



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RAQUEL PIRES NAKAMA

**ESTUDO DA SEPSE POLIMICROBIANA NA SÍNDROME
METABÓLICA EM CAMUNDONGOS**

Londrina
2021

RAQUEL PIRES NAKAMA

**ESTUDO DA SEPSE POLIMICROBIANA NA SÍNDROME
METABÓLICA EM CAMUNDONGOS**

Defesa de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Co-Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso
Martins Pinge

Londrina
2021

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

N163p Nakama, Raquel.
Estudo da sepse polimicrobiana na síndrome metabólica em camundongos / Raquel Nakama. - Londrina, 2021.
66 f. : il.

Orientador: Phileno Pinge Filho.
Coorientador: Marli Cardoso Martins Pinge.
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2021.
Inclui bibliografia.

1. Sepse - Tese. 2. Paradoxo da obesidade - Tese. 3. Ligadura e punção do ceco - Tese. 4. Síndrome metabólica - Tese. I. Pinge Filho, Phileno . II. Cardoso Martins Pinge, Marli. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616

RAQUEL PIRES NAKAMA

**ESTUDO DA SEPSE POLIMICROBIANA NA SÍNDROME
METABÓLICA EM CAMUNDONGOS**

Defesa de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Phileno Pinge Filho
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Fábio H. Kwasniewski
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Profa. Dra. Graziela Scaliante Ceravolo
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 20 de agosto de 2021.

Dedico este trabalho a minha mãe, minha avó, meu irmão e meu namorado. Obrigada pelo apoio em todos os momentos desta jornada. A vocês, minha eterna e imensa gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, por sempre me guiar, por me proporcionar grandes oportunidades e me fortalecer para cumprir meus desafios.

À minha mãe, Ana Maria Lavandosk, desde o início da minha vida, dos meus estudos, sempre me apoiando, me deu liberdade para trilhar meu caminho, mas sempre me orientando com sabedoria e amor. Obrigada por estar presente em cada momento, desde os mais tristes até as maiores comemorações, vibrando todas as conquistas e me ajudando a suportar os momentos que cheguei a duvidar de mim. Obrigada por todo o amor e dedicação. À minha vó, Catharina Ignês Lavandosk, por cuidar de mim todos os dias, por se preocupar comigo e sempre torcer por mim; sempre que precisei, pedi intensamente à Deus pelas minhas conquistas, obrigada por tudo vó. À todas as pessoas da minha família que estiveram presentes na minha vida, de perto ou de longe, mas que sempre me apoiaram e acreditaram em mim. Ao meu namorado, Gustavo Shoji, que esteve presente comigo não somente durante o mestrado, mas em outras etapas da minha vida, obrigada por me encorajar, por estar comigo, me apoiar, pelas noites, finais de semana e feriados que já passou comigo na UEL, obrigada pelo companheirismo e por todo o carinho.

À minha amiga Giovana Carvalho que me acompanha desde o ensino médio até o presente momento na UEL, obrigada pelo apoio e por ser minha melhor amiga. E às amigadas que fiz durante o mestrado, Maria Isabel e Fabrício Inoue, estar com vocês fez com que esse desafio fosse mais divertido, obrigada pela ajuda, pelas conversas, as vezes mesmo que muito cansados e tristes, nós sempre encontrávamos um motivo para sorrir.

Aos amigos do laboratório de imunopatologia experimental, Cidinha Malvezi, obrigada por toda ajuda nos experimentos, pela disponibilidade e por sempre cuidar de todos do laboratório com carinho; À Maria Isabel Lovo Martins, agradeço pelos diversos ensinamentos, obrigada por toda ajuda e por ser uma pessoa muito solícita. Ao Lucas Santos, que entrou no laboratório e rapidamente tornou-se um grande amigo, obrigada por toda ajuda durante os experimentos, pelo

companheirismo, momentos de muita alegria no laboratório e por podermos dividir nossos bons e maus momentos. À Ana Paula Canizares, que iniciou no laboratório como aluna de iniciação científica e também se tornou uma grande amiga, obrigada por sempre poder contar com a sua ajuda, tanto no laboratório quanto na vida, é confortante saber que conheço pessoas boas como você. Às alunas de IC, Mariana Souza, Vanessa Roberta e Ana Laura por toda ajuda com meus experimentos e com o laboratório.

À professora Doutora Andressa de Freitas, por toda a paciência, por sempre ser muito atenciosa e solícita comigo durante todo o mestrado; obrigada por todos os ensinamentos sobre sepse, por todo o tempo dedicado a mim e por toda a disponibilidade.

À professora Doutora Marli Cardoso Martins Pinge, por aceitar me coorientar, por estar disponível para me ajudar e tirar minhas dúvidas, sempre muito paciente e sábia. Obrigada por ceder um espaço no biotério da fisiologia, por todo o ensinamento e pela ajuda com este trabalho. Aos técnicos da fisiologia, pela ajuda com o biotério, em especial a técnica Fujiko, que me ajudou a resolver muitos perrengues.

Ao meu orientador, Professor Doutor Phileno Pinge Filho, meus sinceros agradecimentos por me orientar desde a iniciação científica e por continuar me orientando. Agradeço por toda atenção e preocupação comigo, pelas conversas e conselhos; obrigada pela ajuda na realização deste trabalho, sua orientação foi imprescindível. Você é um grande exemplo como pessoa e como professor; tenho você como inspiração para minha carreira acadêmica, sempre muito atencioso e procurando aperfeiçoar-se. Obrigada por me reerguer com palavras de força em momentos em que desanimei, pelas críticas construtivas, pois assim eu posso buscar corrigir meus erros e melhorar. Sou grata pela paciência ao longo desses anos e por todos os ensinamentos que você me proporcionou.

À CAPES pelo auxílio financeiro oferecido ao longo desse período.

Sou das que pensam que a ciência tem uma grande beleza. Um cientista em seu laboratório não é só um técnico: é também uma criança colocada diante de fenômenos naturais que lhe impressionam como um conto de fadas.”

Marie Curie

NAKAMA, Raquel Pires. **Estudo da sepse polimicrobiana na síndrome metabólica em camundongos**. 2021. 63 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2021.

RESUMO

A obesidade é um problema de saúde considerada uma epidemia relacionada a fatores ambientais e genéticos, capaz de atingir todas as faixas etárias da população. Ela é definida como um acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo, podendo estar fortemente relacionada a síndrome metabólica (SM). A SM compreende um conjunto de fatores associados à obesidade, como hipertensão, dislipidemia e resistência à insulina. Outro problema de saúde pública extremamente comum é a sepse, uma doença grave, com alto índice de incidência em UTIs. Dados recentes, sugerem que o quadro de um paciente com sepse pode ser agravado caso esse paciente seja obeso, devido ao exagero da resposta inflamatória quando comparado a indivíduos magros, no entanto, existem estudos controversos em que demonstram o “paradoxo da obesidade”, onde a obesidade é capaz de gerar efeitos positivos frente a doenças críticas como a sepse. Dessa maneira, o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da SM em camundongos após a indução da sepse moderada, avaliando, sobrevida, produção de óxido nítrico (NO), parâmetros cardiovasculares e hematológicos. A SM foi induzida em camundongos Swiss por meio de injeções subcutâneas com glutamato monossódico (4mg/g/peso corporal) do 1°-5° dia de vida e os controles foram tratados com salina equimolar, no mesmo período. No 75° dia de vida os animais foram submetidos a cirurgia para a indução da sepse polimicrobiana moderada através do modelo de ligadura e punção do ceco (CLP), a quantificação de NO foi realizada através da técnica de cádmio e Griess, os parâmetros cardiovasculares foram mensurados utilizando a plataforma CODA, e a avaliação hematológica foi determinada por contagem padrão. A sobrevida dos animais com SM foi significativamente maior do que nos animais controle após o período de observação de 168h. O aumento da sobrevida foi acompanhado por melhoras nos parâmetros hematológicos, por apresentarem menor aumento de reticulócitos e um menor decaimento de células fagocíticas. Os parâmetros cardiovasculares dos animais com SM também foram melhores do que os animais controle, pois não houve quadro de hipotensão e também só houve aumento de NO nos grupos controles. Com isto, concluímos que a SM melhora a sobrevida, provavelmente em parte, devido às melhoras nos parâmetros cardiovasculares e hematológicos, além de provocar uma resistência à produção de NO durante a sepse. Nossos achados da relação da SM e sepse moderada são favoráveis à teoria do “paradoxo da obesidade”.

Palavras-chave: síndrome metabólica; sepse; ligadura e punção do ceco (CLP); paradoxo da obesidade.

Nakama, Raquel Pires Nakama. **Study of polymicrobial sepsis in metabolic syndrome in mice**. 2021. 63 p. Dissertation (Master in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2021.

ABSTRACT

Obesity is a health problem considered an epidemic related to environmental and genetic factors, capable of affecting all age groups of the population. It is defined as an abnormal or excessive accumulation of adipose tissue and is strongly related to metabolic syndrome (MS). MS comprises a set of factors associated with obesity, such as hypertension, dyslipidemia, and insulin resistance. Another extremely common public health problem is sepsis, a serious disease with a high incidence rate in patients in ICUs. Recent data suggest that the condition of a patient with sepsis can be aggravated if this patient is obese, due to the exaggeration of the inflammatory response when compared to thin, however, there are controversial studies that demonstrate the "obesity paradox", because obesity is capable of generating positive effects against critical illnesses such as sepsis. Thus, the aim of this study was to evaluate the effects of metabolic syndrome in mice after the induction of moderate sepsis, evaluating survival, nitric oxide production (NO), cardiovascular and hematological parameters. MS was induced in Swiss mice through subcutaneous injections with monosodium glutamate (4mg/g/body weight) from the 1st - 5th day of life and controls were treated with equimolar saline during the same period. On the 75th day of life, the animals underwent surgery for the induction of moderate polymicrobial sepsis using the cecal ligation and puncture model (CLP), the quantification of NO was performed using the cadmium and Griess technique, the cardiovascular parameters were performed using the CODA platform and hematologic evaluation was determined by standard count. The survival of animals with MS was completed longer than controls after the observation period of 168h. The increase in survival was accompanied by improvements in hematological parameters, as they presented a lower increase in reticulocytes and a lower decay of phagocytic cells. The cardiovascular parameters of animals with MS were also better than those of control animals, as there was no hypotension and there was only an increase in NO in the control groups. Thus, we conclude that MS improves survival, probably in part, due to improvements in cardiovascular and hematological parameters, in addition to causing resistance to NO production during sepsis. Our findings on the relationship between MS and moderate sepsis are favorable to the "obesity paradox" theory.

Key words: metabolic syndrome; sepsis; cecal ligation and puncture (CLP); obesity paradox.

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ARC	Núcleo arqueado hipotalâmico
ATP	Adenosina trifosfato
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CASP	<i>Colon Ascendens Stent Peritonitis</i>
CID	Coagulação intravascular disseminada
CLP	Ligadura e punção do ceco
cm ³	Centímetro cúbico
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CP	Parâmetro cardiovascular
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FT	Fator tecidual
g	Gramas
h	Horas
HR	Frequência cardíaca
ICU	<i>Intensive care unit</i>
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
MAP	Pressão arterial média
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm ³	Milímetros cúbicos
MSG	Glutamato monossódico
nNOS	Óxido nítrico sintase neural
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização mundial da saúde
PA	Pressão arterial
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PG	Perigonadal
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona

ROS	Espécies reativas de oxigênio
Rpm	Rotações por minuto
RT	Retroperitoneal
SEM	Média do erro padrão
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SM	Síndrome metabólica
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SOFA	Avaliação de falhas sequenciais em órgão
SSC	<i>Surviving Sepsis Compaing</i>
SUS	Sistema único de saúde
TLR	Receptor <i>Toll like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UTI	Unidade de terapia intensiva
WHO	<i>World health organization</i>
WOF	<i>World obesity federation</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA.....	12
1.2	SEPSE POLIMICROBIANA	14
1.3	FISIOPATOLOGIA DA SEPSE.....	19
1.4	PARADOXO DA OBESIDADE NA SEPSE	21
1.5	MODELO DE INDUÇÃO DA SM POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG).....	24
2	JUSTIFICATIVA	27
3	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
	REFERÊNCIAS	29
	ANEXO - Metabolic syndrome improves cardiovascular dysfunction and survival in CLP-induced mild sepsis in mice	41

INTRODUÇÃO

1.1 OBESIDADE E SÍNDROME METABÓLICA

A obesidade é considerada uma epidemia relacionada ao estilo de vida, que atinge todas as faixas etárias da população e se tornou reconhecida como um problema de saúde global no final do século XX (AITLHADJ; AVILA; BENEDETTO *et al.*, 2011; DREWA; ZORENA, 2017). Ela é um problema de saúde definido como acúmulo anormal ou excessivo de tecido adiposo (AITLHADJ; AVILA; BENEDETTO *et al.*, 2011; WHO, 2000), ocasionada por desequilíbrio na homeostase do metabolismo energético, gerado por muitos fatores genéticos e ambientais, geralmente controlados pelo sistema nervoso central (SNC) (ZELEZNA; MAIXNEROVA; MATYSKOVA *et al.*, 2009). No entanto, a *World Obesity Federation* (WOF) considera a obesidade uma doença progressiva crônica e recorrente (BRAY; KIM; WILDING, 2017). A obesidade também pode ser determinada pelo percentual de gordura corporal, sendo 25% para pessoas do sexo masculino e 30% para o sexo feminino (WHO, 2000). Atualmente existem alguns métodos altamente precisos para determinação da obesidade como a ressonância magnética e bioimpedância elétrica (KALVØY; SAUTER, 2016).

O tecido adiposo é composto por mais de um tipo de célula, como pré-adipócitos, adipócitos, fibroblastos, células do estroma e macrófagos (CSONGRÁDI; KÁPLÁR; NAGY *et al.*, 2017; LEE; LEE; OH, 2019). Durante muito tempo o tecido adiposo era simplesmente considerado como um compartimento de armazenamento para triglicerídeos, mas sabe-se que as funções incluem isolamento térmico, função imunológica e também endócrina (CINTI, 2018; LEE; LEE; OH, 2019). Os diversos tipos de tecido adiposo têm funções endócrinas distintas, por exemplo, o tecido adiposo branco secreta adipocinas, relacionadas a alimentação e metabolismo e o tecido marrom secreta hormônios e fatores de crescimento (FROY; GARAULET, 2018; LEE; LEE; OH, 2019).

A obesidade está relacionada com um estado crônico de inflamação de baixo grau associado com infiltração progressiva de células do sistema imune no tecido adiposo de indivíduos obesos (WEISBERG; MCCANN; DESAI *et al.*, 2003; XU; BARNES; YANG *et al.*, 2003). Adipócitos hipertróficos

em excesso apresentam perfil inflamatório e participam do mecanismo de resistência à insulina, pois secretam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como a interleucina-1-beta (IL1- β), interleucina- 6 (IL6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (DANIELE; GUARDADO MENDOZA; WINNIER *et al.*, 2014). Em contrapartida adipócitos menores apresentam características anti-inflamatórias e também auxiliam a captação de glicose pelos tecidos sensíveis à insulina (KOSKA; ORTEGA; BOGARDUS *et al.*, 2007). Estudos indicam que os níveis de TNF- α aumentam de maneira diretamente proporcional a gravidade da obesidade (NIETO-VAZQUEZ; FERNÁNDEZ-VELEDO; KRÄMER *et al.*, 2008; SOOKOIAN; GARCÍA; GIANOTTI *et al.*, 2005). O TNF- α também pode ser produzido e secretado pelo tecido adiposo contribuindo para a patogênese da hipertensão associada a obesidade e também possui efeito indireto na estimulação de resistência à insulina, pois o TNF- α é capaz de aumentar a lipólise, conseqüentemente há um aumento dos ácidos graxos livres séricos, participando no desenvolvimento da resistência à insulina (JIN; SUN; HUANG *et al.*, 2014; SOOKOIAN; GARCÍA; GIANOTTI *et al.*, 2005).

