



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

CAROLINA HENKES INAMASSU

**A INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NAS ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS
TARDIAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO OCASIONADAS PELA SEPSE
INDUZIDA PELO MÉTODO *CECAL SLURRY***

FLORIANÓPOLIS

2022

CAROLINA HENKES INAMASSU

**A INFLUÊNCIA DO ÓXIDO NÍTRICO NAS ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS
TARDIAS DO MÚSCULO ESQUELÉTICO OCASIONADAS PELA SEPSE
INDUZIDA PELO MÉTODO *CECAL SLURRY***

Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Geisson Marcos Nardi

Coorientadora: Prof(a). Dr(a): Regina de Sordi

FLORIANÓPOLIS

2022

Carolina Henkes Inamassu

A influência do óxido nítrico nas alterações patológicas tardias do músculo esquelético ocasionadas pela sepse induzida pelo método *Cecal Slurry*

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 14 de dezembro de 2022, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Viviane Glaser, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Heiliane Brito Fontana, Dr.(a)
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Jamil Assreuy, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Evelise Maria Nazari Dr.(a)
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Geisson Marcos Nardi, Dr.
Orientador

Insira neste espaço a
assinatura digita

Prof.(a) Regina de Sordi. Dr.(a), Coorientadora

Florianópolis, 2022.

Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me deram a oportunidade de estudar e ter a carreira que eu escolhi.

AGRADECIMENTOS

Tantas pessoas foram essenciais durante a minha trajetória no mestrado e para a realização dessa pesquisa. Agradeço primeiramente aos meus pais, por tudo o que fizeram e fazem por mim, sem vocês eu não teria nem cogitado a ideia de fazer um mestrado. Aos meus primos Vanessa e Éder, por me receberem em Florianópolis e me convencerem a ficar. À Etatiane e sua família, por terem aberto sua casa quando eu não tinha lugar onde morar. À minha família, pelo incentivo de realizar meus sonhos, mesmo estando longe de todos e sem poder vê-los como eu gostaria.

Ao meu incrível orientador, que esteve comigo em todos os experimentos e análises de dados, e estava sempre à disposição quando eu precisei. Que sempre teve a paciência de me ensinar, desde as coisas mais básicas às mais complexas, e que superou todas as minhas expectativas de um bom mentor, sendo o melhor que eu poderia ter. Agradeço por todo o profissionalismo e ensinamentos que mudaram a minha carreira.

À minha coorientadora, que também sempre esteve presente, me ajudou e cedeu seu laboratório e biotério para o projeto. Que confiou em mim e me incluiu nas responsabilidades e rotina do NOLab e LabCaRe, e me passou muitos conhecimentos. A todos os professores e colegas do laboratório, pela parceria e por terem feito meus dias mais leves. Só cresci o tanto que cresci porque sempre tive grandes mentores e colegas para me espelhar e aprender.

Aos técnicos do laboratório de histologia, por todo o cuidado com meu material, pela oportunidade de aprender e sempre deixarem suas portas abertas para me receber. Destes, agradeço em especial ao técnico Gilberto, pela confecção das lâminas e treinamento, e à Emili, que se tornou uma grande amiga e companheira. Ao LAMEB e seus técnicos, que me ajudaram a analisar as minhas amostras, em muitas etapas deste trabalho.

À amiga Nathalia, que me ensinou e ajudou com a imuno-histoquímica, tão importante para esse trabalho. À veterinária Luciana, que estava sempre disponível quando meus animais precisaram, é a melhor cuidadora que eles poderiam ter. Aos colegas do biotério, pela manutenção, limpeza e cuidado com os animais e experimentos alheios, apesar de todas as dificuldades.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós- Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, pela minha formação. Ao corpo docente que me influenciou a ser a pesquisadora que sou hoje, em especial à profa. Dra. Evelise, que me incentivou de todas as maneiras a fazer o doutorado, que eu não achei que fosse possível, e por ceder seu laboratório para a realização da imuno-histoquímica. A todos os técnicos, seguranças,

secretários e profissionais da limpeza por manterem a infraestrutura, burocracia e funcionamento do local.

Aos meus amigos, que foram meu suporte longe da família, e que proporcionaram muitos momentos felizes que vou guardar pra sempre. Obrigada por todo o carinho, desabafos, encontros, risadas e apoio. Desde idas ao médico, ajuda com mudança ou sendo o meu senso de direção em uma cidade antes desconhecida. Por terem contribuído com o retorno da vida após o pior da pandemia.

Todos foram necessários para a minha trajetória, e sou eternamente grata a cada um de vocês.

“A compreensão do mundo natural é uma fonte não apenas de grande curiosidade, mas também de grande realização.”
David Attenborough

RESUMO

A sepse é responsável por cerca de 20% de todas as mortes mundiais. Aproximadamente, 40% dos sobreviventes desenvolvem a síndrome pós-sepse, cujos principais problemas estão relacionados com disfunções do músculo esquelético. Essas disfunções impactam tanto a qualidade de vida como a sobrevivência a longo prazo desses indivíduos. O aumento do óxido nítrico (NO) durante a sepse parece ter relação com o desenvolvimento desse dano muscular. Estudos pré-clínicos de sepse utilizam como padrão-ouro o modelo CLP (*Cecal Ligation and Puncture*) em camundongos, porém, o método *Cecal Slurry* utilizado para indução de sepse em camundongos C57BL/6 parece ser mais vantajoso, pela ausência da necessidade de realização de cirurgia e por não ter diferença em relação ao tamanho e quantidade do conteúdo cecal dos animais. Portanto, um dos nossos objetivos foi adaptar o método *Cecal Slurry* para camundongos *Swiss*, avaliando parâmetros comumente utilizados para caracterizar a sepse em roedores. Em um segundo objetivo, utilizamos o modelo *Cecal Slurry* para verificar a influência do NO na miopatia tardia observada no músculo esquelético causada pela sepse. Para este fim, induzimos a sepse pelo método previamente citado, e após 24 h iniciamos o tratamento dos animais com um inibidor não seletivo das óxido nítrico sintases (NOS; L-NAME) e um inibidor seletivo da isoforma neuronal (NOS-1) das NOS (7-NI), com ambas as drogas inibindo seletivamente ou não a produção de NO. Além disso, utilizamos um doador de NO, o nitroprussiato de sódio (SNP), com objetivo de fornecer exogenamente o NO nos animais. Após 10 dias da indução da sepse e tratamento com as drogas realizamos análises morfométricas e imuno-histoquímicas do músculo EDL (*extensor digitorum longus*). Nossos resultados mostram que o método foi padronizado com sucesso nos animais *Swiss*, por ter induzido um quadro típico de sepse. Os animais apresentaram hipotermia, redução de peso corporal, diminuição da ingestão alimentar, hipoglicemia, hipotensão e aumento de creatinina nos camundongos sépticos, estatisticamente diferentes dos animais controle. Esse quadro de sepse teve uma taxa de sobrevivência de 25%. As análises do músculo EDL apresentaram alterações patológicas após dez dias da indução da sepse, mais especificamente atrofia, edema e aumento do espaço intersticial entre as miofibras. A realização da imuno-histoquímica para a NOS-1 teve marcações no núcleo, sarcolema e no interior das miofibras. A quantificação da NOS-1 foi estatisticamente menor no grupo tratado com inibidor de NOS. Com isso, nosso trabalho mostra que a indução da sepse pelo método *Cecal Slurry* ocasionou em alterações patológicas tardias no músculo esquelético, e a inibição não seletiva de NOS parece ter sido o tratamento que mais apresentou dano muscular no EDL, pois sofreu a maior redução da enzima NOS-1 nesse órgão,

e em outras miopatias a ausência de NOS-1 está relacionada com um dano muscular maior. Porém, são necessários mais estudos, como a avaliação funcional, para a confirmação desse evento.

Palavras-chave: pós-sepse; miopatia; músculo EDL.

ABSTRACT

Sepsis is responsible for about 20% of all deaths worldwide. Approximately 40% of survivors develop post-sepsis syndrome, whose main problems are related to skeletal muscle dysfunction. These dysfunctions impact both the quality of life and the long-term survival of these individuals. The increase in nitric oxide (NO) during sepsis seems to be related with the development of this muscle damage. Preclinical studies of sepsis use the CLP (Cecal Ligation and Puncture) model in mice as the gold standard, however, the Cecal Slurry method used to induce sepsis in C57BL/6 mice seems to be more advantageous, due to the absence of the need for surgery and because there is no difference according to the size and quantity of the animals' cecal content. Therefore, one of our objectives was to adapt the Cecal Slurry method for Swiss mice, evaluating parameters commonly used to characterize sepsis in rodents. In a second objective, we used the Cecal Slurry model to verify the influence of NO on the late myopathy observed in skeletal muscle caused by sepsis. For this purpose, we induced sepsis by the previously mentioned method, and after 24h we started the treatment of the animals with a non-selective nitric oxide synthases inhibitor (NOS; L-NAME) and a selective inhibitor of the neuronal isoform (NOS-1) of NOS (7- NI), with both drugs selectively or not selectively inhibiting NO production. In addition, we used a NO donor, sodium nitroprusside (SNP), with the aim of exogenously supplying NO to the animals. Ten days after sepsis induction and drug treatment, we performed morphometric and immunohistochemical analyzes of the EDL muscle (*extensor digitorum longus*). Our results show that the method was successfully standardized in Swiss animals, as it induced a typical condition of sepsis. The animals showed hypothermia, reduced body weight, decreased food intake, hypoglycemia, hypotension and increased creatinine in septic mice, statistically different from control animals. This sepsis condition had a 25% survival rate. Analysis of the EDL muscle showed pathological changes ten days after sepsis induction, more specifically atrophy, edema and increased interstitial space between myofibers. Immunohistochemistry for NOS-1 showed markings in the nucleus, sarcolemma and inside the myofibers. NOS-1 quantification was statistically lower expressed in the group treated with NOS inhibitor. Thus, our work shows that the induction of sepsis by the Cecal Slurry method caused late pathological changes in the skeletal muscle, and the non-selective inhibition of NOS seems to have been the treatment that most showed muscle damage in the EDL, as it suffered the greatest reduction in NOS-1 enzyme in that organ,

and in other myopathies the absence of NOS-1 is related to greater muscle damage. However, further studies are needed, such as functional evaluation, to confirm this event.

Key-words: post sepsis; miopathy; EDL muscle.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Sistemas orgânicos e parâmetros utilizados para a avaliação do escore SOFA na detecção da sepse.....	26
Figura 2. Estrutura do músculo esquelético.....	27
Figura 3. Organização da miofibra do músculo esquelético.....	28
Figura 4. Representações dos tipos de fibras do músculo esquelético.....	28
Figura 5. Protocolo original utilizado para adaptação do método <i>Cecal Slurry</i> para a indução da sepse em camundongos fêmeas <i>Swiss</i>	36
Figura 6. Experimento de adaptação de protocolo <i>Cecal Slurry</i> de Starr et al. (2014), para fêmeas da linhagem <i>Swiss</i>	38
Figura 7. Indução da sepse por método <i>Cecal Slurry</i> (CS) e análise de parâmetros fisiológicos durante a fase aguda da sepse.....	39
Figura 8. Experimento sobre a influência da modulação do óxido nítrico no dano tardio do músculo EDL causado pela sepse	41
Figura 9. Temperatura média dos grupos experimentais controle e sepse, até 72 horas da indução da sepse.....	51
Figura 10. Variação de peso absoluto, perda de peso e quantidade de alimento ingerido de animais controle e sépticos.....	53
Figura 11. Média da glicemia por grupo experimental controle e sepse.....	54
Figura 12. Pressão arterial e frequência cardíaca média de animais controle e sépticos em 24 horas de sepse.....	55

Figura 13. Níveis de uréia e creatinina de animais controle e sépticos em 24 horas da sepse.....	56
Figura 14. Valores médios de lactato de animais controle e sépticos durante a sepse.....	56
Figura 15. Valores médios de mieloperoxidase de animais controle e sépticos 24 horas após a indução da sepse.....	57
Figura 16. Análise da sobrevivência de animais controle, sépticos e sépticos que receberam tratamento com antibiótico, até 96 horas da indução da sepse.....	58
Figura 17. Lâminas histológicas representativas em coloração com hematoxilina e eosina do músculo EDL, em objetiva de 10X.....	59
Figura 18. Média da área das miofibras do músculo EDL em milímetros quadrados por grupo experimental.....	60
Figura 19. Área transversal média por grupo experimental em milímetros quadrados do músculo EDL.....	60
Figura 20. Imagens do músculo EDL por grupo experimental, geradas com o software ImageJ, para verificação do espaço intersticial entre as miofibras.....	61
Figura 21. Média da porcentagem de espaço intersticial entre as miofibras dos músculos EDL dos grupos experimentais, dez dias após a sepse.....	62
Figura 22. Fotos das lâminas histológicas evidenciando o músculo saudável e alterações patológicas causadas pela sepse.....	63
Figura 23. Marcações de imuno-histoquímica para a enzima NOS-1 no músculo EDL, dez dias após a indução da sepse, por grupo experimental.....	64
Figura 24. Marcação da enzima NOS-1 no músculo esquelético de animal naive e no	

músculo liso vascular, dez dias após a indução da sepse.....64

Figura 25. Média da quantificação da enzima NOS-1, por grupo experimental em unidades arbitrárias, dez dias após a sepse.....66

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Descrição dos grupos experimentais, de acordo com o tratamento de doação do óxido nítrico ou modulação das NOS.....40
- Quadro 2.** Tempos de inclusão em reagentes para histologia.....47
- Quadro 3.** Processo de desparafinização e coloração em hematoxilina e eosina.....47
- Quadro 4.** Reagentes e tempos de incubação das lâminas para imuno-histoquímica da enzima NOS-1.....48
- Quadro 5.** Taxa de sobrevivência de camundongos C57BL/6 de 4 meses de idade de acordo com o método de indução de sepse73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-NI	7-nitroindazol
BSA	Albumina Sérica Bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CDC	Centros de Controle de Doenças, do inglês <i>Centers of Disease Control</i>
CEUA	Comissão de Ética do Uso de Animais
CLP	Ligação e Perfuração Cecal, do inglês <i>Cecal Ligation and Puncture</i>
CS	Pasta Cecal, do inglês <i>Cecal Slurry</i>
CSA	Área Transversal, do inglês <i>Cross Sectional Area</i>
DAB	3,3' - Diaminobenzidina, do inglês <i>3,3' - Diaminobenzidine</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido, do inglês <i>Dimethyl Sulfoxide</i>
EDL	Músculo <i>Extensor Digitorum Longus</i>
EPM	Erro Padrão da Média
HTAB	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio, do inglês <i>Cetyltrimethylammonium Bromide</i>
IDH	Índice de Desenvolvimento Humano
I.M.	Intramuscular
I.P.	Intraperitoneal
L-NAME	Cloridrato de Éster Metílico de N ω -Nitro-L-arginina, do inglês <i>Nω-Nitro-L-</i>

Arginine Methyl Ester Hydrochloride

MODS	Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos, do inglês <i>Multiple Organ Dysfunction Syndrome</i>
NTP	National Toxicology Program
nNOS	Óxido Nítrico Sintase neuronal, do inglês <i>neuronal Nitric Oxide Synthase</i>
NO	Óxido Nítrico, do inglês <i>Nitric Oxide</i>
NOS	Óxido Nítrico Sintase, do inglês <i>Nitric Oxide Synthase</i>
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, do inglês <i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SNP	Nitroprussiato, do inglês <i>Nitroprusside</i>
SOFA	Avaliação Sequencial de Falência de órgãos, do inglês <i>Sequential Organ Failure Assessment</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	21
1.1. Doenças infecciosas e sepse.....	21
1.2. Pós-sepse e síndrome pós-sepse.....	22
1.3. Modelos de estudo da sepse.....	24
1.4. O músculo esquelético.....	26
1.5. Sepse e músculo esquelético.....	29
1.6. O óxido nítrico na sepse.....	30
1.7. O papel do óxido nítrico no dano muscular ocasionado pela sepse.....	32
2. JUSTIFICATIVA.....	33
3. HIPÓTESES.....	33
4. OBJETIVOS.....	34
4.1. Objetivo geral.....	34
4.2. Objetivos específicos.....	34
5. METODOLOGIA.....	34
5.1. Animais.....	35
5.2. Drogas e reagentes.....	35
5.3. Método <i>Cecal Slurry</i> (CS).....	35
5.4. Delineamento experimental.....	37
5.4.1. <i>Adaptação do método Cecal Slurry (CS) para camundongos fêmeas Swiss</i>	37
5.4.2. <i>Avaliação de parâmetros da fase aguda da sepse (24 horas após a indução da sepse)</i>	38
5.4.3. <i>Influência do óxido nítrico no dano tardio do músculo esquelético causado pela sepse</i>	39
5.5. Verificação dos parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais	41
5.5.1. <i>Aferição de temperatura, peso e alimentação</i>	42
5.5.2. <i>Mensuração de glicemia</i>	42
5.5.3. <i>Determinação da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)</i>	42
5.6. Coleta de amostras biológicas.....	43
5.7. Protocolos experimentais com amostras biológicas.....	44
5.7.1. <i>Ureia</i>	44
5.7.2. <i>Creatinina</i>	44
5.7.3. <i>Lactato</i>	45

5.7.4. Mieloperoxidase.....	46
5.7.5. Histologia das amostras biológicas.....	47
5.7.6. Imuno-histoquímica do músculo EDL.....	48
5.7.7. Análise histológica e quantificação de NOS-1 do músculo EDL.....	49
5.8. Análises estatísticas.....	50
6. RESULTADOS.....	51
6.1. Avaliação da temperatura, peso, alimentação e glicemia de animais controle e sépticos.....	51
6.1.1. Aferição da temperatura dos animais controle e sépticos.....	51
6.1.2. Determinação do peso e alimentação dos animais controles e sépticos.....	52
6.1.3. Mensuração de glicemia de animais controle e sépticos.....	53
6.2. Avaliação fisiológica da sepse aguda por modelo <i>Cecal Slurry</i> (CS).....	54
6.2.1. Medição da pressão arterial e frequência cardíaca em animais controle e sépticos.....	54
6.2.2. Níveis de uréia e creatinina em animais controle e sépticos.....	55
6.2.3. Níveis de lactato em animais controle e sépticos.....	56
6.2.4. Níveis de mieloperoxidase em animais controle e sépticos.....	57
6.3. Análise de sobrevivência de animais sépticos.....	57
6.3.1. Curva de sobrevivência.....	57
6.4. Análise do músculo EDL.....	58
6.4.1. Lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina.....	58
6.4.2. Análise da média da área das miofibras.....	59
6.4.3. Análise da área transversal (<i>Cross Sectional Area, CSA</i>).....	60
6.4.4. Análise do espaço intersticial entre as miofibras.....	61
6.4.5. Análise do dano muscular.....	63
6.4.6. Imuno-histoquímica do músculo EDL para NOS-1.....	63
6.4.7. Quantificação da enzima NOS-1.....	65
7. DISCUSSÃO.....	66
7.1. Padronização do modelo <i>Cecal Slurry</i> em camundongos <i>Swiss</i> fêmeas.....	66
7.2. Influência do óxido nítrico no dano tardio do músculo esquelético causado pela sepse.....	74
8. CONCLUSÕES.....	77
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças infecciosas e sepse

Doenças infecciosas têm sido a maior causa de morte humana desde os primeiros registros. Como exemplo, há ampla evidência de que aproximadamente um terço a metade da população da Europa e da Ásia foi dizimada pela Peste Negra (FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009). Ao longo da história humana, houve pelo menos 17 pandemias, datadas desde o ano 541, causadas por diversos agentes patogênicos, como *Yersinia pestis*, *Vibrio cholerae*, diversas variantes de influenza A MERS-CoV, e SARS-CoV-2, o causador da pandemia mais recente, com início em 2019 e ainda em curso (PIRET & BOIVIN, 2021).

Os agentes causadores de doenças são divididos em 5 grupos: vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos. O curso de uma infecção pode ser separado em estágios, mas apenas quando um agente patogênico estabelece com sucesso um sítio de infecção no hospedeiro, é que ocorre uma doença. No geral, pouco dano é causado, a não ser que o patógeno consiga se espalhar a partir do ponto de infecção inicial, ou secrete toxinas que possam ser propagadas no organismo infectado (JANEWAY JR et al., 2001).

Agentes infecciosos podem ainda causar infecções sistêmicas, ao se disseminarem pelo hospedeiro principalmente pela corrente sanguínea, e assim podem infectar qualquer órgão no corpo. No entanto, infecções sistêmicas podem vir a evoluir para um quadro de sepse, como uma condição ameaçadora à vida, e o órgão ou tipo celular que um patógeno infecta é um determinante das manifestações clínicas da doença (WALKER, 2014).

A palavra sepse apareceu pela primeira vez nos poemas de Homero, e era associada à decomposição biológica e putrefação no organismo (GEROULANOS & DOUKA, 2006). Foi somente mais tarde, no final do século XIX, que a sepse foi ligada à comunidade médica. Denominada anteriormente como septicemia, era considerada uma doença associada à bactérias, pelo envenenamento químico causado pelos produtos produzidos por elas (BOTERO & PÉREZ, 2012).

Infecções que levam à sepse frequentemente começam no pulmão, sistema urinário, sistema gastrointestinal e pele. Infecções bacterianas causam o maior número de casos de sepse, porém ela também pode ser ocasionada a partir de infecções fúngicas e virais, como em casos de influenza e COVID-19. Os indivíduos mais suscetíveis são idosos acima de 65 anos, imunossuprimidos, pessoas com doenças crônicas (diabetes,

câncer, doenças renais, etc.), crianças com menos de 1 ano de idade, e pessoas que recentemente tiveram uma doença grave, sepse ou foram internadas. (CDC, 2022)

Antigamente, a sepse foi considerada uma síndrome que possuía um amplo espectro de gravidade, tendo o estágio inicial em forma de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) na presença de uma infecção. Já a sepse grave tinha evidências de disfunção de órgãos e hipoperfusão tecidual, e o choque séptico, hipotensão que persistia mesmo com a realização da ressuscitação de fluidos. Por último, o estágio de síndrome da falência de múltiplos órgãos (MODS), consistia na falha de dois ou mais órgãos pela incapacidade de manter a homeostase sem intervenção hospitalar (GRIFFITHS & ANDERSON, 2009).

O seu conceito moderno é baseado na resposta inflamatória da síndrome, mas sua definição e critérios envolvidos são um processo contínuo, do acúmulo do conhecimento de seus mecanismos ao longo do tempo. Isso reflete no sucesso e na falha do seu diagnóstico e nas intervenções terapêuticas, e na identificação da sepse, sua gravidade e do prognóstico do paciente (SALOMÃO et al., 2019).

A definição mais atual e aceita é que a sepse é caracterizada como uma disfunção de órgãos ameaçadora à vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção. Além disso, a mensuração da falência de múltiplos órgãos pode ser representada pelo aumento na análise de falência de órgãos sequencial (*Sequential Organ Failure Assessment*, ou SOFA) como parâmetro para tomada de decisões clínicas (SINGER et al., 2016).

