



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

Gabrielle Delfrate

Alterações cardiovasculares em sobreviventes à sepse: potencial
terapêutico de um inibidor da fosfodiesterase-5

Florianópolis
2025

Gabrielle Delfrate

**Alterações cardiovasculares em sobreviventes à sepse: potencial
terapêutico de um inibidor da fosfodiesterase-5**

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

Orientador: Prof. Daniel Fernandes, Dr.

Florianópolis

2025

Delfrate, Gabrielle

Alterações cardiovasculares em sobreviventes à sepse :
potencial terapêutico de um inibidor da fosfodiesterase-5
/ Gabrielle Delfrate ; orientador, Daniel Fernandes, 2025.
130 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2025.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Pós-sepse. 3. Tadalafila. 4. Óxido
nítrico. 5. Cecal slurry. I. Fernandes, Daniel. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia. III. Título.

Gabrielle Delfrate

Alterações cardiovasculares em sobreviventes à sepse: potencial terapêutico de um inibidor da fosfodiesterase-5

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 16 de junho de 2025, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) José Eduardo da Silva Santos, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.(a) Rita de Cássia Tostes, Dr.(a)
Instituição Universidade de São Paulo

Prof.(a) Stéfany Bruno A. Cau, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Minas Gerais

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 pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.(a) Daniel Fernandes, Dr.(a)
Orientador(a)

Florianópolis, 2025.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Daniel Fernandes, a quem sempre admirei desde as aulas de farmacologia durante a graduação na UEPG. Obrigada pela paciência, disponibilidade e confiança!

À banca avaliadora, José Eduardo, Stéfany Cau, Rita Tostes, bem como os suplentes Renata Lataro, Geisson Nardi e Filipe de Oliveira, pelo aceite do convite e disponibilidade em avaliar esse trabalho.

Ao professor Jamil Assreuy, que considero como meu “coorientador do coração”, obrigada por estar sempre tão disposto a compartilhar o seu conhecimento. Foi um prazer dividir a bancada com o Senhor.

Aos professores Regina de Sordi, Renata Lataro, Jamaira Victorio e Geisson Nardi, por todas as dúvidas sanadas e pelos momentos produtivos durante os nossos seminários semanais. Ao professor Lucas Pinheiro, pela colaboração nos experimentos. E a todos os professores do PPG de farmacologia, pelas aulas e conversas.

A todos que já passaram pelo Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal (LabCaRe), impossível citar todos os nomes. Aos que já estavam aqui quando eu cheguei, e me ensinaram muito, em especial ao Thander, Júnior, Gustavo, Malu, Bruna, Thiele e Filipe, a quem fiz infinitas perguntas sobre protocolos. À formação atual: Amanda, Carol, Dani, Denise, Luana B., Luana M., Lucas, Maérly, Paola e Stéphanie. Meus irmãos “catitos”, vocês me ensinaram muito mais do que experimentos, me ensinaram sobre ciência e sobre coisas da vida. Agradeço a sorte de ter conhecido cada um de vocês. À estagiária Sabrina, que nos ajudou imensamente no ano que passou conosco. Aos alunos de iniciação científica Vanessa e Francisco, a quem pude orientar no aprendizado de alguns experimentos e ajudaram nesse trabalho. E claro, à minha pupila Paola, obrigada por desenvolver esse projeto comigo. Tenho certeza que você vai ser uma grande pesquisadora.

Aos discentes do PPG em Farmacologia, os quais se ajudam mutuamente. Em especial a querida Daniele Hummel, que realizou comigo os experimentos de estresse oxidativo. Aos vizinhos do laboratório de Biologia Cardiovascular, que sempre nos ajudam e com quem dividimos o biotério. À Letícia Yoshitome, com quem trocamos diversos equipamentos e reagentes.

Às técnicas Daiane Bobermin e Adriane Madeira, por toda a ajuda em diversos momentos. Ao técnico Gilberto Marloch, do departamento de morfologia, que auxiliou imensamente na histologia desse trabalho, além das conversas profundas sobre a vida. À Letícia Kramer Pachecho, do laboratório de análises clínicas do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago, pelo suporte nas análises.

À instituição Universidade Federal de Santa Catarina, pela estrutura, por oferecer educação de qualidade e gratuita, e pelas pessoas que fazem o melhor possível todos os dias. Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB), onde realizei diversas análises. Aos funcionários do Biotério e aos veterinários, em especial a Luciana Honorato, que me ajudou imensamente na primeira parte desse projeto, bem como no treinamento da ingestão voluntária. A todos os funcionários, incluindo secretaria, recepção, segurança e limpeza, sempre queridos e prestativos.

Agradeço aos meus pais, Lucélia e Angenilson, que não mediram esforços para que eu tivesse uma boa educação, que sempre incentivaram e apoiaram os meus estudos. Vocês são os meus maiores exemplos de dedicação! Aprendi com vocês o valor do trabalho, e que “não existe sucesso sem sacrifício”.

Ao meu marido, Zeca, que esteve comigo desde a minha primeira apresentação durante a iniciação científica e vem acompanhado essa jornada acadêmica. Por todo o apoio, parceria e compreensão. Por me acompanhar na UFSC nos finais de semana de tratamento. O seu amor e cuidado foram essenciais durante essa caminhada.

A toda a minha família e amigos, os quais eu dou muito valor! Obrigada por existirem e entenderem a minha ausência em vários momentos nos últimos anos.

À Grande Vida do universo, mais conhecida como Deus, que “criou” um organismo tão complexo e perfeito a ponto de que não sei se algum dia a mente humana será capaz de compreendê-lo. O que gera para nós, pesquisadores de Farmacologia, uma demanda infinita de ideias, projetos e trabalhos.

À indústria farmacêutica Cristália, pela doação da heparina.

Às agências de fomento CAPES, FAPESC e em especial ao CNPq, pela bolsa de doutorado.

RESUMO

A sepse é uma condição grave e incidente, caracterizada por disfunção de um ou mais órgãos vitais, devido a uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. O comprometimento cardiovascular contribuiu para a hipoperfusão tecidual e aumento da taxa de mortalidade aguda, e mesmo após a alta hospitalar, é relatado um aumento do risco de infarto do miocárdio e eventos tromboembólicos nos sobreviventes. Porém, os mecanismos envolvidos no aumento do risco cardiovascular pós-sepse não são elucidados, e ainda não há opção terapêutica direcionada para reduzir esse risco. Este trabalho investigou a hipótese de que os sobreviventes à sepse apresentam disfunção na via de sinalização do óxido nítrico (NO), as quais contribuem para o comprometimento cardiovascular a longo prazo. O objetivo principal foi avaliar o impacto do tratamento com um inibidor da fosfodiesterase 5 (PDE5) e aumento dos níveis de GMPc, nas alterações cardiovasculares pós-sepse. Para isso, a indução de sepse foi padronizada pela administração de uma suspensão de 1 g/kg i.p. de conteúdo cecal (*cecal slurry*, CS) em ratos machos adultos da linhagem *Wistar*, em comparação ao procedimento cirúrgico de ligação e perfuração cecal (CLP). Os animais demonstraram hiperlactatemia, hipotensão severa e vasoplegia 24 horas pós-CS ou CLP, validando o uso do modelo CS para as análises subsequentes. Os animais foram considerados sobreviventes 96 horas pós-CS, diante da observação da redução da carga bacteriana tecidual, recuperação de parâmetros hemodinâmicos e de função renal. Então, os sobreviventes à sepse foram distribuídos em dois grupos de tratamento. O tratamento foi realizado com tadalafila (5 mg/kg, v.o.) ou veículo, uma vez ao dia, até as análises em 15 ou 30 dias pós-sepse. Foi observado a redução da potência vasorelaxante da acetilcolina e aumento da contração à noradrenalina em aorta isolada, sugerindo disfunção endotelial, 30 dias pós-CS. Essas alterações não foram identificadas no grupo tratado com tadalafila, o qual demonstrou níveis aumentados de GMPc na aorta. À nível cardíaco, foram observados aumento de colágeno no ventrículo esquerdo e prolongamento do intervalo QT durante estímulo com isoprenalina, indicando remodelamento e alterações na condução elétrica, respectivamente. O tratamento com tadalafila preveniu esses achados. Em coração isolado, observou-se a redução da pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) durante um desafio com isoprenalina, 30 dias pós-sepse, sendo que esse parâmetro foi restaurado nos animais tratados com tadalafila. O tratamento com tadalafila também demonstrou aumentar a capacidade antioxidante cardíaca, observada pela elevação dos níveis de glutathione reduzida, e reduzir o número de leucócitos e plaquetas no sangue, que se encontravam elevados nos animais sobreviventes. Em conjunto, os resultados indicam que ratos sobreviventes à sepse apresentaram sinais de disfunção endotelial e cardíaca tardia. O tratamento com tadalafila teve um impacto positivo, melhorando a função cardíaca e reduzindo a remodelação tecidual. Esses achados destacam o potencial terapêutico da inibição da PDE5 na mitigação de alterações cardiovasculares de longo prazo após a sepse.