A obesidade parece apresentar uma relação direta com a hipertensão arterial sistêmica, popularmente conhecida por hipertensão, definida pelo aumento da pressão arterial (PA) nas artérias sistêmicas de modo persistente (LUFT, 2001), ocorre de maneira multifatorial, estando relacionada com fatores genéticos, epigenéticos, ambientais e sociais, pode ocorrer através do aumento da reabsorção renal de sódio, deteriorando a natriurese pressórica e também pela expansão de volume, etc (BARROSO; RODRIGUES; BORTOLOTTI *et al.*, 2021; WOFFORD; HALL, 2004). A manutenção fisiológica da PA envolve uma complexa interação dentre diversos fatores neuro-hormonais, incluindo o sistema renina-angiotensina-aldosterona, peptídeos natriuréticos, endotélio, sistema nervoso simpático e o sistema imunológico (OPARIL; ACELAJADO; BAKRIS *et al.*, 2018). Alterações nesses sistemas que levem ao mau funcionamento de algum fator, pode levar direta ou indiretamente a aumentos da PA média, o que pode resultar em danos secundários, como outras doenças cardiovasculares (HALL; HALL, 2017).

A síndrome metabólica (SM) se caracteriza por um conjunto de fatores de risco, que se manifestam num indivíduo e aumentam as chances de

desenvolver doenças cardiometabólicas. Considera-se como componentes da SM, a hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e aumento discreto ou no limite superior da glicemia em jejum, resistência à insulina, inflamação de baixo grau, estresse oxidativo e hipertensão arterial, além da obesidade visceral (DE MARCHI; GUIMARÃES-OKAMOTO; MELCHERT *et al.*, 2016). Os mecanismos patogênicos da SM são complexos e ainda precisam ser mais elucidados. A literatura ainda discute se os componentes individuais da SM representam doenças, ou, manifestações distintas de um mecanismo patogênico comum. A adiposidade visceral, no entanto, demonstrou ser um gatilho primário para a maioria das vias envolvidas na SM. De todos os mecanismos propostos, resistência à insulina, ativação neuro-hormonal e inflamação crônica parecem ser os principais atores no início, progressão e transição da obesidade para SM (ROCHLANI; POTHINENI; KOVELAMUDI *et al.*, 2017).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a obesidade quase triplicou desde 1975. Dados de 2016, mostram que 1,9 bilhões de pessoas com mais de 18 anos, encontram-se com sobrepeso, dentre elas mais de 650 milhões apresentavam obesidade. Outro dado alarmante refere-se que atualmente existem 42 milhões de crianças abaixo dos 5 anos, acima do peso. Atualmente, ainda que a obesidade seja evitável, a maior parte da população mundial vive em locais em que o sobrepeso é mais fatal do que o baixo peso (WHO, 2020).

1.2 SEPSE POLIMICROBIANA

A sepse consiste em uma resposta inflamatória sistêmica mediante uma infecção local grave, ocasionando a falência múltipla de órgãos e podendo evoluir até a morte (ISKANDER, K. N.; OSUCHOWSKI, M. F.; STEARNS-KUROSAWA, D. J. *et al.*, 2013). Essa síndrome inclui anormalidades fisiológicas, patológicas e bioquímicas induzidas pela infecção, que normalmente tem origem bacteriana, porém também pode ocorrer por vírus, fungos e parasitos (BONE; GRODZIN; BALK, 1997; CECCONI; EVANS; LEVY *et al.*, 2018). Diante da severidade dessa condição é necessário que se faça um diagnóstico rápido através das características da sepse, para que se trate o paciente o quanto

antes. A sepse possui alta incidência e continua sendo uma das principais causas de morte no mundo, sendo considerado um grave problema de saúde pública, foi considerada em 2017 uma prioridade de saúde global pela Assembleia Mundial da Saúde e pela OMS (REINHART; DANIELS; KISSOON *et al.*, 2017), com consequências econômicas severas (FLEISCHMANN; SCHERAG; ADHIKARI *et al.*, 2016; TIRU; DININO; ORENSTEIN *et al.*, 2015). Existem fortes evidências de que pacientes que sobrevivem a essa condição, podem vir a apresentar, de modo frequente, incapacidades físicas, psicológicas e cognitivas em longo prazo, o que pode vir a ter implicações sociais e de cuidados de saúde significativos com esse paciente (IWASHYNA; ELY; SMITH *et al.*, 2010).

Mesmo que a sepse seja considerada um problema de saúde global, é notório que há uma desproporcionalidade de documentos evidenciando casos de sepse, pois a maioria das informações sobre ocorrências dessa condição é proveniente de países considerados de alta renda. Neste contexto, é preciso que haja uma maior vigilância em todos os sistemas de saúde, procurando não negligenciar países de média e baixa renda (CECCONI; EVANS; LEVY *et al.*, 2018). Desde 2004, vem-se desenvolvendo um projeto global denominado “Surviving Sepsis Campaign (SSC)”, que visa melhorar a sobrevivência de pacientes com sepse e choque séptico, sendo considerado um dos mais importantes programas de melhoria para casos de sepse, a nível global. Pacotes desse programa são lançados e podem ser atualizados, indicando novas tendências e observações; dessa maneira, esses pacotes são importantes para a melhoria do diagnóstico e tratamento da sepse desde 2005 (DELLINGER; LEVY; RHODES *et al.*, 2013). As diretrizes desse programa reafirmam a necessidade de uma rápida avaliação detalhada do quadro do paciente para início do tratamento e uma reavaliação contínua da resposta do paciente ao tratamento (LEVY; EVANS; RHODES, 2018).

Em 1991, foram inicialmente definidos alguns termos, para melhoria de diagnóstico e tratamento, a infecção foi definida como um fenômeno envolvendo a invasão por microrganismos, com consequente resposta inflamatória. Bacteremia é o termo dado a presença de bactérias viáveis no sangue. Sepse foi definida como uma resposta inflamatória sistêmica de um

hospedeiro, frente a infecção, estando acompanhada de um ou mais sinais: hemocultura positiva, frequência respiratória maior do que 20 movimentos respiratórios/minuto, frequência cardíaca maior que 90 batimentos/minuto (bpm), hipertermia ou hipotermia, leucocitose (leucócitos >12.000 células/mm³) ou leucopenia (leucócitos <4.000 células/mm³). A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), é caracterizada por um ou mais sintomas da sepse, porém não há hemocultura positiva. A sepse grave é determinada quando há complicação da sepse e está associada a fenômenos de hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica, porém o quadro de hipotensão (pressão sistólica <90 mmHg) ainda pode ser revertida pela administração de fluidos, sem necessidade de vasopressores. A sepse grave pode evoluir para o choque séptico, termo utilizado para sepse associada a hiperlactatemia ou hipotensão refratária à ressuscitação fluídica, com a necessidade de administração de vasopressores. O termo síndrome da disfunção de múltiplos órgãos representa uma condição em que não há homeostasia da função orgânica (BONE; BALK; CERRA *et al.*, 2009; PHYSICIANS; COMMITTEE, 1992).

A partir do reconhecimento de algumas limitações dessas definições, em 2001 houve uma expansão da lista de critérios de diagnóstico, no entanto pela falta de evidências dos casos de sepse, não houve muita mudança (LEVY; FINK; MARSHALL *et al.*, 2003). Em 2014, em vista da necessidade de uma revisão das definições de sepse, especialistas selecionados por suas experiências em epidemiologia da sepse, ensaios clínicos e pesquisa básica ou translacional entraram em um consenso, baseado em um entendimento atual das mudanças induzidas pela sepse na função de órgãos, morfologia, biologia celular, bioquímica, imunologia e circulação. Assim, a Terceira Definição Consensual Internacional para Sepse e Choque Séptico (Sepse-3) de 2016, definiu a sepse como uma disfunção de órgãos, com risco à vida, resultante de uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, e o choque séptico foi definido como um subconjunto da sepse, em que anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas são um agravante, aumentando potencialmente a mortalidade. Em resumo, os novos critérios para reconhecimento da sepse envolvem mais a caracterização da disfunção orgânica do que a identificação de sinais da inflamação (CECCONI; EVANS; LEVY *et al.*, 2018; SINGER;

DEUTSCHMAN; SEYMOUR *et al.*, 2016). De acordo com o uso comum dos termos, as categorias anteriores de sepse, sepse grave agora foram alterados para: infecção, sepse (CECCONI; EVANS; LEVY *et al.*, 2018).

Para a definição da sepse têm sido usadas algumas alternativas para determinar o grau das disfunções orgânicas presentes no paciente. Essas ferramentas são utilizadas para determinar a pontuação SOFA (Sequential Sepsis-related Organ Failure Assessment), que avalia os sistemas cardiovascular, respiratório, nervoso e renal, além da coagulação e a concentração de bilirrubina (VINCENT; MORENO; TAKALA *et al.*, 1996). Dessa forma, a sepse é agora definida a partir da presença de uma infecção concomitante a uma alteração aguda na pontuação SOFA de 2 pontos ou mais (0 na pontuação SOFA indica pacientes sem qualquer disfunção de órgão preexistente conhecida) (CECCONI; EVANS; LEVY *et al.*, 2018). Existem ainda mais três critérios, estabelecidos em 2016, que compreendem a alteração do estado mental, pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg, ou uma frequência respiratória de mais de 22 respirações/minuto, que podem identificar pacientes hospitalizados com infecção que tenham uma suscetibilidade em permanecerem por um tempo prolongado em unidade de terapia intensiva (UTI) e apresentem alto risco de morte, se o paciente apresentar no mínimo dois critérios, ele é considerado em uma categoria de alto risco de sepse (BRAUN, 2019; CHURPEK; SNYDER; HAN *et al.*, 2017).

A maior parte dos dados epidemiológicos são provenientes de estudos de pacientes hospitalizados em países de alta renda, no entanto as informações globais da sepse são provavelmente subestimados por esses estudos, pois autores sugerem que a maior incidência de casos de sepse ocorram em países de baixa renda, devido a maior carga de doenças infecciosas e recursos limitados para prevenção de infecções (CHIU; LEGRAND, 2021; RUDD; JOHNSON; AGESA *et al.*, 2020). Dados de 2001, provenientes de uma pesquisa levantada nos Estados Unidos da América, relatam que a incidência de sepse grave foi superior a 750.000 casos por ano, cerca de 300 casos a cada 100.000 habitantes (ANGUS; LINDE-ZWIRBLE; LIDICKER *et al.*, 2001). No Reino Unido a frequência relatada de sepse é ainda maior que nos Estados Unidos, tendo uma incidência de 27% de casos de sepse em relação às

internações em UTIs, em comparação, nos Estados Unidos essa frequência fica em torno de 17% (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014). Essa discrepância pode ser devido à diferença no maior número de leitos nos Estados Unidos da América, quando comparado ao Reino Unido (LEVY; ARTIGAS; PHILLIPS *et al.*, 2012; RHODES; FERDINANDE; FLAATTEN *et al.*, 2012). Apesar de haver subnotificação, evidências sugerem que a sepse é a causa de cerca de um terço da metade das mortes hospitalares nos Estados Unidos da América, no entanto sabe-se que a maioria de mortes decorrentes da sepse ocorrem em países de baixa renda, porém há negligência em relação a este fato (CECCONI; EVANS; LEVY *et al.*, 2018; LIU; ESCOBAR; GREENE *et al.*, 2014). Estima-se que 90% das mortes causadas por infecções pulmonares ocorrem em locais com poucos recursos e 70% das 9 milhões de mortes, causadas por infecções pulmonares em neonatos e lactantes, estão associados à sepse, e a maioria desses casos ocorrem na Ásia e na África (BLACK; COUSENS; JOHNSON *et al.*, 2010).

Em uma visão geral, a incidência de sepse está aumentando no mundo, e está amplamente relacionada à alta taxa de mortalidade, tendo relevância social e econômica (GAIESKI; EDWARDS; KALLAN *et al.*, 2013; KUMAR; KUMAR; TANEJA *et al.*, 2011). Pesquisadores apontam que no período de 2000 a 2007, nos Estados Unidos houve um aumento de 140% de casos de sepse e no período de 2008 a 2012 o aumento da incidência foi de 26% anual (KUMAR; KUMAR; TANEJA *et al.*, 2011; STOLLER; HALPIN; WEIS *et al.*, 2016). Os custos econômicos destinados a casos de sepse são altos e podem variar de país para país, fatores como idade, gravidade da sepse e tipo de instituições influenciam diretamente nos custos. O custo médio destinado à sepse nos Estados Unidos foi de 19.330 dólares, somente no ano de 2007 (LAGU; ROTHBERG; SHIEH *et al.*, 2012), o custo médio por pacientes em 21 UTIs brasileiras, entre os anos de 2003 e 2004, foi de 9.632 dólares (SOGAYAR; MACHADO; REA-NETO *et al.*, 2008). No Brasil, entre os anos de 2006 a 2015, o índice de relatos de sepse pelo SUS, aumentou em 50,5% e isto pode estar relacionado com a expectativa de vida da população brasileira que também aumentou de 73 para 75 anos (NEIRA; HAMACHER; JAPIASSÚ, 2018) ou também com o melhor diagnóstico da sepse (GAIESKI; EDWARDS; KALLAN *et al.*, 2013).

1.3 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

O quadro de sepse tem como início a invasão de um organismo por agentes infecciosos, resultando em uma resposta inflamatória exacerbada, em que há uma intensa ativação de células do sistema imunológico, que pode culminar em desordem no metabolismo do hospedeiro com consequente comprometimento de órgãos e evolução ao óbito devido a diversas disfunções orgânicas (BONE, 1991; PARRILLO, 1993).

A sepse pode ocorrer pela infecção de um único patógeno ou ter origem polimicrobiana (CAVAILLON, 2003). No momento em que ocorre a infecção no hospedeiro, células no sistema imunológico inato são ativadas e recrutadas, como por exemplo, monócitos, macrófagos, e o sistema complemento também pode ser ativado, pela via alternativa. Esses microrganismos expressam em sua superfície moléculas denominadas Padrões Moleculares Associados à Patógenos (PAMPS), essas estruturas são reconhecidas por células do sistema imune inato através de receptores denominados Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), como por exemplo os receptores *Toll-like* (TLR). Exemplos dessa interação são o TLR-2 e TLR-4 que reconhecem peptídeoglicano de bactérias gram-positivas e lipopolisacarídeo de bactérias gram-negativas, respectivamente. Dessa maneira há o início da cascata inflamatória, com liberação de citocinas como TNF- α e interleucina-1 beta (IL-1 β), IL-6, IL-8, estimulando uma intensa resposta imunológica celular (RUSSELL, J. A., 2006; TAKEDA; KAISHO; AKIRA, 2003; THijs; HACK, 1995) .

A grande produção de citocinas contribui com a ativação plaquetária e com lesões a células do endotélio vascular, podendo desencadear problemas com o extravasamento capilar e a coagulação intravascular disseminada (CID), com aumento de fatores pró-coagulantes e diminuição de anticoagulantes (ISKANDER, KENDRA N; OSUCHOWSKI, MARCIN F; STEARNS-KUROSAWA, DEBORAH J *et al.*, 2013; RUSSELL, JAMES A, 2006). A expressão do fator tecidual (FT) em células endoteliais e plaquetas dá início a cascata de coagulação (MARSHALL, 2001). A ativação em excesso da coagulação pode levar ao desenvolvimento de micro trombos capazes de

obstruir vasos de pequeno calibre, gerando uma situação de hipóxia, correlacionada com a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e morte eventual (OPAL; ESMON, 2002; RUSSELL, JAMES A, 2006).

