



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Clarissa Germano Barp

Contribuição do tecido adiposo perivascular na disfunção vascular da sepse experimental

Florianópolis

2020

Clarissa Germano Barp

Contribuição do tecido adiposo perivascular na disfunção vascular da sepse experimental

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia

Orientador: Prof. Jamil Assreuy, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Barp, Clarissa Germano
Contribuição do tecido adiposo perivascular na disfunção
vascular da sepse experimental / Clarissa Germano Barp ;
orientador, Jamil Assreuy, 2020.
88 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Farmacologia Cardiovascular. 3.
Sepse. 4. Disfunção vascular. 5. Tecido adiposo
perivascular. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia. III. Título.

Clarissa Germano Barp

Contribuição do tecido adiposo perivascular na disfunção vascular da sepse experimental

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^ª. Luciana Venturini Rossoni, Dr^ª.

Universidade de São Paulo

Prof^ª. Daniella Bonaventura, Dr^ª.

Universidade Federal de Minas Gerais

Prof. Daniel Fernandes, 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 doutora em Farmacologia.

Prof. Rui Daniel Schroder Prediger, Dr.

Coordenador do Programa

Prof. Jamil Assreuy, Dr.

Orientador

Florianópolis, 2020.

Dedico este trabalho a todos aqueles que, da bancada ao leito, se dedicam a entender e melhorar o panorama da sepse.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Prof. Dr. Jamil, por sua orientação nestes seis anos de caminhada. Por todo o ensinamento científico, mas também, e não menos importante, pelas trocas sobre a vida e por não deixar de ver as pessoas nos seu orientados, respeitando as diferenças. Seus ensinamentos são valiosos.

À minha família. Aos meus pais e primeiros mestres, Marlene e Vicente, que me mostraram a importância da educação e que até hoje são apoio em todas as minhas escolhas. À minha irmã, Camila, com quem posso conversar sobre o universo e a vida sabendo que nossa troca é sempre de crescimento. E ao meu companheiro felino, Gru, que é dose diária de amor. Amo vocês!

À Patrícia, colaboradora deste trabalho, com quem discuti as ideias e os resultados, os anseios da vida, as angústias do processo e um pouco de astrologia.

À toda a equipe do NOLab. À Adri, sempre disposta a ajudar. E a todos os colegas, dos antigos até os atuais, por toda a ajuda e boa convivência. Em especial à Maria Luísa, pelas ajudas experimentais e por compartilhar comigo o amor pelos felinos, e à Camila, “minha IC”, por toda a troca.

Ao Prof. Dr. Tony Heagerty, por ter me acolhido em seu laboratório durante o Doutorado Sanduíche e por seu cuidado em saber “Are you okay? Are you happy?”. O mundo científico precisa de mais pessoas assim. E à Sophie Saxton, por todo auxílio no laboratório e por compartilhar seu conhecimento experimental.

Ao Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e a todos de seu laboratório, onde utilizei os sistemas de órgão isolado. Em especial à Elaine pelas conversas para além dos experimentos e à Angélica pela sempre pronta ajuda.

Aos amigos que fiz em Manchester, Camila, Priscilla, Giulia, Flavi, Ana, Raquel, Julio, Robson e Paula. Não teria sido o mesmo sem vocês, vocês coloriram aqueles dias cinzas!

À todas as pessoas queridas que compartilharam comigo um pouco desta aventura. Em especial às minhas amigas queridas, que passaram pelos altos e baixos do doutorado comigo: Cassiana, Camila, Stella e Andréia. Obrigada pela amizade e apoio.

Aos professores e colegas dos LabCardio e LabCare, pelas discussões nos seminários semanais.

À Prof^a. Dr^a. Luciana Venturini Rossoni pela ajuda com o experimento de sonda fluorescente e ao Prof. Dr. Edson Antunes pela doação de agonista e antagonista β 3 adrenérgicos.

A todos os professores, colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia.

Aos funcionários do LAMEB e do LCME.

Aos professores, Dr^a. Luciana Venturini Rossoni, Dr^a. Daniella Bonaventura, Dr. Daniel Fernandes, Dr^a. Simone Vargas da Silva e Dr. Alfeu Zanotto, por terem aceitado avaliar este trabalho.

Às agências de fomento, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro. E à UFSC, universidade pública de qualidade, onde foi desenvolvida a maior parte deste projeto.

Aos animais, meu profundo respeito.

“Somos, enfim, o que fazemos para transformar o que somos. A identidade não é uma peça de museu, quietinha na vitrine, mas a sempre assombrosa síntese das contradições nossas de cada dia.”

Eduardo Galeano

RESUMO

A disfunção vascular desempenha papel fundamental no desenvolvimento da sepse. O endotélio é conhecido por sua ação neste contexto, porém, a ação do tecido adiposo perivascular (PVAT) nesta disfunção é relativamente desconhecida. O trabalho foi desenvolvido utilizando modelo de sepse experimental, induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) e incubação com LPS. A resposta contrátil de aorta torácica e artéria mesentérica superior obtidas de ratas sépticas com o PVAT mantido (PVAT+) ou removido (PVAT-) e de artérias de resistência de camundongos incubadas com LPS foi avaliada frente à noradrenalina. Sondas fluorescentes foram utilizadas para a avaliação da produção de óxido nítrico (NO) e espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *oxygen reactive species*) pelo PVAT. Também, através de técnica de imunofluorescência, foi avaliada a expressão das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) e de receptores β 3- adrenérgicos, além da S-nitrosilação de proteínas, através do ensaio de *biotin switch*. Aorta e artéria mesentérica superior dos animais sépticos PVAT+ mostraram uma resposta contrátil diminuída, quando comparada com os vasos PVAT-. O PVAT da aorta produziu NO, enquanto o PVAT da mesentérica produziu ROS durante a progressão da sepse. O PVAT de artérias de resistência incubado com o LPS também causou relaxamento destes mesmos vasos. O PVAT da aorta e da mesentérica apresentou aumento na expressão da isoforma neuronal da NOS (NOS-1). Houve aumento da nitrosilação de proteínas apenas no PVAT da aorta. Experimentos cruzados, onde os vasos eram provenientes de animais saudáveis e o PVAT de animais saudáveis ou de animais sépticos, mostraram L-NAME, ODQ e antagonista β 3- adrenérgico reverteram o efeito anticontrátil aumentado do PVAT de animais sépticos na aorta. Nenhum destes compostos reverteu este efeito na mesentérica superior, o qual foi revertido pelo uso de tempol. O PVAT contribui para o aumento do efeito anticontrátil em vasos sépticos e os mecanismos parecem diferir entre os vasos: enquanto no PVAT da aorta o efeito parece depender da ativação de receptores β 3-adrenérgicos e NO, no PVAT da mesentérica, a formação de ROS parece ser mais relevante; ainda não se tem informações sobre os mecanismos anticontráteis do PVAT de artérias de resistência. Independente dos mecanismos, o PVAT participa da disfunção vascular da sepse e pode ser um alvo importante para futuros tratamentos desta condição.

Palavras-chave: tecido adiposo perivascular; choque séptico; disfunção vascular; óxido nítrico; espécies reativas de oxigênio

ABSTRACT

Vascular dysfunction plays a key role in sepsis. Endothelium is a relevant player but the role of perivascular adipose tissue (PVAT) is relatively unknown. The work was developed using cecal ligation and puncture (CLP) as sepsis model and LPS incubation. The responses of aorta, superior mesenteric artery and second order mesentery artery to norepinephrine in the presence or absence of PVAT were evaluated. Fluorescent probes measured nitric oxide (NO) and reactive oxygen species (ROS) production. NO synthases (NOS) and β 3-adrenoceptor expression were detected by immunofluorescence and S-nitrosylation by biotin switch assay. Aorta and superior mesenteric arteries from septic animals with intact PVAT showed a worsened response to the vasoconstrictor compared to vessels without PVAT. The same was observed in resistance mesenteric artery incubated with LPS. PVAT from aorta produced NO and ROS whereas PVAT from mesentery artery produced only ROS. Septic aortic PVAT exhibited a higher density of NOS-1 and NOS-3. S-nitrosylation was found in aortic PVAT. Donor (PVAT obtained from normal or septic rats): Host (normal vessel without PVAT) experiments showed that L-NAME, ODQ and β -3 adrenergic receptor antagonist blocked septic aortic PVAT anti-contractile effect. None of these compounds affected mesenteric PVAT and tempol, but not apocynin, blocked its anti-contractile effect. PVAT contributes to the anti-contractile effect in aorta and mesenteric artery of septic rats and the mechanisms seems to be different: β -3 adrenergic receptor and NO appear to be key mediators of this effect in aortic PVAT, but not in superior mesenteric PVAT where ROS seem to be a relevant mediator; it's necessary more information about the mechanism of PVAT in resistance arteries. Therefore, independent of the mechanism PVAT is a participant of sepsis vascular dysfunction and a putative pharmacological target to counteract this condition.

Keywords: perivascular adipose tissue; septic shock; vascular dysfunction; nitric oxide; reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferenças do tecido adiposo.....	19
Figura 2 - Estrutura da parede dos vasos.....	20
Figura 3 - Tipos de tecido adiposo perivascular.....	22
Figura 4 - Fatores de risco para o desenvolvimento da sepse.....	30
Figura 5 - Visão simplificada da fisiopatologia sepse.....	32
Figura 6 - Curva de sobrevivência para a caracterização da gravidade da sepse experimental.....	45
Figura 7 - Concentração de nitrito + nitrato (NOx) plasmáticos.....	46
Figura 8 - Resposta contrátil de vasos naïve e Sham frente à noradrenalina.....	47
Figura 9 - A presença do PVAT reduz a contração dos vasos de animais sépticos frente à noradrenalina.....	49
Figura 10 - Efeito anticontrátil do PVAT removido de animais sépticos sobre a contração de vasos saudáveis.....	51
Figura 11 - Produção de NO e ROS no PVAT de aorta e artéria mesentérica superior obtidas de animais sépticos durante a progressão da sepse.....	53
Figura 12 - Expressão das NOS no PVAT de aorta torácica e artéria mesentérica superior durante a sepse.....	55
Figura 13 - S-nitrosilação de proteínas no PVAT de aorta e artéria mesentérica superior durante a sepse.....	56
Figura 14 - Inibição da via do NO no efeito anticontrátil do PVAT removido de animais sépticos.....	57
Figura 15 - Imunofluorescência dos receptores β_3 -adrenérgicos no PVAT de aorta e artéria mesentérica superior durante a sepse.....	59
Figura 16 - Efeito do antagonista do receptor β_3 adrenérgico sobre o PVAT de animais saudáveis e sépticos na contração aorta de animais saudáveis.....	60
Figura 17 - Efeito da apocinina e tempol sobre o PVAT de animais saudáveis e sépticos na contração de artéria mesentérica superior de animais saudáveis.....	61
Figura 18 - Efeito do PVAT na contração para a noradrenalina de vasos saudáveis ou incubados com lipopolissacarídeo.....	62
Figura 19 - Efeito do PVAT na contração para a noradrenalina de vasos saudáveis após a incubação do PVAT com lipopolissacarídeo.....	63
Figura 20 - Efeito do PVAT na contração para a noradrenalina de vasos de camundongos obesos após a incubação do PVAT com lipopolissacarídeo.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores de potência (-log CE50) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior com (PVAT+) ou sem (PVAT-) o tecido adiposo perivascular mantido.....	50
Tabela 2 - Valores de potência (-log CE50) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior de animais saudáveis incubadas com PVAT de animais naïve ou CLP.....	52
Tabela 3 - Valores de potência (-log CE50) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior de animais saudáveis na presença de PVAT de animais saudáveis ou sépticos na ausência ou na presença de inibidores da via do NO.....	58
Tabela 4 - Valores de potência (-log CE50) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior de animais saudáveis na presença de PVAT de animais saudáveis ou sépticos na presença de antagonista de receptores β 3-adrenérgicos.....	60
Tabela 5 - Valores de potência (-log CE50) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior de animais saudáveis na presença de PVAT de animais saudáveis ou sépticos na presença de compostos que interferem via de ROS.....	61
Tabela 6 - Valores de potência (-log CE50) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em artéria mesentérica de segunda ordem PVAT+ e PVAT- incubados com veículo ou LPS.....	63
Tabela 7 - Valores de potência (-log CE50) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em artéria mesentérica de segunda ordem de animais saudáveis na presença de PVAT incubado com veículo ou com LPS.....	64
Tabela 8 - Valores de potência (-log CE50) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em artéria mesentérica de segunda ordem de animais obesos na presença de PVAT incubado com veículo ou com LPS.....	65

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Desenho experimental da Parte I.....	43
Esquema 2 - Experimentos de aorta e artéria mesentérica superior isoladas.....	44
Esquema 3 - Experimentos de artéria mesentérica de segunda ordem isoladas.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADRF Fator relaxante derivado do adipócito
- Ang 1–7 Angiotensina 1-7
- Ang II Angiotensina II
- ANOVA Análise de variância
- AT₁ e AT₂ Receptores de angiotensina II do tipo 1 e 2
- BAT Tecido adiposo marrom
- BH₄ tetrahidrobiopterina
- BK_{Ca} Canais de potássio dependentes de cálcio
- CARS Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
- CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais
- CLP Ligadura e perfuração do ceco
- CO₂ Dióxido de carbono
- DAMP Padrões moleculares associados ao dano
- DAPI 4',6-diamidino-2-phenilindol
- DNA ácido desoxirribonucleico
- ECA Enzima conversora de angiotensina
- EFS Estímulo de campo elétrico
- FAD Dinucleotídeo de flavina e adenina
- FMN Mononucleotídeo de flavina
- GCs Guanilato ciclase solúvel
- GMP Monofosfato cíclico de guanosina
- HFD Dieta rica em lipídios
- H₂O₂ Peróxido de hidrogênio
- H₂S Sulfeto de hidrogênio
- IL Interleucina
- KCl Cloreto de potássio
- K_v canais de potássio dependentes de voltagem
- LPS Lipopolissacarídeo
- NA Noradrenalina
- NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- NET Transportador de noradrenalina
- NO Óxido nítrico
- NOS-1 Óxido nítrico sintase neuronal

NOS-2 Óxido nítrico sintase induzida
NOS-3 Óxido nítrico sintase endotelial
NOx Nitrato e nitrito
 $O_2^{\cdot-}$ Ânion superóxido
OCT3 transportador de cátions orgânicos 3
ONOO⁻ Peroxinitrito
PAME Éster metílico do ácido palmítico
PAMP Padrões moleculares associados ao patógeno
PAQR Receptores de progesterona e adiponectina Q
PRR receptores de reconhecimento padrão
PVAT Tecido adiposo perivascular
ROS Espécies reativas de oxigênio
RSN Espécies reativas de nitrogênio
SERT Transportador de serotonina
SIRS Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SRA Sistema renina-angiotensina
TLR Receptores do tipo toll
TNF- α Fator de necrose tumoral alfa
UCP-1 Proteína desacopladora-1
UTI Unidade de terapia intensiva
WAT Tecido adiposo branco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O TECIDO ADIPOSEO – ASPECTOS GERAIS.....	18
1.2. PVAT E O SISTEMA CARDIOVASCULAR.....	20
1.3. SEPSE, CHOQUE SÉPTICO E A DISFUNÇÃO CARDIOVASCULAR.....	28
1.4. PVAT NA SEPSE E ENDOTOXEMIA.....	35
2. JUSTIFICATIVA.....	36
3. HIPÓTESE.....	36
4. OBJETIVOS.....	36
4.1. OBJETIVO GERAL.....	36
4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
5.1. ANIMAIS.....	37
5.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	37
5.2.1. Indução da sepse pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	37
5.2.2. Experimentos de órgão isolado.....	38
5.2.3. Dosagem de nitrito e nitrato (NOx).....	39
5.2.4. Avaliação da produção de NO e ROS.....	40
5.2.5. Imunofluorescência.....	41
5.2.6. Ensaio de nitrosilação de proteínas.....	42
5.2.7. Análise estatística.....	42
5.3. MATERIAIS.....	43
5.4. DESENHOS EXPERIMENTAIS.....	43
6. RESULTADOS.....	44
6.1. PARTE I.....	45
6.1.1. Caracterização da intensidade da sepse experimental e a escolha por animais naïve como controle.....	45
6.1.2. Efeito do PVAT sobre o tônus vascular de animais sépticos.....	47
6.1.3. Confirmação do aumento da ação anticontrátil do PVAT na sepse.....	50
6.1.4. Produção de NO e ROS no PVAT.....	52
6.1.5. Expressão das NOS no PVAT durante o curso da sepse.....	54
6.1.6. S-nitrosilação de proteínas no PVAT durante o curso da sepse.....	55
6.1.7. Envolvimento da produção de NO no efeito anticontrátil do PVAT da aorta durante o choque séptico.....	56

6.1.8. Envolvimento dos receptores β3-adrenérgicos no efeito anticontrátil do PVAT durante o desenvolvimento do quadro séptico.....	58
6.1.9. Envolvimento da produção de ROS no efeito anticontrátil do PVAT da artéria mesentérica superior durante o choque séptico.....	60
6.2. PARTE II.....	61
7. DISCUSSÃO.....	66
8. CONCLUSÃO.....	75
9. REFERÊNCIAS	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. O TECIDO ADIPOSEO – ASPECTOS GERAIS

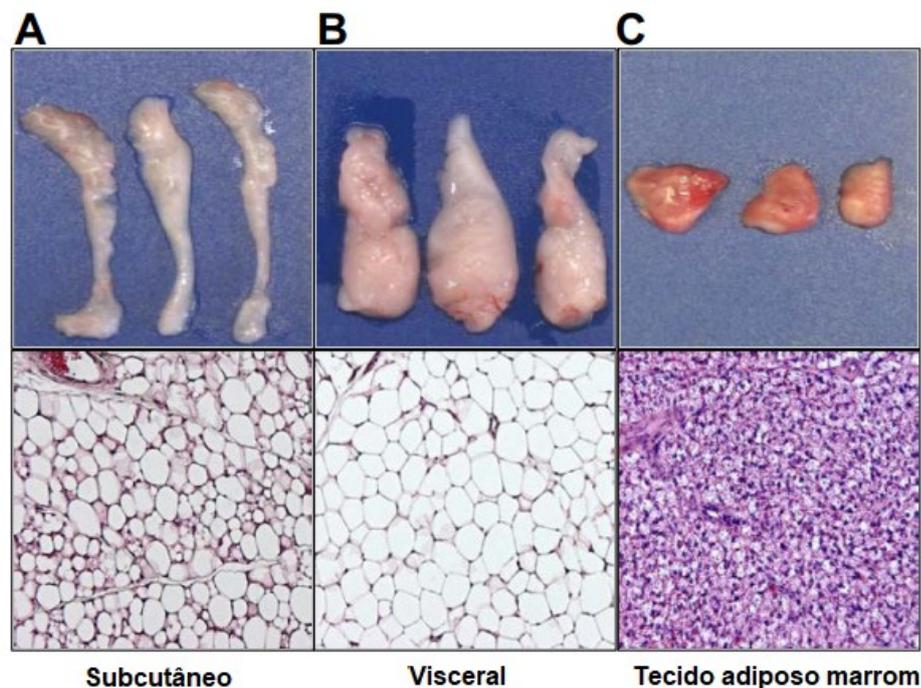
O tecido adiposo é formado por diversos tipos celulares, entre eles estão os adipócitos, pré-adipócitos, células T, macrófagos, nervos, capilares e fibras de colágeno (Brown *et al.*, 2014). Antes considerado apenas um depósito de triglicerídeos, a partir do trabalho pioneiro de Kathleen Sue Cook e colaboradores (1987) passou a ser reconhecido como um órgão endócrino. Dele são secretadas diversas substâncias ativas que participam da modulação do metabolismo sistêmico: citocinas, entre elas a interleucina-6 (IL-6) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *tumor necrosis factor- α*); e adipocinas, que são citocinas secretadas exclusivamente ou majoritariamente pelo tecido adiposo, que incluem leptina, adiponectina, visfatina, resistina, apelina, quemerina e omentina. Essas substâncias, após liberadas pelo tecido adiposo, irão agir sobre seus receptores, presentes em diferentes tipos celulares, ativando diferentes cascatas de sinalização (Luo e Liu, 2016).

Nos mamíferos, se levarmos em consideração características histológicas e funcionais, o tecido adiposo pode ser classificado em dois tipos: são eles o tecido adiposo branco (WAT, do inglês *white adipose tissue*) e o tecido adiposo marrom (BAT, do inglês *brown adipose tissue*). O WAT é amplamente distribuído e funciona como o maior depósito de energia proveniente do metabolismo. Nele, a energia é estocada na forma de triglicerídeos e liberada sob demanda, permitindo que haja intervalos entre as alimentações. Neste tipo, os adipócitos se apresentam grandes e esféricos, com a maior parte do citoplasma sendo composta por uma gotícula única de triglicerídeo (revisado por Kwok *et al.*, 2016). Já o BAT é encontrado em regiões restritas, como escápula e tórax de mamíferos adultos. Possui maior vascularização e adipócitos menores, compostos por diversas pequenas gotículas de triglicerídeos, além de diversas mitocôndrias que expressam a proteína desacopladora-1 (UCP-1, do inglês *uncoupling protein-1*). É responsável pela termorregulação e coordenada pelo sistema nervoso autônomo simpático, através dos receptores β 3-adrenérgicos (revisado por Cannon e Nedergaard, 2004). Há ainda um terceiro tipo, que se forma pela transdiferenciação de adipócitos tipicamente brancos para o fenótipo do tipo marrom em situações de adaptação (a temperaturas baixas, por exemplo), sendo chamado de tecido adiposo bege (Rosenwald *et al.*, 2013)

É possível, ainda, classificar o tecido adiposo quanto a sua localização. Neste caso, pode ser dividido em tecido adiposo subcutâneo, visceral e perivascular. O tecido adiposo subcutâneo está localizado logo abaixo das camadas da pele, enquanto o tecido adiposo visceral é encontrado nas proximidades de órgãos vitais, no peritônio e caixa torácica. Embora ambos em geral se apresentem na forma de WAT, tem-se mostrado que existem importantes diferenças

histológicas (Figura 1) e de contribuição para o metabolismo, que dependem da sua localização (revisado por Kwok *et al.*, 2016). Experimentos de transplante do tecido adiposo subcutâneo para a cavidade abdominal, onde normalmente está o tecido adiposo visceral, mostram que há diminuição no ganho de peso e melhora no metabolismo da glicose em ratos, indicando um perfil mais pró-inflamatório do tecido adiposo visceral e mais antiinflamatório do tecido adiposo subcutâneo, o que pode ser explicado pela maior produção de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas envolvidas na imunidade inata por parte do WAT visceral, havendo uma relação positiva entre aumento deste tipo de tecido adiposo e o risco de desenvolvimento de diabetes, hiperlipidemia e doenças cardiovasculares (Hocking *et al.*, 2008; Foster *et al.*, 2011; revisado por Lee *et al.*, 2013).

Figura 1. Diferenças do tecido adiposo.

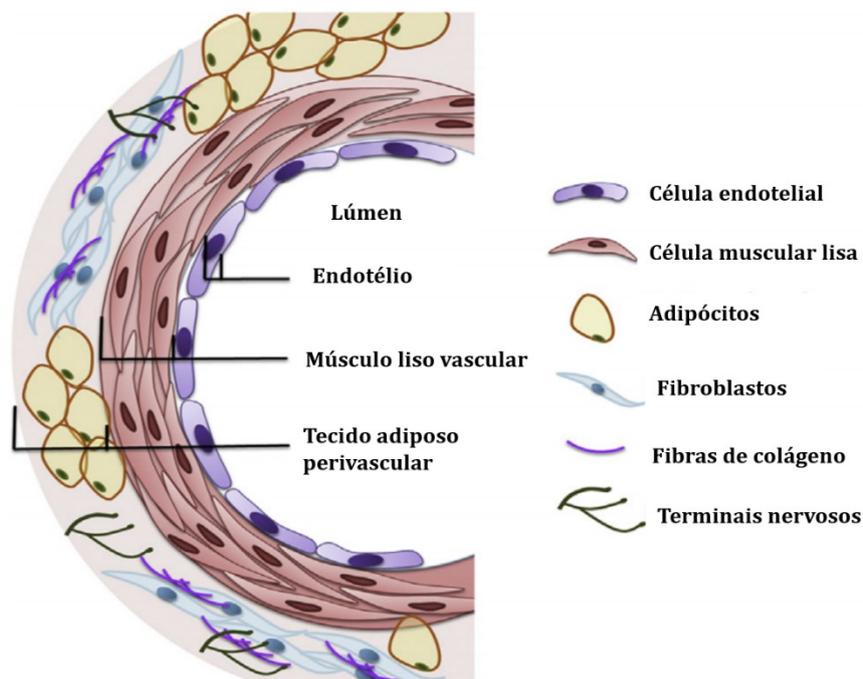


Características morfológicas do tecido adiposo branco subcutâneo (A) e visceral (B); tecido adiposo marrom (C) de camundongo. A marcação histológica por hematoxilina-eosina mostra que os depósitos de WAT diferem no tamanho: depósitos subcutâneos são mais heterogêneos, contendo tanto adipócitos uni e multiloculares, enquanto os depósitos viscerais são mais uniformes e contém adipócitos uniloculares; o BAT é muito diferente do tecido adiposo branco, apresentando adipócitos menores, com gotículas lipídicas multiloculares (Adaptado de Berry *et al.*, 2013).

Já o tecido adiposo perivascular (PVAT), é aquele que envolve os vasos periféricos, encontrando-se na sua porção mais externa (Figura 2). Sua composição varia dependendo da localização anatômica e, devido a sua posição extremamente próxima aos vasos, desempenha função estrutural e de proteção mecânica (revisado por Gil-Ortega *et al.*, 2015). Somado a isso,

tem crescido a quantidade de trabalhos científicos mostrando que o PVAT também produz e libera substâncias com funções parácrinas e endócrinas, apresentando importante contribuição para o tônus vascular (revisado por Brown *et al.*, 2014). Estudos utilizando ferramentas genéticas mostram que o PVAT difere do tecido adiposo branco e marrom em sua origem. Chang e colegas (2012) mostraram que o cruzamento de camundongos PPAR- $\gamma^{\text{flox/flox}}$ (do inglês *peroxisome proliferator-activated receptor- γ*) com camundongos *knock in* para SM22 α -Cre (SM22 $\alpha^{\text{CreKI/CreKI}}$) e, subsequentemente, com camundongos ApoE $^{-/-}$, permitiu a criação de animais desprovidos de PVAT (SM22 $^{\text{CreKI/+}}$ /PPAR $^{\text{flox/flox}}$ /ApoE $^{-/-}$) tanto na aorta quanto nas artérias mesentéricas, enquanto que o BAT intraescapular e o WAT (gonadal, inguinal e subcutâneo) mantiveram-se intactos, corroborando com a ideia de que as células precursoras perivasculares possam ter origem de desenvolvimento diferente dos demais tipos de tecido adiposo.

Figura 2. Estrutura da parede dos vasos.



A parede dos vasos periféricos é composta por três camadas principais: a túnica íntima, de células endoteliais; a túnica média, composta por células da musculatura lisa vascular; e a túnica externa ou adventícia, onde se encontra o tecido adiposo perivascular (Modificada de Zhao *et al.*, 2015).