Palavras-chave: pós-sepse; tadalafila; óxido nítrico.

ABSTRACT

Sepsis is a severe and prevalent condition characterized by dysfunction of one or more vital organs due to a dysregulated host response to infection. Cardiovascular impairment contributes to tissue hypoperfusion and increased acute mortality. Even after hospital discharge, sepsis survivors exhibit an increased risk of myocardial infarction and thromboembolic events. However, the mechanisms underlying this increased cardiovascular risk remain unclear, and there is no currently targeted therapy to prevent these events. This study investigated the hypothesis that sepsis survivors present dysfunction in the nitric oxide (NO) signaling pathway, which contributes to long-term cardiovascular impairment. The main objective was to evaluate the impact of phosphodiesterase 5 (PDE5) inhibition and consequent cyclic GMP (cGMP) elevation on cardiovascular alterations in the post-sepsis period. For this purpose, sepsis was induced in adult male Wistar rats by intraperitoneal administration of a 1 g/kg suspension of cecal content (cecal slurry, CS), and compared to the surgical cecal ligation and puncture (CLP) model. Animals exhibited hyperlactatemia, severe hypotension, and vasoplegia 24 hours after CS or CLP, validating the CS model for subsequent analyses. Animals were considered survivors 96 hours post-CS, as indicated by reduced tissue bacterial burden, recovery of hemodynamic parameters, and restored renal function. Survivors were then allocated into two treatment groups: tadalafil (5 mg/kg, orally) or vehicle, administered once daily until analysis at 15 or 30 days post-sepsis. Thirty days after CS, a reduction in acetylcholine-induced vasorelaxation and increased contractile response to noradrenaline were observed in isolated aortic rings, indicating endothelial dysfunction. These alterations were not detected in the tadalafil-treated group, which exhibited increased cGMP levels in the aorta. In the heart, CS animals presented increased collagen in the left ventricle and QT interval prolongation during isoproterenol stimulation, suggesting tissue remodeling and altered electrical conduction. Tadalafil treatment prevented these effects. In isolated hearts preparations, left ventricular developed pressure (LVDP) was reduced during isoproterenol challenge 30 days post-sepsis, and this parameter was restored in tadalafil-treated animals. Tadalafil also enhanced cardiac antioxidant capacity, as evidenced by increased reduced glutathione levels, reduced leukocyte and platelet counts, which were elevated in sepsis survivors. Altogether, the findings indicate that sepsis survivors developed late-onset endothelial and cardiac dysfunction. Tadalafil treatment exerted a protective effect by improving cardiac function and reducing tissue remodeling. These results highlight the therapeutic potential of PDE5 inhibition in mitigating long-term cardiovascular alterations following sepsis.

Keywords: post-sepsis; tadalafil; nitric oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Delineamento experimental da padronização do modelo <i>cecal slurry</i>	38
Figura 2 - Registro típico da avaliação hemodinâmica realizada em animais sobreviventes à sepse.....	40
Figura 3 - Registro típico da construção de curvas concentração-resposta na aorta torácica de sobreviventes à sepse	41
Figura 4 - Delineamento experimental da avaliação do efeito da tadalafila nas alterações cardiovasculares de ratos sobreviventes à sepse	50
Figura 5 - Padronização da dose de <i>cecal slurry</i> e avaliação da disseminação bacteriana.....	55
Figura 6 - Acompanhamento do quadro séptico de animais submetidos aos modelos <i>cecal slurry</i> ou CLP	56
Figura 7 - Avaliação hemodinâmica de ratos submetidos aos modelos <i>cecal slurry</i> ou CLP	57
Figura 8 - Registro típico do experimento de curva dose-resposta à angiotensina II em ratos submetidos aos modelos <i>cecal slurry</i> ou CLP	58
Figura 9 - Reatividade vascular à fenilefrina em ratos submetidos aos modelos <i>cecal slurry</i> ou CLP.....	59
Figura 10 - Níveis plasmáticos de nitrato e nitrito de ratos submetidos aos modelos <i>cecal slurry</i> ou CLP	60
Figura 11 - Avaliação da função renal, vinte e quatro horas após a indução de sepse por <i>cecal slurry</i> ou CLP	61
Figura 12 - Sobrevivência dos animais submetidos ao modelo <i>cecal slurry</i> ou CLP.....	61
Figura 13 - Caracterização do período de recuperação pós-sepse.....	63
Figura 14 - Parâmetros hemodinâmicos e níveis de NOx no plasma 96 horas após a indução de sepse	64
Figura 15 - Avaliação da função renal 96 horas após a indução de sepse	65
Figura 16 - Hemodinâmica de animais sobreviventes à sepse	66
Figura 17 - Avaliação da resposta contrátil e de relaxamento na aorta de ratos 15 dias pós-sepse	68
Figura 18 - Avaliação da resposta contrátil e de relaxamento na aorta de ratos 30 dias pós-sepse	69

Figura 19 - Avaliação da resposta contrátil e de relaxamento em aortas sem o endotélio preservado	70
Figura 20 - Avaliação da função cardíaca de animais sobreviventes à sepse em sistema de Langendorff	71
Figura 21 – Efeito da tadalafila na hemodinâmica de animais 30 dias pós-sepse	72
Figura 22 - Efeito da tadalafila na função renal de animais 30 dias pós-sepse	73
Figura 23 – Efeito da tadalafila em parâmetros hematológicos 30 dias pós-sepse...	74
Figura 24 - Efeito da tadalafila nos níveis plasmáticos de NOx e GMPc em ratos sobreviventes à sepse.....	75
Figura 25 - Efeito do tratamento crônico com tadalafila nos níveis plasmáticos de NOx e GMPc de animais controle	76
Figura 26 - Efeito da tadalafila na resposta contrátil e de relaxamento na aorta de ratos 30 dias pós-sepse	78
Figura 27 - Efeito da tadalafila nos níveis de óxido nítrico e GMPc na aorta de sobreviventes à sepse.....	79
Figura 28 - Efeito da tadalafila nos níveis de espécies reativas de oxigênio na aorta de sobreviventes à sepse.....	80
Figura 29 - Efeito da tadalafila na espessura aórtica de ratos sobreviventes à sepse	81
Figura 30 - Efeito da tadalafila na deposição de colágeno na aorta de ratos sobreviventes à sepse.....	82
Figura 31 - Efeito da tadalafila na função cardíaca de ratos 30 dias pós-sepse em sistema de Langendorff.....	83
Figura 32 - Efeito da tadalafila nos parâmetros eletrocardiográficos de ratos 30 dias pós-sepse.....	85
Figura 33 - Efeito da tadalafila na deposição de colágeno no tecido cardíaco de ratos sobreviventes à sepse.....	86
Figura 34 - Efeito da tadalafila no índice de hipertrofia do músculo cardíaco.	87
Figura 35 - Efeito da tadalafila nos níveis de óxido nítrico e nitrito no tecido cardíaco de sobreviventes à sepse.....	88
Figura 36 - Efeito da tadalafila nos níveis GMPc no tecido cardíaco e pulmonar de ratos sobreviventes à sepse.....	89

