



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

LEONARDO BERTO PEREIRA

**ESTUDO DA SÍNDROME METABÓLICA EM
CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS SUBMETIDOS A SEPSE
SEVERA: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES, INFLAMATÓRIOS E
HEMATOLÓGICOS**

Londrina
2024

LEONARDO BERTO PEREIRA

**ESTUDO DA SÍNDROME METABÓLICA EM
CAMUNDONGOS SWISS FÊMEAS SUBMETIDOS A SEPSE
SEVERA: AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS
CARDIOVASCULARES, INFLAMATÓRIOS E
HEMATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Coorientador: Prof. Dr. Phileo Pinge Filho

Londrina
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

P436E Berto-Pereira, Leonardo.

Estudo da síndrome metabólica em camundongos Swiss fêmeas submetidos a sepse severa: avaliação dos parâmetros cardiovasculares, inflamatórios e hematológicos. / Leonardo Berto-Pereira. - Londrina, 2024.
46 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins-Pinge.

Coorientador: Phileno Pinge-Filho.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2024.

Inclui bibliografia.

1. Síndrome metabólica - Tese. 2. Sepse - Tese. 3. Obesidade - Tese. I. Martins-Pinge, Marli Cardoso. II. Pinge-Filho, Phileno. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

LEONARDO BERTO PEREIRA

**ESTUDO DA SÍNDROME METABÓLICA EM CAMUNDONGOS SWISS
FÊMEAS SUBMETIDOS A SEPSE SEVERA: AVALIAÇÃO DOS
PARÂMETROS CARDIOVASCULARES, INFLAMATÓRIOS E
HEMATOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso
Martins Pinge
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dra. Flávia Alessandra Guarnier
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Ernane Torres Uchoa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 07 de maio de 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças e sabedoria nessa caminhada para alcançar meus objetivos e vencer as dificuldades e desafios ao longo dessa jornada.

Agradeço aos meus pais, Andréia Berto e Leonardo Batista, minha avó, Raquel de Oliveira e meus tios, Adriano Zeferino e Vanilza Martins, por sempre se esforçarem para que eu tivesse as oportunidades que eles nunca tiveram, proporcionando as melhores condições para que eu pudesse chegar até aqui, passando os valores que me fizeram ser a pessoa que sou hoje, muitas vezes se sacrificando em benefício dos filhos, dando todo o suporte durante minha vida acadêmica.

Agradeço a minha namorada, Valentina Alves (Gatusca), por ser minha companheira de vida e ter ficado ao meu lado durante esse ano de mestrado, foi paciente e me deu seu amor, carinho, colo e conforto, sempre soube o que falar, me encorajando a seguir em frente nos momentos de dificuldades e me incentivando a sempre dar o melhor de mim e ser minha melhor versão. Obrigado por todos os finais de semana que me acompanhou na UEL, e todas as noites acordada comigo enquanto estudava. Amo ser seu Bê.

Agradeço a minha sogra, Larissa Braga (sogrinha), sempre se mostrou presente acompanhando toda minha trajetória desde a graduação até aqui, nunca mediu esforços para me ver bem. Sempre com palavras de carinho e conforto. Se hoje tenho orgulho de onde cheguei e de quem sou é porque tive pessoas como você em minha vida para me inspirar. Obrigado, beijo com Deus.

Agradeço a minha orientadora, Professora Doutora Marli Cardoso Martins Pinge, pela confiança, oportunidade e orientação, foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e pessoal. Sou imensamente grato por sua paciência, incentivo e sabedoria, que foram essenciais para superar os desafios e alcançar meus objetivos. Seu comprometimento e dedicação são inspiradores, um grande exemplo de profissional. Muito obrigado, por tudo.

Agradeço ao meu coorientador, Professor Doutor Phileno Pinge Filho por aceitar me coorientar, estar sempre disponível para me ajudar e tirar minhas

dúvidas, sempre muito paciente. Ter tido a oportunidade de ter você como coorientador e ter participado da sua aula foi engrandecedor e inspirador. É por professores como você que a docência deixa de ser um medo e passa a ser um privilégio. Obrigado por toda troca de conhecimento.

Agradeço a todos do Laboratório de Imunopatologia Experimental, em especial, Raquel Nakama (Rachel), que me introduziu nesse universo de seps e síndrome metabólica, me orientando desde o TCC, sempre se mostrando solícita para qualquer dúvida ou puxão de orelha. Lucas Felipe (Lucas Chagas), meu amigo de laboratório e colega de quarto, mesmo com seu mau humor na maior parte das manhãs esteve sempre presente e disposto a ajudar em todos os experimentos realizados. Lucas Rossi (Odonto), por dividir as fêmeas comigo e por todo papo aleatório de “o que você prefere?” que rolava em cada tempo livre e, Isabella Thihara (Meni), chegou recentemente no laboratório, esteve presente em todos os experimentos, sempre acompanhada de um sumiço repentino. Vocês são ótimos profissionais e bons amigos, sempre me senti acolhido na presença de vocês. Agradeço à Aparecida Malvezi (Cida) e aos alunos de iniciação científica, Guilherme Massardi, Mateus Viana, Isabella Maximo, Manuela Fancio e Gabriela Gonçalves, por me ajudarem em todas as etapas e experimentos até a finalização do trabalho.

Agradeço aos meus amigos, João e Fabricio, vocês foram essenciais na caminhada até aqui, cada “jantar” e conversa até tarde da madrugada no laboratório foram importantes e muito significativas para passar o tempo e aguentar toda essa trajetória, vocês são os melhores quixós que alguém poderia ter.

Agradeço a CAPES, pelo auxílio financeiro oferecido ao longo desse período.

A todos, meu mais sincero, obrigado!

RESUMO

BERTO-PEREIRA, Leonardo. **Estudo da síndrome metabólica em camundongos Swiss fêmeas submetidos a sepse severa: avaliação dos parâmetros cardiovasculares, inflamatórios e hematológicos.** Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, Departamento de Imunologia, Parasitologia e Patologia Geral, Centro de Ciências Biológicas – Universidade Estadual de Londrina, Paraná, Brasil, 2024.

A obesidade é considerada uma doença complexa que ocorre mediante interação entre uma predisposição genética e fatores ambientais, definida como um excesso de gordura corporal resultante de um balanço energético inadequado por um longo período. O quadro de obesidade está também associado ao desenvolvimento de diversas outras complicações, como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, dislipidemia e hipertensão. Quando indivíduos apresentam pelo menos três dessas complicações, clinicamente são diagnosticados com síndrome metabólica (Smet). Outro problema de saúde pública é a sepse, definida como uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. A sepse é considerada uma das causas mais comuns de morte em unidades de terapia intensiva (UTI), apresentando um diagnóstico difícil devido às múltiplas comorbidades e doenças subjacentes que os indivíduos desenvolvem. Dados recentes mostraram que camundongos machos com síndrome metabólica apresentam melhor prognóstico e sobrevida quando submetidos a uma condição séptica moderada, corroborando com a teoria do paradoxo da obesidade. Nesse estudo, animais com Smet apresentam hipertensão e quando estes são submetidos à condição séptica por ligadura e punção do ceco (CLP) que, em animais controle promove hipotensão, estes não apresentam alterações significativas na pressão arterial. No entanto, essa associação não foi avaliada ainda em fêmeas, inclusive se as mesmas apresentam um perfil dentro do paradoxo da obesidade. Dessa maneira, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito da Smet em camundongos Swiss fêmeas submetidos à sepse polimicrobiana severa induzida por CLP. A Smet foi induzida em camundongos Swiss neonatos através de injeção subcutânea de glutamato monossódico (MSG) com 4mg/g de peso corporal do dia 1 ao dia 5 após o nascimento. Os animais do grupo controle (CTL) foram tratados com solução salina equimolar na mesma concentração e período. No 75º dia de vida, o modelo CLP foi utilizado para induzir sepse polimicrobiana severa. Para os parâmetros inflamatórios avaliamos o óxido nítrico (NO), determinado pela técnica de cádmio e Griess e a quantificação de IL-6 através da técnica de ELISA. A dosagem de glicose foi realizada 24 horas antes e 24 horas após CLP por monitor de glicose, e o perfil lipídico foi dosado a partir de kit comercial. Os parâmetros cardiovasculares foram mensurados utilizando a plataforma CODA e a avaliação hematológica foi determinada por contagem padrão. A Smet não alterou a sobrevida dos animais submetidos à sepse, visto que os grupos CTL e Smet CLP apresentaram quadro de hipotensão e hipoglicemia, acompanhado de leucopenia e aumento de citocina inflamatória IL-6. Com isso, podemos concluir que a teoria do paradoxo da obesidade não é observada nas fêmeas, embora tenha sido observado que a Smet atenua alguns parâmetros durante a sepse, como hematológicos e resistência ao aumento de NO. Esses achados fornecem novas informações para a literatura relacionando a Smet e sepse.

Palavras-chave: Ligadura e punção do ceco; Óxido nítrico; Obesidade; Glicemia; Hipertensão; Citocinas.

ABSTRACT

BERTO-PEREIRA, Leonardo. **Study of metabolic syndrome in female Swiss mice subjected to severe sepsis: evaluation of cardiovascular, inflammatory, and hematological parameters.** Dissertation – Postgraduate in Experimental Pathology, Department of Immunology, Parasitology and General Pathology, Biological Science Center - State University of Londrina, Paraná, Brazil, 2024.

Obesity is considered a complex disease that occurs through the interaction between genetic predisposition and environmental factors, defined as an excess of body fat resulting from an inadequate energy balance over a long period. Obesity is also associated with the development of various other complications such as hyperglycemia, hypertriglyceridemia, dyslipidemia, and hypertension. When individuals present at least three of these complications, they are clinically diagnosed with metabolic syndrome (MetS). Another public health problem is sepsis, defined as organ dysfunction with life-threatening risks caused by a dysregulated host response to infection. Sepsis is considered one of the most common causes of death in intensive care units (ICUs), presenting a difficult diagnosis due to the multiple comorbidities and underlying diseases individuals develop. Recent data have shown that male mice with metabolic syndrome have a better prognosis and survival when subjected to moderate septic conditions, corroborating the theory of the obesity paradox. In this study, animals with MetS present hypertension, and when subjected to septic condition by cecal ligation and puncture (CLP), which in control animals promotes hypotension, they do not present significant changes in blood pressure. However, this association has not yet been evaluated in females, including whether they exhibit a profile within the obesity paradox. Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of MetS in female Swiss mice subjected to severe polymicrobial sepsis induced by CLP. MetS was induced in neonatal Swiss mice by subcutaneous injection of monosodium glutamate (MSG) at 4mg/g body weight from day 1 to day 5 after birth, while animals in the control group (CTL) were treated with equimolar saline solution at the same concentration and period. On the 75th day of life, the CLP model was used to induce severe polymicrobial sepsis. For inflammatory parameters, we evaluated nitric oxide (NO), determined by the cadmium and Griess technique, and quantification of IL-6 using the ELISA technique. Glucose dosage was performed 24 hours before and 24 hours after CLP by glucose monitor, and lipid profile was measured using a commercial kit. Cardiovascular parameters were measured using the CODA platform, and hematological evaluation was determined by standard counting. MetS did not alter the survival of animals subjected to sepsis, as both CTL and MetS CLP groups showed hypotension and hypoglycemia, accompanied by leukopenia and increased inflammatory cytokine IL-6. Thus, we can conclude that the theory of the obesity paradox is not observed in females, although it was observed that MetS attenuates some parameters during sepsis, such as hematological and resistance to NO increase. These findings provide new information for the literature regarding the relationship between MetS and sepsis.

Key-words: Ligation and perforation of the cecum; Nitric oxide; Obesity; Blood glucose; Hypertension; Cytokines.