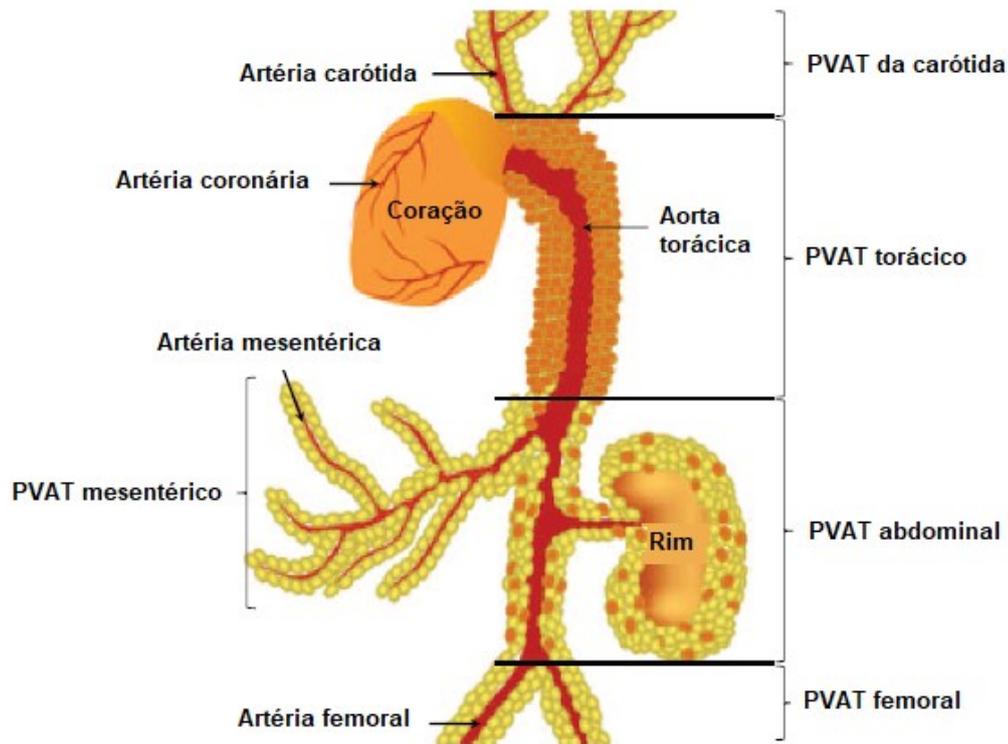
1.2. PVAT E O SISTEMA CARDIOVASCULAR

Os primeiros relatos sobre a existência de funções do tecido adiposo perivascular (do inglês *perivascular adipose tissue* - PVAT) que vão além da composição estrutural dos vasos, ocorreram no início dos anos 90, no reconhecido trabalho de Edward E. Soltis e Lisa A. Cassis

(1991). Estes pesquisadores mostraram, por meio do registro da tensão isométrica de anéis de aortas isoladas de ratos, que havia redução na resposta vasoconstritora para a noradrenalina naqueles anéis onde o PVAT era mantido intacto. Este achado foi confirmado mais tarde por Löhn e colaboradores (2002), que mostraram que a contração de anéis de aorta também era atenuada, na presença do PVAT, em resposta a outros agentes vasoconstritores, como a fenilefrina, a angiotensina II e a serotonina e sugeriram, então, que havia um fator relaxante derivado do PVAT (ADRF, do inglês *adipocyte-derived relaxing factor*), que agiria em canais de K^+ do músculo liso vascular favorecendo assim a vasodilatação.

À parte da circulação cerebral, o PVAT envolve virtualmente todos os vasos sanguíneos periféricos maiores do que 50 μm de diâmetro (Houben *et al.*, 2012). De uma maneira geral, pode-se afirmar que em condição fisiológica o PVAT exerce ação anticontrátil, anti-inflamatória e antioxidante. Porém, análises imunohistoquímicas, histológicas e de PCR revelam que o PVAT apresenta diferentes padrões fenotípicos (Figura 3), variando tanto em estrutura quanto em função dependendo da sua localização e, portanto, é fundamental considerar essas diferenças regionais durante os estudos a ele relacionados.

Figura 3. Tipos de tecido adiposo perivascular.



O PVAT pode ser classificado como branco (pontos amarelos), marrom (pontos marrons) ou bege (representado pela mistura de pontos amarelos e marrons), dependendo da sua localização anatômica (Adaptada de Brown *et al.*, 2014).

Os adipócitos que compõem o PVAT cardíaco (aquele que envolve as artérias coronárias) de humanos apresentam características fenotípicas tanto de BAT quanto de WAT (Sacks *et al.*, 2009; Payne *et al.*, 2012). Como murinos não apresentam PVAT envolvendo estas artérias, os estudos referentes a este vaso são desenvolvidos utilizando animais de maior porte, como cães e porcos que, assim como os seres humanos, possuem PVAT coronário (Antonopoulos *et al.*, 2017). Sua influência na manutenção do tônus coronário ainda é controversa. Em um trabalho publicado em 2013, Owen e colaboradores mostraram que a adição do PVAT à coronárias “limpas” (ou seja, com o PVAT removido) de porcos saudáveis permite um aumento na resposta contrátil para o cloreto de potássio (KCl), dependente da quantidade de PVAT adicionado à cuba. Do mesmo modo, estudo utilizando coronária de cães constatou haver diminuição na dilatação dependente de endotélio nas coronárias onde o PVAT foi mantido (Payne *et al.*, 2010), apontando para uma função pró-contrátil do PVAT neste vaso. Porém, é importante lembrar que estes estudos foram realizados utilizando animais machos. Um interessante estudo de Ahmad e colegas (2017) mostrou que o sexo influencia na ação do PVAT sobre a manutenção do tônus de artérias coronárias e a conhecida ação anticontrátil sobre

vasos periféricos pôde ser vista também nas coronárias de porcas, mas não na de porcos – o que indica que o PVAT pode exercer um efeito protetor sobre coronárias de fêmeas, o que vai ao encontro com a menor incidência de doenças coronárias em fêmeas.

Da mesma maneira que o PVAT coronariano, o PVAT que envolve as artérias renais apresenta uma mistura de adipócitos característicos de WAT e de BAT. Se por um lado o PVAT destes dois vasos apresenta semelhança fenotípica, parece que quanto a regulação do tônus vascular há diferenças. Segundo o recente trabalho de Restini e colaboradores (2018), o PVAT renal não exerce qualquer influência na contração da artéria renal de ratos machos, não havendo mudanças nem na potência nem na contração máxima para a noradrenalina e a fenilefrina, apesar de não haver dados disponíveis sobre a resposta frente a agentes vasoconstritores não-adrenérgicos e também de haver um *pool* de catecolaminas disponível no tecido.

Já o PVAT dos vasos periféricos, como da aorta - vaso de condutância - e das artérias mesentéricas - vasos de resistência -, apresenta características fenotípicas que diferem entre si, porém sabe-se que exerce uma ação global anticontrátil (Soltis & Cassis, 1991; Gao *et al.*, 2005; Ayala-Lopez *et al.*, 2017). Na aorta torácica de roedores, o PVAT se apresenta característico de BAT, já na aorta abdominal e artérias mesentéricas se apresenta majoritariamente do tipo branco (revisado por Brown *et al.*, 2014). Padilla e colegas (2013) mostraram que mesmo em um mesmo vaso a gordura perivascular pode apresentar variações fenotípicas, como é o caso da aorta, onde o PVAT aparece distinto na aorta torácica e abdominal e esta variação não diz respeito apenas ao fenótipo, mas também às suas ações parácrinas, já que a influência do PVAT na contratilidade da aorta abdominal é menor se comparada à torácica e esta diferença está relacionada a uma menor expressão da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS ou NOS-3) na primeira (Victorio *et al.*, 2016).

Assim como nas artérias da circulação sistêmica, o PVAT também age na modulação da homeostase venosa. Na veia cava de ratos, por exemplo, a contração é reduzida quando o PVAT é mantido intacto (PVAT+) e este fenômeno é observado tanto para a fenilefrina, quanto para serotonina e para vasoconstritor mimético de tromboxano A (U 46619) em experimentos *ex vivo*. Porém, diferente das artérias, na veia cava a contração só é atenuada pelo PVAT na presença de endotélio (Lu *et al.*, 2011).

Como dito, a capacidade de influenciar a contração vascular atribuída ao PVAT é devida à produção local e liberação de moléculas ativas, como citocinas e adipocinas, e também por apresentar sistema ativo de recaptção de catecolaminas e sistema renina-angiotensina (SRA).

Algumas das principais substâncias provenientes do PVAT com conhecida ação sobre o tônus vascular são:

- i. Adiponectina – descoberta em meados da década de 90, esta adipocina de 30 kDa pode ser encontrada em diferentes conformações e exerce seus efeitos sobre seus receptores AdipoR1 e AdipoR2, membros da família de receptores de progesterona e adiponectina Q (PAQR) (Scherer *et al.*, 1995; revisado por Yamauchi *et al.*, 2014). Tem ação anti-inflamatória (Yokota *et al.*, 2000; Okamoto *et al.*, 2002), de sensibilização à insulina (Lindsay *et al.*, 2002) e importante ação vasodilatadora (Fésüs *et al.*, 2003; Hong *et al.*, 2016). Nas artérias, sua ação anticontrátil ocorre pela ativação de canais de potássio dependentes de cálcio (BK_{Ca}), tanto na musculatura lisa vascular quanto por mecanismos dependentes de endotélio. Esta ação sobre BK_{Ca} parece ser mediada por óxido nítrico (NO), já que a ligação da adiponectina à seus receptores estimula a produção de AMPK, o qual fosforila e ativa a NOS no músculo liso e endotélio (Lynch *et al.*, 2013; Almabrouk *et al.*, 2017).
- ii. Leptina – produto do gene *ob* de adipócitos, atua como modulador do apetite e da homeostase energética (Friedman & Halaas, 1999). Sua produção é proporcional à massa de gordura corporal tanto em animais quanto em humanos e apresenta conhecida ação pró-inflamatória. Seu papel na manutenção do tônus vascular ainda é controverso. Por exemplo, a leptina tem ação vasodilatadora direta em aorta de ratos saudáveis, que é atenuada pela ausência de endotélio e pela inibição das NO sintases. Esta mesma ação direta foi notada em experimentos utilizando mesentérica superior de ratos, porém o efeito não pôde ser inibido com o uso de L-NAME, apontando para uma ação dependente de endotélio, mas independente de NO neste vaso (Lembo *et al.*, 2000). Já Momim e colegas (2006), utilizando artéria mamária interna e veia safena de indivíduos com doença coronariana, encontraram respostas vasodilatadoras em ambos os vasos, porém, esta resposta foi independente de endotélio bem como da produção de NO. Se de um lado a leptina apresenta ação vasodilatadora direta, de outro, promove uma ação indireta vasoconstritora, que se dá pelo ativação do sistema nervoso simpático, vista tanto pela administração aguda de leptina intracerebroventricular, quanto pela sua administração intravenosa crônica em ratos saudáveis (Dunbar *et al.*, 1997; Shek *et al.*, 1998). Ainda, quando avaliada em aorta torácica e artéria pulmonar sem endotélio (E-) de ratos hipertensos, a leptina apresentou uma ação vasoconstritora direta (Gomart *et al.*, 2017). Assim,

sua influência sobre o tônus parece ser dependente do local, do contexto fisiológico/fisopatológico e, parece, da espécie.

- iii. Óxido nítrico – através de experimentos de RT-PCR, posteriormente confirmados pelo método de *Western Blotting*, Dashwood e colegas (2007) mostraram que o PVAT expressa a isoforma endotelial da NOS-3 e que o nível de expressão desta enzima no PVAT e na veia safena de humanos é semelhante. O NO é mediador da ação anticontrátil desencadeada por algumas adipocinas. O efeito endotélio-dependente da adiponectina é dependente de NO, ocorrendo por meio da fosforilação da NOS-3 em resíduos de Ser¹¹⁷⁹, o que resulta em ativação enzimática e produção de NO; este efeito é parcialmente dependente de AMPK (Chen *et al.*, 2003; Weston *et al.*, 2013). O efeito vasodilatador endotélio-dependente causado pela leptina também é mediada pelo NO, isso pode ser visto em animais bem como em pacientes saudáveis, e esse estímulo parece se dar pela fosforilação de Akt, com consequente ativação da NOS-3 (Kimura *et al.*, 2000; Vecchione *et al.*, 2002; Schinzari *et al.*, 2013). No entanto, a expressão de NOS-3 pode variar entre PVATs em diferentes localizações e este fato é correlato com sua ação vasodilatadora. No PVAT da aorta abdominal, por exemplo, a expressão de NOS-3 está diminuída em cerca de 60% quando comparada à do PVAT torácico e, da mesma maneira, a influência anticontrátil do PVAT abdominal sobre a aorta abdominal com endotélio preservado (E+) apresenta-se reduzida (Victorio *et al.*, 2016). Mais recentemente em 2016, Xia e colegas mostraram que há expressão gênica das demais isoformas da NO sintases no PVAT de camundongos.
- iv. Peróxido de hidrogênio – enquanto o efeito vasodilatador endotélio-dependente do PVAT está majoritariamente atrelado à indução da NO sintase e ao aumento da produção de NO, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) tem sido visto como importante mediador de sua ação endotélio-independente, através da subsequente ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs). A incubação de aorta sem endotélio (E-) com catalase, com *scavenger* de H₂O₂ ou com um inibidor da GCs aumentou a vasoconstrição para a fenilefrina apenas nos vasos onde o PVAT foi mantido intacto (Gao *et al.*, 2007). O mesmo efeito foi visto frente à noradrenalina por Costa e colegas (2016), que demonstraram que as mitocôndrias são importante fonte de H₂O₂ no PVAT de aortas, já que sua

incubação com desacoplador da cadeia de elétrons diminuiu a produção final de H_2O_2 e, assim, o efeito anticontrátil de aortas sem endotélio.

- v. Sulfeto de hidrogênio – outro mediador gasoso localmente produzido é o H_2S . Fang e colegas (2009) mostraram que o H_2S induz vasodilatação em aortas de ratos e também que vasoconstritores como a fenilefrina, angiotensina-II e serotonina reduzem a produção de H_2S na aorta, porém aumentam a sua produção e liberação pelo PVAT, com consequente ação parácrina de vasodilatação na musculatura lisa. A inibição da enzima produtora de H_2S , a cistationina- γ -ligase (CSE) atenua o efeito anticontrátil do PVAT, sem apresentar ação nos anéis de vaso sem o PVAT (revisado por Köhn *et al.*, 2012).
- vi. Metil palmitato – fator relaxante produzido pelos adipócitos do PVAT, o éster metílico do ácido palmítico (PAME) e que atua no músculo liso através da abertura de canais de potássio dependentes de voltagem (K_v), efeito este independente da presença de endotélio (Lee *et al.*, 2011). O controle do tônus arterial pelo PAME já foi observado em aortas de ratos, bem como em artérias mesentéricas de humanos e sua atuação se dá majoritariamente pela abertura dos canais de potássio do subtipo K_v7 da musculatura vascular (Wang *et al.*, 2018).
- vii. Ânion superóxido – sua principal fonte de produção no PVAT é pela enzima NAD(P)H oxidase. A expressão da subunidade p67phox da enzima é encontrada em adipócitos isolados do PVAT. Ensaios utilizando artérias mesentéricas superiores isoladas de ratos mostraram que o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) apresenta ação pró-contrátil frente à estímulo de campo elétrico (EFS), uma vez que sua inibição com a enzima *scavenger* superóxido dismutase (SOD) exerce atenuação na contração dos vasos PVAT+, assim como o uso de inibidores de NAD(P)H oxidase, como a apocinina (Gao *et al.*, 2006). Além da sua produção pelos adipócitos, outra importante fonte de produção de $O_2^{\cdot-}$ no PVAT se dá pelos macrófagos residentes, sendo que sua ativação leva ao aumento da produção de superóxido e perda da ação anticontrátil do PVAT (Withers *et al.*, 2011).

Além destas, outras adipocinas têm se mostrado relevantes no controle da homeostase vascular, entre elas estão a visfatina (Wang *et al.*, 2009), omentina (Yamawaki *et al.*, 2010), resistina (Langheim *et al.*, 2010) e apelina (Kagota *et al.*, 2019).

Atualmente existem diversas evidências de um sistema adrenérgico completo nos adipócitos, incluindo a presença de receptores adrenérgicos, transportadores de catecolaminas e enzimas metabolizadoras (Lafontan & Berlan, 1993; Pizzinat *et al.*, 1999; Song *et al.*, 2019).

No que se refere ao PVAT, muito tem sido esclarecido nos últimos anos. Bulloch & Daly (2014) mostraram, através de experimento de imunofluorescência, que há marcação positiva de fibras nervosas ao anticorpo PGP 9.5, confirmando a presença de inervação no PVAT de artérias mesentéricas de camundongos. Também, fizeram marcações para os receptores α e β -adrenérgicos e puderam constatar a presença de ambos os receptores na gordura perivascular.

Alguns anos antes, em 2011, Loesch & Dashwood utilizaram marcações imunohistoquímicas para mostrar a existência de fibras nervosas no PVAT da veia safena de indivíduos submetidos ao procedimento de *bypass* de artéria coronária, também chamado de ponte de safena. O interesse dos autores em explorar a presença de inervação nestas veias se deu pela observação de que os segmentos que eram usados mantendo-se a gordura perivascular intacta, apresentavam uma melhor performance após o implante, o que se traduzia em menor dano vascular quando comparado ao método tradicional de implantação de veias ‘limpas’, apontando para uma ação vasculoprotetora do PVAT, atribuída à presença de capilares, da leptina como um modulador da produção de NO, bem como da inervação neste tecido (revisado pelo mesmo grupo - Loesh & Dashwood, 2018).

Por meio de experimentos funcionais, Ayala-Lopez e colegas (2014) notaram que aortas e mesentéricas de ratos apresentam resposta contrátil concentração-dependente ao simpatomimético indireto tiramina. Isso só pode ser observado nos vasos PVAT (+), apontando para a presença/produção local de catecolaminas, o que pode ser confirmado em análises de cromatografia líquida de alta eficiência, pela detecção de NA, dopamina (DA) e serotonina (5-HT). Hoje sabe-se que estas catecolaminas podem ser produzidas tanto pelos adipócitos (Ayala-Lopez *et al.*, 2015), quanto pela fração estromal do PVAT, *e.g.* macrófagos (Whiters *et al.*, 2011) e eosinófilos (Whiters *et al.*, 2017).

Além da produção de catecolaminas, o PVAT também apresenta um sistema de recaptação funcional. Ayala-Lopez *et al* (2015) comprovaram, através de belas imagens de fluorescência, que os adipócitos são capazes de captar ASP+ (4-[4-(dimethylamino)-styril]-N-methylpyridinium iodide), um substrato fluorescente para transportadores catiônicos e tal captação foi reduzida por nisoxetina (inibidor de transportador de noradrenalina - NET), citalopram (inibidor de transportador de serotonina - SERT), bem como por corticosterona (inibidor de transportador de cátions orgânicos 3 - OCT3). Contudo, apesar de aparentemente os 3 transportadores apresentarem alguma influência na recaptação, apenas foi possível detectar o RNA mensageiro e a expressão proteica de OCT3 e, a partir desta e outras evidências, supõe-se que o principal mediador de recaptação de NA no PVAT seja OCT3 (Ayala-Lopez *et al.*, 2015; Saxton *et al.*, 2018). Em um recente trabalho publicado por Ahmad e colegas (2019), foi

demonstrado que além da recaptação de NA, o PVAT também armazena NA em vesículas, através de transportadores vesiculares de monoaminas (VMAT, *vesicular monoamine transporter*).

Para tornar completa a presença de um sistema adrenérgico funcional no PVAT, é sabido que o estímulo nervoso do PVAT proporciona um efeito vasodilatador, que se dá pela ativação de receptores β 3-adrenérgicos. A ativação destes receptores β 3-adrenérgicos possibilita a liberação de um fator anticontrátil derivado do PVAT e este fator parece ser a adiponectina, já que este efeito foi abolido em animais *knock out* para esta adipocina (Saxton *et al.*, 2018).

Embora ainda menos explorado do que o sistema adrenérgico, o sistema renina-angiotensina (SRA) da gordura perivascular também tem sido visto como uma influência sobre o controle do tônus vascular. Com exceção à renina, o PVAT apresenta a expressão gênica de todos os componentes do SRA, incluindo a enzima conversora de angiotensina (ECA), angiotensina I e II (Ang I e II) e a angiotensina 1-7 (Ang 1-7), bem como os receptores de Ang II, o AT₁ e o AT₂ (Gálvez-Prieto *et al.*, 2008). O uso de inibidor da ECA, assim como de antagonista do receptor de Ang II em artérias mesentéricas PVAT (+) submetidas à hipóxia, reverte a perda da ação anticontrátil apresentada pelo PVAT (Rosei *et al.*, 2015). Uma das substâncias com efeito anticontrátil e anti-inflamatório do SRA é a Ang (1-7) (revisado por Jiang *et al.*, 2014). Na veia cava inferior a Ang (1-7) tem sido vista como principal mediadora da ação parácrina do PVAT, agindo de maneira endotélio-dependente via receptores Mas, induzindo a liberação de NO e sua ação em canais K_v do músculo liso venoso (Lu *et al.*, 2011). Recentemente, Nóbrega e colaboradores confirmaram a expressão proteica de receptores para a angiotensina do tipo 2 (AT₂) e, também, de receptores Mas no PVAT de aortas, mostrando que o PVAT age, independente de endotélio, através de via que envolve as NO sintases constitutivas e ativação de PI3k/Akt (Nóbrega *et al.*, 2019).

Além de suas ações fisiológicas, tem-se estudado o envolvimento do PVAT em diversos processos patológicos relacionados ao sistema cardiovascular, como hipertensão (Gálvez-Prieto *et al.*, 2012), aterosclerose (Spiroglou *et al.*, 2010), nas alterações vasculares decorrentes da obesidade (Xia e Lee, 2017), bem como na sepse (Awata *et al.*, 2019).

1.3. SEPSE, CHOQUE SÉPTICO E A DISFUNÇÃO CARDIOVASCULAR

A sepse é uma condição bastante heterogênea e complexa, causada pelo desbalanço da resposta do hospedeiro frente a uma infecção (Singer *et al.*, 2016). Segundo registros históricos, seu termo foi utilizado no contexto médico pela primeira vez nos poemas de Homero, há mais de 2700 anos, se referindo ao apodrecimento: *sepsis* deriva do termo *sepo*, que significa

apodrecer. Tal termo também é encontrado na coletânea *Corpus Hippocraticum*, vinculado ao legado do médico e filósofo Hipócrates (400 a.C.), associado a uma deterioração biológica perigosa e de mal cheiro que pode acontecer no corpo (revisado por Funk et al., 2009). De lá pra cá, muito se avançou no entendimento desta condição, porém, sua definição clínica aconteceu apenas no começo dos anos 1990, quando especialistas se reuniram e publicaram o primeiro consenso que definiu o que era a sepse e de que maneira deveria ser tratada. Segundo este guia, a sepse ficou definida como uma síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) desencadeada por uma infecção. Seu mau prognóstico levaria à sepse grave, caracterizada pelo aparecimento de dano de órgãos e, ao choque séptico, estágio mais grave desta condição, onde além da falha orgânica, haveria hipotensão refratária ao uso de agentes vasoconstritores e à reposição de fluidos (Bone et al., 1992). No entanto, no último consenso clínico, o Terceiro Consenso Internacional de Definições para a Sepse e o Choque Séptico (*Sepsis-3*), ocorrido em 2016, algumas definições foram revisadas e modificadas e, atualmente, a sepse é entendida como uma disfunção orgânica causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. O termo sepse grave foi removido e o choque séptico é agora identificado pela presença de hipotensão persistente (exigindo o uso de vasopressor para sua manutenção ≥ 65 mmHg) somada à elevados níveis de lactato (maiores que 2 mmol/L ou 18 mg/dL), os quais permanecem alterados mesmo após a ressuscitação fluídica (Singer et al., 2016).

A mortalidade e a morbidade relacionadas a sepse figuram entre os maiores problemas de saúde pública do mundo (Singer *et al.*, 2016). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que mais de 30 milhões de pessoas sejam afetadas pela sepse no mundo a cada ano e, destas, aproximadamente 6 milhões venham a óbito. Apesar da dificuldade de quantificar os casos de sepse e caracterizar os perfis de incidência, devido a heterogeneidade de sua origem (ver Figura 4 para fatores de risco) e a falta de registros adequados (principalmente em países de baixa e média renda), sabe-se que as populações mais propensas a desenvolver esta condição são idosos e crianças e, da mesma maneira, o índice de mortalidade nestes grupos são mais altos (Rudd *et al.*, 2018; Fleischmann-Struzek *et al.*, 2018; Kotfis *et al.*, 2019).

No Brasil, apenas em 2017 foi publicado o primeiro estudo observacional que reuniu dados epidemiológicos da sepse no país. O estudo avaliou unidades de terapia intensivas (UTIs) localizadas em diferentes regiões do país e encontrou altas taxas de incidência, prevalência e de morte, estimando mais de 200.000 mortes por sepse/ano no país, o que representa ~55% dos pacientes que são internados devido a esta condição (Machado *et al.*, 2017).

Figura 4. Fatores de risco para o desenvolvimento da sepse

Fatores de risco para o desenvolvimento da sepse	
Idade	Infância (< 2 anos) > 55 anos
Comorbidades	Câncer Diabetes Doença pulmonária obstrutiva crônica Obstrução biliar ou cirrose Doença renal crônica Falência cardíaca congestiva Doença vascular de colágeno Obesidade*
Imunidade prejudicada	Transplante Quimioterapia Radioterapia Imunossupressão mediada por fármacos Transfusão sanguínea
Quebra de barreiras naturais	Trauma Lesão cirúrgica Intubação ou cateterização Queimaduras Enterocolite
Infecções crônicas	HIV Infecções do trato urinário Pneumonia Decúbito ou feridas de pele que não cicatrizam
Outras	Desnutrição calórica proteica
*A obesidade pode estar associada ao aumento de complicações, mas melhor recuperação	

(Adaptada de Hotchkiss *et al.*, 2016).

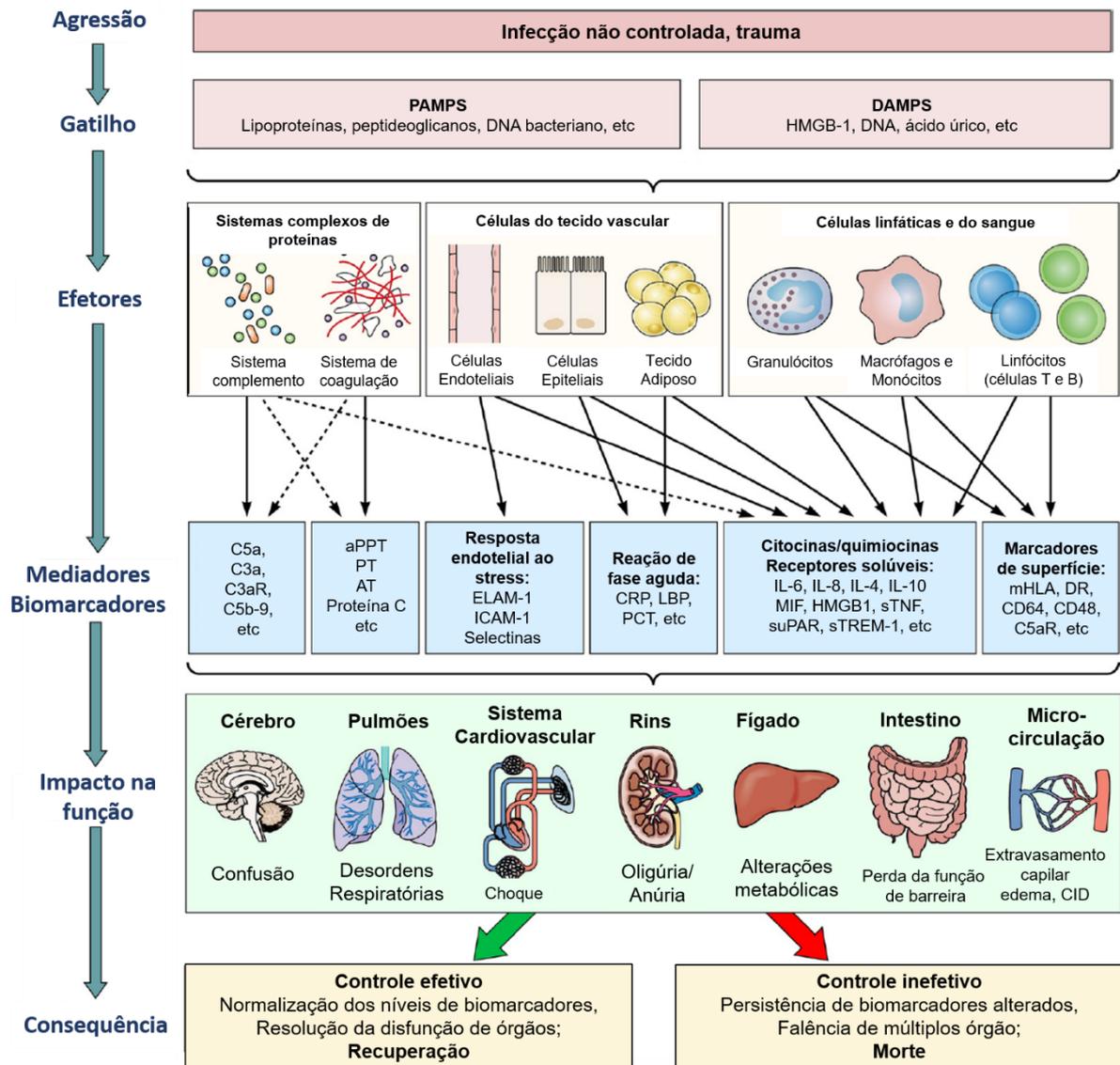
A sepse pode ser causada por diferentes microrganismos, dentre eles bactérias gram-negativas (principais causadoras) e gram-positivas, fungos, vírus e parasitas (Vincent *et al.*, 2009; Ani *et al.*, 2015). O início do desenvolvimento da doença se dá pelo reconhecimento de componentes celulares únicos destes microrganismos, os padrões de reconhecimento associado à patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) através receptores de reconhecimento padrão (PRR's, do inglês *pattern recognition receptors*) do hospedeiro. São conhecidas quatro famílias de PRRs: a do tipo *toll* (TLR, do inglês *toll like receptors*), a das proteínas de repetição ricas em leucina com domínio de oligomerização de nucleótidos (NOD, do inglês *nucleotide-binding oligomerization domain*), a dos receptores tipo RIG-1 (RIG, do inglês *retinoic acid-inducible gene*) que atuam no reconhecimento do RNA viral e, também, a dos receptores de lectina tipo C (CLR, do inglês *C-type lectin receptor*) presentes na superfície de células fagocíticas. Além do reconhecimento de PAMPs, os receptores PRRs também reconhecem produtos endógenos provenientes da degradação celular, como peptídeos e glicosaminoglicanos que são liberados de células apoptóticas e necróticas, estes produtos são

chamados de padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular pattern*) (Cinel e Opal, 2009). O reconhecimento destes produtos leva a ativação de diversas vias de sinalização que irão influenciar na expressão de genes relacionados a inflamação, ao metabolismo celular e imunidade adaptativa (Cinel e Opal., 2009; Hotchkiss *et al.*, 2016).

