demonstrando que, durante à sepse, ocorre uma superexpressão da COX-2, levando a um aumento significativo dos níveis de PGI_2 e PGE_2 , os quais, por sua vez,

contribuem com a hiporresponsividade vascular à agentes vasoconstritores desencadeada pela sepse (Kimmoun et al., 2013; Ozer et al., 2017; Bahar Tunctan et al., 2013).

Baseados nessas informações, nós decidimos avaliar se a COX estaria envolvida na hiporreatividade vascular observada no grupo CAF-CLP. De modo interessante, a inibição não-seletiva da COX reduziu significativamente a resposta contrátil à PE do grupo CLP, sem, no entanto, provocar alterações na resposta contrátil à PE do grupo CAF-CLP. Quando, por sua vez, avaliamos, em um mesmo gráfico, as curvas cumulativas-concentração resposta para PE de ambos os grupos, observamos que a resposta contrátil a PE do grupo CLP foi reduzida à um nível similar ao do grupo CAF-CLP, de modo que a diferença significativa da resposta contrátil a PE existente entre os grupos foi perdida após a inibição não-seletiva da COX. Logo, esses achados sugerem que, de fato, a COX está envolvida na hiporreatividade vascular à PE observada no grupo CAF-CLP, porém esse envolvimento parece não ocorrer pelo aumento da produção de prostanóides vasodilatadores, mas pela redução da produção de prostanóides vasoconstritores.

O envolvimento da COX na hiporreatividade vascular à PE do grupo CAF-CLP foi também confirmado por meio da técnica de imunofluorescência. Os resultados mostraram que intensidade de fluorescência da imunomarcagem de COX-2 se mostrou significativamente aumentada, nas camadas íntima e média, das aortas do grupo CAF-CLP, quando comparado com as aortas do grupo CLP. Logo, nós sugerimos que possivelmente esteja acontecendo um aumento na expressão de COX-2 na tentativa de compensar o prejuízo na produção de prostanóides vasoconstritores verificado em aortas do grupo CAF-CLP. Assim sendo, mais estudos se fazem necessários na tentativa de: 1) avaliar a expressão de COX-2; e 2) mensurar os níveis de prostanóides vasoconstritores, como tromboxano A₂ (TXA₂) e prostaglandina 2- α (PGF₂ α).

Além do NO e dos prostanóides derivados de COX, o envolvimento de outros fatores de relaxamento endoteliais, tais como o H₂O₂ e os peptídeos derivados do sistema renina-angiotensina, também foram investigados. Tanto os peptídeos derivados do sistema renina-angiotensina, como o H₂O₂, têm sido descritos como mediadores importantes para a manutenção da função endotelial em processos

fisiológicos e fisiopatológicos (Costa et al., 2021; Holtz & Goetz, 1994). Contudo, com base nos nossos resultados, descartamos a participação desses fatores na hiporresponsividade aórtica observada no grupo CAF-CLP. Além disso, o envolvimento dos canais para Ca^{2+} também foi investigado, uma vez que a mobilização de cálcio intracelular já foi descrita estando associada à hiporreatividade vascular desencadeada pela sepse (Nonato et al., 2016). No entanto, as respostas de relaxamento induzida pelo bloqueio dos canais para Ca^{2+} dependentes de voltagem do tipo L não apresentou diferença significativa entre os grupos CLP e CAF-CLP, o que sugere que os canais para Ca^{2+} não estão envolvidos na hiporresponsividade aórtica observada no grupo CAF-CLP.

Os pacientes que sobrevivem à sepse apresentam um risco aumentado de infecções recorrentes nos primeiros anos após o episódio da sepse (T. Wang et al., 2014). Estudos vem demonstrando que essa maior susceptibilidade à infecções secundárias, causadas, principalmente, por microorganismos oportunistas, pode estar associada às alterações na imunidade inata e adaptativa provocadas pela sepse, que se estendem por um longo período de tempo após a recuperação clínica e são, no geral, caracterizadas pela imunossupressão, inflamação crônica e persistência bacteriana (Delano & Ward, 2016; Nascimento et al., 2021). O modelo experimental de sepse, denominado *two-hit*, foi desenvolvido por Muenzer et al. (2006) e tem se mostrado uma ferramenta importante para o estudo da sepse e da desregulação imunológica, à longo prazo, por ela desencadeada. Esse modelo é baseado na indução, primeiramente, da sepse, que é considerada o primeiro *hit* e, a seguir, da infecção com o microorganismo oportunista, que, por sua vez, é considerada o segundo *hit*, buscando mimetizar o que normalmente é observado na prática clínica (Muenzer et al., 2006).

Dentre os microorganismos oportunistas, o *Aspergillus sp.* vem sendo considerado a principal causa de infecção pulmonar secundária (Zhao et al., 2021). Logo, para avaliar se as alterações cardiovasculares observadas em camundongos obesos alimentados com dieta de cafeteria e sobreviventes à sepse poderiam ser protetoras ou não à um novo desafio infeccioso, nós infectamos os animais com *Aspergillus fumigatus*. Os nossos resultados demonstraram que os animais do grupo CAF-CLP, quando comparados aos do grupo CLP, apresentaram uma tendência de maior sobrevivência à infecção, que foi acompanhada por uma menor redução de

peso corporal. Logo, esses achados sugerem que as respostas cardiovasculares observadas no grupo CAF-CLP poderiam ser protetoras à morbimortalidade diante de um novo desafio infeccioso, o que corrobora resultados de estudos clínicos que demonstram que a obesidade é capaz de conferir benefícios na severidade e progressão de infecções, tais como na sepse, embora às custas de alterações fisiopatológicas mais significativas (Lewis et al., 2022; Prescott et al., 2014; Rios-Diaz et al., 2017). No entanto, a fim de confirmar os achados obtidos, estudos adicionais, avaliando outros parâmetros de severidade e progressão da doença (Malacco et al., 2019), se fazem necessários. Além disso, é importante que essas análises sejam realizadas também em um modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria à longo prazo, uma vez que os achados obtidos podem não ser similares entre as abordagens dietéticas de curto e longo prazos (Timirci-Kahraman et al., 2018).

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra que, apesar de não influenciar na severidade da progressão da sepse, a obesidade induzida pela dieta de cafeteria por um curto período de tempo é capaz de provocar alterações significativas na função cardiovascular de sobreviventes à sepse. Os animais obesos alimentados com dieta de cafeteria e sobreviventes à sepse mostraram, em condições basais, serem protegidos de prejuízos elétricos e funcionais cardíacos desencadeados pela sepse. Contudo, em condições de estresse, pareceram estar predispostos à ocorrência de arritmias associadas a um prejuízo da função cardíaca. Além disso, esses animais apresentaram hiporresponsividade aórtica frente ao estímulo vasoconstritor induzido pela PE, que se mostrou mediada, essencialmente, por vias de sinalização endoteliais, envolvendo tanto um aumento do estímulo vasodilatador por meio da eNOS/NO/GCs, quanto um prejuízo do estímulo vasoconstritor por meio de MEK/ERK 1/2 e COX. Sendo assim, essas alterações cardiovasculares, em conjunto, parecem ser mecanismos compensatórios adaptativos desencadeados pela obesidade induzida pela dieta de cafeteria que poderiam conferir, aos sobreviventes à sepse, benefícios diante de infecções secundárias.

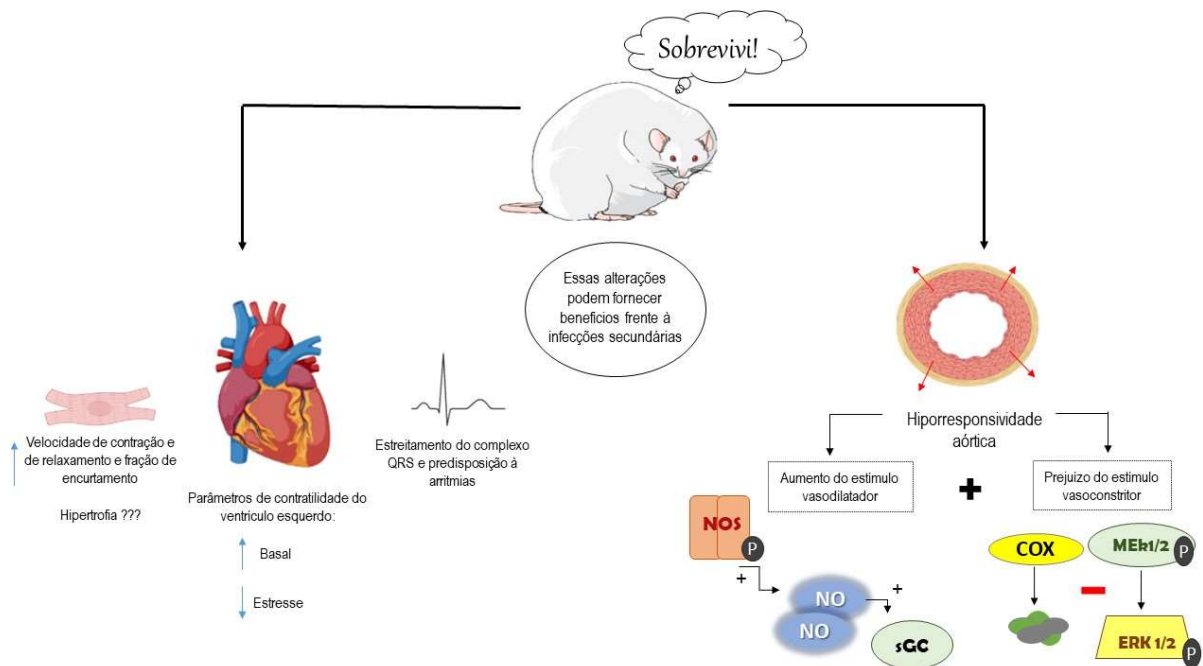


Figura 35: Figura ilustrativa das alterações cardiovasculares desencadeadas pela obesidade induzida pela dieta de cafeteria em camundongos sobreviventes à sepse. Elaborada pela autora com auxílio de biorender.com.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahrens, T. (2006). Hemodynamics in sepsis. *AACN Advanced Critical Care*, 17(4), 435–445. <https://doi.org/10.1097/01256961-200610000-00009>
- Alamili, M., Rosenberg, J., & Gögenur, I. (2015). Day-night variation in heart rate variability changes induced by endotoxaemia in healthy volunteers. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica*, 59(4), 457–464. <https://doi.org/10.1111/aas.12472>
- Almeida, N. R. C. de, Pontes, G. F., Jacob, F. L., Deprá, J. V. S., Porto, J. P. P., Lima, F. R. de, & Albuquerque, M. R. T. C. de. (2022). Análise de tendência de mortalidade por sepse no Brasil e por regiões de 2010 a 2019. *Revista de Saúde Pública*, 56, 25. <https://doi.org/10.11606/s1518-8787.2022056003789>
- Angriman, F., Rosella, L. C., Lawler, P. R., Ko, D. T., Wunsch, H., & Scales, D. C. (2022). Sepsis hospitalization and risk of subsequent cardiovascular events in adults: a population-based matched cohort study. *Intensive Care Medicine*, 48(4), 448–457. <https://doi.org/10.1007/s00134-022-06634-z>
- Barp, C. G., Benedet, P. O., & Assreuy, J. (2020). Perivascular adipose tissue phenotype and sepsis vascular dysfunction: Differential contribution of NO, ROS and beta 3-adrenergic receptor. *Life Sciences*, 254, 117819. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.117819>
- Battault, S., Meziat, C., Nascimento, A., Braud, L., Gayraud, S., Legros, C., De Nardi, F., Drai, J., Cazorla, O., Thireau, J., Meyer, G., & Reboul, C. (2018). Vascular endothelial function masks increased sympathetic vasopressor activity in rats with metabolic syndrome. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, 314(3), H497–H507. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2017>
- Bell, R. M., Mocanu, M. M., & Yellon, D. M. (2011). Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 50(6), 940–950. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2011.02.018>
- Bhattacharya, I., Damjanović, M., Perez Dominguez, A., & Haas, E. (2011). Inhibition of activated ERK1/2 and JNKs improves vascular function in mouse aortae in the absence of nitric oxide. *European Journal of Pharmacology*, 658(1), 22–27.

<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.053>

- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., & Cohen, R. A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, *368*(6474), 850–853. <https://doi.org/10.1038/368850a0>
- Bone, R. C., Balk, R. A., Cerra, F. B., Dellinger, R. P., Fein, A. M., Knaus, W. A., Schein, R. M. H., & Sibbald, W. J. (1992). Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest*, *101*(6), 1644–1655. <https://doi.org/10.1378/chest.101.6.1644>
- Bonenfant, J., Li, J., Nasouf, L., Miller, J., Lowe, T., Jaroszewski, L., Qiu, X., Thapamagar, S., Mittal, A., Godzik, A., Klein, W., & Nair, M. G. (2022). Resistin Concentration in Early Sepsis and All-Cause Mortality at a Safety-Net Hospital in Riverside County. *Journal of Inflammation Research*, *15*(July), 3925–3940. <https://doi.org/10.2147/JIR.S370788>
- Bornstein, S. R., Licinio, J., Tauchnitz, R., Engelmann, L., Negrão, A., Gold, P., & Chrousos, G. P. (1998). Plasma Leptin Levels Are Increased in Survivors of Acute Sepsis: Associated Loss of Diurnal Rhythm in Cortisol and Leptin Secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *83*(1), 280–283. <https://doi.org/10.1210/jcem.83.1.4610>
- Bortolin, R. C., Vargas, A. R., Gasparotto, J., Chaves, P. R., Schnorr, C. E., Martinello, K. B., Silveira, A. K., Rabelo, T. K., Gelain, D. P., & Moreira, J. C. F. (2018). A new animal diet based on human Western diet is a robust diet-induced obesity model: Comparison to high-fat and cafeteria diets in term of metabolic and gut microbiota disruption. *International Journal of Obesity*, *42*(3), 525–534. <https://doi.org/10.1038/ijo.2017.225>
- Breijo-Marquez, F. R. (2008). Decrease of electrical cardiac systole. *International Journal of Cardiology*, *126*(2), 36–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2007.12.051>
- Burgdorff, A. M., Bucher, M., & Schumann, J. (2018). Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. *Journal of International Medical Research*, *46*(4), 1303–1310. <https://doi.org/10.1177/0300060517743836>
- Busch, K., Kny, M., Huang, N., Klassert, T. E., Stock, M., Hahn, A., Graeger, S.,

- Todiras, M., Schmidt, S., Chamling, B., Willenbrock, M., Groß, S., Biedenweg, D., Heuser, A., Scheidereit, C., Butter, C., Felix, S. B., Otto, O., Luft, F. C., ... Fielitz, J. (2021). Inhibition of the NLRP3/IL-1 β axis protects against sepsis-induced cardiomyopathy. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 12(6), 1653–1668. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12763>
- Carbone, S., Lavie, C. J., & Arena, R. (2018). The Obesity Paradigm and Lifetime Risk of Cardiovascular Disease. *JAMA Cardiology*, 3(9), 894. <https://doi.org/10.1001/jamacardio.2018.1834>
- Cava, E., Neri, B., Grazia, M., Riso, S., & Carbone, S. (2020). *Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19 . The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect , the company ' s public news and information . January.*
- Celes, M. R. N., Prado, C. M., & Rossi, M. A. (2012). Sepsis: Going to the heart of the matter. *Pathobiology*, 80(2), 70–86. <https://doi.org/10.1159/000341640>
- Chait, A., & den Hartigh, L. J. (2020). Adipose Tissue Distribution, Inflammation and Its Metabolic Consequences, Including Diabetes and Cardiovascular Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 7(February), 1–41. <https://doi.org/10.3389/fcvm.2020.00022>
- Chooi, Y. C., Ding, C., & Magkos, F. (2019). The epidemiology of obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 6–10. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.09.005>
- Cichon, I., Ortmann, W., Santocki, M., Opydo-chanek, M., & Kolaczowska, E. (2021). Scrutinizing mechanisms of the ‘obesity paradox in sepsis’: Obesity is accompanied by diminished formation of neutrophil extracellular traps (nets) due to restricted neutrophil–platelet interactions. *Cells*, 10(2), 1–27. <https://doi.org/10.3390/cells10020384>
- Cisse, K., Samadoulougou, S., Ouedraogo, M., Kouanda, S., & Kirakoya-Samadoulougou, F. (2021). Prevalence of abdominal obesity and its association with cardiovascular risk among the adult population in Burkina Faso: Findings from a nationwide cross-sectional study. *BMJ Open*, 11(7), 1–12.