“Quando eu era menino, os mais velhos perguntavam:
- O que você quer ser quando crescer?
Hoje não perguntam mais. Se perguntassem, eu diria que quero ser, menino.”

Fernando Sabino

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Celsius
µL	Microlitros
µM	Micromolar
ARC	Núcleo arqueado
bpm	Batimentos por minuto
CLP	Ligadura e punção do ceco
cm	Centímetros
cm ³	Centímetros cúbicos
CP	Parâmetros cardiovasculares
CTL	Controle
DAMP	Padrões moleculares associados a danos
DAP12	Proteína adaptadora 12
DCV	Doenças cardiovasculares
dL	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
g	gramas
GHRH	Hormônio liberador do hormônio do crescimento
i.p	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
h	Horas
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HR	Frequência cardíaca
IL	Interleucina
iNOS	Isoforma induzível

IMC	Índice de massa corporal
Kg	Quilogramas
M1	Macrófago tipo 1
M2	Macrófago tipo 2
MAP	Pressão arterial média
MDL-1	Lectina associada a DAP12 mieloide
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm ³	Milímetros cúbicos
mmHg	Milímetros de mercúrio
NO	Óxido nítrico
MSG	Glutamato monossódico
PA	Pressão arterial
PAMP	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Proteína C reativa
PG	Perigonadal
pg	Picogramas
PRR	Receptor de reconhecimento de padrões
rpm	Rotações por minuto
RT	Retroperitoneal
s.c	Subcutânea
SAM	Síndrome de ativação macrófagica
SHAM	Cirurgia simulada
SHUa	Síndrome hemolítico-urêmica atípica
Smet	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
Th2	Linfócitos T helper tipo 2

TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TREM-1	Receptor desencadeante expresso nas células mieloides-1
UTI	Unidade de terapia intensiva
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA	15
1.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO	16
1.3 SEPSE POLIMICROBIANA	18
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVO	21
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 REFERÊNCIAS.....	22
ANEXO A – CEUA.....	25
ANEXO B – Produção científica	26

1 1 INTRODUÇÃO

2

3 1.1 OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA

4

5 A obesidade tornou-se um problema de saúde pública em todo mundo e as
6 condições relacionadas variam conforme a região (Mayoral, Andrade et al. 2020). É
7 considerada uma doença complexa que ocorre mediante interação entre uma
8 predisposição genética e fatores ambientais, definida como um excesso de gordura
9 corporal resultante de um balanço energético inadequado por um longo período
10 (Faccioli, Poitou et al. 2023). Em 2015, foi estimado pelo Global Burden of Disease
11 Obesity Collaborator que mais de 603,7 milhões de adultos apresentavam quadro de
12 obesidade, e o mesmo, estimou que valores maiores de IMC foram responsáveis por
13 4 milhões de mortes, sendo dois terços deste número associado a doenças
14 cardiovasculares (Piché, Tchernof et al. 2020).

15 O tecido adiposo é considerado um importante órgão endócrino, sendo
16 responsável pela homeostase energética, em condições de hiperadiposidade, onde
17 há perda da homeostase energética, acarretando distúrbios metabólicos, produção
18 alterada de hormônios esteróides, como o estrogênio e, inflamação crônica (Iyengar,
19 Gucalp et al. 2016). A inflamação causada pela obesidade é diferente de outros
20 padrões inflamatórios pois envolve a ativação da imunidade inata, impactando na
21 homeostase energética. Esse quadro inflamatório também pode levar a respostas
22 inadequadas do organismo, como quadros de fibrose e necrose, podendo também,
23 causar danos significativos nos tecidos (Saltiel and Olefsky 2017).

24 A obesidade, vem sendo associada a um estado de inflamação sistêmica,
25 caracterizado por uma resposta desencadeada pelo tecido adiposo, com aumentos
26 nas citocinas: IL-6, IL-1, IL-8 e TNF- α e ocasionando o aumento de proteínas de fase
27 aguda, como a proteína C reativa (PCR) (Purdy and Shatzel 2021). A obesidade
28 apresenta uma relação direta com a hipertensão arterial sistêmica, conhecida como
29 hipertensão, definida pelo aumento da pressão arterial (PA) nas artérias sistêmicas
30 de modo persistente (Luft 2001). Isso ocorre pelo aumento do débito cardíaco e o
31 volume do plasma em indivíduos obesos em comparação com indivíduos que não
32 apresentam quadro de obesidade. Também podem ocorrer alterações na resistência
33 periférica pelo aumento nos fatores vasoconstritores ou a diminuição dos
34 vasodilatadores que contribuem para a elevação da PA (Oparil, Acelajado et al. 2018).

1 As doenças cardiovasculares (DCV) são consideradas um grande problema de
2 saúde em todo o mundo, conhecidas como uma das principais causas de morte. A
3 obesidade apresenta um papel muito significativo no desenvolvimento de DCV,
4 estando intimamente associada ao quadro de resistência à insulina, que ocorre devido
5 ao fato das células responderem menos aos efeitos da insulina, podendo resultar em
6 complicações como hiperglicemia e o desenvolvimento de diabetes mellitus tipo 2.
7 Esse quadro de resistência à insulina prejudica o estado normal do metabolismo da
8 glicose, levando a um aumento do estresse oxidativo e uma reação inflamatória (Irfan
9 2024). O quadro de obesidade está também associado ao desenvolvimento de
10 diversas outras complicações, como hiperglicemia, hipertrigliceridemia, dislipidemia e
11 hipertensão. Quando indivíduos apresentam pelo menos três dessas complicações,
12 clinicamente são diagnosticados com síndrome metabólica (Smet) (Boulangé, Neves
13 et al. 2016).

14 A Smet foi descrita originalmente em 1988, conhecida antes como síndrome de
15 resistência à insulina ou síndrome X (McCracken, Monaghan et al. 2018). Atualmente
16 a Smet é caracterizada como um conjunto de anormalidades metabólicas associadas
17 ao aumento do risco de desenvolver doenças cardiovasculares (Rochlani, Pothineni
18 et al. 2017). Estudos recentes mostram que a disfunção endotelial, estresse oxidativo
19 crônico e inflamação sistêmica também foram incluídos como fatores importantes para
20 caracterizar a Smet. Esses fatores clínicos recentes se unem também a uma
21 suscetibilidade genética e aos fatores patogênicos clássicos para construir a
22 fisiopatologia complexa e variada da Smet (Bovolini, Garcia et al. 2021).

23 As células do sistema imunológico desempenham um papel fundamental na
24 disfunção fisiológica associada a Smet, incluindo sua patogênese e o
25 desenvolvimento de doenças crônicas. A perda da homeostase metabólica leva a
26 ativação do sistema imunológico em diversos tecidos, como adiposo, fígado, pâncreas
27 e vascular, onde conseqüentemente os indivíduos notavelmente apresentam
28 marcadores plasmáticos elevados característicos de inflamação crônica. O quadro de
29 obesidade também pode afetar diretamente a imunidade devido a mudanças nas
30 populações de leucócitos e fenótipos inflamatórios, podendo levar ao aumento do
31 risco de desenvolver doenças infecciosas e crônicas, além de complicações ainda
32 maiores na disfunção metabólica (Andersen, Murphy et al. 2016).

33

34 1.2 INDUÇÃO DA OBESIDADE POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO

1
2 O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais abundante no sistema
3 nervoso central (SNC) sendo mais conhecido como glutamato monossódico (MSG)
4 (Hernández Bautista, Mahmoud et al. 2019). A utilização do MSG para a indução da
5 obesidade é um modelo muito utilizado e conhecido na literatura. A principal alteração
6 causada por esse aminoácido é o dano e a morte celular dos neurônios dos núcleos
7 hipotalâmicos, principalmente aqueles do núcleo arqueado (ARC). Essa perda de
8 neurônios afeta a sinalização mediada pela insulina prejudicando o equilíbrio
9 energético (Zazula, Saraiva et al. 2023). O ARC sendo uma estrutura do SNC
10 relacionada à ingestão de alimentos, faz com que animais com Smet induzidos por
11 MSG apresentem características típicas, como um atraso no crescimento devido à
12 lesão que ocorre no ARC causando diminuição da secreção do hormônio liberador do
13 hormônio do crescimento (GHRH), o que pode explicar as alterações no tamanho
14 reduzido (Hernández Bautista, Mahmoud et al. 2019).

15 Diversos estudos presentes na literatura já mostraram o efeito do MSG no
16 metabolismo homeostático e sua eficácia no desenvolvimento da Smet. Lucchetti e
17 colaboradores em 2019, através da indução da Smet em camundongos Swiss
18 demonstraram que a Smet pode ser um fator exacerbador da fase aguda da doença
19 de Chagas (Lucchetti, Boaretto et al. 2019). Nakama e colaboradores em 2021
20 observou que a Smet melhorou a sobrevivência de camundongos submetidos à sepse
21 moderada e atenuou o aumento de óxido nítrico (NO) plasmático, característica típica
22 da sepse, corroborando com a teoria do paradoxo da obesidade (Nakama, Malvezi et
23 al. 2021).

24 Os efeitos da administração do MSG também já foram observados utilizando
25 ratos como modelo experimental avaliando parâmetros cardiovasculares. Foi
26 observado que a administração de MSG em ratos induziu alterações metabólicas e
27 cardiovasculares e a suplementação apenas com L-Arginina ou treinamento físico foi
28 capaz de reverter esses parâmetros impostos pela Smet (Reginato, de Jager et al.
29 2023). Outros trabalhos presentes na literatura como de Da Cunha e colaboradores
30 em 2017, em ratos que passaram pela administração de MSG foi observado aumento
31 da ativação da iNOS cardíaca, contribuindo para a disfunção autonômica do coração,
32 aumento de prostaglandina E₂ e perfil oxidativo, todos revertidos pela inibição da
33 enzima iNOS (da Cunha, Lopes et al. 2017). Leite e colaboradores em 2015
34 observaram que a esplenectomia em ratos obesos por MSG pode diminuir o quadro

1 de obesidade e modular a função das ilhotas pancreáticas, demonstrando a sinergia
2 entre o baço e o pâncreas endócrino (Leite Nde, Montes et al. 2015). Dessa forma,
3 tanto em ratos como em camundongos o modelo MSG tem mostrado ser um bom
4 modelo de síndrome metabólica.

5

6 1.3 SEPSE POLIMICROBIANA

7

8 A partir da terceira conferência de consenso internacional, publicada em 2016,
9 a sepse passou a ser definida como uma disfunção orgânica com risco de vida
10 causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (Esposito, De
11 Simone et al. 2017). A sepse é considerada uma das causas mais comuns de morte
12 em unidades de terapia intensiva (UTI), apresentando um diagnóstico difícil devido às
13 múltiplas comorbidades e doenças subjacentes que os indivíduos desenvolvem (Rello,
14 Valenzuela-Sánchez et al. 2017). É estimado que 48,9 milhões de pessoas em todo o
15 mundo sejam diagnosticadas com quadro de sepse a cada ano, sendo responsável
16 por 11 milhões de mortes apresentando 19,7% do total de todas as mortes globais. A
17 porcentagem de mortes globais causadas pela sepse em 2017 atingiu o pico na
18 primeira infância, diminuiu no início da idade adulta e atingiu o pico novamente em
19 adultos mais velhos (Wang and Liu 2023).