Figura 37 - Efeito da tadalafila na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAGase) no tecido cardíaco e pulmonar de ratos sobreviventes à sepse.....	90
Figura 38 - Efeito da tadalafila na produção de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco de sobreviventes à sepse	91
Figura 39 - Efeito da tadalafila no estado redox no tecido cardíaco de ratos sobreviventes à sepse.....	92
Figura 40 - Resumo gráfico dos resultados.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Alvos de fosforilação da PKG e mecanismo biológico no músculo liso vascular e cardiomiócito	21
Tabela 2 - Parâmetros avaliados no escore de sepse	34
Tabela 3 – Animais utilizados na padronização do modelo CS e comparação com CLP	51
Tabela 4 – Animais utilizados no estudo das alterações cardiovasculares pós-sepse	53
Tabela 5 – Eficácia e potência de vasoativos na aorta de ratos 15 dias pós-sepse, tratados ou não com tadalafila, em comparação ao controle	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	Análise da variância
ARRIVE	<i>Animal research: reporting of in vivo experiments</i>
AT1	Receptor de angiotensina II do tipo 1
AUC	Área sob a curva
BUN	Nitrogênio ureico
CCR	Curva concentração-resposta
CLP	Ligação e perfuração cecal
CMC	Carboximetilcelulose
COX	Ciclooxigenase
CS	<i>Cecal slurry</i>
D.O.	Densidade óptica
DAF	Diacetato de diaminofluoresceína
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DAN	2,3 – diaminoftaleno
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHE	Dihidroetídio
dP/dT	Derivada da pressão pela derivada do tempo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
E _{max}	Efeito máximo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
GRK2	Quinase-2 do receptor acoplado à proteína G
GSH	Glutathiona reduzida
GSSH	Glutathiona oxidada
GTP	Guanosina trifosfato
HE	Hematoxilina e eosina
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio
IBMX	Isobutil-metilxantina
IL-17	Interleucina 17

iPDE5	Inibidores da fosfodiesterase 5
LogCE ₅₀	Logaritmo da concentração efetiva média (50% do E _{max})
MMP-9	Metaloproteinase da matriz extracelular 9
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NAGase	N-acetilglucosaminidase
NETs	Armadilhas extracelulares de neutrófilos
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS-1	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS-2	Óxido nítrico sintase induzível
NOS-3	Óxido nítrico sintase endotelial
NOx	Nitrato e nitrito
OPT	o-ftalaldeído
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato-salina
PDE	Fosfodiesterase
PDVE	Pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo
PFA	Paraformaldeído
PICS	<i>Post-intensive care syndrome</i>
PKG	Proteína quinase G
PSVE	Pressão sistólica do ventrículo esquerdo
ROCK	Rho-quinase
RPP	<i>Rate pressure-product</i>
Tad	Tadalafila
TCA	Ácido tricloroacético
TMB	3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina
UA	Unidades arbitrárias
UFC	Unidades formadoras de colônia
UP	Unidades arbitrárias de perfusão
UTI	Unidade de terapia intensiva
VASP	Fosfoproteína estimulada por vasodilatador

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
1.1	SEPSE: DA EMERGÊNCIA MÉDICA À SÍNDROME PÓS-SEPSE	16
1.2	A VIA DE SINALIZAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR	19
1.3	IMPLICAÇÕES DO ÓXIDO NÍTRICO NA SEPSE AGUDA E PÓS-SEPSE.....	23
1.4	REFINAMENTO DA SEPSE EXPERIMENTAL.....	26
1.5	HIPÓTESE	27
2	OBJETIVOS.....	27
2.1	OBJETIVO GERAL	27
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	SOLUÇÕES, DROGAS, REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS	28
3.2	ANIMAIS	30
3.2.1	Protocolos analgésicos	30
3.2.2	Protocolos anestésicos	31
3.2.3	Protocolo de eutanásia.....	31
3.3	CARACTERIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE SEPSE AGUDA POR CECAL SLURRY (COMPARAÇÃO COM LIGAÇÃO E PERFURAÇÃO CECAL)	31
3.3.1	Indução de sepse por ligação e perfuração cecal.....	31
3.3.2	Padronização do modelo de indução de sepse por <i>cecal slurry</i>	32
3.3.2.1	<i>Preparação do cecal slurry.....</i>	32
3.3.2.2	<i>Aplicação do cecal slurry.....</i>	32
3.3.2.3	<i>Determinação da dose de cecal slurry</i>	33
3.3.2.4	<i>Avaliação da disseminação bacteriana para órgãos e tecidos</i>	33
3.3.3	Acompanhamento do quadro séptico	33
3.3.4	Avaliação da sobrevivência à sepse	34
3.3.5	Avaliação hemodinâmica	35
3.3.6	Avaliação da resposta contrátil <i>ex vivo</i>	35
3.3.7	Determinação do nível plasmático de nitrato e nitrito (NOx)	36
3.3.8	Dosagem plasmática de marcadores de disfunção de órgãos	37
3.3.9	Caracterização do período de recuperação após a indução de sepse por CS	37

3.3.10	Delineamento experimental da caracterização do modelo	37
3.4	AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES PÓS-SEPSE.....	38
3.4.1	Indução de sepse por <i>cecal slurry</i> (método adaptado)	38
3.4.2	Acompanhamento do quadro séptico (adaptado).....	39
3.4.3	Avaliação hemodinâmica de animais sobreviventes à sepse.....	40
3.4.4	Avaliação em anel de aorta isolado de animais sobreviventes à sepse 40	
3.4.5	Avaliação da função cardíaca em coração isolado.....	41
3.4.6	Avaliação do eletrocardiograma.....	42
3.4.7	Dosagem plasmática de marcadores de disfunção de órgãos de animais sobreviventes à sepse.....	43
3.4.8	Avaliação de marcadores hematológicos.....	43
3.4.9	Determinação de NOx plasmático e nitrito cardíaco	43
3.4.10	Avaliação dos níveis de guanosina monofosfato cíclico	44
3.4.11	Determinação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico tecidual de animais sobreviventes à sepse.....	44
3.4.12	Avaliação histológica do tecido cardíaco e vascular	45
3.4.13	Avaliação da mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase	46
3.4.14	Avaliação da enzima NADPH oxidase no tecido cardíaco	47
3.4.15	Avaliação da glutathiona reduzida e oxidada no tecido cardíaco	48
3.4.16	Delineamento da avaliação do impacto da tadalafila em sobreviventes à sepse experimental	48
3.5	NÚMERO AMOSTRAL	50
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	53
4	RESULTADOS	55
4.1	PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE SEPSE AGUDA POR CECAL SLURRY.....	55
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO PERÍODO DE RECUPERAÇÃO DA FASE AGUDA DA SEPSE.....	62
4.3	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES EM RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE.....	65
4.4	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PDE5 EM RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE	71

4.4.1	Análises <i>in vivo</i> e sistêmicas.....	71
4.4.2	Análises vasculares.....	76
4.4.3	Análises cardíacas.....	82
5	DISCUSSÃO.....	93
6	CONCLUSÃO.....	102
	REFERÊNCIAS.....	103
	APÊNDICE A – VIABILIDADE DE BACTÉRIAS EM PREPARAÇÕES DE <i>CECAL SLURRY</i>	118
	APÊNDICE B – RESPOSTA HIPOTENSORA 1 HORA APÓS ADMINISTRAÇÃO ORAL DE 5 MG/KG DE TADALAFILA EM RATOS SEM INTERVENÇÃO.....	119
	APÊNDICE C – CARACTERIZAÇÃO DO QUADRO SÉPTICO AGUDO DOS ANIMAIS AVALIADOS 15 E 30 DIAS PÓS-SEPSE.....	120
	APÊNDICE D – PARÂMETROS OBTIDOS EM ANEL DE AORTA ISOLADO DE SOBREVIVENTES À SEPSE EM COMPARAÇÃO À CONTROLES DE MESMA IDADE.....	121
	APÊNDICE E – PERFIL HEMATOLÓGICO DE ANIMAIS 15 DIAS PÓS- SEPSE.....	122
	APÊNDICE F – AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR EM ANIMAIS 15 DIAS PÓS-SEPSE.....	123
	ANEXO A – CERTIFICADO 1 DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	124
	ANEXO B – CERTIFICADO 2 DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.....	125
	ANEXO C – ARTIGOS PUBLICADOS DURANTE O DOUTORADO	126
	ANEXO D – ARTIGOS EM PREPARAÇÃO OU SUBMETIDOS.....	127
	ANEXO E – OUTRAS PUBLICAÇÕES.....	128

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE: DA EMERGÊNCIA MÉDICA À SÍNDROME PÓS-SEPSE

A sepse é definida como uma disfunção de órgãos com risco de vida, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção, seja ela bacteriana, fúngica, parasitária ou viral. O choque séptico é um agravamento do quadro, caracterizado clinicamente como nível de lactato sérico > 2 mmol/l e necessidade de uso de vasopressores para manter a pressão arterial média ≥ 65 mmHg, mesmo com reposição de fluídos (SINGER et al., 2016). No Brasil, a taxa de mortalidade decorrente da sepse foi estimada em 55% em 2014 (MACHADO et al., 2017). Globalmente, foram estimados 48,9 milhões de casos e 11 milhões de mortes em 2017 (RUDD et al., 2020). Sendo assim, a sepse é um sério problema de saúde pública, tanto nacional quanto mundial.