No ano de 2017, foram registrados 48,9 milhões de casos da doença, e destes, 11 milhões vieram a óbito, o que representa quase 20% de todas as mortes mundiais. No entanto, é estimado que os números reais sejam o dobro do que previamente relatado, devido à falta de dados da população que vive em áreas de baixo IDH; e quase metade das mortes associadas à síndrome ocorrem depois da mesma (RUDD et al., 2020).

A síndrome pode levar à morte de até 50% dos pacientes internados em unidades de terapia intensiva, e mesmo após a alta, os pacientes sobreviventes também exibem uma taxa de mortalidade muito elevada, quando comparada com os pacientes de qualquer outra doença. Os mecanismos por trás disso ainda são desconhecidos, tanto celulares quanto moleculares, e ainda não é possível estabelecer relações pela falta de informação sobre o assunto (GRITTE et al., 2021)

1.2. Pós-sepse e síndrome pós-sepse

Além da baixa expectativa de sobrevivência e piora da qualidade de vida, os pacientes sobreviventes podem sofrer efeitos a longo prazo que podem durar meses, e até anos depois que os sintomas da sepse ativa tenham sido resolvidos. Dentre estes problemas, destaca-se desordens neurocognitivas, deficiências funcionais e piora de condições médicas. Essas consequências são consideradas sequelas, e parecem ter um padrão consistente (MOSTEL et al., 2020).

Assim como cresce o número de casos, também aumenta o número de sobreviventes, que podem sofrer da “síndrome pós-sepse” após a alta hospitalar. Essa síndrome envolve danos em múltiplos sistemas, como o imune, renal, cognitivo e cardiovascular. Essas consequências juntas levam a novas hospitalizações, piora da qualidade de vida e aumento da mortalidade, e entender sua patofisiologia é crucial para melhorar as condições de vida de seus sobreviventes (VAN DER SLIKKE et al., 2020).

Em um trabalho de Schmidt et al., 2020, foi demonstrada uma mortalidade de pacientes sépticos de quase 75%, até o período de 4 anos após o diagnóstico da doença. Após o diagnóstico, metade dos pacientes faleceram em até 70 dias, e quase 20% dos pacientes vieram a óbito dentro do primeiro ano de acompanhamento do estudo. Isso evidencia a mortalidade causada por esta síndrome a longo prazo.

Ademais, apesar da taxa de mortalidade dos doentes ter reduzido recentemente, resultando em um aumento dos números dos sobreviventes, as diretrizes atuais não fornecem orientação sobre o cuidado após a alta hospitalar ou período de recuperação. O agravamento das complicações depois da alta está associado com um pior estado de saúde antes do desenvolvimento da doença, características do episódio de sepse aguda (como a gravidade da infecção e resposta do hospedeiro), e a qualidade do tratamento hospitalar (PRESCOTT & ANGUS, 2018).

Os estudos clínicos têm focado na sobrevivência de curto prazo, e existem poucos dados sobre a recuperação a longo prazo. Há muitos caminhos clínicos que um paciente pode passar após a hospitalização, desde uma rápida e completa melhora a complicações recorrentes e morte. As prioridades de estudos de longo prazo são os mecanismos envolvidos na morbidade crônica, para incorporação de acompanhamento e trajetórias de recuperação e sobrevivência entre os pacientes, bem como pesquisas de ensaios terapêuticos (PRESCOTT et al., 2019).

Cerca de 40% dos sobreviventes desenvolvem a síndrome pós-sepse. Dentre os sintomas físicos mais comuns estão a letargia, fadiga excessiva, baixa mobilidade, falta

de ar, inchaço dos membros por inflamação excessiva, dor no peito, e até a incapacidade de caminhar. Comumente, a recuperação da síndrome pós-sepse leva de 6 a 18 meses, mas alguns pacientes demandam mais tempo, ou até nunca recuperam a normalidade de antes do episódio de sepse (DANIELS & NUTBEAM, 2019).

Dentre os riscos, também aumentam as chances de desenvolvimento de síndromes de fraqueza persistente adquirida, tanto dos músculos respiratórios como dos locomotores. Essa fraqueza adquirida resulta em uso prolongado de ventilação mecânica, limitação de exercício e comprometimento funcional dos músculos. Há ampla evidência de que a sepse causa uma miopatia caracterizada por atrofia, redução da capacidade de geração de força e alteração da bioenergética (CALLAHAN & SUPINSKI, 2009).

1.3. Modelos de estudo da sepse

Camundongos são os animais mais utilizados em pesquisas pré-clínicas, e possuem a capacidade de uso de linhagens geneticamente modificadas e oportunidade de estudo de genes particulares na patogênese da doença. Além disso, têm a vantagem de não serem considerados animais de companhia, e portanto seu uso é considerado mais ético, além de diversos reagentes e kits comerciais designados para a espécie já estarem comercialmente disponíveis, o que facilita a mensuração de parâmetros biológicos (FINK, 2014).

Existem três principais modelos de sepse, os modelos de infecção bacteriana, de endotoxemia, e da disrupção da barreira do hospedeiro, como por exemplo por ligação e perfuração cecal (CLP). Estudos clínicos mostram que a eficácia da terapia medicamentosa na sepse pode depender do quadro de sua gravidade, e uma melhor divisão dos estados dos modelos poderia aprimorar o conhecimento sobre a patogênese e habilidade de tratamentos especializados conforme a condição inflamatória dos indivíduos (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005).

O método CLP é atualmente o padrão-ouro para a pesquisa sobre a sepse, pois gera uma representação da complexidade da sepse humana. Para isso, primeiramente os animais são anestesiados e passam por uma laparotomia e têm seu ceco isolado. Após, o ceco é ligado abaixo da válvula ileocecal e perfurado duas vezes com agulha. O abdômen é suturado em duas camadas, e é feita a reposição de fluidos antes do animal retornar a sua caixa (HUBBARD et al., 2005).

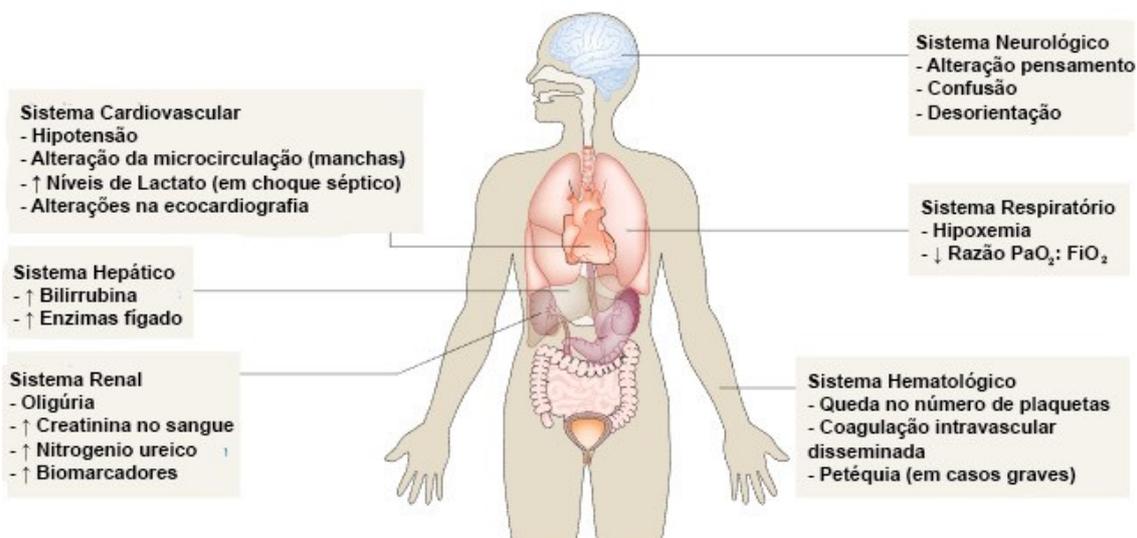
Porém, esse método pode não ser o mais apropriado, devido a diferença do tamanho e conteúdo do ceco de animais, e também em relação a diferentes idades ou condições de saúde. O modelo de pasta cecal (*Cecal Slurry*, CS) parece ser mais vantajoso, já que a quantidade de conteúdo cecal é padronizada, não é necessário o uso de anestésicos ou realização de cirurgia, portanto não há diferenças entre os grupos experimentais em relação à resposta a cirurgia, além de poder ser feito em um grande número de animais (STARR et al., 2014).

Esse mesmo modelo é capaz de induzir a sepse tanto por endotoxemia, quando por bacteremia prolongada, de forma polimicrobiana e com organismos endógenos ao hospedeiro, e possui uma maior reprodutibilidade. Ademais, é possível induzir tanto uma forma moderada, quanto severa da doença, e a mortalidade pode ser controlada dependendo da dose de conteúdo cecal injetado, e da idade dos camundongos (STARR et al., 2014).

Para detecção da síndrome em humanos, de sua severidade e falência de múltiplos órgãos, é utilizado o escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*), ou análise sequencial de falência de órgãos. Dentre os seus sistemas avaliados, estão o cardiovascular, neurológico, respiratório, renal, hepático e hematológico. As principais mensurações são acerca da frequência cardíaca e respiratória, pressão arterial, bilirrubina, uréia e creatinina, além da escala Glasgow (Figura 1) (JONES; TRZECIAK; KLINE, 2009).

Além dessas mensurações, são analisados outros parâmetros clínicos complementares para a detecção e avaliação de severidade da sepse, dentre eles os níveis de glicose para verificação de hipoglicemia ou hiperglicemia (FERREIRA et al., 2017), níveis de lactato, para identificação de choque séptico e de um pior prognóstico (LEE & AN, 2016), e aferição de temperatura, para verificação de febre ou hipotermia (THOMAS-RÜDDEL et al., 2021). Existem ainda novos biomarcadores em desenvolvimento, como a mieloperoxidase, cuja avaliação pode ajudar no diagnóstico e predição de prognóstico da doença. (SCHRIJVER et al., 2017).

Figura 1. Sistemas orgânicos e parâmetros utilizados para a avaliação do escore SOFA na detecção da sepse.



Sistemas analisados para identificação de falência de múltiplos órgãos na sepse, dentre eles o sistema cardiovascular, hepático, renal, hematológico, respiratório e neurológico.

Fonte: Adaptado de Lelubre & Vincent, 2018.

1.4. O músculo esquelético

O músculo esquelético representa o maior sistema corporal em humanos. Dentre suas funções, é responsável pela postura e produção de movimento, regulação da termogênese, metabolismo e secreção de peptídeos para a comunicação com outros tecidos (CSAPO; GUMPENBERGER; WESSNER, 2020). Ele compõe aproximadamente 40% da massa seca corporal total, e cerca de 50% a 75% de todas as proteínas (FRONTERA & OCHALA, 2015).

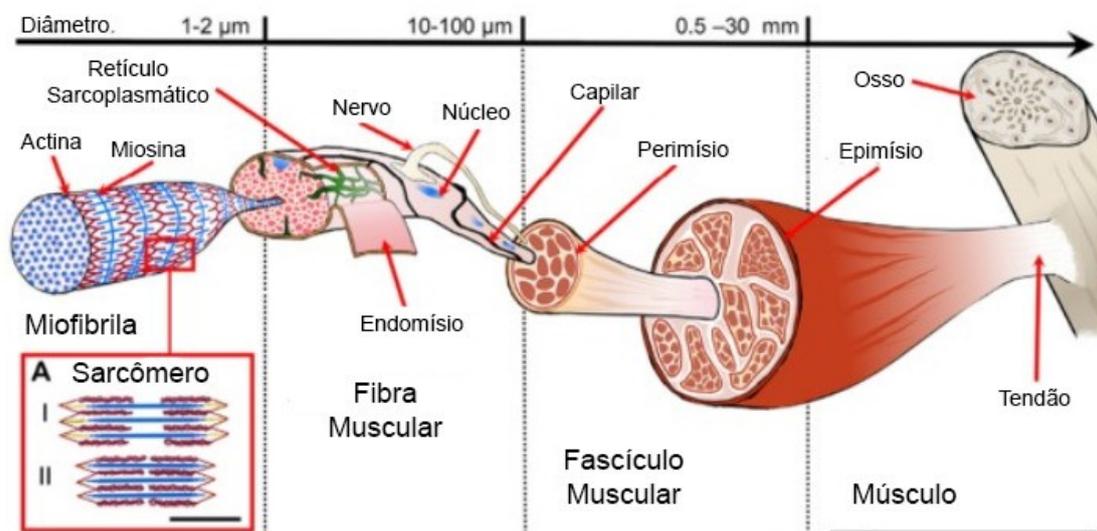
Suas células são multinucleadas e denominadas fibras, ou miofibras, altamente especializadas para a produção de movimento e geração de força isométrica máxima. O diâmetro das fibras possui grande importância na determinação de sua força, e seu comprimento determina a sua velocidade máxima de contração. Ao redor das fibras, encontra-se a lâmina basal e entre elas há uma bainha de colágeno denominada endomísio, que exercem um papel de suporte dessas células (Figura 2) (LIEBER, 2002).

Abaixo do endomísio, está a membrana plasmática das miofibras, o sarcolema. Ele é uma membrana excitável que possui várias similaridades com uma membrana de célula neuronal. Invaginações do sarcolema (túbulos T) se estendem para o interior da fibra na junção das bandas A e I, e se conectam com o retículo sarcoplasmático. A excitação do sarcolema e dos túbulos T leva a liberação de cálcio do retículo

sarcoplasmático e a iniciação da contração pelos miofilamentos (Figura 2) (DEISCH, 2017).

Conjuntos de miofibras são referidos como fascículas, que junto com o perimísio que os revestem ajudam a formar a estrutura muscular. Nas fibras, sua principal unidade formadora são as miofibrilas, organelas responsáveis pela contratilidade muscular, e diversas mitocôndrias, que provêm a energia necessária para a contração e núcleos encarregados das instruções de produção de proteínas da fibra (Figura 2) (MACINTOSH; GARDINER; MCCOMAS, 2006).

Figura 2. Estrutura do músculo esquelético

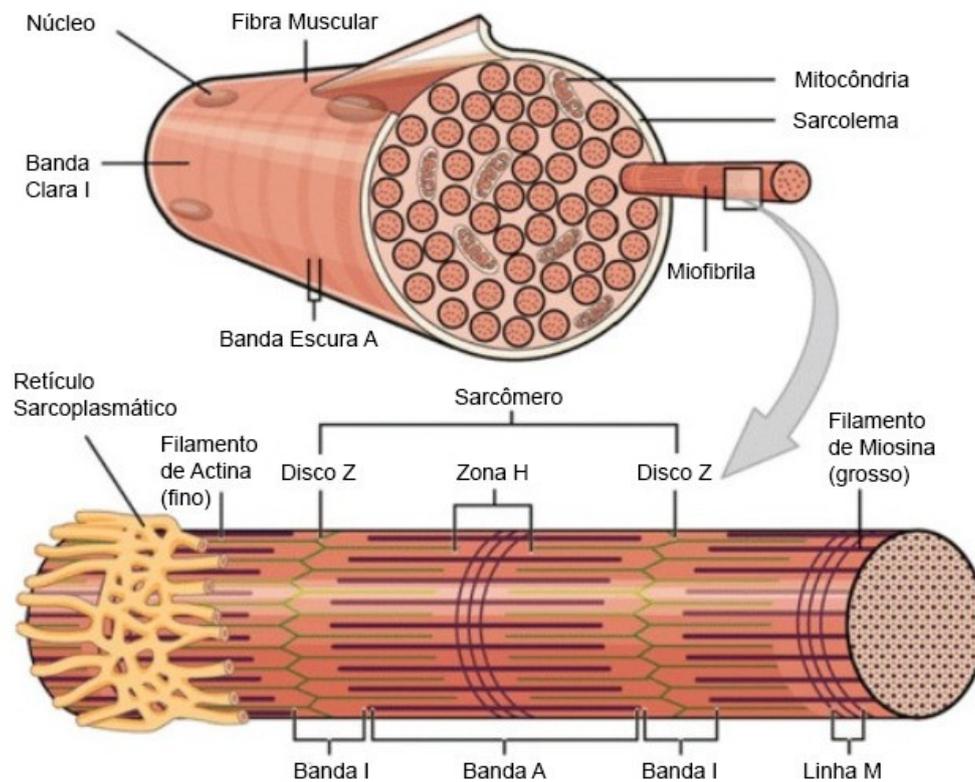


Estrutura do músculo esquelético, desde sua composição macroscópica, até os filamentos de actina e miosina organizados em sarcômeros. O músculo é ancorado ao osso por um tendão, e é dividido em fascículas, contendo suas miofibras. Dentro de cada miofibrila estão presentes diversas miofibrilas, formadas por sarcômeros e filamentos de actina e miosina.

Fonte: Adaptado de Gotti et al., 2020.

As miofibrilas têm ainda unidades contráteis chamadas sarcômeros compostos por dois filamentos proteicos principais, a actina e a miosina (Figura 3). A força é gerada quando filamentos de actina deslizam pelos filamentos de miosina, e resultam na contração dos sarcômeros. Filamentos de miosina são mais grossos e possuem diversas cabeças que se ligam aos filamentos mais finos de actina, formando pontes de actina e miosina. Como os sarcômeros estão ligados de ponta a ponta em toda a miofibrila, sua contração simultânea contrai todo o músculo (MANSFIELD & NEUMANN, 2019).

Figura 3. Organização da miofibrila do músculo esquelético.

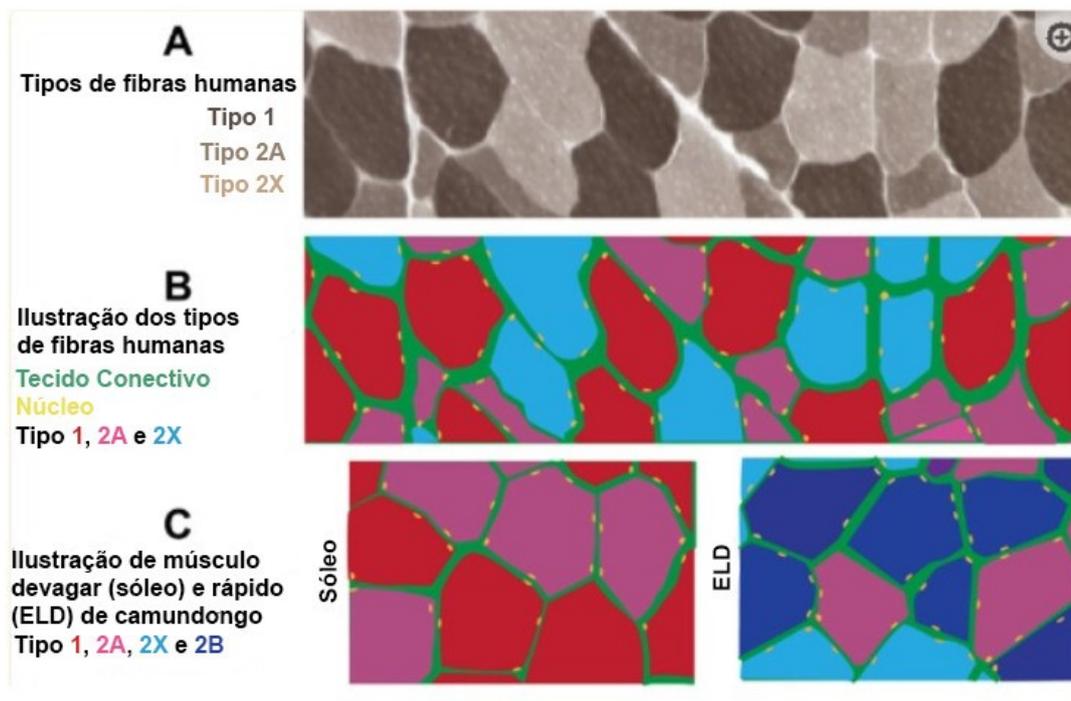


Corte transversal de miofibrila do músculo esquelético, evidenciando os núcleos, miofibrilas e sarcolema, e aumento da miofibrila com realce do sarcômero, retículo sarcoplasmático, filamentos de actina e miosina e suas bandas.

Fonte: Adaptado de Oliver; Seddon; Trask, 2016.

Em geral, as miofibras são classificadas em tipos de contração rápida e de contração lenta, definidas pelas isoformas de miosina que expressam (figura 4). Também são definidas pela sua velocidade de fadiga e contração, e seu tipo metabólico. O tipo de miofibrila pode impactar em miopatias desenvolvidas, e recentemente tem surgido pesquisas acerca de sua suscetibilidade ou resistência a doenças, porém em muitos casos não é claro porque certos tipos de fibras são mais afetados (TALBOT & MAVES, 2016).

Figura 4. Representações dos tipos de fibras do músculo esquelético.



(A) Lâmina histológica de músculo EDL humano, com diferenciação de tipos de fibras, (B) Ilustração da lâmina histológica humana com tipos de fibras, tecido conjuntivo e núcleos periféricos das células e (C), Ilustração dos tipos de fibras com tecido conjuntivo e núcleos periféricos dos músculos sóleo (contração lenta) e EDL (contração rápida) de camundongo.

Fonte: Adaptado de Talbot & Maves, 2016.

1.5. Sepses e músculo esquelético

Pesquisas com sobreviventes de sepse de mais de 41 países mostraram que alguns dos seus principais problemas decorrentes da sepse estão relacionados com o músculo esquelético. Dentre os problemas musculares se encaixam a piora da respiração, dor no peito, presença de fadiga, perturbação de sono e aumento da dificuldade na realização de atividades diárias, como leitura e fala. Melhorias para a assistência médica para esse grupo de pessoas é uma área que necessita de avanços. (HUANG et al., 2019).

Além dos problemas citados acima, a perda de massa muscular também é frequente em pacientes com sepse, como uma consequência da resposta catabólica no músculo esquelético. Ela pode ocorrer devido ao desequilíbrio entre a síntese e a degradação de proteínas musculares, sendo aumento da degradação mais essencial que a diminuição da síntese proteica, na diminuição da tolerância ao exercício físico e risco aumentado de complicações tromboembólicas e pulmonares (LEE & KIM, 2010).

Investigações sobre associações da sepse com um pior prognóstico e aumento da mortalidade dos pacientes mostram relação com a perda de massa muscular. Essa associação também ocorre em casos de sarcopenia, e influencia no tempo de sobrevivência dos indivíduos (ZHANG et al., 2021). Apesar da perda de massa ocorrer rapidamente durante a sepse, a recuperação pode demorar consideravelmente, e não há estudos publicados sobre a reabilitação dos sobreviventes (JONES & GRIFFITHS, 2013).

Durante a perda de massa e da atrofia muscular (definida como uma diminuição no tamanho de um tecido ou órgão), as proteínas contráteis, citoplasma, e as organelas das células musculares são removidas. Isso resulta no encolhimento das miofibras do músculo esquelético, como resultado da ativação de sistemas proteolíticos. Esses diferentes sistemas se conectam em vias de sinalização que controlam a síntese e a degradação proteica simultaneamente, influenciando na performance contrátil muscular (BONALDO & SANDRI, 2013).

Nos músculos respiratórios, a deficiência na contração ocorre por defeitos que atuam na geração de força, aumento da demanda metabólica e da frequência respiratória. Eles são mediados por interações com prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias, fatores de ativação de plaquetas, endotoxinas bacterianas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico. Os efeitos fisiológicos da maior atividade de enzimas produtoras de óxido nítrico na contratilidade e performance de músculos respiratórios e dos membros ainda devem ser elucidados (HUSSAIN, 1998).