<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-049496>

- Costa, T. J., Barros, P. R., Arce, C., Santos, J. D., da Silva-Neto, J., Egea, G., Dantas, A. P., Tostes, R. C., & Jiménez-Altayó, F. (2021). The homeostatic role of hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide in the vasculature. *Free Radical Biology and Medicine*, *162*, 615–635. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.11.021>
- Crowell, K. T., Soybel, D. I., & Lang, C. H. (2017). Inability to replete white adipose tissue during recovery phase of sepsis is associated with increased autophagy, apoptosis, and proteasome activity. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, *312*(3), R388–R399. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00498.2016>
- Danninger, T., Rezar, R., Mamandipoor, B., Dankl, D., Koköfer, A., Jung, C., Wernly, B., & Osmani, V. (2022). Underweight but not overweight is associated with excess mortality in septic ICU patients. *Wiener Klinische Wochenschrift*, *134*(3–4), 139–147. <https://doi.org/10.1007/s00508-021-01912-0>
- De La Rica, A. S., Gilsanz, F., & Maseda, E. (2016). Epidemiologic trends of sepsis in western countries. *Annals of Translational Medicine*, *4*(17), 4–9. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.08.59>
- de Moura e Dias, M., dos Reis, S. A., da Conceição, L. L., Sediya, C. M. N. de O., Pereira, S. S., de Oliveira, L. L., Gouveia Peluzio, M. do C., Martinez, J. A., & Milagro, F. I. (2021). Diet-induced obesity in animal models: points to consider and influence on metabolic markers. *Diabetology and Metabolic Syndrome*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/s13098-021-00647-2>
- de Souza, P., Guarido, K. L., Scheschowitsch, K., da Silva, L. M., Werner, M. F., Assreuy, J., & da Silva-Santos, J. E. (2016). Impaired vascular function in sepsis-surviving rats mediated by oxidative stress and Rho-Kinase pathway. *Redox Biology*, *10*(August), 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.09.016>
- Delano, M. J., & Ward, P. A. (2016). The immune system's role in sepsis progression, resolution, and long-term outcome. *Immunological Reviews*, *274*(1), 330–353. <https://doi.org/10.1111/imr.12499>

- Delirrad, M., Gharebaghi, N., Mobarhan, S., & Nejadrahim, R. (2020). Relationship Between Lipid Profile and Sepsis Outcome in Intensive Care Unit. *Archives of Clinical Infectious Diseases*, 15(2). <https://doi.org/10.5812/archcid.93533>
- DeMartini, T., Nowell, M., James, J., Williamson, L., Lahni, P., Shen, H., & Kaplan, J. M. (2017). High fat diet-induced obesity increases myocardial injury and alters cardiac STAT3 signaling in mice after polymicrobial sepsis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1863(10), 2654–2660. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.06.008>
- dos Reis Costa, D. E. F., de Araújo, N. F., Nóbrega, N. R. C., de Assis Rabelo Ribeiro, N., de Oliveira, A. C. C., dos Santos Aggum Capettini, L., Ferreira, A. V. M., & Bonaventura, D. (2022). Contribution of RAS, ROS and COX-1-derived prostanoids to the contractile profile of perivascular adipose tissue in cafeteria diet-induced obesity. *Life Sciences*, 309(September). <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120994>
- Duan, C., Yang, G., Li, T., & Liu, L. (2015). Advances in vascular hyporeactivity after shock: The mechanisms and managements. *Shock*, 44(6), 524–534. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000000457>
- Dumith, S. C., Saes-Silva, E., Languer Vargas, B., Belarmino, V., Volz, P. M., Nascimento da Silva, C., de Oliveira Meller, F., Schäfer, A. A., & Pereira da Silva, M. (2022). What factors explain the increase in obesity in Brazil? An ecological analysis of contextual and behavioural components. *Public Health*, 209, 61–66. <https://doi.org/10.1016/j.puhe.2022.05.008>
- Eichhorn, E. J., & Bristow, M. R. (1996). Medical Therapy Can Improve the Biological Properties of the Chronically Failing Heart. *Circulation*, 94(9), 2285–2296. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.94.9.2285>
- Estivaleti, J. M., Guzman-Habinger, J., Lobos, J., Azeredo, C. M., Claro, R., Ferrari, G., Adami, F., & Rezende, L. F. M. (2022). Time trends and projected obesity epidemic in Brazilian adults between 2006 and 2030. *Scientific Reports*, 12(1), 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16934-5>
- Falagas, M. E., & Kompoti, M. (2006). Obesity and infection. *Lancet Infectious Diseases*, 6(7), 438–446. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(06\)70523-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(06)70523-0)

- Farneback, G. (2003). Two-Frame Motion Estimation Based on Polynomial Expansion. In *Lecture Notes in Computer Science* (Vol. 2749, Número 1, p. 363–370). https://doi.org/10.1007/3-540-45103-X_50
- Féletou, M., Huang, Y., & Vanhoutte, P. M. (2011). Endothelium-mediated control of vascular tone: COX-1 and COX-2 products. *British Journal of Pharmacology*, *164*(3), 894–912. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01276.x>
- Ferreira, F. B. D., dos Santos, C., Bruxel, M. A., Nunes, E. A., Spiller, F., & Rafacho, A. (2017). Glucose homeostasis in two degrees of sepsis lethality induced by caecum ligation and puncture in mice. *International Journal of Experimental Pathology*, *98*(6), 329–340. <https://doi.org/10.1111/iep.12255>
- Fleischmann, E., Teal, N., Dudley, J., May, W., Bower, J. D., & Salahudeen, A. K. (1999). Influence of excess weight on mortality and hospital stay in 1346 hemodialysis patients. *Kidney International*, *55*(4), 1560–1567. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1755.1999.00389.x>
- Francisco, V., Pino, J., Gonzalez-Gay, M. A., Mera, A., Lago, F., Gómez, R., Mobasher, A., & Gualillo, O. (2018). Adipokines and inflammation: is it a question of weight? *British Journal of Pharmacology*, *175*(10), 1569–1579. <https://doi.org/10.1111/bph.14181>
- Frydrych, L. M., Bian, G., Fattahi, F., Morris, S. B., O'Rourke, R. W., Lumeng, C. N., Kunkel, S. L., Ward, P. A., & Delano, M. J. (2019). GM-CSF Administration Improves Defects in Innate Immunity and Sepsis Survival in Obese Diabetic Mice. *The Journal of Immunology*, *202*(3), 931–942. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800713>
- Funk, D. J., Parrillo, J. E., & Kumar, A. (2009). Sepsis and Septic Shock: A History. *Critical Care Clinics*, *25*(1), 83–101. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2008.12.003>
- Gao, Y. (2010). The multiple actions of NO. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, *459*(6), 829–839. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0773-9>
- Genga, K. R., & Russell, J. A. (2017). Update of Sepsis in the Intensive Care Unit. *Journal of Innate Immunity*, *9*(5), 441–455. <https://doi.org/10.1159/000477419>
- Gun Song, B. (2022). Electrocardiographic Differential Diagnosis of Narrow QRS and

- Wide QRS Complex Tachycardias. In *Electrocardiograms [Working Title]*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.102568>
- Health Effects of Overweight and Obesity in 195 Countries over 25 Years. (2017). *New England Journal of Medicine*, 377(1), 13–27. <https://doi.org/10.1056/nejmoa1614362>
- Hillenbrand, A., Xu, P., Zhou, S., Blatz, A., Weiss, M., Hafner, S., Henne-Bruns, D., & Knippschild, U. (2016). Circulating adipokine levels and prognostic value in septic patients. *Journal of Inflammation (United Kingdom)*, 13(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12950-016-0138-z>
- Holtz, J., & Goetz, R. M. (1994). Vascular renin-angiotensin-system, endothelial function and atherosclerosis? In *Arteriosclerosis* (p. 71–86). Steinkopff. https://doi.org/10.1007/978-3-642-85660-0_7
- Jabaley, C. S., Blum, J. M., Groff, R. F., & O'Reilly-Shah, V. N. (2018). Global trends in the awareness of sepsis: Insights from search engine data between 2012 and 2017. *Critical Care*, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13054-017-1914-8>
- Jafarzadeh, S. R., Thomas, B. S., Warren, D. K., Gill, J., & Fraser, V. J. (2016). Longitudinal study of the effects of bacteremia and sepsis on 5-year risk of cardiovascular events. *Clinical Infectious Diseases*, 63(4), 495–500. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw320>
- Jagan, N., Morrow, L. E., Walters, R. W., Plambeck, R. W., Wallen, T. J., Patel, T. M., & Malesker, M. A. (2020). Sepsis and the Obesity Paradox: Size Matters in More Than One Way. *Critical Care Medicine*, 48(9), E776–E782. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000004459>
- Jerez, S., Scacchi, F., Sierra, L., Karbinger, S., & Peral De Bruno, M. (2012). Vascular hyporeactivity to angiotensin II and noradrenaline in a rabbit model of obesity. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 59(1), 49–57. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e318235156a>
- Kaakinen, M., Reichelt, M. E., Ma, Z., Ferguson, C., Martel, N., Porrello, E. R., Hudson, J. E., Thomas, W. G., Parton, R. G., & Headrick, J. P. (2017). Cavin-1 deficiency modifies myocardial and coronary function, stretch responses and ischaemic

- tolerance: roles of NOS over-activity. *Basic Research in Cardiology*, 112(3), 1–19. <https://doi.org/10.1007/s00395-017-0613-6>
- Kaplan, J. M., Nowell, M., Lahni, P., Shen, H., Shanmukhappa, S. K., & Zingarelli, B. (2016). Obesity enhances sepsis-induced liver inflammation and injury in mice. *Obesity*, 24(7), 1480–1488. <https://doi.org/10.1002/oby.21504>
- Karampela, I., Christodoulatos, G. S., Vallianou, N., Tsilingiris, D., Chrysanthopoulou, E., Skyllas, G., Antonakos, G., Marinou, I., Vogiatzakis, E., Armaganidis, A., & Dalamaga, M. (2022). Circulating Chemerin and Its Kinetics May Be a Useful Diagnostic and Prognostic Biomarker in Critically Ill Patients with Sepsis: A Prospective Study. *Biomolecules*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/biom12020301>
- Kimmoun, A., Ducrocq, N., & Levy, B. (2013). Mechanisms of Vascular Hyporesponsiveness in Septic Shock. In *Current Vascular Pharmacology* (Vol. 11, Número 2, p. 139–149). <https://doi.org/10.2174/157016113805290245>
- Koliaki, C., Liatis, S., & Kokkinos, A. (2019). Obesity and cardiovascular disease: revisiting an old relationship. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 92, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.10.011>
- Kolyva, A. S., Zolota, V., Mpatsoulis, D., Skroubis, G., Solomou, E. E., Habeos, I. G., Assimakopoulos, S. F., Goutzourelas, N., Kouretas, D., & Gogos, C. A. (2014). The role of obesity in the immune response during sepsis. *Nutrition and Diabetes*, 4(9), e137-7. <https://doi.org/10.1038/nutd.2014.34>
- Korkmaz, B., Buharalioglu, K., Sahan-Firat, S., Cuez, T., Tuncay Demiryurek, A., & Tunctan, B. (2011). Activation of MEK1/ERK1/2/iNOS/sGC/PKG pathway associated with peroxynitrite formation contributes to hypotension and vascular hyporeactivity in endotoxemic rats. *Nitric Oxide*, 24(3), 160–172. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2011.02.004>
- Korkmaz, B., Ozveren, E., Buharalioglu, C. K., & Tunctan, B. (2006). Extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) contributes to endotoxin-induced hyporeactivity via nitric oxide and prostacyclin production in rat aorta. *Pharmacology*, 78(3), 123–128. <https://doi.org/10.1159/000095962>
- Kosyakovsky, L. B., Angriman, F., Katz, E., Adhikari, N. K., Godoy, L. C., Marshall, J.