Os sinais inflamatórios são traduzidos pela ligação de uma série de moléculas adaptadoras aos PRRs. Proteínas cinases e fosfatases participam da propagação do sinal no citoplasma, o que resulta na ativação de vários fatores de transcrição, como o fator nuclear κ B (NF- κ B), proteína de resposta de crescimento precoce 1 (EGR-1, do inglês *early growth response protein 1*), a proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês *activator protein 1*) e os sinais transdutores e ativadores da transcrição 1 (STAT1, do inglês *signal transducer and activator of transcription 1*). Há, então, a ativação e recrutamento de leucócitos aos tecidos. A produção de neutrófilos e macrófagos é estimulada pela liberação de citocinas, quimiocinas, produtos de ativação do sistema complemento, NO, e de outros mediadores. Este gatilho pró-inflamatório, estimula a liberação de importantes mediadores secundários, como fatores lipídicos e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, os quais amplificam o processo inflamatório (Cinel e Opal, 2009; Nduka e Parrillo, 2011; Hotchkiss *et al.*, 2016). Há também, durante desenvolvimento da sepse, um importante aumento na produção de mediadores antiinflamatórios, como a citocina IL-10, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) e o TGF- β , caracterizando uma resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, do inglês *compensatory anti-inflammatory response syndrome*). Porém, estes mediadores anti-inflamatórios são insuficientes para reprimir a automanutenção da inflamação ou, ainda, acabam se mostrando danosos pois, produzidos em demasia, levam a um estado de imunodepressão (van der Poll e Opal, 2008; Nedeva *et al.*, 2019).

A ativação dos receptores de células imunes, do complemento, a síntese de NO e de outros mediadores inflamatórios causam efeitos profundos em diversos sistemas do organismo, entre eles o de coagulação e o sistema vascular, levando ao aumento da expressão de selectinas e moléculas de adesão, desencadeando a coagulação intravascular disseminada, o aumento da permeabilidade vascular, com conseqüente extravasamento vascular, além de vasodilatação. (Figura 5). Esta disfunção microcirculatória contribui para o colapso do sistema cardiovascular de maneira tão profunda que a redução na resistência vascular periférica é vista como principal responsável pela alta mortalidade do choque séptico (Boisramé-Helms *et al.*, 2013; Burgdorff *et al.*, 2018).

Figura 5. Visão simplificada da fisiopatologia sepse.



Uma agressão desencadeia a liberação de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), que são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na superfície ou no interior das células do sistema imune e outros. Estes sensores funcionam também como efetores para modular a resposta imune através de vários mediadores ou biomarcadores pró ou anti-inflamatórios. Como resultado, a agressão pode ou não ser resolvida e, caso não seja, a função dos órgãos pode ser temporariamente ou até mesmo permanentemente prejudicada. Abreviaturas: HMGB1, proteína B1 do grupo de alta mobilidade; MIF, fator inibidor da migração de macrófagos; C5a e C3a, componentes 5a e 3a do sistema complemento; C5aR, proteína receptora C5a; C5b-9, complexo de complemento terminal; aPPT, tempo de tromboplastina parcial ativada; ELAM-1, molécula de adesão leucocitária endotelial 1; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; CRP, proteína C reativa; LBP, proteína ligadora de LPS; ROS, espécie reativas de oxigênio; ERNs, espécies reativas de nitrogênio; IL-6, interleucina-6; IL-8, interleucina-8; IL-4, interleucina-4; IL-10, interleucina-10; MIF, fator inibidor da migração de macrófagos; mHLA, antígeno monocítico leucocitário humano; sTNF, fator de necrose tumoral solúvel; suPAR, receptor ativador de plasminogênio solúvel tipo urocinase; sTREM-1, receptor solúvel de gatilho expresso em células mielóides 1; CD64 e CD48, glicoproteínas de membrana 64 e 48; CID, coagulação intravascular disseminada (Modificada de Reinhart *et al.*, 2012).

A hipotensão e hiporreatividade vascular da sepse consistem na instalação de vasodilatação profunda com baixa pressão arterial, que acontecem apesar do aumento no débito cardíaco, da ressuscitação fluidica e da administração de agentes vasopressores (Matsuda e Hattori, 2007; Levy *et al.*, 2010). Tal vasoplegia descontrolada resulta na diminuição da perfusão tecidual, levando a um desbalanço no fluxo sanguíneo destinado aos órgãos vitais, com consequente disfunção orgânica (Sharawy, 2014). Os mecanismos pelos quais esta disfunção vascular ocorre não estão totalmente compreendidos, porém, sabe-se que ela está relacionada a uma combinação de dano endotelial e aumento da liberação de fatores pró-inflamatórios com ação vasodilatadora. Dentre estes fatores estão os mediadores lipídicos, como eicosanoides e fatores de ativação plaquetária, bem como as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RSN, do inglês *reactive nitrogen species*) (Aird, 2003; Sharawy, 2014).

Os primeiros relatos da participação do NO na fisiopatologia da sepse se deram no início dos anos 1990, quando Ochoa e colaboradores observaram que pacientes sépticos apresentavam um aumento plasmático dos metabólitos de NO (Ochoa *et al.*, 1991). Poucos anos antes, alguns grupos já haviam demonstrado que o LPS induz a produção de NO em diversos tipos celulares, entre eles os macrófagos (Stuehr e Marletta, 1987), hepatócitos (Billiar *et al.*, 1989), células da musculatura lisa vascular (Rees *et al.*, 1990) e células endoteliais (Radomski *et al.*, 1990; revisado por Moncada *et al.*, 1991). Na mesma década, pesquisadores trataram pacientes sépticos com L-NAME e mostraram que a inibição da produção de NO levava ao aumento da pressão arterial destes pacientes, apesar de haver também alterações no débito cardíaco (Petros *et al.*, 1994). Estudo *ex vitro*, utilizando artérias mesentéricas de pacientes em choque séptico, mostraram que estes vasos estavam hiporresponsivos à noradrenalina e confirmaram que a adição de L-NAME ou azul de metileno (inibidor da guanilato ciclase solúvel GCs, alvo de ação do NO) à cuba de órgão isolado, revertia esta resposta ao agente vasoconstritor, atribuindo ao NO a redução da sensibilidade vascular no choque séptico (Tsuneyoshi *et al.*, 1996). Estes e outros estudos realizados tanto em animais de experimentação bem como em pacientes, deixaram claro a importância do NO no desenvolvimento da disfunção vascular da sepse.

O NO é produzido pela família das enzimas NO sintases. São conhecidas três isoformas desta enzima, duas definidas como constitutivas (a NOS-3 e a NOS-1) e a terceira que possui sua atividade induzida (NOS-2) por estímulos inflamatórios, presença de endotoxinas bacterianas ou hipóxia (Förstermann *et al.*, 1998; Kleinert *et al.*, 2004). Todas elas encontram-se ativas cataliticamente quando dimerizadas e utilizam L-arginina e oxigênio molecular como substrato, necessitando de cofatores como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), o mononucleotídeo de flavina (FMN) e a

tetrahidrobiopterina (BH₄), para a produção de NO e L-citrulina (Förstermann e Sessa, 2012). Porém, elas diferem na quantidade e no tempo de produção de NO, uma vez que a isoforma induzida produz NO em concentrações maiores (mM) e por mais tempo e as constitutivas produzem NO em escala nanomolar e de maneira pulsátil.

Apesar das NO sintases estarem classificadas como constitutivas ou induzida, é sabido que as isoformas constitutivas também estão sujeitas à regulação transcricional e que a NOS-2 está expressa em condição fisiológica (Förstermann e Sessa, 2012; Mattila e Thomas, 2014). A NOS-2 foi a primeira isoforma a ser apontada como responsável pela produção exacerbada de NO durante a sepse e endotoxemia (revisado por Moncada *et al.*, 1991; Fernandes e Assreuy, 2008), porém, hoje já se sabe que o aumento da expressão da NOS-1 (Enkhbaatar *et al.*, 2009; Nardi *et al.*, 2014) e da NOS-3 (Araújo *et al.*, 2012) também contribuem para a produção de NO nesta condição.

A participação do NO na disfunção vascular da sepse ocorre por diferentes mecanismos, diretos ou indiretos, como por exemplo pela ação sobre a GCs (Fernandes *et al.*, 2009; Nardi *et al.*, 2014); através da S-nitrosilação de proteínas (Benedet *et al.*, 2018); e sobre canais de potássio (Bolotina *et al.*, 1994; da Silva-Santos *et al.*, 1999; Collin *et al.*, 2011). Além da produção aumentada de NO, o desacoplamento das NO sintases, que ocorre tanto pela redução do substrato L-arginina (Luiking *et al.*, 2005), bem como do cofator BH₄ (He *et al.*, 2012), contribui para a produção de ânion superóxido (O₂⁻) durante a sepse. Também, o aumento da atividade de enzimas como NAHPD oxidase (Kong *et al.*, 2010) e xantina oxidase (Galley *et al.*, 1996; Luchtemberg *et al.*, 2008) estão envolvidas no aumento da produção de ROS durante o desenvolvimento desta condição.

O equilíbrio entre a formação e eliminação de ROS é fundamental para a manutenção da homeostase celular. Em condição fisiológica, sua produção é minuciosamente controlada por componentes antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Finkel, 2003). Porém, a produção exagerada de ROS está associada à citotoxicidade (Huet *et al.*, 2011). Na sepse, os altos níveis de O₂⁻ possibilitam ampla interação com o NO, formando espécies ainda mais reativas, como o peroxinitrito (ONOO⁻) (Thomas *et al.*, 2015). O ONOO⁻ e outras ROS, interagem com múltiplos alvos, oxidando proteínas e componentes do DNA e induzindo peroxidação lipídica (Pacher *et al.*, 2007). Estas ações oxidativas podem ocorrer nas membranas mitocondriais, resultando em despolarização da membrana, desacoplamento da fosforilação oxidativa e alteração da cadeia respiratória, ativação de caspases e, por fim, apoptose (Boisramé-Helms *et al.*, 20). Além disso, algumas ROS e mediadores com conhecida ação vasodilatadora se apresentam aumentados na sepse, contribuindo não só para o dano orgânico,

mas também para a disfunção vascular, como é o caso do H_2O_2 e o H_2S , que agem através da abertura direta de canais de K^+ do músculo liso vascular ou, ainda, pela via GCs/PKG (Mink *et al.*, 2008; Coletta e Szabo, 2013).

1.4. PVAT NA SEPSE E ENDOTOXEMIA

Pouco se conhece sobre a influência do PVAT no dano vascular da sepse. Em *abstract* publicado em 2012, Tsao e colaboradores avaliaram a contração dos microvasos de animais desafiados com LPS frente ao vasoconstritor fenilefrina e mostraram que a inibição da atividade das NO sintases pelo uso de L-NAME, induziu melhora na hiporresponsividade já conhecida na endotoxemia, o que aconteceu de maneira mais relevante nos vasos em que o PVAT foi mantido intacto, se comparado a vasos PVAT-, sugerindo que o NO produzido pelo PVAT pode modular a resposta contrátil durante a endotoxemia. No ano seguinte, Hai Mei e colegas mostraram que a contribuição do PVAT para o efeito anticontrátil de artérias mesentéricas de animais endotoxêmicos pode ser dependente de NO, provavelmente proveniente da NOS-2, já que a sua inibição com *androgapholide* reverteu este efeito, apesar deste composto não ser seletivo e o grupo não ter investigado outros possíveis alvos de ação (Jayakumar *et al.*, 2013; Hai Mei *et al.*, 2013).

Recentemente, Awata e colegas mostraram através de experimentos utilizando aortas isoladas de ratos, que os anéis de vasos dos animais sépticos que tiveram o PVAT mantido contraíram menos frente ao vasoconstritor fenilefrina do que aqueles que tiveram o PVAT removido, mostrando que o PVAT contribui para a vasoplegia da sepse experimental. Os autores, através de ferramentas farmacológicas, levantaram evidências de que isso pode ocorrer através do aumento da produção de NO e de prostaciclina provenientes do PVAT (Awata *et al.*, 2019).

2. JUSTIFICATIVA

Apesar do conhecimento adquirido nos últimos anos sobre a influência do PVAT na fisiologia cardiovascular e no desenvolvimento de algumas doenças relacionadas ao sistema cardiovascular (como aterosclerose, hipertensão e obesidade), é escasso o conhecimento referente à ação do PVAT sobre o dano vascular da sepse. Considerando que a hipotensão e a hiporreatividade vascular são vistas como as principais alterações que levam a morte de pacientes em choque séptico, a importância deste trabalho está no entendimento, ainda que inicial, sobre a maneira pela qual o PVAT exerce suas ações sobre esta profunda alteração vascular da sepse.

3. HIPÓTESE

O tecido adiposo perivascular contribui, a partir da liberação de fatores dele derivados, para a disfunção vascular da sepse.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o envolvimento do PVAT na disfunção vascular da sepse.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

PARTE I

- 1) Avaliar a influência do PVAT na contração de aorta e artéria mesentérica superior de animais *naïve* e sépticos;
- 2) Avaliar a contração de aorta e mesentérica superior de animais *naïve*, quando incubados com PVAT de animais *naïve* ou CLP;
- 3) Avaliar a produção de NO e ROS pelo PVAT durante o desenvolvimento da sepse experimental;
- 4) Investigar as vias pelas quais o PVAT contribui para a contração de aorta e artéria mesentérica superior na sepse, considerando as diferenças no tipo de PVAT que envolve cada um destes vasos.

PARTE II

- 5) Avaliar a contração de artéria mesentérica de segunda ordem PVAT+ e PVAT- após a incubação com LPS;

- 6) Avaliar a contração de mesentérica de segunda ordem de camundongos *naïve*, quando na presença de PVAT previamente incubado com LPS (15 µg/mL);
- 7) Avaliar a contração de artéria mesentérica de segunda ordem de animais obesos PVAT+ e PVAT-, frente à noradrenalina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ANIMAIS

PARTE I

O cuidado com os animais e os procedimentos experimentais utilizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da UFSC (CEUA) sob o número de protocolo 2264190617 e estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA). Os experimentos foram realizados em ratas *Wistar* de aproximadamente 90 dias, pesando entre 200 e 250 gramas, fornecidas pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram tratados com vermífugo (Albendazol 10%) na água de beber por 3 dias, seguido de solução polivitamínica (Vitagold®) pelos próximos 4 dias. Foram alocados em 5 animais por caixa em estante ventilada, sendo mantidas temperatura (22 ± 2 °C) e luz (ciclo de 12 h claro/escuro) controladas, com livre acesso à água e ração.

PARTE II

Todos os procedimentos cumpriram as normas estabelecidas pelo *Animals (Scientific Procedures) Act 1986* e foram feitos de acordo com licença de projeto aprovado. Os experimentos foram realizados utilizando camundongos C57BL/6J (Envigo, Reino Unido). Os animais receberam dieta normal ou rica em gordura (*Special Diet Services*, UK, cat no. 824054, 60% gordura, 20% carboidrato e 20% proteína) e, com aproximadamente 18 semanas e peso médio de $40.73 \text{ g} \pm 4.652 \text{ g}$, foram eutanasiados por asfixia de CO₂.

5.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.2.1. Indução da sepse pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A indução da sepse foi realizada pelo método de CLP (Rittirsch *et al.*, 2009). Os animais foram previamente sedados pela via i.p com cloridrato de xilazina (5 mg/Kg) e analgesiados com cloridrato de tramadol (10 mg/Kg) e, então, foram acomodados em uma câmara de respiração para a indução de anestesia com oxigênio-isoflurano a 5%. Após a indução da anestesia, os animais foram colocados sobre uma manta aquecida (37°C) e a anestesia foi mantida por inalação contínua da mistura de oxigênio-isoflurano (3%) durante todo o procedimento cirúrgico. O anestésico local lidocaína (2%, sem vasoconstritor) foi administrado

na região da linha alba, onde foi feita a incisão abdominal. Após o procedimento anestésico, foi realizada laparotomia, com incisão de aproximadamente 1 cm e, então, a exposição e ligadura não obstrutiva do ceco, abaixo da válvula ileocecal. A perfuração transfixante no ceco dos animais foi realizada com agulha 14 G, seguida de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. O ceco foi recolocado na cavidade abdominal e a sutura foi feita utilizando fio de nylon (3-0). Em seguida, os animais receberam PBS (30 mL/Kg; ~36°C; s.c.) para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (~120 minutos). Visando diminuir o sofrimento animal, foi administrado cloridrato de tramadol (5 mg/kg, s.c.) em intervalos de 12 horas.

5.2.2. Experimentos de órgão isolado

Vinte e quatro horas após a indução da sepse, as ratas foram eutanasiadas com sobredose de anestésicos (cetamina 300 mg/Kg e xilazina 60 mg/Kg; i.p.) para a coleta dos vasos. Para reduzir o número de animais utilizados, foram coletadas as aortas e artérias mesentéricas superiores dos mesmos animais. Em seguida, o PVAT foi mantido (PVAT+) ou removido (PVAT-) dos vasos (ver Esquema 2A), os quais permaneceram em solução nutritiva Krebs-Ringer (pH 7.4; composição em mM: 118 NaCl; 4.7 KCl; 2.5 CaCl₂; 1.1 MgSO₄; 0.9 KH₂PO₄; 25 NaHCO₃; 0.03 EDTA e 11 D-glucose) gelada até o início do experimento. Os vasos foram então seccionados em anéis de ~3 mm e colocados em sistema de órgão isolado aquecido a 37°C e constantemente gaseificado com mistura carbogênica contendo 95% O₂ e 5% CO₂. Os anéis estavam conectados à transdutores de força isométrica (ADInstruments, Dunedin, Nova Zelândia) para a medição da tensão. A tensão basal foi de 0,5 g e 2 g para a mesentérica superior e aorta, respectivamente. Depois de 45 min de estabilização, com troca da solução nutritiva (a cada 15 min), a viabilidade dos vasos foi avaliada usando KCl (120 mM). Após lavagem e nova estabilização dos anéis (30 min), a presença de endotélio funcional foi confirmada pela capacidade de vasodilatação à acetilcolina (1 μM para aorta e 10 μM para mesentérica superior) nos vasos pré-contraídos com fenilefrina (1 μM para aorta e 10 μM para mesentérica superior). Apenas os anéis que apresentaram >80% de vasodilatação foram considerados. A curva cumulativa para a noradrenalina (1 nM a 100 μM) foi realizada após nova estabilização dos anéis. Em alguns protocolos experimentais, os anéis PVAT+ e PVAT- foram incubados com L-NAME (200 μM) por 30 min antes da curva cumulativa para a noradrenalina. Os dados são expressos como gramas de contração x noradrenalina log [M].

Uma segunda abordagem experimental utilizando o sistema de órgão isolado foi utilizada. Neste caso, o PVAT dos vasos de ratas saudáveis e sépticas foram dissecados de toda

a extensão do vaso utilizado e mantidos separadamente em Krebs refrigerado até o momento da realização do experimento. Apenas vasos de animais normais (*naïve*) foram montados no sistema (ver Esquema 2B). A estabilização dos vasos ocorreu como descrito acima. Vinte minutos antes da realização da curva cumulativa para a noradrenalina, o PVAT de vasos de animais normais ou sépticos foi adicionado às cubas, contidos por fio de aço inoxidável (40 μm de diâmetro), ou seja, o PVAT encontrava-se apenas na mesma solução que os vasos, embora sem contato direto com os mesmos. Nos experimentos nos quais o PVAT foi incubado previamente com ferramentas farmacológicas, estas foram adicionadas à solução do PVAT 30 min antes deste ser adicionado à cuba contendo os vasos. O PVAT foi lavado 3 vezes com Krebs-Ringer e imediatamente colocado na cuba com o vaso repórter, como explicado acima. Os dados são expressos como gramas de contração x noradrenalina $\log [M]$.

Em uma terceira etapa, segmentos de artéria mesentérica de segunda ordem ($>200 \mu\text{m}$) de camundongos foram dissecadas em solução nutritiva (composição em mmol/L : 119 NaCl, 4,7 KCl, 1,17 MgSO_4 , 25 NaHCO_3 , 1,17 KH_2PO_4 , 0,03 EDTA, 5,5 glicose e 1,6 CaCl_2) gelada. O PVAT foi mantido em alguns segmentos (PVAT+) e removido em outros (PVAT-) ou, ainda, foi removido de todos os segmentos e adicionado à cuba previamente à realização da curva concentração-resposta (ver Esquema 3). As artérias foram montadas utilizando fio de 40 μm de diâmetro (Danish MyoTech, Dinamarca) e deixadas estabilizando por 30 min antes da normalização. A normalização utilizou o comprimento e a tensão da parede do vaso para ajustar os vasos a uma tensão inicial padronizada. As artérias foram esticadas gradualmente usando um micrômetro e a força medida usando transdutor Powerlab® (LabChart v7; ADInstruments, Reino Unido), que permite o cálculo da tensão da parede. Após a normalização, os vasos foram deixados por mais 30 min para equilíbrio (37°C, gaseificado com mistura carbogênica contendo 95% O_2 e 5% CO_2). Após o equilíbrio, os vasos foram desafiados com 60 mmol/L de KCl para estabelecer uma resposta contrátil máxima. Vasos com resposta $< 0,3 \text{ mN/mm}^2$ foram excluídos. As artérias PVAT+ e PVAT-, ou ainda, os PVATs previamente isolados dos vasos, foram incubados com LPS (15 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas e a contração dos vasos nestas diferentes condições foi testada para a noradrenalina (ver Esquema 3). As respostas foram registradas usando o programa LabChart®. Os dados são expressos como % de contração do KCl x noradrenalina $\log [M]$.

5.2.3. Dosagem de nitrito e nitrato (NO_x)

Os níveis de NO_x foram medidos pelo método de Griess, como descrito previamente por Granger e colaboradores (1996). Para isso foi utilizado o reagente de Griess (1% de

sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftiletilenodiamina em água de Milli-Q). O plasma foi desproteínezado pela adição de sulfato de zinco (2%) e, para a conversão do nitrato para nitrito, as amostras foram incubadas a 37°C, durante 2 h, em presença de nitrato redutase de *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após a conversão enzimática do nitrato a nitrito, as amostras foram centrifugadas para a remoção das bactérias e 100 µL do sobrenadante foram misturados a 100 µL de reagente de Griess. Após 10 min, realizou-se a leitura em 540 nm em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Os resultados foram expressos como µM de NOx.

5.2.4. Avaliação da produção de NO e ROS

A produção de NO e ROS pelo PVAT foi avaliada de maneira direta através do uso de sondas fluorescentes. Para avaliar a produção de NO, foi utilizada a sonda diaminofluoresceína-FM diacetato (DAF-FM DA). Esta sonda, desenvolvida por Kojima e colaboradores (1999), atravessa a membrana celular de maneira passiva e dentro da célula é desacetilada por esterases, gerando DAF-FM. O DAF-FM reage com o NO, produzindo um benzotriazol fluorescente (excitação em 495 nm e emissão em 515 nm), permitindo a obtenção de relação linear entre a intensidade de fluorescência e a formação de NO na amostra. A sonda é capaz de detectar concentrações de NO a partir de 3 nM (Kojima et al., 1999).

Já o dihidroetídio (DHE) foi utilizado para a detecção de ROS. Esta sonda permeia a membrana celular e é oxidada principalmente pelo O₂⁻, mas também por outras espécies reativas de oxigênio, como o H₂O₂, originando um produto fluorescente, o etídio (E⁺). O E⁺ apresenta seu máximo de fluorescência em comprimento de onda de emissão e excitação de 520 nm e 610 nm, respectivamente (Benov et al., 1998; Gomes et al., 2005).

Aortas torácicas e artérias mesentéricas superiores com os PVATs intactos foram removidas de animais saudáveis e de animais sépticos 12 h e 24 h após a indução da sepse e congeladas em gel crioprotetor Tissue Tek®. Cortes de 10 µm para a aorta e 20 µm para mesentérica superior foram feitos em criostato e acondicionados em lâminas revestidas com poli-L-lisina. As fatias foram incubadas em solução nutritiva de Hank modificado obtido da Sigma Aldrich (EUA) por 15 minutos e, então, incubadas por 60 min com as sondas DAF-FM DA (10 µM) ou DHE (5 µM) diluídas na solução de Hank. Em seguida, as fatias foram lavadas por 3 vezes com a solução e montadas junto com as lamínulas, utilizando gel de montagem Gel Mount®.

Para a avaliação da produção de NO nas artérias mesentéricas superiores, o protocolo teve modificações, seguindo protocolo baseado em Victorio e colaboradores (2012). Neste caso

especificamente, o tecido foi colocado e incubado com DAF-FM DA por 30 min em temperatura ambiente, fixado com paraformaldeído 4% por 4 h e então congelado em gel crioprotetor para então ser cortado e analisado. Esta modificação no protocolo foi necessária pois não conseguimos visualizar nenhuma fluorescência neste tecido, mesmo havendo testado maiores concentrações da sonda ou maior tempo de incubação, seguindo o protocolo padrão.

As amostras foram visualizadas em microscópio de fluorescência (Leica DMI 3000B) e a quantificação da intensidade relativa de fluorescência foi realizada utilizando o software de domínio público Image J 1.50i software (NIH, Bethesda, MD, USA).

5.2.5. Imunofluorescência

Com auxílio de um criostato (Leica CM 1850 UV Biosystems Leica, Wetzlar, Germany), as aortas (10 μ m) e artérias mesentéricas superiores (20 μ m) foram cortadas e os cortes foram colocados em lâminas revestidas com poli-L-lisina. Os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica, e foram bloqueados por 1 h com soro bovino fetal 5%. Após o bloqueio, os cortes foram incubados *overnight*, a 4°C, com os anticorpos primários em diluição 1:200 (anticorpo policlonal feito em coelho anti-NOS-1, SC-1025, lote D2611, Santa Cruz Biotechnology, USA; anticorpo monoclonal feito em camundongo anti-NOS-2, N9657, lote 125M4885V Sigma-Aldrich, USA; anticorpo policlonal feito em coelho anti-NOS-3, SC-654, lote BO613 Santa Cruz Biotechnology, USA; anticorpo policlonal feito em coelho anti-receptor- β 3 adrenérgico, BS1063r, lote AH04103450 BIOSS, USA). Um corte foi utilizado como controle negativo, ou seja, não recebeu o anticorpo primário. No dia seguinte, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com os anticorpos secundários (diluídos 1:800): Alexa Fluor 568- (A11011, lot 1778025, Thermo Fisher Scientific, USA), PE- (sc-3744, lot E3012, Santa Cruz Biotechnology, USA) ou Alexa Fluor 488- (A31627 lot 140410, Thermo Fisher Scientific, USA), por 1 h em temperatura ambiente. Após a incubação, os cortes foram novamente lavados 3 X com PBS e depois foram montadas as lamínulas sobre as lâminas, utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) para conservação da fluorescência. As lâminas foram mantidas em ambiente escuro e úmido a 4°C até o momento da leitura. Para análise, foi utilizado microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000B®, Wetzlar, HE, Germany) e a aquisição das imagens foi realizada através do software LAS AF Lite® (Leica Microsystems®, Wetzlar, HE, Germany). Foram feitos pelo menos 2 cortes de cada tecido (n = 5 por grupo). A quantificação da intensidade relativa de fluorescência foi realizada pelo software NIH ImageJ 1.50i imaging software (NIH, Bethesda,

MD, USA). Os resultados foram expressos em intensidade relativa de fluorescência em comparação com o grupo controle.