1.6. O óxido nítrico na sepse

O óxido nítrico (NO) é um gás, que é sintetizado em diversos tecidos a partir do aminoácido L-arginina, por três isoformas das enzimas óxido nítrico sintases (NOS). Dentre suas funções, o NO age como regulador da pressão e fluxo sanguíneos, como um neurotransmissor, na defesa do hospedeiro contra microrganismos. Também interage com outras moléculas, como o oxigênio, e forma oxidantes que modificam proteínas por nitração e nitrosação, especialmente em desordens inflamatórias (BRUCKDORFER, 2005).

As óxido nítrico sintases são denominadas como NOS-1 (ou NOS neuronal, nNOS), NOS-2 (ou NOS induzida, iNOS), e NOS-3 (ou NOS endotelial, eNOS). A NOS-1 e a NOS-3 são constitutivamente expressas no organismo, e agem na vasodilatação e regulação da pressão sanguínea arterial e na neurotransmissão, etc. Já a NOS-2 é expressa

em diversas células em resposta a lipopolissacarídeos e citocinas, gerando grandes quantidades de NO de efeito citostático em células-alvo parasitadas, que contribuem para a inflamação e choque séptico (FÖRSTERMANN & SESSA, 2012).

O equilíbrio dos efeitos danosos e positivos da regulação da síntese de NO é determinado pelo local e grau em que essa síntese ocorre na sepse. Recentemente, têm sido desenvolvidas possíveis abordagens que buscam vias envolvidas na modulação da síntese do NO e na inibição de NOS, a partir do controle da atividade das NOS, doação ou inibição de NO, a fim de regular a pressão arterial e função de órgãos durante o quadro séptico (LAMB DEN, 2019).

O fármaco de uso experimental L-NAME é amplamente utilizado tanto *in vitro*, como *in vivo*, como um inibidor da atividade das NOS. O tratamento agudo e crônico desse inibidor leva a mudanças na pressão sanguínea e reatividade vascular, devido a subsequente redução da biodisponibilidade de NO. No entanto, em doses baixas e por tempo prolongado, o L-NAME pode ativar a produção de NO. Existem diferenças na modulação de produção de NO a partir do uso desse fármaco a depender do tecido, e da dose administrada (KOPINKOVÁ; PÚZSEROVÁ; BERNÁTOVÁ, 2012).

O L-NAME já foi utilizado em pacientes sépticos humanos e teve que sua infusão contínua restaurou a pressão arterial média e a resistência vascular sistêmica, além da troca gasosa nos pulmões. Porém, houve grandes complicações pelo grande aumento da taxa de mortalidade, e mais estudos são necessários para determinar se a inibição das NOS é benéfica na sepse antes de ser utilizado na prática clínica (LÓPEZ et al., 2004)

Por outro lado, a doação do óxido nítrico na sepse ocasiona em melhorias na sobrevivência, hipertensão pulmonar e perfusão tecidual, além de restaurar o fluxo microcirculatório na sepse. Em contrapartida, sua administração diminui ainda mais a pressão arterial. Mas, apesar de todos os seus benefícios, na relevância clínica, não atende os critérios necessários para sua extrapolação na prática clínica, e há uma lacuna na literatura que deve ser melhor investigada (LAMONTAGNE et al., 2008).

A inibição seletiva de NOS também é utilizada em pesquisas, sendo que a NOS-1 parece estar envolvida nos processos inflamatórios na sepse. A sua inibição farmacológica através do uso de 7-nitroindazol (7-NI) aumenta o risco de mortalidade, o recrutamento de leucócitos ao sítio da infecção e a resposta de citocinas e diminui a eliminação de bactérias na corrente sanguínea. Desse modo, essa enzima teria papel protetor durante a sepse, mas ainda não é possível extrapolar os estudos para outras espécies senão roedores (CUI et al., 2007).

Com isso, a modulação farmacológica do NO pode ser um mecanismo chave no controle da disfunção circulatória na sepse, já que apenas a ressuscitação de fluidos e uso de vasopressores não corrige a perfusão má distribuída entre e dentro dos órgãos. Assim, o desenvolvimento de terapias com NO poderia ser crucial no manejo da sepse, de modo a complementar os tratamentos existentes (LUPP et al., 2013).

1.7. O papel do óxido nítrico no dano muscular ocasionado pela sepse

Na sepse, trabalhos iniciais indicam que o aumento exagerado da síntese de NO é um importante mediador em potencial para a ocorrência do choque séptico. A síntese é desregulada, com produção exagerada, e ocasiona em falência bioenergética, disfunção cardiovascular e toxicidade celular. Ainda, a redução da produção do NO no endotélio pode ser uma das causas da função microvascular prejudicada (LAMB DEN, 2019).

No músculo esquelético, o NO controla a diferenciação de miócitos, respiração, produção de força e homeostase de glicose. A enzima NOS-1 é considerada a principal produtora de óxido nítrico no músculo EDL (*extensor digitorus longus*) durante a sepse (LIDINGTON; LI; TYML, 2007). Mas, apesar de todas as isoformas da NOS serem expressas no músculo esquelético, é a NOS-1 que parece ter preferência de localização nas miofibras, principalmente naquelas de contração rápida (STAMLER & MEISSNER, 2001).

Em amostras do músculo *rectus abdominis* humano, a sepse induziu modificações na expressão de NOS-1, que ocasionou na diminuição da atividade constitutiva de óxido nítrico sintases e da quantidade dessa proteína no músculo. Essas modificações parecem ter relação com os prejuízos musculares sofridos pelos pacientes, já que a expressão proteica foi correlacionada significativamente com a sua severidade (LANONE et al., 2001).

O envolvimento da NOS-1 no músculo esquelético parece ser ambíguo, já que possui um papel protetor na contratilidade do diafragma, mas parece não estar envolvida no dano ao sarcolema nessa síndrome (COMTOIS et al., 2001). Portanto, o caráter benéfico ou danoso do óxido nítrico produzido pela nNOS no músculo esquelético na sepse ainda é incerto e muito pouco estudado, mas possui grande importância para identificar os mecanismos por trás da miopatia adquirida e das sequelas presentes na síndrome pós-sepse.

2. JUSTIFICATIVA

A partir dos dados da literatura expostos acima, fica claro que a sepse é uma doença grave que afeta o sistema de saúde mundial, e que estudos sobre sua patofisiologia são extremamente relevantes para o seu combate. Além disso, durante a sepse ocorre um aumento exagerado de NO no organismo, que está envolvido com a hipotensão e alteração do fluxo sanguíneo microvascular, que leva a alterações sistêmicas e a falência de órgãos.

O NO pode ainda causar irresponsividade da vasodilatação na sepse, e devido à grande proporção do músculo esquelético (cerca de 40% da biomassa e 50-75% das proteínas), esse gás presente nesse órgão pode ser crucial nesse processo, sendo que a enzima NOS-1, e não a NOS-2 pode ser a principal fonte do aumento endógeno do NO no músculo, já que é a isoforma de maior abundância nesse tecido. Ademais, a grande quantidade de NO e NOS-1 no músculo está relacionada com miopatias persistentes induzidas pela sepse.

Como dito anteriormente, a inibição da produção de NO melhora os parâmetros cardiovasculares em diversos aspectos durante o quadro séptico, mas pouco se sabe o efeito dessa inibição no músculo esquelético, ou no período após a sepse. Com isso, verificar os impactos do óxido nítrico e da modulação do NO no músculo esquelético é de suma importância para o entendimento do desenvolvimento das disfunções musculares ocasionadas pela sepse, e para a melhora da recuperação e qualidade de vida de sobreviventes da doença.

3. HIPÓTESES

Este projeto apresenta as seguintes hipóteses: H0) o método *Cecal Slurry* de indução da sepse ocasiona em dano muscular que permanece no período pós-sepse, e portanto pode ser um modelo de estudo de miopatias ocasionadas pela sepse, e H1) o método *Cecal Slurry* não é capaz de promover o dano muscular persistente, e não deve ser utilizado em pesquisas de alterações patológicas do músculo esquelético após a sepse.

Em relação ao dano muscular esquelético e o NO, temos que H0) a modulação do NO no músculo esquelético agrava o dano muscular induzido pela sepse, e H1) a modulação do NO no músculo esquelético não tem efeito sobre o dano muscular causado pela sepse.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Padronizar o método *Cecal Slurry* de indução da sepse em camundongos fêmeas da linhagem *Swiss* e verificar o impacto do óxido nítrico e da inibição da produção de NO dano muscular causado pela sepse.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Adaptar o método *Cecal Slurry* da linhagem de camundongos C57BL/6 machos para camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*.

4.2.2. Mensurar os parâmetros fisiológicos (temperatura, peso, ingestão alimentar, uréia, creatinina, lactato, mieloperoxidase, pressão arterial média e frequência cardíaca) em animais em quadro de sepse induzida pelo *Cecal Slurry*.

4.2.3. Realizar as análises morfométricas do músculo EDL (área média das miofibras, área transversal e espaço intersticial entre as miofibras) no período pós-sepse

4.2.4. Verificar o impacto do óxido nítrico e modulações das NOS no dano muscular no período pós-sepse.

4.2.5. Fazer a imuno-histoquímica para localizar e quantificar a enzima NOS-1 no músculo EDL no período pós-sepse.

4.2.6. Verificar a influência do óxido nítrico e modulações das NOS na presença da enzima NOS-1 no músculo EDL no período pós-sepse.

4.2.7. Relacionar a quantidade de NOS-1 no músculo EDL com as alterações patológicas sofridas pela sepse.

5. METODOLOGIA

5.1. Animais

No total, foram utilizados 165 camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*, com idade de 45-120 dias e peso em torno de 30-50 gramas, com aprovação do CEUA número 4274200721, ID 067314; e origem do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Todos foram aclimatados no biotério do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal (LabCaRe), no Departamento de Farmacologia, com ciclo de claro/escuro de 12/12 horas, a uma temperatura ambiente de 23 ± 2 °C, por pelo menos uma semana antes do início dos experimentos, com 4 a 5 animais por caixa. As fêmeas receberam vermífugo albendazol diluído em água nos primeiros 3 dias, sendo 2 ml diluídos em 300 ml de água, e tiveram comida e água ofertadas à vontade durante todo o tempo, sem restrições.

5.2. Drogas e reagentes

Os reagentes utilizados nesse estudo foram: cetamina (Dopalen™, adquiridos de Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), xilazina (Anasedan™, adquiridos de Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), enrofloxacina 10% (Fabiani Saúde Animal, São Paulo, SP, Brasil), heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP, Brasil), 7-nitroindazol (7-NI), L-NAME, nitroprussiato de sódio (SNP), dimetil-sulfóxido (DMSO) de Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, USA, 3,3' - Diaminobenzidina (DAB), Triton X-100, brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), tetrametilbenzidina, peróxido de hidrogênio, carbonato de lítio (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA), anticorpo policlonal de coelho anti-NOS-1 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA), soro fetal bovino (GIBCO, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil), Entellan® (Merck, Darmstadt, Alemanha), paraformaldeído, álcool etílico absoluto, xilol absoluto, eosina amarelada, álcool metílico (metanol) (ACS Científica, Sumaré, SP, Brasil), hematoxilina de Harris (Newprov, Pinhais, Paraná, Brasil). Todos os compostos foram diluídos para uso em água destilada. O 7-NI foi diluído em DMSO puro na concentração de 20 mg/ml.

5.3. Método *Cecal Slurry* (CS)

Para a indução da sepse, o estudo se baseou no trabalho de Starr et al. (2014), em que é descrito um novo protocolo experimental de indução de sepse a partir da pasta cecal

(*Cecal Slurry*, CS), que é menos invasivo, como alternativa ao modelo padrão-ouro de ligação e perfuração cecal (CLP). Ele consiste na coleta do conteúdo cecal de animais eutanasiados, e desse conteúdo é feita uma solução filtrada e diluída em água destilada, que depois é congelada e aliqüotada para uso posterior (Figura 5).

Para realização do procedimento foram utilizados animais doadores do ceco, que foram sacrificados sempre no período da manhã, com dose letal de quetamina e xilazina (3 vezes a dose anestésica 90/15 mg/kg) intraperitoneal (i.p.). Logo após, foi feita uma incisão no abdômen dos animais, de aproximadamente 2 centímetros, e o ceco foi localizado e exposto para fora da cavidade abdominal. Com uma tesoura, o ceco foi retirado cortando-se suas alças adjacentes, cerca de 1 centímetro de distância do órgão.

Os órgãos coletados foram posicionados em placa de Petri, e abertos com um corte em uma de suas extremidades. O conteúdo cecal foi coletado com espátula, pesado em balança analítica e transferido para um bécker de 100 ml, em que foi adicionado 0,5 ml de salina para cada 100 mg de fezes. O bécker foi posicionado em um agitador magnético, e uma barra magnética foi colocada para homogeneizar a solução.

A partir disso, a solução homogeneizada foi filtrada três vezes consecutivas, primeiramente com uma peneira, e depois utilizando dois filtros de *mesh* de abertura 0,25 e 0,074 milímetros (mm). O volume do filtrado final foi mensurado, e foi adicionado o mesmo volume de água destilada à solução. Por fim, a solução foi aquecida em banho-maria a 37 °C, por cerca de cinco minutos, antes de ser injetada nos animais. Ao contrário do método original, a solução final não foi congelada ou diluída em glicerol, e foi utilizada fresca, pois foi feita exata para o número de animais sépticos.

Figura 5. Protocolo original utilizado para adaptação do método *Cecal Slurry* para a indução da sepse em camundongos fêmeas *Swiss*



(A) Cecos coletados dos camundongos, (B) Coleta do conteúdo cecal e adição de água destilada, (C) Filtragem da solução, (D) Segunda filtragem da solução, (E) Adição de volume igual da solução de glicerol e PBS, e (F) Aliquotas congeladas em -80 °C.

Fonte: Adaptado de Starr et al., 2014.

5.4. Delineamento experimental

Este projeto teve sua metodologia dividida em 3 etapas, que foram divididas em 1) adaptação do método *Cecal Slurry* (CS) para camundongos fêmeas da linhagem *Swiss*; 2) avaliação de parâmetros fisiológicos na fase aguda da sepse (24 horas após a indução da sepse) e comprovação da adaptação do protocolo; 3) a influência do NO e da modulação das NOS no músculo esquelético no período pós-sepse (10 dias após a indução da sepse).

5.4.1. Adaptação do método *Cecal Slurry* (CS) para camundongos fêmeas *Swiss*

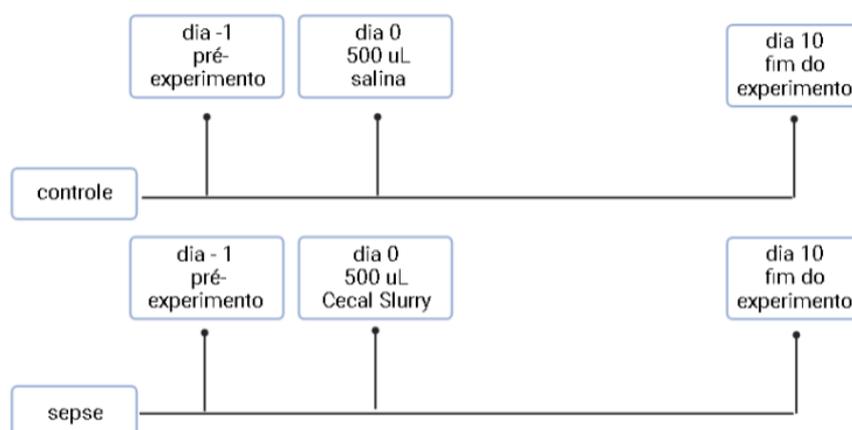
Nesta parte do trabalho, foi feito um experimento com indução da sepse pelo modelo *Cecal Slurry*, conforme descrito no item anterior. Foram utilizadas 2 fêmeas como doadoras para a obtenção do conteúdo cecal, 6 fêmeas para controle, e 12 para modelo de indução da sepse (Figura 6). Cada um dos animais sépticos recebeu 0,01 mL/g

via i.p. de solução cecal, e cada animal controle recebeu 0,01mL/g via i.p. de salina aquecida a 37 °C.

Após a indução da sepse, foi feita uma avaliação da temperatura retal e do peso em até 72 horas, e da alimentação em até 96 horas. Já no caso da glicemia, foram feitas medidas ao longo do primeiro dia após a indução da sepse nas horas 0, 2, 4 e 6. A mortalidade dos animais foi acompanhada até 96 horas. Todos os animais receberam analgesia com aplicação i.p. de tramadol (10mg/kg), duas horas antes da indução da sepse ou salina, para evitar interferências na sua temperatura, e a cada 24 horas, até dois dias após a indução da sepse.

A figura abaixo representa o esquema do experimento de adaptação do protocolo *Cecal Slurry*:

Figura 6. Experimento de adaptação de protocolo *Cecal Slurry* de Starr et al. (2014), para fêmeas da linhagem *Swiss*.



Experimento de avaliação de 10 dias, com grupo controle com injeção de 500 µl salina no dia 0, e grupo séptico com injeção de 500 µl de solução cecal.

Fonte: A autora, com utilização do Biorender.

5.4.2. Avaliação de parâmetros da fase aguda da sepse (24 horas após a indução da sepse)

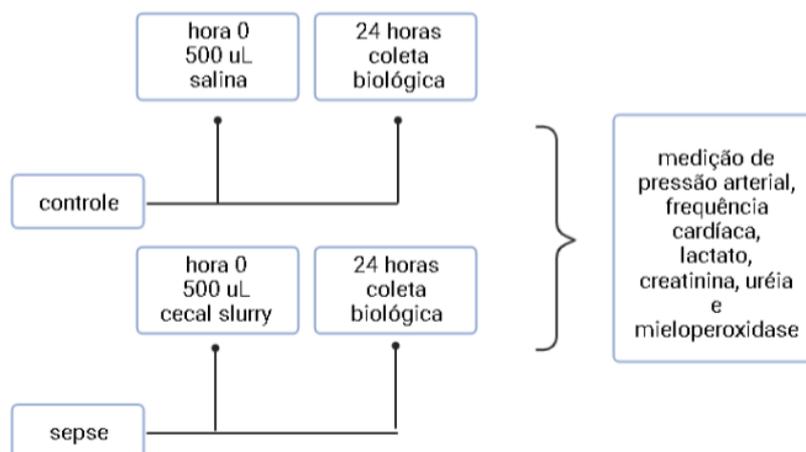
Esta etapa do trabalho buscou avaliar os parâmetros da sepse na sua fase aguda, em 24 horas. A indução da sepse foi feita assim como descrito no experimento anterior deste trabalho, com a mesma dosagem de solução cecal injetados via i.p. Foram utilizadas

vinte fêmeas, das quais 2 foram animais doadores, 8 foram controles e 10 animais sépticos (Figura 7).

Após 24 horas da indução da sepse, cada animal passou por anestesia e teve sua pressão arterial e frequência cardíaca mensuradas. Após sacrifício foram coletados o sangue e o pulmão dos animais para análise. A partir do pulmão dos camundongos, foi medida a enzima mieloperoxidase, e do plasma foram averiguados os índices de ureia, creatinina e lactato.

O esquema a seguir é um representativo do experimento sobre a fase aguda da sepse:

Figura 7. Indução da sepse por método *Cecal Slurry* (CS) e análise de parâmetros fisiológicos durante a fase aguda da sepse.



Experimento de avaliação de parâmetros da sepse aguda. Animais controle receberam 500 µl de salina e animais sépticos 500 µl de solução cecal. Após 24 horas, os animais foram anestesiados para medição de sua pressão arterial e frequência cardíaca, e posteriormente eutanasiados para coleta de sangue e mensuração de lactato, ureia, creatinina a partir do plasma, e coleta do pulmão para mensuração da mieloperoxidase.

Fonte: A autora, com utilização do Biorender.

5.4.3. *Influência do óxido nítrico no dano tardio do músculo esquelético causado pela sepse*

Esta terceira parte da pesquisa buscou avaliar o dano no músculo esquelético na fase pós-sepse, e o envolvimento do óxido nítrico e das NOS nesse processo. Para isso,

foram utilizados no total 64 animais, sendo 10 doadores, 7 animais naive (não receberam nenhum tratamento nem salina), e 47 animais sépticos (Figura 8).

Todos os animais receberam injeções intraperitoneais de antibiótico de amplo espectro enrofloxacina 10%, na dose 5 mg/Kg, após 24 horas da indução da sepse, e a cada 24 horas até o décimo dia de experimento. Foram divididos em 5 grupos experimentais, sendo eles: 1) naive (N), 2) sepse controle (recebeu apenas veículo) (CSC), 3) animais sépticos tratados com inibidor seletivo da enzima NOS-1 (7-NI), 4) animais sépticos tratados com doador de óxido nítrico (nitroprussiato de sódio, SNP) e 5) animais sépticos tratados com inibidor não seletivo de NOS (L-NAME).

Os respectivos tratamentos dos grupos 3, 4 e 5 foram aplicados após 24 horas da indução da sepse, e após a cada 24 horas até o décimo dia do experimento, para análise da fase pós-sepse das fêmeas sobreviventes. Tanto o antibiótico como os tratamentos foram injetados via i.p. nos animais. No quadro abaixo podem ser verificados os grupos experimentais, seus tratamentos e a dosagem de cada fármaco para melhor entendimento:

Quadro 1. Descrição dos grupos experimentais, de acordo com o tratamento de doação do óxido nítrico ou modulação das NOS.

Grupo	Tratamento	Função	Dosagem
N naive	Antibiótico	comparação com animais sépticos e sépticos tratados	5mg/Kg
CSC séptico	Antibiótico	comparação com animais naive e tratados	5mg/Kg
7N séptico-tratado	antibiótico + 7-NI	inibidor da enzima NOS-1	5mg/Kg
SNP séptico-tratado	antibiótico + SNP	doador de óxido nítrico	0,2mg/Kg
L-NAME séptico-tratado	antibiótico + L-NAME	inibidor não seletivo de NOS	5mg/Kg

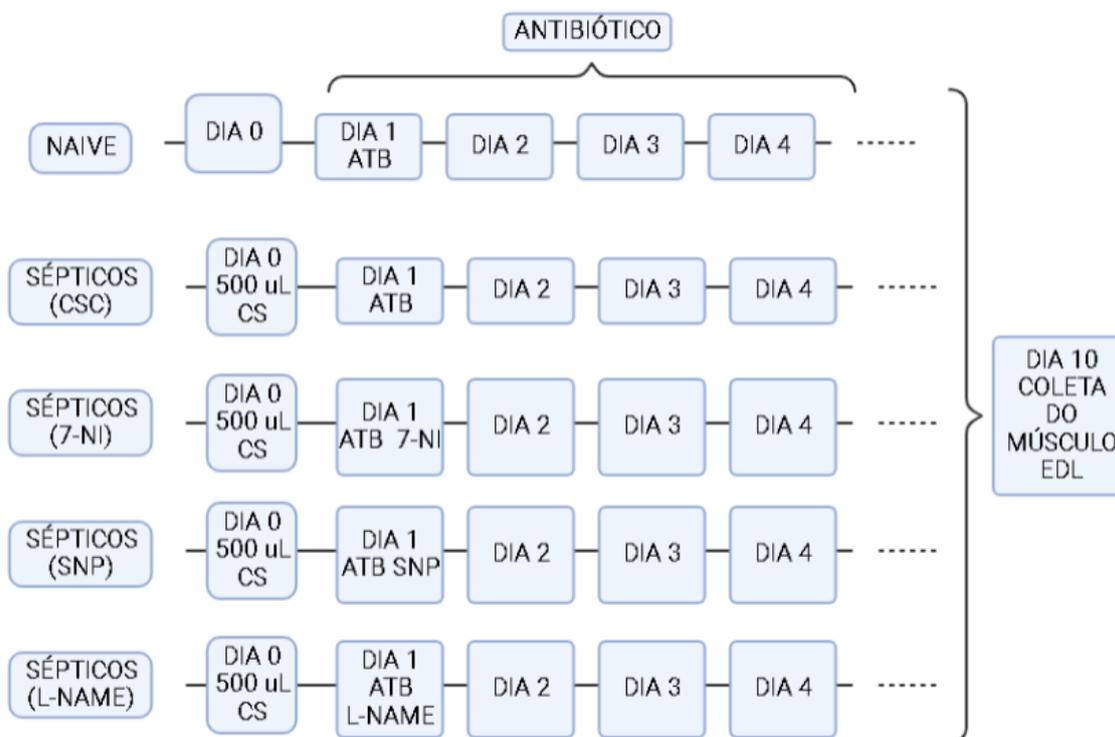
Fonte: Doses adaptadas de Nardi et al., 2014, para uso crônico.