A vasodilatação e o aumento da permeabilidade também são fatores que ocorrem devido ao estado inflamatório do hospedeiro em que há lesão do endotélio e liberação de óxido nítrico (NO), potente vasodilatador; dessa forma, além da liberação de citocinas, há o acúmulo de outras proteínas plasmáticas como quimiocinas, prostaglandinas e leucotrienos (JANEWAY JR, 2001; RUSSELL, J. A., 2006). O NO é produzido pela enzima NO sintase (NOS) que utiliza como substrato a L-arginina. São descritas três isoformas de NOS, a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS). Em resposta a mediadores inflamatórios e PAMPs a isoforma iNOS produz altos níveis de NO (ANDREAKIS; D'ANIELLO; ALBALAT *et al.*, 2010). Frente a infecção causada pela sepse o NO tem um papel importante na eliminação de agentes infecciosos, como bactérias, no entanto níveis exacerbados de NO prejudicam a migração de neutrófilos, que também são importantes contribuintes para resolução da infecção, além disso o NO pode causar lesões teciduais, contribuindo para a disfunção múltipla de órgãos (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000).

No desenvolvimento da sepse pode haver alterações no metabolismo de lipídeos, carboidratos e proteínas. O metabolismo anaeróbico e a hiperlactatemia são favorecidos pelo quadro de hipóxia decorrente da redução do débito cardíaco e pela diminuição do fluxo sanguíneo. A hipóxia tecidual é a principal responsável pela supressão metabólica no quadro de sepse, no entanto mesmo que não haja diminuição na oferta de oxigênio, pode haver uma falha na utilização dessa molécula em nível mitocondrial (O'BRIEN; KLA; HOPKINS *et al.*, 2007). Esse mecanismo foi denominado de hipóxia citopática, definindo então a baixa produção de adenosina trifosfato (ATP), ainda que os níveis de oxigênio dos tecidos estejam normais, ocorrendo tanto em pacientes quanto em modelos animais de sepse (CROUSER, 2004; FINK, 2000).

Mesmo com os estudos já realizados afim de estudar os mecanismos envolvidos na sepse, ela continua sendo um desafio à equipe médica e sua fisiopatologia ainda é pouco compreendida e as taxas de hospitalização continuam altas (CECCONI; EVANS; LEVY *et al.*, 2018). Para

elucidar os mecanismos associados a sepse e a resposta inflamatória sistêmica, diversos modelos experimentais animais precisaram ser desenvolvidos, afim de mimetizar as alterações que tipicamente ocorre em pacientes sépticos (RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007).

Neste trabalho utilizamos a técnica de sepse polimicrobiana induzida por ligação e punção do ceco (CLP), pois este procedimento é considerado padrão-ouro na pesquisa em sepse, pois é considerado um modelo realista desenvolvido a mais de 40 anos (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; DEITCH, 2005; REMICK; NEWCOMB; BOLGOS *et al.*, 2000; RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007; WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980). Como o ceco é uma fonte endógena de contaminação bacteriana, sua perfuração causa peritonite devido as bactérias ali presentes, então essas diversas bactérias atingem a corrente sanguínea. Este modelo quando aplicado em roedores, apresenta padrões de sintomas típicos semelhantes aos humanos, como hipotermia, taquicardia e taquipneia (RITTIRSCH; HUBER-LANG; FLIERL *et al.*, 2009). Uma das grandes vantagens deste modelo é que ele pode ser adaptado conforme a gravidade desejada, para investigação da sepse grave, moderada ou leve (RITTIRSCH; HUBER-LANG; FLIERL *et al.*, 2009). Tendo isso em vista, é importante que o procedimento de CLP seja realizado com alta consistência, para que os experimentos sejam confiáveis e reprodutíveis, para isso, detalhes como a região de ligadura do ceco, calibre da agulha e número de punções são informações determinantes (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; SINGLETON; WISCHMEYER, 2003).

1.4 PARADOXO DA OBESIDADE NA SEPSE

A obesidade tornou-se uma epidemia global com severas consequências na saúde pública, pois ela é um fator de risco estabelecido para diversas doenças, como doenças metabólicas, cardiovasculares, vários tipos de câncer e até saúde mental (CHOOI; DING; MAGKOS, 2019; DIXON, 2010; WHO, 2020). O sobrepeso e a obesidade estão associados a uma alta taxa de mortalidade, estando relacionados com 4 milhões de óbitos no ano de 2015, o

que representa aproximadamente 7,1% do total de mortes daquele ano (AFSHIN; FOROUZANFAR; REITSMA *et al.*, 2017).

O tratamento de pacientes obesos criticamente doentes é um desafio aos profissionais da saúde, pois existem diversas dificuldades observadas como prejuízos na oxigenação, suporte nutricional, obesidade associada a síndrome metabólica, farmacocinética alterada, maior risco de lesões renais e também maior probabilidade de complicações graves (DE JONG; VERZILLI; SEBBANE *et al.*, 2018). Avaliando todas essas intercorrências, é possível inferir que a obesidade influencia resultados de maneira negativa, piorando quadros que já são críticos. Em contrapartida, existem estudos que apresentam resultados contrários, como o estudo de OLIVEROS e VILLAMOR (2008) em que avaliaram a relação entre a mortalidade em pacientes obesos ou com sobrepeso, comparados a pacientes de peso normal, ambos gravemente enfermos e os resultados mostraram que pacientes obesos ou com sobrepeso apresentaram um menor índice de mortalidade.

Quando ocorre um melhor desempenho na recuperação de pacientes obesos em comparação a pacientes com peso normal, denomina-se “paradoxo da obesidade”, pois é considerado uma contradição, visto que acreditava-se que a obesidade agravasse doenças já críticas. Este fenômeno já foi descrito em diversas situações de doenças agudas e crônicas, como na sepse, síndrome do desconforto respiratório, insuficiência cardíaca e doença arterial coronariana (AKINNUSI; PINEDA; EL SOLH, 2008; CARBONE; CANADA; BILLINGSLEY *et al.*, 2019; KARAMPELA; CHRISTODOULATOS; DALAMAGA, 2019; NI; LUO; YU *et al.*, 2017; PEPPER; SUN; WELSH *et al.*, 2016).

É importante que a população almeje o peso ideal para cada biotipo, pois a obesidade é de fato um fator de risco para uma ampla gama de doenças, por esse motivo, é importante que a redução da obesidade a nível global na população seja uma importante medida preventiva. No entanto, uma vez que doenças específicas estejam estabelecidas, a obesidade pode não ser mais um fator agravante, mas sim protetor (KARAMPELA; CHRYSANTHOPOULOU; CHRISTODOULATOS *et al.*, 2020).

Atualmente não se têm evidências suficientes que expliquem totalmente o “paradoxo da obesidade”, por esse motivo é necessário mais estudo acerca deste assunto, mas existem algumas possíveis explicações sobre as alterações imunológicas, metabólicas e endócrinas do tecido adiposo em pacientes obesos em estado crítico. O tecido adiposo é considerado o maior órgão endócrino do corpo, tendo em vista a massa de gordura corporal total, sendo capaz de produzir diversas moléculas bioativas, denominadas de adipocinas, que exercem funções endócrinas, parácrinas e autócrinas (KERSHAW; FLIER, 2004; OUCHI; PARKER; LUGUS *et al.*, 2011). Dentre as outras substâncias secretadas pelo tecido adiposo, encontram-se hormônios, citocinas, quimiocinas, proteínas do sistema complemento, coagulação e fibrinólise, fatores de crescimento e enzimas que estão envolvidas na síntese de esteroides (WANG; MARIMAN; RENES *et al.*, 2008).

Quando o tecido adiposo se encontra disfuncional, tem como consequência a desregulação metabólica. Doenças críticas também causam alterações morfológicas e funcionais no tecido adiposo e durante este processo pode haver perda de massa muscular severa, no entanto, o tecido adiposo é preservado, há aumento no número de adipócitos de menor tamanho, recém diferenciados, e a infiltração por macrófagos é aumentada (LANGOUCHE; PERRE; THIESSEN *et al.*, 2010). Nesse momento também aumenta a capacidade dos adipócitos em captar e metabolizar a glicose, e armazenar triglicerídeos, atenuando os efeitos prejudiciais ao metabolismo (LANGOUCHE; PERRE; THIESSEN *et al.*, 2010).

Os macrófagos presentes no tecido adiposo também sofrem uma mudança do fenótipo M1 para M2, ou seja, ocorre uma mudança no perfil inflamatório dessas células do sistema imunológico inato, atenuando o estado inflamatório exercido pelo fenótipo M1 e um estado anti-inflamatório característico de macrófagos M2, além disso eles oferecem outras ações protetoras, como aumento da capacidade fagocítica, sensibilização à insulina e remodelação do tecido (GORDON; MARTINEZ, 2010; LANGOUCHE; MARQUES; INGELS *et al.*, 2011; MARQUES; LANGOUCHE, 2013).

No decorrer do estabelecimento da obesidade não ocorre somente uma expansão e acúmulo de gordura. O tecido adiposo passa por

diversas alterações celulares e estruturais, processo denominado remodelação, em que ocorre hipertrofia e hiperplasia de adipócitos, adaptação da matriz extracelular, expansão da vasculatura e infiltração de células inflamatórias, resultando em disfunção do tecido adiposo, caracterizada pela capacidade limitada de armazenar lipídios, expressão alterada de adipocinas, inflamação crônica e fibrose (PELLEGRINELLI; CAROBBIO; VIDAL-PUIG, 2016; SUN; TORDJMAN; CLÉMENT *et al.*, 2013).

Outros mecanismos envolvidos na fisiopatologia do “paradoxo da obesidade”, que supostamente apresentam efeitos protetores sobre doenças críticas, podem envolver maior reserva de energia (MITTWEDE; CLEMMER; BERGIN *et al.*, 2016), mediadores anti-inflamatórios (HILLENBRAND; XU; ZHOU *et al.*, 2016; KORDONOWY; BURG; LENOX *et al.*, 2012; TORPY; BORNSTEIN; CHROUSOS, 1998), lipoproteínas de ligação de endotoxinas (CHIEN; JERNG; YU *et al.*, 2005), síntese de esteroides adrenais (LI; PAPADOPOULOS; VIHMA, 2015), ativação do sistema renina-angiotensina (KALUPAHANA; MOUSTAID-MOUSSA, 2012; YVAN-CHARVET; QUIGNARD-BOULANGÉ, 2011) e cardioproteção (HASTIE; PADMANABHAN; SLACK *et al.*, 2010), e também a preservação da força muscular (VANHOREBEEK; VAN DEN BERGHE, 2004). Os mecanismos propostos atualmente acerca do “paradoxo da obesidade” em doenças críticas são baseados em estudos experimentais e também estudos clínicos, no entanto, ainda não se pode explicar totalmente os eventos envolvidos nesse fenômeno (KARAMPELA; CHRYSANTHOPOULOU; CHRISTODOULATOS *et al.*, 2020).

1.5 MODELO DE INDUÇÃO DA SM POR GLUTAMATO MONOSSÓDICO (MSG)

A obesidade e a SM estão entre as principais causas de morbimortalidade mundial e apesar disso, seus mecanismos patogênicos ainda não estão completamente esclarecidos (HARWOOD; LISTRANI; WAGNER, 2012). Dessa maneira existe a necessidade de novos estudos acerca desse assunto, sendo fundamental o desenvolvimento de métodos de pesquisa afim de elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da obesidade e da SM. O uso de modelos animais na pesquisa é de grande importância por abranger todo

um metabolismo, no entanto, existem limitações como por exemplo a dificuldade de aplicar os achados em pesquisas realizadas com animais para os humanos, pois existem diferenças genéticas e fisiológicas importantes e devido a isso os resultados encontrados em animais podem diferir em estudos em humanos (NILSSON; RAUN; YAN *et al.*, 2012; VARGA; HARANGI; OLSSON *et al.*, 2010). Neste contexto, é necessário a escolha de um modelo experimental animal com a máxima semelhança com os encontrados em pacientes humanos (NILSSON; RAUN; YAN *et al.*, 2012).

Existem diversos modelos animais para o estudo da obesidade e síndrome metabólica, como modificações genéticas, uso de fármacos e dietas específicas. Modelos animais que tenham semelhanças com a forma em que ocorre em humanos ajudam a compreender a fisiopatologia dessas condições (FUCHS; LOUREIRO; MACEDO *et al.*, 2018). Pequenos roedores, como ratos e camundongos são modelos animais amplamente utilizados no estudo de distúrbios metabólicos (HERBERG; COLEMAN, 1977; REES; ALCOLADO, 2005). A fisiologia de pequenos roedores é próxima dos humanos, apresentam pequeno porte, têm alta reprodução (6-12 filhotes por ninhada), têm ciclo reprodutivo curto e atinge a maturidade sexual dentro de 4 a 8 semanas após o nascimento, por esses motivos tem-se utilizado cada vez mais modelos em camundongos (KLEINERT; CLEMMENSEN; HOFMANN *et al.*, 2018).

Neste trabalho escolhemos o modelo de síndrome metabólica induzido pela administração neonatal de MSG em camundongos Swiss, pois este modelo experimental associa o aumento da atividade parassimpática, hiperinsulinemia, obesidade, dislipidemia, aumento da gordura visceral e aumento da pressão arterial, que são semelhantes à características encontradas na SM (HERNÁNDEZ-BAUTISTA; ALARCÓN-AGUILAR; ESCOBAR-VILLANUEVA *et al.*, 2014; LUCCHETTI; BOARETTO; LOPES *et al.*, 2019; PELANTOVÁ; BÁRTOVÁ; ANÝŽ *et al.*, 2016).

Em camundongos, a injeção neonatal de MSG causa neurotoxicidade em áreas do hipotálamo (JIN; CAO; BIAN *et al.*, 2015; YULYANINGSIH; RUDENKO; VALDEARCOS *et al.*, 2017). Altas doses de MSG apresentam ações neurotóxicas principalmente no núcleo arqueado

hipotalâmico (ARC), causando principalmente necrose neuronal, que nesta região está envolvida na regulação da homeostase metabólica, leva a diversas alterações neuroendócrinas (MA; YU; MA *et al.*, 2007). O ARC é uma região do SNC relacionada com a ingestão de alimentos, devido a lesão os animais têm comportamento hipofágico e características físicas como atraso no crescimento, pois ocorre diminuição da secreção do hormônio de crescimento (COLLISON; MAKHOUL; ZAIDI *et al.*, 2012; OLNEY, 1969). Os efeitos tóxicos do MSG no SNC não se aplicam a humanos porque existem fatores como idade, via de administração e dose que são diferentes. A toxicidade do MSG ocorre em camundongos após a aplicação em neonatos, pois a barreira hematoencefálica não está completamente formada, assim ocorre a passagem diretamente para o SNC (YULYANINGSIH; RUDENKO; VALDEARCOS *et al.*, 2017).

2 JUSTIFICATIVA

Diante da severidade encontrada em casos de pacientes com sepse, da alta incidência e por continuar sendo uma das principais causas de morte no mundo, é considerada pela OMS um problema de saúde pública e uma prioridade de saúde global. Assim como há dificuldade em diagnosticar com rapidez, ainda não há tratamentos que sejam considerados completamente eficientes. Somam-se a isso o aumento na incidência da obesidade e SM atualmente, na população em geral e em pacientes críticos. A obesidade está relacionada com um estado crônico de inflamação de baixo grau sendo também um importante fator de risco para diversas doenças, estando associado a maior mortalidade.

A obesidade como fator agravante ou de melhor prognóstico para a sepse ainda é motivo de controvérsia, pois, alguns estudos prévios demonstraram que obesos podem apresentar melhor prognóstico em doenças críticas, incluindo a sepse, do que indivíduos não obesos. Neste contexto, este trabalho avaliou a sobrevida, produção de NO, parâmetros cardiovasculares e perfil hematológico em camundongos controle e com SM, que foram submetidos a indução da sepse polimicrobiana moderada através do método de ligadura e punção cecal.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da síndrome metabólica em camundongos submetidos a sepse polimicrobiana moderada induzida por ligadura e punção do ceco (CLP).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Validar o modelo de indução da SM em camundongos obesos MSG;
- Estabelecer a sepse moderada em camundongos Swiss machos, através do método de CLP;
- Determinar a influência da SM na taxa de mortalidade no modelo de sepse moderada em camundongos e analisar as alterações causadas pela SM por meio da quantificação de óxido nítrico (NO), parâmetros cardiovasculares e hematológicos em camundongos submetidos a CLP moderada.