5.2.6. Ensaio de nitrosilação de proteínas

Aortas e artérias mesentéricas superiores foram coletadas usando tampão contendo EDTA e neocuproína e congeladas à -20° C em material crioprotetor (Tissue Tek®). Após completo congelamento, as amostras foram mantidas à -80° C até o momento do uso (os experimentos foram realizados no máximo 3 dias após a coleta dos tecidos). No dia do experimento, os vasos foram seccionados em criostato (10 µm para a aorta e 20 µm para a artéria mesentérica superior) e as fatias foram, então, acomodadas em lâminas revestidas com poli-L-lisina, como descrito por Benedet *et al.*, 2018. Os cortes foram permeabilizados com PBS contendo 1% de Triton X-100 por 15 min, lavados 3 vezes com tampão de lavagem (250 mM HEPES, 0,1 mM EDTA e 0,01 mM neocuproína) e, então, fixado com paraformaldeído 4% por 20 min em temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com N-etilmaleimida (20 mM; 30 min; à 4° C), para que houvesse o bloqueio das sulfidrilas livres e, após esta incubação, novamente foram lavados 3 vezes com o tampão de lavagem. Então, as fatias foram incubadas com ascorbato de sódio (1 mM) e 0.05 mM de *N*-(3-maleimidylpropionyl)biocytin por 1 h, em temperatura ambiente. Como controle da detecção de proteínas S-nitrosiladas, alguns cortes foram incubados sem a presença do ascorbato de sódio. Todos os cortes foram lavados e, por fim, incubados com solução de avidina conjugada ao fluoróforo FITC (1:800 dilution; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) por 1 h, também em temperatura ambiente. As lamínulas foram então acondicionadas sobre os cortes, utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount® (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) para conservação da fluorescência. Para análise, foi utilizado microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000B®, Wetzlar, HE, Germany) e a aquisição das imagens foi realizada através do software LAS AF Lite® (Leica Microsystems®, Wetzlar, HE, Germany). Foram feitos pelo menos 2 cortes de cada tecido (n = 5 por grupo). A quantificação da intensidade relativa de fluorescência foi realizada pelo software NIH ImageJ 1.50i imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em intensidade relativa de fluorescência em comparação com o grupo controle.

5.2.7. Análise estatística

Os dados são expressos como média ± erro padrão da média. A análise estatística foi realizada utilizando o programa Graph Prism 5.03 (Graph Pad Software, San Diego, CA). As

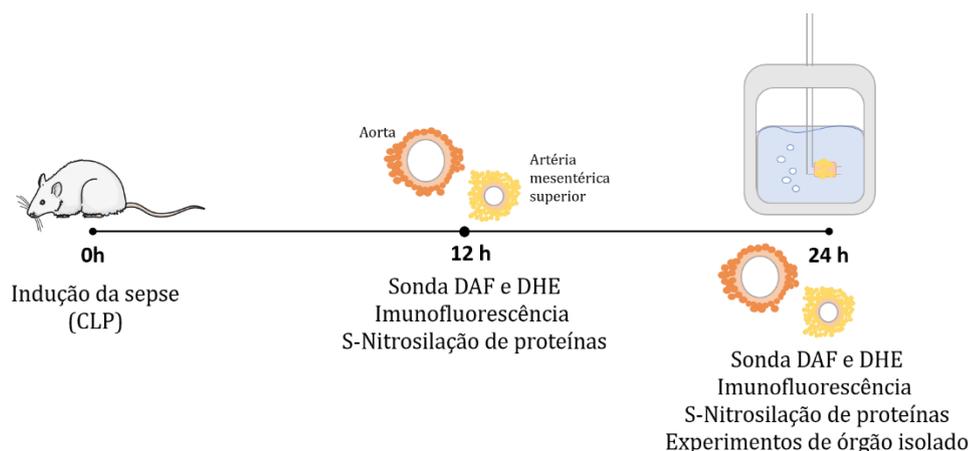
curvas concentração-resposta foram analisadas utilizando ANOVA de duas vias, com pós-teste de Bonferroni; $-\log CE_{50}$ e R_{max} foram analisados pelo teste-T de Student. A comparação entre os grupos PVAT 12 h, PVAT 24 h e PVAT *naïve* foi realizada por ANOVA de uma via. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

5.3. MATERIAIS

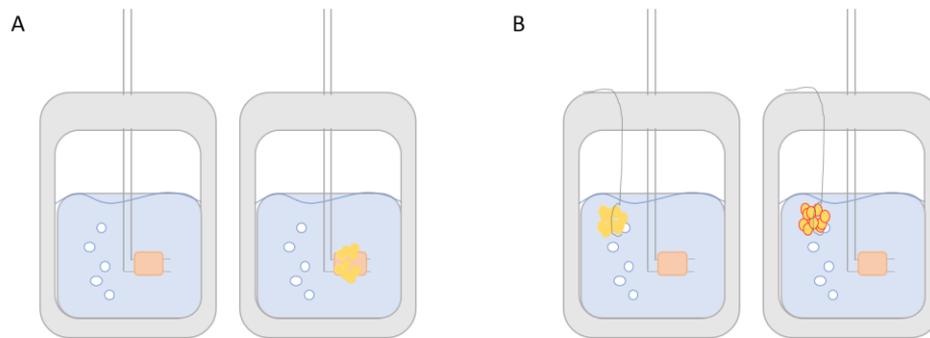
Anticorpo policlonal feito em coelho anti-NOS-1 and anti-NOS-3 foram comprados da Santa Cruz *Biotechnology*, EUA; mouse monoclonal antibody anti-NOS-2 from Sigma-Aldrich, USA. Anticorpo policlonal feito em coelho anti-receptor β_3 adquirido da BIOS, EUA. Tissue Tek® obtido de Sakura Finetek Inc., EUA. Anticorpos secundários (Alexa Fluor 568, PE or Alexa Fluor 488) e avidina-FITC da *Invitrogen Life Technologies*, EUA. Sondas fluorescentes, DAF-FM diacetato (*4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorofluorescein diacetate*) and DHE (*dihydroethidium*) comprados da *Thermo Fisher Scientific*, EUA. Reagentes usados para o ensaio de *Biotin Switch*: HEPES, neocuproína, ascorbato de sódio, *N*-(3-malemidylpropionyl) biocytin da Sigma-Aldrich, EUA. L-NAME (*N*(ω)-nitro-L-arginine methyl ester) e bitartarato de noradrenalina, LPS (*Escherichia coli* O111:B4), ODQ (*1H*-(1,2,4)oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one), tempol e apocinina adquiridos da Sigma-Aldrich, EUA.

5.4. DESENHOS EXPERIMENTAIS

Esquema 1: Desenho experimental da Parte I

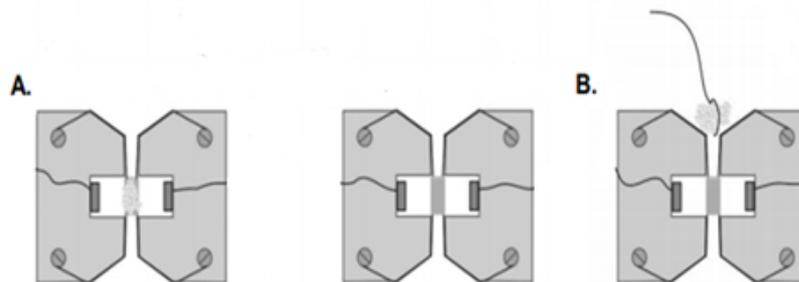


Esquema 2: Experimentos de aorta e artéria mesentérica superior isoladas



Inicialmente, aortas e artérias mesentéricas superiores de animais *naïve* ou sépticos foram utilizadas em experimento de órgão isolado, tendo seu PVAT mantido (PVAT+) ou removido (PVAT-) (Esquema 2A). Numa segunda abordagem, os PVATs de vasos de animais *naïve* ou sépticos foram isolados e mantidos em líquido nutritivo gelado até serem adicionados às cubas contendo os vasos, alguns PVATs foram previamente incubados com inibidores e antagonistas para estudo do mecanismo de ação. Nesta abordagem, apenas vasos de animais saudáveis foram utilizados (Esquema 2B).

Esquema 3: Experimentos de artéria mesentérica de segunda ordem isoladas



Artérias mesentéricas de segunda ordem tiveram o PVAT mantido ou removido e foram incubadas com LPS (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 4 horas antes da contração para a noradrenalina em sistema de órgão isolado (Esquema 3A). Ou, ainda, tiveram o PVAT removido e incubado com LPS (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 4 horas e, então, adicionado ao sistema de órgão isolado contendo vasos que foram mantidos com líquido nutritivo (Esquema 3B) (Modificado de Saxton *et al.*, 2018).

6. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho encontram-se divididos em duas partes: a primeira, se refere aos resultados obtidos utilizando modelo de sepse em ratas, onde investigamos as ações do PVAT sobre a contração de aorta e artéria mesentérica superior, ambas com o endotélio intacto; a segunda, relata os resultados iniciais sobre ação do PVAT em artérias mesentéricas de segunda ordem de camundongos, incubadas *ex vivo* com LPS e desprovidas de endotélio.

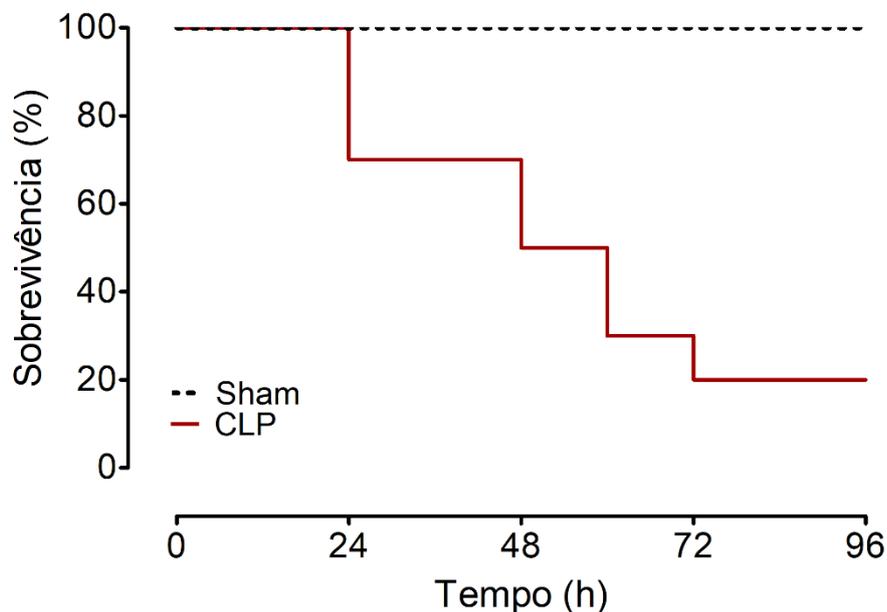
6.1. PARTE I

6.1.1. Caracterização da intensidade da sepse experimental e a escolha por animais *naïve* como controle

Com o objetivo de padronizar a intensidade da sepse, realizamos uma curva de mortalidade dos animais submetidos à cirurgia de CLP, como controle foram utilizados animais falso-operados (Sham).

Os animais apresentaram 50% de mortalidade 48 horas após a indução da sepse e 20% dos animais sobreviveram ao final do tempo de avaliação (Figura 6).

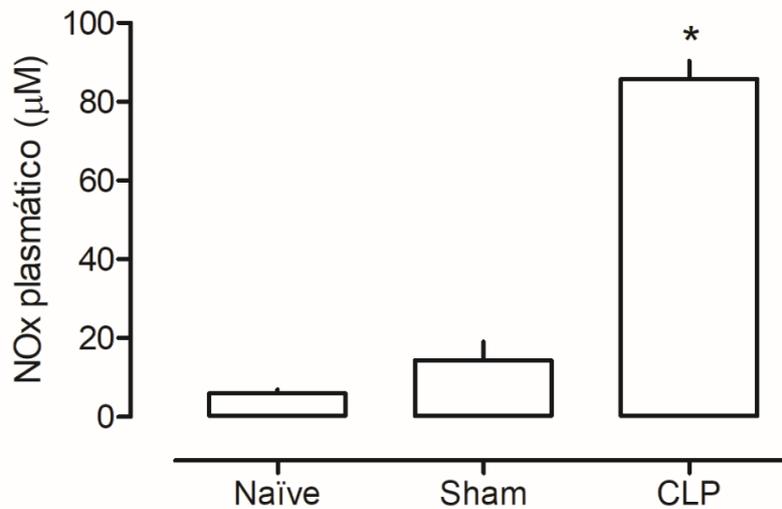
Figura 6. Curva de sobrevivência para a caracterização da gravidade da sepse experimental.



A taxa de sobrevivência foi avaliada a cada 12 h após a indução da sepse até o tempo de 96 h. Os resultados são expressos como porcentagem de sobrevivência. n = 10 animais por grupo.

Os animais Sham (ou falso operados), passam pela anestesia e pela laparotomia, assim como os animais CLP e, por esse motivo, são muitas vezes escolhidos como controle experimentais no desenvolvimento de projetos de pesquisa, já que foram submetidos aos mesmos protocolos que os animais-teste. Com a finalidade de avaliar se haveria alguma diferença entre animais saudáveis (*naïve*) ou os animais Sham, analisamos a concentração de NO plasmático, através da sua medida indireta, pela dosagem de nitrito+nitrato (NOx). Nesta avaliação não foi observada diferença significativa entre animais do grupo *naïve* e Sham, enquanto nos animais CLP, 24 horas após a indução da sepse, a dosagem de NOx se mostrou aumentada (Figura 7).

Figura 7. Concentração de nitrito + nitrato (NOx) plasmáticos.

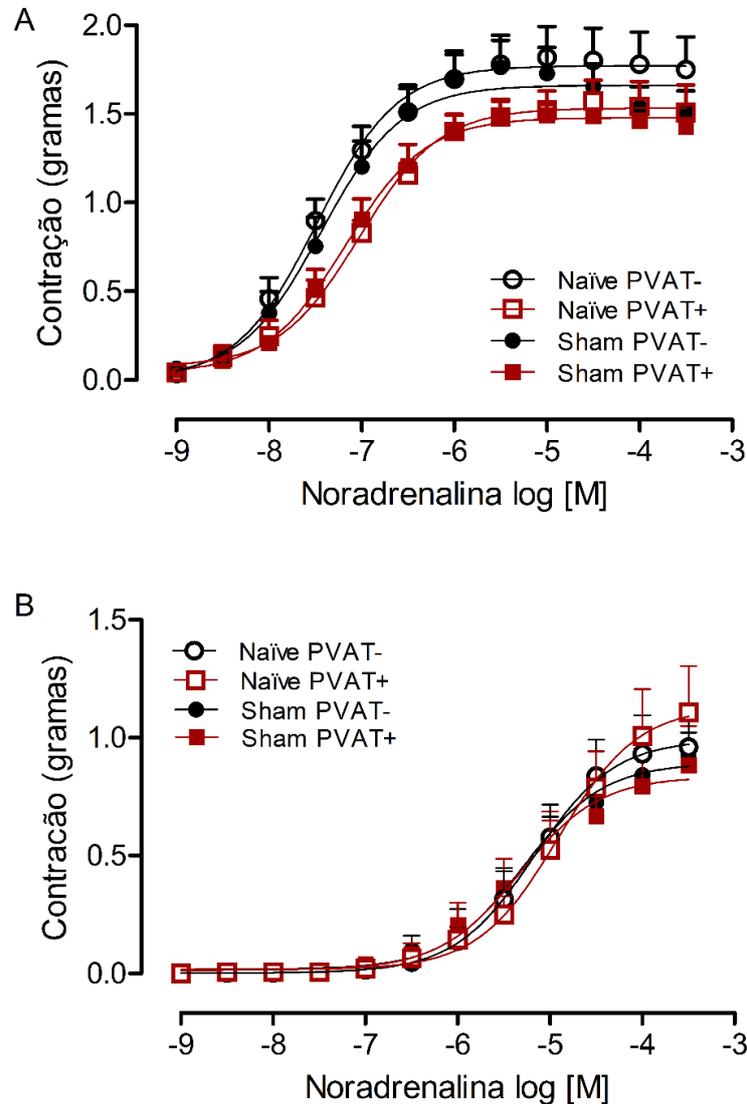


Vinte e quatro horas após a indução da sepse (CLP) ou da abertura da cavidade abdominal (Sham), o sangue foi coletado e o NOx plasmático foi mensurado. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média de 5 ratas. ANOVA de uma via seguida pelo *post hoc* de Bonferroni; * $p < 0,05$ em relação ao grupo Naïve.

Além da avaliação da concentração de NOx, também realizamos curva concentração-resposta para a noradrenalina em anéis de aorta torácica e artéria mesentérica superior, de animais *naïve* e Sham, PVAT+ e PVAT-. A análise destas curvas de contração mostra que não houve diferença entre os grupos Sham, quando comparados aos grupos *naïve* nas mesmas condições experimentais (Figura 8).

Levando em consideração estes resultados, que mostraram não haver diferenças entre animais saudáveis e falso operados nos parâmetros avaliados e, principalmente, pensando na redução de sofrimento animal, utilizamos ratas *naïve* como controle para os experimentos encontrados na sequência deste trabalho, já que estas não são submetidas aos protocolos anestésico e cirúrgico.

Figura 8. Resposta contrátil de vasos *naïve* e Sham frente à noradrenalina.



Vinte e quatro horas após a laparotomia, os vasos PVAT+ e PVAT- de animais sham foram coletados e a resposta à noradrenalina foi avaliada em sistemas de órgão isolado. Painel A para aorta e painel B para artéria mesentérica superior. Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média; $n = 8$. ANOVA de duas vias.

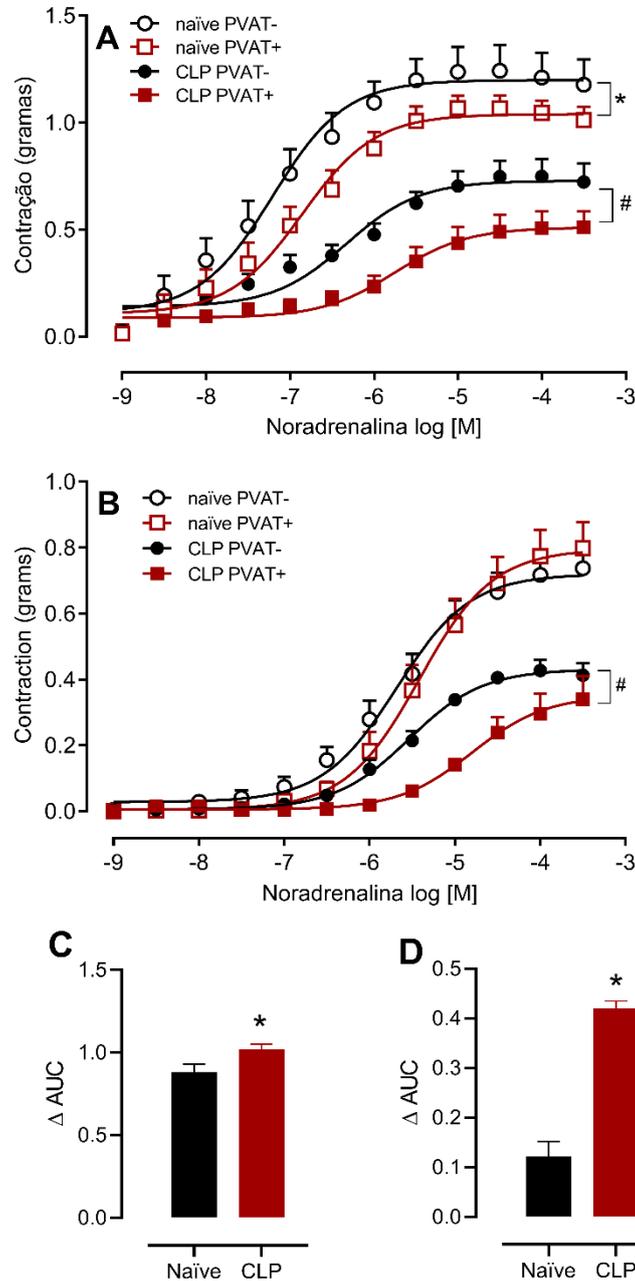
6.1.2. Efeito do PVAT sobre o tônus vascular de animais sépticos

Para avaliarmos se haveria alguma influência do PVAT na resposta contrátil, aortas e artérias mesentéricas superiores de ratas *naïve* ou CLP 24 h foram coletadas para experimento de órgão isolado. A curva cumulativa das aortas de ratas saudáveis confirmou o que a literatura vem mostrando: neste caso, os vasos dos animais PVAT+ apresentaram menor resposta contrátil quando comparados ao PVAT- saudáveis (Figura 9A, símbolos abertos; Tabela 1). Porém, quando avaliamos a contração de artérias mesentéricas superiores das mesmas ratas

saudáveis, não observamos diferença na resposta contrátil comparando os vasos PVAT+ e PVAT- (Figura 9B, símbolos abertos; Tabela 1).

Da mesma maneira, avaliamos a contração dos vasos de animais CLP. Coletamos as aortas torácicas e artérias mesentéricas superiores 24 h após a indução da sepse, quando a hipotensão e hiporreatividade vascular já estão estabelecidas (Nardi *et al.*, 2016; Benedet *et al.*, 2018). Esta hiporreatividade pode ser confirmada observando-se a Figura 9, que mostra que os vasos de animais sépticos apresentam resposta máxima (Rmax) significativamente reduzida quando comparados com os de animais *naïve* (Figura 9A e 9B, símbolos fechados; Tabela 1). Além disso, observamos também que a ação anticontrátil do PVAT não só continua ocorrendo no choque séptico, como também está aumentada se comparada com os animais saudáveis em ambos os vasos avaliados (Figura 9C e 9D). Este fenômeno pode ser facilmente visualizado no gráfico de contração de artéria mesentérica superior, neste vaso não observamos o efeito anticontrátil do PVAT em animais *naïve*, porém, nos animais sépticos a contração PVAT+ encontra-se claramente reduzida.

Figura 9. A presença do PVAT reduz a contração dos vasos de animais sépticos frente à noradrenalina.



Curva concentração-resposta para a noradrenalina em aorta torácica (A) e artéria mesentérica superior (B) de animais *naïve* (símbolos abertos) e animais sépticos (símbolos fechados) contendo (PVAT+) ou não (PVAT-) o tecido adiposo perivascular. Delta da área sob a curva (AUC, do inglês *area under curve*) entre as curvas de contração de animais *naïve* e séptico para aorta (C) e artéria mesentérica superior (D). Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média; $n = 7-8$. ANOVA de duas vias. * $p < 0,05$ comparação PVAT+ e PVAT- do grupo *naïve*; e # $p < 0,05$ comparação PVAT+ e PVAT- do grupo CLP.

Tabela 1. Valores de potência (-log CE₅₀) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior com (PVAT+) ou sem (PVAT-) o tecido adiposo perivascular mantido.

	Aorta torácica		Artéria mesentérica superior	
	Rmax (g)	-log EC ₅₀	Rmax (g)	-log EC ₅₀
<i>Naïve</i>				
PVAT(-)	1.2 ± 0.014	7.0 ± 0.04	0.78 ± 0.01	5.6 ± 0.04
PVAT(+)	1.1 ± 0.01 [#]	6.7 ± 0.04*	0.81 ± 0.01	5.4 ± 0.03*
<i>CLP</i>				
PVAT(-)	0.70 ± 0.01	6.3 ± 0.007	0.43 ± 0.01	5.5 ± 0.02
PVAT(+)	0.51 ± 0.01 [#]	5.7 ± 0.007*	0.35 ± 0.03 [#]	4.8 ± 0.007*

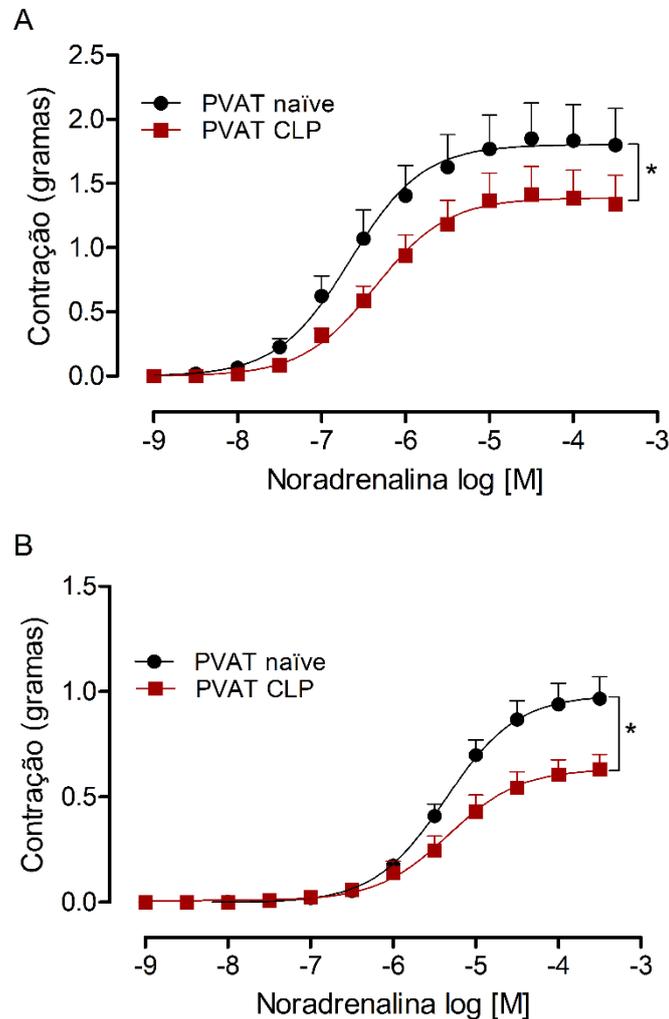
Os dados são expressos como a média ± erro padrão da média; n=8. Teste t de Student, P < 0.05: * -log CE₅₀ PVAT(+) vs. PVAT(-); # Rmax PVAT(+) vs. PVAT(-) .

6.1.3. Confirmação do aumento da ação anticontrátil do PVAT na sepse

Apesar de haver notável diferença na contração dos vasos de animais sépticos PVAT+ quando comparada a dos vasos que tiveram o PVAT removido, nos perguntamos o quanto desta alteração seria unicamente proveniente do PVAT, já que durante a sepse existem importantes alterações tanto no músculo liso vascular quanto no endotélio. Para remover as possíveis influências das outras camadas constituintes do vaso, avaliamos a contração apenas de vasos saudáveis após a incubação com PVAT de animais saudáveis ou sépticos.

Os resultados apresentados na Figura 10 confirmam que a sepse causa alterações no PVAT e que este apresenta uma maior ação anticontrátil quando comparada com a do PVAT de animais saudáveis na aorta (Figura 10A), bem como na artéria mesentérica superior (Figura 10B). Na Tabela 2 encontram-se os parâmetros de potência e resposta máxima da contração para a noradrenalina.

Figura 10. Efeito anticontrátil do PVAT removido de animais sépticos sobre a contração de vasos saudáveis



O PVAT foi removido de aortas e artérias mesentéricas superiores de animais saudáveis ou sépticos, mantidos em líquido nutritivo e adicionados às cubas contendo os vasos de animais saudáveis 20 minutos antes da curva concentração-resposta para a noradrenalina. Ainda com a presença do PVAT na cuba, foram feitas as curvas concentração-resposta para a noradrenalina (Painel A para aorta; Painel B artéria mesentérica superior). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; $n = 8$. ANOVA de duas vias, $*p < 0,05$.

Tabela 2. Valores de potência (-log CE₅₀) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior de animais saudáveis incubadas com PVAT de animais *naïve* ou CLP.