- C., Ferreyro, B. L., Lee, D. S., Rosenson, R. S., Sattar, N., Verma, S., Toma, A., Englesakis, M., Burstein, B., Farkouh, M. E., Herridge, M., Ko, D. T., Scales, D. C., Detsky, M. E., ... Lawler, P. R. (2021). Association between sepsis survivorship and long-term cardiovascular outcomes in adults: a systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Medicine*, 47(9), 931–942. <https://doi.org/10.1007/s00134-021-06479-y>
- Lahav, R., Haim, Y., Bhandarkar, N. S., Levin, L., Chalifa-Caspi, V., Sarver, D., Sahagun, A., Maixner, N., Kovesh, B., Wong, G. W., & Rudich, A. (2021). CTRP6 rapidly responds to acute nutritional changes, regulating adipose tissue expansion and inflammation in mice. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 321(5). <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00299.2021>
- Laudanski, K. (2021). Persistence of lipoproteins and cholesterol alterations after sepsis: Implication for atherosclerosis progression. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910517>
- Lavie, C. J., Milani, R. V., & Ventura, H. O. (2009). Obesity and Cardiovascular Disease. Risk Factor, Paradox, and Impact of Weight Loss. *Journal of the American College of Cardiology*, 53(21), 1925–1932. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2008.12.068>
- Leendertse, M., Willems, R. J., Giebelen, I. A., Florquin, S., Van Den Pangaart, P. S., Bonten, M. J., & Van Der Poll, T. (2009). Cecal ligation and puncture induced sepsis impairs host defense against *Enterococcus faecium* peritonitis. *Intensive Care Medicine*, 35(5), 924–932. <https://doi.org/10.1007/s00134-009-1440-5>
- Leopoldo, A. S., Lima-Leopoldo, A. P., Nascimento, A. F., Luvizotto, R. A. M., Sugizaki, M. M., Campos, D. H. S., Da Silva, D. C. T., Padovani, C. R., & Cicogna, A. C. (2016). Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 49(4), 1–9. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20155028>
- Levy, B., Collin, S., Sennoun, N., Ducrocq, N., Kimmoun, A., Asfar, P., Perez, P., & Meziani, F. (2010). Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: From bench to bedside. *Intensive Care Medicine*, 36(12), 2019–2029. <https://doi.org/10.1007/s00134-010-2045-8>

- Lewis, E. D., Williams, H. C., Bruno, M. E. C., Stromberg, A. J., Saito, H., Johnson, L. A., & Starr, M. E. (2022). Exploring the Obesity Paradox in A Murine Model of Sepsis: Improved Survival Despite Increased Organ Injury in Obese Mice. *Shock*, 57(1), 151–159. <https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001856>
- Li, C., Davis, X., Lahni, P., Stuck, J., Williamson, L., & Kaplan, J. (2021). Obesity protects against sepsis-induced and norepinephrine-induced white adipose tissue browning. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 321(3), E433–E442. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00380.2020>
- Li, S., Hu, X., Xu, J., Huang, F., Guo, Z., Tong, L., Lui, K. Y., Cao, L., Zhu, Y., Yao, J., Lin, X., Guan, X., & Cai, C. (2019). Increased body mass index linked to greater short- and long-term survival in sepsis patients: A retrospective analysis of a large clinical database. *International Journal of Infectious Diseases*, 87, 109–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.07.018>
- Lin, H., Wang, W., Lee, M., Meng, Q., & Ren, H. (2020). Current Status of Septic Cardiomyopathy: Basic Science and Clinical Progress. *Frontiers in Pharmacology*, 11(March), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00210>
- Lin, X., & Li, H. (2021). Obesity: Epidemiology, Pathophysiology, and Therapeutics. *Frontiers in Endocrinology*, 12(September), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.706978>
- Lincoln, T. M., Dey, N., & Sellak, H. (2001). Invited Review: cGMP-dependent protein kinase signaling mechanisms in smooth muscle: from the regulation of tone to gene expression. *Journal of Applied Physiology*, 91(3), 1421–1430. <https://doi.org/10.1152/jappl.2001.91.3.1421>
- Lipinska-Gediga, M. (2016). Sepsis and septic shock – is a microcirculation a main player? *Anestezjologia Intensywna Terapia*, 48(4), 261–265. <https://doi.org/10.5603/AIT.a2016.0037>
- Loosen, S. H., Koch, A., Tacke, F., Roderburg, C., & Luedde, T. (2019). The role of adipokines as circulating biomarkers in critical illness and sepsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(19), 1–11. <https://doi.org/10.3390/ijms20194820>

- Louie, J. K., Acosta, M., Samuel, M. C., Schechter, R., Vugia, D. J., Harriman, K., & Matyas, B. T. (2011). A novel risk factor for a novel virus: Obesity and 2009 pandemic influenza a (H1N1). *Clinical Infectious Diseases*, 52(3), 301–312. <https://doi.org/10.1093/cid/ciq152>
- Lv, X., & Wang, H. (2016). Pathophysiology of sepsis-induced myocardial dysfunction. *Military Medical Research*, 3(1), 30. <https://doi.org/10.1186/s40779-016-0099-9>
- MacEdo, I. C., Medeiros, L. F., Oliveira, C., Oliveira, C. M., Rozisky, J. R., Scarabelot, V. L., Souza, A., Silva, F. R., Santos, V. S., Cioato, S. G., Caumo, W., & Torres, I. L. S. (2012). Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides*, 38(1), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.08.007>
- Malacco, N. L. S. O., Souza, J. A. M., Mendes, A. C., Rachid, M. A., Kraemer, L. R., Mattos, M. S., Lima, G. N., Sousa, L. P., Souza, D. G., Pinho, V., Teixeira, M. M., Russo, R. C., & Soriani, F. M. (2019). Acute lung injury and repair induced by single exposure of *Aspergillus fumigatus* in immunocompetent mice. *Future Microbiology*, 14(17), 1511–1525. <https://doi.org/10.2217/fmb-2019-0214>
- Mankowski, R. T., Yende, S., & Angus, D. C. (2019). Long-term impact of sepsis on cardiovascular health. *Intensive Care Medicine*, 45(1), 78–81. <https://doi.org/10.1007/s00134-018-5173-1>
- Mann, D. L., & Bristow, M. R. (2005). Mechanisms and models in heart failure: The biomechanical model and beyond. *Circulation*, 111(21), 2837–2849. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.500546>
- Marques, M. B., & Langouche, L. (2013). Endocrine, metabolic, and morphologic alterations of adipose tissue during critical illness. *Critical Care Medicine*, 41(1), 317–325. <https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e318265f21c>
- Marques, M. B., Perre, S. V., Aertgeerts, A., Derde, S., Güiza, F., Casaer, M. P., Hermans, G., Van den Berghe, G., & Langouche, L. (2013). Critical illness induces nutrient-independent adipogenesis and accumulation of alternatively activated tissue macrophages. *Critical Care*, 17(5), R193. <https://doi.org/10.1186/cc12887>
- Martin, L., Derwall, M., Al Zoubi, S., Zechendorf, E., Reuter, D. A., Thiemermann, C., & Schuerholz, T. (2019). The Septic Heart: Current Understanding of Molecular

- Mechanisms and Clinical Implications. *Chest*, 155(2), 427–437. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.08.1037>
- Martins, T., Castro-Ribeiro, C., Lemos, S., Ferreira, T., Nascimento-Gonçalves, E., Rosa, E., Oliveira, P. A., & Antunes, L. M. (2022). Murine Models of Obesity. *Obesities*, 2(2), 127–147. <https://doi.org/10.3390/obesities2020012>
- Mathew, B., Francis, L., Kayalar, A., & Cone, J. (2008). Obesity: Effects on cardiovascular disease and its diagnosis. *Journal of the American Board of Family Medicine*, 21(6), 562–568. <https://doi.org/10.3122/jabfm.2008.06.080080>
- Matias, A. M., Estevam, W. M., Coelho, P. M., Haese, D., Kobi, J. B. B. S., Lima-Leopoldo, A. P., & Leopoldo, A. S. (2018). Differential effects of high sugar, high lard or a combination of both on nutritional, hormonal and cardiovascular metabolic profiles of rodents. *Nutrients*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/nu10081071>
- Matsuda, N., & Hattori, Y. (2007). Vascular biology in sepsis: Pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *Journal of Smooth Muscle Research*, 43(4), 117–137. <https://doi.org/10.1540/jsmr.43.117>
- Meddings, J. B., Scott, R. B., & Fick, G. H. (1989). Analysis and comparison of sigmoidal curves: Application to dose-response data. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, 257(6). <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1989.257.6.g982>
- Merdji, H., Kassem, M., Chomel, L., Clere-Jehl, R., Helms, J., Kurihara, K., Chaker, A. B., Auger, C., Schini-Kerth, V., Toti, F., & Meziani, F. (2021). Septic shock as a trigger of arterial stress-induced premature senescence: A new pathway involved in the post sepsis long-term cardiovascular complications. *Vascular Pharmacology*, 141, 106922. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106922>
- Merx, M. W., & Weber, C. (2007). Sepsis and the heart. *Circulation*, 116(7), 793–802. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678359>
- Mira, J. C., Gentile, L. F., Mathias, B. J., Efron, P. A., Brakenridge, S. C., Mohr, A. M., Moore, F. A., & Moldawer, L. L. (2017). Sepsis Pathophysiology, Chronic Critical Illness, and Persistent Inflammation-Immunosuppression and Catabolism

- Syndrome. *Critical Care Medicine*, 45(2), 253–262.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000002074>
- Mishra, S. K., & Choudhury, S. (2018). Experimental protocol for cecal ligation and puncture model of polymicrobial sepsis and assessment of vascular functions in mice. *Methods in Molecular Biology*, 1717(June 2009), 161–187.
https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7526-6_14
- Morelli, A., & Passariello, M. (2016). Hemodynamic coherence in sepsis. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*, 30(4), 453–463.
<https://doi.org/10.1016/j.bpa.2016.10.009>
- Muenzer, J. T., Davis, C. G., Dunne, B. S., Unsinger, J., Dunne, W. M., & Hotchkiss, R. S. (2006). Pneumonia after cecal ligation and puncture: A clinically relevant “two-hit” model of sepsis. *Shock*, 26(6), 565–570.
<https://doi.org/10.1097/01.shk.0000235130.82363.ed>
- Namas, R., Zamora, R., Ph, D., Namas, R., An, G., Ph, D., Dick, T. E., Ph, D., Jacono, F. J., Androulakis, I. P., Ph, D., Nieman, G. F., Ph, D., Chang, S., Billiar, T. R., John, A., Angus, D. C., Vodovotz, Y., & Ph, D. (2013). *NIH Public Access*. 27(3), 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2011.05.025.Sepsis>
- Nardi, G. M., Scheschowitsch, K., Ammar, D., De Oliveira, S. K., Arruda, T. B., & Assreuy, J. (2014). Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. *Critical Care Medicine*, 42(6), 391–400.
<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000301>
- Nascimento, D. C., Viacava, P. R., Ferreira, R. G., Damaceno, M. A., Piñeros, A. R., Melo, P. H., Donate, P. B., Toller-Kawahisa, J. E., Zoppi, D., Veras, F. P., Peres, R. S., Menezes-Silva, L., Caetité, D., Oliveira, A. E. R., Castro, Í. M. S., Kauffenstein, G., Nakaya, H. I., Borges, M. C., Zamboni, D. S., ... Alves-Filho, J. C. (2021). Sepsis expands a CD39+ plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. *Immunity*, 54(9), 2024–2041.e8.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.08.005>
- Neira, R. A. Q., Hamacher, S., & Japiassu, A. M. (2018). Epidemiology of sepsis in

- Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. *PLoS ONE*, *13*(4), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195873>
- Niederbichler, A. D., Hoesel, L. M., Westfall, M. V., Gao, H., Ipaktchi, K. R., Sun, L., Zetoune, F. S., Su, G. L., Arbabi, S., Sarma, J. V., Wang, S. C., Hemmila, M. R., & Ward, P. A. (2006). An essential role for complement C5a in the pathogenesis of septic cardiac dysfunction. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(1), 53–61. <https://doi.org/10.1084/jem.20051207>
- Nonato, A. O., Olivon, V. C., Dela Justina, V., Zanotto, C. Z., Webb, R. C., Tostes, R. C., Lima, V. V., & Giachini, F. R. (2016). Impaired Ca²⁺ Homeostasis and Decreased Orai1 Expression Modulates Arterial Hyporeactivity to Vasoconstrictors During Endotoxemia. *Inflammation*, *39*(3), 1188–1197. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0354-y>
- Oliveira, Marina Chaves de, Silveira, A. L. M., Tavares, L. P., Rodrigues, D. F., van de Loo, F. A. J., Sousa, L. P. de, Teixeira, M. M., Amaral, F. A., & Ferreira, A. V. M. (2017). Two opposite extremes of adiposity similarly reduce inflammatory response of antigen-induced acute joint inflammation. *Nutrition*, *33*, 132–140. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2016.05.008>
- Oliveira, Marina C., Menezes-Garcia, Z., Henriques, M. C. C., Soriani, F. M., Pinho, V., Faria, A. M. C., Santiago, A. F., Cara, D. C., Souza, D. G., Teixeira, M. M., & Ferreira, A. V. M. (2013). Acute and sustained inflammation and metabolic dysfunction induced by high refined carbohydrate-containing diet in mice. *Obesity*, *21*(9). <https://doi.org/10.1002/oby.20230>
- Olwal, C. O., Nganyewo, N. N., Tapela, K., Djomkam Zune, A. L., Owoicho, O., Bediako, Y., & Duodu, S. (2021). Parallels in Sepsis and COVID-19 Conditions: Implications for Managing Severe COVID-19. *Frontiers in Immunology*, *12*(December 2019), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.602848>
- Opal, S. M. (2011). The Evolution of the Understanding of Sepsis, Infection, and the Host Response: A Brief History. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, *23*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2010.12.001>
- Ortega, F. B., Lavie, C. J., & Blair, S. N. (2016). Obesity and cardiovascular disease.