Os mecanismos fisiopatológicos da sepse são complexos e englobam inflamação excessiva, disfunção imunológica, e alterações macro e microvasculares. A resposta frente a um patógeno envolve uma cascata de eventos inflamatórios e vasculares, que ativam o sistema imunológico a fim de resolver a infecção. No quadro séptico, ocorre a desregulação desses mecanismos, resultando em uma resposta inflamatória exacerbada mediada por citocinas, quimiocinas, padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), padrões moleculares associados a danos (DAMPs) e formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs). Esse estado hiper inflamatório é geralmente seguido de imunossupressão, porém, o quadro pode se manifestar de forma variável entre os pacientes, tornando o tratamento bastante desafiador (revisado em MEYER; PRESCOTT, 2024).

A vasculatura é altamente afetada na sepse. A exposição ao patógeno e a resposta inflamatória associada resulta, entre outras alterações, em vasodilatação e aumento da permeabilidade endotelial, causando perda massiva de fluido intravascular para o interstício, o que contribui para hipotensão (DOLMATOVA et al., 2021). A hipotensão severa induz sobrecarga cardíaca, dificultando a perfusão sanguínea e resultando em isquemia e disfunção de órgãos, a qual pode evoluir para falência de múltiplos órgãos (HOBAL, 2023). Nesse contexto, o manejo da sepse consiste no controle do foco infeccioso e manutenção da pressão arterial média acima de 65 mmHg com a administração intravenosa de fluídos e

vasoconstritores. O desfecho do quadro séptico é fortemente influenciado pela magnitude do comprometimento vascular, a qual se relaciona com a responsividade do paciente às terapias de suporte (FLEISCHMANN-STRUZEK et al., 2020).

Embora a sepse seja reconhecida como uma emergência médica há várias décadas, a preocupação com os sobreviventes à sepse ganhou destaque apenas em tempos mais recentes. Um estudo pioneiro publicado em 1997 observou que em um grupo de 1505 pacientes, 70% foram a óbito dois anos após o quadro de sepse (QUARTIN et al., 1997). Rahmel e colaboradores (2020) analisaram dados hospitalares de 2009 à 2016 e observaram que 62,1% dos pacientes que tiveram sepse durante a internação foram a óbito no período de 5 anos após a alta hospitalar, o que representou um aumento de 1,73 vezes no risco de mortalidade em comparação aos pacientes não sépticos (RAHMEI et al., 2020). Esses estudos demonstram que a alta letalidade não se restringe a fase aguda da doença.

Os mecanismos envolvidos no aumento do risco de mortalidade nos sobreviventes à sepse não são esclarecidos, entretanto, sabe-se que uma das principais causas é a incidência de eventos cardiovasculares, entre eles, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, acidente vascular cerebral, arritmia ventricular e morte cardíaca súbita (OU et al., 2016). Um estudo que avaliou dados de 2003 de beneficiários do seguro de saúde *Medicare*, nos Estados Unidos, observou que 29,5% dos pacientes sobreviventes à sepse (sem doença cardiovascular preexistente) tiveram eventos cardiovasculares em até um ano após a hospitalização (YENDE et al., 2014). Uma meta-análise de 27 estudos publicados entre 2005 e 2021 relatou que a hospitalização por sepse foi associada a um maior risco de incidência de eventos cardiovasculares por pelo menos 5 anos após a alta (razão de risco ajustada 1,58; intervalo de confiança 1,30 – 1,91) (KOSYAKOVSKY et al., 2021). Porém, foi possível observar uma alta variabilidade entre os estudos avaliados. Estudos de coorte mais recentes, não incluídos nessa meta-análise, demonstraram um aumento de 1,3 vezes no risco de eventos cardiovasculares até 5 anos pós-sepse (ANGRIMAN et al., 2022) e um aumento de 43% no risco de hospitalização por eventos cardiovasculares (principalmente falência cardíaca) em sobreviventes à sepse em comparação a pacientes não-sépticos (JENTZER et al., 2023). Dessa forma, apesar de não haver um consenso acerca da magnitude, diversas evidências apontam para o risco cardiovascular elevado em sobreviventes à sepse.

Ainda, sugere-se que a sepse pode induzir alterações persistentes no sistema imunológico, aumentando a suscetibilidade a infecções secundárias. Wang e colaboradores (2014) observaram um maior risco de readmissão hospitalar por infecção em até um ano pós-sepse. O tipo de infecção predominante foi pneumonia, causada por diversos patógenos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida spp.*, considerados oportunistas (WANG et al., 2014). Um estudo conduzido na Alemanha relatou resultados semelhantes; 45% dos sobreviventes à sepse foram hospitalizados com infecções em até um ano, um aumento de 9,6% em relação à pacientes não-sépticos (FLEISCHMANN-STRUZEK et al., 2022). Portanto, a causa do aumento do risco de complicações cardiovasculares pós-sepse é provavelmente multifatorial, incluindo inflamação persistente ou imunossupressão, disfunção mitocondrial, disfunção endotelial e cardiovascular persistente (MIRA et al., 2017).

Além das alterações nos sistemas imunológico e cardiovascular, disfunções neuro cognitivas e incapacidades funcionais são frequentes nos sobreviventes à sepse. O conjunto dessas alterações é atualmente denominado como síndrome pós-sepse e tem relação direta com a diminuição da qualidade de vida do paciente (GRITTE et al., 2021; MOSTEL et al., 2019; VAN DER SLIKKE et al., 2020). Por definição, a síndrome pós-sepse compreende problemas médicos, psicológicos ou cognitivos que surgem após a sepse, que requerem hospitalização e que persistem por semanas ou meses após a alta hospitalar, impactando negativamente o indivíduo e para os quais nenhum diagnóstico alternativo pode ser encontrado (VAN DER SLIKKE et al., 2023).

De certa forma, a síndrome pós-sepse se assemelha à síndrome do cuidado pós-intensivo (PICS, do inglês, *post-intensive care syndrome*), principalmente em relação à fraqueza muscular, disfunção cognitiva e psicológica. Um estudo identificou que 70% dos pacientes sobreviventes à sepse desenvolveram PICS durante os três primeiros meses após a alta da unidade de terapia intensiva (UTI) (IWASHYNA et al., 2012). Porém, o diagnóstico de síndrome pós-sepse é menos usual, pode ocorrer em intervalos maiores após a alta hospitalar, não é restrito a pacientes que ficaram internados em UTI e possui forte correlação com alterações cardiovasculares. Semelhanças também têm sido observadas na COVID longa ou pós-COVID, por meio da incidência de sequelas respiratórias, cognitivas (MONJE; IWASAKI, 2022) e no sistema cardiovascular (TANNI et al., 2022) após a fase aguda da infecção pelo vírus SARS-CoV-2.

Diante da sua complexidade, ainda não há terapia específica para a síndrome pós-sepse, e as recomendações atuais para o manejo do risco cardiovascular se resume à prática de atividade física, controle do peso e acompanhamento da pressão arterial (VAN DER SLIKKE et al., 2023). Porém, essas estratégias não são totalmente eficazes. Logo, a identificação de alvos farmacológicos é de extrema importância para se obter uma terapia eficaz para a prevenção das alterações cardiovasculares pós-sepse.