No décimo dia, foi feito o sacrifício de todas as fêmeas sobreviventes e coleta de sangue, músculo EDL e pulmão. Após as coletas, tanto o plasma como os órgãos foram congelados a -80 °C para futuras análises bioquímicas. Além disso, a duplicata dos órgãos

coletados foi separada e preservada em paraformaldeído 4% para encaminhamento para histologia e imuno-histoquímica.

A Figura a seguir mostra um resumo de todas as etapas do experimento:

Figura 8. Experimento sobre a influência da modulação do óxido nítrico no dano tardio do músculo EDL causado pela sepse.



Experimento com avaliação do impacto do óxido nítrico e modulação das NOS no pós-sepse. No dia 0, animais do grupo CSC, 7-NI, SNP E L-NAME passaram pela indução da sepse, e o grupo naive não recebeu salina. Após 24 horas, foi injetado o antibiótico (ATB) enrofloxacina 10% a 5mg/kg por via intraperitoneal em todos os animais. Além disso, o grupo 7-NI também recebeu tratamento com 7-NI, o grupo SNP foi tratado com nitroprussiato, e o grupo L-NAME recebeu L-NAME. A cada 24 horas, cada grupo recebia antibiótico (ATB), e os grupos específicos seu tratamento, até o nono dia. No décimo dia, todos os animais foram eutanasiados e tiveram seus músculos extensores longo dos dedos (EDL) coletados. Um músculo foi congelado a -80 °C para medida de área transversal, e outro foi fixado em paraformaldeído 4% para histologia e imuno-histoquímica.

Fonte: A autora, com utilização do Biorender.

5.5. Verificação dos parâmetros fisiológicos e comportamentais dos animais

5.5.1. Aferição de temperatura, peso e alimentação

Para aferição da temperatura, foi utilizado um termômetro digital, de temperatura mínima de 32 °C, que foi introduzido no reto dos animais, até a temperatura permanecer estável. Foram feitas medidas logo após a indução da sepse, e depois a cada hora, até completar 8 horas. A partir disso, foram tomadas medidas 24, 48 e 72 horas depois da injeção da solução cecal, e os gráficos foram expressos em média \pm erro padrão da média.

Para a mensuração do peso dos camundongos, foi utilizada uma balança digital, com os animais acondicionados em um pote de plástico, até o animal permanecer parado e o número estável. A pesagem ocorreu 24 horas antes da indução da sepse, logo após a injeção da solução cecal, e 24, 48 e 72 horas após. Com os resultados, foram feitas análises de peso médio por grupo experimental e gramas perdidas dos animais, em média \pm erro padrão da média.

A alimentação dos animais foi aferida na mesma balança, com o pote devidamente higienizado, a partir da ração presente nas caixas dos camundongos, e foi feito um cálculo da média de ração consumida por animal em cada dia, por 4 dias após a indução da sepse. Os resultados foram expressos em média em gramas por grupo experimental ao longo do tempo em horas, em média \pm erro padrão da média.

5.5.2. Mensuração de glicemia

Para avaliar a glicemia, foi utilizado o aparelho On-Call® Plus II, Laboratórios Acon, de uso humano, com as fitas provenientes da caixa do próprio fabricante do aparelho. Para isso, cada animal foi posicionado dentro de um contensor próprio para camundongos, e cerca de 1 cm da ponta final da cauda foi exposta para perfuração com o aparelho. Depois da perfuração, uma gota de sangue foi delicadamente obtida com aplicação de pressão da base da cauda até o furo realizado, e o sangue foi coletado com a fita específica. A fita foi posicionada conforme descrito no manual no medidor, e o número resultante foi registrado. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média, a cada duas horas a partir da indução da sepse, nos animais controle e sépticos, até 6 horas, e depois em 24 horas.

5.5.3. Determinação da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC)

Os animais utilizados tiveram sua pressão arterial e frequência cardíaca analisadas 24 horas após a indução da sepse, e foram anestesiados com cetamina e xilazina na dose 90/15 mg/kg, respectivamente, intramuscular (i.m.), e posteriormente foram colocados em posição de decúbito dorsal, sobre plataforma aquecida. Uma incisão perpendicular de 1 cm foi realizada na superfície dorsal do pescoço, expondo o músculo esterno hioide. Este, por sua vez, foi seccionado medialmente e após exploração cirúrgica a artéria carótida externa direita do animal foi encontrada e separada do nervo vago e tecidos adjacentes.

Posteriormente, este vaso teve seu fluxo sanguíneo interrompido com uso de fio de sutura, na extremidade distal. O fluxo sanguíneo da extremidade proximal foi interrompido temporariamente com a utilização de uma pinça curvada. Logo após, uma incisão foi feita na porção medial da artéria carótida, e foi inserido um cateter de polietileno, Angiocath®, nº 23 com heparina, que foi firmemente amarrado ao vaso, e conectado ao aparelho de transdução de pressão Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Houston, Texas, EUA, e posteriormente acoplado ao amplificador Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltda., Castle Hill, Austrália).

As análises da frequência cardíaca e pressão arterial média foram realizadas através de um sistema operacional Windows 10, Microsoft Corporation, EUA, e também pelo software de integração LabChart 8™. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM).

5.6. Coleta de amostras biológicas

Para coleta de sangue, os animais foram sacrificados após 24 horas da indução da sepse, com dose letal de cetamina e xilazina, i.p., e foram utilizadas seringas de 3 ml e agulhas descartáveis, de medida 21G. Logo antes da coleta, uma gota de heparina 5000 UI/mL foi colocada no bico da seringa, antes da agulha ser acoplada, e então foi diretamente introduzida no coração do animal, com o sangue coletado. O conteúdo foi centrifugado a 1G, a 4000 rpm, a 20 °C, por cinco minutos, e o plasma resultante foi congelado a -80 °C.

Também foram coletados os músculos EDL e pulmões, em tubos de 2 ml. Um exemplar dos pulmões foi congelado a -80 °C para realização de análises bioquímicas (mieloperoxidase), e um músculo EDL foi utilizado para medição de área transversal. O

outro músculo foi fixado em paraformaldeído a 4% por 24 horas e depois transferidos para álcool 70%, para fixação e realização da histologia e imuno-histoquímica. A coleta destes músculos foi realizada conforme protocolo descrito previamente (HAKIM; WASALA; DUAN, 2013).

5.7. Protocolos experimentais com amostras biológicas

5.7.1. Ureia

Para obtenção dos valores de ureia, foi utilizado o plasma congelado dos animais a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, com utilização do kit para dosagem da empresa Labtest. Os reagentes de trabalho foram preparados conforme o fabricante, com 10 μl de solução padrão total, 1000 μl de urease e 1000 μl de oxidante de uso para cada tubo de 5 ml contendo o branco, padrão e amostras.

No tubo para análise do branco foi adicionado 1000 μl de urease, no tubo padrão foram adicionados 10 μl da solução padrão preparada e 1000 μl de urease, e nos tubos com amostras, foram adicionados 10 μl de amostra e 1000 μl de urease. Os tubos foram homogeneizados e incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por cinco minutos, e logo após foi adicionado 1000 μl de oxidante de uso.

Novamente, os tubos foram homogeneizados e incubados a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos. Em uma placa de ELISA foram transferidos 250 μl do conteúdo de cada amostra, e a leitura foi feita em uma leitora de placas Ultra microplate reader EL 808, BioTeck Instruments, INC., EUA, à uma absorbância de 600 nm.

Para realização dos cálculos, foi descontado o valor do branco de todos os resultados, e foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Ureia (mg/dl)} = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}} \times 70$$

Os resultados foram analisados em média \pm EPM, para cada grupo, controle e sepse, em 24 horas após a indução da sepse.

5.7.2. Creatinina

Nesta dosagem, foi utilizado o plasma dos animais, que estava congelado a -80°C , e o kit da empresa Labtest. Para o procedimento, o plasma foi descongelado em banho-maria, e foi utilizada uma placa de ELISA e a leitora Ultra microplate reader EL 808, BioTeck Instruments, INC., EUA, à uma absorvância de 510 nm.

Para o poço do branco, foi adicionado 160 μl de tampão (reagente n°2 do kit), 20 μl de água destilada e 40 μl de ácido pícrico (reagente n° 1). Para o poço padrão, foi adicionado 160 μl de tampão, 20 μl de padrão (reagente n° 3) e 40 μl de ácido pícrico. Para as amostras, foi adicionado 160 μl de tampão, 20 μl de amostra e 40 μl de ácido pícrico.

A placa foi homogeneizada e incubada em banho-maria a 37°C por 10 minutos, sendo que o nível da água foi superior ao nível dos reagentes. A placa foi lida, e o branco foi descontado, sendo essa absorvância descrita como A1 na fórmula abaixo, e a do padrão, descrita como P. Em seguida foi adicionado ao branco e às amostras 8 μl de acidificante (reagente n° 4). A placa foi homogeneizada e mantida em temperatura ambiente por 5 minutos, e foi novamente lida à uma absorvância de 510 nm, sendo essa absorvância descrita como A2.

Para os cálculos, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Creatina (não corrigida)} = \frac{A1-A2}{\text{absorvância padrão}} \times 4\text{mg/dl}$$

Creatinina (corrigida) = creatinina (não corrigida) – 0,25mg/dl (índice de correção).

Os resultados foram expressos em média \pm EPM, para cada grupo amostral, controle e sépticos, após 24 horas da indução da sepse.

5.7.3. Lactato

A dosagem de lactato foi feita através do plasma congelado a -80°C dos animais, pelo método enzimático com utilização do kit da empresa Labtest, como padrão do laboratório. Primeiramente, o plasma foi descongelado em banho-maria até ficar em estado líquido, e foi preparado o reagente padrão de trabalho conforme fabricante, sendo 500 μL de solução para cada amostra, padrão e branco.

Foram preparados em tubos de 2 ml o branco, com 5 µl de água destilada e o reagente de trabalho, o padrão, com 5 µl do reagente padrão e o reagente de trabalho; e as amostras em si, com 5 µl de cada amostra e o reagente de trabalho.

Depois, todos os tubos foram homogeneizados e incubados a 37 °C no banho-maria, e 200 µl de cada tubo foram pipetados em uma placa de leitura de 96 poços, e levados para a leitora de placas Ultra microplate reader EL 808, BioTeck Instruments, INC., EUA, à uma absorvância de 550 nm.

Para os cálculos, de cada amostra foi descontado o branco, e logo após foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Lactato (mg/dl)} = \frac{\text{absorvância da amostra} \times 40}{\text{absorvância do padrão}}$$

Após esses procedimentos, os resultados obtidos foram expressos em média ± EPM, para os animais controle e sépticos, em 24 horas após a indução da sepse.

5.7.4. Mieloperoxidase

Para dosagem da enzima mieloperoxidase, foi utilizado o pulmão congelado dos animais, que foi homogeneizado com solução tampão de fosfato de sódio a 50 mM e pH 5,4, com brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), a 0,5%, p/v, com auxílio de equipamento do tipo Ultra-Turrax, por dez segundos. Após esse passo, foi feita a solubilização com um sonicador Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, IL, EUA, a 4 °C, por dez segundos. O homogenato foi centrifugado a 10.000 rpm, a 4 °C, por quinze minutos, e disso foi utilizado 25 µl para dosagem de mieloperoxidase.

Foi utilizado o reagente tetrametilbenzidina, e peróxido de hidrogênio 0,5 mM, em solução tampão fosfato 80 mM, de pH 5,4. A reação enzimática foi realizada por 5 minutos, e foi obtido um volume final de 150 µl. As amostras foram colocadas em uma placa de leitura de ELISA, e então na leitora de placas Ultra microplate reader EL 808, BioTeck Instruments, INC., EUA, a uma absorvância de 650 nm.

Com os resultados, foi estimada a quantidade total de proteína, assumindo 1 miligrama de proteína para 1 unidade de absorvância a 280 nm, sendo a atividade de mieloperoxidase expressa como densidade óptica a 650 nm por miligrama de proteína. A atividade da mieloperoxidase foi expressa em média ± EPM, em 24 horas após a indução da sepse, nos animais controle e sépticos.

5.7.5. Histologia das amostras biológicas

Foi realizada a histologia dos músculos EDL coletados, que estavam fixados em álcool 70%, e para isso passaram primeiramente pelo processo de inclusão no Laboratório de Histologia do Departamento de Histologia do Centro de Ciências Biológicas, com procedimento descrito no quadro a seguir:

Quadro 2. Tempos de inclusão em reagentes para histologia.

Reagente	Tempo
Álcool 70%	1 hora
Álcool 80%	1 hora
Álcool 95%	1 hora
Álcool 100% I	1 hora
Álcool 100% II	1 hora
Álcool 50%/Xilol 50%	1 hora
Xilol 100% I	1 hora
Xilol 100% II	1 hora
Parafina I	1 hora
Parafina II	1 hora

A partir disso, as amostras incluídas foram emblocadas em parafina, e ficaram secando por 24 horas até os blocos endurecerem. Depois, os blocos foram posicionados no freezer a -17 °C por alguns minutos, e então levados ao micrótomo manual da marca Olympus America Inc., modelo Cut 4055, onde foram realizados os cortes. Os cortes resultantes foram posicionados no banho histológico da Lupetec, BH2015, a 37°C, até as fitas esticarem, e então posicionados em lâmina histológica de medida 24x50 milímetros e colocados em estufa a 40 °C, em um ângulo de 45° para secagem.

Após 24 horas, as lâminas passaram pelo processo de coloração em hematoxilina e eosina, seguindo o protocolo a seguir:

Quadro 3. Processo de desparafinização e coloração em hematoxilina e eosina.

Reagentes	Tempo
Xilol 100% I	15 minutos
Xilol 100% II	5 minutos
Álcool 100% I	5 minutos
Álcool 100% II	5 minutos
Álcool 90%	5 minutos
Álcool 80%	5 minutos

Álcool 70%	5 minutos
Água destilada	1 minuto
Hematoxilina	8 minutos
Água corrente	3 minutos
Eosina	1 minuto
Álcool 100% (3x)	Passagem
Xilol 100%	Passagem

Por fim, foram anexadas as lamínulas em todas as lâminas feitas, com o uso de Entellan®, com as bolhas sendo eliminadas com ajuda de uma pinça, pressionando o ar para as extremidades. As lâminas com as lamínulas foram deixadas para secar por 24 horas na estufa a 40 °C, até a sua análise histológica, descrita a seguir.

5.7.6. Imuno-histoquímica do músculo EDL

A imuno-histoquímica para a enzima NOS-1 foi realizada de acordo com o protocolo desenvolvido no Laboratório de Reprodução e Desenvolvimento Animal, do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética. Ela foi realizada nas lâminas histológicas sobressalentes não coradas e sem lamínula do músculo EDL dos camundongos.

Os reagentes foram incubados com as lâminas dentro de uma cubeta em uma capela, ou em uma plataforma de metal, com as lâminas suspensas entre dois apoios e uma pipeta de Pasteur para inclusão dos reagentes, conforme o quadro a seguir:

Quadro 4. Reagentes e tempos de incubação das lâminas para imuno-histoquímica da enzima NOS-1.

Xilol 100% I	10 minutos	Cubeta
Xilol 100% II	10 minutos	Cubeta
Álcool 100% I	10 minutos	Cubeta
Álcool 100% II	10 minutos	Cubeta
Álcool 90%	5 minutos	Cubeta
Álcool 80%	5 minutos	Cubeta
Álcool 70%	5 minutos	Cubeta
H ₂ O ₂ 10% (1 H ₂ O ₂ /2 metanol)	10 minutos no escuro	Cubeta
PBS	5 minutos	Cubeta
PBS-Triton 0,3%	10 minutos (2x em agitação branda)	Cubeta

BSA 5% (albumina sérica bovina) em PBS-Triton 0,3%	30 minutos	Plataforma
BSA 5% em PBS-Triton 0,3%	30 minutos	Plataforma
anticorpo primário anti-NOS-1 (produzido em coelho) em BSA 5% e PBS-Triton 0,3%	12 horas a 4 °C, cobrindo os cortes com parafilm	Plataforma
PBS-Triton 0,3%	Lavar por 10 minutos (3x em agitação branda)	Plataforma
anticorpo secundário anti-coelho em BSA 5% e PBS-Triton 0,3%	3 horas	Plataforma
PBS	10 minutos (3x)	Cubeta
PBS-Triton 0,1%	10 minutos (2x)	Cubeta
PBS	5 minutos	Cubeta
DAB (3,3' - Diaminobenzidina)	5-10 minutos, dependendo do resultado	Plataforma
Água destilada	5 minutos	Plataforma

Para montagem das lâminas, o material foi desidratado em álcool 70%, 80% e 90%, por cinco minutos cada, álcool 100% I e II por dez minutos cada, e xilol 100% I e II por dez minutos cada. Por fim, as lâminas foram cobertas com Entellan® e com a lamínula, com cuidado para expulsão das bolhas formadas com uma pinça.

5.7.7. Análise histológica e quantificação de NOS-1 do músculo EDL

A partir das lâminas histológicas confeccionadas, foi feita a análise histológica para aferição de dano muscular e qualidade das lâminas, com o uso do microscópio óptico Olympus BX-41®, do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), da Universidade Federal de Santa Catarina. Para obtenção de imagens das lâminas histológicas produzidas foi utilizado o software de aquisição e captura de imagens Q-Capture Pro 5.1 Q-Imaging®, com câmera digital 3.3 MPixel Q-Imaging®. Foram fotografadas imagens nas objetivas de 10x e 20x.

As fotos obtidas foram analisadas pelo software ImageJ para Windows, e delas foram mensuradas a área média das miofibras, com a utilização de uma escala em microns para pixels (*analyze, set scale*), calibrada a cada nova imagem. Depois da definição da escala, foram contabilizadas 50 miofibras por foto, a partir da função “*polygon selections*”, e sua análise (*analyse, measure*), com área contabilizada a partir da função

analyze, set measurements, area. A partir disso, foi feito o cálculo da área média das miofibras de cada grupo experimental.

Além da área, foram mensurados os espaços entre as fibras utilizando o mesmo programa. As imagens foram abertas, e clicou-se em *image>type>8byt*. Depois, foi ajustado o *threshold* em *image>adjust>auto threshold*, e a configuração utilizada foi a sugerida “*try all*”. A imagem escolhida foi a mais representativa da original, e foi selecionada sua análise em porcentagem com *image>adjust>auto threshold>percentage*. Foi medido o polígono com a função “*polygon selections*” com a melhor área das fotos, evitando locais de sujeira ou artefatos, e então “*analyze particles*”, apenas com os parâmetros *display results* e *sumarize*.

Do músculo EDL congelado a -80 °C, retirou-se as amostras do freezer e elas foram descongeladas em temperatura ambiente, com os tubos posicionados no gelo para preservação enquanto não eram utilizadas. Foi feita a aferição da área transversal *Cross Sectional Area, CSA*), a partir de medida do diâmetro em lupa para laboratório, Metrimpex Hungary e PZO-Labimex®. Todos os resultados dessa seção foram tabulados e analisados em média com desvio padrão, de todos os grupos experimentais descritos em 5.5.3 (naive, controle da sepse, e tratamentos com 7-nitroindazol ou 7-NI, nitroprussiato e L-NAME).

Para a quantificação de NOS-1, as imagens das fotos da imuno-histoquímica foram feitas a partir do protocolo de Crowe e Yue, 2019, com o software ImageJ Fiji., versão 1.2. Após a imagem ser aberta no programa, foi clicado em *color>color deconvolution*, em que foi selecionada a opção “H DAB”. Com isso, foi selecionada a imagem 2, e o *threshold* foi definido em *image>adjust>threshold*, e ajustado em valores máximos e mínimos, retirando artefatos. Por fim, a função *analyze>measure* expressou os resultados finais da quantificação da enzima NOS-1.

Todos os resultados foram expressos em gráficos de dispersão com média e desvio padrão.

5.8. Análises estatísticas

As análises foram realizadas a partir de tabulamento dos dados obtidos nos experimentos no programa Microsoft® Excel®, que posteriormente foram utilizados para cálculos estatísticos no programa Graph Pad Prism 9 for Windows® (Graph Pad

Software, La Jolla, CA, USA). Os resultados obtidos foram expressos como média \pm EPM e as diferenças estatísticas foram consideradas significativas para $P < 0,05$.

Foram feitos os testes t não pareados e análises de variância de uma ou duas vias (ANOVA *one-way* ou *two-way*), testes de normalidade, Shapiro-Wilk e identificação de outliers, além de análises da proporção de sobrevivência. Ainda, foram feitos gráficos de todos os parâmetros analisados no trabalho, utilizando o mesmo programa Graph Pad Prism 9 for Windows® (Graph Pad Software, La Jolla, CA, USA).