Aorta			
PVAT <i>Naïve</i>		PVAT CLP	
-log CE ₅₀	Rmax	-log CE ₅₀	Rmax
6.7 ± 0.06	1.8 ± 0.03	6.4 ± 0.07*	1.4 ± 0.02 [#]
Artéria mesentérica superior			
PVAT <i>Naïve</i>		PVAT CLP	
-log CE ₅₀	Rmax	-log CE ₅₀	Rmax
5.4 ± 0.03	1.0 ± 0.01	5.3 ± 0.04	0.63 ± 0.01 [#]

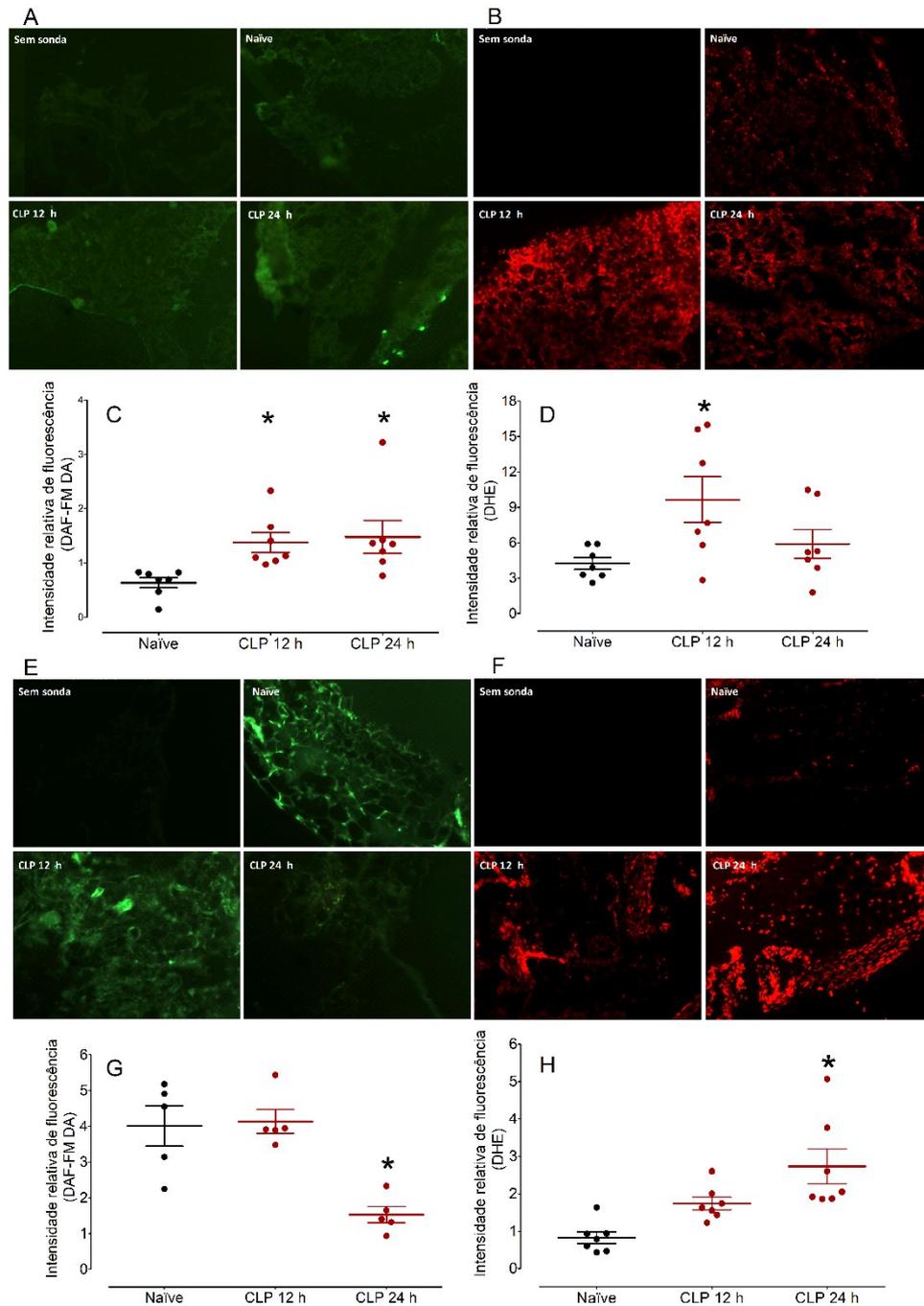
Os dados são expressos como a média ± erro padrão da média; n=8. Teste t de Student, P < 0.05: * -log CE₅₀ PVAT CLP vs. PVAT *naïve*; # Rmax PVAT CLP vs. PVAT *naïve*.

6.1.4. Produção de NO e ROS no PVAT

Considerando a relevância do NO e das ROS na disfunção vascular e, ainda, na ação do PVAT sobre a contração vascular, avaliamos a produção de ambos no PVAT de animais saudáveis e durante a progressão da sepse, neste caso, nos tempos de 12 h e 24 h após o CLP.

Os resultados mostram que houve aumento na produção de NO bem como de ROS pelo PVAT da aorta já no tempo de 12 h quando comparada ao grupo *naïve*. A produção de NO se manteve elevada nos tempos tardios da sepse (Figura 11A-D). Já nas imagens referentes à artéria mesentérica superior, não houve aumento da produção NO no PVAT em nenhum dos tempos avaliados (Figura 11E e G), enquanto, quase de maneira espelhada, nos tempos tardios da sepse um aumento na produção de ROS pode ser observado (Figura 11F e H).

Figura 11. Produção de NO e ROS no PVAT de aorta e artéria mesentérica superior obtidas de animais sépticos durante a progressão da sepse.

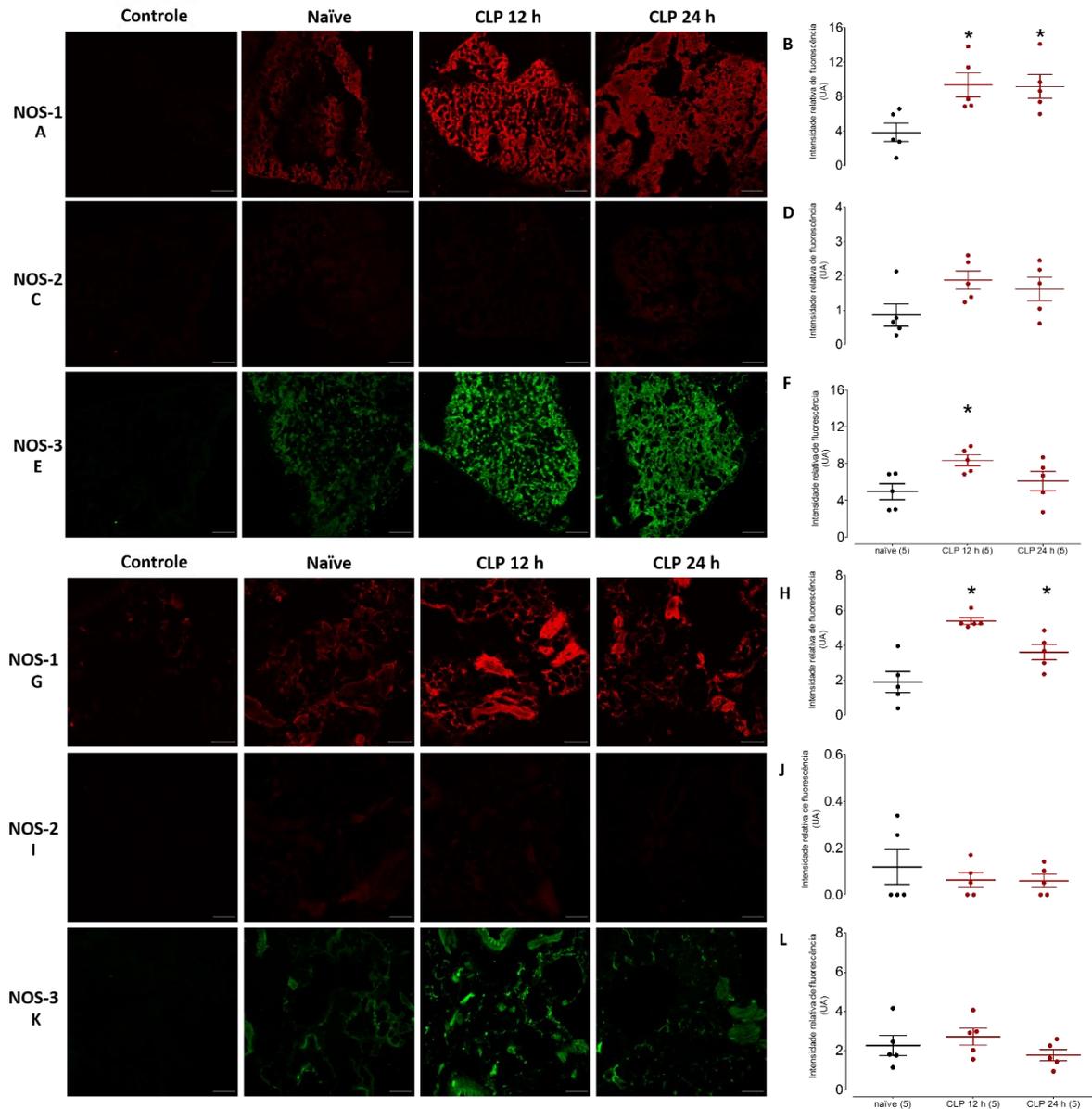


PVAT de aorta (micrografias e painéis de cima) e de artéria mesentérica superior (micrografias e painéis de baixo). Imagens representativas da quantificação da produção de NO (imagens em A e E; painéis C e G) e ROS (imagens em B e F; painéis D e H). As artérias foram coletadas de animais *naive* e de animais sépticos 12 h e 24 h após o CLP e incubados por 60 min com DAF-FM DA (10 μ M) para a medida da produção de NO ou DHE (5 μ M) para a avaliação da produção de ROS. As fotografias dos cortes que não foram incubados com a sonda (Sem sonda) foram utilizadas para mostrar a autofluorescência do tecido, a qual foi descontada dos demais cortes. As imagens foram obtidas com aumento de 20x. Para melhor visualização, o brilho foi aumentado 60% nas imagens A e E e 35% em B e F. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; n=7, exceto pelo painel G, que representa um n=5. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni; *p < 0,05 comparados com o grupo *Naive*.

6.1.5. Expressão das NOS no PVAT durante o curso da sepse

Avaliamos, também, a expressão das NO sintases no PVAT de ambos os vasos estudados. De maneira interessante, encontramos um aumento da NOS-1 tanto na aorta quanto na artéria mesentérica superior de animais sépticos nos dois tempos avaliados (Figura 12A-B e G-H). Também observamos um aumento transitório da expressão da NOS-3 na aorta (Figura 12E-F), o que não foi visto na mesentérica superior (Figura 12K-L). Não houve alteração significativa da expressão da isoforma induzida (Figura 12C-D e I-J).

Figura 12. Expressão das NO sintases no PVAT de aorta torácica e artéria mesentérica superior durante a sepse.



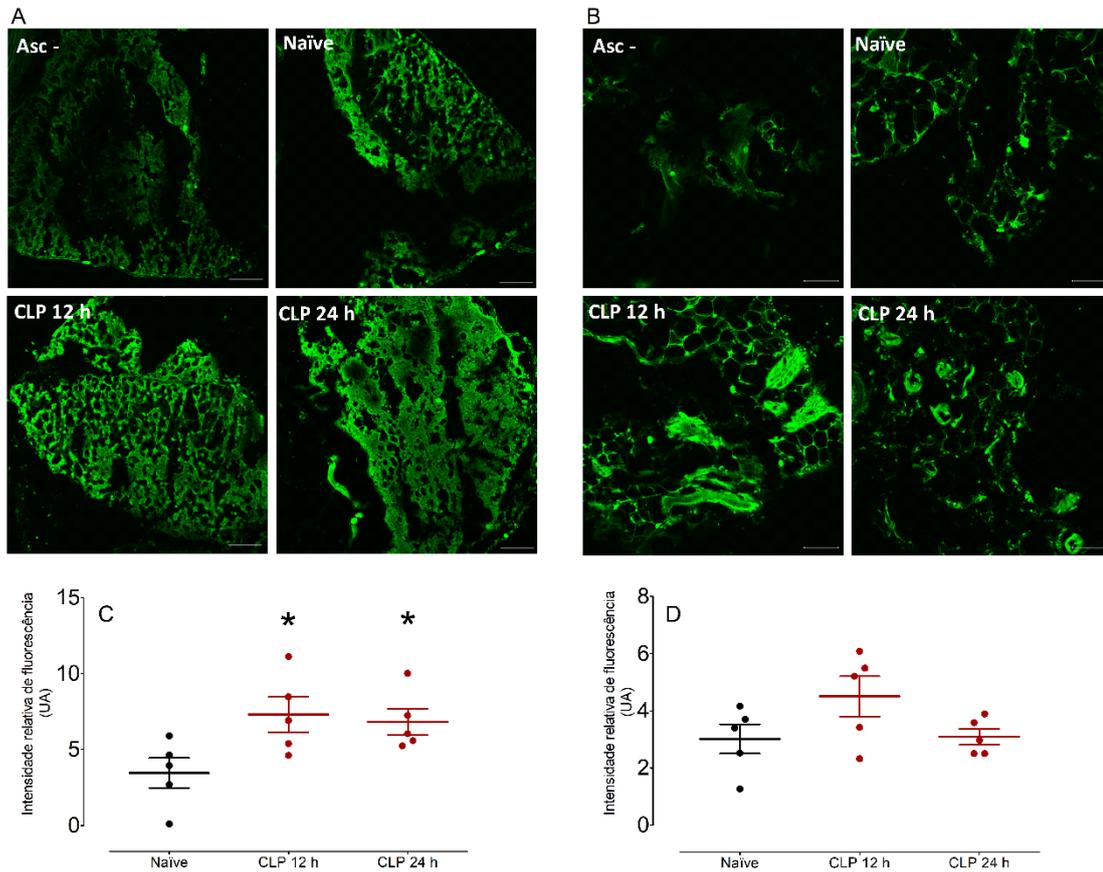
Imagens representativas e quantificação da intensidade relativa de fluorescência do PVAT da aorta (painéis A – F) e artéria mesentérica superior (painéis G – L). Os cortes incubados apenas com anticorpo secundário (Controle) foram usados como controle da autofluorescência. As imagens foram obtidas com aumento de 20x, em microscópio confocal. A barra branca no canto inferior direito corresponde a 100 μ m. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; n=5. ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Bonferroni; *p < 0,05 comparado com o grupo *Naïve*.

6.1.6. S-nitrosilação de proteínas no PVAT durante o curso da sepse

Como já mencionado na Introdução, uma das ações do NO é sobre a S-nitrosilação de proteínas. Avaliamos, então, utilizando a técnica de *biotin switch*, se o PVAT da aorta e mesentérica superior estariam mais nitrosilados durante a sepse. A Figura 13 mostra que há maior nitrosilação de proteínas no PVAT da aorta quando comparado ao grupo *naïve* (Figura

13A e C). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na nitrosilação do PVAT da mesentérica (Figura 13B e D).

Figura 13. S-nitrosilação de proteínas no PVAT de aorta e artéria mesentérica superior durante a seps.



Imagens representativas e quantificação da intensidade relativa de fluorescência do PVAT de aorta (A e C) e artéria mesentérica superior (B e D). Como controle da detecção da S-nitrosilação, um grupo foi incubado sem a presença do ascorbato (Asc-). Aumento de 20x. A barra branca no canto inferior direito é equivalente a 100 μ m. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; n = 5. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni; *p < 0,05 comparado com o grupo *naive*.

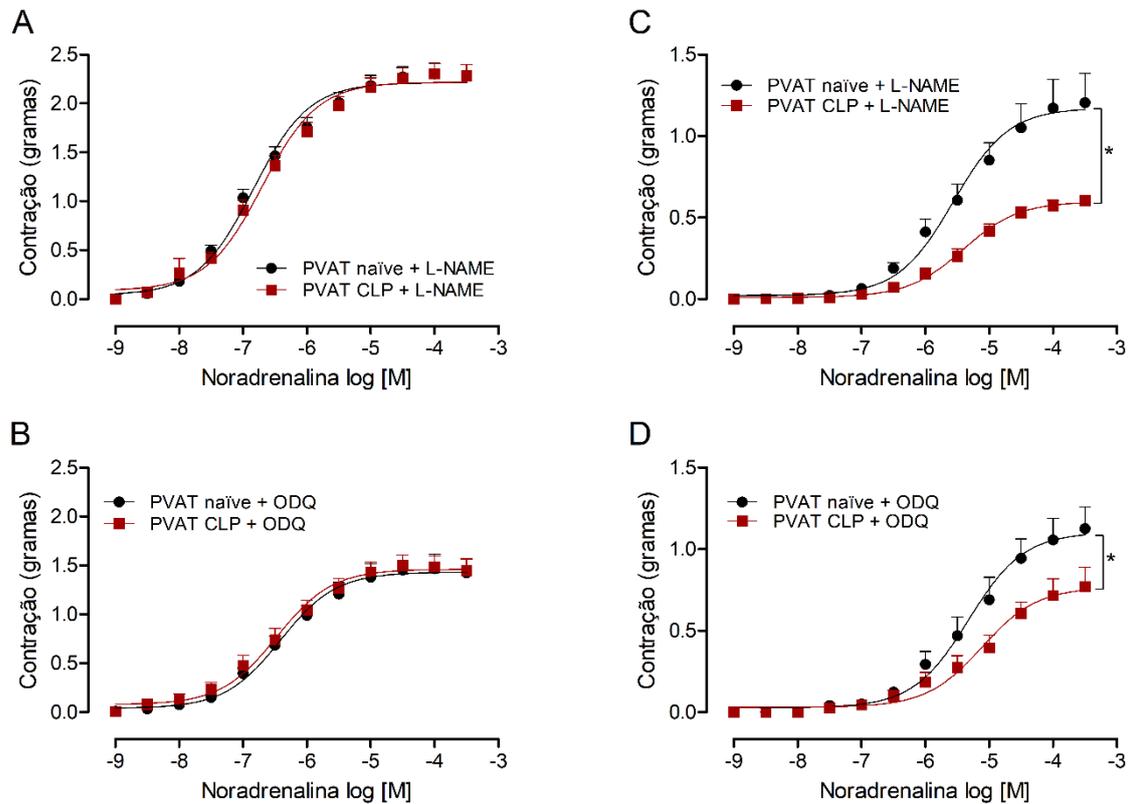
6.1.7. Envolvimento da produção de NO no efeito anticontrátil do PVAT da aorta durante o choque séptico

Levando em consideração o aumento na produção de NO, o aumento da expressão de NOS-1 e NOS-3, além do aumento da nitrosilação de proteínas no PVAT da aorta, avaliamos a contração deste vaso após incubação prévia do PVAT com inibidor não seletivo da produção de NO, o L-NAME (200 μ M), ou com inibidor da GCs, enzima alvo da ação do NO (ODQ, 10 μ M).

Na aorta, a inibição da via do NO, seja na sua síntese (Figura 14A) ou na sua via de ação (Figura 14B), foi capaz de reverter por completo o efeito anticontrátil aumentado do PVAT

proveniente de vasos CLP. Por outro lado, na artéria mesentérica superior, onde não encontramos aumento da produção de NO nem da nitrosilação de proteínas no PVAT durante a sepse, inibir a via do NO no PVAT não causou mudança significativa em sua ação anticontrátil aumentada (Figura 14C e D). Os valores de $-\log CE_{50}$ e resposta máxima estão mostrados na Tabela 3.

Figura 14. Inibição da via do NO no efeito anticontrátil do PVAT removido de animais sépticos



O PVAT foi removido de aortas (painéis A e B) e artérias mesentéricas superiores (C e D) de animais saudáveis ou sépticos e incubados com L-NAME (200 μ M; painéis A e C) ou com ODQ (10 μ M; painéis B e D) por 30 minutos, lavados e adicionados às cubas contendo os vasos de animais saudáveis. Após 20 minutos, e ainda na presença do PVAT na cuba, foram feitas as curvas concentração-resposta para a noradrenalina. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; n = 8. ANOVA de duas vias, *p < 0,05.

Tabela 3. Valores de potência (-log CE₅₀) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior de animais saudáveis na presença de PVAT de animais saudáveis ou sépticos na ausência ou na presença de inibidores da via do NO.

Aorta				
Inibidor	PVAT <i>Naïve</i>		PVAT CLP	
	-log CE ₅₀	Rmax	-log CE ₅₀	Rmax
L-NAME (200 µM)	6.8 ± 0.02	2.2 ± 0.01	6.7 ± 0.02*	2.2 ± 0.01
ODQ (10 µM)	6.4 ± 0.04	1.4 ± 0.02	6.5 ± 0.04	1.4 ± 0.01
Artéria mesentérica superior				
Inibidor	PVAT <i>Naïve</i>		PVAT CLP	
	-log CE ₅₀	Rmax	-log CE ₅₀	Rmax
L-NAME (200µM)	5.6 ± 0.04	1.2 ± 0.02	5.4 ± 0.03*	0.60 ± 0.01 [#]
ODQ (10 µM)	5.3 ± 0.04	1.1 ± 0.02	5.1 ± 0.04*	0.80 ± 0.02 [#]

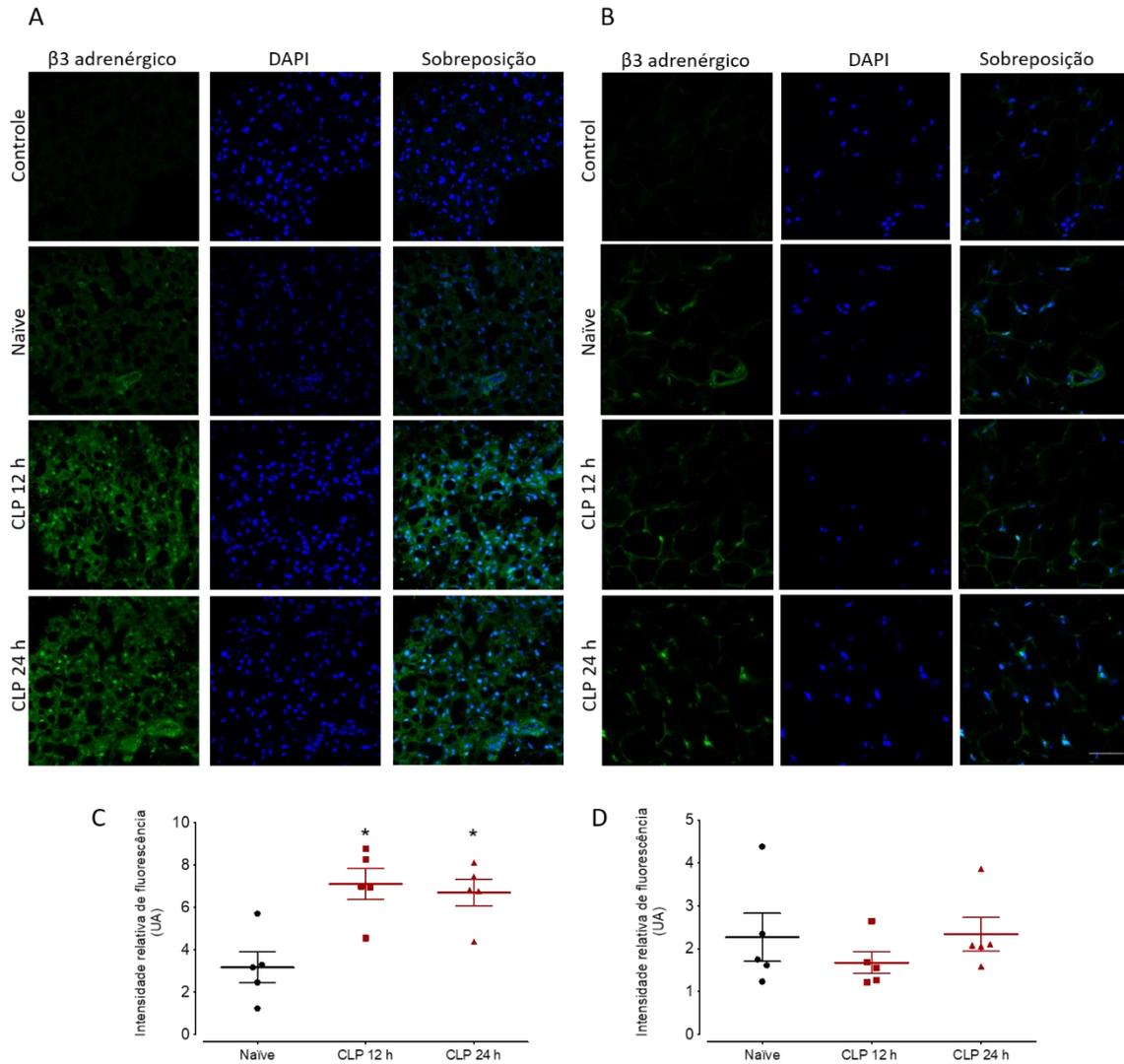
Os dados são expressos como a média ± erro padrão da média; n=8. Teste t de Student, p < 0,05: * -log CE₅₀ PVAT(+) vs. PVAT(-); # Rmax PVAT(+) vs. PVAT(-) .

6.1.8. Envolvimento dos receptores β3-adrenérgicos no efeito anticontrátil do PVAT durante o desenvolvimento do quadro séptico

Tendo em vista i) que o PVAT apresenta um sistema adrenérgico completo, expressando, principalmente, receptores β3-adrenérgicos e ii) que durante a sepse há uma ativação excessiva e sistêmica do sistema adrenérgico, avaliamos a expressão dos receptores β3-adrenérgicos durante a progressão da sepse.

Encontramos um aumento da expressão de receptores β3-adrenérgicos no PVAT da aorta nos tempos de 12 h e 24 h após a indução da sepse (Figura 15A e C). Nenhuma alteração na expressão destes receptores foi vista no PVAT da artéria mesentérica superior (Figura 15B e D).

Figura 15. Imunofluorescência dos receptores β 3-adrenérgicos no PVAT de aorta e artéria mesentérica superior durante a sepse.

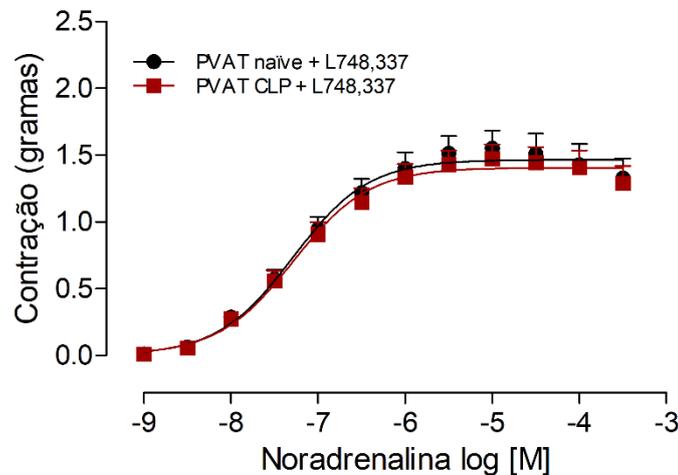


PVAT de aorta (grupo A) e artéria mesentérica superior (grupo B). Os Painéis C e D mostram a análise quantitativa da intensidade da fluorescência para o PVAT da aorta e artéria mesentérica superior, respectivamente (unidades arbitrárias). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal com aumento de 63 vezes; a barra branca na imagem inferior direita corresponde à 50 μ m. Dados estão expressos como média \pm erro padrão da média; n = 5. ANOVA de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni; *p < 0,05 comparado com o grupo *Naive*.

Já que os receptores β 3-adrenérgicos aparecem regulados positivamente durante a progressão da sepse, avaliamos se sua ativação estaria envolvida no aumento da ação anticontrátil do PVAT no choque séptico.

O antagonismo de receptores β 3-adrenérgicos no PVAT, pelo antagonista seletivo 748,333 (10 μ M), reverteu o efeito anticontrátil de vasos incubados com PVAT CLP quando comparados com PVAT *naive* (Figura 16 e Tabela 4).

Figura 16. Efeito do antagonista do receptor β -3 adrenérgico sobre o PVAT de animais saudáveis e sépticos na contração de aorta de animais saudáveis.



O PVAT foi removido de aortas de animais saudáveis ou sépticos e incubados com L 748,333 (10 μ M) por 30 minutos, lavados e adicionados às cubas contendo os vasos de animais saudáveis. Após 20 minutos, e ainda na presença do PVAT na cuba, foram feitas as curvas concentração-resposta para a noradrenalina. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; n = 8. ANOVA de duas vias, *p < 0,05.

Tabela 4. Valores de potência (-log CE₅₀) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior de animais saudáveis na presença de PVAT de animais saudáveis ou sépticos na presença de antagonista de receptores β 3-adrenérgicos.

Inibidor	Aorta torácica			
	PVAT Naíve		PVAT CLP	
	-log CE ₅₀	Rmax	-log CE ₅₀	Rmax
L748,337 (10 μ M)	7.3 \pm 0.04	1.5 \pm 0.01	7.3 \pm 0.04	1.4 \pm 0.01

Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média; n=8. Teste t de Student, p < 0,05: * -log CE₅₀ PVAT(+) vs. PVAT(-); # Rmax PVAT(+) vs. PVAT(-).

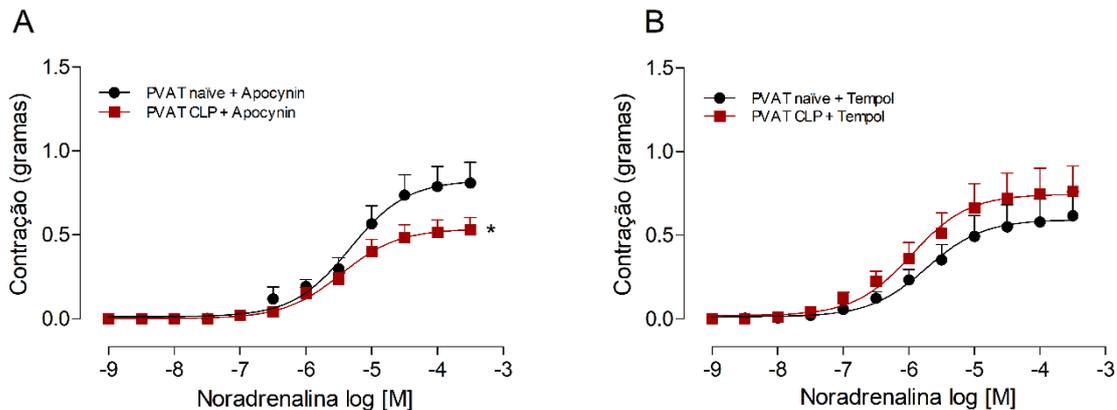
6.1.9. Envolvimento da produção de ROS no efeito anticontrátil do PVAT da artéria mesentérica superior durante o choque séptico

Os resultados encontrados até então apontaram para uma diferença nos mecanismos pelos quais o PVAT exerce sua ação sobre aorta e artéria mesentérica superior na sepse. Na aorta, a via do NO parece ser importante, já na mesentérica superior, esta via não parece ser muito relevante.