20 A fisiopatologia da sepse atualmente é conceituada como um desequilíbrio que
21 ocorre na resposta inflamatória sistêmica que influencia e afeta a função do sistema
22 imunológico, o eixo neuroendócrino e a cascata de coagulação, resultando em lesão
23 e falência de órgãos. A inflamação possui um papel muito importante na patogênese
24 da sepse, que se inicia com a resposta a patógenos invasivos, liberação de citocinas,
25 padrões moleculares associados a danos (DAMP) e padrões moleculares associados
26 a patógenos (PAMP). Os PAMP são responsáveis por estimular monócitos a realizar
27 liberação de pró-coagulantes e outros mediadores para ativação de plaquetas,
28 neutrófilos e células endoteliais, já os DAMP, compreendendo as histonas, DNA
29 cromossômico, DNA mitocondrial, nucleossomos e proteínas liberadas por neutrófilos
30 ativando o processo inflamatório e a cascata de coagulação. Como a resposta
31 inflamatória a nível sistêmico é mais agressiva, existem mecanismos endógenos para
32 que seja possível regular a inflamação que são importantes para a sobrevivência dos
33 indivíduos. O quadro de sepse é conhecido como a forma mais comum de inflamação
34 desregulada, mas também existem outras como a síndrome de ativação macrofágica

1 (SAM), síndrome hemolítico-urêmica atípica (SHUa) e o choque endotoxêmico
2 (Kellum, Formeck et al. 2022).

3 A resposta inflamatória do indivíduo frente a uma infecção se inicia quando as
4 células da imunidade inata, principalmente macrófagos, vão reconhecer e se ligar aos
5 componentes dos patógenos. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRR)
6 localizados na superfície das células do sistema imunológico vão reconhecer e se ligar
7 aos PAMP. Os PRR também podem reconhecer sinais de danos endógenos,
8 conhecidos como alarminas ou DAMP, liberados durante o processo inflamatório. A
9 partir disso, o receptor desencadeador que está expresso nas células mieloides
10 (TREM-1) e os receptores mieloides de lectina associada à DAP12 (MDL-1) presente
11 nas células do sistema imunológico que vão reconhecer e se ligar aos patógenos. A
12 ligação desses receptores de superfície das células do sistema imunológico aos
13 componentes dos patógenos resulta na fagocitose, morte e fagocitose dos detritos do
14 tecido que sofreu injúria. Todos esses processos levam a ativação de um conjunto de
15 genes com subsequente síntese e sinalização proteica. As moléculas de sinalização
16 liberam citocinas pró-inflamatórias por macrófagos que estão envolvidos na resposta
17 inflamatória, como TNF- α e IL-1, moléculas de adesão como a de adesão intercelular
18 1 (ICAM-1) e de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e mediadores derivados de
19 nitrogênio, como o NO, aumentando o recrutamento de leucócitos, além dos efeitos
20 vasculares hipotensivos que se caracterizam pela intensa produção de NO pela via
21 induzível (iNOS) que são observados frequentemente em condições sépticas. Se os
22 mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios estiverem em equilíbrio e o quadro
23 infeccioso for controlado, a homeostase no indivíduo será restaurada, ocorrendo a
24 reparação e cicatrização dos tecidos injuriados (Taeb, Hooper et al. 2017).

25 Para estudar os mecanismos envolvidos na sepse, vários modelos animais
26 experimentais são desenvolvidos, um deles é o modelo de ligadura e punção do ceco,
27 padrão-ouro para que seja possível imitar as alterações fisiopatológicas que são
28 frequentemente observadas em pacientes sépticos. O modelo de CLP consiste na
29 ligadura realizada na região ileocecal, seguida de punção com agulha no ceco. Sabe-
30 se que o ceco é uma fonte endógena de contaminação bacteriana, devido a isso, a
31 perfuração leva a uma translocação de bactérias entéricas para a corrente sanguínea,
32 levando a ativação do sistema imunológico, choque séptico, disfunção múltipla de
33 órgãos, podendo evoluir para a morte. Uma das maiores vantagens de se utilizar o
34 modelo CLP é poder adaptar a severidade da sepse, isso se dá através do local de

- 1 ligadura que é realizada no ceco, assim como o calibre da agulha e a quantidade de
- 2 punções (Rittirsch, Huber-Lang et al. 2009).
- 3

1 **2 JUSTIFICATIVA**

2 Dados recentes mostraram que camundongos machos com síndrome
3 metabólica apresentam melhor prognóstico e sobrevida quando submetidos a uma
4 condição séptica moderada (Nakama, Malvezi et al. 2021). Nesse estudo, animais
5 com Smet apresentam hipertensão e quando estes são submetidos à condição séptica
6 de CLP, que em animais controle promove hipotensão, estes não apresentam
7 alterações significativas na pressão arterial, corroborando com o paradoxo da
8 obesidade, onde já foi descrito que a obesidade pode proporcionar uma vantagem de
9 sobrevivência na sepse, desafiando as implicações convencionais para a saúde (Eng,
10 Suthaaharan et al. 2024). Considerando que em muitas doenças, fêmeas jovens ou
11 mulheres antes da menopausa, apresentam proteção pelos níveis mais altos de
12 estrógeno, especula-se que essa possa ser uma outra proteção. No entanto, ainda
13 não existem estudos que avaliem a associação da Smet e a sepse severa induzida
14 por CLP em camundongos fêmeas, além de não existirem dados sobre as alterações
15 cardiovasculares desses animais. Devido à falta de informações sobre associação
16 destes modelos experimentais em camundongos fêmeas, se faz necessário mais
17 estudos relacionados ao tema.

18

19 **3 OBJETIVO**

20

21 Avaliar o efeito da Smet em camundongos Swiss fêmeas submetidos à sepse
22 polimicrobiana severa induzida por ligadura e punção do ceco.

23

24 **3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

25

26 - Validar o modelo de indução da Smet por injeção de glutamato monossódico
27 (MSG) em camundongos neonatos fêmeas;

28 - Estabelecer a sepse severa pelo modelo CLP em camundongos Swiss
29 fêmeas, através da observação da sobrevida;

30 - Determinar a influência da Smet na sobrevida a partir do modelo de CLP;

31 - Analisar as alterações causadas pela sepse em camundongos fêmeas com
32 Smet ou controle por meio de parâmetros cardiovasculares, hematológicos e
33 quantificação de óxido nítrico (NO) e IL-6 submetidos à sepse severa.

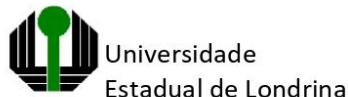
1 4 REFERÊNCIAS

- 2
- 3 Andersen, C. J., K. E. Murphy and M. L. Fernandez (2016). "Impact of Obesity and
4 Metabolic Syndrome on Immunity." Adv Nutr **7**(1): 66-75.
- 5
- 6 Boulangé, C. L., A. L. Neves, J. Chilloux, J. K. Nicholson and M. E. Dumas (2016).
7 "Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease."
8 Genome Med **8**(1): 42.
- 9
- 10 Bovolini, A., J. Garcia, M. A. Andrade and J. A. Duarte (2021). "Metabolic Syndrome
11 Pathophysiology and Predisposing Factors." Int J Sports Med **42**(3): 199-214.
- 12
- 13 da Cunha, N. V., F. N. Lopes, C. Panis, R. Cecchini, P. Pinge-Filho and M. C. Martins-
14 Pinge (2017). "iNOS inhibition improves autonomic dysfunction and oxidative status in
15 hypertensive obese rats." Clin Exp Hypertens **39**(1): 50-57.
- 16
- 17 Eng, M., K. Suthaaharan, L. Newton, F. Sheikh and A. Fox-Robichaud (2024). "Sepsis
18 and obesity: a scoping review of diet-induced obesity murine models." Intensive Care
19 Med Exp **12**(1): 15.
- 20
- 21 Esposito, S., G. De Simone, G. Boccia, F. De Caro and P. Pagliano (2017). "Sepsis
22 and septic shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches." J Glob
23 Antimicrob Resist **10**: 204-212.
- 24
- 25 Faccioli, N., C. Poitou, K. Clément and B. Dubern (2023). "Current Treatments for
26 Patients with Genetic Obesity." J Clin Res Pediatr Endocrinol **15**(2): 108-119.
- 27
- 28 Hernández Bautista, R. J., A. M. Mahmoud, M. Königsberg and N. E. López Díaz
29 Guerrero (2019). "Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model
30 and anti-obesity medicinal plants." Biomed Pharmacother **111**: 503-516.
- 31
- 32 Irfan, H. (2024). "Obesity, Cardiovascular Disease, and the Promising Role of
33 Semaglutide: Insights from the SELECT Trial." Curr Probl Cardiol **49**(1 Pt A): 102060.
- 34
- 35 Iyengar, N. M., A. Gucalp, A. J. Dannenberg and C. A. Hudis (2016). "Obesity and
36 Cancer Mechanisms: Tumor Microenvironment and Inflammation." J Clin Oncol
37 **34**(35): 4270-4276.
- 38
- 39 Kellum, J. A., C. L. Formeck, K. F. Kernan, H. Gómez and J. A. Carcillo (2022).
40 "Subtypes and Mimics of Sepsis." Crit Care Clin **38**(2): 195-211.
- 41
- 42 Leite Nde, C., E. G. Montes, S. V. Fisher, C. R. Cancian, J. C. de Oliveira, M. C.
43 Martins-Pinge, C. C. Kanunfre, K. L. Souza and S. Grassioli (2015). "Splenectomy
44 attenuates obesity and decreases insulin hypersecretion in hypothalamic obese rats."
45 Metabolism **64**(9): 1122-1133.
- 46
- 47 Lucchetti, B. F. C., N. Boaretto, F. N. C. Lopes, A. D. Malvezi, M. I. Lovo-Martins, V. L.
48 H. Tatakijara, V. Fattori, R. S. Pereira, W. A. Verri, Jr., E. J. de Almeida Araujo, P.

- 1 Pinge-Filho and M. C. Martins-Pinge (2019). "Metabolic syndrome agravates
2 cardiovascular, oxidative and inflammatory dysfunction during the acute phase of
3 Trypanosoma cruzi infection in mice." Sci Rep **9**(1): 18885.
4
- 5 Luft, F. C. (2001). "Twins in cardiovascular genetic research." Hypertension **37**(2 Pt 2):
6 350-356.
7
- 8 Mayoral, L. P., G. M. Andrade, E. P. Mayoral, T. H. Huerta, S. P. Canseco, F. J. Rodal
9 Canales, H. A. Cabrera-Fuentes, M. M. Cruz, A. D. Pérez Santiago, J. J. Alpuche, E.
10 Zenteno, H. M. Ruíz, R. M. Cruz, J. H. Jeronimo and E. Perez-Campos (2020).
11 "Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity." Indian J Med Res **151**(1): 11-
12 21.
13
- 14 McCracken, E., M. Monaghan and S. Sreenivasan (2018). "Pathophysiology of the
15 metabolic syndrome." Clin Dermatol **36**(1): 14-20.
16
- 17 Nakama, R. P., A. D. Malvezi, M. I. Lovo-Martins, L. F. Dos Santos, A. P. Canizares
18 Cardoso, G. Scacco, A. M. D. de Freitas, M. C. Martins-Pinge and P. Pinge-Filho
19 (2021). "Metabolic syndrome improves cardiovascular dysfunction and survival during
20 cecal ligation and puncture-induced mild sepsis in mice." Life Sci **286**: 120033.
21
- 22 Oparil, S., M. C. Acelajado, G. L. Bakris, D. R. Berlowitz, R. Cífková, A. F. Dominiczak,
23 G. Grassi, J. Jordan, N. R. Poulter, A. Rodgers and P. K. Whelton (2018).
24 "Hypertension." Nat Rev Dis Primers **4**: 18014.
25
- 26 Piché, M. E., A. Tchernof and J. P. Després (2020). "Obesity Phenotypes, Diabetes,
27 and Cardiovascular Diseases." Circ Res **126**(11): 1477-1500.
28
- 29 Purdy, J. C. and J. J. Shatzel (2021). "The hematologic consequences of obesity." Eur
30 J Haematol **106**(3): 306-319.
31
- 32 Reginato, G. S., L. de Jager, A. B. Martins, B. F. C. Lucchetti, B. H. de Campos, F. N.
33 C. Lopes, E. J. A. Araujo, C. Zaia, P. Pinge-Filho and M. C. Martins-Pinge (2023).
34 "Differential benefits of physical training associated or not with l-arginine
35 supplementation in rats with metabolic syndrome: Evaluation of cardiovascular,
36 autonomic and metabolic parameters." Physiol Behav **268**: 114251.
37
- 38 Rello, J., F. Valenzuela-Sánchez, M. Ruiz-Rodriguez and S. Moyano (2017). "Sepsis:
39 A Review of Advances in Management." Adv Ther **34**(11): 2393-2411.
40
- 41 Rittirsch, D., M. S. Huber-Lang, M. A. Flierl and P. A. Ward (2009). "Immunodesign of
42 experimental sepsis by cecal ligation and puncture." Nat Protoc **4**(1): 31-36.
43
- 44 Rochlani, Y., N. V. Pothineni, S. Kovelamudi and J. L. Mehta (2017). "Metabolic
45 syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds."
46 Ther Adv Cardiovasc Dis **11**(8): 215-225.
47
- 48 Saltiel, A. R. and J. M. Olefsky (2017). "Inflammatory mechanisms linking obesity and
49 metabolic disease." J Clin Invest **127**(1): 1-4.
50