6. RESULTADOS

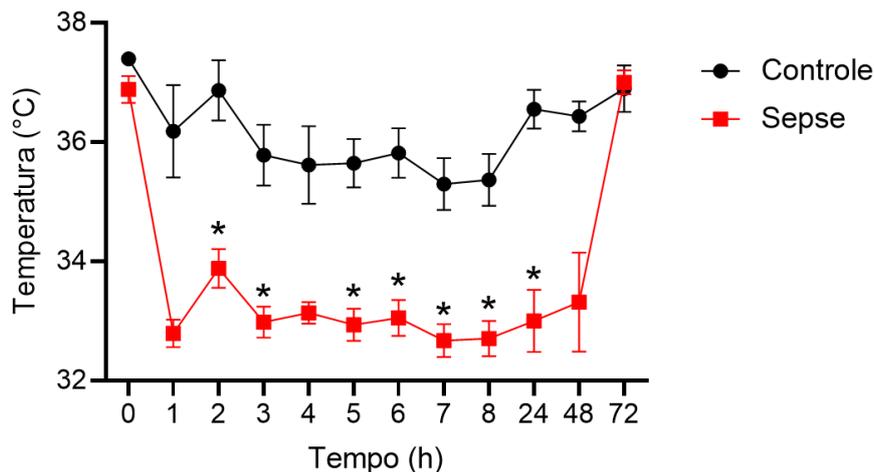
6.1. Avaliação de temperatura, peso, alimentação e glicemia de animais controle e sépticos

6.1.1. Aferição da temperatura dos animais controle e sépticos

O acompanhamento da temperatura e a presença de hipotermia na sepse podem ser utilizados como predição de prognóstico e possível *endpoint*. No momento de indução da sepse, os animais do grupo controle apresentavam um temperatura média de $37,4 \pm 0,1$ °C, e os animais sépticos $36,9 \pm 0,2$ °C (Figura 9). Logo na primeira hora após a injeção da solução cecal, foi possível observar hipotermia nos animais sépticos ($32,8 \pm 0,2$ °C).

A temperatura dos animais sépticos permaneceu baixa por 48 horas, e apenas 72 horas após a indução da sepse, a temperatura foi normalizada, seguindo o mesmo padrão dos controles ($37 \pm 0,2$ °C e $36,9 \pm 0,4$ °C, respectivamente). Em relação à mortalidade, indivíduos que apresentaram temperatura ≤ 32 °C (a medição mínima do termômetro) por mais de 8 horas vieram à óbito (75% dos animais, dados não mostrados).

Figura 9. Temperatura média dos grupos experimentais controle e sepse, até 72 horas da indução da sepse.



A temperatura foi medida a partir do tempo 0 de hora em hora até 24h, e depois a cada 24 horas até 72 horas. Resultados são expressos em média \pm erro padrão da média (EPM). O grupo séptico é estatisticamente diferente do grupo controle, com $*P < 0,05$ (ANOVA de duas vias). Grupo controle com $N=11$ e grupo séptico com $N=6$.

Fonte: A autora.

6.1.2. Determinação do peso e alimentação dos animais controles e sépticos

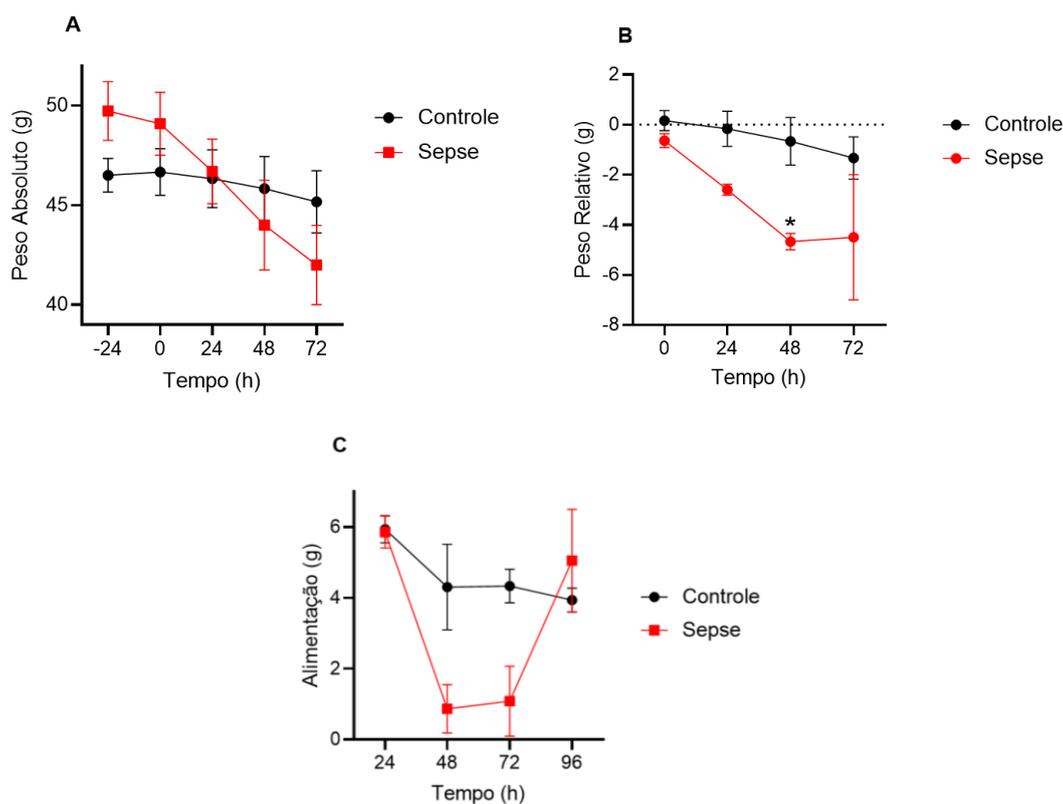
Nos mesmos animais do item anterior, foi realizada a medição do seu peso absoluto, sua perda de peso e peso da sua ingestão de alimento durante a sepse. Em relação ao peso absoluto, foram tomadas medidas no momento de indução da sepse, e depois a cada 24 horas, até 72 horas. No início da observação, os animais do grupo controle tinham uma média de peso de $46,5 \pm 0,8$ g, e os animais sépticos, $49,7 \pm 1,5$ g (Figura 10 A). No final do experimento, o peso dos animais sépticos foi reduzido para 42 ± 2 g (cerca de 10% de redução de peso). Apesar de não ter diferenças estatísticas, o grupo séptico perdeu peso consideravelmente nesse período. Os animais do grupo controle permaneceram com o peso médio de 46,1g.

A perda de peso dos animais também foi reportada (Figura 10 B), com medidas no momento de indução da sepse, e depois a cada 24 horas, até 72 horas depois. Nesse tempo, os animais do grupo controle tiveram uma perda de peso de aproximadamente 1g, e os animais sépticos tiveram valor de perda de $4,5 \pm 2,5$ g, sendo estatisticamente diferentes do grupo controle, mostrando que a sepse reduziu o peso desses animais.

Sobre a quantidade de ingestão de alimento, no início da observação os animais controles apresentaram valor médio de $5,9 \pm 0,4$ g, e os animais sépticos, $5,8 \pm 0,4$ g, sem diferença estatística entre os grupos (Figura 10 C). A partir de 24 horas, a ingestão de

alimento dos animais sépticos decaiu, e em 48 horas apresentava valor de $0,8 \pm 0,6g$, enquanto os animais controles tinham valor de ingesta alimentar de $4,3 \pm 1,2g$. A partir de 72 horas, a ingestão de alimento dos animais sépticos aumentou gradativamente, e em 96 horas não tiveram diferença estatística em comparação com o grupo controle ($5,0,5 \pm 1,4$ e $3,9 \pm 0,3$, respectivamente).

Figura 10. Variação de peso absoluto, perda de peso e quantidade de alimento ingerido de animais controle e sépticos.



(A) Variação do peso de animais controles e sépticos, em 72 horas, com medidas a cada 24 horas, (B) Média de perda peso de animais controles e sépticos, em 72 horas, com medidas a cada 24 horas e (C) Variação do peso de ingestão alimentar em gramas por grupo experimental controle e sepse, com medidas a cada 24 horas, até 96 horas. Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $P < 0,05$ (ANOVA de duas vias). Grupo controle com $N=6$ e grupo séptico com $N=11$.

Fonte: A autora.

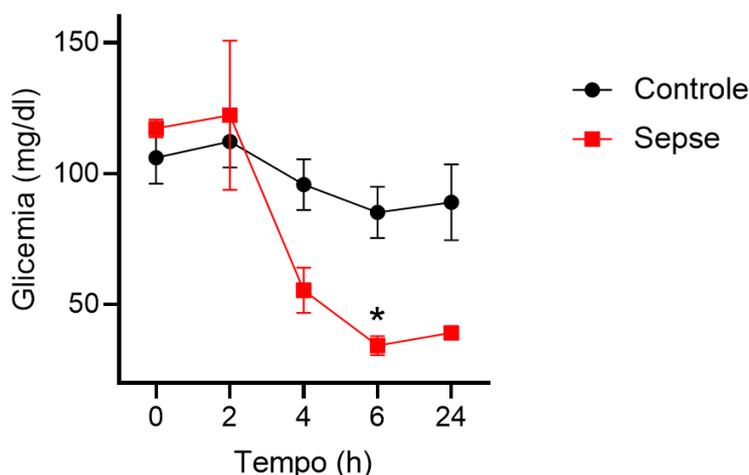
6.1.3. Mensuração de glicemia de animais controle e sépticos

A glicemia é um fator importante na predição do prognóstico da sepse. Foi acompanhada a glicemia de animais controle e sépticos até 24 horas após a indução da

sepse pelo método *Cecal Slurry*. No momento inicial, os animais sépticos e controle não apresentaram diferença estatística, e seu índice glicêmico foi de $117,2 \pm 3,3$ mg/dl e 106 ± 10 mg/dl, respectivamente (Figura 11).

Após a segunda hora, houve uma queda na glicemia dos animais sépticos, e foi possível notar que estavam em um quadro de hipoglicemia a partir da quarta hora ($55,3 \pm 8,6$ mg/dl, representando uma queda de aproximadamente 53%), condizente o que ocorre durante o quadro de sepse. O seu índice glicêmico permaneceu baixo até final do período de observação. Os animais controles se mantiveram dentro da média da curva ($97,6$ mg/dl) com 89 ± 14 mg/dl.

Figura 11. Média da glicemia por grupo experimental controle e sepse.



Medida de glicemia de animais controle e sépticos nos momentos de indução da sepse, e 2, 4, 6 e 24 horas depois. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$ (ANOVA de duas vias). Grupo controle com $N=5$ e grupo séptico com $N=11$.

Fonte: A autora.

6.2. Avaliação fisiológica da sepse aguda por modelo *Cecal Slurry* (CS)

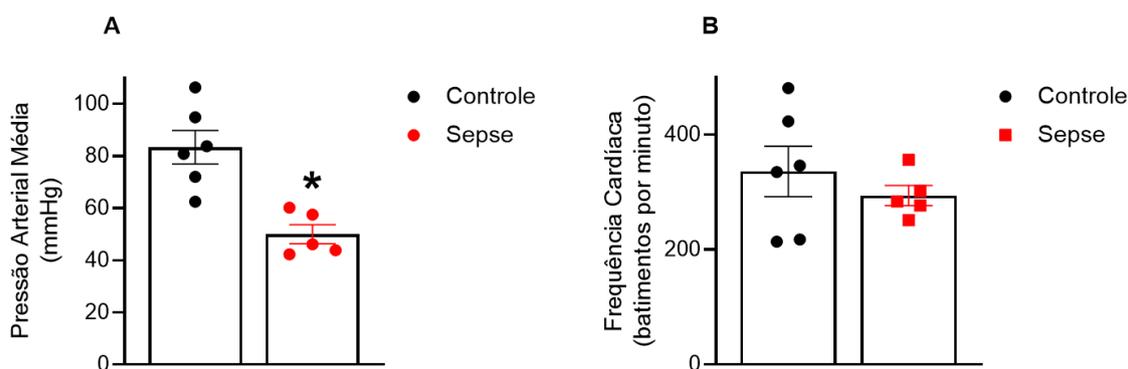
6.2.1. Medição de pressão arterial e frequência cardíaca em animais controle e sépticos

Para avaliação da função cardíaca e identificação de hipotensão típica de sepse, foi realizada a medição da pressão arterial média e da frequência cardíaca média dos animais controle e sépticos após 24 horas da indução da sepse pelo método *Cecal Slurry*. Em relação à pressão arterial média, os animais controles apresentaram valor médio de $83,3 \pm 6,4$ mmHg, e os animais sépticos $49,9 \pm 3,6$ mm Hg, com diferença estatística e

redução de 40% em relação aos animais controle, e apresentavam hipotensão (Figura 12 A).

No caso da frequência cardíaca (figura 12 B), não houve diferença estatística entre os grupos, sendo que em 24 horas após a indução da sepse os animais controles apresentaram frequência cardíaca média de $336,4 \pm 46,9$ bpm, e os animais sépticos $294,2 \pm 17,5$ bpm.

Figura 12. Pressão arterial e frequência cardíaca média de animais controle e sépticos em 24 horas de sepse.



(A) Pressão arterial média de animais controle e sépticos em horas após a indução da sepse, em mmHg e (B) Frequência cardíaca média de animais controle e sépticos, em batimentos por minuto, 24 horas após a indução da sepse. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$ (teste t não pareado).

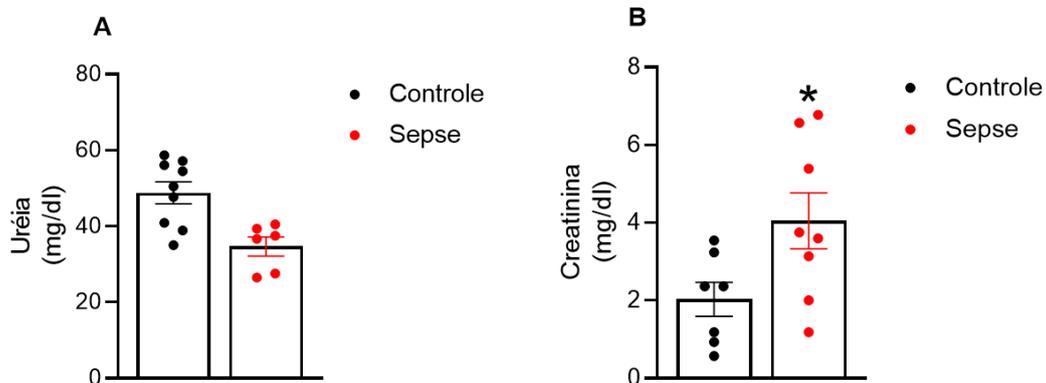
Fonte: A autora.

6.2.2. Níveis de ureia e creatinina em animais controle e sépticos

Para avaliação da função renal, foram realizadas medidas dos níveis de ureia e creatinina dos animais controle e sépticos em 24 horas após a indução da sepse. Sobre os níveis de ureia (Figura 13 A), nesse tempo não houve diferença estatística entre os grupos controle e sépticos, com valores respectivos de $48,8 \pm 2,9$ mg/dl e $34,7 \pm 2,5$ mg/dl.

No caso dos níveis de creatinina, em 24 horas os animais controle apresentavam valor de $2 \pm 0,4$ mg/dl, e os animais sépticos $4 \pm 0,7$ mg/dl, e com diferença estatística entre os dois grupos. Além disso, os valores de creatinina dos animais sépticos foi 50% maior que nos controles. Isso mostra que a função renal desses camundongos foi comprometida, como ocorre tipicamente na sepse.

Figura 13. Níveis de ureia e creatinina de animais controle e sépticos em 24 horas da sepse.



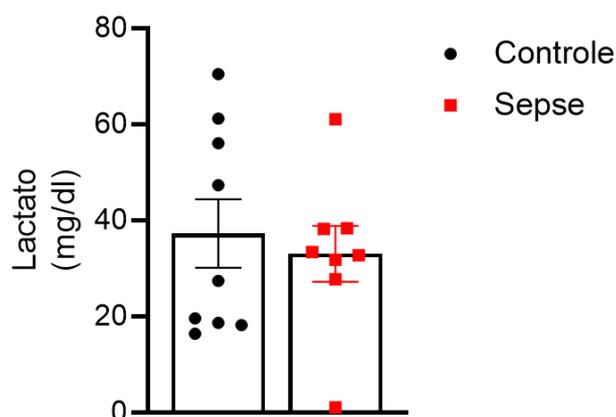
(A) Média de ureia em mg/dl dos grupos controle e sepse, 24 horas após a indução da sepse e (B) Média de ureia em mg/dl dos animais controle sépticos, 24 horas após a indução da sepse. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0.05$ (teste t não pareado).

Fonte: A autora.

6.2.3. Níveis de lactato em animais controle e sépticos

Para avaliação de quadro de hipóxia tecidual, bem como de prognóstico na sepse, foi medido o nível de lactato de animais controles e sépticos em 24 horas após a indução da sepse (Figura 14). Nesse momento, os animais controles apresentavam $37,3 \pm 7,1$ mg/dl de lactato, e os animais sépticos, $33 \pm 5,8$ mg/dl. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 14. Valores médios de lactato de animais controle e sépticos durante a sepse.



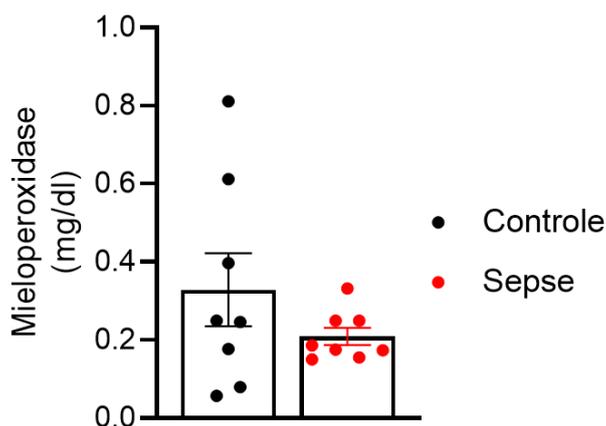
Média dos valores de lactato por grupo experimental, 24 horas após a indução da sepse. Resultados expressos em média \pm EPM. Não houve diferença estatística por teste t não pareado.

Fonte: A autora.

6.2.4. Níveis de mieloperoxidase em animais controle e sépticos

Mensurações de mieloperoxidase podem diferenciar quadros de sepse e de síndrome inflamatória sistêmica em casos não infecciosos. Para isso, foi feita a medida da mieloperoxidase em pulmão de animais controles e sépticos, em 24 horas de sepse (Figura 15). Os animais controles apresentaram valor médio de $0,3 \pm 0,09$ mg/dl, e animais sépticos, $0,2 \pm 0,02$ mg/dl, e não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 15. Valores médios de mieloperoxidase de animais controle e sépticos 24 horas após a indução da sepse.



Valores de mieloperoxidase média dos grupos controle e sépticos, 24 horas após a indução da sepse. Resultados expressos em média \pm EPM. Não houve diferença estatística por teste t não pareado.

6.3. Análise de sobrevivência de animais sépticos

6.3.1. Curva de sobrevivência

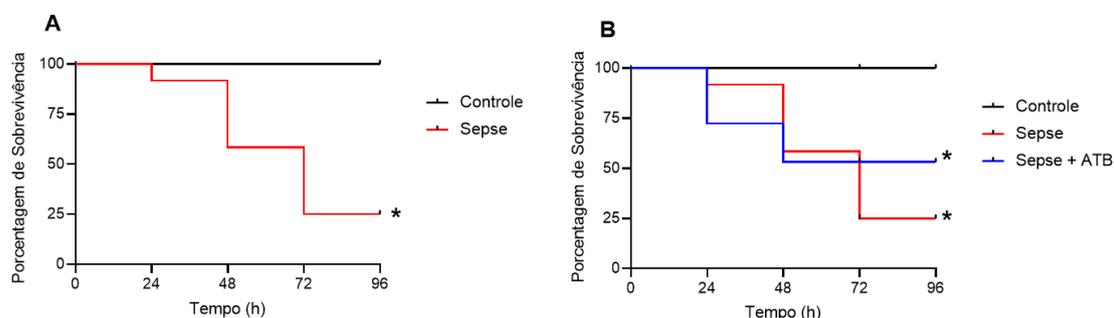
Após a indução da sepse, foi feita uma análise da sobrevivência dos animais controle, sépticos, e sépticos tratados com antibiótico (Figura 16). Na Figura 16 A, foi observado que os animais controles tiveram uma sobrevivência de 100% em 96 horas. Já

em animais sépticos, a proporção de sobrevivência reduziu em 24 horas, e continuou reduzindo até 72 horas. Em 96 horas, não houve mais óbitos dos animais sépticos, e a proporção de sobrevivência desses animais nesse período foi de 25%. Houve diferença estatística entre animais controle e sépticos.

Para medida de comparação, as mesmas curvas de sobrevivência da Figura 16 A foram inclusas na Figura 16 B, em que foi feita a proporção de sobrevivência de animais sépticos, que receberam tratamento com antibiótico. Assim como nos animais sépticos que não foram tratados com antibiótico, esses camundongos tiveram sua proporção de sobrevivência reduzida em 24 horas, e novamente em 48 horas.

Ao contrário dos animais sépticos que não foram tratados com antibiótico, os animais sépticos tratados com antibiótico vieram a óbito somente até 48 horas após a indução da sepse. 50% dos animais tratados com antibiótico sobreviveram, e houve diferença estatística com o controle. Além disso, em relação aos animais sépticos, foram recuperados 25% dos animais.

Figura 16. Análise da sobrevivência de animais controle, sépticos e sépticos que receberam tratamento com antibiótico, até 96 horas da indução da sepse.



(A) Análise da sobrevivência de animais controle e sépticos, em 96 horas após a indução da sepse e **(B)** Análise da sobrevivência de animais controle, sépticos e sépticos tratados com antibiótico, em 96 horas após a sepse. Resultados expressos em porcentagem de sobrevivência. * $P < 0,05$ (sobrevivência). Grupo controle com $N=6$, grupo séptico com $N=12$ e grupo séptico tratado com antibiótico com $N=47$.

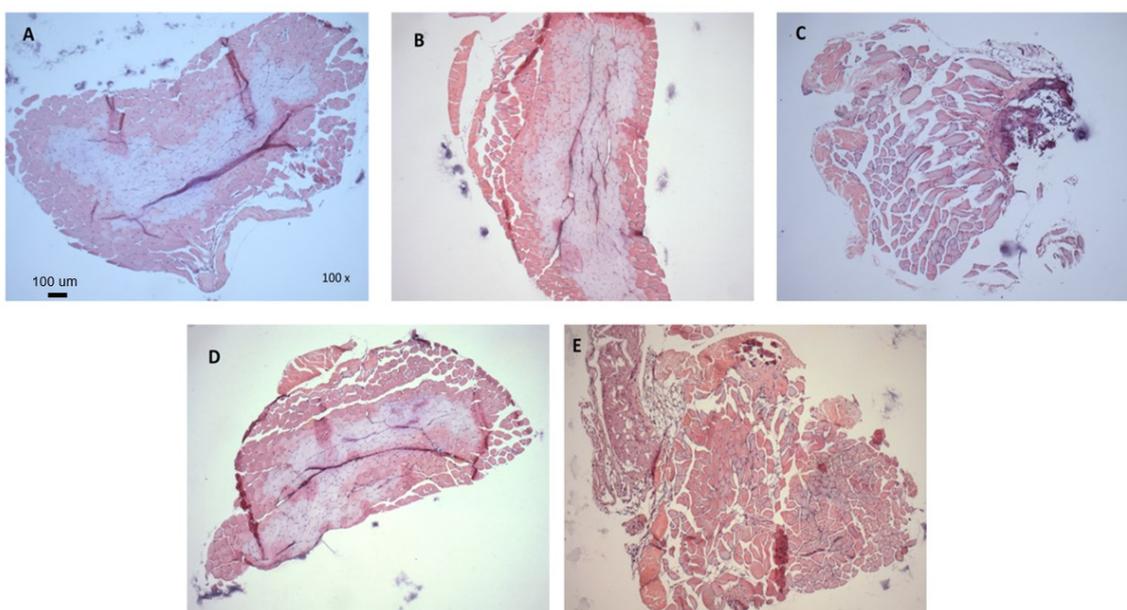
Fonte: A autora.