REFERÊNCIAS

AFSHIN, A.; FOROUZANFAR, M.; REITSMA, M.; SUR, P. *et al.* Health effects of overweight and obesity in 195 countries over 25 years: The GBD 2015 Obesity Collaborators. **N Engl J Med**, 377, n. 1, p. 13-27, 2017.

AITLHADJ, L.; AVILA, D. S.; BENEDETTO, A.; ASCHNER, M. *et al.* Environmental exposure, obesity, and Parkinson's disease: lessons from fat and old worms. **Environ Health Perspect**, 119, n. 1, p. 20-28, Jan 2011.

AKINNUSI, M. E.; PINEDA, L. A.; EL SOLH, A. A. Effect of obesity on intensive care morbidity and mortality: a meta-analysis. **Critical care medicine**, 36, n. 1, p. 151-158, 2008.

ANDREAKIS, N.; D'ANIELLO, S.; ALBALAT, R.; PATTI, F. P. *et al.* Evolution of the Nitric Oxide Synthase Family in Metazoans. **Molecular Biology and Evolution**, 28, n. 1, p. 163-179, 2010.

ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical care medicine**, 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001.

BARROSO, W. K. S.; RODRIGUES, C. I. S.; BORTOLOTTI, L. A.; MOTA-GOMES, M. A. *et al.* Brazilian guidelines of hypertension–2020. 116, p. 516-658, 2021.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. d. Q. Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, 182, n. 1, p. 214-223, 2000.

BLACK, R. E.; COUSENS, S.; JOHNSON, H. L.; LAWN, J. E. *et al.* Global, regional, and national causes of child mortality in 2008: a systematic analysis. **The lancet**, 375, n. 9730, p. 1969-1987, 2010.

BONE, R.; BALK, R.; CERRA, F.; DELLINGER, R. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. 1992. **Chest**, 136, n. 5 Suppl, 2009.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Annals of internal medicine**, 115, n. 6, p. 457-469, 1991.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, 112, n. 1, p. 235-244, 1997.

BRAUN, D. A Retrospective Review of the Sepsis Definition after Publication of Sepsis-3. **Am J Med**, 132, n. 3, p. 382-384, Mar 2019.

BRAY, G. A.; KIM, K. K.; WILDING, J. P. H. Obesity: a chronic relapsing progressive disease process. A position statement of the World Obesity Federation. **Obes Rev**, 18, n. 7, p. 715-723, Jul 2017.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**, 4, n. 10, p. 854-865, Oct 2005.

CARBONE, S.; CANADA, J. M.; BILLINGSLEY, H. E.; SIDDIQUI, M. S. *et al.* Obesity paradox in cardiovascular disease: where do we stand? **Vascular health and risk management**, 15, p. 89, 2019.

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

CECCONI, M.; EVANS, L.; LEVY, M.; RHODES, A. Sepsis and septic shock. **The Lancet**, 2018.

CHIEN, J.-Y.; JERNG, J.-S.; YU, C.-J.; YANG, P.-C. Low serum level of high-density lipoprotein cholesterol is a poor prognostic factor for severe sepsis. **Critical care medicine**, 33, n. 8, p. 1688-1693, 2005.

CHIU, C.; LEGRAND, M. Epidemiology of sepsis and septic shock. **Curr Opin Anaesthesiol**, 34, n. 2, p. 71-76, Apr 1 2021.

CHOOI, Y. C.; DING, C.; MAGKOS, F. The epidemiology of obesity. **Metabolism**, 92, p. 6-10, 2019.

CHURPEK, M. M.; SNYDER, A.; HAN, X.; SOKOL, S. *et al.* Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment, Systemic Inflammatory Response Syndrome, and Early Warning Scores for Detecting Clinical Deterioration in Infected Patients outside the Intensive Care Unit. **Am J Respir Crit Care Med**, 195, n. 7, p. 906-911, Apr 1 2017.

CINTI, S. Adipose Organ Development and Remodeling. **Compr Physiol**, 8, n. 4, p. 1357-1431, Sep 14 2018.

COLLISON, K. S.; MAKHOUL, N. J.; ZAIDI, M. Z.; AL-RABIAH, R. *et al.* Interactive effects of neonatal exposure to monosodium glutamate and aspartame on glucose homeostasis. **Nutrition & metabolism**, 9, n. 1, p. 1-13, 2012.

CROUSER, E. D. Mitochondrial dysfunction in septic shock and multiple organ dysfunction syndrome. **Mitochondrion**, 4, n. 5-6, p. 729-741, 2004.

CSONGRÁDI, É.; KÁPLÁR, M.; NAGY, B., Jr.; KOCH, C. A. *et al.* Adipokines as atherothrombotic risk factors in obese subjects: Associations with haemostatic markers and common carotid wall thickness. **Nutr Metab Cardiovasc Dis**, 27, n. 6, p. 571-580, Jun 2017.

DANIELE, G.; GUARDADO MENDOZA, R.; WINNIER, D.; FIORENTINO, T. V. *et al.* The inflammatory status score including IL-6, TNF- α , osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. **Acta Diabetol**, 51, n. 1, p. 123-131, Feb 2014.

DE JONG, A.; VERZILLI, D.; SEBBANE, M.; MONNIN, M. *et al.* Medical versus surgical ICU obese patient outcome: a propensity-matched analysis to resolve clinical trial controversies. **Critical care medicine**, 46, n. 4, p. e294-e301, 2018.

DE MARCHI, P. N.; GUIMARÃES-OKAMOTO, P. T. C.; MELCHERT, A.; RIBEIRO, J. F. A. *et al.* Síndrome metabólica: relação entre obesidade, resistência insulínica e hipertensão arterial sistêmica nos pequenos animais. **Veterinária e zootecnia**, 23, n. 2, p. 184-191, 2016.

DEITCH, E. A. J. S. Rodent models of intra-abdominal infection. 24, p. 19-23, 2005.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; ANNANE, D. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive care medicine**, 39, n. 2, p. 165-228, 2013.

DIXON, J. B. The effect of obesity on health outcomes. **Mol Cell Endocrinol**, 316, n. 2, p. 104-108, Mar 25 2010.

DREWA, A.; ZORENA, K. [Prevention of overweight and obesity in children and adolescents in European countries]. **Pediatr Endocrinol Diabetes Metab**, 23, n. 3, p. 152-158, 2017.

FINK, M. Cytopathic hypoxia. A concept to explain organ dysfunction in sepsis. **Minerva anesthesiologica**, 66, n. 5, p. 337-342, 2000.

FLEISCHMANN, C.; SCHERAG, A.; ADHIKARI, N. K.; HARTOG, C. S. *et al.* Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis. Current

estimates and limitations. **American journal of respiratory and critical care medicine**, 193, n. 3, p. 259-272, 2016.

FROY, O.; GARAULET, M. The Circadian Clock in White and Brown Adipose Tissue: Mechanistic, Endocrine, and Clinical Aspects. **Endocr Rev**, 39, n. 3, p. 261-273, Jun 1 2018.

FUCHS, T.; LOUREIRO, M. d. P.; MACEDO, L. E.; NOCCA, D. *et al.* Modelos animais na síndrome metabólica. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, 45, n. 5, 2018.

GAIESKI, D. F.; EDWARDS, J. M.; KALLAN, M. J.; CARR, B. G. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Critical care medicine**, 41, n. 5, p. 1167-1174, 2013.

GORDON, S.; MARTINEZ, F. O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, 32, n. 5, p. 593-604, 2010.

HALL, M. E.; HALL, J. E. Pathogenesis of hypertension. **Hypertension: A Companion to Braunwald's Heart Disease E-Book**. Philadelphia: Elsevier, p. 33-51, 2017.

HARWOOD, H. J., Jr.; LISTRANI, P.; WAGNER, J. D. Nonhuman primates and other animal models in diabetes research. **J Diabetes Sci Technol**, 6, n. 3, p. 503-514, May 1 2012.

HASTIE, C. E.; PADMANABHAN, S.; SLACK, R.; PELL, A. C. *et al.* Obesity paradox in a cohort of 4880 consecutive patients undergoing percutaneous coronary intervention. **European heart journal**, 31, n. 2, p. 222-226, 2010.

HERBERG, L.; COLEMAN, D. L. Laboratory animals exhibiting obesity and diabetes syndromes. **Metabolism**, 26, n. 1, p. 59-99, 1977.

HERNÁNDEZ-BAUTISTA, R. J.; ALARCÓN-AGUILAR, F. J.; ESCOBAR-VILLANUEVA, D. C.; ALMANZA-PÉREZ, J. C. *et al.* Biochemical alterations during the obese-aging process in female and male monosodium glutamate (MSG)-treated mice. **International journal of molecular sciences**, 15, n. 7, p. 11473-11494, 2014.

HILLENBRAND, A.; XU, P.; ZHOU, S.; BLATZ, A. *et al.* Circulating adipokine levels and prognostic value in septic patients. **Journal of Inflammation**, 13, n. 1, p. 1-7, 2016.

HOGUE, C. W.; STEARNS, J. D.; COLANTUONI, E.; ROBINSON, K. A. *et al.* The impact of obesity on outcomes after critical illness: a meta-analysis. **Intensive care medicine**, 35, n. 7, p. 1152-1170, 2009.

ISKANDER, K. N.; OSUCHOWSKI, M. F.; STEARNS-KUROSAWA, D. J.; KUROSAWA, S. *et al.* Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. **Physiol Rev**, 93, n. 3, p. 1247-1288, Jul 2013.

ISKANDER, K. N.; OSUCHOWSKI, M. F.; STEARNS-KUROSAWA, D. J.; KUROSAWA, S. *et al.* Sepsis: multiple abnormalities, heterogeneous responses, and evolving understanding. **Physiological reviews**, 93, n. 3, p. 1247-1288, 2013.

IWASHYNA, T. J.; ELY, E. W.; SMITH, D. M.; LANGA, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. **Jama**, 304, n. 16, p. 1787-1794, Oct 27 2010.

JANEWAY JR, C. A. How the immune system protects the host from infection. **Microbes and infection**, 3, n. 13, p. 1167-1171, 2001.

JIN, D.; SUN, J.; HUANG, J.; HE, Y. *et al.* TNF- α reduces g0s2 expression and stimulates lipolysis through PPAR- γ inhibition in 3T3-L1 adipocytes. **Cytokine**, 69, n. 2, p. 196-205, Oct 2014.

JIN, Y. J.; CAO, P. J.; BIAN, W. H.; LI, M. E. *et al.* BDNF levels in adipose tissue and hypothalamus were reduced in mice with MSG-induced obesity. **Nutritional neuroscience**, 18, n. 8, p. 376-382, 2015.

KALUPAHANA, N. S.; MOUSTAID-MOUSSA, N. The adipose tissue renin-angiotensin system and metabolic disorders: a review of molecular mechanisms. **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, 47, n. 4, p. 379-390, 2012.

KALVØY, H.; SAUTER, A. R. Detection of intraneural needle-placement with multiple frequency bioimpedance monitoring: a novel method. 30, n. 2, p. 185-192, Apr 2016.

KARAMPELA, I.; CHRISTODOULATOS, G. S.; DALAMAGA, M. The Role of Adipose Tissue and Adipokines in Sepsis: Inflammatory and Metabolic Considerations, and the Obesity Paradox. **Current Obesity Reports**, 8, n. 4, p. 434-457, 2019/12/01 2019.

KARAMPELA, I.; CHRYSANTHOPOULOU, E.; CHRISTODOULATOS, G. S.; DALAMAGA, M. Is There an Obesity Paradox in Critical Illness? Epidemiologic

and Metabolic Considerations. **Current Obesity Reports**, 9, n. 3, p. 231-244, 2020/09/01 2020.

KERSHAW, E. E.; FLIER, J. S. Adipose tissue as an endocrine organ. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, 89, n. 6, p. 2548-2556, 2004.

KLEINERT, M.; CLEMMENSEN, C.; HOFMANN, S. M.; MOORE, M. C. *et al.* Animal models of obesity and diabetes mellitus. **Nature Reviews Endocrinology**, 14, n. 3, p. 140-162, 2018/03/01 2018.

KORDONOWY, L. L.; BURG, E.; LENOX, C. C.; GAUTHIER, L. M. *et al.* Obesity is associated with neutrophil dysfunction and attenuation of murine acute lung injury. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, 47, n. 1, p. 120-127, 2012.

KOSKA, J.; ORTEGA, E.; BOGARDUS, C.; KRAKOFF, J. *et al.* The effect of insulin on net lipid oxidation predicts worsening of insulin resistance and development of type 2 diabetes mellitus. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, 293, n. 1, p. E264-269, Jul 2007.

KUMAR, G.; KUMAR, N.; TANEJA, A.; KALEEKAL, T. *et al.* Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000–2007). **Chest**, 140, n. 5, p. 1223-1231, 2011.

LAGU, T.; ROTHBERG, M. B.; SHIEH, M.-S.; PEKOW, P. S. *et al.* Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Critical care medicine**, 40, n. 3, p. 754-761, 2012.

LANGOUCHE, L.; MARQUES, M. B.; INGELS, C.; GUNST, J. *et al.* Critical illness induces alternative activation of M2 macrophages in adipose tissue. **Critical Care**, 15, n. 5, p. 1-9, 2011.

LANGOUCHE, L.; PERRE, S. V.; THIESSEN, S.; GUNST, J. *et al.* Alterations in adipose tissue during critical illness: An adaptive and protective response? **Am J Respir Crit Care Med**, 182, n. 4, p. 507-516, Aug 15 2010.

LEE, M. W.; LEE, M.; OH, K. J. Adipose Tissue-Derived Signatures for Obesity and Type 2 Diabetes: Adipokines, Batokines and MicroRNAs. **J Clin Med**, 8, n. 6, Jun 14 2019.

LEVY, M. M.; ARTIGAS, A.; PHILLIPS, G. S.; RHODES, A. *et al.* Outcomes of the Surviving Sepsis Campaign in intensive care units in the USA and Europe: a prospective cohort study. **The Lancet infectious diseases**, 12, n. 12, p. 919-924, 2012.

LEVY, M. M.; EVANS, L. E.; RHODES, A. The Surviving Sepsis Campaign Bundle: 2018 update. **Intensive Care Medicine**, 44, n. 6, p. 925-928, June 01 2018. journal article.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, 29, n. 4, p. 530-538, Apr 2003.

LI, J.; PAPADOPOULOS, V.; VIHMA, V. Steroid biosynthesis in adipose tissue. **Steroids**, 103, p. 89-104, 2015.

LIU, V.; ESCOBAR, G. J.; GREENE, J. D.; SOULE, J. *et al.* Hospital deaths in patients with sepsis from 2 independent cohorts. **Jama**, 312, n. 1, p. 90-92, 2014.

LUCCHETTI, B. F. C.; BOARETTO, N.; LOPES, F. N. C.; MALVEZI, A. D. *et al.* Metabolic syndrome aggravates cardiovascular, oxidative and inflammatory dysfunction during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Scientific Reports**, 9, n. 1, p. 18885, 2019/12/11 2019.

LUFT, F. C. Twins in cardiovascular genetic research. **Hypertension**, 37, n. 2 Pt 2, p. 350-356, Feb 2001.

MA, J.; YU, L.-J.; MA, R.-D.; ZHANG, Y.-P. *et al.* Repair of glutamate-induced excitotoxic neuronal damage mediated by intracerebroventricular transplantation of neural stem cells in adult mice. **Neuroscience bulletin**, 23, n. 4, p. 209-214, 2007.