- Circulation Research*, 118(11), 1752–1770.
<https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306883>
- Ou, S. M., Chu, H., Chao, P. W., Lee, Y. J., Kuo, S. C., Chen, T. J., Tseng, C. M., Shih, C. J., & Chen, Y. T. (2016). Long-term mortality and major adverse cardiovascular events in sepsis survivors a nationwide population-based study. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 194(2), 209–217.
<https://doi.org/10.1164/rccm.201510-2023OC>
- Ouchi, N., Parker, J. L., Lugus, J. J., & Walsh, K. (2011). Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nature Reviews Immunology*, 11(2), 85–97.
<https://doi.org/10.1038/nri2921>
- Ozer, E. K., Goktas, M. T., Kilinc, I., Bariskaner, H., Ugurluoglu, C., & Iskit, A. B. (2017). Celecoxib administration reduced mortality, mesenteric hypoperfusion, aortic dysfunction and multiple organ injury in septic rats. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 86, 583–589. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.11.102>
- Papadimitriou-Olivgeris, M., Aretha, D., Zotou, A., Koutsileou, K., Zbouki, A., Lefkaditi, A., Sklavou, C., Marangos, M., & Fligou, F. (2016). The Role of Obesity in Sepsis Outcome among Critically Ill Patients: A Retrospective Cohort Analysis. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5941279>
- Parlee, S. D., Lentz, S. I., Mori, H., & MacDougald, O. A. (2014). Quantifying size and number of adipocytes in adipose tissue. *Methods in Enzymology*, 537, 93–122.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411619-1.00006-9>
- Patel, K., & McElvania, E. (2019). Diagnostic Challenges and Laboratory Considerations for Pediatric Sepsis. *The journal of applied laboratory medicine*, 3(4), 587–600. <https://doi.org/10.1373/jalm.2017.025908>
- Peng, T. C., Chang, C. Y., Huang, I. T., Kao, M. C., Chang, Y. Y., & Huang, C. J. (2018). Platonin mitigates vascular hyporeactivity of thoracic aorta in septic rats. *Journal of Surgical Research*, 221, 190–195.
<https://doi.org/10.1016/j.jss.2017.08.054>
- Peng, X. Q., Damarla, M., Skirball, J., Nonas, S., Wang, X. Y., Han, E. J., Hasan, E. J., Cao, X., Boueiz, A., Damico, R., Tuder, R. M., Sciuto, A. M., Anderson, D. R.,

- Garcia, J. G., Kass, D. A., Hassoun, P. M., & Zhang, J. T. (2010). Protective role of PI3-kinase/Akt/eNOS signaling in mechanical stress through inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase in mouse lung. *Acta Pharmacologica Sinica*, *31*(2), 175–183. <https://doi.org/10.1038/aps.2009.190>
- Pepper, D. J., Sun, J., Welsh, J., Cui, X., Suffredini, A. F., & Eichacker, P. Q. (2016). Increased body mass index and adjusted mortality in ICU patients with sepsis or septic shock: A systematic review and meta-analysis. *Critical Care*, *20*(1). <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1360-z>
- Pérez-Matute, P., Pérez-Echarri, N., Martínez, J. A., Martí, A., & Moreno-Aliaga, M. J. (2007). Eicosapentaenoic acid actions on adiposity and insulin resistance in control and high-fat-fed rats: Role of apoptosis, adiponectin and tumour necrosis factor- α . *British Journal of Nutrition*, *97*(2), 389–398. <https://doi.org/10.1017/S0007114507207627>
- Petroni, R. C., de Oliveira, S. J. S., Fungaro, T. P., Ariga, S. K. K., Barbeiro, H. V., Soriano, F. G., & de Lima, T. M. (2022). Short-term Obesity Worsens Heart Inflammation and Disrupts Mitochondrial Biogenesis and Function in an Experimental Model of Endotoxemia. *Inflammation*, *45*(5), 1985–1999. <https://doi.org/10.1007/s10753-022-01669-2>
- Petronilho, F., Giustina, A. Della, Nascimento, D. Z., Zarbato, G. F., Vieira, A. A., Florentino, D., Danielski, L. G., Goldim, M. P., Rezin, G. T., & Barichello, T. (2016). Obesity Exacerbates Sepsis-Induced Oxidative Damage in Organs. *Inflammation*, *39*(6), 2062–2071. <https://doi.org/10.1007/s10753-016-0444-x>
- Poveda-Jaramillo, R. (2021). Heart Dysfunction in Sepsis. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, *35*(1), 298–309. <https://doi.org/10.1053/j.jvca.2020.07.026>
- Powell-Wiley, T. M., Poirier, P., Burke, L. E., Després, J. P., Gordon-Larsen, P., Lavie, C. J., Lear, S. A., Ndumele, C. E., Neeland, I. J., Sanders, P., & St-Onge, M. P. (2021). Obesity and Cardiovascular Disease A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circulation*, *143*(21), E984–E1010. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000973>
- Prescott, H. C., Chang, V. W., O'Brien, J. M., Langa, K. M., & Iwashyna, T. J. (2014).

- Obesity and 1-Year Outcomes in Older Americans With Severe Sepsis*. *Critical Care Medicine*, 42(8), 1766–1774. <https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000336>
- Qian, J., & Fulton, D. (2013). Post-translational regulation of endothelial nitric oxide synthase in vascular endothelium. *Frontiers in Physiology*, 4 DEC(December), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00347>
- R. Breijo-Márquez, F. (2021). Decrease of electrical systole of heart: a review of more than 300 patients. *Trends Journal of Sciences Research*, 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.31586/gjcd.2021.118>
- Reinhart, K., Daniels, R., Kisson, N., Machado, F. R., Schachter, R. D., & Finfer, S. (2017). Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. *New England Journal of Medicine*, 377(5), 414–417. <https://doi.org/10.1056/NEJMp1707170>
- Rios-Diaz, A. J., Lin, E., Williams, K., Jiang, W., Patel, V., Shimizu, N., Metcalfe, D., Olufajo, O. A., Cooper, Z., Havens, J., Salim, A., & Askari, R. (2017). The obesity paradox in patients with severe soft tissue infections. *The American Journal of Surgery*, 214(3), 385–389. <https://doi.org/10.1016/j.amjsurg.2016.05.006>
- Rittirsch, D., Huber-Lang, M. S., Flierl, M. A., & Ward, P. A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature Protocols*, 4(1), 31–36. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.214>
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolín, I., Herrera, F., Martín, V., & Reiter, R. J. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *Journal of Pineal Research*, 36(1), 1–9. <https://doi.org/10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x>
- Rodríguez, E., Ribot, J., Rodríguez, A. M., & Palou, A. (2004). PPAR- γ 2 expression in response to cafeteria diet: Gender- and depot-specific effects. *Obesity Research*, 12(9), 1455–1463. <https://doi.org/10.1038/oby.2004.182>
- Rudd, K. E., Johnson, S. C., Agesa, K. M., Shackelford, K. A., Tsoi, D., Kievlan, D. R., Colombara, D. V., Ikuta, K. S., Kisson, N., Finfer, S., Fleischmann-Struzek, C., Machado, F. R., Reinhart, K. K., Rowan, K., Seymour, C. W., Watson, R. S., West,

- T. E., Marinho, F., Hay, S. I., ... Naghavi, M. (2020). Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. *The Lancet*, 395(10219), 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)
- Ruiz, S., Vardon-Bounes, F., Merlet-Dupuy, V., Conil, J. M., Buléon, M., Fourcade, O., Tack, I., & Minville, V. (2016). Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. *Intensive Care Medicine Experimental*, 4(1). <https://doi.org/10.1186/s40635-016-0096-z>
- Rungsung, S., Singh, T. U., Perumalraja, K., Mahobiya, A., Sharma, M., Lingaraju, M. C., Parida, S., Sahoo, M., & Kumar, D. (2022). Luteolin alleviates vascular dysfunctions in CLP-induced polymicrobial sepsis in mice. *Pharmacological Reports*, 74(5), 1054–1068. <https://doi.org/10.1007/s43440-022-00399-4>
- Sampey, B. P., Vanhoose, A. M., Winfield, H. M., Freemerman, A. J., Muehlbauer, M. J., Fueger, P. T., Newgard, C. B., & Makowski, L. (2011). Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: Comparison to high-fat diet. *Obesity*, 19(6), 1109–1117. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>
- Sandoo, A., Veldhuijzen van Zanten, J. J. C. ., Metsios, G. S., Carroll, D., & Kitas, G. D. (2015). The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *The Open Cardiovascular Medicine Journal*, 4(1), 302–312. <https://doi.org/10.2174/1874192401004010302>
- Santos, F. A., Carvalho, K. M. M. B., Batista-Lima, F. J., Nunes, P. I. G., Viana, A. F. S. C., de Carvalho Almeida da Silva, A. A., da Cruz Fonseca, S. G., Chaves, M. H., Rao, V. S., Magalhães, P. J. C., & de Brito, T. S. (2017). The triterpenoid alpha, beta-amyrin prevents the impaired aortic vascular reactivity in high-fat diet-induced obese mice. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 390(10), 1029–1039. <https://doi.org/10.1007/s00210-017-1404-1>
- Sawadogo, W., Tsegaye, M., Gizaw, A., & Adera, T. (2022). Overweight and obesity as risk factors for COVID-19-associated hospitalisations and death: systematic review and meta-analysis. *BMJ Nutrition, Prevention & Health*, 5(1), 10–18. <https://doi.org/10.1136/bmjnph-2021-000375>

- Scalzo, S., Afonso, M. Q. L., da Fonseca, N. J., Jesus, I. C. G., Alves, A. P., Mendonça, C. A. T. F., Teixeira, V. P., Biagi, D., Cruvinel, E., Santos, A. K., Miranda, K., Marques, F. A. M., Mesquita, O. N., Kushmerick, C., Campagnole-Santos, M. J., Agero, U., & Guatimosim, S. (2021). Dense optical flow software to quantify cellular contractility. *Cell Reports Methods*, 1(4). <https://doi.org/10.1016/j.crmeth.2021.100044>
- Scalzo, S., Mendonça, C. A. T. F., Kushmerick, C., Agero, U., & Guatimosim, S. (2022). Microscopy-based cellular contractility assay for adult, neonatal, and hiPSC cardiomyocytes. *STAR Protocols*, 3(1). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2022.101144>
- Schmidt, D. S., & Salahudeen, A. K. (2007). Obesity-survival paradox - Still a controversy? *Seminars in Dialysis*, 20(6), 486–492. <https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2007.00349.x>
- Shafat, A., Murray, B., & Rumsey, D. (2009). Energy density in cafeteria diet induced hyperphagia in the rat. *Appetite*, 52(1), 34–38. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2008.07.004>
- Shankar-Hari, M., Phillips, G. S., Levy, M. L., Seymour, C. W., Liu, V. X., Deutschman, C. S., Angus, D. C., Rubenfeld, G. D., & Singer, M. (2016). Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock. *JAMA*, 315(8), 775. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0289>
- Shankar-Hari, M., & Rubenfeld, G. D. (2016). Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges. *Current Infectious Disease Reports*, 18(11). <https://doi.org/10.1007/s11908-016-0544-7>
- Shankar-Hari, M., Saha, R., Wilson, J., Prescott, H. C., Harrison, D., Rowan, K., Rubenfeld, G. D., & Adhikari, N. K. J. (2020). Rate and risk factors for rehospitalisation in sepsis survivors: systematic review and meta-analysis. *Intensive Care Medicine*, 46(4), 619–636. <https://doi.org/10.1007/s00134-019-05908-3>
- Shrum, B., Anantha, R. V., Xu, S. X., Donnelly, M., Haeryfar, S. M. M., McCormick, J. K., & Mele, T. (2014). A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. *BMC Research Notes*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756->

0500-7-233

- Siegl, D., Annecke, T., Johnson, B. L., Schlag, C., Martignoni, A., Huber, N., Conzen, P., Caldwell, C. C., & Tschöp, J. (2014). Obesity-induced hyperleptinemia improves survival and immune response in a murine model of sepsis. *Anesthesiology*, *121*(1), 98–114. <https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000000192>
- Singer, M., Deutschman, C. S., Seymour, C., Shankar-Hari, M., Annane, D., Bauer, M., Bellomo, R., Bernard, G. R., Chiche, J. D., Cooper-Smith, C. M., Hotchkiss, R. S., Levy, M. M., Marshall, J. C., Martin, G. S., Opal, S. M., Rubenfeld, G. D., Poll, T. Der, Vincent, J. L., & Angus, D. C. (2016). The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA - Journal of the American Medical Association*, *315*(8), 801–810. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.0287>
- Singh, P., Sharma, P., Nakade, U. P., Sharma, A., Gari, M., Choudhury, S., Shukla, A., & Garg, S. K. (2018). Endocannabinoid-mediated modulation of Gq protein-coupled receptor mediates vascular hyporeactivity to nor-adrenaline during polymicrobial sepsis. *Pharmacological Reports*, *70*(6), 1150–1157. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.07.001>
- Smeding, L., Plötz, F. B., Groeneveld, A. B. J., & Kneyber, M. C. J. (2012). Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock. *Shock*, *37*(5), 449–456. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31824c3238>
- Sousa-Lopes, A., de Freitas, R. A., Carneiro, F. S., Nunes, K. P., Allahdadi, K. J., Webb, R. C., Tostes, R. de C., Giachini, F. R., & Lima, V. V. (2020). Angiotensin (1-7) inhibits ang II-mediated ERK1/2 Activation by stimulating MKP-1 activation in vascular smooth muscle cells. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, *9*(1), 50–61. <https://doi.org/10.22088/IJMCM.BUMS.9.1.50>
- Soussi, S., Sharma, D., Jüni, P., Lebovic, G., Brochard, L., Marshall, J. C., Lawler, P. R., Herridge, M., Ferguson, N., Del Sorbo, L., Feliot, E., Mebazaa, A., Acton, E., Kennedy, J. N., Xu, W., Gayat, E., Dos Santos, C. C., Soussi, S., & Soussi, S. (2022). Identifying clinical subtypes in sepsis-survivors with different one-year outcomes: a secondary latent class analysis of the FROG-ICU cohort. *Critical Care*, *26*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/s13054-022-03972-8>

- Su, L. H., Lin, M. T., Yeh, S. L., & Yeh, C. L. (2021). Glutamine administration attenuates kidney inflammation in obese mice complicated with polymicrobial sepsis. *Mediators of Inflammation*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/5597118>
- Svensson, A. M., Hellerström, C., & Jansson, L. (1996). Diet-induced obesity and pancreatic islet blood flow in the rat: A preferential increase in islet blood perfusion persists after withdrawal of the diet and normalization of body weight. *Journal of Endocrinology*, 151(3), 507–511. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1510507>
- Szrama, J., Smuszkiewicz, P., & Trojanowska, I. (2009). Glycemic profile and effectiveness and safety of insulin therapy in septic patients. Is the blood glucose level sufficient? *Polish Archives of Internal Medicine*, 119(10), 621–627. <https://doi.org/10.20452/pamw.787>
- Tay-Lasso, E., Grigorian, A., Lekawa, M., Dolich, M., Schubl, S., Barrios, C., Nguyen, N., & Nahmias, J. (2022). Obesity Does Not Increase Risk for Mortality in Severe Sepsis Trauma Patients. *American Surgeon*. <https://doi.org/10.1177/00031348221078986>
- Tchernof, A., & Després, J. P. (2013). Pathophysiology of human visceral obesity: An update. *Physiological Reviews*, 93(1), 359–404. <https://doi.org/10.1152/physrev.00033.2011>
- Thavamani, A., Umapathi, K. K., Sankararaman, S., & Roy, A. (2021). Effect of obesity on mortality among hospitalized paediatric patients with severe sepsis. *Pediatric Obesity*, 16(8), 1–9. <https://doi.org/10.1111/ijpo.12777>
- Timirci-Kahraman, O., Yilmaz, U., Yilmaz, N., Cevik, A., Horozoglu, C., Celik, F., Oguz Gokce, M., Ergen, A., Melekoglu, A., & Zeybek, U. (2018). A study of short- and long-term mRNA levels of the retn, iapp, and Drd5 genes in obese mice induced with high-fat diet. *In Vivo*, 32(4), 813–817. <https://doi.org/10.21873/invivo.11312>
- Triggiani, A. I., Valenzano, A., Ciliberti, M. A. P., Moscatelli, F., Villani, S., Monda, M., Messina, G., Federici, A., Babiloni, C., & Cibelli, G. (2017). Heart rate variability is reduced in underweight and overweight healthy adult women. *Clinical Physiology and Functional Imaging*, 37(2), 162–167. <https://doi.org/10.1111/cpf.12281>
- Tunctan, B., Korkmaz, B., Dogruer, Z. N., Tamer, L., Atik, U., & Buharalioglu, C. K.