- 1 Taeb, A. M., M. H. Hooper and P. E. Marik (2017). "Sepsis: Current Definition,
2 Pathophysiology, Diagnosis, and Management." Nutr Clin Pract **32**(3): 296-308.
3
- 4 Wang, W. and C. F. Liu (2023). "Sepsis heterogeneity." World J Pediatr **19**(10): 919-
5 927.
6
- 7 Zazula, M. F., D. F. Saraiva, J. L. Theodoro, M. Maciel, E. Sepulveda, B. Zanardini de
8 Andrade, M. L. Boaretto, J. Maciel, G. A. Bronczek, G. M. Soares, S. C. Sagae
9 Schneider, G. R. F. Bertolini, M. M. Torrejais, L. F. C. Ribeiro, L. C. Fernandes and K.
10 Naliwaiko (2023). "An Early and Sustained Inflammatory State Induces Muscle
11 Changes and Establishes Obesogenic Characteristics in Wistar Rats Exposed to the
12 MSG-Induced Obesity Model." Int J Mol Sci **24**(5).
13
14
15
16
17

1 ANEXO A – CEUA



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 134/2021

Londrina, 22 de dezembro de 2021.

Prezado(a) professor(a),

Certificamos que o projeto intitulado: “**Sepe polimicrobiana na síndrome metabólica murina: efeito da aspirina sobre a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs), marcadores inflamatórios e parâmetros cardiovasculares**” protocolo CEUA nº **051.2021** sob a responsabilidade de **Phileno Pingue Filho** que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL) no dia **22/12/2021**.

Este projeto tem por objetivo avaliar o potencial terapêutico do pré-tratamento com aspirina na severidade da sepe em camundongos com síndrome metabólica ou não. **Grau de invasividade: G13.**

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	03/01/2022 a 03/01/2025
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogêneo – Swiss
Nº de animais	536, sendo: Matrizes: 9 machos e 27 fêmeas Prole estimada (masculina): 500 animais
Peso/ Idade	Matrizes: 20 a 25 g/ 30 dias
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina.
Amostras a serem coletadas	Sangue, lavado peritoneal, fígado.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

Em cumprimento às exigências do CONCEA, em até 30 dias da finalização do projeto de pesquisa ou extensão envolvendo o uso de animais (verificar período de vigência expresso neste ofício), é necessário encaminhar relatório da descrição de uso de animais para ceua@uel.br, conforme modelo disponível no site da CEUA: <http://www.uel.br/comites/ceua/pages/relatorio-de-projetos.php>.

Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo-me, cordialmente,

Profª Drª Maria Fernanda
Rodrigues Graciano
Coordenadora da Comissão de
Ética no Uso de Animais
Universidade Estadual de Londrina
ceua@uel.br / (43) 3371-5454

Profª Drª Maria Fernanda Rodrigues Graciano
Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo.(a) Sr.(a)

Prof. (a) Dr. (a). Phileno Pingue Filho

Responsável pelo projeto

C/C para a Chefia do Departamento de Ciências Patológicas /CCB

C/C para a Direção do Centro de Ciências Biológicas /CCB

C/C para o Biotério Central/ CCB

1 ANEXO B – PRODUÇÃO CIENTÍFICA

2 Este trabalho foi realizado na Universidade Estadual de Londrina – UEL e
3 originou um artigo científico intitulado “Evaluation of metabolic syndrome in female
4 Swiss mice subjected to severe sepsis: cardiovascular, inflammatory and
5 hematological parameters”.

6

7 Periódico proposto: Life Sciences

8 As normas da revista podem ser visualizadas em:

9 <https://www.sciencedirect.com/journal/life-sciences/publish/guide-for-authors>

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

1 **Evaluation of metabolic syndrome in female Swiss mice subjected to severe**
2 **sepsis: cardiovascular, inflammatory and hematological parameters**

3

4 Leonardo Berto-Pereira^a, Raquel Pires Nakama^a, Lucas Felipe dos Santos^b, Aparecida
5 Donizette Malvezi^a, Isabella Ramos Trevizani Thihara^b, Lucas Sobral de Rossi^c,
6 Fabricio Seidy Ribeiro Inoue^a, Wander Rogério Pavanelli^a, Priscila Cassola^d, Philenó
7 Pinge-Filho^{a,b}, Marli Cardoso Martins-Pinge^{a,d*}.

8

9 ^aPostgraduate Program in Experimental Pathology, Department of Immunology,
10 Parasitology and General Pathology. State University of Londrina, Paraná, Brazil.

11

12 ^bPostgraduate Program in Microbiology, Department of Microbiology, State University
13 of Londrina, Paraná, Brazil

14

15 ^cPostgraduate Program in Health Sciences, Department of Health Sciences, State
16 University of Londrina, Paraná, Brazil

17

18 ^dPostgraduate Program in Physiological Sciences, Department of Physiological
19 Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

20

21 *Corresponding author: Marli Cardoso Martins Pinge PhD., Laboratory of
22 Cardiovascular Physiology and Pathophysiology, Department of Physiological
23 Sciences, Biological Sciences Center, State University of Londrina, CEP: 86051-970,
24 Londrina, Paraná, Brazil. E-mail address: martinspinge@uel.br (Martins-Pinge, M. C.).
25 Tel: +55 43 3371-5927

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

1 **ABSTRACT**

2

3 **Aims:** The aim of the study was to evaluate the effect of metabolic syndrome (MetS)
4 on female Swiss mice subjected to severe polymicrobial sepsis induced by ligation and
5 puncture of the cecum (CLP).

6

7 **Main methods:** MetS was induced in neonatal Swiss mice by subcutaneous injection
8 of monosodium glutamate (MSG) at 4mg/g body weight from day 1 to day 5 after birth,
9 while animals in the control group (CTL) were treated with equimolar saline solution at
10 the same volume and period. On the 75th day of life, the CLP model was used to
11 induce severe polymicrobial sepsis. For inflammatory parameters, we assessed nitric
12 oxide (NO), determined by the cadmium and Griess technique, and quantified IL-6
13 using the ELISA technique. Glucose levels were measured 24 hours before and after
14 CLP using a glucose monitor, and the lipid profile was assessed using commercial kits.
15 Cardiovascular parameters were measured using the CODA platform, and
16 hematological evaluation was determined by standard counting.

17

18 **Key findings:** Different from male mice, MetS did not alter the survival of females
19 subjected to severe sepsis, and both CTL and MetS CLP groups exhibited hypotension
20 and hypoglycemia, accompanied by leukopenia and increased inflammatory cytokine
21 IL-6. It was also observed that MetS attenuates some parameters during sepsis, such
22 as hematological parameters and resistance to NO increase.

23

24 **Significance:** Thus, we can conclude that the obesity paradox theory is not observed
25 in females, so our findings provide new insights for the literature linking MetS and
26 sepsis.

27

28 **Keywords:** Infectious disease, Ligation and perforation of the cecum; Nitric oxide;
29 Obesity.

30

31

32

33

34

1 1. Introduction

2

3 From the third international consensus conference, published in 2016, sepsis
4 was defined as an organic dysfunction with life-threatening risk caused by a
5 dysregulated host response to infection (1). Sepsis is considered one of the most
6 common causes of death in intensive care units (ICUs), presenting a challenging
7 diagnosis due to the multiple comorbidities and underlying diseases that individuals
8 develop (2). It is estimated that 48.9 million people worldwide are diagnosed with
9 sepsis each year, responsible for 11 million deaths, accounting for 19.7% of all global
10 deaths (3).

11 Obesity has become a public health problem worldwide, and related conditions
12 vary by region (4). It is considered a complex disease that occurs through the
13 interaction between genetic predisposition and environmental factors, defined as an
14 excess of body fat resulting from an inadequate energy balance over a long period (5).
15 In 2015, it was estimated by the Global Burden of Disease Obesity Collaborator that
16 over 603.7 million adults were obese, and it was estimated that higher BMI values were
17 responsible for 4 million deaths, with two-thirds of this number associated with
18 cardiovascular diseases (6). Obesity is also associated with the development of
19 various other complications, such as hyperglycemia, hypertriglyceridemia,
20 dyslipidemia, and hypertension. When individuals present at least three of these
21 complications, they are clinically diagnosed with metabolic syndrome (MetS) (7).
22 Currently, MetS is characterized as a set of metabolic abnormalities associated with
23 an increased risk of developing cardiovascular diseases (8).

24 To induce MetS, the monosodium glutamate (MSG) model was used, as it
25 involves an excitatory neurotransmitter, glutamate, causing damage and cell death to
26 neurons in the hypothalamic nuclei, primarily the arcuate hypothalamic nucleus (ARC).
27 This neuronal loss affects insulin-mediated signaling, impairing metabolic homeostasis
28 (9) (10).

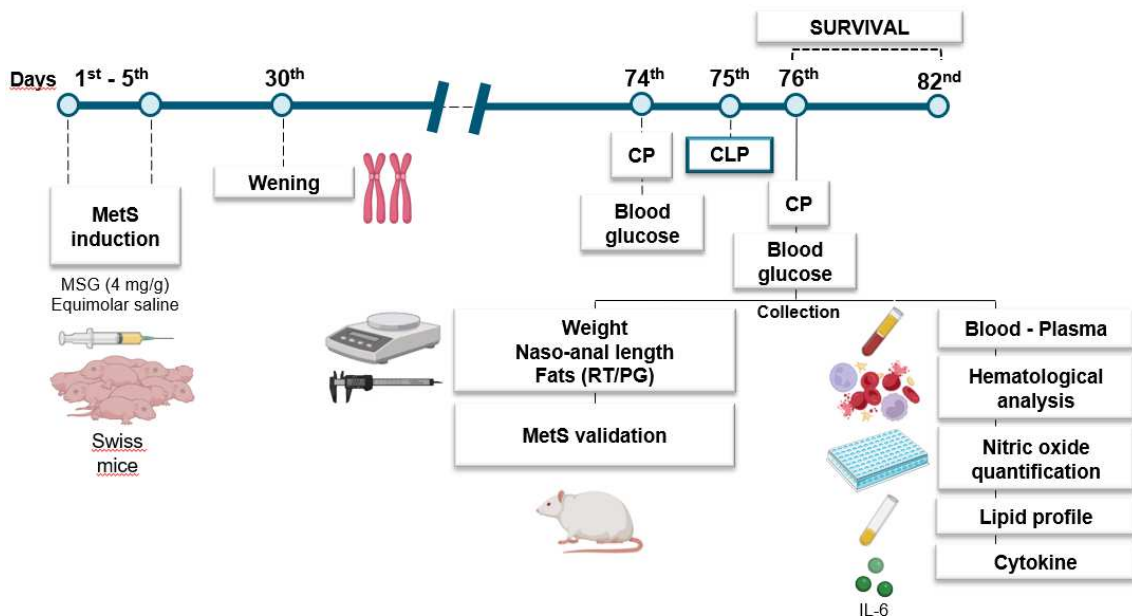
29 Recent data have shown that male mice with metabolic syndrome have a better
30 prognosis and survival when subjected to a septic condition (11). In this study, animals
31 with MetS present hypertension, and when subjected to the septic condition of CLP,
32 which in control animals induces hypotension, they do not show significant changes in
33 blood pressure. Considering that in many diseases, young females or premenopausal
34 women exhibit protection due to higher estrogen levels, it is speculated that this could

1 be another form of protection. However, there are still no studies evaluating the
 2 association of MetS and severe sepsis induced by CLP in female mice, and there is
 3 also a lack of data on the cardiovascular and inflammatory alterations of these animals.
 4 Due to the lack of information on the association of these experimental models in
 5 female mice, further studies related to the topic are necessary.