MARQUES, M. B.; LANGOUCHE, L. Endocrine, metabolic, and morphologic alterations of adipose tissue during critical illness. **Critical care medicine**, 41, n. 1, p. 317-325, 2013.

MARSHALL, J. C. Inflammation, coagulopathy, and the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. **Critical care medicine**, 29, n. 7, p. S99-S106, 2001.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, 5, n. 1, p. 4-11, 2014.

MITTWEDE, P. N.; CLEMMER, J. S.; BERGIN, P. F.; XIANG, L. Obesity and critical illness: insights from animal models. **Shock (Augusta, Ga.)**, 45, n. 4, p. 349, 2016.

NEIRA, R. A. Q.; HAMACHER, S.; JAPIASSÚ, A. M. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PloS one**, 13, n. 4, p. e0195873, 2018.

NI, Y.-N.; LUO, J.; YU, H.; WANG, Y.-W. *et al.* Can body mass index predict clinical outcomes for patients with acute lung injury/acute respiratory distress syndrome? A meta-analysis. **Critical Care**, 21, n. 1, p. 36, 2017/02/22 2017.

NIETO-VAZQUEZ, I.; FERNÁNDEZ-VELEDO, S.; KRÄMER, D. K.; VILA-BEDMAR, R. *et al.* Insulin resistance associated to obesity: the link TNF-alpha. **Arch Physiol Biochem**, 114, n. 3, p. 183-194, Jul 2008.

NILSSON, C.; RAUN, K.; YAN, F.-f.; LARSEN, M. O. *et al.* Laboratory animals as surrogate models of human obesity. **Acta Pharmacologica Sinica**, 33, n. 2, p. 173-181, 2012.

O'BRIEN, J.; KLA, K. M.; HOPKINS, I. B.; MALECKI, E. A. *et al.* Kinetic parameters and lactate dehydrogenase isozyme activities support possible lactate utilization by neurons. **Neurochemical research**, 32, n. 4-5, p. 597-607, 2007.

OLIVEROS, H.; VILLAMOR, E. Obesity and mortality in critically ill adults: a systematic review and meta-analysis. **Obesity**, 16, n. 3, p. 515, 2008.

OLNEY, J. W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, 164, n. 3880, p. 719-721, 1969.

OPAL, S. M.; ESMON, C. T. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. **Critical Care**, 7, n. 1, p. 23, 2002.

OPARIL, S.; ACELAJADO, M. C.; BAKRIS, G. L.; BERLOWITZ, D. R. *et al.* Hypertension. **Nat Rev Dis Primers**, 4, p. 18014, Mar 22 2018.

OUCHI, N.; PARKER, J. L.; LUGUS, J. J.; WALSH, K. Adipokines in inflammation and metabolic disease. **Nature reviews immunology**, 11, n. 2, p. 85-97, 2011.

PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **New England Journal of Medicine**, 328, n. 20, p. 1471-1477, 1993.

PELANTOVÁ, H.; BÁRTOVÁ, S.; ANÝŽ, J.; HOLUBOVÁ, M. *et al.* Metabolomic profiling of urinary changes in mice with monosodium glutamate-induced obesity. **Analytical and bioanalytical chemistry**, 408, n. 2, p. 567-578, 2016.

PELLEGRINELLI, V.; CAROBBIO, S.; VIDAL-PUIG, A. Adipose tissue plasticity: how fat depots respond differently to pathophysiological cues. **Diabetologia**, 59, n. 6, p. 1075-1088, 2016.

PEPPER, D. J.; SUN, J.; WELSH, J.; CUI, X. *et al.* Increased body mass index and adjusted mortality in ICU patients with sepsis or septic shock: a systematic review and meta-analysis. **Critical Care**, 20, n. 1, p. 1-10, 2016.

PHYSICIANS, A. C. o. C.; COMMITTEE, S. o. C. C. M. C. C. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med**, 20, p. 864-874, 1992.

REES, D.; ALCOLADO, J. Animal models of diabetes mellitus. **Diabetic medicine**, 22, n. 4, p. 359-370, 2005.

REINHART, K.; DANIELS, R.; KISSOON, N.; MACHADO, F. R. *et al.* Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. **N Engl J Med**, 377, n. 5, p. 414-417, Aug 3 2017.

REMICK, D. G.; NEWCOMB, D. E.; BOLGOS, G. L.; CALL, D. R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, 13, n. 2, p. 110-116, Feb 2000.

RHODES, A.; FERDINANDE, P.; FLAATTEN, H.; GUIDET, B. *et al.* The variability of critical care bed numbers in Europe. **Intensive care medicine**, 38, n. 10, p. 1647-1653, 2012.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **J Leukoc Biol**, 81, n. 1, p. 137-143, Jan 2007.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M. S.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc**, 4, n. 1, p. 31-36, 2009.

ROCHLANI, Y.; POTHINENI, N. V.; KOVELAMUDI, S.; MEHTA, J. L. Metabolic syndrome: pathophysiology, management, and modulation by natural compounds. **Therapeutic advances in cardiovascular disease**, 11, n. 8, p. 215-225, 2017.

RUDD, K. E.; JOHNSON, S. C.; AGESA, K. M.; SHACKELFORD, K. A. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet**, 395, n. 10219, p. 200-211, Jan 18 2020.

RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **N Engl J Med**, 355, n. 16, p. 1699-1713, Oct 19 2006.

RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **New England Journal of Medicine**, 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. **Eur Surg Res**, 35, n. 6, p. 486-491, Nov-Dec 2003.

SOGAYAR, A. M.; MACHADO, F. R.; REA-NETO, A.; DORNAS, A. *et al.* A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, 26, n. 5, p. 425-434, 2008.

SOOKOIAN, S.; GARCÍA, S. I.; GIANOTTI, T. F.; DIEUZEIDE, G. *et al.* The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor-alpha gene is associated with hypertension in adolescents harboring the metabolic syndrome. **Am J Hypertens**, 18, n. 10, p. 1271-1275, Oct 2005.

STOLLER, J.; HALPIN, L.; WEIS, M.; APLIN, B. *et al.* Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. **Journal of critical care**, 31, n. 1, p. 58-62, 2016.

SUN, K.; TORDJMAN, J.; CLÉMENT, K.; SCHERER, P. E. Fibrosis and adipose tissue dysfunction. **Cell metabolism**, 18, n. 4, p. 470-477, 2013.

TAKEDA, K.; KAISHO, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors. **Annual review of immunology**, 21, n. 1, p. 335-376, 2003.

THIJS, L.; HACK, C. Time course of cytokine levels in sepsis. **Intensive care medicine**, 21, n. 2, p. S258-S263, 1995.

TIRU, B.; DININO, E. K.; ORENSTEIN, A.; MAILLOUX, P. T. *et al.* The economic and humanistic burden of severe sepsis. **Pharmacoeconomics**, 33, n. 9, p. 925-937, 2015.

TORPY, D.; BORNSTEIN, S.; CHROUSOS, G. Leptin and interleukin-6 in sepsis. **Hormone and Metabolic Research**, 30, n. 12, p. 726-729, 1998.

VANHOREBEEK, I.; VAN DEN BERGHE, G. Hormonal and metabolic strategies to attenuate catabolism in critically ill patients. **Current opinion in pharmacology**, 4, n. 6, p. 621-628, 2004.

VARGA, O.; HARANGI, M.; OLSSON, I.; HANSEN, A. K. Contribution of animal models to the understanding of the metabolic syndrome: a systematic overview. **Obesity Reviews**, 11, n. 11, p. 792-807, 2010.

VINCENT, J. L.; MORENO, R.; TAKALA, J.; WILLATTS, S. *et al.* The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. **Intensive Care Med**, 22, n. 7, p. 707-710, Jul 1996.

WANG, P.; MARIMAN, E.; RENES, J.; KEIJER, J. The secretory function of adipocytes in the physiology of white adipose tissue. **Journal of cellular physiology**, 216, n. 1, p. 3-13, 2008.

WEISBERG, S. P.; MCCANN, D.; DESAI, M.; ROSENBAUM, M. *et al.* Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. **J Clin Invest**, 112, n. 12, p. 1796-1808, Dec 2003.

WHO, W. H. O. Obesity: preventing and managing the global epidemic. 2000.

WHO, W. H. O. **Obesity and overweight**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/obesity-and-overweight>. Acesso em: April 5th.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, 29, n. 2, p. 189-201, Aug 1980.

WOFFORD, M. R.; HALL, J. E. Pathophysiology and treatment of obesity hypertension. **Curr Pharm Des**, 10, n. 29, p. 3621-3637, 2004.

XU, H.; BARNES, G. T.; YANG, Q.; TAN, G. *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **J Clin Invest**, 112, n. 12, p. 1821-1830, Dec 2003.

YULYANINGSIH, E.; RUDENKO, I. A.; VALDEARCOS, M.; DAHLÉN, E. *et al.* Acute lesioning and rapid repair of hypothalamic neurons outside the blood-brain barrier. **Cell reports**, 19, n. 11, p. 2257-2271, 2017.

YVAN-CHARVET, L.; QUIGNARD-BOULANGÉ, A. Role of adipose tissue renin–angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity. **Kidney international**, 79, n. 2, p. 162-168, 2011.

ZELEZNA, B.; MAIXNEROVA, J.; MATYSKOVA, R.; HAUGVICOVA, R. *et al.* Anorexigenic effect of cholecystinin is lost but that of CART (Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript) peptide is preserved in monosodium glutamate obese mice. **Physiol Res**, 58, n. 5, p. 717-723, 2009.

ANEXO A

Este trabalho foi realizado na Universidade Estadual de Londrina e originou um artigo científico e intitula-se: “Metabolic syndrome improves cardiovascular dysfunction and survival in CLP-induced mild sepsis”.

Metabolic syndrome improves cardiovascular dysfunction and survival in CLP-induced mild sepsis in mice

Raquel Pires Nakama^a, Aparecida Donizette Malvezi^a, Maria Isabel Lovo-Martins^a, Lucas Felipe dos Santos^b, Ana Paula Canizares Cardoso^a, Gustavo Scacco^c, Andressa de Freitas Mendes Dionísio^c, Marli Cardoso Martins-Pinge^c, Phileo Pinge Filho^{a,b*}

^a *Postgraduate Program in Experimental Pathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.*

^b *Postgraduate Program in Microbiology, Department of Microbiology, State University of Londrina, Paraná, Brazil.*

^c *Postgraduate Program in Physiological Sciences, Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.*

*Corresponding author: Phileo Pinge-Filho Ph.D., Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brazil. E-mail address: pingefilho@uel.br (Pinge-Filho, P.), Tel: + 55 43 3371-4978.

Metabolic syndrome improves cardiovascular dysfunction and survival during cecal ligation and puncture-induced mild sepsis in mice

Raquel Pires Nakama^a, Aparecida Donizette Malvezi^a, Maria Isabel Lovo-Martins^a, Lucas Felipe dos Santos^b, Ana Paula Canizares Cardoso^a, Gustavo Scacco^c, Andressa de Freitas Mendes Dionísio^c, Marli Cardoso Martins-Pinge^c, Phileno Pinge-Filho^{a,b*}

^a *Postgraduate Program in Experimental Pathology, Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Paraná, Brazil.*

^b *Postgraduate Program in Microbiology, Department of Microbiology, State University of Londrina, Paraná, Brazil.*

^c *Postgraduate Program in Physiological Sciences, Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.*

*Corresponding author: Phileno Pinge-Filho Ph.D., Laboratório de Imunopatologia Experimental, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, CEP: 86051-970, Londrina, Paraná, Brazil. E-mail address: pingefilho@uel.br (Pinge-Filho, P.), Tel: + 55 43 3371-4978.

Abstract

Aims: Sepsis is a potentially fatal systemic inflammatory response and its underlying pathophysiology is still poorly understood. Studies suggest that obesity, a component of metabolic syndrome (MS), is associated with sepsis survival. Therefore, this study focused on investigating the influence of MS on mortality and cardiovascular dysfunction induced by sublethal cecal ligation and puncture (SL-CLP).

Main methods: Newborn Swiss mice received monosodium glutamate (MSG) ($4 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$, s.c.) during the first 5 d of life for MS induction, while the control pups received equimolar saline solution. On the 75th day, SL-CLP was used to induce mild sepsis (M-CLP) in the MS (MS-M-CLP) and control (SAL-M-CLP) mice. The effect of MS on sepsis in mice was assessed by determining the survival rate and quantification of nitric oxide (NO) in the plasma, and associating this data with hematological and cardiovascular parameters.

Key findings: MS improved the survival of septic mice, preventing impairment to hematological and cardiovascular parameters. In addition, MS attenuated plasmatic NO increase, which is a typical feature of sepsis.

Significance: These findings provide new insights into the relationship between obesity and mild sepsis in mice, thus revealing an approach in favor of the “obesity paradox.”

Keywords: Obesity; Nitric Oxide; Cecal ligation and puncture; Obesity paradox; Cardiovascular parameters.

1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO) [1], overweight and obesity are defined as abnormal or excessive accumulation of fat, related to lifestyle, which affects all age groups of the population. Obesity has become recognized as a global health problem in the late twentieth century, reaching pandemic levels, with over 600 million obese adults [2].

One of the main consequences of overweight or obesity is hypertension, which is correlated with a cascade of associated cardiorenal and metabolic disorders that can lead to direct deleterious effects on cardiac and vascular structure and function. The mechanism underlying this phenomenon has been increasingly investigated. It involves increasing renal tubular reabsorption, which impairs pressure natriuresis and causes volume expansion, activation of the sympathetic nervous system (SNS), and renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) [3-5]. Physical pressure on the kidneys can also contribute to this increase in blood pressure, especially when visceral obesity is present [3]. These abnormal processes interact with each other to enhance cardiovascular risk and other secondary pathophysiological conditions that encompass several dysfunctions known as metabolic syndrome (MS) [6-8].

Research conducted in the last 15 years indicates that obesity increases morbidity and mortality through its multiple effects on almost all systems in humans [9]. Recent data suggest the existence of a direct link between obesity and increased visceral fat with adverse outcomes and death from coronavirus 2019 (COVID-19) [10, 11].

In this context, researchers have observed an “obesity paradox,” in which individuals with obesity survive to sepsis at higher rates than their non-obese counterparts [12]. Nevertheless, the various aspects of the association between obesity and infection are not fully understood.

Sepsis consists of a systemic inflammatory response through a serious local infection that causes multiple organ failure and can progress to death. It affects more than 19 million people each year [13]. Influx of microbes into the peritoneal cavity after leakage of the intestines due to disease, trauma or surgery leads to peritonitis, which may result in sepsis [14]. Animal models for the study of different

aspects of sepsis have been developed for over 30 years, such as ‘cecal ligation and puncture’ (CLP) and ‘ascending colon stent peritonitis’ (CASP), which mimic the progression of polymicrobial peritonitis to sepsis [15].

Bacteria and their toxins induce the production of a variety of inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1, IL-6, and nitric oxide (NO), produced mainly by inflammatory cells. The release of these mediators is essential for the development of sepsis [16]. Mice undergoing severe sepsis induced by CLP exhibit an impairment of neutrophil migration to the infection focus dependent on NO [17], which is associated with a failure of local bacterial clearance and high mortality [18, 19].

Considering the global increase in the prevalence of obesity and MS, the present study was designed to examine the distinct effects of MS on CLP-induced sub-lethal sepsis in mice (SL-CLP). To investigate the influence of MS on the survival, blood pressure, production of NO, and blood cell scores in SL-CLP mice, we utilized a model of monosodium glutamate in mouse pups to induce MS in adult animals, and examined the different parameters over a period of 24 h.