- (2007). Inhibition of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) activity reverses endotoxin-induced hypotension via decreased nitric oxide production in rats. *Pharmacological Research*, 56(1), 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2007.03.006>
- Tunctan, Bahar, Korkmaz, B., Sari, A. N., Kacan, M., Unsal, D., Serin, M. S., Buharalioglu, C. K., Sahan-Firat, S., Cuez, T., Schunck, W. H., Manthati, V. L., Falck, J. R., & Malik, K. U. (2013). Contribution of iNOS/sGC/PKG pathway, COX-2, CYP4A1, and gp91 phox to the protective effect of 5,14-HEDGE, a 20-HETE mimetic, against vasodilation, hypotension, tachycardia, and inflammation in a rat model of septic shock. *Nitric Oxide - Biology and Chemistry*, 33, 18–41. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2013.05.001>
- Ulusoy, H., Kangalgil, M., Küçük, A. O., Özdemir, A., Karahan, S. C., Yaman, S. Ö., Yavuz, H. B., & Ok, Ü. (2021). Effects of different lipid emulsions on serum adipokines, inflammatory markers and mortality in critically ill patients with sepsis: A prospective observational cohort study. *Clinical Nutrition*, 40(7), 4569–4578. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2021.05.037>
- van der Slikke, E. C., An, A. Y., Hancock, R. E. W., & Bouma, H. R. (2020). Exploring the pathophysiology of post-sepsis syndrome to identify therapeutic opportunities. *EBioMedicine*, 61, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103044>
- Vankrunkelsven, W., Derde, S., Gunst, J., Vander Perre, S., Declerck, E., Pauwels, L., Derese, I., Van den Berghe, G., & Langouche, L. (2022). Obesity attenuates inflammation, protein catabolism, dyslipidaemia, and muscle weakness during sepsis, independent of leptin. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*, 13(1), 418–433. <https://doi.org/10.1002/jcsm.12904>
- VIGITEL - Secretaria de, Vigilância, D. de A. em S. e, & Transmissíveis, de D. N. (2022). *VIGITEL BRASIL 2021 VigITEL BRASIL 2021*.
- Wang, T., Derhovanessian, A., De Cruz, S., Belperio, J. A., Deng, J. C., & Hoo, G. S. (2014). Subsequent Infections in Survivors of Sepsis. *Journal of Intensive Care Medicine*, 29(2), 87–95. <https://doi.org/10.1177/0885066612467162>
- Wang, X., Buechler, N. L., Martin, A., Wells, J., Yoza, B., McCall, C. E., & Vachharajani, V. (2016). Sirtuin-2 regulates sepsis inflammation in ob/ob mice. *PLoS ONE*,

- 11(8), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160431>
- Wehrens, X. H. T. (2007). The molecular basis of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: What are the different hypotheses regarding mechanisms? *Heart Rhythm*, 4(6), 794–797. <https://doi.org/10.1016/j.hrthm.2006.12.016>
- Wichterman, K. A., Baue, A. E., & Chaudry, I. H. (1980). Sepsis and septic shock—A review of laboratory models and a proposal. *Journal of Surgical Research*, 29(2), 189–201. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(80\)90037-2](https://doi.org/10.1016/0022-4804(80)90037-2)
- World Health Organization - Obesity. (2016). In *World Health Organization*. http://www.who.int/gho/ncd/risk_factors/obesity_text/en/
- World Health Organization - Sepsis. (2017). World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/sepsis>
- Wu, J., Kong, M., Lou, Y., Li, L., Yang, C., Xu, H., Cui, Y., Hao, H., & Liu, Z. (2021). Simultaneous Activation of Erk1/2 and Akt Signaling is Critical for Formononetin-Induced Promotion of Endothelial Function. *Frontiers in Pharmacology*, 11(January), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.608518>
- Wu, M. H., Tsou, P. Y., Wang, Y. H., Lee, M. T. G., Chao, C. C. T., Lee, W. C., Lee, S. H., Hu, J. R., Wu, J. Y., Chang, S. S., & Lee, C. C. (2019). Impact of post-sepsis cardiovascular complications on mortality in sepsis survivors: A population-based study. *Critical Care*, 23(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13054-019-2579-2>
- Yeh, C.-L., Wu, J.-M., Yang, P.-J., Lee, P.-C., Chen, K.-Y., Yeh, S.-L., & Lin, M.-T. (2022). Intravenous calcitriol treatment benefits the homeostasis of CD4+ T cells and attenuates kidney injury in obese mice complicated with polymicrobial sepsis. *Nutrition*, 103–104, 111741. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111741>
- Yende, S., Linde-Zwirble, W., Mayr, F., Weissfeld, L. A., Reis, S., & Angus, D. C. (2014). Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 189(9), 1065–1074. <https://doi.org/10.1164/rccm.201307-1321OC>
- Yuki, K., & Murakami, N. (2015). Sepsis Pathophysiology and Anesthetic Consideration. *Cardiovascular & Hematological Disorders-Drug Targets*, 15(1),

57–69. <https://doi.org/10.2174/1871529x15666150108114810>

- Zaborska, K. E., Wareing, M., & Austin, C. (2017). Comparisons between perivascular adipose tissue and the endothelium in their modulation of vascular tone. *British Journal of Pharmacology*, *174*(20), 3388–3397. <https://doi.org/10.1111/bph.13648>
- Zanotti-Cavazzonia, S. L., & Hollenberg, S. M. (2009). Cardiac dysfunction in severe sepsis and septic shock. *Current Opinion in Critical Care*, *15*(5), 392–397. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e3283307a4e>
- Zhao, Z., Song, J., Yang, C., Yang, L., Chen, J., Li, X., Wang, Y., & Feng, J. (2021). Prevalence of Fungal and Bacterial Co-Infection in Pulmonary Fungal Infections: A Metagenomic Next Generation Sequencing-Based Study. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *11*(November), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.749905>

APÊNDICES

9. APÊNDICES

9.1. Apêndice A - Resultados suplementares da etapa de avaliação das respostas hemodinâmicas e cardíacas

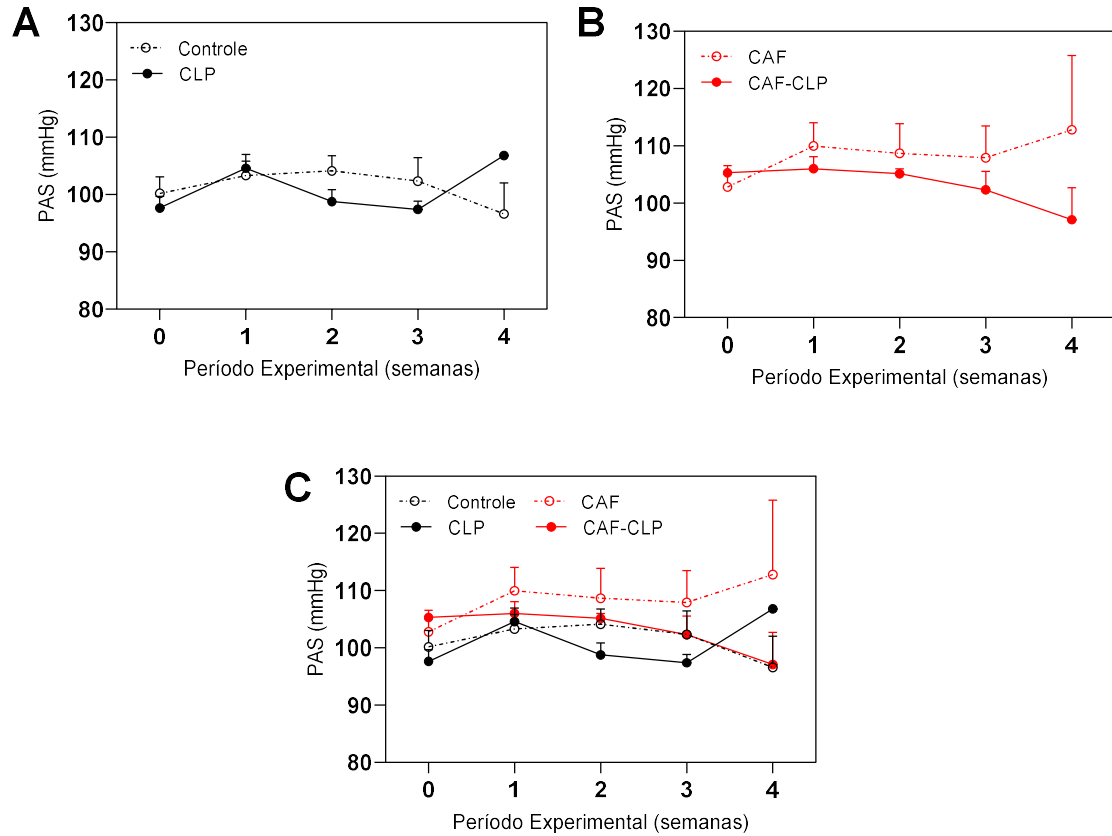


Figura S1: Avaliação temporal da Pressão Arterial Sistólica (PAS) dos grupos experimentais ao longo das semanas de estudo. Os valores representam a média \pm EPM da PAS obtida para um n de 1-14 animais dos grupos experimentais que receberam **(A)** dieta padrão e **(B)** dieta CAF. **(D)** Sobreposição dos resultados de PAS obtidos para todos os grupos experimentais ao longo das 4 semanas de estudo.

9.2. Apêndice B - Resultados suplementares da etapa de avaliação das respostas vasculares

Como pode ser visualizado na *figura S2*, a retirada do endotélio aumentou significativamente o E_{max} e a potência da PE no grupo controle. O mesmo resultado foi verificado para o grupo CAF, com exceção do valor de potência da PE que não se alterou nesse grupo após a retirada do endotélio. No entanto, apesar do aumento verificado para ambos os grupos, a diferença no E_{max} para PE existente na presença do endotélio, permaneceu quando essa camada foi retirada. Portanto, o endotélio parece não estar envolvido na diminuição da contração vascular à PE observada no grupo CAF.

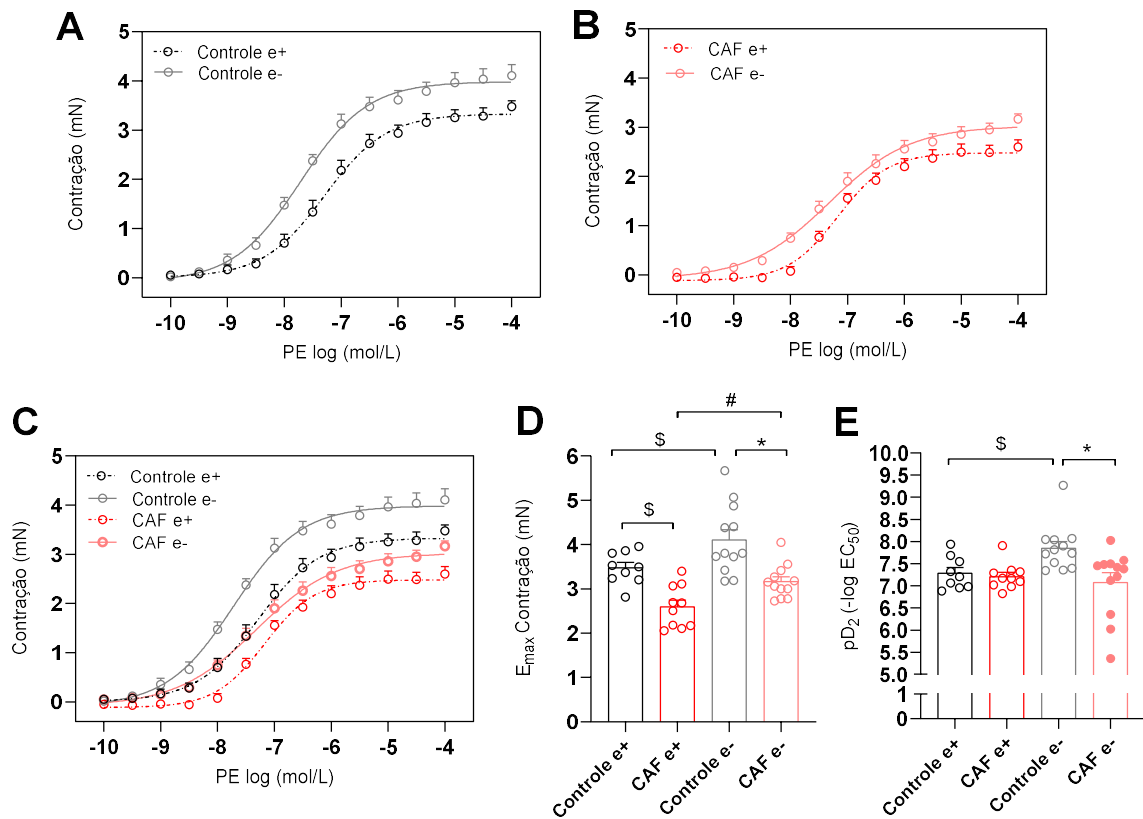


Figura S2. Efeito da remoção da camada endotelial na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (A) e CAF (B) em anéis de aortas com e sem endotélio. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência do endotélio. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 9-11 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle e+; # $p < 0,05$ em relação

ao grupo CAF e+; * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle e- (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

Como mostrado na *figura S3*, a incubação prévia com L-NAME aumentou significativamente os valores de E_{max} e potência da PE do grupo controle. Já, para o grupo CAF, a incubação com L-NAME levou somente a um aumento significativo dos valores de E_{max} da PE, sem alterações no valor da potência da PE. Quando, por sua vez, realizamos a sobreposição das curvas concentração-resposta para PE de ambos os grupos, verificamos que a diferença significativa nos valores de E_{max} da PE existente entre os grupos controle e CAF persistiu com a incubação com L-NAME. Deste modo, a ativação da NOS parece não participar da hiporreatividade vascular verificada no grupo CAF em relação ao grupo controle.