6

7 2. Material and methods

8



9

10 2.1 Experimental design

11

12 **Figure 1. Experimental design.** To induce Metabolic Syndrome (MetS), Swiss mice
 13 were treated from the first day of life until the fifth day with monosodium glutamate
 14 (MSG) (4 mg/g body weight), while the control group received equimolar saline
 15 solution. On the thirtieth day of age, the animals were weaned, and only females were
 16 separated for experimentation. Cardiovascular parameters (CP), such as mean arterial
 17 pressure (MAP) and heart rate (HR), were measured 24 hours before and after the
 18 induction of sepsis (CLP). Blood glucose levels were measured 24 hours before and
 19 24 hours after the CLP procedure. Blood collection was also performed 24 hours after
 20 CLP, for hematological analysis and obtaining plasma for lipid profile analysis, nitric
 21 oxide (NO) quantification, and cytokine analysis. Then, the animals were euthanized,
 22 and their weight and naso-anal length were measured. Additionally, their
 23 retroperitoneal (RT) and perigonadal (PG) fat pads were removed and weighed to

1 characterize obesity. Survival analysis was evaluated every 24 hours for 7 days after
2 the CLP procedure.

3

4 2.2 Animals

5

6 The experiments were conducted as a randomized, blinded, and controlled
7 study. Female Swiss mice aged 75 days were used, divided into two groups: CTL and
8 MetS. The animals were housed in polypropylene cages (414 x 344 x 168 millimeters).
9 The cages were lined with autoclaved bedding and washed three times per week. The
10 cages remained in the conditioning room (temperature 21-23°C) under a 12/12-hour
11 light/dark cycle. The animals had ad libitum access to water and food. All procedures
12 were performed in accordance with CONCEA's ethical guidelines and approved by the
13 Committee on Ethics in the Use of Animals of the State University of Londrina
14 (CEUA/UEL, process number: 051.2021).

15

16 2.3 Experimental groups

17

18 At 74 days of age, female Swiss mice with or without metabolic syndrome were
19 divided into 4 experimental groups: (Group 1) sham surgery control (CTL SHAM),
20 (Group 2) control subjected to severe sepsis (CTL CLP). The same groups were
21 repeated for animals treated with MSG after birth, (Group 3) metabolic syndrome sham
22 surgery (MetS SHAM), (Group 4) metabolic syndrome subjected to severe sepsis
23 (MetS CLP).

24

25 2.4 Induction of metabolic syndrome

26

27 To induce MetS, newborn mice were subjected to subcutaneous injection of
28 monosodium glutamate (sigma, St. Louis, USA) (4 mg/g body weight) from day 1 to
29 day 5 after birth (12). Animals in the control group (CTL) were treated with equimolar
30 saline. The mice were separated after weaning by sex, where only female mice were
31 used. Obesity was assessed at 75 days of life and characterized by calculating the Lee
32 Index for each animal using the formula: $\sqrt[3]{\text{body weight}/\text{naso-anal length}} \times 1000$, and
33 also through the weight of retroperitoneal and perigonadal fats, where the weight body
34 and length will be given in g and cm, respectively (13).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2.5 Severe polymicrobial sepsis

To induce sepsis, mice in the control and experimental groups were subjected or not to the polymicrobial sepsis model through ligation and perforation of the cecum (CLP), previously described by (14) with adaptations suggested by (15). Firstly, the mice were anesthetized by applying ketamine and xylazine (1.25 mg/mL ketamine; 0.5 mg/mL xylazine) intraperitoneally (i.p). The incision was made in the midline of the abdomen so that the cecum was exposed. Using a cotton thread, a ligation was performed close to the base of the cecum, without there being a total obstruction of the intestine. After ligation, the cecum was punctured with 1 transverse hole with the aid of a 21G needle and lightly pressed until feces came out through the perforations. The cecum was relocated into the mouse's abdominal cavity and the incision sutured. Sham animals were submitted to, but not subjected to the CLP process. After the surgical procedure, the mice received 1ml of sterile saline solution (0.9%) subcutaneously (s.c) for hydration and were kept warm for 1 hour at 37°C, later returning to their cages with free access to food and water. Survival was assessed every 24 hours for 7 days after the CLP procedure.

2.6 Glucose dosage

Blood glucose concentration were measured 24 hours before and 24 hours after the induction of sepsis by CLP. As a method of animal analgesia, lidocaine ointment 50mg/g (AstraZeneca do Brasil Ltda - Cotia - SP) was applied topically to the tail tip beforehand. Peripheral blood samples were collected from the tail of the animal (1-5 µL), and glucose levels were determined using a glucose monitor (Accu-Check Active-Roche Diagnosis®).

2.7 Hematological analysis and plasma obtainment

Twenty-four hours after the induction of sepsis, the control and experimental animal groups were anesthetized with Ketamine (100 mg/kg) and Xylazine Hydrochloride (20 mg/kg). Following this procedure, blood collection was performed via cardiac puncture. The collected blood was placed in microtubes containing 30 µL

1 of sodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA). From these samples, platelet
2 count, total leukocytes, reticulocytes, monocytes, lymphocytes, eosinophils, and
3 neutrophils were determined. Hematocrit was measured by centrifuging capillary tubes
4 containing blood samples in a microcentrifuge (Novatechnica, Piracicaba, São Paulo,
5 Brazil). The total number of nucleated cells from the samples was determined using a
6 manual hematocytometer. The remaining blood sample was then centrifuged at 3,000
7 rpm for 15 minutes at 22°C to collect plasma, which was stored at -80°C until the day
8 of sample analysis.

9 10 2.8 Measurement of blood pressure and heart rate

11
12 The measurement of mean arterial pressure, systolic and diastolic blood
13 pressure, as well as heart rate, was performed 24 hours before the induction of sepsis
14 by CLP and 24 hours after the procedure in both control and experimental groups. For
15 this purpose, the non-invasive CODA system (KENT SCIENTIFIC, TORRINGTON,
16 CT) was used, which calculates the difference in volume obtained from the mouse tail
17 through sensors. To perform these analyses, it was necessary to place the animal in a
18 conscious state within a container developed by the manufacturer itself and according
19 to previous studies (16).

20 21 2.9 Quantification of nitric oxide

22
23 The concentration of NO in the plasma of control and experimental mice was
24 conducted 24 hours after the induction of sepsis. The NO concentration was estimated
25 using the nitrite concentration method as previously described by (17) with
26 modifications proposed by (18).

27 28 2.10 Lipid profile

29
30 The concentrations of triglycerides, total cholesterol, and HDL cholesterol in
31 plasma were analyzed using the colorimetric enzymatic method with a commercial kit
32 (BioTécnica). The analysis was conducted 24 hours before the CLP procedure.
33 Readings were taken using a spectrophotometer, and values were expressed in
34 mg/dL.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34

2.11 Plasma cytokine quantification

The detection of IL-6 in the plasma was performed 24 hours after severe sepsis induction by the CLP method using the colorimetric technique with an ELISA kit (eBioscience) read on a GloMax® Explorer multimode microplate reader with a wavelength of 450nm.

2.12 Statistical analysis

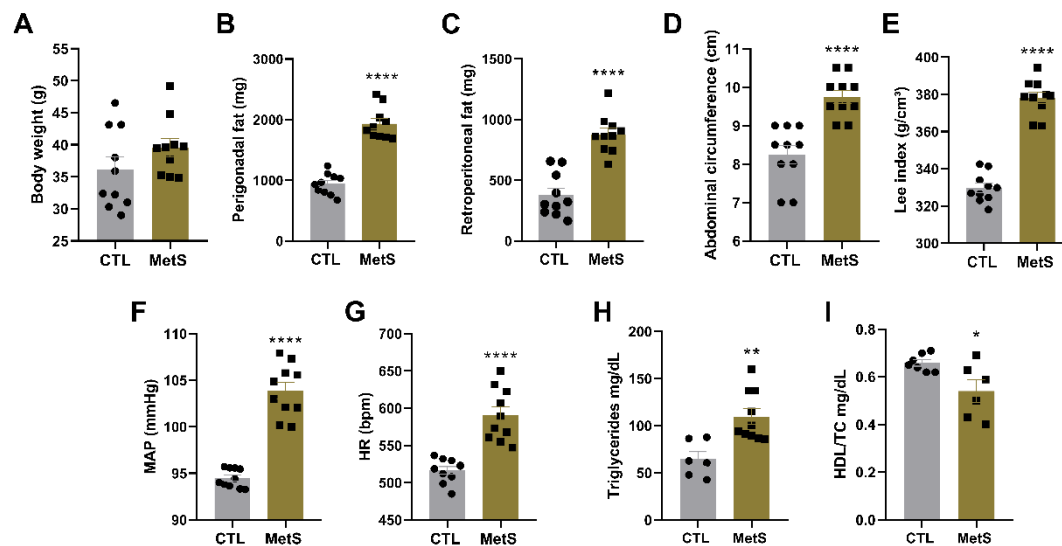
Initially, the data underwent exploratory statistical analysis in which normality was assessed using the Shapiro-Wilk test. The results were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Analysis between two groups was conducted using Student's t-test. Significance was evaluated by two-way analysis of variance for grouped data (two-way ANOVA), followed by Tukey's multiple comparison tests. Differences were considered significant for results with $p \leq 0.05$. Survival rate was determined using the Logrank test. All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA).

3 Results

3.1 Validation of metabolic syndrome (MetS)

At 76 days of age, female Swiss mice that received MSG were euthanized to validate Metabolic Syndrome (Figure 2). There was no difference in body mass between CTL and MetS animals (Figure 2. A). Although mass did not differ between the groups, the weight of perigonadal and retroperitoneal fat, as well as abdominal circumference, were higher in the MetS group compared to the CTL group (Figure 2. B-C-D; $p < 0.0001$). To validate obesity, in addition to weight, the Lee index also utilizes naso-anal length. MetS animals, through significantly different values from the CTL group, are considered obese (Figure 2. E; $p < 0.0001$). In addition to being considered obese, MetS group animals also exhibit alterations in cardiovascular parameters, such as hypertension (Figure 2. F; $p < 0.0001$), tachycardia (Figure 2. G; $p < 0.0001$), and hypertriglyceridemia (Figure 2. H; $p = 0.0027$). MetS group animals also show a

1 significant decrease in HDL cholesterol ratio (Figure 2. I; $p= 0.0250$), which may
 2 indicate a dyslipidemia condition.