6.4. Análise do músculo EDL

6.4.1. Lâminas histológicas coradas com hematoxilina e eosina

Foi realizada a histologia dos músculos EDL, e posteriormente coloração em hematoxilina e eosina; e das lâminas resultantes foram tiradas fotos para medida de análise da área das miofibras, análise do espaço intersticial e identificação de dano muscular. Todos os músculos EDL coletados passaram pelo mesmo processo de fixação, processamento, inclusão, e coloração, com todos os músculos posicionados em uma mesma lâmina. Para o trabalho, foi escolhida a foto mais representativa de cada grupo, e estas foram editadas para melhor visualização (Figura 17).

Figura 17. Lâminas histológicas representativas em coloração com hematoxilina e eosina do músculo EDL, em objetiva de 10X.



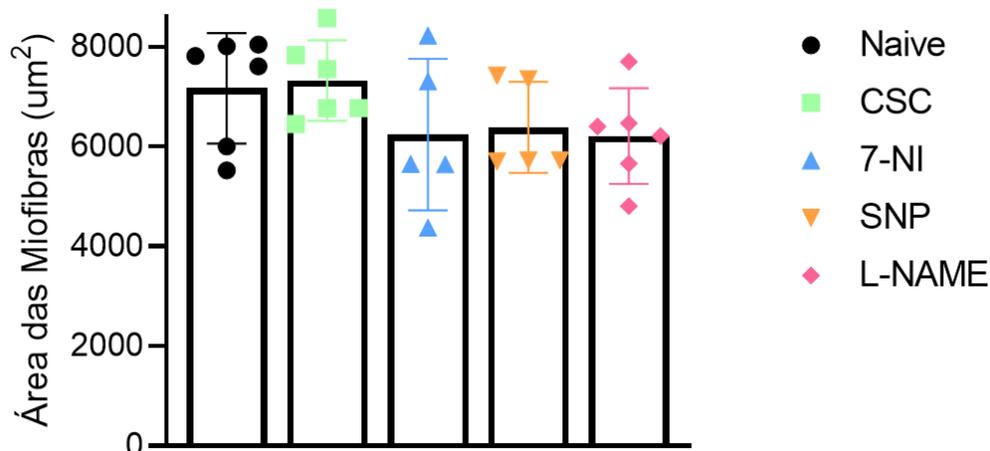
(A) Grupo naive, (B) (CSC), (C) 7-NI, (D) SNP e (E) L-NAME.

Fonte: A autora.

6.4.2. Análise da média da área das miofibras

Foram contabilizadas as áreas de 50 miofibras de cada músculo EDL, para verificar o seu tamanho médio após 10 dias da indução da sepse, e foi calculada a média por grupo experimental (Figura 18). As médias dos grupos naive, CSC, 7-NI, SNP e L-NAME foram respectivamente $0,71 \pm 0,04 \text{ mm}^2$, $0,73 \pm 0,03 \text{ mm}^2$, $0,62 \pm 0,06 \text{ mm}^2$, $0,63 \pm 0,04 \text{ mm}^2$ e $0,59 \pm 0,04 \text{ mm}^2$. Não houve diferença estatística entre os grupos.

Figura 18. Média da área das miofibras do músculo EDL em milímetros quadrados por grupo experimental.



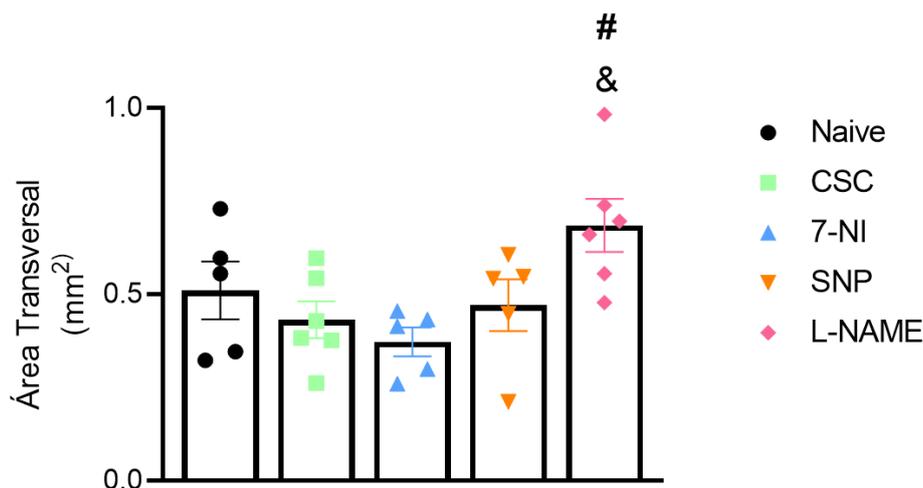
Área média das miofibras por grupo experimental, 10 dias após a indução da sepse. **Preto:** Grupo N, **verde:** Grupo CSC, **azul:** Grupo 7-NI, **laranja:** Grupo SNP e **rosa:** Grupo L-NAME. Resultados expressos em média \pm EPM. Não houve diferença significativa por ANOVA de uma via com *post-hoc* de Tukey.

Fonte: A autora.

6.4.3. Análise da área transversal do músculo EDL (Cross Sectional Area, CSA)

Para verificação da ocorrência de hipertrofia ou atrofia do músculo EDL, foi realizada a medida da área transversal média dos grupos experimentais, 10 dias após a sepse (Figura 19). Foi calculada uma média dessa medida por grupo experimental, e os resultados dos grupos N, CSC, 7-NI, SNP e L-NAME foram respectivamente $0,51 \pm 0,07$ mm², $0,43 \pm 0,05$ mm², $0,38 \pm 0,04$ mm², $0,47 \pm 0,07$ mm² e $0,68 \pm 0,07$ mm². Houve diferença estatística entre o grupo L-NAME e 7-NI, e L-NAME e CSC. As diferenças percentuais entre o grupo N e 7-NI, SNP e L-NAME, foi respectivamente 25%, 7% e 33%.

Figura 19. Área transversal média por grupo experimental em milímetros quadrados do músculo EDL.



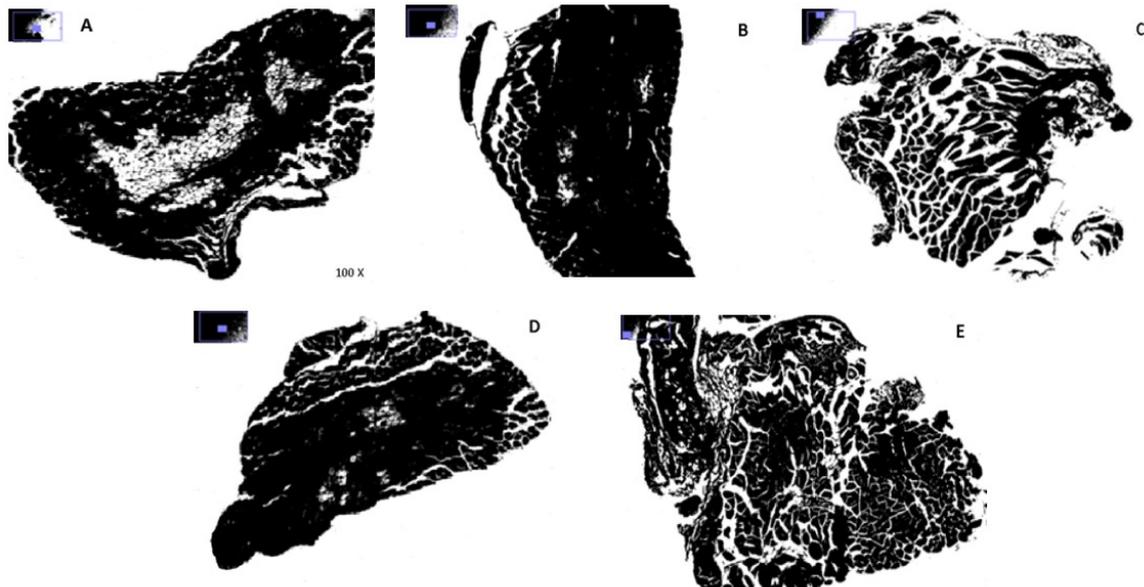
Área transversal média do músculo EDL por grupo experimental, 10 dias após a indução da sepse. **Preto:** Grupo N, **Verde:** Grupo CSC, **Azul:** Grupo 7NI, **Laranja:** Grupo SNP e **Rosa:** Grupo L-NAME. Resultados expressos em média \pm EPM. # $P < 0,05$ entre os grupos CSC e L-NAME, e & $P < 0,05$ entre os grupos 7-NI e L-NAME (ANOVA de uma via com *post hoc* de Tukey).

6.4.4. Análise do espaço intersticial entre as miofibras

Para verificação de edema no músculo EDL, foi feita uma análise percentual do espaço intersticial entre as miofibras dos grupos experimentais, dez dias após a indução da sepse, a partir de imagens geradas com o software ImageJ (Figura 20). Foi mensurado o espaço em branco das imagens dos músculos. Casos em que houve coloração branca em locais em que a lâmina original havia tecido não foram contabilizados para não gerar viés, bem como locais em que havia dobra do corte. Houve diferença estatística entre o grupo Naive e 7-NI, sendo que o grupo Naive teve $9,3 \pm 0,8\%$ de espaço intersticial, e o grupo 7-NI teve $21,5 \pm 4,8\%$ (Figura 21). Isso mostra que a inibição seletiva da enzima NOS-1 na sepse causou maior edema no músculo esquelético.

Apesar dos outros grupos não apresentarem diferença estatística, a diferença percentual respectiva do grupo Naive com os grupos CSC, SNP e L-NAME foi de 8,3%, 7,7% e 6,7%.

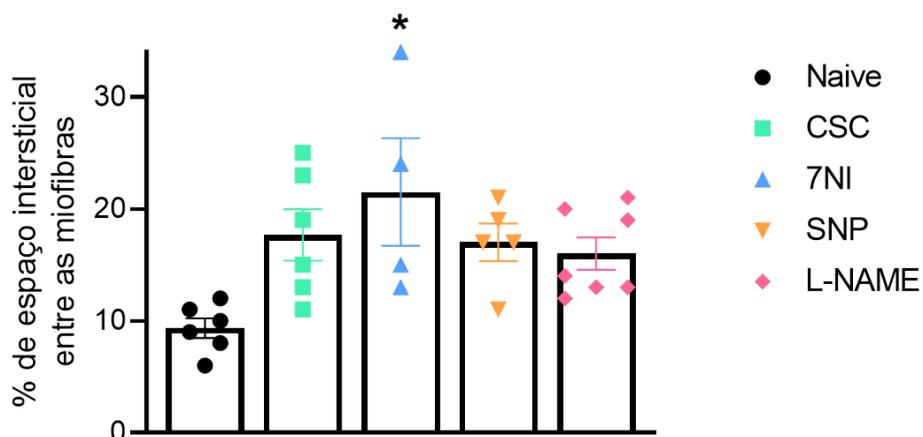
Figura 20. Imagens do músculo EDL por grupo experimental, geradas com o software ImageJ, para verificação do espaço intersticial entre as miofibras.



Imagens das lâminas histológicas feitas com o software ImageJ, utilizadas para análise do espaço intersticial entre as miofibras dos músculos EDL de cada grupo experimental, em objetiva de 10X, dez dias após a indução da sepse. (A) Grupo N, (B) Grupo CSC, (C) Grupo 7-NI, (D) Grupo SNP e (E) Grupo L-NAME.

Fonte: A autora.

Figura 21. Média da porcentagem de espaço intersticial entre as miofibras dos músculos EDL dos grupos experimentais, dez dias após a sepse.



Média da porcentagem do espaço intersticial entre as miofibras dos músculos EDL dos grupos experimentais, coletados dez dias após a indução da sepse pelo método *Cecal Slurry*. **Preto:** Grupo N, **Verde:** Grupo CSC, **Azul:** Grupo 7-NI, **Laranja:** Grupo SNP e **Rosa:** Grupo L-NAME. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$ (ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey) comparado com Naive.

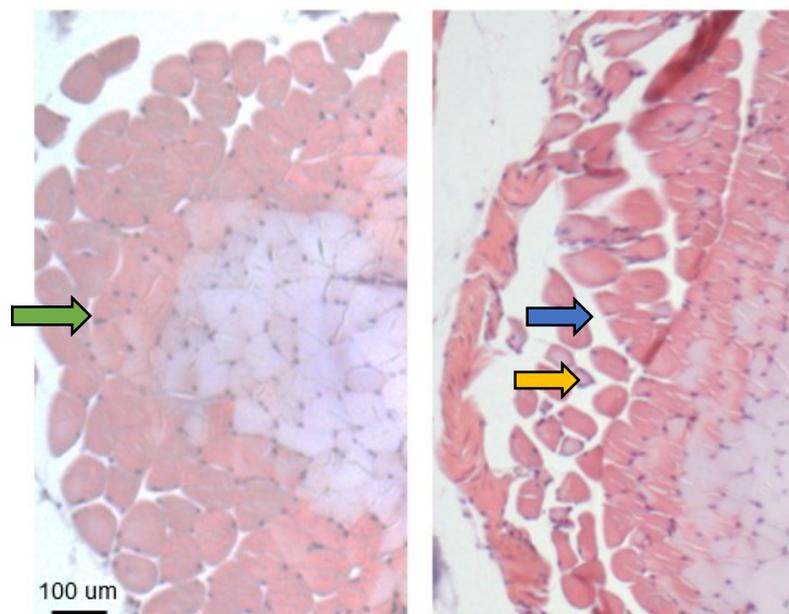
Fonte: A autora.

6.4.5. Análise do dano muscular

Ao observar as lâminas histológicas e realizar a comparação entre os animais naive e sépticos, foram notadas diversas alterações patológicas (Figura 22). A imagem da esquerda representa um indivíduo representativo do grupo naive, e a imagem da direita mostra um animal que passou pela indução da sepse. As análises musculares utilizaram como base o atlas de lesões não neoplásicas de roedores, um guia padronizado do *National Toxicology Program*, que faz parte do *National Institute of Health* dos EUA (NTP, 2022).

As observações foram realizadas apenas no grupo naive e séptico, excluindo os grupos tratados, pois se trata de uma descrição qualitativa.

Figura 22. Fotos das lâminas histológicas evidenciando o músculo saudável e alterações patológicas causadas pela sepse, em objetiva de 20X.



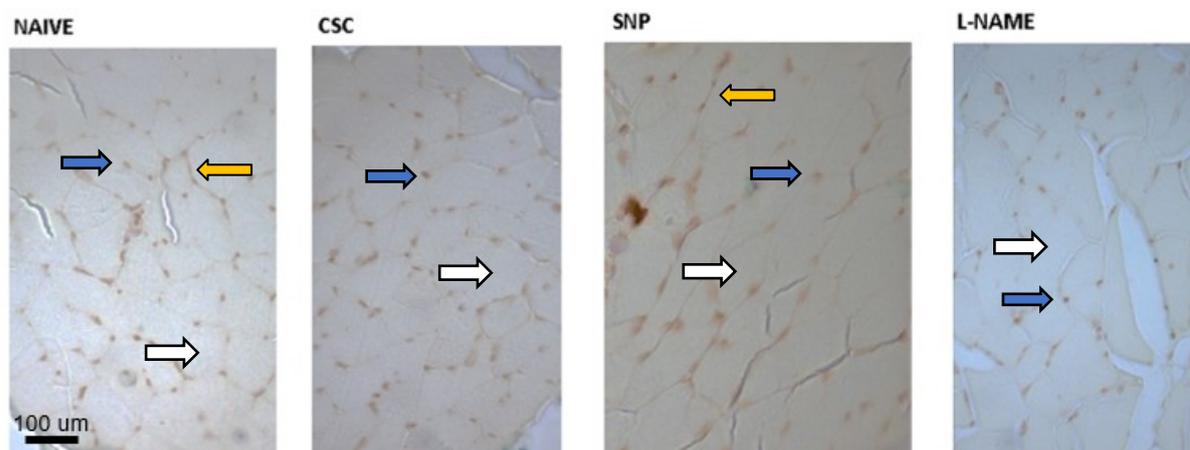
À esquerda: Músculo EDL representativo do grupo naive, com seta verde apontando a organização normal do músculo saudável. **Seta verde:** Músculo EDL saudável. **À direita:** Representativo do músculo EDL do grupo CSC. **Seta azul:** Presença de edema pela expansão do espaço intersticial, e **Seta amarela:** Atrofia de uma miofibra devido à redução de seu diâmetro.

Fonte: A autora.

6.4.6. Imuno-histoquímica do músculo EDL para NOS-1

A síntese do NO no músculo esquelético ocorre principalmente pela enzima NOS-1. Para verificar sua presença no músculo EDL, foi realizada a imuno-histoquímica no músculo EDL, coletado após dez dias da indução da sepse. Foi escolhida uma imagem representativa de cada grupo, que foi editada para melhor visualização das marcações (Figuras 23 e 24). Todos os músculos foram posicionados na mesma lâmina, e passaram pelo mesmo processo de imuno-histoquímica ao mesmo tempo. A quantificação da NOS-1 foi feita sobre as imagens originais, sem edição.

Figura 23. Marcações de imuno-histoquímica para a enzima NOS-1 no músculo EDL, dez dias após a indução da sepse, por grupo experimental, em objetiva de 10X.



Imagens representativas editadas da imuno-histoquímica para a NOS-1, por grupo experimental, dos músculos EDL coletados dez dias após a indução da sepse. **Seta azul:** Presença da enzima NOS-1 nos núcleos das fibras esqueléticas. **Seta amarela:** Presença da NOS-1 no sarcolema do músculo esquelético. **Seta branca:** marcação sutil no interior da miofibrila.

Fonte: A autora.

Figura 24. Marcação da enzima NOS-1 no músculo esquelético de animal naive e no músculo liso vascular, dez dias após a indução da sepse.



Marcação para a enzima NOS-1, realizada pela técnica de imuno-histoquímica, em músculo EDL e músculo liso vascular de animal naive, coletados dez dias após a indução da sepse. **Seta preta:** Presença de NOS-1 nas hemácias do músculo liso vascular (artefato da técnica). **Seta roxa:** Marcação da enzima na célula do músculo liso de uma arteríola. **Seta verde:** Presença da NOS-1 no núcleo da miofibra, evidenciando a cromatina no músculo esquelético.

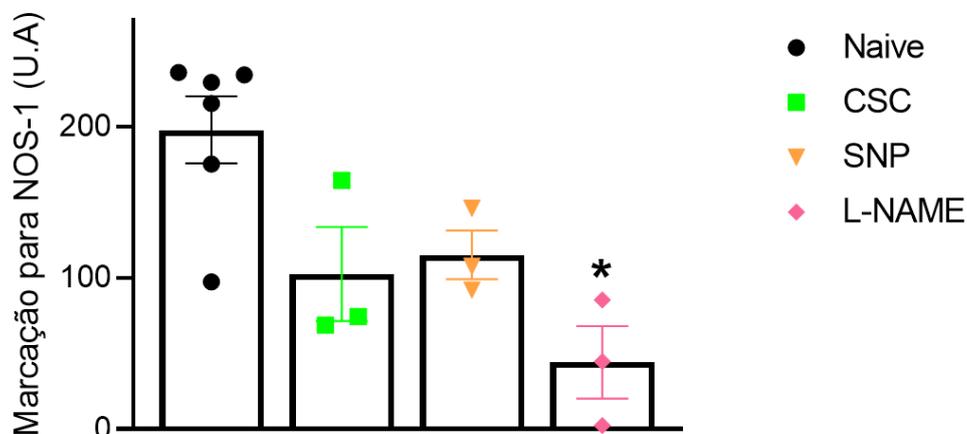
Fonte: A autora.

6.4.7. *Quantificação da enzima NOS-1*

Através das imagens originais da imuno-histoquímica, foi feita a quantificação da enzima NOS-1 em cada músculo de cada grupo experimental, para relacionar a presença dessa enzima com o dano muscular do EDL (Figura 22). Não foram contabilizadas as marcações dos núcleos ou do sarcolema, apenas da NOS-1 no interior da miofibra, por motivos de interesse apenas nas miofibras. Houve diferença estatística entre os grupos naive e L-NAME. Os valores das quantificações dos grupos naive, CSC, 7-NI e L-NAME foram respectivamente $197,7 \pm 22$ U.A., $102,4 \pm 31$ U.A., $115,1 \pm 16$ U.A., $44,1 \pm 24$ U.A.

A diferença porcentual entre o grupo naive e CSC, naive e SNP e naive e L-NAME, foi respectivamente 48%, 41% e 77%. Em relação a diferença porcentual entre o grupo séptico com os demais tratamentos, houve um aumento de 12% do grupo SNP, e uma redução de 57% do grupo L-NAME. Ou seja, a inibição não seletiva das NOS foi o tratamento que mais reduziu a NOS-1, principal produtora do NO no músculo esquelético. Apesar de não ter diferença estatística, a NOS-1 teve uma tendência de redução pela indução da sepse e com o tratamento doação do óxido nítrico.

Figura 25. Média da quantificação da enzima NOS-1, por grupo experimental em unidades arbitrárias, dez dias após a sepse.



Quantificação da enzima NOS-1 em unidades arbitrárias por grupo experimental, no músculo EDL coletado após dez dias da indução da sepse. **Preto:** Grupo N, **Verde:** Grupo CSC, **Laranja:** Grupo SNP e **Rosa:** Grupo L-NAME. Resultados expressos em média \pm EPM. * $P < 0,05$ (ANOVA de duas vias com *post hoc* de Tukey), em relação ao grupo naive.

Fonte: A autora.

7. DISCUSSÃO

7.1. Padronização do modelo *Cecal Slurry* em camundongos *Swiss* fêmeas

Inicialmente, este trabalho tinha como proposta original avaliar a influência do óxido nítrico no dano do músculo esquelético na sepse tardia, utilizando o modelo de indução de sepse padrão-ouro, CLP. No entanto, essa metodologia teve que ser alterada pois não obteve a aprovação do CEUA. Com isso, como alternativa sugerida pela própria comissão, foi feita a mudança para o método *Cecal Slurry*, menos invasivo. Porém, o uso do CS na literatura só fazia uso de ratos, camundongos C57BL/6 ou neonatos machos, sem registros na linhagem *Swiss*.

Além disso, o projeto de pesquisa inicial tinha como objetivo avaliar o efeito da ecdisterona no dano muscular esquelético no período pós-sepse, mas a literatura publicada mostrava a existência de resistência desse tratamento em machos. Assim sendo, optou-se por camundongos fêmeas *Swiss*, e antes de se avaliar o dano muscular na sepse

tardia, o método *Cecal Slurry* precisou ser adaptado para essa outra linhagem e em fêmeas.

Para isso, foram realizados dois experimentos. O primeiro buscou identificar a sepse nas fêmeas *Swiss* (Figura 6), a partir da análise de parâmetros característicos dessa síndrome. Foi feita indução da sepse, com acompanhamento da temperatura desses animais, seu peso, ingestão alimentar, glicemia e sobrevivência em 96 horas. No segundo experimento (Figura 7) foi realizada a avaliação fisiológica da sepse, e foi feita a mensuração da pressão arterial e frequência cardíaca médias, e dos níveis de uréia, creatinina, lactato e mieloperoxidase, 24 horas após a indução da sepse.