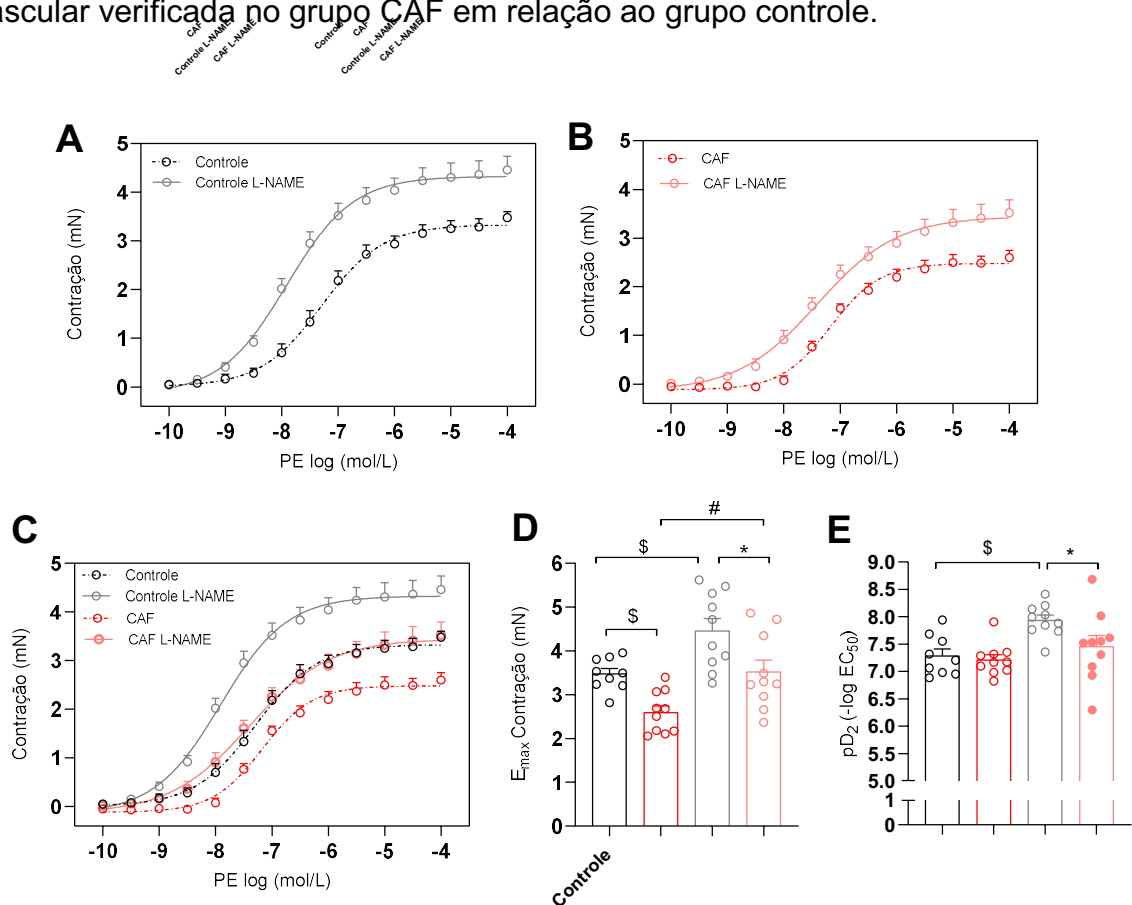


Figura S3. Efeito da inibição não-seletiva da enzima NOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (A) e CAF (B) em anéis de aortas previamente incubados ou não com L-NAME. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de L-NAME. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de

E_{max} e potência da PE obtida para um n de 9-10 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle L-NAME (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

Como pode ser visualizado na figura S4, a incubação com 1400W reduziu significativamente o E_{max} de contração da PE nos grupos controle e CAF, não sendo verificadas alterações nos valores de potência desse vasoconstritor. Contudo, essa redução do E_{max} da PE foi proporcionalmente maior no grupo controle quando comparado ao grupo CAF, de modo que é possível observar a sobreposição das curvas cumulativas concentração-resposta para PE de ambos os grupos após a incubação com 1400W. Em outras palavras, a diferença significativa entre os valores de E_{max} da PE existente entre os grupos, controle e CAF, foi abolida com a inibição seletiva da iNOS. Sendo assim, sugere-se que a atividade da iNOS estaria envolvida na redução da resposta contrátil a PE observada no grupo CAF. No entanto, outros estudos se fazem necessários com intuito de confirmar esses achados obtidos.

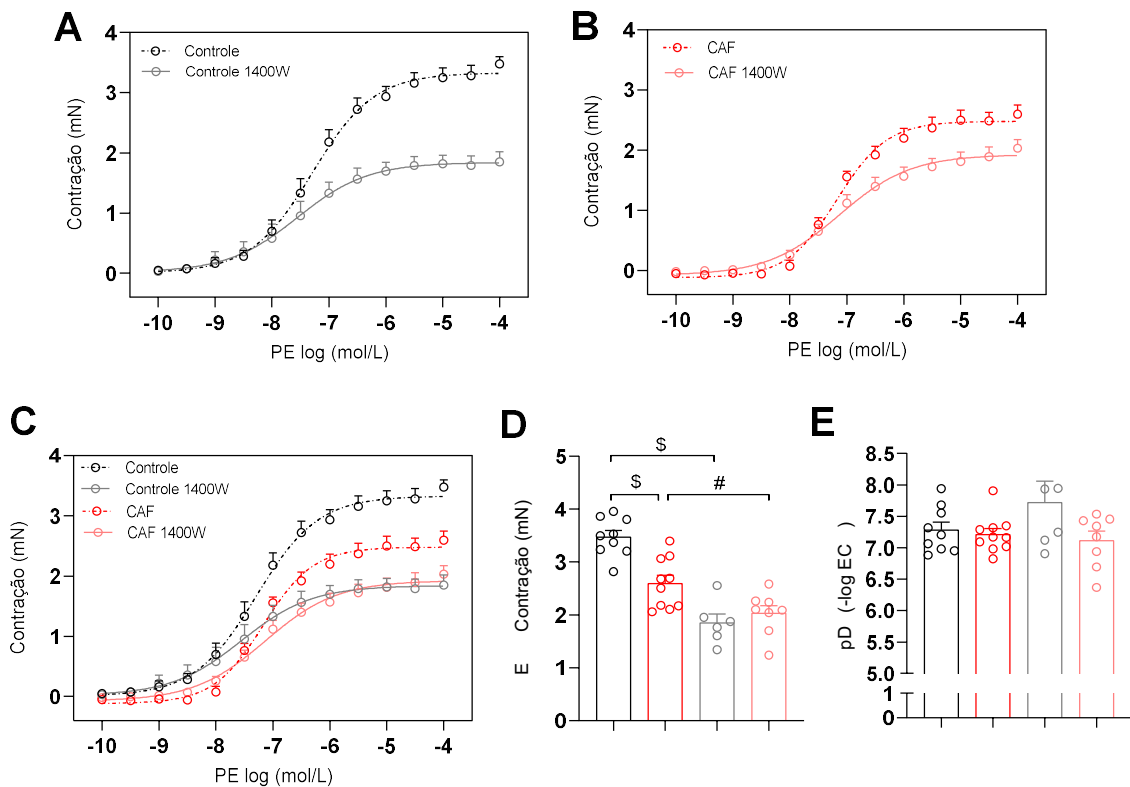


Figura S4. Efeito da inibição seletiva da iNOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle **(A)** e CAF **(B)** em anéis de aortas previamente incubados ou não com 1400W. **(C)** Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de 1400W. **(D)** e **(E)** Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE em relação ao grupo Controle. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Como pode ser observado na figura S5, a incubação com 7-NI diminuiu significativamente o E_{max} e a potência da PE no grupo controle. De maneira similar, a incubação com esse inibidor também causou redução significativa do E_{max} da PE no grupo CAF, porém sem alterações verificadas na potência desse vasoconstritor. No entanto, a redução da resposta contrátil a PE foi proporcionalmente maior no grupo controle quando comparado ao grupo CAF, de modo que o E_{max} e a potência da PE de ambos os grupos foram similares após a incubação com 7-NI. Isso fica evidente na figura S5 C, em que é possível visualizar a sobreposição das curvas cumulativas concentração-resposta para PE dos grupos controle e CAF incubados previamente com 7-NI. Sendo assim, esses achados sugerem que a atividade da nNOS parece estar envolvida na redução da contração vascular a PE no grupo CAF. Contudo, esses resultados ainda não são conclusivos e precisam ser confirmados por meio de estudos futuros.

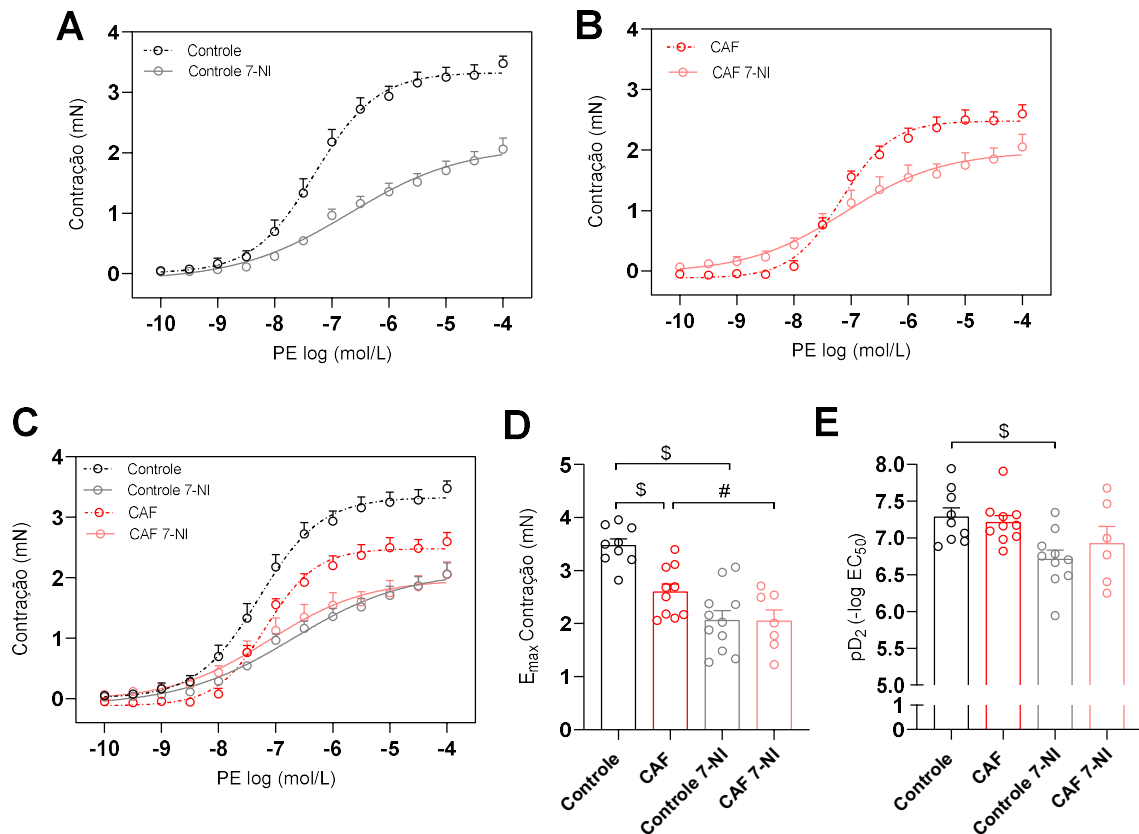


Figura S5. Efeito da inibição seletiva da nNOS na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (A) e CAF (B) em anéis de aortas previamente incubados ou não com 7-NI. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de 7-NI. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE em relação ao grupo Controle. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

Como é possível visualizar na *Figura S6*, a incubação prévia com LY-294,002 reduziu de forma significativa a resposta contrátil da PE nas aortas dos grupos controle e CAF, de modo que a diferença significativa nos valores de E_{max} da PE entre os grupos deixou de existir. Além disso, nenhuma alteração nos valores de potência da PE foi observada entre os grupos após incubação com LY-294,002. Logo, esses achados sugerem que a via de sinalização PI3K-Akt estaria mediando a hiporresponsividade vascular observada no grupo CAF através de um mecanismo que não envolve a ativação da NOS, uma vez que, se envolvesse a ativação da NOS, era esperado que a inibição da PI3K levaria um aumento do E_{max} da PE no grupo CAF, o que não ocorreu de acordo com os resultados obtidos.