3
 4 **Figure 2. Validation of metabolic syndrome (MetS).** Swiss mice at 76 days of age,
 5 previously treated with saline solution (CTL) or MSG (MetS), were euthanized to
 6 validate MetS. Measurements were collected as follows: (A) body weight, expressed
 7 in grams (g); (B) perigonadal fat (PG) and (C) retroperitoneal fat (RP), expressed in
 8 milligrams (mg); (D) abdominal circumference, expressed in centimeters (cm); and (E)
 9 Lee index, expressed in grams per cubic centimeter (g/cm³). Cardiovascular
 10 parameters such as (F) mean arterial pressure (MAP) and (G) heart rate (HR) were
 11 expressed in millimeters of mercury (mmHg) and beats per minute (bpm), respectively.
 12 (H) Triglyceride levels were expressed in milligrams per deciliter (mg/dL), and
 13 HDL/total cholesterol ratio, expressed in milligrams per deciliter (mg/dL). Data are
 14 presented as mean \pm SEM. Statistical analysis was performed using the Student's t-
 15 test, and differences were considered significant for values with $p \leq 0.05$. ** $p < 0.01$,
 16 *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (N=7-10).

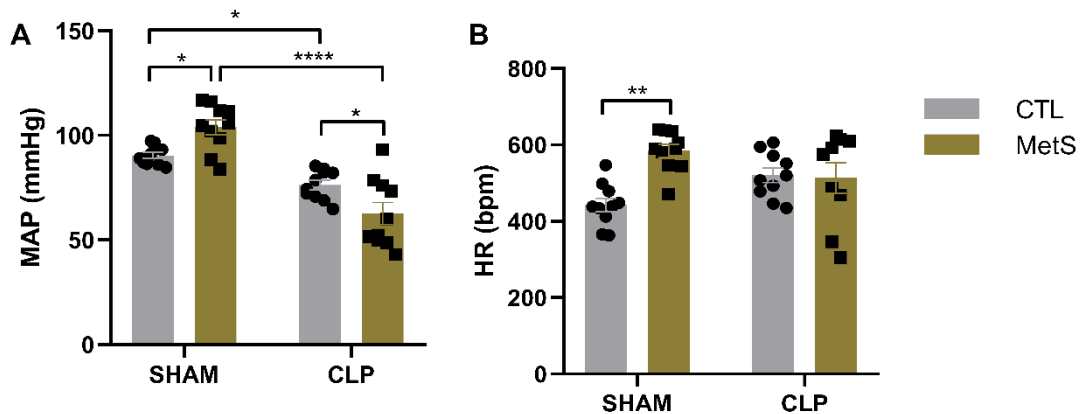
17

18 3.2 Cardiovascular parameters 24h after induction of severe sepsis in female swiss
 19 mice

20

21 The animals in the MetS SHAM group exhibit hypertension compared to the
 22 CTL SHAM group ($p= 0.0393$), and sepsis caused hypotension in the CTL CLP and
 23 MetS CLP groups when compared to their respective SHAM groups (Figure 3. A).

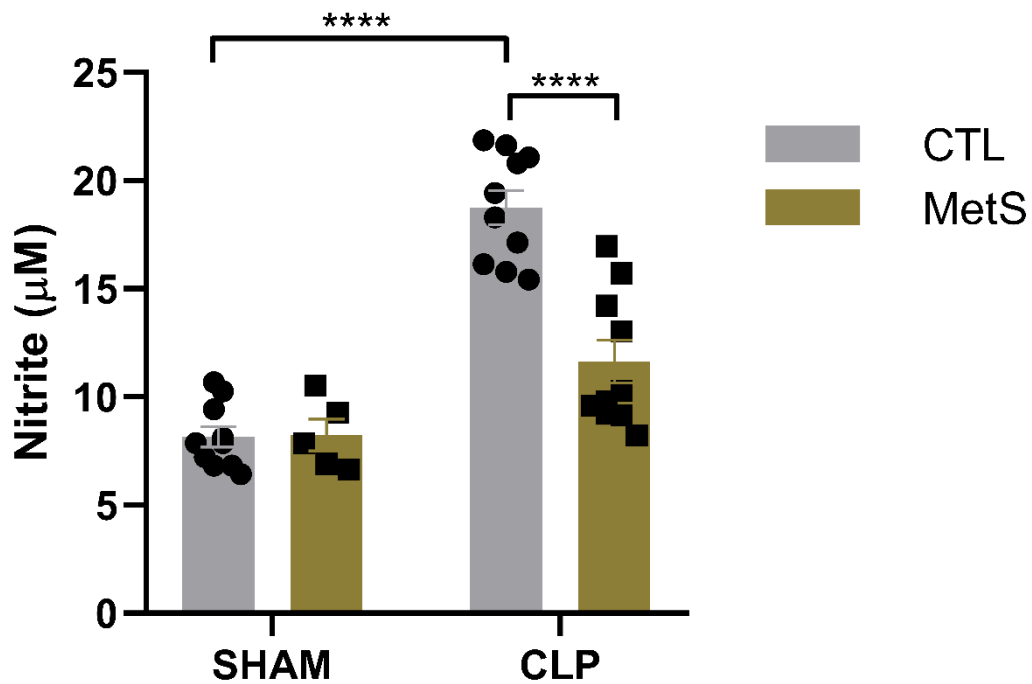
1 Regarding heart rate, although the animals in the MetS SHAM group present
 2 tachycardia compared to the CTL SHAM group ($p = 0.0011$), the established condition
 3 of severe sepsis did not alter any parameter (Figure 3. B), keeping the heart rate
 4 unchanged.
 5



6
 7 **Figure 3. Cardiovascular parameters.** The CODA platform was used to measure
 8 cardiovascular parameters, such as mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR),
 9 in female Swiss mice 24 hours after the CLP procedure. (A) Mean arterial pressure
 10 was expressed in millimeters of mercury (mmHg). (B) Heart rate was expressed in
 11 beats per minute (bpm). Bars represent mean \pm SEM of different groups. Statistical
 12 differences marked with (*) were considered for analyses with $p \leq 0.05$. Statistical
 13 analysis was performed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple
 14 comparison test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (N = 9-10)
 15

16 3.3 Quantification of plasma nitric oxide 24 hours after severe sepsis induction

17
 18 The CTL SHAM and MetS SHAM groups do not show a significant difference in
 19 plasma nitric oxide. However, when subjected to severe sepsis induction by CLP,
 20 animals in the CTL CLP group show an increase in NO compared to their respective
 21 SHAM group ($p < 0.0001$). The same phenomenon is not observed in the MetS CLP
 22 group (Figure 4), suggesting that MetS may confer resistance to the increase in NO in
 23 animals subjected to severe sepsis.



1

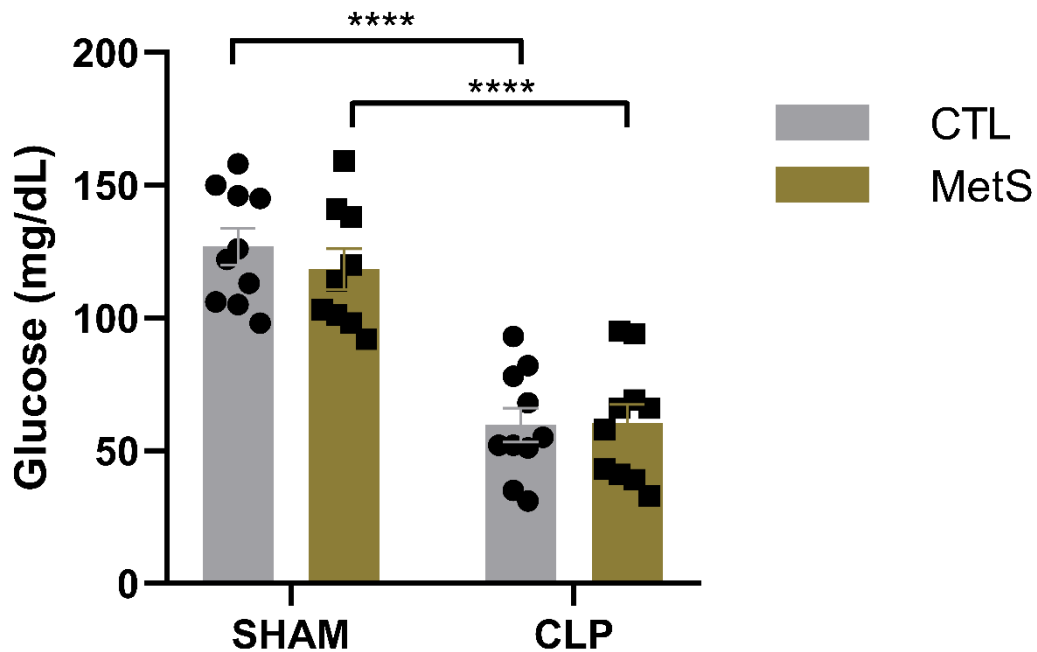
2 **Figure 4. Quantification of nitric oxide in plasma.** Nitric oxide was estimated by the
 3 nitrite concentration using the cadmium/Griess technique and measured in plasma 24
 4 hours after sepsis induction. Levels were expressed in micromolar (μM). Bars
 5 represent the mean \pm SEM. Statistical differences marked with (*) were considered for
 6 analyses with $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using two-way ANOVA
 7 followed by Tukey's multiple comparison test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.
 8 (N = 5-10).

9

10 3.4 Evaluation of blood glucose levels 24 hours after severe sepsis induction by CLP

11

12 The animals in the CTL SHAM and MetS SHAM groups did not show significant
 13 differences in glucose levels. However, severe sepsis led animals in the CTL CLP (p
 14 < 0.0001) and MetS CLP ($p < 0.0001$) groups to develop hypoglycemia 24 hours after
 15 CLP induction compared to their respective SHAM (Figure 5).



1

2 **Figure 5. Blood glucose concentration.** Glucose measurement was conducted 24
 3 hours after sepsis induction and was expressed in milligrams per deciliter (mg/dL) of
 4 blood. Bars represent the mean \pm SEM. Statistical differences marked with (*) were
 5 considered for analyses with $p \leq 0.05$. Statistical analysis was performed using two-
 6 way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$,
 7 **** $p < 0.0001$. (N = 10).