2. Materials and methods

2.1 Study protocol

The protocol used in this study is described in Fig. 1, and all procedures were carried out in strict accordance with the guidelines for Laboratory Animals established by the National Institute of Health (Bethesda, MD, USA), as recommended by the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals proposed by the Brazilian National Council of Animal Experimentation (COBEA). The protocol was approved by the Internal Scientific Commission and the Ethics in Animal Experimentation Committee of Londrina State University (approval number: CEUA - process number 14783.2019.01). Every effort was made to minimize pain and the animals used in these experiments

2.2 Animals

The experiments were performed in a randomized controlled study. Swiss mice were maintained in an animal facility at the Department of Pathological Sciences, Center for Biological Sciences, State University of Londrina, under a controlled environmental temperature (21-23 °C) and a 12 h day/night cycle. The

mice were fed a commercial rodent diet (Nuvilab-CR1, Quimtia-Nuvital, Colombo, Paraná, Brazil) and sterilized water *ad libitum*. All the animals were anesthetized with ketamine (1.25mg/mL) and xylazine (0.5mg/mL) and euthanized by cervical dislocation.

2.3 MSG induction of metabolic syndrome

Newborn Swiss mice received a daily subcutaneous injection of monosodium glutamate (MSG) (Sigma, St. Louis, USA) at a concentration of 4 mg/g body weight (MS group) or equimolar saline solution (SAL-CTL group), during the first 5 days of life [8, 20].

The mice were separated after weaning by sex, and only male mice were used. Metabolic syndrome (MS) was characterized by the Lee Index for each animal using the formula: $\sqrt[3]{\text{body weight}/\text{naso-anal length} \times 1000}$ [21]. The weights of the retroperitoneal and perigonadal fats were also measured. At 74-day old, male mice, obese or not, were separated into six experimental groups: (G1) obese control group [MS-CTL], (G2) obese sham group (MS-Sham) and (G3) obese CLP (MS-M-CLP) group; the same groups were repeated for animals that were treated with saline after birth, groups G4 (SAL-CTL), G5 (SAL-Sham), and G6 (SAL-M-CLP), representing the experimental groups and treatment is shown in Fig. 1. MS was validated by the presence of an increased Lee index, increased perigonadal and retroperitoneal fat tissue, hypertension, and hyperglycemia.

2.4 Blood glucose measurement

Blood glucose levels were measured 24 h before sepsis induction by CLP. As a method of analgesia for animals, lidocaine ointment 50 mg/g (AstraZeneca do Brasil Ltda - Cotia - SP) was previously applied topically to the tip of the tail. Peripheral blood samples were collected from the animal's tail, and blood glucose was determined using a glucose monitor (AccuCheck Active, Roche Diagnostics).

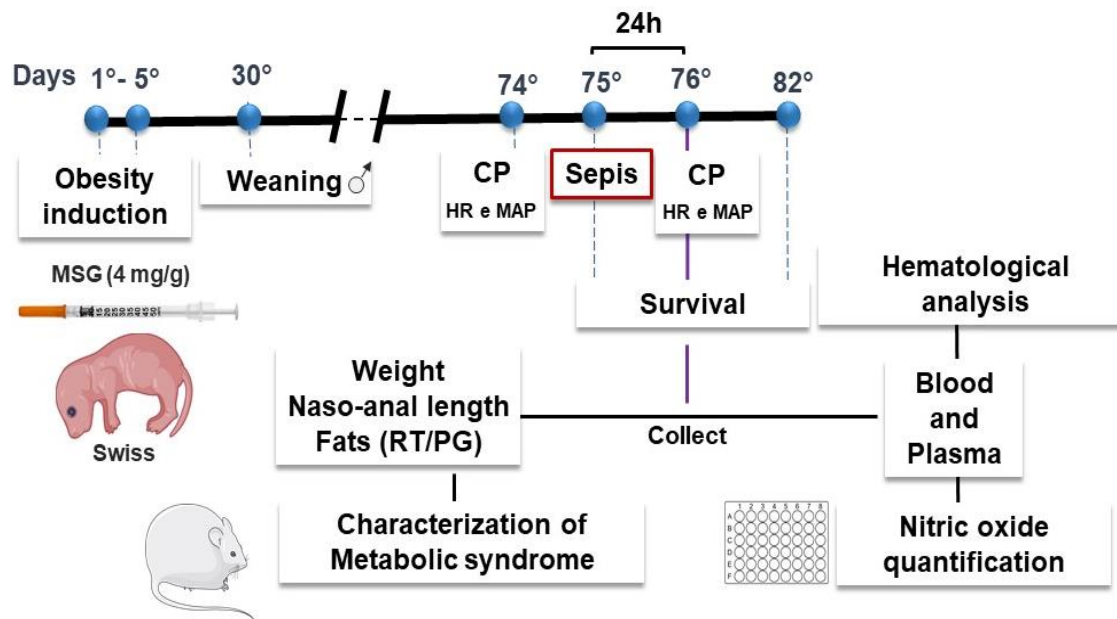


Fig. 1. Experimental design. To induce MS, Swiss mice were treated from the first day of life to the fifth day with monosodium glutamate (MSG) (4 mg/g body weight), while the control group received equimolar saline. At 30 d-of-age, the animals were weaned and only the males were separated for experimentation. Cardiovascular parameters (CP), such as mean arterial pressure and heart rate, were measured 24 h before and after sepsis induction (CLP). Blood collection was also carried out 24 h after CLP, so the hematological analysis and quantification of nitric oxide (NO) could be performed. Next, the animals were euthanized and their weight and naso-anal length were measured. Moreover, their retroperitoneal (RT) and perigonadal (PG) fats were removed and weighed, to characterize obesity.

2.5 Mild sepsis model by cecal ligation and puncture

Mice from the control and experimental groups were subjected to the polymicrobial sepsis model through cecal ligation and puncture of the cecum (CLP), as previously described by Wichterman et al. (1980) [22] with adaptations suggested by Rittirsch et al (2009) [23]. Briefly, mice were anesthetized with ketamine (1.25 mg/mL) and xylazine (0.5 mg/mL) i. p., were subjected to a 1cm midline incision on the anterior abdomen. Using a cotton thread, the cecum was exposed and ligated at half the distance between the distal pole and the base of the cecum below the ileocecal junction without causing bowel obstruction.

A transversal single puncture was made through the cecum using a 21-gauge needle to induce moderate septic injury. Pressure was applied (the cecum was squeezed) to allow the cecal contents to be expressed through the puncture. The

cecum was placed back in the abdominal cavity, and the peritoneal wall and skin incision were closed, as described by Torres-Dueñas et al. (2007) [24]. All animals received 1 mL of sterile isotonic saline subcutaneously (s.c.) immediately after the surgery and were kept warm for 1 h at 37 °C, as shown in Fig. S1. They were then transported to their cages with free access to food and water. Sham-operated mice were handled in the same manner, except that the cecum was not ligated or punctured. Survival was observed for 7 days every 24 h after CLP.

2.6 Cardiovascular parameters

Mean arterial pressure, systolic and diastolic, and heart rates were performed 24 h before the induction of sepsis by CLP and 24 h after the procedure in the control and experimental groups. Measurements were obtained using a non-invasive CODA system (Kent Scientific, Torrington, CT) based on the volume of pressure obtained from the mouse tail [8, 25, 26].

2.7 Hematological parameters

Twenty-four hours after sepsis induction, blood from mice groups under anesthesia was collected by cardiac puncture using a 26-gauge needle and a 1-mL syringe. The blood was transferred to a microtube containing 30 μ L of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) for hematological analysis. Platelets, total leukocytes, reticulocytes, lymphocytes, monocytes, and neutrophils were determined using standard methods [27, 28]. To enumerate reticulocytes, 40 μ L of blood was incubated with 20 μ L of brilliant cresyl blue for 20 min at 37 °C, and thin blood smears were then prepared on glass slides. After the blood smears were air-dried, the reticulocytes were counted by light microscopy. All blood analyses and cell counts were performed twenty-four hours after sepsis induction. The rest of the blood sample was subsequently centrifuged at 10,000 rpm for 10 min at 22 °C to collect the plasma, which was stored at -80 °C until the day of analysis of the samples.

2.8 Measurement of NO levels in mouse plasma samples

Nitrite concentrations in the plasma of control and experimental mice were assessed 24 h after sepsis induction. The concentration of nitrite was based on the Griess reaction, involving a shortened incubation period of nitrate with

cadmium, as described previously [29] with some modifications proposed by Panis et al. [30].

2.9 Statistical analysis

Initially, the data were subjected to an 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). The significance between two groups was analyzed using the Student's t-test and there were more than two groups, one-way analysis of variance (ANOVA), and two-way ANOVA, followed by Tukey's or Sidak's multiple comparisons test. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Survival rate was determined using the log-rank test. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism software (version 6.0; GraphPad Software, San Diego, CA).

3. Results

3.1 MS

On the 76th day of life, MSG-induced obesity was validated by the mass, Lee index, retroperitoneal (RP), and perigonadal (PG) adipose tissue weights. Mass was expressed in grams of total weight of mouse (g), Lee index was expressed in grams per cubic centimeter (g/cm^3), the weight of RP and PG adipose tissue was expressed in milligrams, and is presented in Fig. 2A–D. No statistical difference was found between the body masses of the control group (CTL) and obese (MS) group mice. As expected, we found an increase in the Lee index in the MS-CTL group compared to that in the SAL-CTL group ($P < 0.0001$). The comparison of RP and PG adipose weights between the SAL-CTL and MS groups also revealed a significant increase in these parameters in the MS-CTL group ($P < 0.0001$). Cardiovascular parameters, such as heart rate (HR) and mean arterial pressure (MAP), were expressed in beats per minute (bpm) and millimeters of mercury (mmHg), respectively. We observed a higher HR and MAP in the MS-CTL group (Fig. 2E) when compared to that in the SAL-CTL (Fig. 2F, $P < 0.001$). Glucose dosage was expressed in milligrams of glucose per deciliter of blood (mg/dL), and as expected, fasting glycemia (Fig. 2G) was increased in

the MS-CTL group when compared to that in the SAL-CTL group ($P < 0.01$). (Fig. 2G). These data indicate that MSG induced MS in male Swiss mice, as previously described by Lucchetti et al. (2019) [8].

3.2 MS protects mice from M-CLP-induced mortality

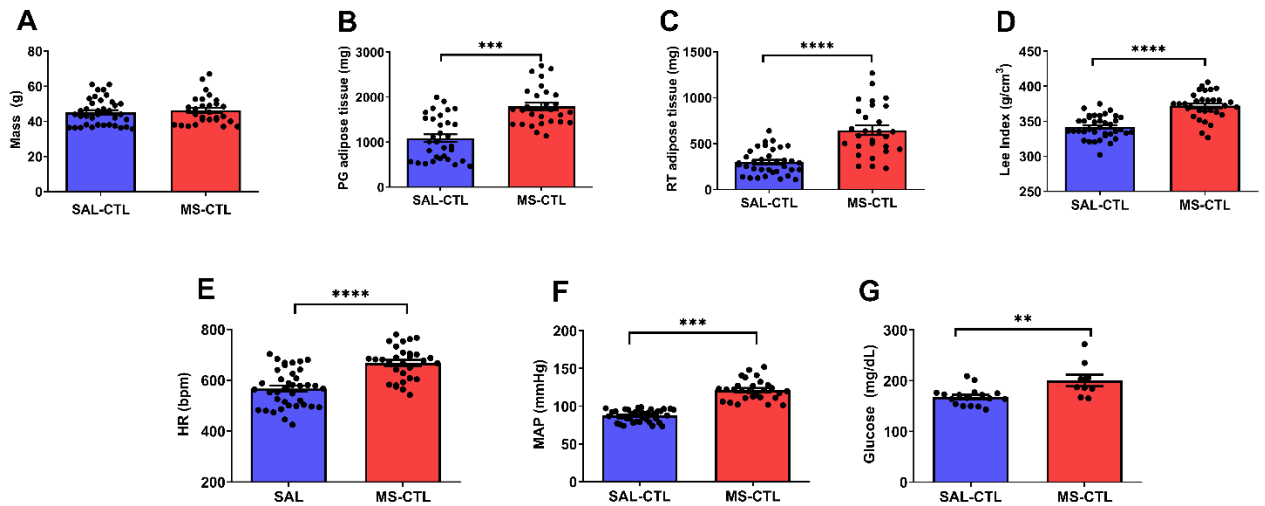


Fig. 2. Validation of Metabolic syndrome (MS). Swiss mice, 76 days old, previously treated with saline (SAL-CTL) or with MSG (MS-CTL) were euthanized to characterize obesity. Measures were collected as (A) mass, expressed in grams (g), (B) perigonadal adipose tissue (PG) and (C) retroperitoneal (RP), expressed in milligrams (mg) and (D) Lee index expressed in grams per cubic centimeter (g/cm^3). Cardiovascular parameters such as (E) heart rate (HR) and (F) mean arterial pressure (MAP) were expressed in beats per minute (bpm) and millimeters of mercury (mmHg), respectively, (G) Glucose dosage, expressed in milligrams of glucose per deciliter of blood (mg/dL). Data show mean \pm SEM. Representative result of six experiments with five to seven animals each. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ when comparing SAL-CTL group to MS-CTL, determined by Student's t-test. CTL, control group ($n = 39$ mice) and MS, obese group ($n = 32$ mice).

To evaluate the influence of MS on the pathophysiology of sepsis, we performed a CLP model for moderate sepsis [18, 22, 31]. As shown in Fig. 3, all animals subjected to sham surgery (SAL-Sham or MS-Sham) survived during the entire observation period (168 h). Control mice that underwent the CLP procedure (SAL-M-CLP) had a survival rate of 55% after being observed for 168 h, validating our experiment of mild sepsis [23, 32, 33].

The MS-M-CLP group presented only one death, 72 h after sepsis induction, with a 95% survival rate, which was not significantly different when compared to the control group that underwent simulated surgery (SAL-Sham).

However, MS-M-CLP mice had higher survival rates than saline animals (SAL-M-CLP, $P < 0.001$).

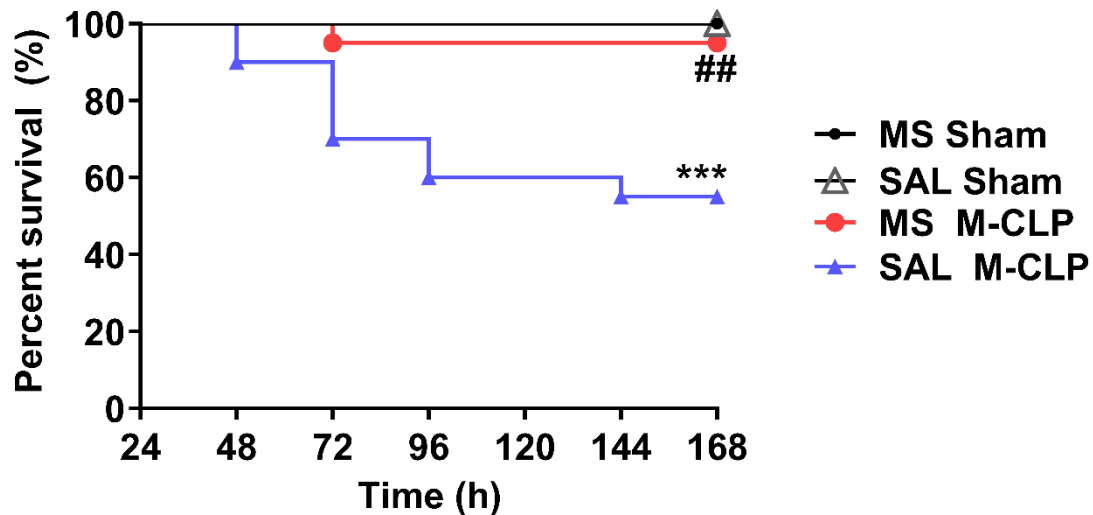


Fig. 3. Survival rate during the progression of CPL-induced moderate sepsis. The results are expressed as the percentage of survival of each experimental group using the Logrank test, during observation of 7 days every 24h ($n = 20$ mice for each group). $***P < 0.001$, when comparing the groups SAL M-CLP vs SAL SHAM and $## P < 0.01$, when comparing MS M-CLP to SAL M-CLP.