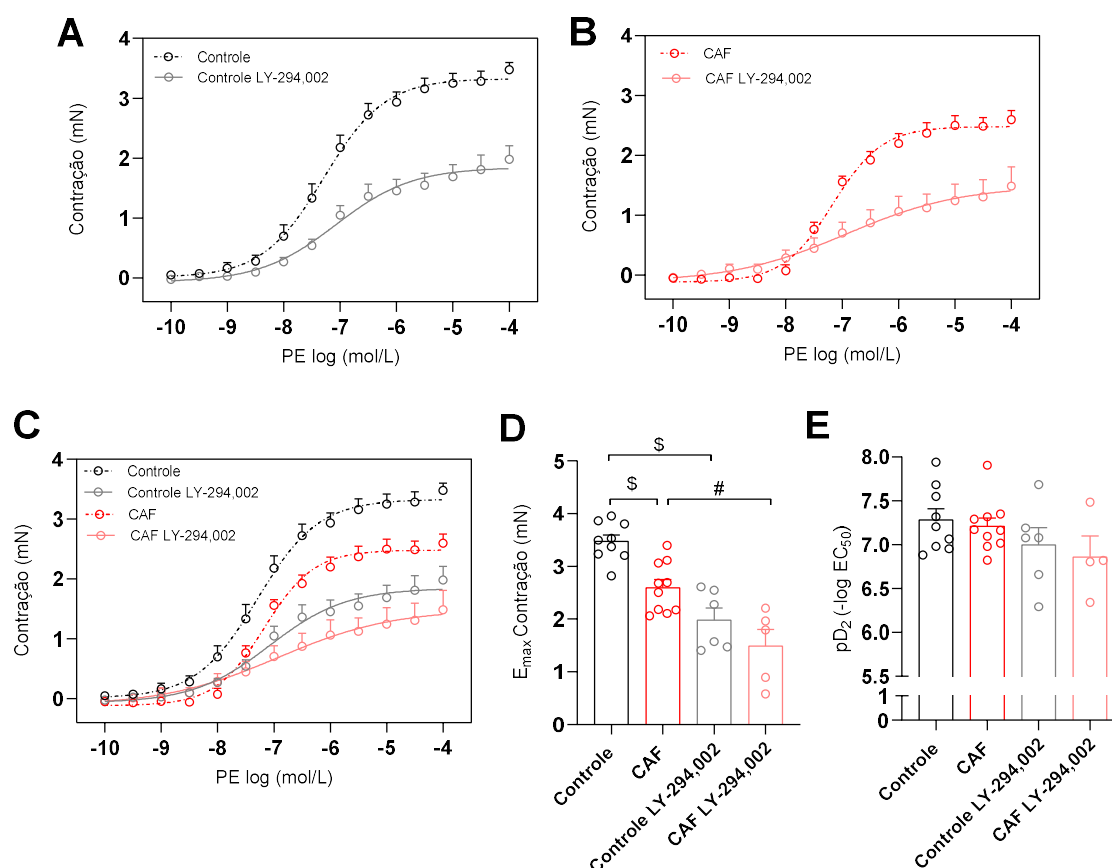


Figura S6. Efeito da inibição seletiva da enzima PI3K na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (A) e CAF (B) em anéis de aortas previamente incubados ou não com LY-294,002. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de LY-294,002. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 4-10 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

Como mostrado na *figura S7*, a incubação prévia com PD98059 reduziu significativamente o E_{max} de contração da PE nos grupos controle e CAF, não sendo observadas alterações nos valores de potência desse vasoconstritor. A redução do E_{max} da PE provocada pela inibição de MEK 1/2 foi proporcionalmente maior no grupo controle, de modo que a diferença significativa nos valores de E_{max} deixou de existir. Esses achados sugerem que a via de sinalização MEK/ERK 1/2 poderia estar mediando a diminuição da resposta contrátil à PE no grupo CAF através de um mecanismo que não envolve a ativação da NOS, já que, como mencionado anteriormente, era esperado um aumento da contração vascular para PE, após a

incubação PD98059, caso a ativação de NOS estivesse envolvida, o que, de fato, não foi verificado.

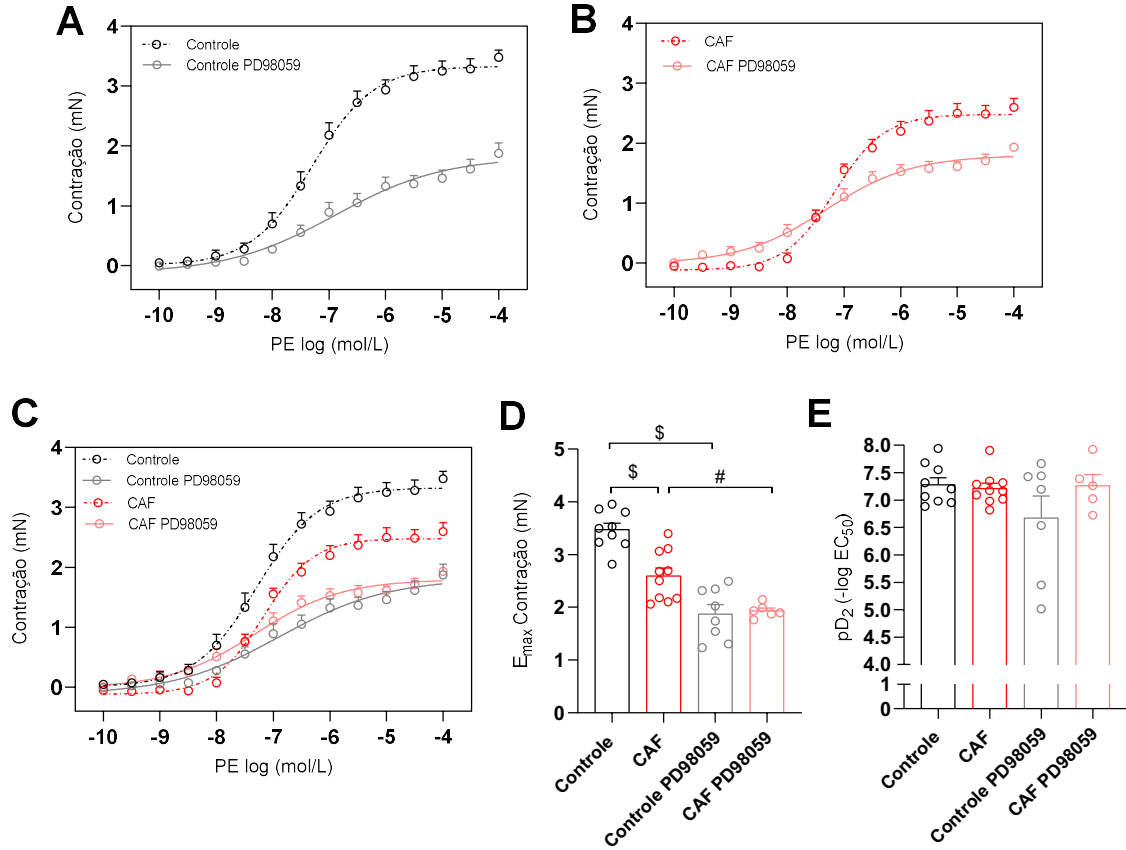


Figura S7. Efeito da inibição seletiva das enzimas MEK 1/2 na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (A) e CAF (B) em anéis de aortas previamente incubados ou não com PD98059. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de PD98059. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 5-10 preparações independentes. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Como mostrado na *figura S8*, no grupo controle, a incubação prévia com ODQ aumentou significativamente o valor da potência da PE, mas reduziu também de forma significativa o E_{max} desse vasoconstritor. Já, no grupo CAF, a incubação com ODQ não alterou significativamente os valores de E_{max} e de potência da PE. Quando, por sua vez, plotamos as curvas de ambos os grupos, não observamos diferença significativa nos valores de E_{max} e potência da PE entre eles. Com base nestes

resultados, sugere-se que a atividade da GCs parece estar mediando a diminuição da contração vascular a PE no grupo CAF.

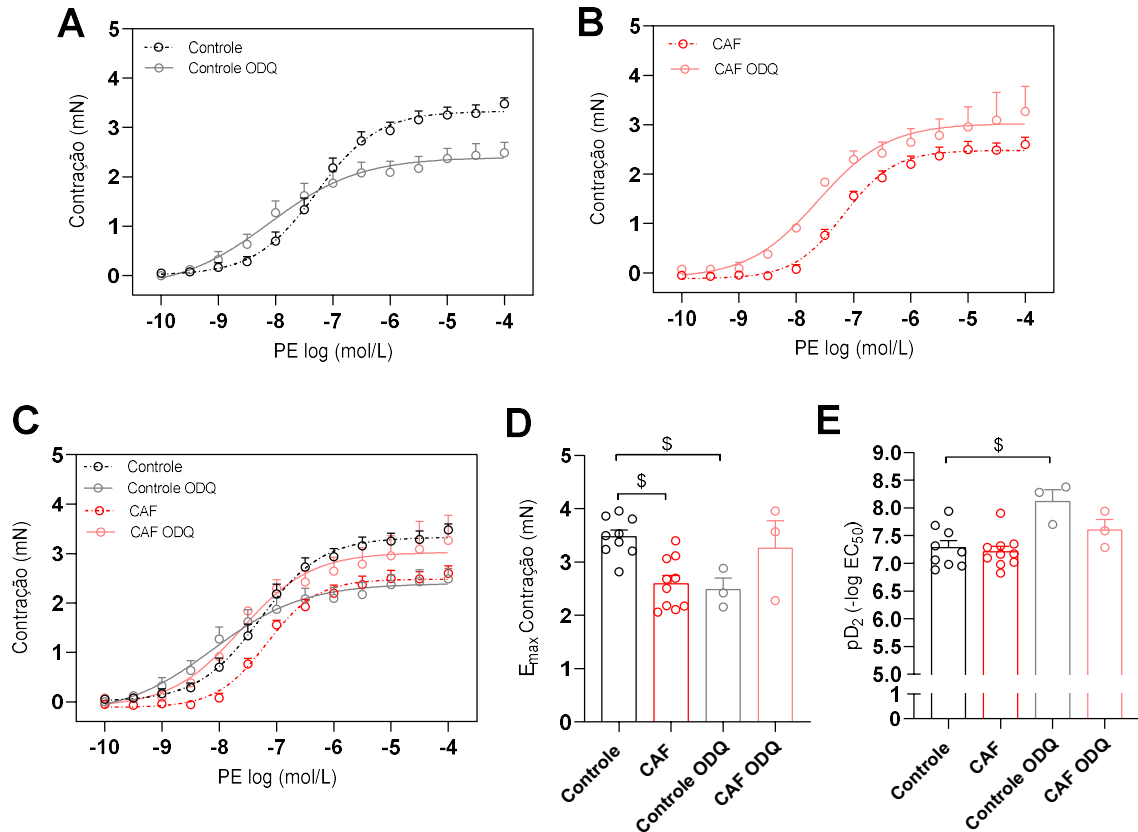


Figura S8. Efeito da inibição da enzima GCs na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (A) e CAF (B) em anéis de aortas previamente incubados ou não ODQ. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de ODQ. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 3-10 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Como pode ser visualizado na figura S9, a incubação com TEA reduziu significativamente o E_{max} de contração da PE tanto no grupo controle, quanto no grupo CAF, sem causar alterações nos valores de potência desse vasoconstritor. No entanto, a diferença significativa do E_{max} da PE existente entre os grupos controle e CAF persistiu após a incubação com TEA. Logo, é possível inferir que os canais para K^+ não contribuem com a hiporreatividade vascular a PE observada no grupo CAF.

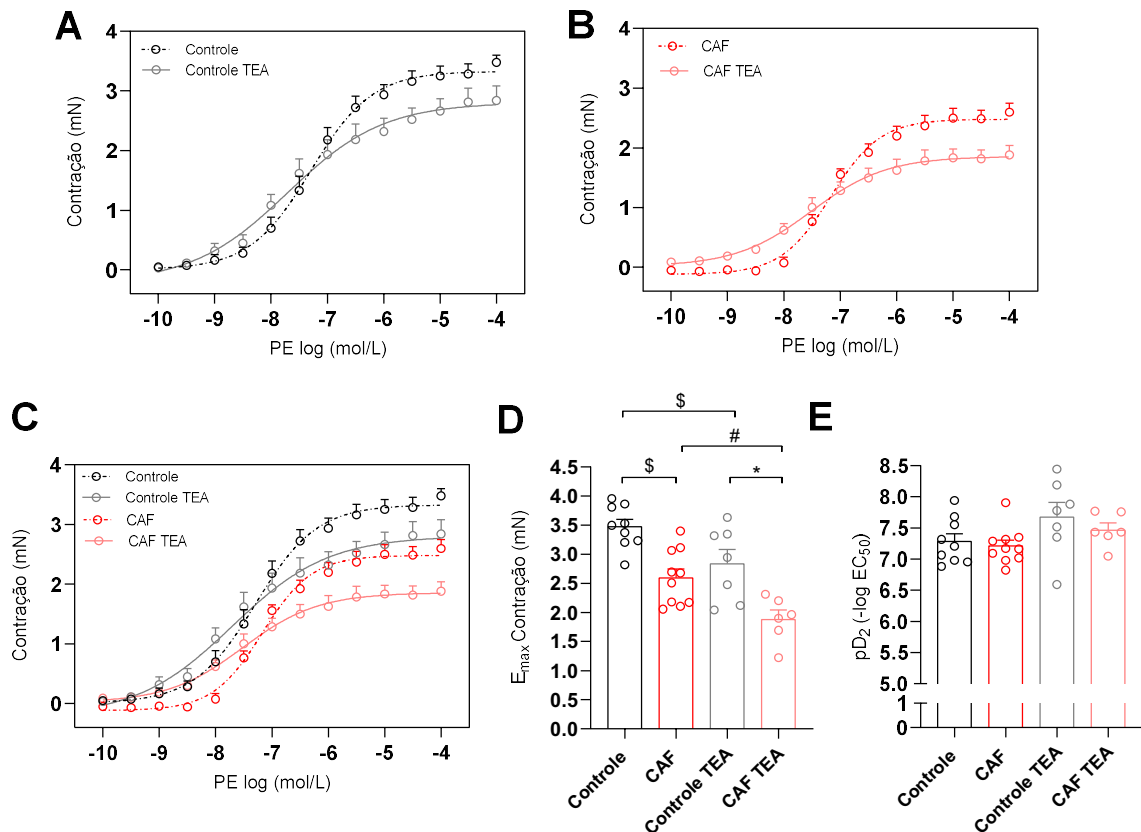


Figura S9. Efeito do bloqueio dos canais para K^+ na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (**A**) e CAF (**B**) em anéis de aortas previamente incubados ou não TEA. (**C**) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de TEA. (**D**) e (**E**) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 6-10 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; * $p < 0,05$ em relação ao grupo TEA (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Como mostrado na *figura S10*, a incubação com ibuprofeno reduziu significativamente os valores de E_{max} da PE nos grupos controle e CAF. Contudo, uma redução significativa do valor da potência da PE foi somente observada no grupo CAF. Logo, quando sobrepomos as curvas cumulativas para PE, verificamos que a diferença significativa nos valores de E_{max} da PE existente entre os grupos deixou de existir após a incubação com ibuprofeno, porém a potência da PE do grupo controle se mostrou significativamente maior comparada a do grupo CAF. Sendo assim, não é possível concluir que a atividade COX participa da diminuição da contração a PE observada no grupo CAF.