Dentre os possíveis alvos terapêuticos, destaca-se a via de sinalização do óxido nítrico (NO). Após a identificação do NO como um importante fator relaxante liberado pelo endotélio, percebeu-se a sua relevância para a saúde cardiovascular, ao mediar vasodilatação (MONCADA; HIGGS, 1993), inibição da agregação plaquetária (ANTL et al., 2007), sinalização anti-hipertrofica (MELICHAR et al., 2004), entre outros efeitos. Portanto, a potencialização dessa via se torna uma opção a ser explorada nesse grupo de pacientes. É bem estabelecido que há um aumento expressivo de NO e alterações significativas da sua sinalização durante a sepse aguda (COBB; DANNER; CASE, 1996), mas não é elucidado se essas alterações persistem a longo prazo, potencializando ou suprimindo essa via. Diante disso, o tópico a seguir irá abordar o NO e seus efetores no sistema cardiovascular. Posteriormente, será discutido a relação do NO com a sepse aguda e o possível envolvimento no pós-sepse.

1.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NO SISTEMA CARDIOVASCULAR

O NO é um gás que penetra em células, sem a mediação de um receptor de membrana. Dessa forma, a interação com o seu principal alvo, a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs), ocorre por sinalização parácrina. Apesar de possuir uma meia-vida relativamente curta (cerca de 6 segundos), o espectro de ação do NO é amplo, podendo formar novas espécies mais estáveis após ser liberado (WANG et al., 2002).

A dieta é uma fonte importante de NO. O nitrato (NO_3^-) proveniente de alimentos como beterraba e folhas verdes é convertido a nitrito (NO_2^-) por bactérias produtoras de nitrato redutase. Após a sua absorção, o nitrito pode ser reconvertido em NO, o qual pode ter efeitos sistêmicos (JANSSON et al., 2008). O NO também

pode ser sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual possui três isoformas: NOS-1 (neuronal), NOS-2 (induzível) e NOS-3 (endotelial). Em condições fisiológicas, o NO ativa principalmente a GCs, favorecendo a conversão de guanosina trifosfato (GTP) em monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), que por sua vez ativa a proteína quinase G (PKG), a qual medeia uma série de efeitos por meio da fosforilação de alvos biológicos (DENNINGER; MARLETTA, 1999; POTTER, 2011).

O GMPc é um nucleotídeo cíclico com importantes funções como segundo mensageiro intracelular. A sua comunicação está sujeita a um sistema de compartimentalização, em que os seus níveis devem ser altos o suficiente dentro de microdomínios de ação para ativar o seu principal alvo, PKG (CASTRO et al., 2006). Pelo menos dois fatores contribuem para a formação desses microdomínios de ação: 1) Estruturas celulares, como o citoesqueleto e golgi, formando barreiras físicas a sua difusão (KATO et al., 2015); e 2) Enzimas fosfodiesterase (PDE) específicas, responsáveis pela sua degradação. As PDEs hidrolisam a ligação fosfodiéster, cessando a sinalização do nucleotídeo cíclico. Onze isoformas dessa enzima são atualmente descritas, com afinidades distintas por GMPc ou monofosfato cíclico de adenosina (AMPc), sendo que as PDE5, PDE6 e PDE9 degradam prioritariamente GMPc (DUNKERLY-EYRING; KASS, 2020). Entre essas, a PDE5 é a mais explorada pela sua vasta expressão.

A PDE5 é expressa no corpo cavernoso, pulmão, plaquetas, células endoteliais, músculo liso vascular e tecido cardíaco, demonstrando relevância para o sistema cardiovascular (BLANCO-RIVERO; XAVIER, 2020). A sua transcrição é mediada por um único gene (*PDE5A*) que pode ser expresso em três isoformas (PDE5A1, PDE5A2 e PDE5A3), as quais compartilham o mesmo domínio catalítico e são amplamente distribuídas nos tecidos (LIN et al., 2002). Por volta de 1986, um inibidor da PDE5 (iPDE5) foi desenvolvido no intuito de ser utilizado no tratamento da angina. Porém, o composto demonstrou ser extremamente eficaz no tratamento da disfunção erétil. O iPDE5 (hoje conhecido como sildenafil) demonstrou-se capaz de potencializar o efeito vasodilatador do NO, o qual é liberado pelos nervos cavernosos durante o estímulo sexual, recebendo aprovação para uso clínico em 1998 (GHOFRANI; OSTERLOH; GRIMMINGER, 2006).

Em seguida, estudos demonstraram o efeito benéfico do sildenafil e outros iPDE5, como tadalafila e vardenafila, em modelos de hipertensão pulmonar

(CORBIN et al., 2005; ZHAO et al., 2001), o que culminou na aprovação para o tratamento dessa condição em 2005. Atualmente, a tadalafila também é aprovada para o tratamento de sintomas urinários do trato inferior, em pacientes com hiperplasia prostática benigna, por exemplo. Além disso, o seu reposicionamento também tem sido extensivamente avaliado em diversas patologias, destacando-se ensaios clínicos que apontam para o seu efeito benéfico em pacientes com falência cardíaca (HUBERS et al., 2022; VINNAKOTA et al., 2023; WAN et al., 2021).

A PKG é uma importante proteína efetora da via de sinalização do NO. Descrita em 3 isoformas ($I\alpha$, $I\beta$ e II), a PKGI é a mais relevante no sistema cardiovascular. A PKGI α é mais predominante no cardiomiócito e a maioria dos efeitos são atribuídos a essa isoforma. A ligação de 4 moléculas de GMPc à PKGI induz uma mudança conformacional que permite a ligação de peptídeos ao seu domínio catalítico e, conseqüentemente, a fosforilação das proteínas alvo (SCOTT, 1991). Os principais alvos de fosforilação da PKGI e mecanismo biológico associado no músculo liso vascular e cardiomiócito estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Alvos de fosforilação da PKG e mecanismo biológico no músculo liso vascular e cardiomiócito

Local	Isoforma	Alvo de fosforilação	Mecanismo biológico	Referência
Músculo liso vascular	PKGI α	Canais para potássio ativados por cálcio (BKCa e KCa 1.1)	Inibição do influxo de cálcio e hiperpolarização da membrana	Fukao et al. (1999)
		Fosfolambana (PLN)	Aumento do sequestro de cálcio pelo retículo sarcoplasmático	Hofmann et al., (2009)
		Cadeias leve de miosina (MLCK)	Inibição da afinidade da MLCK pelo complexo cálcio-calmodulina	Surks et al. 1999
	PKGI β	Substrato de cGMP quinase associado ao receptor IP3 (IRAG)	Inibição do influxo de cálcio via inositol trifosfato (IP3)	Schlossmann et al. 2000.
		Canais de Ca ²⁺ dependentes de voltagem (LTCC)	Diminuição da probabilidade de abertura e entrada de cálcio	Yang et al., 2007
		Titina e troponina I	Aumento do relaxamento diastólico	Layland; Solaro; Shah, 2005
Cardiomiócito	PKGI	Proteína C de ligação	Diminuição da sinalização	Thoonen et al.

à miosina (cMyBP-C)	de remodelação cardíaca	2015
Reguladores da sinalização da proteína G (RGS)	Inibição da hiperativação de receptores acoplados a proteína G	Takimoto et al. 2009
Tuberina (TSC2)	Aumento de função proteassomal e autofagia de miócitos danificados por meio da ubiquitinação	Ranek et al. 2019
Canal catiônico de potencial transitório 6 (TRPC6)	Inibição do influxo de cálcio relacionado a ativação da calcineurina	Koitabashi et al. 2010
Fator nuclear de células T ativadas (NFAT)	Bloqueio da sinalização calcineurina/NFAT	Koitabashi et al. 2010
Canais da membrana interna mitocondrial	Diminuição da sinalização oxidativa mitocondrial	Frankenreiter et al. 2017

Fonte: Elaborada pelo autor.

Dessa forma, o principal efeito biológico resultante da ação da PKGI no músculo liso vascular é a vasodilatação, contribuindo para a redução da pressão arterial média e aumento do fluxo sanguíneo (SCOTT, 1991). Contudo, a PKGI também tem sido associada à inibição da proliferação de células do músculo liso vascular e fosforilação inibitória da GTPase RhoA (FRANCIS; BUSCH; CORBIN, 2010; SELLAK et al., 2013). No tecido cardíaco, a sinalização da PKGI medeia a diminuição da força de contração (efeito ionotrópico negativo), aumento do relaxamento diastólico (efeito lusotrópico positivo) e efeitos anti-hipertróficos (ADLER et al., 2020).