Investigamos se a ação anticontrátil do PVAT da mesentérica superior poderia estar sendo mediada pela produção de ROS. Para isso, incubamos o PVAT de animais *naíve* ou CLP com inibidor da NADPH oxidase (apocinina, 1 mM) ou com *scavenger* de ROS (tempol, 10 μ M). Apesar da inibição da enzima produtora de ROS não alterar a diferença entre a contração de vasos incubados com PVAT *naíve* e CLP (Figura 17A), o tempol foi capaz de reverter

completamente a contração aumenta dos vasos PVAT CLP (Figura 17B). Os valores referentes ao $-\log CE_{50}$ e resposta máxima podem ser encontrados na Tabela 5.

Figura 17. Efeito da apocinina e tempol sobre o PVAT de animais saudáveis e sépticos na contração de artéria mesentérica superior de animais saudáveis.



O PVAT foi removido de artérias mesentéricas superiores de animais saudáveis ou sépticos e incubados com apocinina (1 mM; painel A) ou tempol (10 μ M; painel B) por 30 minutos, lavados e adicionados às cubas contendo os vasos de animais saudáveis. Após 20 minutos, e ainda na presença do PVAT na cuba, foram feitas as curvas concentração-resposta para a noradrenalina. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; n = 8. ANOVA de duas vias, *p < 0,05.

Tabela 5. Valores de potência ($-\log CE_{50}$) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em aorta torácica e artéria mesentérica superior de animais saudáveis na presença de PVAT de animais saudáveis ou sépticos na presença de compostos que interferem via de ROS.

Inibidor	Artéria mesentérica superior			
	PVAT Naïve		PVAT CLP	
	$-\log CE_{50}$	Rmax	$-\log CE_{50}$	Rmax
Apocinina (1 mM)	5.4 \pm 0.06	0.83 \pm 0.02	5.7 \pm 0.05	0.60 \pm 0.01 [#]
Tempol (300 μ M)	5.7 \pm 0.07	0.6 \pm 0.02	6.0 \pm 0.07*	0.75 \pm 0.02 [#]

Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média; n=8. Teste t de Student, p < 0,05: * $-\log CE_{50}$ PVAT(+) vs. PVAT(-); # Rmax PVAT(+) vs. PVAT(-) .

6.2. PARTE II

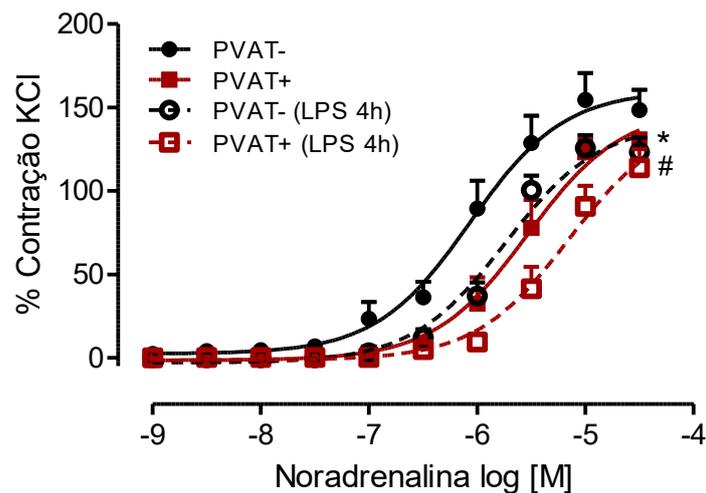
Nesta sessão serão apresentados os resultados encontrados durante o período de Doutorado Sanduíche no Exterior da CAPES (PDSE), desenvolvido entre o período de setembro de 2018 a fevereiro de 2019 na University of Manchester sob a orientação do Professor Doutor Anthony Heagerty.

Nessa etapa do projeto, investigamos a influência do PVAT em microvasos. Para tal, utilizamos como ferramenta experimental a incubação dos vasos PVAT+ e PVAT- ou do PVAT isolado com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) na cuba de órgão isolado. Como os vasos de

resistência são os principais elementos mantenedores da resistência vascular periférica (revisado por Johnson, 2008), o objetivo nessa etapa do trabalho foi avaliar se a presença do PVAT, após a incubação com LPS, causaria o mesmo efeito danoso visto nos vasos de maior calibre durante a sepse.

Inicialmente, incubamos artérias mesentéricas de segunda ordem (com menos de 200 μm de diâmetro) PVAT+ e PVAT- com LPS (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 4 horas e avaliamos a contração para a noradrenalina. Observamos que 1) a ação anticontrátil do PVAT encontra-se presente também nos vasos de resistência (Figura 18, símbolos fechados); 2) que a incubação com LPS, mesmo que *ex vitro* e por tempo relativamente curto, induz hiporreatividade nestes vasos e 3) que a ação do PVAT se mantém ativa nos vasos “endotoxêmicos” (Figura 18, símbolos abertos).

Figura 18. Efeito do PVAT na contração para a noradrenalina de vasos saudáveis ou incubados com lipopolissacarídeo.



Artérias mesentéricas de segunda ordem (sem endotélio) foram coletadas tendo o seu PVAT mantido intacto (PVAT+) ou removido (PVAT-). As linhas tracejadas representam os vasos que foram incubados com LPS (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 4h antes da realização da curva com noradrenalina. Os vasos tiveram o endotélio removido. Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; $n = 8$. ANOVA de duas vias, * $p < 0,05$ PVAT+ vs. PVAT-; # $p < 0,05$ PVAT+ (LPS 4 h) vs. PVAT- (LPS 24 h).

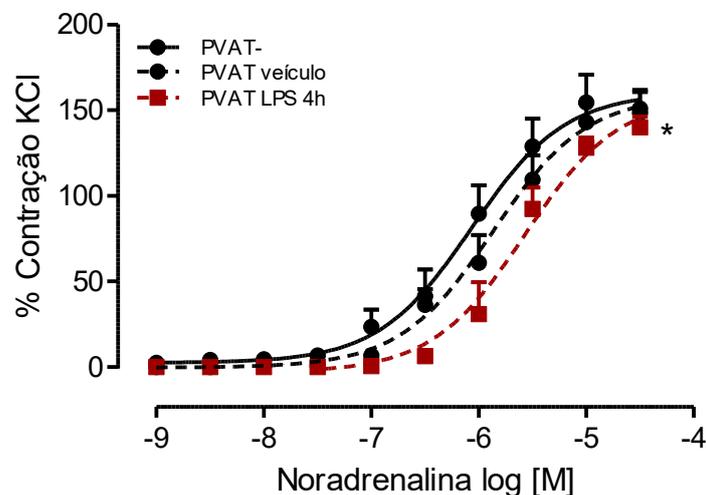
Tabela 6. Valores de potência ($-\log CE_{50}$) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em artéria mesentérica de segunda ordem PVAT+ e PVAT- incubados com veículo ou LPS.

Artéria mesentérica de segunda ordem		
	Rmax (g)	$-\log EC_{50}$
-		
PVAT(-)	160,3 ± 3	6,1 ± 0,04
PVAT(+)	149,2 ± 3,3 [#]	5,5 ± 0,04*
LPS (15mg/mL)		
PVAT(-)	140,6 ± 2,1	5,7 ± 0,03
PVAT(+)	143,5 ± 4,6	5,1 ± 0,04*

Os dados são expressos como a média ± erro padrão da média; n=8. Teste t de Student, $p < 0,05$: * $-\log CE_{50}$ PVAT(+) vs. PVAT(-); # Rmax PVAT(+) vs. PVAT(-).

Em seguida, avaliamos se a incubação apenas do PVAT com LPS (15 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas seria capaz de causar alguma alteração na contração destes vasos. Como podemos observar na Figura 19 (e Tabela 7), a contração dos vasos com PVAT LPS é reduzida, quando comparada a dos vasos PVAT veículo.

Figura 19. Efeito do PVAT na contração para a noradrenalina de vasos saudáveis após a incubação do PVAT com lipopolissacarídeo.



Artérias mesentéricas de segunda ordem (sem endotélio) foram coletadas tendo o seu PVAT removido. As linhas tracejadas representam os vasos saudáveis que tiveram o PVAT incubado com solução nutritiva ou com LPS (15 $\mu\text{g/mL}$) por 4 h. Após a incubação, o PVAT foi lavado 3x, adicionado à cuba 20 min antes e mantidos durante a realização da curva de contração para a noradrenalina. Os vasos tiveram o endotélio removido. Os dados são expressos como média ± erro padrão da média; n = 8. ANOVA de duas vias, * $p < 0,05$ PVAT veículo vs. PVAT LPS.

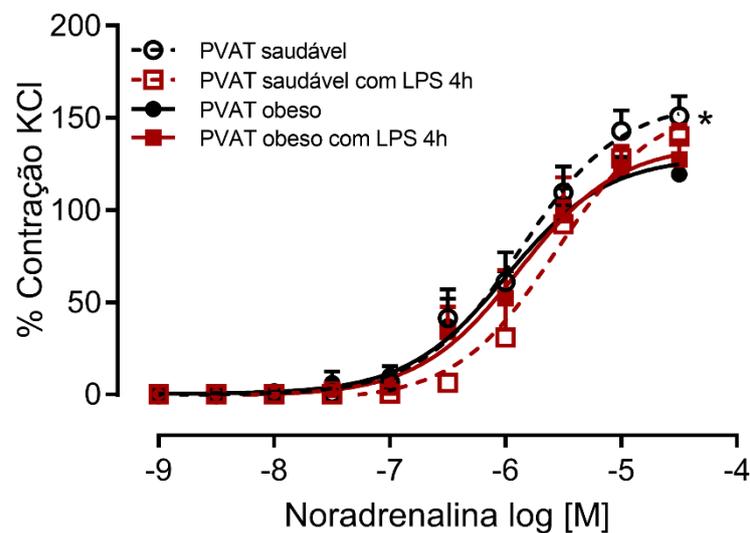
Tabela 7. Valores de potência ($-\log CE_{50}$) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em artéria mesentérica de segunda ordem de animais saudáveis na presença de PVAT incubado com veículo ou com LPS.

Artéria mesentérica superior		
	$-\log CE_{50}$	Rmax
PVAT -	6.1 ± 0.1	160.3 ± 8.4
PVAT veículo	5.9 ± 0.09	160.8 ± 7.9
PVAT LPS 4h	$5.6 \pm 0.08^{*}\#$	$146.9 \pm 7.5^{*}\#$

Os dados são expressos como a média \pm erro padrão da média; n=9. Anova de uma via, seguida de pós hoc de Bonferroni; $p < 0,05$: * $-\log CE_{50}$ PVAT LPS 4h vs. PVAT-; # PVAT LPS 4h vs. PVAT veículo.

Levando em consideração que há perda do efeito anticontrátil do PVAT em alguns modelos de obesidade (Ketonen *et al.*, 2010), incubamos o PVAT de camundongos obesos com LPS (15 $\mu\text{g/mL}$). Avaliamos, então, se o LPS seria capaz de reduzir a contração destes vasos da mesma maneira que vimos nos vasos de animais saudáveis. A Figura 20 (e Tabela 8) nos mostra que o LPS não foi capaz de alterar a contração dos vasos de camundongos obesos nestas condições.

Figura 20. Efeito do PVAT na contração para a noradrenalina de vasos de camundongos obesos após a incubação do PVAT com lipopolissacarídeo.



Artérias mesentéricas de segunda ordem (sem endotélio) foram coletadas de animais obesos tendo o seu PVAT removido. O PVAT foi incubado com solução nutritiva ou com LPS (15 $\mu\text{g/mL}$) por 4 h. Após a incubação, o PVAT foi lavado 3x, adicionado à cuba 20 min antes e mantidos durante a realização da curva de contração para a noradrenalina. Os vasos tiveram o endotélio removido. As linhas tracejadas indicam os animais controle (saudáveis). Os dados são expressos como média \pm erro padrão da média; n = 6; ANOVA de duas vias; * $p < 0,05$ PVAT saudável vs. PVAT saudável com LPS.

Tabela 8. Valores de potência (-log CE₅₀) e resposta máxima (Rmax) da contração induzida pela noradrenalina em artéria mesentérica de segunda ordem de animais obesos na presença de PVAT incubado com veículo ou com LPS.

Artéria mesentérica superior		
	-log CE50	Rmax
PVAT obeso veículo	5.9 ± 0.08	136,7 ± 5.9
PVAT obeso LPS 4h	5.8 ± 0.1	145,6 ± 9.3

Os dados são expressos como a média ± erro padrão da média; n=7. Teste t de Student, p < 0,05.

7. DISCUSSÃO

A sepse é uma condição complexa. Trata-se de um processo inflamatório sistêmico gerado por uma infecção, que promove alterações em níveis teciduais, celulares e moleculares em diferentes sistemas do organismo. Assim, o entendimento de sua fisiopatologia e a translação de dados de estudos com animais para a clínica se mostram complicados (revisado por Gotts e Matthay, 2016). O modelo experimental de ligadura e perfuração do ceco foi escolhido neste trabalho por ser considerado o modelo que melhor representa na pesquisa básica as alterações que ocorrem na sepse clínica (Rittirsch *et al.*, 2009). Por ser um modelo invasivo, os animais submetidos ao CLP apresentam sinais de desconforto e dor, entre eles piloereção, baixa mobilidade, cifose vertebral e dispneia (Sotocinal *et al.*, 2011). Visando minimizar a dor, os animais foram tratados com tramadol, um analgésico opióide, derivado sintético da codeína, que atua no sistema nervoso central inibindo a transmissão da dor pela inibição da recaptção neuronal de noradrenalina e aumento da liberação de serotonina (Minami *et al.*, 2015); este analgésico não apresenta efeitos imunossupressores (Sacerdote, 2006; Hugunin *et al.*, 2010). Apesar de ser amplamente utilizado, o modelo de CLP apresenta uma grande variabilidade, sendo importante a sua padronização para que não haja heterogeneidade na intensidade da infecção gerada. Para tal, analisamos a mortalidade de um grupo de animais por 96 h (4 dias) e, assim, padronizamos a sobrevivência dos animais em 50% 48 horas após a indução da sepse. Ao final das 96 h, a sobrevivência não passou dos 20%.

A fim de definir o melhor controle experimental, avaliamos a concentração dos metabólitos de NO (NOx) no plasma de animais *naïve*, Sham e sépticos. Esta relação entre o aumento dos metabólitos de NO no plasma e a sepse/choque séptico já foi demonstrada, inclusive na clínica (Mitaka *et al.*, 2003). Em nossa análise, não encontramos diferença nos níveis de NOx do plasma de animais falso-operados quando comparados ao plasma de animais saudáveis. Já nos animais sépticos, como esperado, este índice estava significativamente aumentado. Ainda, com o mesmo propósito de selecionar o controle experimental, realizamos curvas concentração-resposta para a noradrenalina em vasos de animais *naïve* e Sham PVAT+ ou PVAT-. Também não encontramos diferenças no perfil contrátil entre os grupos. Considerando estes resultados, optamos por seguir o trabalho utilizando animais *naïve* como controle experimental, já que estes animais não passam por protocolo cirúrgico, minimizando assim o sofrimento animal. É importante destacar que, sempre que possível, aorta e mesentérica superior e seus respectivos PVAT foram coletados do mesmo animal para a redução do número de animais utilizados no desenvolvimento deste trabalho.

Depois da descoberta de Soltis e Cassis (1991), que mostrou que o PVAT apresenta ação parácrina sobre a aorta de animais experimentais, outros estudos foram desenvolvidos para explorar essa ação em diferentes vasos (Lu *et al.*, 2011; Restini *et al.*, 2018), em outros animais (Payne *et al.*, 2010; Owen *et al.*, 2013) e até mesmo em humanos (Payne *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2018), a fim de confirmar a ação anticontrátil deste tecido em situação fisiológica e, também, investigar suas possíveis alterações em doenças cardiovasculares. Na fisiopatologia da hipertensão, por exemplo, já foi relatado que a ação anticontrátil do PVAT se encontra atenuada, o que pode ser explicado por mudanças morfológicas e no perfil de liberação de adipocinas pelo tecido (Gálvez *et al.*, 2006). Em animais SHR os níveis de leptina estão mais baixos, com consequente diminuição na produção de NO, provavelmente por uma menor ativação de NOS-3 (Gálvez-Prieto *et al.*, 2012). Já se observou que em animais hipertensos, há redução da produção de Ang (1-7) e, por outro lado, um aumento de Ang II (Lee *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2011). Na aterosclerose, estudo utilizando coronárias e aortas (principais vasos a desenvolver placas ateroscleróticas) obtidas em autópsia, mostrou uma correlação positiva entre a produção de adipocinas pró-inflamatórias no PVAT e a aterosclerose e, entre estas adipocinas, estão a visfatina e quimerina. O mesmo grupo também mostrou que há uma relação inversa entre aterosclerose e a produção de adiponectina, corroborando assim sobre a possível contribuição da gordura perivascular na manutenção da aterosclerose (Spiroglou *et al.*, 2010). Estes achados obtidos através de material humano foram também vistos em estudos experimentais mais recentes, que detectaram um aumento de genes/proteínas associados ao dano oxidativo e à inflamação, como de interleucina-8 e MCP-1 no PVAT de animais submetidos à modelos de inflamação vascular (Manka *et al.*, 2014; Quesada *et al.*, 2018). Também, na obesidade, se sabe que o efeito anticontrátil do PVAT se encontra abolido ou significativamente reduzido em diferentes modelos da doença (Marchesi *et al.*, 2009; Ketonen *et al.*, 2010; Agabiti-Rosei *et al.*, 2014). Neste caso, o eixo hipóxia-inflamação-estresse oxidativo favorece a produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias, como leptina e TNF- α e a redução de mediadores anti-inflamatórios, como adiponectina e IL-10, agravando a disfunção endotelial e resultando na perda ou atenuação da ação anticontrátil do PVAT (Xia & Li, 2017).

Apesar da sepse apresentar importantes alterações vasculares, seu efeito global difere das demais doenças vasculares citadas acima, no sentido de haver maior produção de mediadores da vasodilatação, culminando não em hipertensão, mas, pelo contrário, em uma grave hipotensão (Matsuda e Hattori, 2007). Dessa maneira, as alterações do PVAT muito

provavelmente se mostram diferentes ou até opostas às que ocorrem em doenças como a hipertensão ou aterosclerose.

No final de 2019, Awata e colegas mostraram que na sepse experimental o PVAT da aorta apresenta aumento de sua ação anticontrátil em resposta à fenilefrina, favorecendo a hiporreatividade vascular característica desta condição. Nossos experimentos confirmam tal achado. Em nossas condições experimentais, também encontramos um aumento da ação anticontrátil do PVAT sobre aorta torácica e, ainda, sobre a artéria mesentérica superior de animais sépticos. Avaliamos a contração destes vasos na fase tardia da sepse (24 horas após a sua indução), pois neste momento os animais se encontravam em choque séptico, ou seja, a hiporreatividade vascular estava instalada, o que pode ser visto claramente em nossos resultados, onde aorta e artéria mesentérica superior apresentam importante redução da resposta máxima ao agente vasoconstritor. Em nosso trabalho utilizamos a noradrenalina como agente vasoconstritor, pois este ainda é o fármaco de escolha no tratamento da hipotensão na sepse clínica (Scheeren *et al.*, 2019).

Os dois vasos alvos de estudo deste trabalho possuem diferentes tipos de tecido perivascular. Enquanto a aorta apresenta PVAT do tipo marrom, a mesentérica superior é formada pelo PVAT do tipo branco (Brown *et al.*, 2014). Além disso, por apresentarem localização e calibre diferentes, os mecanismos de manutenção da contração não são exatamente os mesmos, visto que há diferenças na distribuição de receptores α e β adrenérgicos e de receptores de Ang II ao longo da rede arterial (Chen *et al.*, 1995; Stassen *et al.*, 1997; Chruscinski *et al.*, 2010). Levando em consideração estas informações, confirmamos dados da literatura sobre a ação anticontrátil do PVAT na aorta torácica em situação fisiológica (Soltis e Cassis, 1991). Porém, não encontramos esta mesma ação sobre a artéria mesentérica superior de ratas saudáveis, o que se assemelha ao achado de Victorio e colegas (2016), que mostraram não haver grande influência do PVAT na contração de aorta abdominal. Assim como a mesentérica superior, a aorta abdominal apresenta PVAT do tipo branco e nesta porção do vaso, o grupo não encontrou diferença na contração para a fenilefrina entre os grupos PVAT+ e PVAT-. Por outro lado, como mencionado anteriormente, no choque séptico encontramos uma redução na contração vascular para a noradrenalina *em ambos os vasos PVAT+*, que pode ser confirmada pela diferença no ΔAUC , apontando para uma contribuição deste tecido também na mesentérica superior durante a sepse.

Apesar da menor resposta contrátil apresentada pelos vasos sépticos PVAT+, sabemos que profundas alterações endoteliais bem como na musculatura lisa vascular são causadas pela sepse (Hollenberg e Cunnion, 1994; Matsuda e Hattori, 2007). Para garantirmos que a diferença

na contração seria, realmente, proveniente de alterações locais no PVAT dos animais sépticos, lançamos mão de um protocolo experimental “cruzado”, que utilizou unicamente vasos saudáveis no sistema de órgão isolado, mas os PVAT adicionados à cuba eram provenientes de animais saudáveis ou sépticos. Neste esquema experimental, encontramos uma redução significativa na contração dos vasos saudáveis que foram incubados com PVAT de animais sépticos quando comparada àqueles vasos receptores do PVAT *naïve*, corroborando com o resultado do experimento anterior e mostrando que há alteração na produção de mediadores que são provenientes do PVAT durante a sepse. Este protocolo “cruzado” foi escolhido para dar continuidade aos experimentos funcionais da Parte I deste trabalho.

Como já mencionado na Introdução, o PVAT tem importantes efeitos parácrinos, que ocorrem pela liberação de diversos mediadores, entre eles ROS e NO, agindo sobre o tônus vascular (Gao *et al.*, 2006; Xia *et al.*, 2016). A produção de NO e de ROS parece estar aumentada no PVAT da aorta durante a sepse experimental e este aumento pode estar envolvido na sua maior ação anticontrátil (Awata *et al.*, 2019). Através de experimentos utilizando sondas fluorescentes, confirmamos o aumento de NO no PVAT da aorta durante a progressão da sepse, nos tempos de 12 h e 24 h após sua indução, enquanto a produção de ROS se mostrou transitória neste vaso. De maneira inesperada, a produção de NO pelo PVAT da mesentérica superior não aumentou nos tempos avaliados. Neste vaso, encontramos apenas aumento na produção de ROS na fase tardia da sepse.

Uma possível explicação para o aumento de NO no PVAT da aorta seria o aumento da expressão/atividade das enzimas NO sintases e o seu desacoplamento poderia explicar o aumento de ROS na mesentérica, visto que esta artéria se encontra na região peritoneal, justamente onde é feita a indução cirúrgica da sepse e, portanto, em uma área de intensa inflamação local. Diante destas possibilidades e por meio de experimentos de imunofluorescência, avaliamos a expressão das 3 diferentes isoformas da NOS no PVAT de ambos os vasos. Houve aumento da isoforma neuronal, tanto no PVAT da aorta quanto da mesentérica superior e apenas um aumento transitório da NOS-3 no PVAT da aorta. De maneira muito interessante e inesperada, não vimos aumento significativo da NOS-2, a isoforma induzida da enzima, nos tempos avaliados em nenhum dos PVAT. Importante ressaltar que confirmamos a efetividade do anticorpo utilizado para a imunofluorescência da NOS-2 contra macrófagos peritoneais de camundongos.

A expressão gênica das três isoformas das NO sintases já foi previamente analisada no PVAT (Xia *et al.*, 2016). É sabido que pode haver variação da expressão proteica desta enzima dependendo da localização e, ainda, que ocorrem variações na sua atividade em situação

patológica, como na obesidade, onde há desacoplamento de NOS-3, com consequente redução da produção de NO (Victorio et al., 2016; Xia *et al.*, 2016). Para avaliar se a atividade das NOS estaria aumentada no PVAT de aorta e mesentérica superior durante o choque séptico, incubamos o PVAT de animais saudáveis e sépticos com L-NAME (inibidor não seletivo das NOS). Após a incubação, adicionamos os PVAT às cubas de órgão isolado contendo vasos saudáveis e, então, procedemos a curva cumulativa para a noradrenalina. Na aorta, a inibição da NOS reverteu completamente o maior efeito anticontrátil causado pelo PVAT de animais sépticos. Mas, por outro lado, na mesentérica superior o PVAT séptico continuou induzindo uma contração significativamente menor do que o PVAT saudável. Este resultado apontou para diferenças nos mecanismos de ação entre PVAT de aorta e de artéria mesentérica superior na contração vascular durante a sepse.

Somado a este resultado e a fim de comprovar o envolvimento da via do NO na aorta e o não envolvimento da mesma via na mesentérica superior, avaliamos a ação do NO sobre alguns dos seus principais alvos. O alvo clássico da ação do NO é a GCs, sua ativação induz a síntese de GMPc que, por sua vez, irá estimular a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), dando início à uma cascata de sinalização através de fosforilação proteica (revisado por Cary *et al.*, 2006). Na sepse, além do aumento da produção de NO, já foi demonstrado que há também aumento da expressão da GCs na aorta e sua inibição na fase tardia da sepse melhora a hiporreatividade vascular, reduzindo a mortalidade da sepse experimental (Fernandes *et al.*, 2009). Em experimentos de órgão isolado, mostramos que a inibição da GCs no PVAT de aorta também foi capaz de anular a diferença contrátil entre vasos receptores de PVAT séptico e PVAT saudável.

Outro alvo conhecido da ação do NO se dá sobre proteínas, através da reação reversível com sulfidrilas (tióis) de resíduos de cisteínas, levando à formação de S-nitrosotióis (Hess *et al.*, 2005). Dependendo do sítio de S-nitrosilação, pode haver alterações conformacionais e funcionais na proteína alvo, estando esta interação relacionada à diversos processos regulatórios (Anand e Stamler, 2012). Estudo prévio do nosso laboratório mostrou que há um aumento na S-nitrosilação de proteínas da aorta de animais sépticos e que proteínas importantes na manutenção do tônus vascular, como a BK_{Ca} de alta condutância, podem estar altamente nitrosiladas nesta condição (Benedet *et al.*, 2018). A S-nitrosilação de proteínas aumenta o tempo de meia-vida do NO em minutos, horas ou até mesmo dias nos sistemas biológicos, funcionando como reservatório de NO (Stamler *et al.*, 1992; Hess *et al.*, 2005). Avaliamos, então, se a S-nitrosilação de proteínas no PVAT de aorta e artéria mesentérica superior poderia estar funcionando como reserva de NO durante a progressão da sepse. Nossos resultados

mostram que há aumento da S-nitrosilação no PVAT da aorta, porém, na mesentérica superior, assim como não houve influência da inibição de GCs, também não encontramos alteração no perfil de S-nitrosilação deste PVAT no curso da sepse.

Porém, de onde vem o estímulo para o aumento da produção de NO visto no PVAT da aorta? Sabe-se que há inervação simpática no PVAT tanto de aorta quanto de artérias mesentéricas, mas, esta inervação é mais significativa no PVAT do tipo branco do que no PVAT marrom (Bullock e Dally, 2014; Ayala-Lopez *et al.*, 2014). Por outro lado, a parte da inervação simpática, nos últimos anos tem sido mostrado que o PVAT apresenta um sistema próprio de produção e armazenamento de catecolaminas (Ayala-Lopez *et al.*, 2015; Saxton *et al.*, 2018; Ahmad *et al.*, 2019). No PVAT, encontram-se expressos receptores α e β adrenérgicos, sendo o receptor do tipo β_3 adrenérgico o mais abundante ($\beta_3 > \alpha_2 > \alpha_1$) (Bullock e Dally, 2014). Sua ativação tem sido vista como fundamental para a ação anticontrátil do PVAT. Estudos prévios mostraram que a utilização de agonista β_3 adrenérgico (CL-316243) é capaz de induzir vasodilatação independente de endotélio, mas dependente do PVAT em vasos de resistência e que o estímulo de receptores β_3 adrenérgicos do PVAT induz a liberação de NO, provavelmente mediada pelo aumento da produção de adiponectina (Greenstein *et al.*, 2009; Weston *et al.*, 2013; Saxton *et al.*, 2018; Bussey *et al.*, 2018). No sistema circulatório, receptores β_3 adrenérgicos também são encontrados no coração, onde, em oposição aos efeitos de aumento da força e frequência cardíacas apresentados pelos demais subtipos de receptores β (β_1 e β_2), sua ativação produz efeitos inotrópicos negativos. Sua ativação necessita de maiores concentrações de catecolaminas e sua ação é dependente de NO que, por sua vez, tem sua produção estimulada pelo aumento na expressão e atividade das isoformas constitutivas da NO sintase (Aragón *et al.*, 2011). Nós avaliamos a expressão de receptores β_3 adrenérgicos no PVAT de aorta e mesentérica superior de animais *naïve* e sépticos e pudemos confirmar a sua expressão em ambos os vasos. Mostramos um aumento na expressão de β_3 durante a sepse, mas isso ocorreu apenas no PVAT da aorta, onde vimos também um aumento da produção de NO.