3.3 Associations between the NO production, cardiovascular parameters and blood cells with metabolic syndrome and sepsis

The level of NO in the plasma of mice that underwent simulated surgery (sham) did not increase or change when compared with the control. There was an increase in NO or nitrite only in the control group animals subjected to CLP when compared to the CTL, Sham groups of SAL or MS animals, and to the MS animals subjected to CLP (Fig. 4, $P < 0.0001$). Our results showed that the increase in NO production, which is a typical feature of sepsis, is blunted by obesity, or that obesity produces resistance to NO increase (Fig. 4, $P < 0.05$). Obese mice presented higher blood pressure levels than the control group (MS-CTL = 121.4 ± 2.591 vs. SAL-CTL = 87.62 ± 1.243 ; $P < 0.0001$) (Fig. 2F), which is a characteristic marker of metabolic syndrome, observed in the experimental model of MS proposed in this work [8]. The obese group also presented

tachycardia compared to the control group (MS-CTL = 656.8 ± 13.48 vs SAL-CTL = 581.7 ± 13.74 , $P < 0.001$) (Fig. 4E).

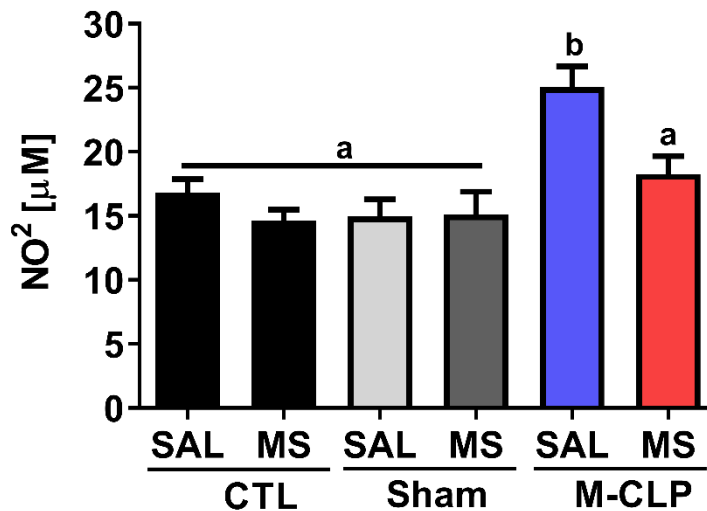


Fig. 4. Quantification of NO in plasma. NO was estimated by the production of nitrite through the cadmium / Griess technique and measured in plasma 24 h after sepsis induction. NO levels were expressed as micromolar (NO²/µM). Bars represent mean \pm SEM of the different groups: SAL (n = 9), MS (n = 11), SAL Sham (n = 10), MS Sham (n = 6), SAL CLP (n = 9) and MS CLP (n = 6). Values followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$, as determined by two-way ANOVA with Sidak's posttest).

Mice that underwent the simulated surgery procedure did not show changes in both mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) (Fig. 5A, B, D, E). Control animals that underwent the CLP procedure showed a decrease in MAP compared to the sham animals (SAL Sham = 93.32 ± 3.02 vs SAL M-CLP = 82.16 ± 1.641 ; $P < 0.01$). However, the obese animals did not show significant changes after CLP (MS Sham = 110.9 ± 4.763 vs. MS M-CLP = 108.9 ± 4.302). Control animals underwent to CLP showed increasing heart rate after when compared with Sham group (SAL Sham = 593.4 ± 15.11 vs SAL M-CLP = 677.4 ± 31.75 ; $P < 0.01$), but we did not observe significant changes in heart rate of obese animals (Fig. 5E, F). In addition, when we compare the two groups underwent CLP, the saline also shows a decrease in MAP (SAL M-CLP = 82.16

± 1.641 vs MS M-CLP = 108.9 ± 4.302 ; $P < 0.0001$) and heart rate (SAL M-CLP = 677.4 ± 31.75 vs MS M-CLP = 627.9 ± 18.24 ; $P < 0.01$) (Fig. 5F).

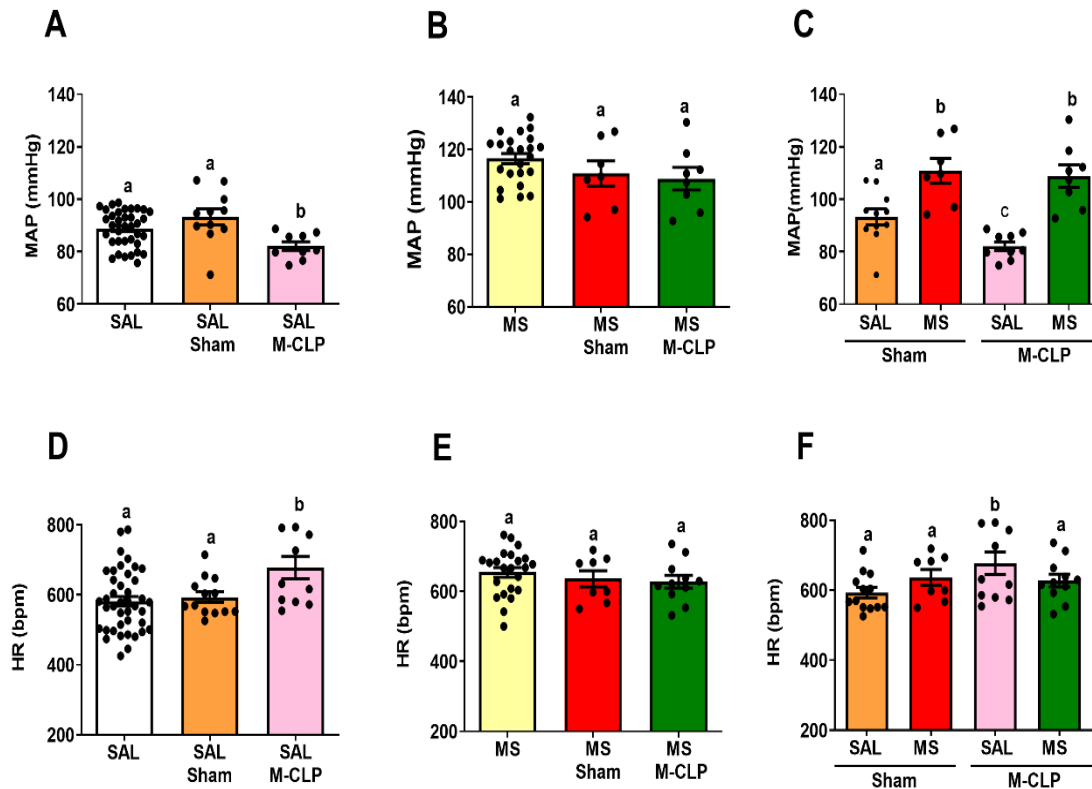


Fig. 5. CP in animals that underwent moderate sepsis. The CODA platform was used to measure cardiovascular parameters, such as MAP and heart rate 24 h before the animals were submitted to CLP and 24 h after this procedure. The mean arterial pressure of the animals (A, B, C) was expressed in millimeters of mercury (mmHg). Heart rate (D, E, F) was expressed in beats per minute (bpm). Bars represent the mean \pm SEM of the different groups. Values followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$; A,B,C,D and E one-way ANOVA with Tukey posttest; C and F two-way ANOVA with Sidak posttest).

The hematological parameters and platelet numbers increased (Fig. 6A) in the control group when the sepsis procedure was performed (SAL-Sham vs. SAL M-CLP, $P < 0.01$). An increase in reticulocytes (Fig. 6B) was also observed in mice with moderate sepsis compared to the control group ($P < 0.05$). A decrease ($P < 0.05$) in the total leukocyte count levels (Fig. 6C, including monocytes (Fig. 6D), lymphocytes (Fig. 6E), and neutrophils (Fig. 6F) was observed in groups undergoing the surgical procedure (Sham), regardless of

sepsis. Interestingly, the decrease in lymphocytes and monocytes was lower in the MS-M-CLP group than in the SAL M-CLP group ($P < 0.05$).

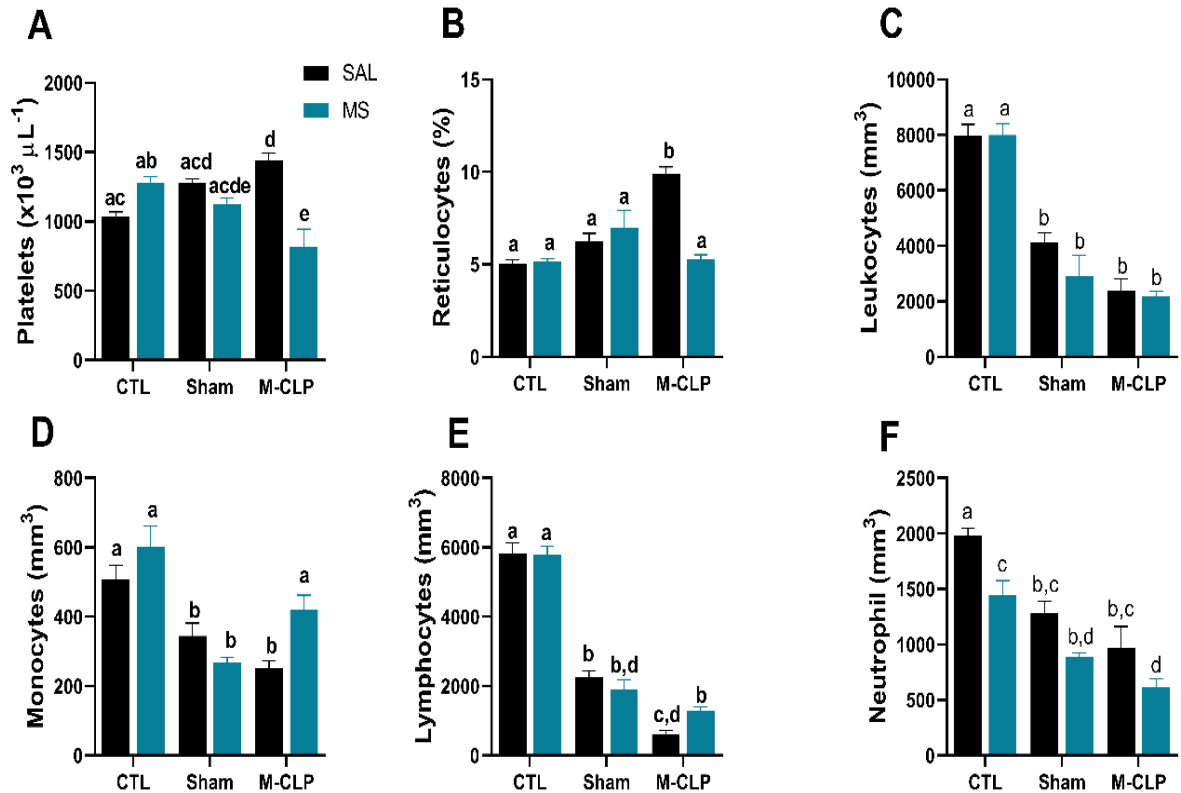


Fig. 6. Hematological parameters in mice subjected to induction of moderate sepsis by CLP. The analysis of peripheral blood was performed 24 h after the procedure in the control and obese groups, submitted to sepsis or not. Bars represent the mean \pm SEM of the different groups. Values followed by the same letter are not significantly different ($P < 0.05$; two-way ANOVA with Sidak posttest).

4. Discussion

Metabolic syndrome (MS) is a low-grade inflammatory condition of interlinked metabolic disturbances, such as obesity, associated with an increased risk of many major chronic diseases (cardiovascular disease, hypertension, type 2 diabetes, arthritis, and cancer) and is well studied. However, the role of MS in inflammatory processes, such as sepsis, is unclear because opposite results have been reported in the literature [12, 34-36].

Laboratory studies indicate exaggeration of inflammatory response and prothrombogenic phenotype assumed by obese animals compared with lean septic animals [34, 37]. C57Bl/6 mice chronically fed a high-fat diet showed increased mortality during *Staphylococcus aureus*-induced sepsis or sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with low-fat diet-fed C57Bl/6 controls [38, 39]. Mild obesity also reduces the survival of endotoxemic rats [40]. These studies revealed that obesity can increase the risk of death in animal models of infection. Although obesity is associated with overall mortality risk in the general population, some authors have interpreted these data to suggest that obesity confers an advantage in surviving clinical subpopulations and was defined as “obesity paradox” [41, 42].

Sepsis and MS are both inflammation-related diseases and represent an inter-related escalating disease burden for modern healthcare systems [43]. Several studies that used the neonatal administration of MSG according to the methodology applied in this study, observed that the animals presented hypertension, insulin resistance, increased fat deposition, and decreased nasal-anal length without changes in body weight, which corroborates our findings. Furthermore, it has been described that this model increases sympathetic modulation in heart rate variability and renal sympathetic nerve activity, baroreflex sensitivity is altered, and oxidative stress is increased [6, 8, 44, 45]. The MS developed in these mice was shown to be protective against induced moderate sepsis, decreased mortality, and improved cardiovascular parameters, providing further evidence of the obesity paradox [35, 46-50].

The mechanisms that explain in the 'obesity paradox' and some critical health dangerous situations, such as those that occur in sepsis, are not fully understood. However, immunological, metabolic, and endocrine disorders participate in this complex pathophysiological mechanism. In fact, alterations in leptin and adiponectin have been correlated with survival in sepsis [51] [52]. Adipose tissue functions, in addition to playing an endocrine role, can modulate the inflammatory response by releasing multiple bioactive substances, known as adipose-derived secreted factors or adipokines, which can contribute to the pathogenesis of obesity-linked complications [53].

Cardiovascular compromise in human sepsis manifests primarily as hypotension [54]. The CLP sepsis model in mice also exhibits characteristics of sepsis, including hypotension [55]. Proteins of the renin angiotensin system are also produced in adipose tissue [56], which can confer hemodynamic advantages in sepsis [57, 58]. Our data showed that non-obese animals had a significant drop in blood pressure, while obese animals had no drop in blood pressure after sepsis induction. It may be possible that the hypertensive state of MS animals may collaborate to minimize blood pressure drop during sepsis. However, further studies are required to elucidate the mechanisms involved in this protection

The results of the present study showed that NO production increased only in the non-obese group that underwent sepsis. Parallel to this, we observed a drop in MAP only in the same group. These results strongly suggest that this drop in blood pressure is due to this increase in nitrite, due to the well-known vasodilator effect of NO, especially in sepsis. The curious fact of our study is the findings of the effects of sepsis in MS animals, which did not show cardiovascular changes and, at the same time, did not promote increases in plasma nitrite levels, corroborating the hypothesis of sepsis resistance in animals with obesity or MS.

da Cunha, Pinge-Filho, Panis, et al. [59] demonstrated that MSG-treated rats showed reduced NO production and increased generation of reactive oxygen species in the vascular endothelium, suggesting that the observed hypertension may be due to lower NO production or bioavailability. When microorganisms invade a host, as in CLP-induced sepsis, are stimulated to produce powerful pro-inflammatory mediators, such as tumor necrosis factor (TNF), IL-1, and IL-6, and produce NO and ROS when this inflammatory reaction becomes systemic and uncontrolled, sepsis ensues [60]. We suggest that the lower NO production in animals treated with MSG may contribute to the resistance to hypotension and lower mortality observed in the group of animals with MS.