A ativação de PKGI no cardiomiócito também está relacionada a fosforilação de canais da membrana interna mitocondrial. A abertura desses canais pela PKGI tem sido relacionada a um aumento de K⁺ na matriz mitocondrial e diminuição da sinalização oxidativa mitocondrial (COSTA et al., 2005; FRANKENREITER et al., 2017).

Outro alvo, amplamente descrito, é a fosfoproteína estimulada por vasodilatador (VASP), essa proteína foi originariamente identificada em plaquetas e a sua fosforilação é associada a inibição da ativação e agregação plaquetária (HALBRIIGGES et al., 1990). Recentemente, o aumento da fosforilação dessa

proteína no tecido cardíaco tem sido associado à proteção de danos de isquemia-reperfusão (KÖHLER et al., 2018).

1.3 IMPLICAÇÕES DO ÓXIDO NÍTRICO NA SEPSE AGUDA E PÓS-SEPSE

É bem estabelecido que ocorre produção excessiva de NO durante o quadro agudo de sepse, mediada principalmente (mas não somente) pela NOS-2, o que já foi demonstrado em modelos de sepse experimental (NARDI et al., 2014; ROSALES et al., 2021; VASQUES-NÓVOA et al., 2018). As propriedades citotóxicas do NO e seus produtos auxiliam na defesa do hospedeiro e ativam respostas imunológicas (revisado em SPILLER et al., 2019). Ao mesmo tempo, devido ao efeito vasodilatador dessa molécula, o aumento de NO também contribui para o quadro de hipotensão severa e refratária observado na sepse. Esse efeito é mediado tanto pela via clássica (NO/GCs/GMPc/PKG), quanto por modificações pós traducionais em proteínas, como nitrosilação (BENEDET et al., 2018), e formação de peroxinitrito (ONOO^-), produto da reação do NO com o ânion superóxido (O_2^-) (NIN et al., 2011).

O NO está envolvido no mecanismo de dessensibilização dos receptores de angiotensina II do tipo 1 (AT1) (BUCHER et al., 2001) e α_1 -adrenérgico (KANDASAMY et al., 2016) nos vasos, e do receptor β -adrenérgico no tecido cardíaco (DAL-SECCO et al., 2017), contribuindo para a diminuição da resposta vasoconstritora à angiotensina II e agonistas adrenérgicos, bem como para a depressão miocárdica que é observada na sepse. Sugere-se que o NO e S-nitrotióis regulam a atividade da quinase-2 do receptor acoplado à proteína G (GRK2) por S-nitrosilação, induzindo a internalização de receptores acoplados à proteína G nos vasos e no coração (DAL-SECCO et al., 2017; WHALEN et al., 2007).

Diante disso, a inibição da formação de NO já foi apontada há várias décadas como alvo da terapia da sepse. Estudos iniciais demonstraram que a inibição não-específica de NOS reverteu a hipotensão e hiporresponsividade à vasoconstritor associada à sepse (HOLLENBERG; CUNNION; ZIMMERBERG, 1993). Porém, os resultados não se confirmaram em estudos posteriores e em ensaios clínico, em que a inibição global da NOS aumentou a mortalidade de pacientes com choque séptico (LÓPEZ et al., 2004). Um estudo subsequente demonstrou que a inibição da GCs foi benéfica 20 horas após a indução de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP), mas aumentou a mortalidade dos animais se

inibida 8 horas pós-CLP (FERNANDES et al., 2009). Portanto, a liberação inicial de NO parece ser importante para iniciar a defesa imunológica e preservar a microcirculação na fase inicial da sepse (Revisado em LAMBDEN, 2019). Isso destaca o papel dual do NO na sepse, sendo um desafio modular os seus níveis corretamente.

Apesar da clara demonstração da desregulação da via de sinalização do NO durante a sepse aguda, não se sabe se essas alterações se mantêm à longo prazo. Estudos já demonstraram que o aumento sustentado de NO pode induzir uma supressão subsequente da GCs (DAO et al., 2020; SAYED et al., 2007). Portanto, é possível que a sepse induza alterações à longo prazo na via de sinalização do NO, contribuindo para a disfunção cardiovascular observada em sobreviventes à sepse.

Ao contrário da diminuição da reatividade vascular que ocorre na sepse aguda, estudos experimentais têm demonstrado aumento da contratilidade em sobreviventes à sepse. Um estudo observou o aumento da contração induzida por angiotensina II na aorta de ratos, 60 dias após a indução de sepse por CLP. Não foi identificado o aumento da expressão de receptores AT1, porém foi observado a diminuição da atividade endógena da enzima antioxidante superóxido dismutase, aumento de ONOO^- e da produção de superóxido frente ao estímulo com angiotensina II na aorta dos ratos sobreviventes à sepse (DE SOUZA et al., 2016). Além disso, foi observado hiperreatividade à fenilefrina em anéis aórticos de camundongos 15 dias pós-CLP, a qual foi significativamente atenuada após a incubação dos vasos com losartana, tiron e ibuprofeno, sugerindo o envolvimento do receptor AT1, espécies reativas de oxigênio (EROs) e derivados da enzima ciclooxigenase (COX) (NÓBREGA, 2021).

O desequilíbrio redox com predomínio de espécies oxidantes pode induzir o desacoplamento do dímero da NOS-3, favorecendo a formação de O_2^- em detrimento da produção NO (LUNDBERG; GLADWIN; WEITZBERG, 2015). Nesse contexto, um estudo experimental demonstrou o aumento de O_2^- e diminuição de NOS-3 na aorta de ratos, 90 dias após a indução de sepse por CLP (MERDJI et al., 2021). Além disso, é possível que a biodisponibilidade do NO também seja prejudicada pela reação com O_2^- e formação de ONOO^- , mecanismo já demonstrado em algumas formas de comprometimento cardiovascular, como aterosclerose e insuficiência cardíaca (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018; KARBACH et al., 2014; SHIMABUKURO, 2023).

Os demais componentes da via de sinalização de NO também são afetados sob condições oxidantes. A GCs se torna insensível ao NO e propensa à degradação proteolítica (MEURER et al., 2009), o que pode contribuir para a diminuição dos níveis de GMPc e atividade da PKG, conforme já foi identificado em pacientes com insuficiência cardíaca (VAN HEEREBEEK et al., 2012).

A nitrosilação e subsequente oxidação da PKG α tem sido associada a uma sinalização hipertrófica e apoptótica no tecido cardíaco (NAKAMURA et al., 2018; PRYSYAZHNA et al., 2016). E a sua nitração por ONOO $^-$ foi identificada no pulmão de pacientes com hipertensão pulmonar, sendo relacionada ao aumento da remodelação vascular e vasoconstrição (ZHAO et al., 2009). Dada a importância da atividade da PKG no sistema cardiovascular, a sua alteração pode ser um mecanismo envolvido na disfunção cardiovascular pós-sepse.

Notoriamente, o estudo de Souza et al., (2016) demonstrou a potencialização da via RhoA-Rho quinase por meio da diminuição do efeito vasodilatador de um inibidor da Rho-quinase (ROCK) e aumento da expressão de RhoA na aorta de ratos 60 dias pós-sepse (DE SOUZA et al., 2016). Visto que a PKG α induz a fosforilação inibitória de RhoA (KATO et al., 2012), as alterações observadas por de Souza et al. (2016) podem estar relacionadas a uma redução na atividade da via de sinalização do NO, e, em última análise, da PKG α .

Portanto, diversas evidências suportam que a via NO-GCs-GMPc-PKG pode estar comprometida à longo prazo pós-sepse. Assim, a restauração dessa via de sinalização pode ser uma alternativa para prevenir alterações cardiovasculares em sobreviventes à sepse. Neste sentido, a inibição da PDE5 pode ser uma estratégia para estimular esta via. Entre as opções terapêuticas atuais, os iPDE5 tem se destacado pelo efeito benéfico demonstrado em diversas doenças cardiovasculares, como infarto, insuficiência cardíaca e doença arterial periférica (TZOUMAS et al., 2020). Ainda, essa classe é utilizada na clínica há mais de duas décadas e possui o perfil de segurança bem estabelecido. A utilização do fármaco tadalafila pode ser vantajosa por exibir alta seletividade para PDE5 e ter o maior tempo de meia-vida (cerca de 16 horas) entre os compostos da sua classe (ANDERSSON, 2018; SHEN et al., 2020).