Nos vasos de condutância, os receptores β_3 adrenérgicos estão também expressos no endotélio (Rautureau *et al.*, 2002). Para evitar a interferência dos receptores endoteliais, incubamos os PVAT isolados de animais saudáveis e sépticos com antagonista seletivo de receptor β_3 adrenérgico (L 748,333) e seguimos com o experimento “cruzado”, utilizando apenas aortas de animais saudáveis. A inibição de receptores β_3 adrenérgicos no PVAT reverteu a diferença entre PVAT saudável e séptico na contração da aorta, sugerindo um possível mecanismo para a ação anticontrátil do PVAT aórtico durante a sepse: no choque séptico há disfunção na modulação simpática do sistema circulatório, todavia são encontradas altas

concentrações de catecolaminas circulantes (Annane *et al.*, 1993), esta alta concentração de catecolaminas estaria agindo sobre os receptores β_3 adrenérgicos do PVAT da aorta ativando-os. Sua ativação levaria ao aumento da expressão e atividade de NOS-1, culminando em aumento na produção de NO e agravamento da vasoplegia.

Porém, é sabido que a disfunção simpática da sepse é influenciada pelo aumento da internalização de receptores adrenérgicos, causada justamente pela contínua alta concentração de catecolaminas circulantes (Dal Secco *et al.*, 2010; Burgdorff *et al.*, 2018). Dessa forma, os receptores β_3 adrenérgicos não deveriam estar reduzidos e não mais expressos durante a sepse? Estudos utilizando diferentes tipos celulares, mostram que receptores β_3 adrenérgicos são mais resistentes à dessensibilização do que os outros tipos de receptores adrenérgicos, isso porque este subtipo não apresenta importantes sítios estruturais importantes para a internalização apresentados pelos outros subtipos β (Nantel *et al.*, 1993; Carpéné *et al.*, 1993; Milano *et al.*, 2018). Esses dados sustentam nossos achados e a nossa hipótese de mecanismo anticontrátil do PVAT sobre a aorta durante a sepse experimental.

Na artéria mesentérica superior, o mecanismo parece ser outro. Apesar de não haver aumento na produção de NO no PVAT deste vaso, encontramos aumento da produção de ROS. Contudo, a inibição da NO sintase no PVAT não reduziu o efeito anticontrátil na mesentérica durante a sepse, indicando que o desacoplamento enzimático de NOS não deve ser a fonte de sua produção. Gao e colaboradores (2006) mostraram que há NADPH oxidase expressa e funcional no PVAT de artéria mesentérica e a formação de $O_2^{\cdot-}$ pela NADPH oxidase do PVAT apresenta ação contrátil sobre este vaso em condição fisiológica (Gao *et al.*, 2006). Porém, após produzido, o $O_2^{\cdot-}$ pode ser prontamente convertido por enzimas superóxido dismutases (SOD) à O_2 e H_2O_2 , o último com conhecida ação vasodilatadora (revisado por Liochev e Fridovich, 2007). Além disso, sabe-se que a isoforma 4 da NADPH oxidase (NOX4) produz majoritariamente H_2O_2 e está expressa em adipócitos (Ray *et al.*, 2011). E, ainda, que a interação entre a alta produção de NO e $O_2^{\cdot-}$ leva a formação de $ONOO^-$, uma ROS extremamente reativa e que também apresenta ação vasodilatadora (Ronson *et al.*, 1999). Considerando todas estas informações sobre a produção de ROS pela NADPH oxidase, avaliamos se a sua inibição no PVAT poderia ter influência sobre a contração da artéria mesentérica superior na sepse. Porém, não encontramos nenhuma alteração no perfil de contração após a inibição desta enzima no PVAT.

Até esta fase do trabalho pudemos saber que o aumento de ROS não parece ser proveniente do desacoplamento de NO sintase, nem de NADPH oxidase. Utilizamos então, também em experimento de órgão isolado, um *scavenger* de ROS, para confirmarmos se o

aumento da produção local, mostrada pela sonda fluorescente, teria realmente influência funcional. O uso de tempol como *scavenger* nos confirmou a importância das ROS do PVAT para a vasoplegia da mesentérica superior na sepse, uma vez que a retirada de ROS não só reverteu a ação anticontrátil do PVAT séptico, como também apresentou uma contração maior do que a do vaso contendo PVAT saudável.

A redução da entrega de oxigênio, devido à baixa perfusão tecidual, somada aos excessivos níveis de substâncias inflamatórias formados durante a sepse, levam a importante disfunção mitocondrial. As alterações mitocondriais incluem a redução da produção de ATP e o aumento da produção de ROS pela cadeia respiratória, aumentando a liberação de ROS para o citoplasma da célula (Singer, 2014). A mitocôndria é vista como uma das principais fontes de ROS na sepse, e sua disfunção está associada ao mau prognóstico da doença (Galley, 2011; Zhang *et al.*, 2018). Assim, embora ainda não confirmado, há grande possibilidade de que o aumento de ROS no PVAT durante a sepse seja proveniente da mitocôndria disfuncional.

A próxima etapa do trabalho consistiu na Parte II, onde iniciamos a avaliação do efeito do PVAT em artérias de resistência. Aqui, utilizamos vasos de camundongos incubados com LPS. O LPS é utilizado como modelo experimental para o estudo das alterações vasculares da sepse, pois a injeção deste produto bacteriano causa endotoxemia, condição que apresenta alterações cardiovasculares parecidas com aquelas da sepse, sendo útil para o estudo de mecanismos e vias relacionadas ao desenvolvimento desta condição (Lewis *et al.*, 2016). Outra diferença desta parte do trabalho foi a utilização dos vasos sem o endotélio. Nas etapas anteriores utilizamos vasos com o endotélio intacto, porém, avaliamos agora a possibilidade de uma “conversa” direta entre PVAT e músculo liso vascular. A ação vasodilatadora promovida pelo PVAT e independente de endotélio já foi demonstrada em vasos de resistência na condição fisiológica e em doenças do sistema cardiovascular (Verlohren *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2007; Aghamohammadzadeh *et al.*, 2015). Confirmamos os dados da literatura que mostram que há diferença na resposta contrátil de vasos de resistência saudáveis PVAT+ e PVAT-, já que nosso resultado mostra uma redução significativa na contração de vasos que tiveram o PVAT mantido. A incubação de vasos (contendo ou não PVAT) com LPS durante poucas horas (4 h) já é capaz de causar a redução da resposta máxima para a noradrenalina e, além disso, notamos que a redução da resposta contrátil dos vasos PVAT+ em relação aos PVAT- foi mantida nesta condição.

Da mesma maneira que na Parte I do trabalho, isolamos o PVAT para incubação (neste caso com LPS), para depois o acrescentarmos ao banho de órgãos, garantindo que as possíveis alterações seriam provenientes de algum fator proveniente do PVAT. Utilizando esta estratégia,

também encontramos uma redução na resposta dos vasos que receberam o PVAT incubado com LPS.

Levando em consideração nossos achados sobre a expressão e atividade das enzimas NOS no PVAT durante a sepse, este aumento da ação anticontrátil com a incubação do PVAT com LPS, pode estar relacionada com um aumento da expressão e/ou atividade das isoformas constitutivas, principalmente da NOS-1. Ao encontro desta hipótese vem a informação sobre a importância do NO proveniente do PVAT em vasos de resistência, já bem descrita na literatura (Weston *et al.*, 2013; Aghamohammadzadeh *et al.*, 2015). Além disso, trabalho anterior do laboratório mostra que há aumento da atividade de NOS-1 logo após a injeção de LPS em ratos e que esta isoforma age como um gatilho para a resposta inflamatória sistêmica, sendo importante para a indução posterior da isoforma induzida (Duma *et al.*, 2011). Outros possíveis mediadores para esta ação seriam o H₂O₂ e o H₂S, conhecidos por suas ações independentes do endotélio e PVAT-dependente sobre a vasodilatação (Gao *et al.*, 2007; Fang *et al.*, 2009).

A presença de comorbidades, como doença renal crônica e diabetes, contribuem para o desenvolvimento e para o mau prognóstico da sepse (Hotchkiss *et al.*, 2016). No entanto, uma comorbidade se apresenta como paradoxal no que diz respeito ao prognóstico desta condição. O termo “paradoxo da obesidade” tem sido usado para descrever o fenômeno de proteção na mortalidade de pacientes obesos com sepse quando comparados com pacientes magros (Yeung e Eikermann, 2017). Esta proteção relacionada à obesidade ainda é bastante discutida, sendo tomada por alguns autores como ambígua, já que alguns estudos utilizando animais de experimentação trazem resultados que refutam este paradoxo (revisado por Mittwede *et al.*, 2016). Porém, um grande estudo coorte publicado em 2019, considerando 55.038 pacientes sépticos adultos, confirma que há um menor índice de mortalidade de pacientes com sobrepeso e obesos por sepse, do que daqueles pacientes com índice de peso normal (Pepper *et al.*, 2019). O aumento de leptina plasmática e o fenótipo da obesidade (considerando o efeito protetor do BAT) são indicados como possíveis mediadores, porém ainda não se sabe qual é o mecanismo que proporciona tal efeito protetor (Crouser *et al.*, 2019).

Sabe-se que o efeito anticontrátil do PVAT se encontra completamente abolido em modelos de obesidade induzida por HFD (do inglês *high fat diet*) e modelo genético *New Zealand* (NZO), e significativamente reduzido em modelo genético *ob/ob* (Marchesi *et al.*, 2010; Ketonen *et al.*, 2010; Agabiti-Rosei *et al.*, 2014). Algumas alterações locais ajudam a explicar essa mudança na ação do PVAT sobre a contração vascular na obesidade. O tamanho e a massa dos adipócitos aumentados, além da redução na densidade e formação de capilares, proporcionam a formação de um ambiente hipóxico (Marchesi *et al.*, 2010). A hipóxia, por sua

vez, favorece a produção e liberação de citocinas, quimiocinas (MIP-1 α e MCP-1) e leptina, induzindo a infiltração de células imunes, como linfócitos do tipo T e de macrófagos no PVAT (Greenstein *et al.*, 2009, Chatterjee *et al.*, 2009). Os macrófagos apresentam importante influência na disfunção do PVAT, pois induzem a atividade de NADPH oxidase, resultando em um aumento na produção de ânion superóxido (Ketonen *et al.*, 2010; DeVallance *et al.*, 2018). Também, o PVAT de animais tratados com HFD apresenta desacoplamento da NOS-3 e diminuição na disponibilidade de arginina (Gil-Ortega *et al.*, 2014; Xia *et al.*, 2016). Outra enzima antioxidante que apresenta sua expressão reduzida nesta condição é a cistationina- γ -ligase (CSE), atenuando os níveis de H₂S (revisado por Beltowski, 2013). Este trio, hipóxia-inflamação-estresse oxidativo favorece a produção de citocinas e adipocinas pró-inflamatórias, como leptina, TNF- α e IL-6 e a regulação negativa de mediadores anti-inflamatórios, como adiponectina e IL-10, agravando a disfunção endotelial e resultando na perda ou atenuação da ação anticontrátil do PVAT na obesidade.

Avaliamos se a incubação do PVAT de animais obesos com LPS apresentaria a mesma resposta anticontrátil aumentada que observamos nos vasos de animais saudáveis. Reforçando os dados da literatura, não encontramos nenhuma diferença na contração de vasos de animais obesos PVAT + LPS quando comparados com PVAT incubado com veículo apenas.

Os resultados referentes a Parte II do trabalho, embora ainda muito preliminares, nos apontam novas possibilidades de investigação dos mecanismos que relacionam o PVAT e a contração de vasos de resistência durante a sepse e também consideram uma possível relação entre PVAT, disfunção vascular da sepse e obesidade.

8. CONCLUSÃO

O PVAT contribui para o efeito anticontrátil da aorta, de artéria mesentérica superior e, muito provavelmente, de artérias de resistência durante sepse. O mecanismo do efeito anticontrátil parece ser diferente dependendo da localização e do tipo de PVAT. Na aorta torácica, o NO proveniente do PVAT é produzido pelas NOS constitutivas, provavelmente mediada pela ativação de receptores β 3 adrenérgicos e envolve a GCs e as vias de S-nitrosilação para seu efeito anticontrátil. Por outro lado, na artéria mesentérica superior, o efeito anticontrátil do PVAT parece depender principalmente da produção de ROS. Já na artéria mesentérica de segunda ordem, são necessárias mais informações sobre o mecanismo. No geral, independentemente dos mecanismos envolvidos, nossos resultados implicam o PVAT como um tecido ativo na disfunção da sepse experimental.

9. REFERÊNCIAS

- AGABITI-ROSEI C, DE CIUCEIS C, ROSSINI C, PORTERI E, RODELLA LF, WITHERS SB, HEAGERTY AM, FAVERO G, AGABITI-ROSEI E, RIZZONI D, REZZANI R. Anticontractile activity of perivascular fat in obese mice and the effect of long-term treatment with melatonin. **J Hypertens** 32(6):1264-74, 2014.
- AGHAMOHAMMADZADEH R, UNWIN RD, GREENSTEIN AS, HEAGERTY AH. Effects of obesity on perivascular adipose tissue vasorelaxant function: nitric oxide, inflammation and elevated systemic blood pressure. **J Vasc Res** 52 (5), 299-305, 2015.
- AHMAD AA, RANDAL MD, ROBERTS RE. Sex differences in the role of phospholipase A2-dependent arachidonic acid pathway in the perivascular adipose tissue function in pigs. **J Physiol** 595(21):6623-6634, 2017.
- AHMAD MF, FERLAND D, AYALA-LOPEZ N, CONTRERAS GA, DARIOS E, THOMPSON J, ISMAIL A, THELEN K, MOESER AJ, BURNETT R, ANANTHARAM A, WATTS SW. Perivascular Adipocytes Store Norepinephrine by Vesicular Transport. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 39:188-199, 2019.
- AIRD WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Blood** 101(10):3765-77, 2003.
- ALMABROUK TAM, UGUSMAN AB, KATWAN OJ, SALT IP, KENNEDY S. Deletion of AMPK α 1 attenuates the anticontractile effect of perivascular adipose tissue (PVAT) and reduces adiponectin release. **Br J Pharmacol** 174(20):3398-3410, 2017.
- ANAND PE, STAMLER JS. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. **J Mol Med** 90:233–244, 2012.
- ANI C, FARSHIDPANAH S, BELLINGHAUSEN STEWART A, NGUYEN HB. Variations in organism-specific severe sepsis mortality in the United States: 1999-2008. **Crit Care Med** 43(1):65-77, 2015.
- ANTONOPOULOS AS, SANNA F, SABHARWAL N, THOMAS S, OIKONOMOU EK, HERDMAN L, MARGARITIS M, SHIRODARIA C, KAMPOLI A, AKOUMIANAKIS I, PETROU M, SAYEED R, KRASOPOULOS G, PSARROS C, CICCONE P, BROPHY CM, DIGBY J, KELION A, UBEROI R, ANTHONY S, ALEXOPOULOS N, TOUSOULIS D, ACHENBACH S, NEUBAUER S, CHANNON KM, ANTONIADES C. Detecting human coronary inflammation by imaging perivascular fat. **Sci Transl Med** 12;9(398), 2017.
- ARAGÓN JP, CONDIT ME, BHUSHAN S, PREDMORE BL, PATEL SS, GRINSFELDER DB, GUNDEWAR S, JHA S, CALVERT JW, BAROUCH LA, LAVU M, WRIGHT HM, LEFER DJ. Beta3-adrenoreceptor stimulation ameliorates myocardial ischemia-reperfusion injury via endothelial nitric oxide synthase and neuronal nitric oxide synthase activation. **J Am Coll Cardiol** 58(25):2683-91, 2011.
- ARAÚJO AV, FERREZIN CZ, PEREIRA ADE C, RODRIGUES GJ, GRANDO MD, BONAVENTURA D, BENDHACK LM. Augmented nitric oxide production and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase during cecal ligation and perforation. **Nitric Oxide** 27(1):59-66, 2012.
- AWATA WMC, GONZAGA NA, BORGES VF, SILVA CBP, TANUS-SANTOS JE, CUNHA FQ, TIRAPELLI CR. Perivascular adipose tissue contributes to lethal sepsis-induced vasoplegia in rats. **Eur J Pharmacol** 863:172706, 2019.

- AYALA-LOPEZ N, JACKSON WF, BURNETT R, WILSON JN, THOMPSON JM, WATTS SW. Organic cation transporter 3 contributes to norepinephrine uptake into perivascular adipose tissue. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 309: H1904–H1914, 2015.
- AYALA-LOPEZ N, MARTINI M, JACKSON WF, DARIOS E, BURNETT R, SEITZ B, FINK GD, WATTS SW. Perivascular adipose tissue contains functional catecholamines. **Pharmacol Res Perspect** 1;2(3):e00041, 2014.
- AYALA-LOPEZ N, THOMPSON JM, WATTS SW. Perivascular Adipose Tissue's Impact on Norepinephrine-Induced Contraction of Mesenteric Resistance Arteries. **Front Physiol** 8;8:37, 2017.
- AYALA-LOPEZ N, THOMPSON JM, WATTS SW. Perivascular Adipose Tissue's Impact on Norepinephrine-Induced Contraction of Mesenteric Resistance Arteries. **Front Physiol** 8;8:37, 2017.
- BELTOWSKI J. Endogenous hydrogen sulfide in perivascular adipose tissue: role in the regulation of vascular tone in physiology and pathology. **Can J Physiol Pharmacol** 91 (11), 889-98, 2013.
- BENEDET PO, MENEGATTI ACO, GONÇALVES MC, TERENCEZI H, ASSREUY J. The therapeutic value of protein (de)nitrosylation in experimental septic shock. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis** 1864(1):307-316, 2018.
- BENOV L, SZTEJNBERG L, FRIDOVICH I. Critical evaluation of the use of hydroethidine as a measure of superoxide anion radical. **Free Radic Biol Med** 25(7):826-31, 1998.
- BERRY DC, STENESEN D, ZEVE D, GRAFF JM. The developmental origins of adipose tissue. **Development** 140: 3939-3949, 2013.
- BILLIAR TR, CURRAN RD, STUEHR DJ, WEST MA, BENTZ BG, SIMMONS RL. An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. **J Exp Med** 169:67-72, 1989.
- BOISRAMÉ-HELMS J, KREMER H, SCHINI-KERTH V, MEZIANI F. Endothelial dysfunction in sepsis. **Curr Vasc Pharmacol** 11(2):150-60, 2013.
- BOLOTINA VM, NAJIBI S, PALACINO JJ, PAGANO PJ, COHEN RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature** 368(6474):850-3, 1994.
- BONE RC, SIBBALD WJ, SPRUNG CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest** 101(6):1481-3, 1992.
- BROWN NK, ZHOU Z, ZHANG J, ZENG R, WU J, EITZMAN DT, CHEN YE, CHANG L. Perivascular Adipose Tissue in Vascular Function and Disease - A Review of Current Research and Animal Models. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 34:1621-1630, 2014.
- BULLOCH JM, DALY CJ. Autonomic nerves and perivascular fat: Interactive mechanisms. **Pharmacol Ther** 143:61–73, 2014.
- BURGDORFF AM, BUCHER M, SCHUMANN J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. **J Int Med Res** 46(4): 1303–1310, 2018.
- BUSSEY CE, WITHERS SB, SAXTON SN, BODAGH N, ALDOUS RG, HEAGERTY AM. β_3 -Adrenoceptor stimulation of perivascular adipocytes leads to increased fat cell-derived NO and vascular relaxation in small arteries. **Br J Pharmacol** 175(18):3685-3698, 2018.

- Cannon B, Nedergaard J. Brown Adipose Tissue: Function and Physiological Significance. **Physiol Rev** 84: 277–359, 2004.
- CARPÉNÉ C, GALITZKY J, COLLON P, ESCLAPEZ F, DAUZATS M, LAFONTAN M. Desensitization of beta-1 and beta-2, but not beta-3, adrenoceptor-mediated lipolytic responses of adipocytes after long-term norepinephrine infusion. **J Pharmacol Exp Ther** 265(1):237-47, 1993.
- CARY SP, WINGER JA, DERBYSHIRE ER, MARLETTA MA. Nitric oxide signaling: no longer simply on or off. **Trends Biochem Sci** 31(4):231-9, 2006.
- CHANG L, VILLACORTA L, LI R, HAMBLIN M, XU W, DOU C, ZHANG J, WU J, ZENG R, CHEN YE. Loss of Perivascular Adipose Tissue on Peroxisome Proliferator–Activated Receptor- γ Deletion in Smooth Muscle Cells Impairs Intravascular Thermoregulation and Enhances Atherosclerosis. **Circulation** 126:1067-1078, 2012.
- CHATTERJEE TK, STOLL LL, DENNING GM, HARRELSON A, BLOMKALNS AL, IDELMAN G, ROTHENBERG FG, NELTNER B, ROMIG-MARTIN SA, DICKSON EW, RUDICH S, WEINTRAUB NL. Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes: INFLUENCE OF HIGH-FAT FEEDING. **CIRC RES** 104(4):541-9, 2009.
- CHEN H, MONTAGNANI M, FUNAHASHI T, SHIMOMURA I, QUON MJ. Adiponectin Stimulates Production of Nitric Oxide in Vascular Endothelial Cells. **J Biol Chem** 278(45):45021-6, 2003.
- CHEN L, MCNEILL JR, WILSON TW, GOPALAKRISHNAN V. Heterogeneity in Vascular Smooth Muscle Responsiveness to Angiotensin II - Role of Endothelin. **Hypertension** 26:83–88, 1995.
- CHRUSCINSKI AJ, BREDE ME, MEINEL L, LOHSE MJ, KOBILKA BK, HEIN L. Differential Distribution of β -Adrenergic Receptor Subtypes in Blood Vessels of Knockout Mice Lacking β 1- or β 2-Adrenergic Receptors. **Mol Pharmacol** 60:955–962, 2001.
- CINEL I, OPAL SM. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Crit Care Med** 37(1):291-304, 2009.
- COLETTA C, SZABO C. Potential role of hydrogen sulfide in the pathogenesis of vascular dysfunction in septic shock. **Curr Vasc Pharmacol** 11(2):208-21, 2013.
- COLLIN S, SENNOUN N, DRON AG, DE LA BOURDONNAYE M, MONTEMONT C, ASFAR P, LACOLLEY P, MEZIANI F, LEVY B. Vascular ATP sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock. **Intensive Care Med** 37:861–869, 2011.
- COOK KS, MIN HY, JOHNSON D, CHAPLINSKY RJ, FLIER JS, HUNT CR, SPIEGELMAN BM. Adipsin: A circulating serine protease homolog secreted by adipose tissue and sciatic nerve. **Science** 237: 402-405, 1987.
- COSTA RM, FILGUEIRA FP, TOSTES RC, CARVALHO MHC, AKAMINE EH, LOBATO NS. H₂O₂ generated from mitochondrial electron transport chain in thoracic perivascular adipose tissue is crucial for modulation of vascular smooth muscle contraction. **Vasc Pharmacol** 84:28–37, 2016.
- CROUSER ED, CALDWELL CC, HOTCHKISS RS. What Is the Skinny on Obesity During Sepsis? **Crit Care Med** 47 (5), 735-736, 2019.

- DA SILVA-SANTOS JE, ASSREUY J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **J Pharmacol Exp Ther** 290(1):380-7, 1999.
- DAL SECCO D, OLIVON V, CORRÊA T, CELES MR, ABREU M, ROSSI M, OLIVEIRA AM, CUNHA F, ASSREUY J. Cardiovascular hyporesponsiveness in sepsis is associated with G-protein receptor kinase expression via a nitric oxide-dependent mechanism. **Crit Care** 14(Suppl 2):P34, 2010.
- DASHWOOD MR, DOOLEY A, SHI-WEN X, ABRAHAM DJ, SOUZA DSR. Does Periadventitial Fat-Derived Nitric Oxide Play a Role in Improved Saphenous Vein Graft Patency in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Surgery? **J Vasc Res** 44:175–181, 2007.
- DASHWOOD MR, LOESCH A. Does perivascular fat influence neural control of the saphenous vein? Implications in coronary artery bypass surgery (CABG). **Current Neurobiology** 2(1):71-74, 2011.
- DEVALLANCE E, BRANYAN KW, LEMASTER K, OLFERT IM, SMITH DM, PISTILLI EE, FRISBEE JC, CHANTLER PD. Aortic dysfunction in metabolic syndrome mediated by perivascular adipose tissue tnfa- and nox2-dependent pathway. **Exp Physiol** 103 (4), 590-603, 2018.
- DUMA D, FERNANDES D, BONINI MG, STADLER K, MASON RP, ASSREUY J. NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. **Eur J Pharmacol** 668 (1-2), 285-92, 2011.
- DUNBAR JC, HU Y, LU H. Intracerebroventricular leptin increases lumbar and renal sympathetic nerve activity and blood pressure in normal rats. **Diabetes** 46(12):2040-3, 1997.
- ENKHBAATAR P, LANGE M, NAKANO Y, HAMAHATA A, JONKAM C, WANG J, JAROCH S, TRABER L, HERNDON D, TRABER D. Role of neuronal nitric oxide synthase in ovine sepsis model. **Shock** 32(3):253-7, 2009.
- FANG L, ZHAO J, CHEN Y, MA T, XU G, TANG C, LIU X, GENG B. Hydrogen sulfide derived from periadventitial adipose tissue is a vasodilator. **J Hypertens** 27(11):2174-85, 2009.
- FERNANDES D, ASSREUY J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock** 1:10-3, 2008.
- FERNANDES D, SORDI R, PACHECO LK, NARDI GM, HECKERT BT, VILLELA CG, LOBO AR, BARJA-FIDALGO C, ASSREUY J. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **J Pharmacol Exp Ther** 328(3):991-9, 2009.
- FÉSÜS G, DUBROVSKA G, GORZELNIAK K, KLUGE R, HUANG Y, LUFT FC, GOLLASCH M. Adiponectin is a novel humoral vasodilator. **Cardiovasc Res** 75:719–727, 2007.
- FINKEL T. Oxidant signals and oxidative stress. **Curr Opin Cell Biol** 15(2):247-54, 2003.
- FLEISCHMANN-STRUZEK C, GOLDFARB DM, SCHLATTMANN P, SCHLAPBACH LJ, REINHART K, KISSOON N. The global burden of paediatric and neonatal sepsis: a systematic review. **Lancet Respir Med** 6(3):223-230, 2018.
- FÖRSTERMANN U, BOISSEL JP, KLEINERT H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB J** 12(10):773-90, 1998.