A partir dos resultados desses experimentos, foi possível concluir que o método *Cecal Slurry* adaptado em camundongos fêmeas *Swiss* induziu um quadro de sepse. Os animais sépticos apresentavam sintomas típicos, dentre eles a hipotermia, redução de peso, redução da ingestão de alimentos, hipoglicemia, hipotensão e creatinina aumentada, estatisticamente diferentes dos animais controle. Além disso, a sua taxa de sobrevivência também foi compatível com o observado em pacientes humanos, em que apenas 25% dos animais sépticos sobreviveram.

Os resultados da avaliação da temperatura desses animais até 72 horas após a indução da sepse (Figura 9) mostraram que a partir da primeira hora, houve uma queda significativa de sua temperatura corporal dos animais sépticos, e um quadro de hipotermia. A partir de 48 horas, a sua temperatura foi recuperada aos poucos, até atingir a medida dos controles, sem diferença estatística entre os grupos. No mais foi observado que os animais que tiveram temperatura ≤ 32 °C vieram à óbito (dados não mostrados), o que poderia ser um indicativo para a realização de *endpoint*.

Esse padrão também foi observado em outros trabalhos, sendo que a temperatura baixa foi observada até 7 dias após a indução da sepse. O acompanhamento mais longo da temperatura mostrou que em 23 dias esse parâmetro ainda não se iguala aos camundongos controles. Além disso, foi proposto que a hipotermia possa ser um *endpoint* em casos de temperatura corporal $\leq 30,5$ °C em 24 horas, como uma forma de prever a mortalidade e reduzir o sofrimento dos animais (LAITANO et al., 2018; GRANGER et al., 2013).

Existem diversas tentativas de elucidar os mecanismos que levam à essa hipotermia, já que está relacionada a uma maior mortalidade, e as hipóteses da literatura estão relacionadas com a falta de citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α e IL-6, que são considerados os marcadores febris. No entanto, a etiologia da baixa

temperatura na sepse permanece pouco entendida (WIEWEL et al., 2016). Outras evidências apontam ainda que uma hipotermia leve e/ou controlada pode diminuir a mortalidade e danos inflamatórios sistêmicos (HUET et al., 2007).

Desse modo, é preciso investigar mais a causa da hipotermia, qual é sua ligação com uma alta mortalidade e o seu vínculo com as citocinas. Ademais, o uso do *endpoint* deve ser continuado, mas utilizado junto com outros fatores bióticos assim como feito no escore SOFA, já que podem existir falsos positivos e negativos, e a predição entre sobrevivência e morte pode ser enviesada por apenas uma observação.

Além da temperatura corporal, outro parâmetro que foi investigado foi o peso corporal (Figura 10 A e B). Em até 72 horas após a indução de sepse, houve uma grande perda de peso dos animais sépticos, que não foi recuperada ao nível dos animais controle até o final da observação. Os animais controle mantiveram seu peso dentro da média da curva por todo o tempo analisado, o que sugere que a sepse afetou o peso dos animais.

Para verificar se a perda de peso dos animais poderia ter alguma relação com a sua alimentação, foi contabilizado o seu consumo alimentar em até 72 horas da indução da sepse (figura 10 C). Como o peso corporal, a ingestão alimentar também sofreu uma redução nos animais sépticos, que decaiu em 24 horas. Em 48 horas, os animais sépticos apresentaram uma ingestão de alimento de $0,8 \pm 0,6g$, enquanto os animais controles apresentavam a ingesta de $4,3 \pm 1,2g$ de ração, e foram estatisticamente diferentes quando comparados ao grupo controle. No entanto, a partir de 72 horas, seu consumo de ração foi aumentando, até se igualar aos níveis normais dos animais do grupo controle em 96 horas.

Isso foi visto em outros trabalhos, que utilizaram os modelos CLP e LPS, que relataram a redução da ingestão alimentar durante três dias após a indução da sepse, além da relação com a perda de peso dos animais. A perda de peso observada nos nossos resultados também parece estar associada com a redução da ingestão alimentar (GRANGER et al., 2013; BLUTHÉ et al., 2000). Em experimentos de 7 dias após a sepse, também houve perda de peso prolongada (LARIAN et al., 2019; LIU et al., 2021), porém, há dados divergentes com outro estudo, em que ocorreu a perda de peso, mas não a redução da ingestão alimentar. Isso sugere que outros parâmetros estão relacionados com a perda de peso na sepse além da ingestão alimentar (REMICK et al., 2005).

Em outro caso, o consumo alimentar teve um padrão similar ao nosso estudo, com queda drástica logo no primeiro dia da sepse, e atingiu níveis normais no quinto dia (SALMANI et al., 2022). Isso mostra que os resultados disponíveis na literatura são

divergentes, e animais sépticos podem ter diferentes perfis alimentares, além de ganhar, perder muito ou manter seu peso, tanto sobreviventes como falecidos, a depender do período de observação, linhagem e método de indução da sepse (OSUCHOWSKI et al., 2007; XIAO; SIDDIQUI; REMICK, 2006; MARKWART et al., 2014).

Dessa forma, ainda é pouco claro a influência sobre o peso corporal e a ingestão alimentar, e como essas medidas estariam relacionadas. Os resultados dessa divergência de dados poderiam estar conectados com o modelo animal utilizado e experimento realizado. Apesar disso, essas avaliações de peso e ingestão alimentar podem ser importantes para análise do bem-estar animal, escores de severidade da sepse e possíveis *endpoints*. Portanto, nossos resultados de alimentação e ingestão alimentar estão de acordo com a literatura atual.

É provável que alterações no consumo de alimento também influenciem na glicemia de animais sépticos. Na sepse aguda em 24 horas, inicialmente houve um aumento da glicemia (Figura 11), seguido de queda a partir da segunda hora da injeção da pasta cecal, com diferença significativa na sexta hora. A desregulação do metabolismo da glicose é vista em outros artigos, sendo que primeiramente há um pico de glicemia (hiperglicemia) seguido de queda (hipoglicemia), e esses eventos estão associados com uma maior disfunção de órgãos e mortalidade (YAMASHITA et al., 2017; SHAH et al., 2018).

De modo geral, o estresse fisiológico da sepse pode causar três perturbações na regulação da glicemia: a hipoglicemia, hiperglicemia e variabilidade glicêmica, que devem ser estudados em subgrupos pela heterogeneidade patofisiológica (PLUMMER & DEANE, 2016). Como na temperatura, as causas dessa ocorrência possuem hipóteses baseadas em citocinas e TNF- α , e também em hormônios como a incretina, que potencializam a liberação de insulina (OGURI et al., 2002; SHA et al., 2019).

Há ainda uma possibilidade de a sepse gerar uma deficiência na liberação de insulina, que poderia levar a suscetibilidade à hipoglicemia (HAGAR et al., 2017). Como citado acima, ainda é incerto qual o mecanismo responsável pelas flutuações da glicemia durante a sepse, e há ampla divergência de resultados, já que não é vista apenas hipoglicemia, hiperglicemia ou variabilidade glicêmica.

Contudo, os nossos resultados se mostram similares com outros artigos, com nosso modelo de sepse apresentando um quadro hipoglicêmico, que parece estar associado com a redução da ingesta alimentar dos animais tais quais os dados de Ferreira et al., 2017. Esses autores observaram que os animais sépticos apresentaram hipoglicemia

em 24 horas, e também relacionaram esse acontecimento com a falta de apetite dos animais sépticos, assim como ocorreu em nosso estudo.

Além dos parâmetros analisados acima, outras características importantes a serem analisadas na sepse são a pressão arterial e a frequência cardíaca, pois estão relacionadas com a hipoperfusão e a hipovolemia, que são algumas das causas da falência de múltiplos órgãos. Durante a fase aguda da sepse (Figura 12), os animais sépticos sofreram uma queda na pressão arterial, e foi identificada uma hipotensão, com redução de 40% da pressão arterial em relação ao controle. Porém, a frequência cardíaca não demonstrou alterações entre os grupos.

A hipotensão na sepse aguda foi demonstrada em outros trabalhos em modelos animais, sendo que parece ser associada com um pior prognóstico em roedores (KUMAR et al., 2006; WANG et al., 2015). Em contrapartida, a frequência cardíaca observada no presente estudo não mostrou diferenças estatísticas entre os grupos, assim como em outro trabalho. Mesmo assim, nesse artigo houve diferença significativa entre os animais sépticos quando comparado com os valores iniciais, e em 24 horas após a indução da sepse (HOLLENBERG et al., 2001).

Além disso, a frequência cardíaca normal de camundongos de laboratório é de aproximadamente 500 a 700 bpm, e a modulação dos batimentos é considerada mínima (até aproximadamente 50%), ou seja, podem não existir variações estatisticamente diferentes, apesar de haver alterações significativas, e isso limita a exploração desses dados para aplicação em pacientes humanos. Ademais, os processos de mensuração da frequência cardíaca nesses animais envolvem o uso de anestésicos, que diminui a frequência cardíaca e limita a avaliação da função cardíaca (LUJAN & DICARLO, 2013; JANSSEN et al., 2016).

Com isso, se faz necessária a mensuração da pressão arterial e da frequência cardíaca antes da sepse, e não só durante a fase aguda, e os efeitos dos anestésicos também devem ser considerados nos resultados. Isso sugere que a frequência cardíaca normal dos animais antes da sepse pode interferir nos resultados obtidos no quadro séptico, e apesar de não ter diferença estatística entre os grupos, a frequência cardíaca poderia estar significativamente alterada.

Além da hipoperfusão ser uma das causas da falência de órgãos, ela está envolvida com o aumento do lactato na sepse. Os níveis de lactato observados no presente trabalho (Figura 14) não mostraram diferença estatística entre os grupos durante a fase aguda. Isso ocorreu também em outros estudos, em que não foram observadas alterações nas

concentrações de lactato nas primeiras 12 horas da indução da sepse (KUMAR et al., 2006). Em contrapartida, também foi reportado aumento do nível de lactato em 24 horas por outros autores pelo modelo CLP, e esse acontecimento é correlacionado com uma maior mortalidade (YANG et al., 2022; FAN et al., 2022).

A hiperlactatemia é utilizada para identificar grupos de alto risco, como um biomarcador de hipóxia tecidual. Esse aumento é dado por ativação da via de glicólise anaeróbia em vista da hipoperfusão e débito de oxigênio no organismo. Contudo, diversas evidências apontam que o verdadeiro motivo do aumento do lactato na sepse seria a elevação da glicólise aeróbia e do estresse oxidativo, e esse biomarcador teria então uma função protetora de facilitar a eficácia bioenergética. Com isso, a interpretação dos níveis de lactato deve ser feita de acordo com o consenso mais atual (GARCIA-ALVAREZ; MARIK; BELLOMO, 2014; BAKKER, 2017).

Portanto, a ausência de diferença estatística do lactato entre os grupos experimentais não necessariamente indica que não houve hipóxia tecidual neste modelo de sepse, e foi condizente com outros autores. De qualquer forma, seria interessante realizar a avaliação do lactato em outros momentos da sepse, para a verificação de possíveis divergências que possam ocorrer pela utilização de métodos de indução de sepse diferentes.

Além da hiperlactatemia, durante a sepse há uma resposta inflamatória severa e persistente (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). Um dos marcadores utilizados para a detecção dessa inflamação é o aumento da mieloperoxidase. Neste trabalho, foi feita a dosagem da mieloperoxidase no pulmão de animais controle e sépticos (Figura 15), mas não houve diferença estatística. Um estudo em humanos observou um pico de mieloperoxidase no primeiro dia de admissão de pacientes sépticos em UTIs, e uma queda progressiva a partir do segundo dia (BONAVENTURA et al., 2020).

Os autores não discutiram o porquê da mieloperoxidase ter sofrido essa redução ao longo do período do estudo, apenas relacionaram suas concentrações com a mortalidade dos indivíduos. Porém, em camundongos sépticos também ocorreu essa relação, em que animais com deficiência de mieloperoxidase se mostraram mais suscetíveis a morrer de infecção (GAUT; YEH; TRAN, 2001; BROVKOVYCH et al., 2008). Desse modo, esses dados mostram que é necessário quantificar esses marcadores bioquímicos em outros momentos da sepse para medida de comparação, para verificar se há picos mais iniciais ou tardios, e deve-se investigar os mecanismos que causam esse evento.

Outros parâmetros analisados na fase aguda da sepse foram a creatinina e a ureia (Figura 13), já que um dos órgãos mais afetados pela falência de múltiplos órgãos é o rim. Níveis de ureia podem aumentar devido a processos infecciosos e febris, e pelo grande consumo proteico na dieta. Já valores reduzidos estão relacionados com problemas metabólicos hepáticos, catabolismo proteico alterado e má nutrição (HOSTEN, 1990; HIGGINS, 2016); e os camundongos desse estudo apresentaram redução em sua ingestão alimentar no intervalo após a indução da sepse.

Em 24 horas após a indução da sepse, a creatinina dos animais sépticos teve valores dobrados em relação aos animais controles, com diferença estatística entre os grupos, mas a ureia não apresentou diferenças estatísticas. Apesar disso, diversos autores observaram o aumento de uréia e creatinina na sepse induzida pelo método CLP (SUN et al., 2019, XIA et al., 2018). No entanto, a melhor forma de avaliar a função renal é pela medição de taxa de filtração glomerular, estimada pela creatinina (FERGUSON & WAIKAR, 2012), e os resultados dessa pesquisa evidenciam que houve dano renal pelos níveis de creatinina. Ainda, a redução da ingestão de alimento poderia ter levado a ausência da elevação da ureia.

Ademais, medições de ureia em outros momentos da sepse também poderiam ser importantes para a comparação ao longo do tempo da função renal. É possível, que pelo modelo de indução de sepse, possa haver aumento de ureia em outros momentos, assim como ocorreu no trabalho de Lee et al. (2016), em que seu modelo da *Cecal Slurry* foi adaptado e utilizado em ratos, e o pico de ureia e creatinina ocorreu em 6 horas após a indução da sepse.

A última análise feita nos camundongos durante a fase aguda da sepse foi a sua taxa de sobrevivência (Figura 16), pois a sepse comumente é fatal. Os animais controles deste estudo apresentaram sobrevivência de 100%. No entanto, os animais sépticos tiveram redução da proporção da sobrevivência a partir de 24 horas após a indução da sepse. Essa proporção continuou a reduzir em 48 e 72 horas, mas em 96 horas não houve mais óbitos causados pela sepse. Ao final do experimento, os animais sépticos tiveram uma proporção de sobrevivência de 25%, estatisticamente diferentes do controle.

Diversos autores relataram uma sobrevivência dose-dependente de *Cecal Slurry*, sendo que uma aplicação com dose maior de solução cecal causa uma menor sobrevivência dos animais, tanto em fêmeas como machos adultos, ou ainda neonatos. As curvas de sobrevivência desses artigos não tiveram resultados parecidos com o nosso estudo, porém isso pode ter ocorrido pelo fato de serem utilizadas outras linhagens de

camundongos (C56BL/6), e a maioria dos estudos encontrados utilizou ratos inclusive neonatos (WYNN et al., 2007; LEE et al., 2016; YANG et al., 2020; YOUNG et al., 2017; NAKASONE et al., 2021). Não foram encontrados outros artigos com o método *Cecal Slurry* em camundongos *Swiss* fêmeas.

Também foi realizada a proporção de sobrevivência de animais sépticos que receberam tratamento com antibiótico de amplo espectro (Figura 16), aplicado após 24 horas da indução da sepse, e depois consecutivamente a cada 24 horas. A sobrevivência desses animais decaiu em 24 e em 48 horas, porém, ao contrário dos animais que não receberam antibiótico, a mortalidade cessou no segundo dia. Com isso, a proporção de sobrevivência dos animais sépticos tratados com antibiótico foi de 50% , em 96 horas estatisticamente diferentes de animais controle. Isso mostra uma redução da mortalidade de 25%, comparado com os animais sépticos não tratados.

Trabalhos de experimentação com indução de sepse por solução cecal e uso de antibióticos de amplo espectro também relataram melhora na sobrevivência dos animais, sendo que o tempo de administração do fármaco depois da indução da sepse influenciou na taxa de sobrevivência final. Porém, nenhum dos outros estudos relatou utilização da linhagem de camundongos *Swiss*, e foram os únicos encontrados durante a escrita deste trabalho (STEELE; STARR; SAITO, 2017; BASTARACHE et al., 2022).

Em contrapartida, a mortalidade que ocorreu no primeiro dia da sepse foi relativamente baixa, e a grande parte dos animais veio a óbito a partir do segundo dia. Isso sugere que a fase aguda da sepse pode ocorrer neste modelo a partir de 48 a 72 horas, e não nas primeiras 24 horas. Deste modo, a aplicação de enrofloxacina em 24 horas de sepse ainda seria adequado, já que existem evidências que camundongos sépticos permanecem vivos até 24 horas após a sua aplicação (SLATE et al., 2014).

Quadro 5. Taxa de sobrevivência de camundongos C57BL/6 de 4 meses de idade de acordo com o método de indução de sepse.

Método de indução de sepse	Dose do <i>Cecal Slurry</i> /Comprimento da ligação cecal	Taxa de sobrevivência
<i>Cecal Slurry</i> (STARR et al., 2014)	Dose 100 ul	100%
	Dose 150 ul	100%
	Dose 200 ul	43%
CLP (RUIZ et al., 2016)	Comprimento da ligação cecal 5%	80%

	Comprimento da ligação cecal 20%	12%
	Comprimento da ligação cecal 100%	0%

7.2. Influência do óxido nítrico no dano tardio do músculo esquelético causado pela sepse

Feita a padronização do método *Cecal Slurry* e confirmado o quadro de sepse em camundongos fêmeas *Swiss*, o estudo seguiu para a sua segunda parte, para avaliar a influência do NO nas alterações patológicas tardias no músculo esquelético ocasionadas pela sepse (Figura 8). Com isso, foi induzida a sepse pelo método *Cecal Slurry*, e todos os animais do estudo receberam tratamento com antibiótico 24 horas após a indução da sepse, e a cada 24 horas, até o fim do experimento no décimo dia, a fim de analisar o músculo EDL de camundongos sobreviventes.

Para isso, foram utilizados grupos experimentais tratados com doador de NO (SNP), inibidor de NOS-1 (7-NI) e inibidor não seletivo das NOS (L-NAME), além dos grupos naive e sepse veículo (Figura 8). As drogas foram administradas 24 horas após a indução da sepse, e depois a cada 24 horas, até o décimo dia. Todos os animais foram eutanasiados e tiveram os seus músculos EDL coletados para a realização da histologia e identificação do dano muscular. Ainda, foi feita a imuno-histoquímica para verificar a presença da enzima NOS-1 no EDL, já que é a principal enzima produtora de óxido nítrico no músculo esquelético.

Dos resultados dessas análises, foi observado que a sepse induziu alterações patológicas nos animais sépticos, que persistiram no período pós-sepse de dez dias. Além disso, a inibição não seletiva de NOS parece ter sido o tratamento que mais apresentou dano muscular no EDL, pois sofreu a maior redução da enzima NOS-1 nesse órgão, e em outras miopatias a ausência de NOS-1 está relacionada com um dano muscular maior, como já citado anteriormente. Porém, são necessários mais estudos, como a avaliação funcional, para a confirmação desse evento.

A primeira análise morfométrica feita no músculo EDL foi a medida da área de suas miofibras, para detecção de alterações como atrofia nessas estruturas (Figura 18). A atrofia é um dano muscular que pode ocorrer pela degradação e/ou perda de organelas das miofibras devido ao desuso, caquexia e perturbações nutricionais ou metabólicas. Pode haver hipertrofia compensatória em fibras não afetadas, e a principal característica da

atrofia é a redução do diâmetro das miofibras, que são frequentemente angulosas e predominantemente vistas nos músculos traseiros de ratos (NTP, 2022).

Desta forma, analisamos a área média de 50 miofibras por músculo EDL, e foi feita a média da área dessas miofibras por grupo experimental, e os resultados não demonstraram diferença estatística entre os grupos. Isso pode ter ocorrido porque somente as fibras periféricas apresentaram atrofia, mas as fibras centrais apresentaram tamanho e forma normais, assim como relatado na identificação de atrofia de outras análises musculares em roedores (NTP, 2022).

Além disso, todos os grupos apresentaram redução da área das miofibras, e acreditamos que se o tempo do experimento fosse estendido e/ou a sepse fosse induzida de forma crônica nos animais, com a solução cecal sendo injetada diariamente em doses reduzidas, os grupos tratados poderiam apresentar uma diferença estatística entre si. Ainda, nem todos os músculos EDL passaram por análise morfométrica devido a presença de artefatos que impossibilitaram a medição da área das miofibras, mas a mensuração de novos cortes e inclusão de seus dados também poderiam ser outro fator que poderia levar a diferenças estatísticas.

Para confirmação da ausência de atrofia, foi feita a mensuração da área transversal dos músculos EDL congelados (Figura 19), e houve diferença significativa entre os grupos controle da sepse e tratados com inibidor inespecífico de NOS (L-NAME); e entre o grupo tratado com inibidor de NOS-1 (7-NI) e L-NAME. Os dados obtidos mostram uma área transversal de animais sépticos tratados com L-NAME maior que em animais naive e sépticos, que poderia indicar hipertrofia.

Porém, como já dito anteriormente, a aplicação prolongada de L-NAME pode levar ao aumento dos níveis de NO, e portanto, prolongar a inflamação causada pela sepse, que poderia ser a razão do aumento da área desse músculo. Ainda, a hipertrofia do grupo L-NAME poderia ser considerada um falso positivo em caso de edema do músculo esquelético, que é identificado a partir da expansão do espaço intersticial que geralmente ocorre secundário a inflamação (NTP, 2022). Com isso, foi avaliado o espaço intersticial entre as miofibras do músculo EDL (Figura 20).

Houve diferença significativa entre o grupo controle e o grupo séptico tratado com 7-NI. Nem todos os animais controle e sépticos tiveram seu músculo contabilizado, devido a problemas de coleta, no entanto, acreditamos que se todos tivessem sido analisados, haveria diferença estatística. Ademais, todos os grupos tiveram aumento do espaço intersticial, mas o grupo 7-NI foi o que teve a maior porcentagem dessa medida

entre as miofibras. Portanto, a hipótese de que o grupo L-NAME apresentava miofibras hipertróficas foi descartada pela presença do edema.

A última análise morfométrica para identificação de dano muscular no EDL foi feita pelo modelo padrão-ouro da examinação histopatológica, que é considerada o veredito final para a conclusão de diagnósticos (TAQI et al., 2018). Na examinação das lâminas do estudo (Figura 22), foram identificados edema e atrofia em animais sépticos, de acordo com a comparação com lâminas de músculo esquelético de roedores do banco de dados do National Toxicology Program (NTP, 2022).

Foram avaliados somente os grupos naive e controle da sepse, apesar de terem sido observadas alterações nos outros grupos sépticos tratados, pois não foi possível quantificar o dano muscular que de fato estava presente nas lâminas. No entanto, como esses danos foram vistos em todos os músculos dos camundongos do grupo CSC, pode-se afirmar que a sepse induzida pelo método *Cecal Slurry* ocasionou em dano ao músculo esquelético, que persistiu após a sepse.