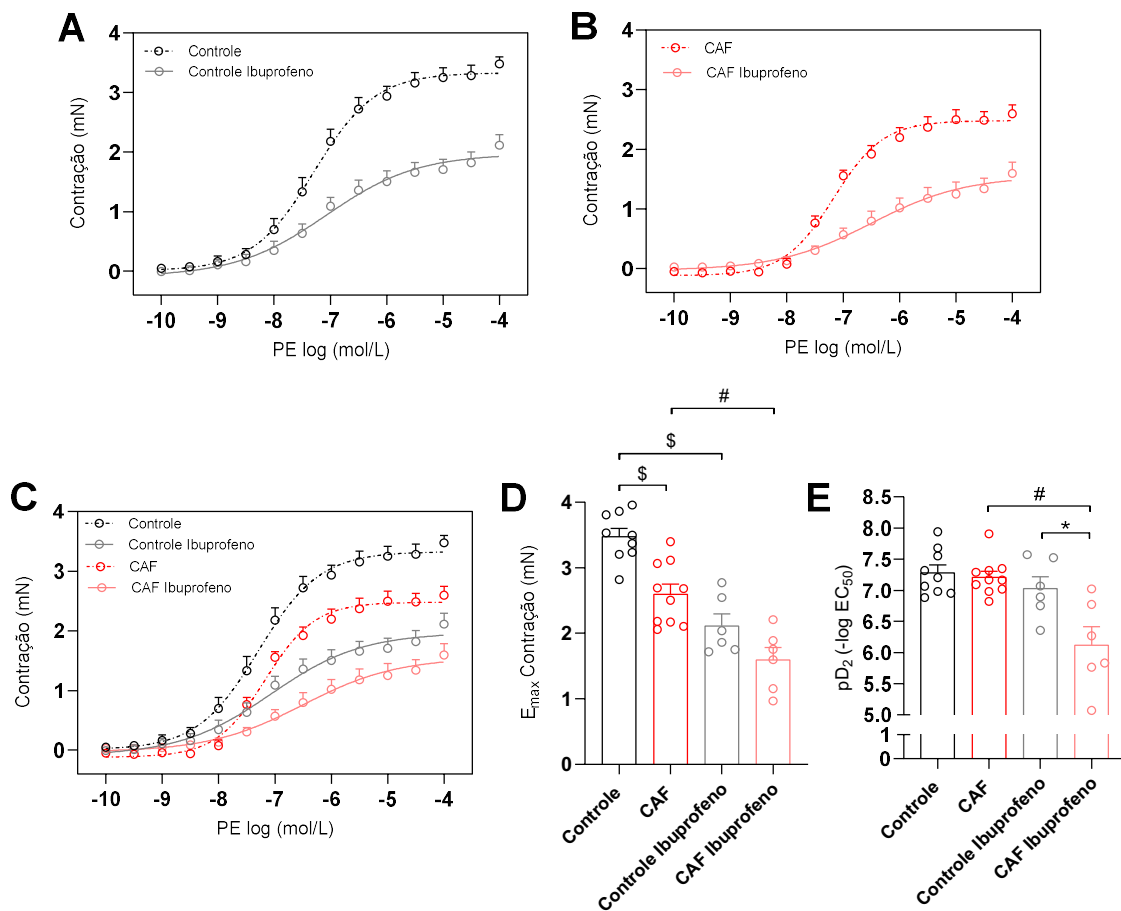


Figura S10. Efeito da inibição não-seletiva da enzima COX na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (A) e CAF (B) em anéis de aortas previamente incubados ou não Ibuprofeno. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de Ibuprofeno. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 6-10 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle Ibuprofeno (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

Como pode ser observado na figura S11, a incubação prévia com catalase reduziu significativamente o E_{max} de contração da PE no grupo controle, não provocando alterações nos valores de potência desse vasoconstritor. No grupo CAF, por sua vez, a incubação com catalase não alterou a resposta contrátil à PE. Dessa forma, quando plotamos as curvas de ambos os grupos em um mesmo gráfico, observamos que as curvas estão sobrepostas, ou seja, a diferença significativa nos valores de E_{max} da PE entre os grupos deixou de existir após a exposição à catalase.

Logo, esses achados sugerem que o H_2O_2 pode estar envolvido na hiporreatividade vascular a PE no grupo CAF, no qual, diferente do esperado, a biodisponibilidade dessa molécula de sinalização estaria reduzida, quando comparado ao grupo controle, o que acarretaria a diminuição da resposta contrátil a PE observada.

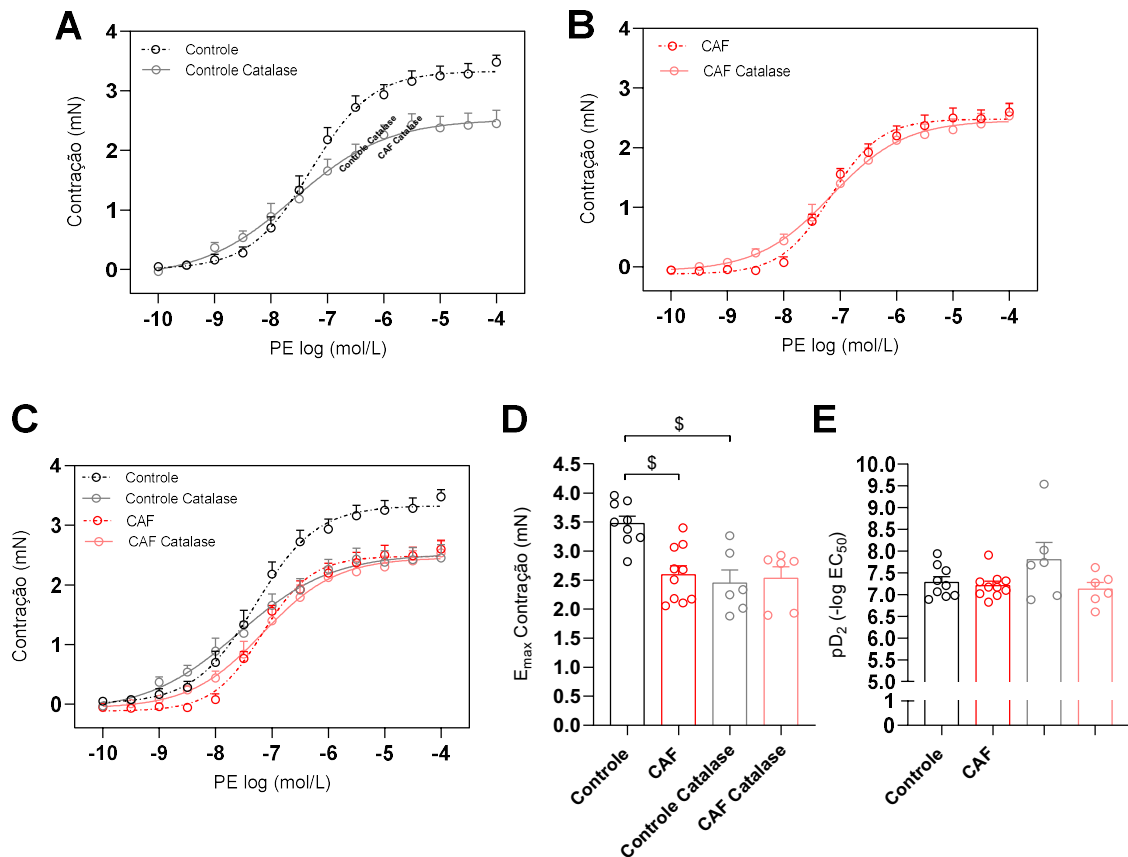


Figura S11. Efeito da Catalase, enzima que catalisa a decomposição do H_2O_2 , na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle (A) e CAF (B) em anéis de aortas previamente incubados ou não Catalase. (C) Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de Catalase. (D) e (E) Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{\max} e potência da PE obtida para um n de 6-10 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle (Two-way ANOVA seguido do pós-teste de Holm-Sidak).

Como pode ser visualizado na figura S12, a incubação com captopril não alterou significativamente a resposta contrátil a PE no grupo controle. Contudo, no grupo CAF, a incubação com Captopril reduziu significativamente os valores de E_{\max} e de potência da PE. Logo, quando as curvas de ambos os grupos foram plotadas em um mesmo gráfico, verificamos que a diferença significativa de E_{\max} da PE existente

entre os grupos persistiu após a incubação com Captopril, não sendo também observadas diferenças nos valores de potência desse vasoconstritor. Diante disso, é possível inferir que o sistema renina-angiotensina não participa da hiporreatividade vascular à PE do grupo CAF.

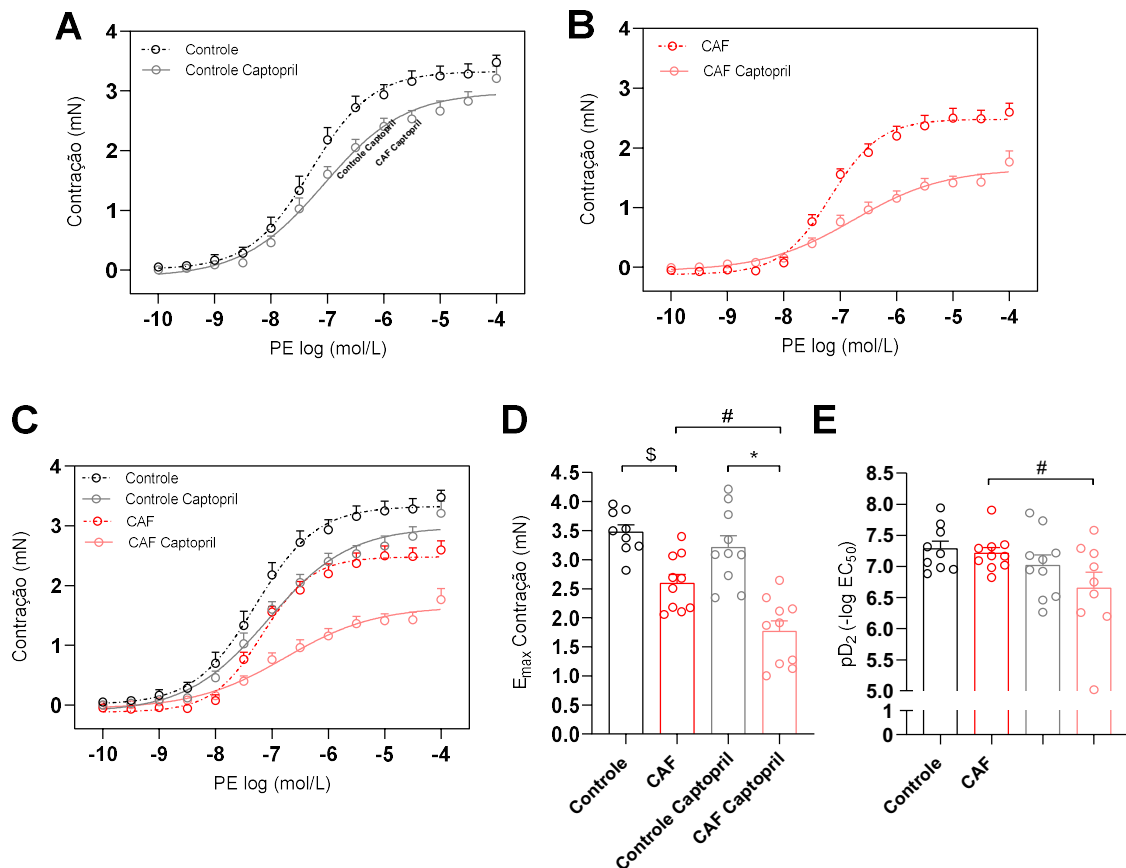


Figura S12. Efeito da inibição da ECA na contração vascular induzida por PE em anéis de aortas dos grupos experimentais. As curvas concentração-resposta ilustram a contração induzida por PE para os grupos Controle **(A)** e CAF **(B)** em anéis de aortas previamente incubados ou não Captopril. **(C)** Sobreposição dos resultados encontrados para os grupos Controle e CAF na presença e na ausência de Captopril. **(D)** e **(E)** Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para um n de 9-10 preparações independentes. \$ $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CAF; * $p < 0,05$ em relação ao grupo Controle Captopril (*Two-way ANOVA* seguido do pós-teste de *Holm-Sidak*).

Como pode ser visualizado na figura S13, não houve diferença significativa no relaxamento vascular induzido pelo Verapamil entre os grupos controle e CAF, o que sugere que os canais para Ca^{2+} não participam da redução da resposta contrátil a PE em aortas do grupo CAF.

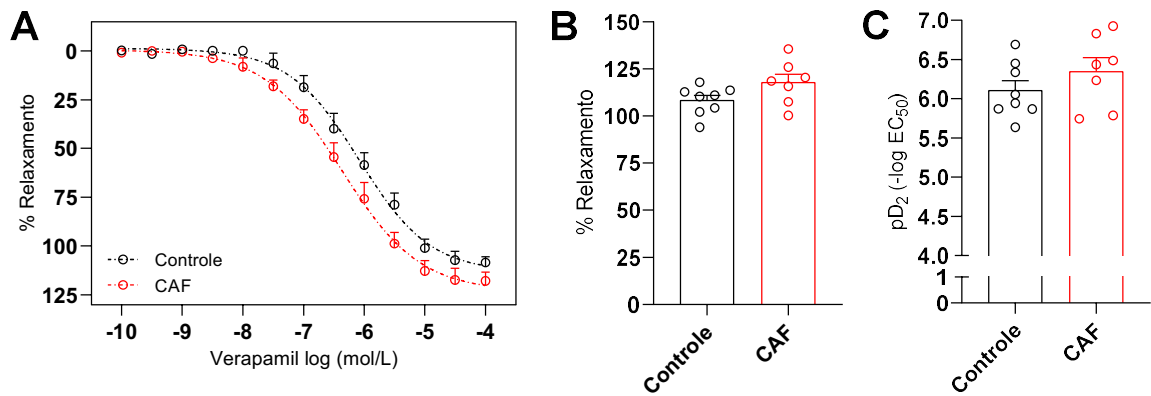


Figura S13: Relaxamento induzido pelo bloqueio dos canais para Ca^{2+} nas aortas dos grupos experimentais. (A) As curvas concentração-resposta ilustram o relaxamento induzido pelo Verapamil em anéis de aortas dos grupos Controle e CAF, pré-contraídos com KCl (30 mmol/L). **(B) e (C)** Cada barra a média \pm EPM dos valores de E_{max} e potência da PE obtida para n preparações independentes (Controle: $n=8$; CAF: $n=7$).