- FÖRSTERMANN U, SESSA WC. Nitric oxide synthases: regulation and function. **Eur Heart J** 33:829–837, 2012.
- FOSTER MT, SHI H, SOFTIC S, KOHLI R, SEELEY RJ, WOODS SC. Transplantation of non-visceral fat to the visceral cavity improves glucose tolerance in mice: investigation of hepatic lipids and insulin sensitivity. **Diabetologia** 54: 2890–2899, 2011.
- FRIEDMAN JM, HALAAS JL. Leptin and the regulation of body weight in mammals. **Nature** 395(6704):763-70, 1998.
- FUNK DJ, PARRILLO JE, KUMAR A. Sepsis and septic shock: a history. **Crit Care Clin** 25(1):83-101, 2009.
- GALLEY HF, DAVIES MJ, WEBSTER NR. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. **Crit Care Med** 24(10):1649-53, 1996.
- GALLEY HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **BJA** 107 (1): 57–64, 2011.
- GÁLVEZ B, CASTRO J, HEROLD D, DUBROVSKA G, ARRIBAS S, GONZÁLEZ MC, ARANGUEZ I, LUFT FC, RAMOS MC, GOLLASCH M, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS. Perivascular Adipose Tissue and Mesenteric Vascular Function in Spontaneously Hypertensive Rats. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 26:1297-1302, 2006.
- GÁLVEZ-PRIETO B, BOLBRINKER J, STUCCHI P, DE LAS HERAS AI, MERINO B, ARRIBAS S, RUIZ-GAYO M, HUBER M, WEHLAND M, KREUTZ R, FERNANDEZ-ALFONSO MS. Comparative expression analysis of the renin-angiotensin system components between white and brown perivascular adipose tissue. **J Endocrinol** 197(1):55-64, 2008.
- GÁLVEZ-PRIETO B, DUBROVSKA G, CANO MV, DELGADO M, ARANGUEZ I, GONZÁLEZ C, RUIZ-GAYO M, GOLLASCH M, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS. A reduction in the amount and anti-contractile effect of periadventitial mesenteric adipose tissue precedes hypertension development in spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res** 31(7):1415-23, 2008.
- GÁLVEZ-PRIETO B, SOMOZA B, GIL-ORTEGA M, GARCÍA-PRIETO CF, DE LAS HERAS AI, GONZÁLEZ MC, ARRIBAS S, ARANGUEZ I, BOLBRINKER J, KREUTZ R, RUIZ-GAYO M, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS. Anticontractile Effect of Perivascular Adipose Tissue and Leptin are Reduced in Hypertension. **Front Pharmacol** 3:103, 2012.
- GAO Y, ZENG Z, TEOH K, SHARMA AM, ABOUZAHAR L, CYBULSKY I, LAMY A, SEMELHAGO L, LEE RMKW. Perivascular adipose tissue modulates vascular function in the human internal thoracic artery. **J Thorac Cardiovasc Surg** 130(4):1130-6, 2005.
- GAO YJ, LU C, SU LY, SHARMA AM, LEE RM. Modulation of vascular function by perivascular adipose tissue: the role of endothelium and hydrogen peroxide. **Br J Pharmacol** 151(3):323-31, 2007.
- GAO YJ, TAKEMORI K, SU LY, AN WS, LU C, SHARMA AM, LEE RM. Perivascular adipose tissue promotes vasoconstriction: the role of superoxide anion. **Cardiovasc Res** 71(2):363-73, 2006.
- GIL-ORTEGA M, CONDEZO-HOYOS L, GARCÍA-PRIETO CF, ARRIBAS SM, GONZÁLEZ MC, ARANGUEZ I, RUIZ-GAYO M, SOMOZA B, FERNÁNDEZ-ALFONSO MS. Imbalance between pro and anti-oxidant mechanisms in perivascular adipose tissue aggravates longterm high-fat diet-derived endothelial dysfunction. **Plos One** 9:e95312, 2014.

- GOMART S, GAUDREAU-ME'NARD C, JESPEERS P, DILEK OG, HUPKENS E, HANTHAZI A, ET AL. Leptin-Induced Endothelium-Independent Vasoconstriction in Thoracic Aorta and Pulmonary Artery of Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Calcium Channels and Stores. **Plos One** 12(1):0169205, 2017.
- GOMES A, FERNANDES E, LIMA JL. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. **J Biochem Biophys Methods** 65(2-3):45-80, 2005.
- GOTTS JE, MATTHAY MA. Sepsis: pathophysiology and clinical management. **BMJ** 353:i1585, 2016.
- GRANGER DL, TAINTOR RR, BOOCKVAR KS, HIBBS JB. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. **Methods Enzymol** 268, 142-51, 1996.
- GREENSTEIN AS, KHAVANDI K, WITHERS SB, SONOYAMA K, CLANCY O, JEZIORSKA M, LAING I, YATES AP, PEMBERTON PW, MALIK RA, HEAGERTY AM. Local inflammation and hypoxia abolish the protective anticontractile properties of perivascular fat in obese patients. **Circulation** 119(12):1661-70, 2009.
- HAI-MEI L, SONG-YIN H, RUN-MEI L, XIAO-HUANG X, LE-QUAN Z, XIAO-PING L, JIN-WEN X. Andrographolide protects against lipopolysaccharide-induced vascular hyporeactivity by suppressing the expression of inducible nitric oxide in periaortic adipose. **J Cardiovasc Pharmacol** 62(2):154-9, 2013.
- HE X, SU F, VELISSARIS D, SALGADO DR, DE SOUZA BARROS D, LORENT S, TACCONE FS, VINCENT JL, DE BACKER D. Administration of tetrahydrobiopterin improves the microcirculation and outcome in an ovine model of septic shock. **Crit Care Med** 40(10):2833-40, 2012.
- HESS DT, MATSUMOTO A, KIM S, *et al.* Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nature**, 6:150-166, 2005.
- HOCKING SL, CHISHOLM DJ, JAMES DE. Studies of regional adipose transplantation reveal a unique and beneficial interaction between subcutaneous adipose tissue and the intra-abdominal compartment. **Diabetologia** 51: 900–902, 2008.
- HONG K, LEE S, LI R, YANG Y, TANNER MA, WU J, HILL MA. Adiponectin Receptor Agonist, AdipoRon, Causes Vasorelaxation Predominantly Via a Direct Smooth Muscle Action. **Microcirculation** 23(3):207-20, 2016.
- HOTCHKISS RS, MOLDAWER LL, OPAL SM, REINHART K, TURNBULL IR, VINCENT JL. Sepsis and septic shock. **Nat Rev Dis Primers** 2:16045, 2016.
- HOUBEN AJ, ERINGA EC, JONK AM, SERNE EH, SMULDERS YM, STEHOUWER CD. Perivascular Fat and the Microcirculation: Relevance to Insulin Resistance, Diabetes, and Cardiovascular Disease. **Curr Cardiovasc Risk Rep** 6:80–90, 2012.
- HUET O, DUPIC L, HARROIS A, DURANTEAU J. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. **Front Biosci (Landmark Ed)** 1;16:1986-95, 2011.
- HUGUNIN KM, FRY C, SHUSTER K, *et al.* Effects of tramadol and buprenorphine on select immunologic factors in a cecal ligation and puncture model. **Shock** 34: 250-260, 2010.

JAYAKUMAR T, HSIEH CY, LEE JJ, SHEU JR. Experimental and Clinical Pharmacology of *Andrographis paniculata* and Its Major Bioactive Phytoconstituent Andrographolide. **Evid Based Complement Alternat Med** 2013:846740, 2013.

JOHNSON PC. Overview of the Microcirculation. Capítulo do livro *Microcirculation* (Second Edition). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374530-9.00022-X>.

KAGOTA S, MARUYAMA-FUMOTO K, IWATA S, SHIMARI M, KOYANAGI S, SHIOKAWA Y, MCGUIRE JJ, SHINOZUKA K. Perivascular Adipose Tissue-Enhanced Vasodilation in Metabolic Syndrome Rats by Apelin and N-Acetyl-L-Cysteine-Sensitive Factor(s). **Int J Mol Sci** 20(1):106, 2019.

KETONEN J, SHI J, MARTONEN E, MERVAALA E. Periadventitial adipose tissue promotes endothelial dysfunction via oxidative stress in diet-induced obese C57Bl/6 mice. **Circ J** 74(7):1479-87, 2010.

KIMURA K., TSUDA K., BABA A., KAWABE T., BOH-OKA S., IBATA M., MORIWAKI C., HANO T., NISHIO I. Involvement of nitric oxide in endothelium-dependent arterial relaxation by leptin. **Biochem Biophys Res Commun** 273, 745–74910, 2000.

KLEINERT H, PAUTZ A, LINKER K, SCHWARZ PM. Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. **Eur J Pharmacol** 500(1-3):255-66, 2004.

KÖHN C, DUBROVSKA G, HUANG Y, GOLLASCH M. Hydrogen Sulfide: Potent Regulator of Vascular Tone and Stimulator of Angiogenesis. **Int J Biomed Sci** 8(2):81-6, 2012.

KOJIMA H, URANO Y, KIKUCHI K, HIGUCHI T, HIRATA Y, NAGANO T. Fluorescent Indicators for Imaging Nitric Oxide Production. **Angew Chem Int Ed Engl** 38(21):3209-3212, 1999.

KOTFIS K, WITTEBOLE X, JASCHINSKI U, SOLÉ-VIOLÁN J, KASHYAP R, LEONE M, NANCHAL R, FONTES LE, SAKR Y, VINCENT JL; ICON INVESTIGATORS. A worldwide perspective of sepsis epidemiology and survival according to age: Observational data from the ICON audit. **J Crit Care** 51:122-132, 2019.

Kwok KHM, Lam KSL, Xu A. Heterogeneity of white adipose tissue: molecular basis and clinical implications. **Exp Mol Med** 48: e215, 2016.

LAFONTAN M, BERLAN M. Fat cell adrenergic receptors and the control of white and brown fat cell function. **J Lipid Res** 34(7):1057-91, 1993.

LANGHEIM S, DREAS L, VESCHINI L, MAISANO F, FOGLIENI C, FERRARELLO S, SINAGRA G, ZINGONE B, ALFIERI O, FERRERO E, MASERI A, RUOTOLO G. Increased expression and secretion of resistin in epicardial adipose tissue of patients with acute coronary syndrome. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 298:H746–H753, 2010.

LEE M, WU Y, FRIED SK. Adipose tissue heterogeneity: Implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. **Mol Asp Med** 34:1–11, 2013.

LEE YC, CHANG HH, CHIANG CL, LIU CH, YEH JI, CHEN MF, CHEN PY, KUO JS, LEE TJ. Role of perivascular adipose tissue-derived methyl palmitate in vascular tone regulation and pathogenesis of hypertension. **Circulation** 124(10):1160-71, 2011.

LEMBO G, VECCHIONE C, FRATTA L, MARINO G, TRIMARCO V, AMATI G ET AL. Leptin induces direct vasodilation through distinct endothelial mechanisms. **Diabetes** 49: 293–297, 2000.

- LEVY B, COLLIN S, SENNOUN N, DUCROCQ N, KIMMOUN A, ASFAR P, PEREZ P, MEZIANI F. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. **Intensive Care Med** 36(12):2019-29, 2010.
- LINDSAY RS, FUNAHASHI T, HANSON RL, MATSUZAWA Y, TANAKA S, TATARANNI PA, KNOWLER WC, KRAKOFF J. Adiponectin and development of type 2 diabetes in the Pima Indian population. **Lancet** 6;360(9326):57-8, 2002.
- LIOCHEV SI, FRIDOVICH I. The Effects of Superoxide Dismutase on H₂O₂ Formation. **Free Radic Biol Med** 42 (10), 1465-9, 2007.
- LOESCH A, DASHWOOD MR. Nerve-perivascular fat communication as a potential influence on the performance of blood vessels used as coronary artery bypass grafts. **J Cell Commun Signal** 12:181–191, 2018.
- LÖHN M, DUBROVSKA G, LAUTERBACH B, LUFT FC, GOLLASCH M, SHARMA AM. Periadventitial fat releases a vascular relaxing factor. **FASEB** 16: 1057-1063, 2002.
- LU C, SU LY, LEE RM, GAO YJ. Alterations in perivascular adipose tissue structure and function in hypertension. **Eur J Pharmacol** 656(1-3):68-73, 2011.
- LU C, ZHAO AX, GAO Y, LEE RMKW. Modulation of vein function by perivascular adipose tissue. **Eur J Pharmacol** 657:111–116, 2011.
- LUCHTEMBERG MN, PETRONILHO F, CONSTANTINO L, GELAIN DP, ANDRADES M, RITTER C, MOREIRA JC, STRECK EL, DAL-PIZZOL F. Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. **Clin Biochem** 41(14-15):1186-90, 2008.
- LUIKING YC, POEZE M, RAMSAY G, DEUTZ NE. The role of arginine in infection and sepsis. **J Parenter Enteral Nutr** 29(1 Suppl):S70-4, 2005.
- LUO L, LIU M. Adipose tissue in control of metabolism. **J Endocrinol** 231: 77–99, 2016.
- LYNCH FM, WITHERS SB, YAO Z, WERNER ME, EDWARDS G, WESTON AH, HEAGERTY AM. Perivascular adipose tissue-derived adiponectin activates BKCa channels to induce anticontractile responses. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 304(6):786–795, 2013.
- MACHADO FR, CAVALCANTI AB, BOZZA FA, FERREIRA EM, ANGOTTI CARRARA FS, SOUSA JL, CAIXETA N, SALOMAO R, ANGUS DC, PONTES AZEVEDO LC; SPREAD INVESTIGATORS; LATIN AMERICAN SEPSIS INSTITUTE NETWORK. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infect Dis** 17(11):1180-1189, 2017.
- MANKA D, CHATTERJEE TK, STOLL LL, BASFORD JE, KONANIAH ES, SRINIVASAN R, BOGDANOV VY, TANG Y, BLOMKALNS AL, HUI DY, WEINTRAUB NL. Transplanted perivascular adipose tissue accelerates injury-induced neointimal hyperplasia: role of monocyte chemoattractant protein-1. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 34(8):1723-30, 2014.
- MARCHESE C, EBRAHIMIAN T, ANGULO O, PARADIS P, SCHIFFRIN EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. **Hypertension** 54(6):1384-92, 2009.
- MATSUDA N, HATTORI Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. **J Smooth Muscle Res** 43(4):117–137, 2007.

- MATTILA JT, THOMAS AC. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. **Front Immunol** 5: 458, 2014.
- MILANO S, GERBINO A, SCHENA G, CARMOSINO M, SVELTO M, PROCINO G. Human β 3-Adrenoreceptor is Resistant to Agonist-Induced Desensitization in Renal Epithelial Cells. **Cell Physiol Biochem** 48(2):847-862, 2018.
- MINAMI, K.; OGATA, J.; UEZONO, Y. What is the main mechanism of tramadol? **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol** 388(10):999-1007, 2015.
- MINK SN, KASIAN K, SANTOS MARTINEZ LE, JACOBS H, BOSE R, CHENG ZQ, LIGHT RB. Lysozyme, a mediator of sepsis that produces vasodilation by hydrogen peroxide signaling in an arterial preparation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 94(4):H1724-35, 2008.
- MITAKA C, HIRATA Y, YOKOYAMA K, WAKIMOTO H, HIROKAWA M, NOSAKA T, IMAI T. Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. **Shock** 19(4):305-9, 2003.
- MITTWEDE PN, CLEMMER JS, BERGIN PF, XIANG L. Obesity and critical illness: insights from animal models. **Shock** 45 (4), 349-58, 2016.
- MOMIN AU, MELIKIAN N, SHAH AM, GRIEVE DJ, WHEATCROFT SB, JOHN L ET AL. Leptin is an endothelial-independent vasodilator in humans with coronary artery disease: evidence for tissue specificity of leptin resistance. **Eur Heart J** 27: 2294–2299, 2006.
- MONCADA S, PALMER RM, HIGGS EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev** 43(2):109-42, 1991.
- MURAD F. Shattuck Lecture. Nitric oxide and cyclic GMP in cell signaling and drug development. **N Engl J Med** 355(19):2003-11, 2006.
- NANTEL F, BONIN H, EMORINE LJ, ZILBERFARB V, STROSBERG AD, BOUVIER M, MARULLO S. The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. **Mol Pharmacol** 43(4):548-55, 1993.
- NARDI GM, SCHESCHOWITSCH K, AMMAR D, OLIVEIRA SK, ARRUDA TB, ASSREUY J. Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. **Crit Care Med** 42(6): 391-400, 2014.
- NDUKA, O. O.; PARRILLO, J. E. The pathophysiology of septic shock. **Crit Care Nurs Clin N Am** 23:41-66, 2011.
- NEDEVA C, MENASSA J, PUTHALAKATH H. Sepsis: Inflammation Is a Necessary Evil. **Front Cell Dev Biol** 7:108, 2019.
- OCHOA, J.B, UDEKWU, A. O.; BILLIAR, T. R.; et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Annals Surgery** 214(5): 621-626, 1991.
- OKAMOTO Y, KIHARA S, OUCHI N, NISHIDA M, ARITA Y, KUMADA M, OHASHI K, SAKAI N, SHIMOMURA I, KOBAYASHI H, TERASAKA N, INABA T, FUNAHASHI T, MATSUZAWA Y. Adiponectin reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. **Circulation** 26;106(22):2767-70, 2002.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/sepsis>. Acesso em 05/01/2020.

- OWEN MK, NOBLET JN, SASSOON DJ, CONTEH AM, GOODWILL AG, TUNE JD. Perivascular adipose tissue and coronary vascular disease. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 34(8): 1643–1649, 2014.
- PACHER P, BECKMAN JS, LIAUDET L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev** 87(1):315-424, 2007.
- PADILLA J, JENKINS NT, VIEIRA-POTTER VJ, LAUGHLIN MH. Divergent phenotype of rat thoracic and abdominal perivascular adipose tissues. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** 304:543–552, 2013.
- PAYNE GA, BORBOUSE L, KUMAR S, NEEB Z, ALLOOSH M, STUREK M, TUNE JD. Epicardial perivascular adipose-derived leptin exacerbates coronary endothelial dysfunction in metabolic syndrome via a PKC- β pathway. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 30(9):1711–1717, 2010.
- PAYNE GA, KOHR MC, TUNE JD. Epicardial perivascular adipose tissue as a therapeutic target in obesity-related coronary artery disease. **Br J Pharmacol** 165:659-669, 2012.
- PEPPER DJ, DEMIRKALE CY, SUN J, RHEE C, FRAM D, EICHACKER P, KLOMPAS M, SUFFREDINI AF, KADRI SS. Does Obesity Protect Against Death in Sepsis? A Retrospective Cohort Study of 55,038 Adult Patients*. **Crit Care Med** 47(5), 643–650, 2019.
- PETROS A, LAMB G, LEONE A, MONCADA S, BENNETT D, VALLANCE P. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock. **Cardiovasc Res** 28(1):34-9, 1994.
- PIZZINAT N, MARTIL, REMAURY A, LEGER F, LANGIN D, LAFONTAN M, CARPÉNÉ C, PARINI A. High expression of monoamine oxidases in human white adipose tissue: evidence for their involvement in noradrenaline clearance. **Biochem Pharmacol** 58(11):1735-42, 1999.
- QUESADA I, CEJAS J, GARCÍA R, CANNIZZO B, REDONDO A, CASTRO C. Vascular dysfunction elicited by a cross talk between periaortic adipose tissue and the vascular wall is reversed by pioglitazone. **Cardiovasc Ther** 36(3):e12322, 2018.
- RADOMSKI MW, PALMER RM, MONCADA S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proc Natl Acad Sci** 87(24): 10043–10047, 1990.
- RAUTUREAU Y, TOUMANIANTZ G, SERPILLON S, JOURDON P, TROCHU J, GAUTHIER C. Beta 3-adrenoceptor in rat aorta: molecular and biochemical characterization and signalling pathway. **Br J Pharmacol** 137(2): 153–161, 2002.
- RAY R, MURDOCH CE, WANG M, SANTOS CX, ZHANG M, ALOM-RUIZ S, ANILKUMAR N, OUATTARA A, CAVE AC, WALKER SJ, GRIEVE DJ, CHARLES RL, EATON P, BREWER AC, SHAH AM. Endothelial Nox4 NADPH Oxidase Enhances Vasodilatation and Reduces Blood Pressure in Vivo. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 31 (6), 1368-76, 2011.
- REES DD, CELLEK S, PALMER RMJ, MONCADA S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: An insight into endotoxin shock. **Biochem Biophys Res Commun** 173(2):541-7, 1990.

- REINHART K, BAUER M, RIEDEMANN NC, HARTOG CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. **Clin Microbiol Rev** 25(4):609-34, 2012.
- RESTINI CBA, ISMAIL A, KUMAR RK, BURNETT R, GARVER H, FINK GD, WATTS SW. Renal perivascular adipose tissue: Form and function. **Vasc Pharmacol** 106:37–45, 2018
- RITTIRSCH D, HUBER-LANG MS, FLIERL MA, WARD PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc** 4(1):31-6, 2009.
- RONSON RS, NAKAMURA M, VINTEN-JOHANSEN J. The Cardiovascular Effects and Implications of Peroxynitrite. **Cardiovasc Res** 44 (1), 47-59, 1999.
- ROSEI CA, WITHERS SB, BELCAID L, CIUCEIS CD, RIZZONI D, HEAGERTY AM. Blockade of the renin-angiotensin system in small arteries and anticontractile function of perivascular adipose tissue. **J Hypertens** 33(5):1039-45, 2015.
- ROSENWALD M, PERDIKARI A, RÜLICHE T, WOLFRUM C. Bi-directional interconversion of brite and white adipocytes. **Nat Cell Biol** 15: 659-67, 2013.
- RUDD KE, KISSOON N, LIMMATHUROTSAKUL D, BORY S, MUTAHUNGA B, SEYMOUR CW, ANGUS DC, WEST TE. The global burden of sepsis: barriers and potential solutions. **Crit Care** 22(1):232, 2018.
- SACERDOTE, P. Opioids and the immune system. **Palliat Med** 20:9Y15, 2006.
- SACKS HS, FAIN JN, HOLMAN B, CHEEMA P, CHARY A, PARKS F, KARAS J, OPTICAN R, BAHOUTH SW, GARRETT E, WOLF RY, CARTER RA, ROBBINS T, WOLFORD D, SAMAHA J. Uncoupling Protein-1 and Related Messenger Ribonucleic Acids in Human Epicardial and Other Adipose Tissues: Epicardial Fat Functioning as Brown Fat. Uncoupling Protein-1 and Related Messenger Ribonucleic Acids in Human Epicardial and Other Adipose Tissues: Epicardial Fat Functioning as Brown Fat. **J Clin Endocrinol Metab** 94(9):3611–3615, 2009.
- SAXTON SN, RYDING KE, ALDOUS RG, WITHERS SB, OHANIAN J, HEAGERTY AM. Role of Sympathetic Nerves and Adipocyte Catecholamine Uptake in the Vasorelaxant Function of Perivascular Adipose Tissue. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 38:880-891, 2018.
- SCHEEREN TWL, BAKKER J, DE BACKER D, *et al.* Current use of vasopressors in septic shock. **Ann Intensive Care** 30;9(1):20, 2019.
- SCHERER PE, WILLIAMS S, FOGLIANO M, BALDINI G, LODISH HF. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. **J Biol Chem** 270(45):26746-9, 1995.
- SCHINZARI F1, TESAURO M, CARDILLO C. Endothelial and Perivascular Adipose Tissue Abnormalities in Obesity-Related Vascular Dysfunction: Novel Targets for Treatment. **J Cardiovasc Pharmacol** 69(6):360-368, 2017.
- SHARAWY N. Vasoplegia in septic shock: Do we really fight the right enemy? **J Crit Care** 29:83–87, 2014.
- SHEK EW, BRANDS MW, HALL JE. Chronic leptin infusion increases arterial pressure. **Hypertension** 31(1 Pt 2):409-14, 1998.
- SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA** 315(8): 801–810, 2016.

- SINGER M. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. **Virulence** 5:1, 66–72, 2014.
- SOLTIS EE, CASSIS LA. Influence of perivascular adipose tissue on rat aortic smooth muscle responsiveness. **Clin Exper Hyper- Theory and Practice** 13: 277-296, 1991.
- SONG W, LUO Q, ZHANG Y, ZHOU L, LIU Y, MA Z, GUO J, HUANG Y, CHENG L, MENG Z, LI Z, ZHANG B, LI S, YEE SW, FAN H, LI P, GIACOMINI KM, CHEN L. Organic cation transporter 3 (Oct3) is a distinct catecholamines clearance route in adipocytes mediating the beiging of white adipose tissue. **Plos Biol** 17(1):e2006571, 2019.
- SOTOCINAL SG, SORGE RE, ZALOUM A, et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Mol Pain**, 29;7:55, 2011.
- SPIROGLOU SG, KOSTOPOULOS CG, VARAKIS JN, PAPADAKI HH. Adipokines in periaortic and epicardial adipose tissue: differential expression and relation to atherosclerosis. **J Atheroscler Thromb** 17(2):115-30, 2010.
- STAMLER, J. S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; et al. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **PNAS** 89:7674–7, 1992.
- STASSEN FR, WILLEMSSEN MJ, JANSSEN GM, DEMEY JG. Alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat aorta and mesenteric small arteries are preserved during left ventricular dysfunction post-myocardial infarction. **Cardiovasc Res** 33(3):706-13, 1997.
- STUEHR DJ, MARLETTA MA. Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines, or interferon-gamma. **J Immunol** 139(2):518-25, 1987.
- THOMAS DD, HEINECKE JL, RIDNOUR LA, CHENG RY, KESARWALA AH, SWITZER CH, MCVICAR DW, ROBERTS DD, GLYNN S, FUKUTO JM, WINK DA, MIRANDA KM. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. **Free Radic Biol Med** 87:204-25, 2015.
- TSUNEYOSHI I, KANMURA Y, YOSHIMURA N. Nitric oxide as a mediator of reduced arterial responsiveness in septic patients. **Crit Care Med** 24(6):1083-6, 1996.
- VAN DER POLL T, OPAL SM. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infect Dis** 8(1):32-43, 2008.
- VECCHIONE C., MAFFEI A., COLELLA S., ARETINI A., POULET R., FRATTA L., TRIMARCO V., TRIMARCO B., LEMBO G. Leptin effect on endothelial nitric oxide is mediated through Akt-endothelial nitric oxide synthase phosphorylation pathway. **Diabetes** 51, 168–17310, 2002.
- VERLOHREN S, DUBROVSKA G, TSANG S, ESSIN K, LUFT FC, HUANG Y, GOLLASCH M. Visceral periadventitial adipose tissue regulates arterial tone of mesenteric arteries. **Hypertension** 44 (3), 271-6, 2004.
- VICTORIO JA, FONTES MT, ROSSONI LV, DAVEL AP. Different Anti-Contractile Function and Nitric Oxide Production of Thoracic and Abdominal Perivascular Adipose Tissues. **Front Physiol** 12;7:295, 2016.
- VINCENT JL, RELLO J, MARSHALL J, SILVA E, ANZUETO A, MARTIN CD, MORENO R, LIPMAN J, GOMERSALL C, SAKR Y, REINHART K; EPIC II GROUP OF

- INVESTIGATORS. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. **JAMA** 302(21):2323-9, 2009.
- WANG N, KUCZMANSKI A, DUBROVSKA G, GOLLASCH M. Palmitic Acid Methyl Ester and Its Relation to Control of Tone of Human Visceral Arteries and Rat Aortas by Perivascular Adipose Tissue. **Front Physiol** 9:583, 2018.
- WANG P, XU T, GUAN Y, SU D, FAN G, MIAO C. Perivascular adipose tissue-derived visfatin is a vascular smooth muscle cell growth factor: role of nicotinamide mononucleotide. **Cardiovasc Res** 81, 370–380, 2009.
- WESTON AH, EGNER I, DONG Y, PORTER EL, HEAGERTY AM, EDWARDS G. Stimulated release of a hyperpolarizing factor (ADHF) from mesenteric artery perivascular adipose tissue: involvement of myocyte BKCa channels and adiponectin. **Br J Pharmacol** 169(7):1500-9, 2013.
- WITHERS SB, AGABITI-ROSEI C, LIVINGSTONE DM, LITTLE MC, ASLAM R, MALIK RA, HEAGERTY AM. Macrophage activation is responsible for loss of anticontractile function in inflamed perivascular fat. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 31(4):908-13, 2011.
- WITHERS SB, FORMAN R, MEZA-PEREZ S, SOROBETEA D, SITNIK K, HOPWOOD T, LAWRENCE CB, AGACE WW, ELSE KJ, HEAGERTY AM, SVENSSON-FREJ M, CRUICKSHANK SM. Eosinophils are key regulators of perivascular adipose tissue and vascular functionality. **Sci Rep** 7:44571, 2017.
- XIA N, HORKE S, HABERMEIER A, CLOSS EI, REIFENBERG G, GERICKE A, MIKHED Y, MÜNZEL T, DAIBER A, FÖRSTERMANN U, LI H. Uncoupling of Endothelial Nitric Oxide Synthase in Perivascular Adipose Tissue of Diet-Induced Obese Mice. **Arterioscler Thromb Vasc Biol** 36(1):78-85, 2016.
- XIA N, LI H. The role of perivascular adipose tissue in obesity-induced vascular dysfunction. **Br J Pharmacol** 174(20):3425-3442, 2017.
- YAMAUCHI T, IWABU M, OKADA-IWABU M, KADOWAKI T. Adiponectin receptors: A review of their structure, function and how they work. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 28:15–23, 2014.
- YAMAWAKI H, TSUBAKI N, MUKOHDA M, OKADA M, HARA Y. Omentin, a novel adipokine, induces vasodilation in rat isolated blood vessels. **Biochem Biophys Res Commun** 393:668–672, 2010.
- YEUNG NG P, EIKERMANN M. The obesity conundrum in sepsis. **BMC Anesthesiol** 17: 147, 2017.
- YOKOTA T, ORITANI K, TAKAHASHI I, ISHIKAWA J, MATSUYAMA A, OUCHI N, KIHARA S, FUNAHASHI T, TENNER AJ, TOMIYAMA Y, MATSUZAWA Y. Adiponectin, a new member of the family of soluble defence collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Blood** 1;96(5):1723-32, 2000.
- ZHANG H, FENG Y, YAO Y. Potential therapy strategy: targeting mitochondrial dysfunction in sepsis. **Mil Med Res** 5 (1), 41, 2018.
- ZHAO Y, VANHOUTTE PM, LEUNG SW. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. **J Pharmacol Sci** 129(2):83-94, 2015.