Para avaliar o reposicionamento do fármaco tadalafila, estudos em modelos experimentais são essenciais. Entretanto, a desconexão entre modelos animais de sepse e a condição humana tem sido uma preocupação constante ao longo dos

anos, que permanece até os dias atuais. Recentemente, a campanha *Surviving Sepsis*, dedicada a reduzir a mortalidade da sepse, definiu como uma das prioridades da campanha de 2023 o refinamento de modelos experimentais de sepse (DE BACKER et al., 2024), tema que será abordado no tópico a seguir.

1.4 REFINAMENTO DA SEPSE EXPERIMENTAL

O modelo CLP foi desenvolvido e padronizado há várias décadas e é amplamente utilizado para indução de sepse em animais experimentais (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; RITTIRSCH et al., 2009). Esse modelo consiste na abertura do abdômen do animal, ligação do ceco, perfuração e extravasamento do conteúdo cecal no peritônio, induzindo uma peritonite polimicrobiana que evolui para o quadro de sepse. Uma limitação relevante desse modelo é a dificuldade de manter um grau de severidade padronizado entre os procedimentos realizados, visto que o comprimento da ligadura e a quantidade de conteúdo extravasado interfere diretamente na carga bacteriana, bem como na intensidade da resposta inflamatória e imunológica. Diante disso, o modelo foi aprimorado e modificado ao longo dos anos, a fim de aumentar a reprodutibilidade (SONG; ZOU; CAO, 2018). Ainda assim, a variabilidade e invasividade inerente ao modelo permanecem em discussão. Remick et al., (2019) observaram que há uma grande discrepância nos resultados entre os estudos que avaliaram o mesmo tratamento na mortalidade do modelo CLP, destacando a necessidade de refinar os modelos atuais de sepse experimental.

Nesse contexto, a padronização da carga bacteriana e a redução de procedimentos invasivos relacionados à dor, são relatados como fatores que podem reduzir a variabilidade de modelos experimentais de sepse (LILLEY et al., 2015). Diante disso, a administração intraperitoneal de uma suspensão de conteúdo cecal pode ser uma alternativa para substituir o CLP. Esse modelo, majoritariamente conhecido como *cecal slurry* (CS), possui as vantagens de permitir a administração de uma quantidade conhecida de conteúdo cecal em todos os animais, facilitando a padronização, além de excluir a necessidade de anestesia e cirurgia, diminuindo a invasividade do procedimento. O modelo CS tem sido bastante utilizado para a indução de sepse em camundongos nos últimos anos (SHRUM et al., 2014; STARR et al., 2014). Entretanto, poucos estudos aplicaram o modelo em ratos e há escassa informação na literatura se esse método reproduz as alterações cardiovasculares

associadas à sepse (FANG et al., 2020), limitando a sua propagação. Nesse contexto, a comparação das alterações cardiovasculares agudas induzidas pelos modelos CLP e CS se torna extremamente relevante.

1.5 HIPÓTESE

Diante do exposto, a hipótese desse trabalho é que o modelo *cecal slurry* reproduz a disfunção cardiovascular associada a sepse aguda e induz alterações persistentes na via de sinalização do óxido nítrico, as quais contribuem para o comprometimento cardiovascular à longo prazo. Assim, o aumento dos níveis de GMPc por meio do tratamento crônico com o inibidor da PDE5, tadalafila, é capaz de prevenir as alterações cardiovasculares pós-sepse.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as alterações cardiovasculares na sepse aguda e no pós-sepse em ratos submetidos ao modelo *cecal slurry*, bem como o efeito do tratamento crônico com a tadalafila nos sobreviventes à sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o modelo de indução de sepse em ratos por *cecal slurry* e comparar com o modelo de ligação e perfuração cecal.
- Avaliar o período de recuperação pós-sepse e definir o período de tratamento.
- Avaliar as alterações vasculares e cardíacas 15 e 30 dias após a indução de sepse.
- Avaliar os efeitos sistêmicos do tratamento com tadalafila, bem como o impacto nas alterações cardiovasculares e via de sinalização do óxido nítrico em ratos sobreviventes à sepse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SOLUÇÕES, DROGAS, REAGENTES E MATERIAIS UTILIZADOS

- i) Soluções e sais: ácido fosfórico; EDTA/ácido etilenodiamino tetra-acético (Sigma- Aldrich™, St. Louis, Estados Unidos); citrato de sódio dihidratado (Merck, Darmstadt, Alemanha); hidróxido de sódio (Synth; Diadema; Brasil); nitrato de sódio e nitrito de sódio (Reagen; Colombo; Brasil); paraformaldeído (Neon; Suzano, Brasil); reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico e 0,1% de α -naftil-etilenodiamina em água Milli-Q; 1:1); solução tampão fosfato-salina/PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH_2PO_4 1,5 mM; $\text{Na}_2\text{HPO}_4/7\text{H}_2\text{O}$ 110,8 mM; pH 7,4 - Merck; Darmstadt, Alemanha); solução tampão fosfato-salina/PBS 1 M (KH_2PO_4 1 M; K_2HPO_4 1 M - Synth; Diadema; Brasil); solução nutritiva de Krebs (NaCl 118 mM; KCl 4,7 mM; CaCl_2 2,5 mM; MgSO_4 1,1 mM; KH_2PO_4 0,9 mM; NaHCO_3 25 mM e D-glucose 11 mM; pH 7,4 - Merck; Darmstadt, Alemanha); solução nutritiva de Krebs modificada para Langendorff (NaCl 113 mM; KCl 4,7 mM; CaCl_2 1,35 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2 mM; KH_2PO_4 1,1 mM; NaHCO_3 22 mM e D-glucose 11 mM; pH 7,4 - Merck; Darmstadt, Alemanha); solução salina (NaCl 0,9% - Merck, Darmstadt, Alemanha); tampão NADPH (KH_2PO_4 50 mM; EGTA 1 mM; Sacarose 150 mM; pH 7,4 – Merck; Darmstadt, Alemanha).
- ii) Drogas: angiotensina II humana (#A9525), cloridrato de acetilcolina (#A6625); cloridrato de fenilefrina (#A6126) e bitartarato de noradrenalina (#A9512) (Sigma- Aldrich™, St. Louis, Estados Unidos), albendazol (DISPEC, Maringá, Brasil); Beniv® (buprenorfina – Ourofino Saúde Animal; Campo Largo, Brasil); cloridrato de quetamina 10%, cloridrato de xilazina 2% e Isoflurano (Syntec; Barueri, Brasil); heparina (Hemofol®; Cristália, São Paulo; Brasil); nitroprussiato de sódio (Nuclear; Diadema; Brasil); Pentabiótico® veterinário (Zoetis; Nova Jersey, USA); tadalafila – princípio ativo (Vita Essência; Florianópolis, Brasil); cloridrato de tramadol (Teuto; Anápolis, Brasil).
- iii) Sondas fluorescentes: DAF-FM/diacetato de diaminofluoresceína (#D23844) e DHE/dihidroetídio (#D11347) (Invitrogen, Carlsbad, USA); DAPI/4',6-diamidino-2-fenilindol (#D9542, Sigma- Aldrich™, St. Louis, Estados Unidos).
- iv) Outros materiais: ágar Mueller-Hinton, lâmina ponta fosca e lamínula 24 × 40 mm (Kasvi; São José do Pinhais, Brasil); CC/Mount™ (#C9368), DAN/2,3 – diaminoftaleno (#D2757), glicerol para biologia molecular (#G5516), GSH/L-