Obesity generates a phenotype of enhanced inflammation in the microvasculature of multiple organs, as a result of increased activation of leukocytes, platelets, and endothelial cells. Our study found a higher basal level of platelets and lower levels of neutrophils observed in obese subjects than in lean subjects. Early after CLP or sham, the number of circulating white blood cells dropped. The decrease in lymphocytes and monocytes was lower in the MS-M-

CLP group than in the SAL-M-CLP group. The survival benefit of septic animals granted by MS may be associated with this lower reduction. In fact, studies in clinical practice have identified an association between the occurrence of apoptosis in lymphocytes after sepsis because the duration and depth of lymphopenia have been associated with a higher risk of infection and higher mortality in different clinical settings [61, 62].

Thus, our results show that it is possible to reduce mortality in sepsis if the presence of lymphocytes is preserved. This is concordant with the observations made in studies on experimental sepsis [63]. Neutrophils represent an exception, as their apoptosis is transiently decreased after septic shock, which could participate in the major neutrophilia observed in septic patients [64], and reduction of neutrophil migration to infection sites is associated with a poor outcome in sepsis [19]. This phenomenon was shown to be mediated by NO, because aminoguanidine prevents the failure of neutrophil migration and improves the survival of L-CLP animals [17]. Mice with MS and sepsis showed a reduction in NO production (compared with the non-obese animals) associated with a decrease in the total neutrophil count levels, corroborating these data.

5. Conclusion

Our findings demonstrate that MS improved the survival of septic mice, accompanied by a significant recovery in hematological and cardiovascular parameters, and attenuated the increase in plasma NO, which is a typical feature of sepsis. These findings provide new insights into the relationship between obesity and mild sepsis in mice, thus revealing an approach in favor of the “obesity paradox.”

6. Conflicts of interest

The authors declare that they have no potential conflicts of interest.

7. Author contributions

Conception and design: RPN, GS, AFM, MCMP and PPF. Acquisition, analysis, and interpretation of the data: RPN, ADM, MILM, LFS, APCC, AFM, MCMP and PPF. Drafting or revising and final approval of the manuscript: RPN, ADM, MILM, AFM, MCMP and PPF.

8. Acknowledgments

The authors are grateful for support by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), for the fellowship to RPN and LFS, CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), and for the research fellowship to MCMP and PPF.

9. References

1. World Health Organization: Obesity and overweight. WHO Geneva and u.A. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>.
2. Blüher, M., *Obesity: global epidemiology and pathogenesis*. Nature Reviews Endocrinology, 2019. 15(5): p. 288-98. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0176-8>.
3. Wofford, M.R. and J.E. Hall, *Pathophysiology and treatment of obesity hypertension*. Current pharmaceutical design, 2004. 10(29): p. 3621-37.
4. Hall, M.E., et al., *Obesity and metabolic syndrome hypertension*, in *Disorders of blood pressure regulation*. 2018, Springer. p. 705-22.
5. Hall, J.E., et al., *Obesity, kidney dysfunction and hypertension: mechanistic links*. Nature reviews nephrology, 2019. 15(6): p. 367-85.
6. Cunha, N., et al., *Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats*. Life sciences, 2010. 87(11-12): p. 375-81.
7. Lobato, N., et al., *Obesity induced by neonatal treatment with monosodium glutamate impairs microvascular reactivity in adult rats: role of NO and prostanoids*. Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2011. 21(10): p. 808-16.
8. Lucchetti, B.F.C., et al., *Metabolic syndrome aggravates cardiovascular, oxidative and inflammatory dysfunction during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice*. Scientific reports, 2019. 9(1): p. 1-16.
9. Falagas, M.E. and M. Kompoti, *Obesity and infection*. The Lancet infectious diseases, 2006. 6(7): p. 438-46.
10. Huang, Y., et al., *Obesity in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis*. Metabolism, 2020: p. 154378.
11. Dietz, W. and C. Santos-Burgoa, *Obesity and its implications for COVID-19 mortality*. Obesity, 2020. 28(6): p. 1005-05.
12. Robinson, J., et al., *The obesity paradox in sepsis: a theoretical framework*. Biological research for nursing, 2020. 22(2): p. 287-94.
13. Prescott, H.C. and D.C. Angus, *Enhancing recovery from sepsis: a review*. Jama, 2018. 319(1): p. 62-75.
14. Angus, D.C. and R.S. Wax, *Epidemiology of sepsis: an update*. Critical care medicine, 2001. 29(7): p. S109-S16.
15. Schabbauer, G., *Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP*. Drug Discovery Today: Disease Models, 2012. 9(1): p. e17-e21.
16. Galanos, C. and M.A. Freudenberg, *Mechanisms of endotoxin shock and endotoxin hypersensitivity*. Immunobiology, 1993. 187(3-5): p. 346-56.
17. Benjamim, C., S. Ferreira, and F.d.Q. Cunha, *Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis*. The Journal of infectious diseases, 2000. 182(1): p. 214-23.
18. Freitas, A., et al., *Divergent role of heme oxygenase inhibition in the pathogenesis of sepsis*. Shock, 2011. 35(6): p. 550-59.
19. Alves-Filho, J.C., et al., *The role of neutrophils in severe sepsis*. Shock, 2008. 30(7): p. 3-9.

20. Martin, J.M., et al., *Maternal diet supplementation with n-6/n-3 essential fatty acids in a 1.2: 1.0 ratio attenuates metabolic dysfunction in MSG-induced obese mice*. International journal of endocrinology, 2016. 2016.
21. Bernardis, L. and B. Patterson, *Correlation between 'Lee index' and carcass fat content in weanling and adult female rats with hypothalamic lesions*. Journal of Endocrinology, 1968. 40(4): p. 527-28.
22. Wichterman, K.A., A.E. Baue, and I.H. Chaudry, *Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal*. Journal of Surgical Research, 1980. 29(2): p. 189-201.
23. Rittirsch, D., et al., *Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture*. Nature protocols, 2009. 4(1): p. 31-36.
24. Torres-Dueñas, D., et al., *Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice*. British journal of pharmacology, 2007. 152(3): p. 341-52.
25. Queme, L.F., et al., *Dual modulation of nociception and cardiovascular reflexes during peripheral ischemia through P2Y1 receptor-dependent sensitization of muscle afferents*. Journal of Neuroscience, 2016. 36(1): p. 19-30.
26. Lucchetti, B.F., et al., *Moderate treadmill exercise training improves cardiovascular and nitrgergic response and resistance to Trypanosoma cruzi infection in mice*. Frontiers in physiology, 2017. 8: p. 315.
27. Hideko Tatakihara, V.L., et al., *Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine Trypanosoma cruzi infection*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2008. 52(1): p. 47-58.
28. Donizette Malvezi, A., et al., *Involvement of nitric oxide (NO) and TNF- α in the oxidative stress associated with anemia in experimental Trypanosoma cruzi infection*. FEMS Immunology & Medical Microbiology, 2004. 41(1): p. 69-77.
29. Navarro-Gonzalvez, J.A., C. García-Benayas, and J. Arenas, *Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids*. Clinical chemistry, 1998. 44(3): p. 679-81.
30. Panis, C., et al., *Trypanosoma cruzi: effect of the absence of 5-lipoxygenase (5-LO)-derived leukotrienes on levels of cytokines, nitric oxide and iNOS expression in cardiac tissue in the acute phase of infection in mice*. Experimental parasitology, 2011. 127(1): p. 58-65.
31. Hubbard, W.J., et al., *Cecal ligation and puncture*. Shock, 2005. 24: p. 52-57.
32. Siempos, I.I., et al., *Cecal ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice*. Journal of visualized experiments: JoVE, 2014(84).
33. Jeremias, I., et al., *The severity of cecal ligation and puncture-induced sepsis correlates with the degree of encephalopathy, but the sepsis does not lead to acute activation of spleen lymphocytes in mice*. Molecular neurobiology, 2016. 53(5): p. 3389-99.
34. Vachharajani, V., *Influence of obesity on sepsis*. Pathophysiology, 2008. 15(2): p. 123-34.
35. Ng, P.Y. and M. Eikermann, *The obesity conundrum in sepsis*. 2017, BioMed Central.
36. Jagan, N., et al., *Sepsis and the obesity paradox: size matters in more than one way*. Critical Care Medicine, 2020. 48(9): p. e776-e82.
37. Vachharajani, V., et al., *Obesity exacerbates sepsis-induced inflammation and microvascular dysfunction in mouse brain*. Microcirculation, 2005. 12(2): p. 183-94.
38. Strandberg, L., et al., *Mice chronically fed high-fat diet have increased mortality and disturbed immune response in sepsis*. PloS one, 2009. 4(10): p. e7605.
39. Kaplan, J.M., et al., *Obesity enhances sepsis-induced liver inflammation and injury in mice*. Obesity, 2016. 24(7): p. 1480-88.
40. Sakai, S., et al., *Mild obesity reduces survival and adiponectin sensitivity in endotoxemic rats*. journal of surgical research, 2013. 185(1): p. 353-63.

41. McAuley, P.A. and S.N. Blair, *Obesity paradoxes*. Journal of sports sciences, 2011. 29(8): p. 773-82.
42. Banack, H.R. and J.S. Kaufman, *The "obesity paradox" explained*. Epidemiology, 2013. 24(3): p. 461-62.
43. Meydan, C., U. Bekenstein, and H. Soreq, *Molecular regulatory pathways link sepsis with metabolic syndrome: non-coding RNA elements underlying the sepsis/metabolic cross-talk*. Frontiers in molecular neuroscience, 2018. 11: p. 189.
44. da Cunha, N.V., et al., *COX-2 inhibition does not reverse the increased sympathetic modulation in MSG obese rats*. Autonomic Neuroscience, 2011. 165(2): p. 201-04.
45. da Silva Mattos, A.M., et al., *Renal sympathetic nerve activity is increased in monosodium glutamate induced hyperadipose rats*. Neuroscience letters, 2012. 522(2): p. 118-22.
46. Fleischmann, E., et al., *Influence of excess weight on mortality and hospital stay in 1346 hemodialysis patients*. Kidney international, 1999. 55(4): p. 1560-67.
47. Hogue, C.W., et al., *The impact of obesity on outcomes after critical illness: a meta-analysis*. Intensive care medicine, 2009. 35(7): p. 1152-70.
48. Niedziela, J., et al., *The obesity paradox in acute coronary syndrome: a meta-analysis*. 2014, Springer.
49. Pepper, D.J., et al., *Increased body mass index and adjusted mortality in ICU patients with sepsis or septic shock: a systematic review and meta-analysis*. Critical Care, 2016. 20(1): p. 1-10.
50. Karampela, I., et al., *Is There an Obesity Paradox in Critical Illness? Epidemiologic and Metabolic Considerations*. Current obesity reports, 2020: p. 1-14.
51. Ahima, R.S., *Adipose tissue as an endocrine organ*. Obesity, 2006. 14(S8): p. 242S-49S.
52. Kuperman, E.F., et al., *The impact of obesity on sepsis mortality: a retrospective review*. BMC infectious diseases, 2013. 13(1): p. 1-8.
53. Ouchi, N., et al., *Adipokines in inflammation and metabolic disease*. Nature reviews immunology, 2011. 11(2): p. 85-97.
54. Angus, D.C. and T. Van der Poll, *Severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2013. 369: p. 840-51.
55. Li, J.-L., et al., *Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model*. Journal of International Medical Research, 2018. 46(6): p. 2410-22.
56. Kershaw, E.E. and J.S. Flier, *Adipose tissue as an endocrine organ*. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2004. 89(6): p. 2548-56.
57. Yvan-Charvet, L. and A. Quignard-Boulangé, *Role of adipose tissue renin-angiotensin system in metabolic and inflammatory diseases associated with obesity*. Kidney international, 2011. 79(2): p. 162-68.
58. Kalupahana, N.S. and N. Moustaid-Moussa, *The adipose tissue renin-angiotensin system and metabolic disorders: a review of molecular mechanisms*. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2012. 47(4): p. 379-90.
59. da Cunha, N.V., et al., *Decreased endothelial nitric oxide, systemic oxidative stress, and increased sympathetic modulation contribute to hypertension in obese rats*. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2014. 306(10): p. H1472-H80.
60. Cauwels, A., et al., *TLR2 activation causes no morbidity or cardiovascular failure, despite excessive systemic nitric oxide production*. Cardiovascular research, 2013. 100(1): p. 28-35.
61. Girardot, T., et al., *Apoptosis-induced lymphopenia in sepsis and other severe injuries*. Apoptosis, 2017. 22(2): p. 295-305.

62. Hotchkiss, R.S., et al., *Sepsis-induced apoptosis causes progressive profound depletion of B and CD4+ T lymphocytes in humans*. The Journal of Immunology, 2001. 166(11): p. 6952-63.
63. de Pablo, R., et al., *Role of circulating lymphocytes in patients with sepsis*. BioMed research international, 2014. 2014.
64. Tamayo, E., et al., *Evolution of neutrophil apoptosis in septic shock survivors and nonsurvivors*. Journal of critical care, 2012. 27(4): p. 415. e1-15. e11.

Supplementary Information

Metabolic syndrome improves cardiovascular dysfunction and survival during cecal ligation and puncture-induced mild sepsis in mice

Supplementary Figure

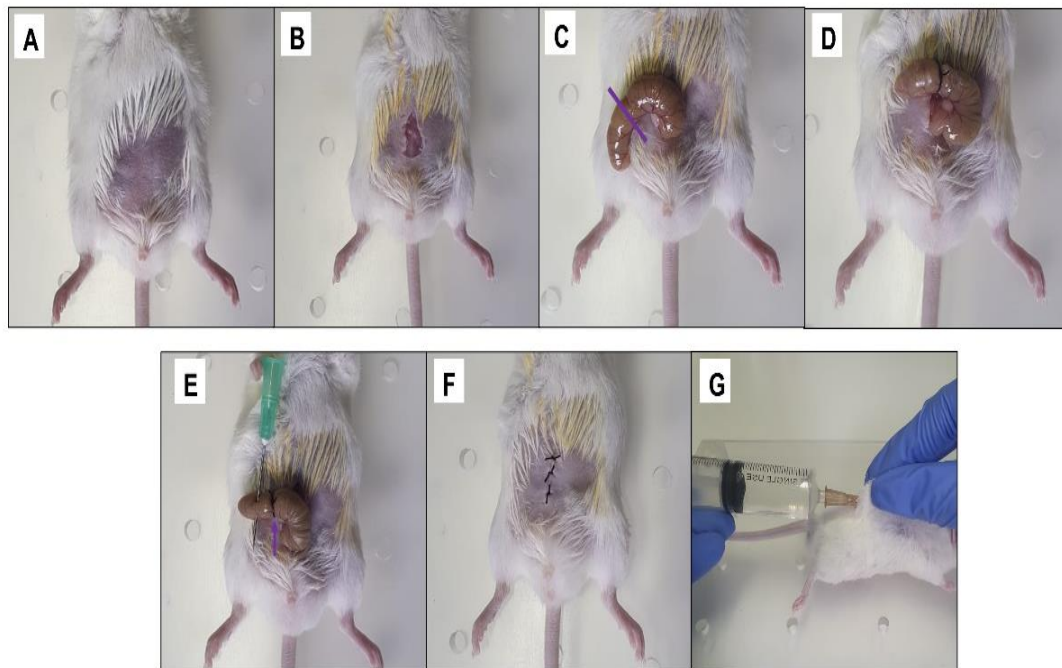


Fig. S1. Mild sepsis model by cecal ligation and puncture. A) The process of trichotomy in the abdominal region. B) Area disinfected with iodine and incision of approximately 1 cm in the midline of the abdomen. C) Exposure of the cecum, usually located in the lower left abdominal region. The purple line indicates the region between the distal pole and the base of the cecum, where the ligation will be performed. D) Ligation is performed with a cotton thread without total intestinal obstruction. E) The puncture of the cecum is carried out with a 21G needle in a transverse way (the purple arrow points to the place where the ligation was performed) and the cecum is lightly pressed until the feces exit. F) The cecum is relocated in the abdominal cavity and a simple suture is made in the incision. G) After the surgical procedure, the animals receive 1 mL of sterile saline solution (0.9%) subcutaneously (s.c).