Por último, como já citado anteriormente, há evidências na literatura de que o músculo esquelético pode ser considerado uma reserva de óxido nítrico, e a NOS-1 é a principal produtora de NO nesse órgão. Com isso, como o NO parece estar envolvido no dano muscular esquelético causado pela sepse, buscamos analisar a presença e a quantidade da enzima NOS-1 nos músculos EDL dos grupos experimentais após a sepse.

Nossos resultados mostram marcação da enzima NOS-1 no núcleo e no sarcolema do tecido em animais naive, conforme visto por outros autores (ROTHER; LANGNAESE; WOLF, 2005). Porém em animais sépticos e sépticos tratados com as drogas descritas acima foi observada sua presença no núcleo, e pouca marcação no sarcolema (Figura 23 e 24). O único grupo séptico que apresentou leve marcação do sarcolema foi o tratado com doador de NO. Além disso, a NOS-1 também foi fortemente marcada na membrana do músculo liso vascular, como visto por Teng et al., 1998.

Por fim, em relação à quantificação da NOS-1 no músculo EDL (Figura 25), houve diferença significativa entre o grupo naive e L-NAME. Por problemas de técnica, não foi possível analisar o grupo 7-NI, bem como alguns dos músculos EDL dos outros grupos experimentais. Acreditamos que uma repetição da imuno-histoquímica expressaria mais resultados estatisticamente significativos nos demais grupos. Mesmo assim, houve diferença significativa entre os grupos naive e L-NAME, e a enzima NOS-1 foi menos expressa com a inibição inespecífica de NOS. Esse resultado corrobora com

as análises morfométricas do músculo EDL, em que o grupo L-NAME foi o que apresentou maior dano muscular dez dias após a indução da sepse.

Em suma, no músculo EDL o tratamento com a doação de NO em animais sépticos parece não melhorar, ou piorar o dano muscular na fase pós-sepse, o que pode estar relacionado com a dose do fármaco, ou o SNP realmente não tem influência no dano muscular após sepse. A inibição de NOS-1 foi o tratamento que apresentou maior edema, mas seus resultados são inconclusivos, pois não foi o grupo mais afetado.

Enfim, a inibição das NOS de maneira inespecífica verificou ser importante para a melhora das funções vasculares na fase inicial da sepse, como dito anteriormente, mas no músculo esquelético após a sepse, essa inibição parece agravar as alterações patológicas no músculo EDL. Ainda, o tratamento com L-NAME foi o que induziu a menor quantidade de NOS-1 no músculo esquelético, e esses fatores poderiam estar relacionados com o aumento do dano muscular visto nesse grupo.

Para as perspectivas futuras, faz-se necessário estudos sobre a influência do NO na função contrátil do músculo EDL no período pós-sepse, para verificar a presença de fraqueza muscular e defeitos de contratilidade e geração de força. Também são necessárias pesquisas para elucidar os mecanismos pelos quais a proteína NOS-1 é reduzida no músculo esquelético após a sepse. O sistema proteolítico ubiquitina-proteassomo parece ser o principal responsável pela degradação da NOS-1 (OSAWA et al, 2003), e pode estar relacionado com esse acontecimento.

8. CONCLUSÕES

A partir do trabalho realizado, pode-se concluir que:

1. O modelo *Cecal Slurry* feito em fêmeas da linhagem Swiss foi adaptado com sucesso, e é reprodutível.
2. O método *Cecal Slurry* utilizado nessa pesquisa induziu um quadro típico de sepse, através da observação da hipoglicemia, hipotensão, hipotermia, redução de peso, redução de consumo alimentar e aumento da creatinina.
3. A mortalidade observada nos experimentos é compatível com os resultados disponíveis na literatura.

4. A sepse induziu alterações patológicas de atrofia e edema no músculo esquelético.
5. A enzima NOS-1 foi amplamente encontrada no núcleo, cromatina e sarcolema do músculo EDL.
6. A quantidade da enzima NOS-1 foi menor no grupo séptico tratado com inibidor inespecífico da sepse.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAKKER, Jan. Lactate is THE target for early resuscitation in sepsis. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 29, p. 124-127, 2017.

BASTARACHE, Julie A. et al. A two-hit model of sepsis plus hyperoxia causes lung permeability and inflammation. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 322, n. 2, p. L273-L282, 2022.

BONALDO, Paolo; SANDRI, Marco. Cellular and molecular mechanisms of muscle atrophy. **Disease models & mechanisms**, v. 6, n. 1, p. 25-39, 2013.

BONAVENTURA, Aldo et al. The role of resistin and myeloperoxidase in severe sepsis and septic shock: Results from the ALBIOS trial. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 50, n. 10, p. e13333, 2020.

BOTERO, Johan Sebastián Hernández; PÉREZ, María Cristina Florián. The history of sepsis from ancient Egypt to the XIX century. In: **Sepsis-an ongoing and significant challenge**. Intechopen, 2012.

BROVKOVYCH, Viktor et al. Augmented inducible nitric oxide synthase expression and increased NO production reduce sepsis-induced lung injury and mortality in myeloperoxidase-null mice. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 295, n. 1, p. L96-L103, 2008.

BRUCKDORFER, Richard. The basics about nitric oxide. **Molecular aspects of medicine**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, 2005.

BURAS, Jon A.; HOLZMANN, Bernhard; SITKOVSKY, Michail. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 10, p. 854-865, 2005.

CALLAHAN, Leigh Ann; SUPINSKI, Gerald S. Sepsis-induced myopathy. **Critical care medicine**, v. 37, n. 10, p. S354, 2009.

CDC. **What is sepsis?** 2022. Centers of Disease Control. Disponível em: <https://www.cdc.gov/sepsis/what-is-sepsis.html>. Acesso em: 23 nov. 2022.

COMTOIS, Alain S. et al. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction and sarcolemmal injury in mice lacking the neuronal nitric oxide synthase. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 163, n. 4, p. 977-982, 2001.

CSAPO, Robert; GUMPENBERGER, Matthias; WESSNER, Barbara. Skeletal muscle extracellular matrix—what do we know about its composition, regulation, and physiological roles? A narrative review. **Frontiers in Physiology**, v. 11, p. 253, 2020.

CUI, Xizhong et al. Neuronal nitric oxide synthase deficiency decreases survival in bacterial peritonitis and sepsis. **Intensive care medicine**, v. 33, n. 11, p. 1993-2003, 2007.

DANIELS, Ron; NUTBEAM, Tim (ed.). **The Sepsis Manual**. 2019. Disponível em: <https://sepsistrust.org/wp-content/uploads/2020/01/5th-Edition-manual-080120.pdf>. Acesso em: 23 nov. 2022.

DEISCH, Jeremy K. Muscle and nerve development in health and disease. **Swaiman's Pediatric Neurology**, p. 1029-1037, 2017.

FAN, Min et al. LACTATE IMPAIRS VASCULAR PERMEABILITY BY INHIBITING HSPA12B EXPRESSION VIA GPR81-DEPENDENT SIGNALING IN SEPSIS. **Shock**, v. 58, n. 4, p. 304-312, 2022.

FERGUSON, Michael A.; WAIKAR, Sushrut S. Established and emerging markers of kidney function. **Clinical chemistry**, v. 58, n. 4, p. 680-689, 2012.

FERREIRA, Francielle BD et al. Glucose homeostasis in two degrees of sepsis lethality induced by caecum ligation and puncture in mice. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 6, p. 329-340, 2017.

FINK, Mitchell P. Animal models of sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 143-153, 2014.

FÖRSTERMANN, Ulrich; SESSA, William C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European heart journal**, v. 33, n. 7, p. 829-837, 2012.

FRONTERA, Walter R.; OCHALA, Julien. Skeletal muscle: a brief review of structure and function. **Calcified tissue international**, v. 96, n. 3, p. 183-195, 2015.

FUNK, Duane J.; PARRILLO, Joseph E.; KUMAR, Anand. Sepsis and septic shock: a history. **Critical care clinics**, v. 25, n. 1, p. 83-101, 2009.

GARCIA-ALVAREZ, Mercedes; MARIK, Paul; BELLOMO, Rinaldo. Sepsis-associated hyperlactatemia. **Critical care**, v. 18, n. 5, p. 1-11, 2014.

GAUT, Joseph P. et al. Neutrophils employ the myeloperoxidase system to generate antimicrobial brominating and chlorinating oxidants during sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 21, p. 11961-11966, 2001.

GEROULANOS, Stefanos; DOUKA, Evangelia T. Historical perspective of the word “sepsis”. **Intensive care medicine**, v. 32, n. 12, p. 2077-2077, 2006.

GOTTI, Carlo et al. Hierarchical fibrous structures for muscle-inspired soft-actuators: A review. **Applied Materials Today**, v. 20, p. 100772, 2020.

GRANGER, Jill I. et al. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 7, p. 1047-1057, 2013.

GRIFFITHS, Ben; ANDERSON, Iain D. Sepsis, SIRS and MODS. **Surgery (Oxford)**, v. 27, n. 10, p. 446-449, 2009.

GRITTE, Raquel Bragante et al. Why septic patients remain sick after hospital discharge?. **Frontiers in Immunology**, p. 3873, 201.

HAGAR, Jon A. et al. Lipopolysaccharide potentiates insulin-driven hypoglycemic shock. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 10, p. 3634-3643, 2017.

HAKIM, Chady H.; WASALA, Nalinda B.; DUAN, Dongsheng. Evaluation of muscle function of the extensor digitorum longus muscle ex vivo and tibialis anterior muscle in situ in mice. **JoVE (Journal of Visualized Experiments)**, n. 72, p. e50183, 2013.

HIGGINS, Chris. Urea and the clinical value of measuring blood urea concentration. **Acutecaretesting. Org**, p. 1-6, 2016.

HOLLENBERG, Steven M. et al. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 5, p. 891-895, 2001.

HOSTEN, Adrian O. BUN and Creatinine. **Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations. 3rd edition**, 1990.

HUANG, Cynthia Y. et al. Life after sepsis: an international survey of survivors to understand the post-sepsis syndrome. **International journal for quality in health care**, v. 31, n. 3, p. 191-198, 2019.

HUBBARD, William J. et al. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 24, p. 52-57, 2005.

HUET, O. et al. Induced mild hypothermia reduces mortality during acute inflammation in rats. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 51, n. 9, p. 1211-1216, 2007.

HUSSAIN, Sabah NA. Respiratory muscle dysfunction in sepsis. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 125-134, 1998.

JANEWAY JR, Charles A. et al. Infectious agents and how they cause disease. In: **Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. 5th edition**. Garland Science, 2001.

JANSSEN, Paul ML et al. The need for speed: mice, men, and myocardial kinetic reserve. **Circulation research**, v. 119, n. 3, p. 418-421, 2016.

JONES, Alan E.; TRZECIAK, Stephen; KLINE, Jeffrey A. The Sequential Organ Failure Assessment score for predicting outcome in patients with severe sepsis and evidence of hypoperfusion at the time of emergency department presentation. **Critical care medicine**, v. 37, n. 5, p. 1649, 2009.

JONES, Christina; GRIFFITHS, R. D. Mental and physical disability after sepsis. **Minerva anesthesiologica**, v. 79, n. 11, p. 1306-1312, 2013.

KOPINCOVÁ, Jana; PÚZSEROVÁ, Angelika; BERNÁTOVÁ, Iveta. L-NAME in the cardiovascular system—nitric oxide synthase activator?. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 3, p. 511-520, 2012.

KUMAR, Anand et al. The duration of hypotension before the initiation of antibiotic treatment is a critical determinant of survival in a murine model of Escherichia coli septic shock: association with serum lactate and inflammatory cytokine levels. **Journal of Infectious Diseases**, v. 193, n. 2, p. 251-258, 2006.

LAITANO, Orlando et al. Xiphoid surface temperature predicts mortality in a murine model of septic shock. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 50, n. 2, p. 226, 2018.

LAMBDEN, Simon. Bench to bedside review: Therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis—An update. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2019.

LAMONTAGNE, Francois et al. NITRIC OXIDE DONORS IN SEPSIS: A SYSTEMATIC REVIEW OF CLINICAL AND: IN VIVO: PRECLINICAL DATA. **Shock**, v. 30, n. 6, p. 653-659, 2008.

LANONE, Sophie et al. Sepsis is associated with reciprocal expressional modifications of constitutive nitric oxide synthase (NOS) in human skeletal muscle: down-regulation of NOS1 and up-regulation of NOS3. **Critical care medicine**, v. 29, n. 9, p. 1720-1725, 2001.

LARIAN, Nika et al. Pseudomonas aeruginosa-derived pyocyanin reduces adipocyte differentiation, body weight, and fat mass as mechanisms contributing to septic cachexia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 130, p. 219-230, 2019.

LEE, Su Mi; AN, Won Suk. New clinical criteria for septic shock: serum lactate level as new emerging vital sign. **Journal of thoracic disease**, v. 8, n. 7, p. 1388, 2016.

LEE, Gi Dong; KIM, Ho Cheol. Mechanisms of muscle wasting in patients with sepsis. **Korean Journal of Critical Care Medicine**, v. 25, n. 1, p. 9-15, 2010.

LEE, In-Chul; BAE, Jong-Sup. Pelargonidin protects against renal injury in a mouse model of sepsis. **Journal of medicinal food**, v. 22, n. 1, p. 57-61, 2019.

LEE, Min Ji et al. Dose-dependent mortality and organ injury in a cecal slurry peritonitis model. **Journal of Surgical Research**, v. 206, n. 2, p. 427-434, 2016.

LELUBRE, Christophe; VINCENT, Jean-Louis. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 417-427, 2018.

LIDINGTON, Darcy; LI, Fuyan; TYML, Karel. Deletion of neuronal NOS prevents impaired vasodilation in septic mouse skeletal muscle. **Cardiovascular research**, v. 74, n. 1, p. 151-158, 2007.

LIEBER, Richard L.. **Skeletal Muscle Structure, Function & Plasticity: the physiological basis of rehabilitation**. 2. ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 2002.

LIU, Yukun et al. Alpinetin attenuates persistent inflammation, immune suppression, and catabolism syndrome in a septic mouse model. **Journal of Immunology Research**, v. 2021, 2021.

LÓPEZ, Angel et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Critical care medicine**, v. 32, n. 1, p. 21-30, 2004.

LUJAN, Heidi L.; DICARLO, Stephen E. Cardiac output, at rest and during exercise, before and during myocardial ischemia, reperfusion, and infarction in conscious mice. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 304, n. 4, p. R286-R295, 2013.

LUPP, Corinna et al. Differentiated control of deranged nitric oxide metabolism: a therapeutic option in sepsis?. **Critical care**, v. 17, n. 3, p. 1-9, 2013.

MACINTOSH, Brian R.; GARDINER, Phillip F.; MCCOMAS, Alan J. **Skeletal Muscle: form and function**. 2. ed. Champaign: Human Kinetics, 2006.

MARKWART, Robby et al. Immunosuppression after sepsis: systemic inflammation and sepsis induce a loss of naive T-cells but no enduring cell-autonomous defects in T-cell function. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e115094, 2014.

MANSFIELD, Paul Jackson; NEUMANN, Donald A.. **Essentials of Kinesiology: for the physical therapist assistant**. 3. ed. Saint Louis: Elsevier, Inc., 2019.

MOSTEL, Zachary et al. Post-sepsis syndrome—an evolving entity that afflicts survivors of sepsis. **Molecular Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2020.

National Toxicology Program. National Institutes of Health (org.). **Nonneoplastic Lesion Atlas**: a guide for standardizing terminology in toxicology pathology for rodents. A guide for standardizing terminology in toxicology pathology for rodents. 2022. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/nml/musculoskeletal/skel_musc/index.htm. Acesso em: 20 nov. 2022.

NAKASONE, Ruka et al. Protective Role of an Initial Low-Dose Septic Challenge against Lethal Sepsis in Neonatal Mice: A Pilot Study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 24, p. 5823, 2021.

NARDI, Geisson M. et al. Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. **Critical care medicine**, v. 42, n. 6, p. e391-e400, 2014.

OGURI, Senri et al. Primary role of interleukin-1 α and interleukin-1 β in lipopolysaccharide-induced hypoglycemia in mice. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 9, n. 6, p. 1307-1312, 2002.

OLIVER, Kate; SEDDON, Annela; TRASK, Richard S. Morphing in nature and beyond: a review of natural and synthetic shape-changing materials and mechanisms. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 24, p. 10663-10689, 2016.

OSAWA, Yoichi et al. Proteolytic degradation of nitric oxide synthase: effect of inhibitors and role of hsp90-based chaperones. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, n. 2, p. 493-497, 2003.

OSUCHOWSKI, Marcin F. et al. Chronic sepsis mortality characterized by an individualized inflammatory response. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 1, p. 623-630, 2007.

PIRET, Jocelyne; BOIVIN, Guy. Pandemics throughout history. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 631736, 2021.

PLUMMER, Mark P.; DEANE, Adam M. Dysglycemia and glucose control during sepsis. **Clinics in chest medicine**, v. 37, n. 2, p. 309-319, 2016.

PRESCOTT, Hallie C. et al. Understanding and enhancing sepsis survivorship. Priorities for research and practice. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 200, n. 8, p. 972-981, 2019.

PRESCOTT, Hallie C.; ANGUS, Derek C. Enhancing recovery from sepsis: a review. **Jama**, v. 319, n. 1, p. 62-75, 2018.

REMICK, Daniel G. et al. Role of interleukin-6 in mortality from and physiologic response to sepsis. **Infection and immunity**, v. 73, n. 5, p. 2751-2757, 2005.

RITTIRSCH, Daniel; FLIERL, Michael A.; WARD, Peter A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 10, p. 776-787, 2008.

ROTHER, Fritz; LANGNAESE, Kristina; WOLF, Gerald. New aspects of the location of neuronal nitric oxide synthase in the skeletal muscle: a light and electron microscopic study. **Nitric Oxide**, v. 13, n. 1, p. 21-35, 2005.

RUDD, Kristina E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200-211, 2020.

RUIZ, Stéphanie et al. Sepsis modeling in mice: ligation length is a major severity factor in cecal ligation and puncture. **Intensive care medicine experimental**, v. 4, p. 1-13, 2016.

SALMANI, Hossein et al. Exacerbated immune response of the brain to peripheral immune challenge in post-septic mice. **Brain Research Bulletin**, v. 185, p. 74-85, 2022.

SALOMÃO, R. et al. Sepsis: evolving concepts and challenges. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 52, 2019.

SCHMIDT, Konrad et al. Long-Term Survival Following Sepsis: Results of a Single-Center Registry Study With 4-Year Follow-Up. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 117, n. 46, p. 775, 2020.

SCHRIJVER, Irene T. et al. Myeloperoxidase can differentiate between sepsis and non-infectious SIRS and predicts mortality in intensive care patients with SIRS. **Intensive care medicine experimental**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2017.

SHAH, Faraaz Ali et al. Stimulation of the endogenous incretin glucose-dependent insulinotropic peptide by enteral dextrose improves glucose homeostasis and inflammation in murine endotoxemia. **Translational Research**, v. 193, p. 1-12, 2018.

SHAH, Faraaz Ali et al. Therapeutic effects of endogenous incretin hormones and exogenous incretin-based medications in sepsis. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 104, n. 11, p. 5274-5284, 2019.

SINGER, Mervyn et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SLATE, Andrea R. et al. Efficacy of enrofloxacin in a mouse model of sepsis. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 53, n. 4, p. 381-386, 2014.

STAMLER, Jonathan S.; MEISSNER, Gerhard. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiological reviews**, v. 81, n. 1, p. 209-237, 2001.

STARR, Marlene E. et al. A new cecal slurry preparation protocol with improved long-term reproducibility for animal models of sepsis. **PLoS one**, v. 9, n. 12, p. e115705, 2014.

STEELE, Allison M.; STARR, Marlene E.; SAITO, Hiroshi. Late therapeutic intervention with antibiotics and fluid resuscitation allows for a prolonged disease course with high survival in a severe murine model of sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 47, n. 6, p. 726, 2017.

SUN, ShuJun et al. Maresin 1 mitigates sepsis-associated acute kidney injury in mice via inhibition of the NF- κ B/STAT3/MAPK pathways. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1323, 2019.

TALBOT, Jared; MAVES, Lisa. Skeletal muscle fiber type: using insights from muscle developmental biology to dissect targets for susceptibility and resistance to muscle disease. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 5, n. 4, p. 518-534, 2016.

TAQI, Syed Ahmed et al. A review of artifacts in histopathology. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 22, n. 2, p. 279, 2018.

TENG, B.-Q. et al. Expression of endothelial nitric oxide synthase in human and rabbit gastrointestinal smooth muscle cells. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 275, n. 2, p. G342-G351, 1998.

THOMAS-RÜDDEL, Daniel O. et al. Fever and hypothermia represent two populations of sepsis patients and are associated with outside temperature. **Critical Care**, v. 25, n. 1, p. 1-10, 2021.

VAN DER SLIKKE, Elisabeth C. et al. Exploring the pathophysiology of post-sepsis syndrome to identify therapeutic opportunities. **EBioMedicine**, v. 61, p. 103044, 2020.

WALKER, D. H. Interactions of pathogens with the host. **Pathobiology of Human Disease**, p. 214, 2014.

WANG, Qiang et al. Anti-inflammatory profile of levosimendan in cecal ligation-induced septic mice and in lipopolysaccharide-stimulated macrophages. **Critical Care Medicine**, v. 43, n. 11, p. e508-e520, 2015.

WIEWEL, Maryse A. et al. Risk factors, host response and outcome of hypothermic sepsis. **Critical Care**, v. 20, p. 1-9, 2016.

WYNN, James L. et al. Increased mortality and altered immunity in neonatal sepsis produced by generalized peritonitis. **Shock**, v. 28, n. 6, p. 675-683, 2007.

XIA, Yizi et al. Pterostilbene attenuates acute kidney injury in septic mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 15, n. 4, p. 3551-3555, 2018.

XIAO, Hongyan; SIDDIQUI, Javed; REMICK, Daniel G. Mechanisms of mortality in early and late sepsis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 9, p. 5227-5235, 2006.

YAMASHITA, Hayato et al. Interleukin-18 reduces blood glucose and modulates plasma corticosterone in a septic mouse model. **Shock**, v. 47, n. 4, p. 455-462, 2017.

YANG, Kun et al. Lactate induces vascular permeability via disruption of VE-cadherin in endothelial cells during sepsis. **Science advances**, v. 8, n. 17, p. eabm8965, 2022.

YANG, Hee Won et al. Effect of Hyperbaric Oxygen Therapy on Acute Liver Injury and Survival in a Rat Cecal Slurry Peritonitis Model. **Life**, v. 10, n. 11, p. 283, 2020.

YOUNG, Whitney A. et al. Improved survival after induction of sepsis by cecal slurry in PD-1 knockout murine neonates. **Surgery**, v. 161, n. 5, p. 1387-1393, 2017.

ZHANG, Jiajie et al. Impact of muscle mass on survival in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis. **Annals of Nutrition and Metabolism**, p. 1-7, 2021.