8

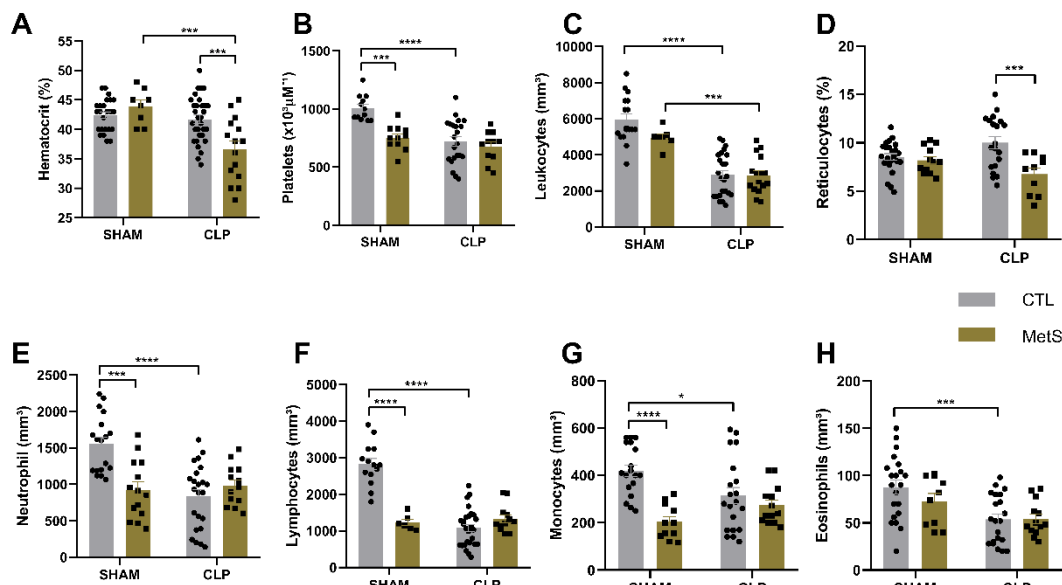
9 3.5 Analysis of hematological parameters

10

11 Severe sepsis caused a decrease in hematocrit in the MetS CLP group
 12 compared to the MetS SHAM group (Figure 6. A; $p = 0.0003$). Regarding platelets,
 13 sepsis induced thrombocytopenia in the CTL CLP group compared to the CTL SHAM
 14 group (Figure 6. B; $p < 0.0001$). Leukopenia was observed in the groups subjected to
 15 severe sepsis, CTL CLP (Figure 6. C; $p < 0.0001$) and MetS CLP (Figure 6. C; $p =$
 16 0.0008), compared to their respective SHAM. Neutropenia was observed only in the
 17 CTL CLP group compared to the CTL SHAM group (Figure 6. E; $p < 0.0001$).
 18 Lymphocytes and monocytes followed the same pattern as neutrophils, where only the
 19 CTL CLP group was affected with a decrease in both parameters compared to CTL
 20 SHAM, presenting lymphocytopenia (Figure 6. F; $p < 0.0001$) and monocytopenia
 21 (Figure 6. G; $p = 0.0321$). Sepsis also caused eosinopenia in the CTL CLP group

1 compared to the CTL SHAM group (Figure 6. H; $p=0.0010$). Reticulocytes were only
 2 different when the groups of animals subjected to sepsis were compared with each
 3 other, where animals in the MetS CLP group had significantly lower levels compared
 4 to CTL CLP (Figure 6. D; $p=0.0008$). Sepsis was not able to cause thrombocytopenia,
 5 neutropenia, lymphocytopenia, monocytopenia, eosinopenia, and reticulocytopenia in
 6 the MetS CLP group, demonstrating a possible protective effect of MetS.

7



8

9 **Figure 6. Hematological parameters in female Swiss mice subjected to severe**
 10 **sepsis induction by CLP.** Peripheral blood analysis was performed 24 hours after the
 11 severe sepsis induction procedure. The parameters analyzed were: (A) hematocrit,
 12 expressed as a percentage (%); (B) platelets, expressed in micromolar (μM); (C)
 13 leukocytes, expressed in cubic millimeters (mm^3); and (D) reticulocytes, expressed as
 14 a percentage (%); (E) neutrophils, (F) lymphocytes, (G) monocytes, (H) eosinophils,
 15 all expressed in cubic millimeters (mm^3). Bars represent the mean \pm SEM. Statistical
 16 differences marked with (*) were considered for analyses with $p \leq 0.05$. Statistical
 17 analysis was performed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple
 18 comparison test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (N = 6-31).

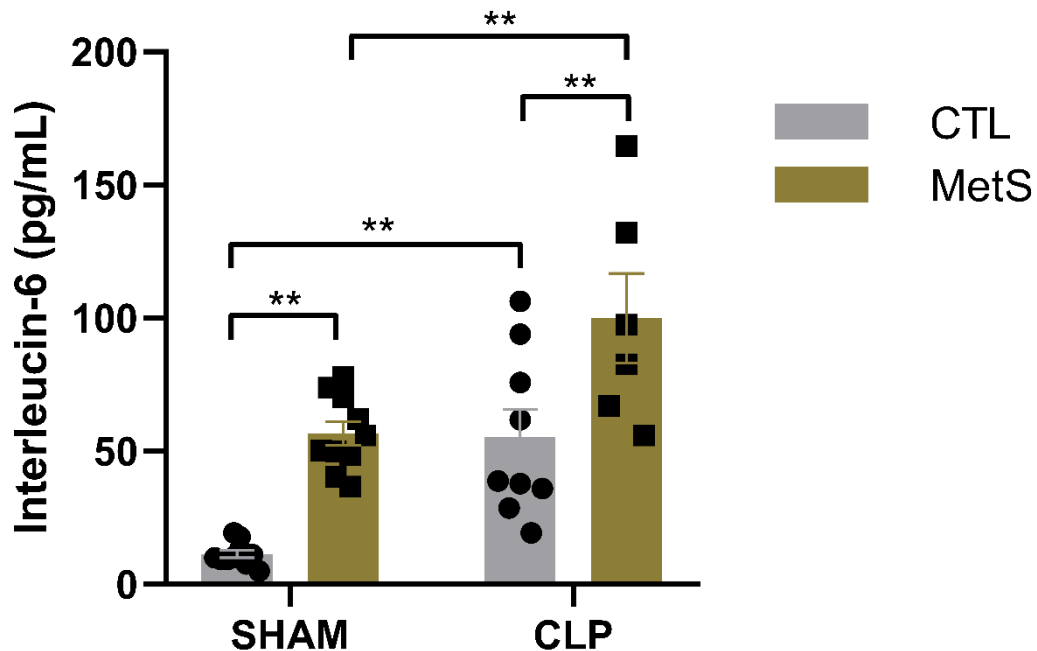
19

20 3.6 Measurement of plasma cytokine IL-6

21

22 The animals in the MetS SHAM group have higher baseline levels of IL-6
 23 compared to the CTL SHAM group (Figure 7; $p=0.0011$), which may be explained by

1 the chronic low-grade inflammation these animals developed due to the obesity.
 2 Severe sepsis increases IL-6 levels in the CTL CLP ($p= 0.0021$) and MetS CLP ($p=$
 3 0.0077) groups compared to their respective SHAM.

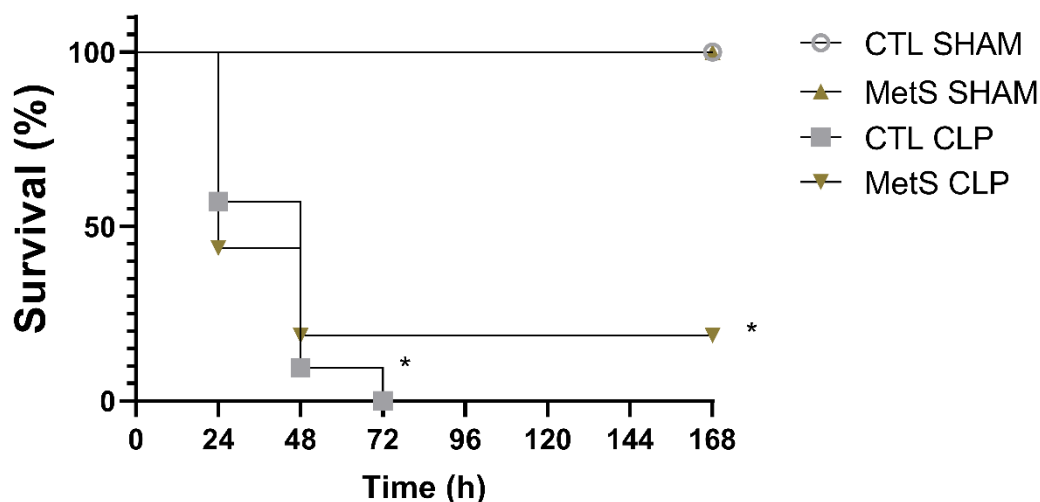


4
 5 **Figure 7. Plasma cytokine IL-6 dosage concentration.** The interleukin-6 assay was
 6 performed 24 hours after severe sepsis induction by CLP using the ELISA technique,
 7 expressed in picograms per milliliter (pg/mL). Bars represent the mean \pm SEM.
 8 Statistical differences marked with (*) were considered for analyses with $p \leq 0.05$.
 9 Statistical analysis was performed using two-way ANOVA followed by Tukey's multiple
 10 comparison test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$. (N = 6-10).

11
 12 3.7 Survival

13
 14 Severe sepsis significantly decreases the survival rate percentage of animals in
 15 the CTL CLP group compared to CTL SHAM (Figure 8; $p < 0.0001$), where the peak of
 16 death occurs 72 hours after CLP induction and no animal completes the survival
 17 analysis remaining alive during the 7 day evaluation period. Although 3 animals in the
 18 MetS CLP group complete the 7 day evaluation, when compared to the MetS SHAM
 19 group, they are significantly different ($p= 0.0016$), suggesting that even though MetS
 20 acted as a possible protective factor in other analyses, this is not reflected in the
 21 survival of these animals.

1



2

3 **Figure 8. Survival rate during the progression of CLP induced severe sepsis.** The
 4 results are expressed as the percentage of survival for each experimental group using
 5 the Logrank statistical test, over 7 days, every 24 hours (CTL SHAM=14, CTL CLP=21,
 6 MetS SHAM=6, MetS CLP=16). Differences were considered significant for values with
 7 $p \leq 0.05$. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

8

9 4. Discussion

10

11 The neuroendocrine MSG model, through neonatal injections in female Swiss
 12 mice, proved effective in developing MetS. Animals subjected to this protocol exhibited
 13 obesity, hypertension, increased retroperitoneal and perigonadal fat deposition, and
 14 hypertriglyceridemia, consistent with previous studies in mice (11,16), as in rats (19-
 15 22). However, the metS animals did not show an increase in plasma NO levels during
 16 CLP like the control animals. In addition, the CTL and MetS groups subjected to severe
 17 sepsis showed hypotension, hypoglycemia, and an increase in the inflammatory
 18 cytokine IL-6, corroborating with the survival data. Hematological parameters did not
 19 change much for the MetS group subjected to severe sepsis, presenting only
 20 leukopenia, but this was not sufficient to alter survival. Thus, our results do not support
 21 the obesity paradox for the female animals.

22

23 The physiological stress caused by sepsis results in metabolic disorders and
 24 interferes with glucose regulation (23). It has been described in the literature that
 patients with sepsis typically present disturbances in glucose levels due to alterations

1 in endocrine metabolism caused by sepsis, increasing the mortality rate of these
2 patients (24). In our study, it was observed that animals from the CTL and MetS groups
3 subjected to severe sepsis exhibited hypoglycemia. According to Wang and colleagues
4 in 2021, from a systematic review and meta-analysis, besides presenting
5 hyperglycemia, septic patients may frequently experience hypoglycemia. It was
6 observed that the occurrence of hypoglycemia was related to increased mortality in
7 septic patients (24). This may be related to inflammatory cytokines, which increase
8 glucose utilization but, on the other hand, inhibit the gluconeogenesis process (25), or
9 it may also occur that septic patients excessively use peripheral glucose due to
10 increased metabolic rate, which can cause depletion of glycogen reserves (26).

11 NOS plays an essential role in regulating inflammatory and immune responses.
12 (27). We observed in our study that animals from the CTL CLP group exhibited
13 increased levels of NO, and in the same group, the animals also presented
14 hypotension. This phenomenon was also observed by Nakama and colleagues in
15 2021, correlating hypotension with the increase in NO production (11). Hypotension is
16 a key risk factor for mortality in patients with sepsis (28). Regarding cardiovascular
17 parameters, septic shock is characterized by a high cardiac output and decreased
18 peripheral resistance due to the dilation of systemic resistance vessels. Much of this
19 condition is caused by positive regulation in the expression of iNOS enzyme and
20 increased production of NO, given that NO plays an important role in vasodilation (29).
21 However, although animals from the MetS CLP group also exhibited hypotension, they
22 did not show an increase in plasma NO levels, suggesting that the decrease in mean
23 arterial pressure (MAP) resulting from sepsis in MetS group is being caused by a
24 mechanism independent of NO. The normal physiological response to low MAP is
25 inhibition of baroreflex arch leading to vasoconstriction in the peripheral circulation due
26 to sympathetic activation and increased catecholamine concentration. However, in
27 septic patients, common vasoconstrictors do not act sufficiently, leading to a
28 vasodilatory Shock (28).

29 Sepsis, being a syndrome characterized by an uncontrolled inflammatory state,
30 involves a consistent and persistent inflammatory response in a state of
31 immunosuppression, which can be exacerbated by the dysregulation of inflammatory
32 factor levels (30). In this context IL-6 plays an important role in host defense against
33 infections and tissue injuries (31). In sepsis, this cytokine is responsible for regulating
34 protein homeostasis in skeletal muscle. Although systemic increase promotes muscle

1 growth and hypertrophy, its continuous and exacerbated increase, as in cancer or
2 diabetes, can lead to muscle atrophy (32). In our study, we observed a significant
3 increase in IL-6 levels in the CTL and MetS CLP groups, which may be related to the
4 worsening survival of these animals during sepsis. Kang and colleagues in 2021
5 observed that IL-6 is an important indicator of cytokine storms, responsible for
6 regulating various aspects of vascular homeostasis and cellular inflammation.
7 Inhibiting IL-6 signaling is considered a beneficial clinical strategy for the treatment of
8 various inflammatory disorders (31).

9 Obesity, a low-grade chronic inflammation, is responsible for generating a
10 phenotype of increased inflammation in the microvasculature of multiple organs during
11 sepsis, due to the increase in immune system cells (11). In our study, it was possible
12 to observe that sepsis can also compromise hematological parameters, causing
13 leukopenia in the CTL and MetS groups subjected to severe sepsis. In a cohort study
14 conducted by Belok and colleagues in 2021, it was described that, although rare,
15 leukopenia is associated with an increased risk of death, which may have occurred
16 due to interruption of maturation, inadequate supply of progenitors to the bone marrow,
17 or hematophagocytosis (33). Thus, there is a relationship between mortality and the
18 condition of leukopenia, corroborating with our survival data, as the same animals that
19 had leukopenia also showed a significant decrease in the survival rate. Animals from
20 the CTL CLP group also presented thrombocytopenia, neutropenia, lymphopenia,
21 monocytopenia, and eosinopenia, which may have been caused by the
22 immunosuppression triggered by sepsis (34).

23

24 **5. Conclusion**

25

26 In the present study we can conclude that unlike male Swiss mice, the obesity
27 paradox does not repeat itself in females with severe sepsis. Although it was observed
28 that MetS attenuates some parameters such as hematological and resistance to the
29 increase in plasma NO, characteristic of sepsis, this is not seen in the survival of these
30 animals. These findings provide new insights for the literature related to the relationship
31 between MetS and sepsis in the female gender, therefore, it is necessary for more
32 research related to the topic to be developed.

33

34 **6. References**

1

- 2 1. Esposito S, De Simone G, Boccia G, De Caro F, Pagliano P. Sepsis and septic
3 shock: New definitions, new diagnostic and therapeutic approaches. *Journal of global*
4 *antimicrobial resistance*. 2017;10:204-12.
- 5 2. Rello J, Valenzuela-Sánchez F, Ruiz-Rodríguez M, Moyano S. Sepsis: A
6 Review of Advances in Management. *Advances in therapy*. 2017;34(11):2393-411.
- 7 3. Wang W, Liu CF. Sepsis heterogeneity. *World journal of pediatrics : WJP*.
8 2023;19(10):919-27.
- 9 4. Mayoral LP, Andrade GM, Mayoral EP, Huerta TH, Canseco SP, Rodal Canales
10 FJ, et al. Obesity subtypes, related biomarkers & heterogeneity. *The Indian journal of*
11 *medical research*. 2020;151(1):11-21.
- 12 5. Faccioli N, Poitou C, Clément K, Dubern B. Current Treatments for Patients with
13 Genetic Obesity. *Journal of clinical research in pediatric endocrinology*.
14 2023;15(2):108-19.
- 15 6. Piché ME, Tchernof A, Després JP. Obesity Phenotypes, Diabetes, and
16 Cardiovascular Diseases. *Circulation research*. 2020;126(11):1477-500.
- 17 7. Boulangé CL, Neves AL, Chilloux J, Nicholson JK, Dumas ME. Impact of the
18 gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease. *Genome medicine*.
19 2016;8(1):42.
- 20 8. Rochlani Y, Pothineni NV, Kovelamudi S, Mehta JL. Metabolic syndrome:
21 pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. *Therapeutic*
22 *advances in cardiovascular disease*. 2017;11(8):215-25.
- 23 9. Hernández Bautista RJ, Mahmoud AM, Königsberg M, López Díaz Guerrero
24 NE. Obesity: Pathophysiology, monosodium glutamate-induced model and anti-
25 obesity medicinal plants. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine &*
26 *pharmacotherapie*. 2019;111:503-16.
- 27 10. Zazula MF, Saraiva DF, Theodoro JL, Maciel M, Sepulveda E, Zanardini de
28 Andrade B, et al. An Early and Sustained Inflammatory State Induces Muscle Changes
29 and Establishes Obesogenic Characteristics in Wistar Rats Exposed to the MSG-
30 Induced Obesity Model. *International journal of molecular sciences*. 2023;24(5).
- 31 11. Nakama RP, Malvezi AD, Lovo-Martins MI, Dos Santos LF, Canizares Cardoso
32 AP, Scacco G, et al. Metabolic syndrome improves cardiovascular dysfunction and
33 survival during cecal ligation and puncture-induced mild sepsis in mice. *Life sciences*.
34 2021;286:120033.
- 35 12. Maletínská L, Toma RS, Pirnik Z, Kiss A, Slaninová J, Haluzík M, et al. Effect of
36 cholecystokinin on feeding is attenuated in monosodium glutamate obese mice.
37 *Regulatory peptides*. 2006;136(1-3):58-63.
- 38 13. Bernardis LL, Patterson BD. Correlation between 'Lee index' and carcass fat
39 content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions. *The Journal of*
40 *endocrinology*. 1968;40(4):527-8.
- 41 14. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock--a review of
42 laboratory models and a proposal. *The Journal of surgical research*. 1980;29(2):189-
43 201.
- 44 15. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of
45 experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nature protocols*. 2009;4(1):31-6.
- 46 16. Lucchetti BFC, Boaretto N, Lopes FNC, Malvezi AD, Lovo-Martins MI,
47 Tatakihara VLH, et al. Metabolic syndrome agravates cardiovascular, oxidative and
48 inflammatory dysfunction during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in
49 mice. *Scientific reports*. 2019;9(1):18885.
- 50 17. Navarro-González JA, García-Benayas C, Arenas J. Semiautomated

- 1 measurement of nitrate in biological fluids. *Clinical chemistry*. 1998;44(3):679-81.
- 2 18. Panis C, Mazzuco TL, Costa CZ, Victorino VJ, Tatakahara VL, Yamauchi LM, et
3 al. Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived
4 leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue
5 in the acute phase of infection in mice. *Experimental parasitology*. 2011;127(1):58-65.
- 6 19. Cunha NV, de Abreu SB, Panis C, Grassioli S, Guarnier FA, Cecchini R, et al.
7 Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium
8 glutamate-induced obese rats. *Life sciences*. 2010;87(11-12):375-81.
- 9 20. Karlen-Amarante M, da Cunha NV, de Andrade O, de Souza HC, Martins-Pinge
10 MC. Altered baroreflex and autonomic modulation in monosodium glutamate-induced
11 hyperadipose rats. *Metabolism: clinical and experimental*. 2012;61(10):1435-42.
- 12 21. Lopes FNC, da Cunha NV, de Campos BH, Fattori V, Panis C, Cecchini R, et
13 al. Antioxidant therapy reverses sympathetic dysfunction, oxidative stress, and
14 hypertension in male hyperadipose rats. *Life sciences*. 2022;295:120405.
- 15 22. da Cunha NV, Pinge-Filho P, Panis C, Silva BR, Pernomian L, Grando MD, et
16 al. Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased
17 sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats. *American journal of
18 physiology Heart and circulatory physiology*. 2014;306(10):H1472-80.
- 19 23. Plummer MP, Deane AM. Dysglycemia and Glucose Control During Sepsis.
20 *Clinics in chest medicine*. 2016;37(2):309-19.
- 21 24. Wang J, Zhu CK, Yu JQ, Tan R, Yang PL. Hypoglycemia and mortality in sepsis
22 patients: A systematic review and meta-analysis. *Heart & lung : the journal of critical
23 care*. 2021;50(6):933-40.
- 24 25. Maitra SR, Wojnar MM, Lang CHJS. Alterations in tissue glucose uptake during
25 the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. 2000;13(5):379-85.
- 26 26. Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-
27 Garza H. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical
28 implications and management. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(3):280-8.
- 29 27. Spiller F, Oliveira Formiga R, Fernandes da Silva Coimbra J, Alves-Filho JC,
30 Cunha TM, Cunha FQ. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and
31 pain. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2019;89:32-40.
- 32 28. Burgdorff AM, Bucher M, Schumann J. Vasoplegia in patients with sepsis and
33 septic shock: pathways and mechanisms. *The Journal of international medical
34 research*. 2018;46(4):1303-10.
- 35 29. Fernandes D, Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock
36 (Augusta, Ga)*. 2008;30 Suppl 1:10-3.
- 37 30. Wei Q, Zhao J, Wang H, Liu C, Hu C, Zhao C, et al. Correlation Analysis of
38 Blood Glucose Level with Inflammatory Response and Immune Indicators in Patients
39 with Sepsis. *Disease markers*. 2022;2022:8779061.
- 40 31. Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular
41 endothelium in cytokine storms. *Experimental & molecular medicine*. 2021;53(7):1116-
42 23.
- 43 32. Zanders L, Kny M, Hahn A, Schmidt S, Wundersitz S, Todiras M, et al. Sepsis
44 induces interleukin 6, gp130/JAK2/STAT3, and muscle wasting. *Journal of cachexia,
45 sarcopenia and muscle*. 2022;13(1):713-27.
- 46 33. Belok SH, Bosch NA, Klings ES, Walkey AJ. Evaluation of leukopenia during
47 sepsis as a marker of sepsis-defining organ dysfunction. *PloS one*.
48 2021;16(6):e0252206.
- 49 34. Davis FM, Schaller MA, Dendekker A, Joshi AD, Kimball AS, Evanoff H, et al.
50 Sepsis Induces Prolonged Epigenetic Modifications in Bone Marrow and Peripheral

1 Macrophages Impairing Inflammation and Wound Healing. *Arteriosclerosis,*
2 *thrombosis, and vascular biology.* 2019;39(11):2353-66.

3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

1 **CONCLUSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO**

2
3 Nosso trabalho foi o primeiro a avaliar a associação entre MetS e o sexo
4 feminino como um fator protetor atenuando contra a sepse. Fornecemos evidências
5 de que, diferente do que já foi observado em camundongos Swiss machos, a teoria
6 do paradoxo da obesidade não se enquadra nas fêmeas. Embora a MetS tenha
7 atenuado positivamente alguns parâmetros, como hematológicos e resistência ao
8 aumento de NO, isso não influencia na análise de sobrevivência desses animais. Os
9 resultados apresentados abrem portas para futuros trabalhos que poderão elucidar a
10 participação do estrogênio na obesidade com influência da sepse severa, no intuito
11 de explicar o fenômeno que faz com que fêmeas obesas não se enquadrem no
12 paradoxo da obesidade.

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34