glutathiona reduzida (#G4251), HTAB/brometo de hexadeciltrimetilamônio (#H5882), poli-L-lisina (#P8920), IBMX/isobutil-metilxantina (#I5879), NAG/n-acetil-glucosamina (#N9376), NEM/n-etil-maleimida (#E3876), OPT/o-ftalaldeído (#P1378) e TMB/3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (#T444) (Sigma-AldrichTM, St. Louis, Estados Unidos); álcool etílico absoluto, xileno e parafina histológica em lentilhas (Neon; Suzano; Brasil); azul de anilina, escarlat de Bielbrich, glicina e TCA/ácido tricloroacético (Nuclear; Diadema; Brasil); diferenciador de Masson (ácido fosfomolibdico 2,5% e ácido fosfotúngstico 2,5%; doado pelo Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da UFSC); CMC/carboximetilcelulose (DEG Importação; São Paulo; Brasil); eosina amarelada e hematoxilina de Harris (Lafan Química Fina; Indaiatuba; Brasil); Entellan® e sulfato de zinco (Merck; Darmstadt, Alemanha); éter etílico (Dinâmica Química Contemporânea; Indaiatuba; Brasil); fio de sutura agulhado de nylon 3-0 (Procare; Osasco, Brasil); GMPc ELISA kit (#581021), lucigenina (#14872) e NADPH/nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (#9000743) (Cayman Chemical; Ann Arbor; Estados Unidos); hidróxido de amônio (Synth; Diadema; Brasil); meio de congelamento *optimum cutting temperature* – O.C.T *Tissue Plus* (Fisher HealthCare, Hampton, Estados Unidos); mistura carbogênica e nitrogênio gasoso comprimido (White Martins, Governador Celso Ramos, Brasil); monitor Accutrend® plus e fitas reagente para lactato (Roche, Basileia, Suíça); monitor de glicemia e fitas reagente (On Call Plus®, ACON BIOTECH, Hangzhou, China); ração animal (Puro Trato, Santo Augusto - RS, Brasil); reagente de Bradford (BioRad; Califórnia; Estados Unidos).

- v) Softwares: LabChart v.8 (Ad Instruments, Dunedin, Nova Zelândia); ImageJ® (National Institutes of Health, Bethesda, USA); GPower 3.1.9.4. (Heinrich Heine Universität Düsseldorf; Alemanha); GraphPadPrism 9.0.1 (GraphPadSoftware; Boston, USA).
- vi) Equipamentos: analisador bioquímico automático (Dimension EXL, Siemens, Munich, BY, Alemanha); balança T-BAL-0030.00 (Incoterm®, Porto Alegre, Brasil); banho-Maria 1100 (Fanem, Guarulhos, Brasil); centrífuga 5804 (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha); centrífuga refrigerada VS-15000CFN II (Vision; Maryland, USA); contador hematológico Maxcel 300 VET (MedMAX, Barueri, Brasil); corador de lâminas Autostainer XL® e criostato CM 1850

(Leica®; Wetzlar, Alemanha); laser doppler monitor (Moor Instruments, Millwey, Reino Unido); leitor de placas ELx800 SpectraMax (Bio-tek Instruments, Vermont, Estados Unidos); máquina de gelo EGE 300M (Everest, Rio de Janeiro, Brasil); ultrapurificador Direct-8 Milli-Q (Merck Millipore, Molsheim, França); bomba de Infusão EFF 311B (Insight, Ribeirão Preto, Brasil); medidor de pH mPA-210 (MS Tecnozon, Piracicaba, Brasil); microscópio de fluorescência (Leica DMI 3000B, Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Germany); microscópio vertical BX41, microscópio invertido IX83 e micrótomo Cut 4055 (Olympus®, Center Valley, PA, Estados Unidos); multileitora infinite M200 (Tecan®, Männedorf, Suíça); PowerLab (Ad Instruments, Dunedin, Nova Zelândia); homogeneizador de tecidos *tissue tearor* X1020 (Intern. Laborat. App.; Dottingen; Suíça).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*) machos da linhagem *Wistar* provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brasil). Os animais foram ambientados no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia por pelo menos 7 dias antes do início da experimentação nas seguintes condições: caixas com cama de maravalha (4-5 animais por caixa), temperatura de 22 °C ± 2, ciclo claro/escuro automático de 12 horas, ração e água *ad libitum*. As caixas foram trocadas duas vezes por semana. Sete a dez dias antes do início da experimentação, os animais foram tratados com uma dose única de 150 mg/kg do anti-helmíntico albendazol. A experimentação foi realizada em animais de 90 a 100 dias de idade e 300 a 400 gramas, entre 07:00 e 19:00 horas (ciclo claro). Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolos 9785211221 e 7262240423) e estão de acordo com as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Além disso, a condução e descrição dos experimentos foi baseada nas diretrizes ARRIVE (do inglês, *animal research: reporting of in vivo experiments*) (DU SERT et al., 2020).

3.2.1 Protocolos analgésicos

- i) Tramadol: 10 mg/kg i.p. antes da indução de sepse + 5 mg/kg i.p. 12/12 horas por 3 dias.
- ii) Buprenorfina: 0,03 mg/kg s.c. antes da indução de sepse e a cada 8 horas por 3 dias.

3.2.2 Protocolos anestésicos

- i) Isoflurano: 5% para indução + 3% para manutenção, ambos combinados com 100% oxigênio via respiratória.
- ii) Quetamina (90 mg/kg) + Xilazina (10 mg/kg) i.m.

3.2.3 Protocolo de eutanásia

- i) Sobredose anestésica: Quetamina (90 mg/kg) + Xilazina (10 mg/kg) i.m. para anestesia inicial, seguido de quetamina (45 mg/kg) i.v. (administrado pela veia gengival).

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA INDUÇÃO DE SEPSE AGUDA POR CECAL SLURRY (COMPARAÇÃO COM LIGAÇÃO E PERFURAÇÃO CECAL)

3.3.1 Indução de sepse por ligação e perfuração cecal

O procedimento foi realizado conforme descrito por Rittirsch et al., (2009), com algumas adaptações. Os animais receberam analgesia preemptiva com tramadol (conforme item 3.2.1 i) e em seguida foram submetidos a anestesia geral inalatória com isoflurano (conforme item 3.2.2 i) sob manta de aquecimento (37 °C). Após a confirmação da anestesia, o local de incisão foi limpo com álcool iodado (iodo 0,1% e álcool etílico 50% v/v) e os animais foram submetidos a laparotomia longitudinal de aproximadamente 1,5 cm na linha alba do abdome. O ceco foi exteriorizado e o seu lúmen foi reduzido por uma ligadura não obstrutiva acima da válvula íleo-cecal. Em seguida, o ceco foi perfurado com uma agulha 22G (25 × 0,7 mm) e comprimido até o extravasamento de cerca de 5 mm de conteúdo cecal. Após o reposicionamento do ceco no peritônio, o plano muscular e a cavidade abdominal

foram suturados com fio de nylon 3-0. Os animais receberam reposição volêmica com solução NaCl 0,9% (50 mL/kg; 37 °C) pela via subcutânea e foram mantidos em camas de maravalha sob aquecimento por pelo menos duas horas.

3.3.2 Padronização do modelo de indução de sepse por cecal slurry

3.3.2.1 *Preparação do cecal slurry*

O conteúdo cecal foi coletado diretamente do ceco de animais doadores. Para isso, os doadores foram sacrificados por sobredose anestésica (conforme item 3.2.3) e, imediatamente após, o ceco foi dissecado e o seu conteúdo coletado em uma placa de Petri. O conteúdo foi pesado e diluído em tampão fosfato-salina (PBS) estéril a fim de formar uma suspensão de 200 mg/mL, a qual foi filtrada 3 vezes, primeiramente em uma malha de nylon de 70 mm para a remoção das partículas maiores e em seguida em filtro *mesh* 60 e 100. O filtrado foi transferido para uma proveta para medição do volume e o mesmo volume de glicerol 30% foi adicionado e homogeneizado, obtendo uma suspensão de 100 mg/mL e 15% de glicerol, a qual foi alíquotada e armazenada em ultra freezer (–80 °C). Para confirmar a viabilidade das bactérias, foi realizado o plaqueamento de 10 µL da suspensão cecal em ágar Mueller Hinton em diluições seriadas com PBS estéril (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000) à fresco e após o congelamento. A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas e em seguida avaliou-se as unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

3.3.2.2 *Aplicação do cecal slurry*

Os animais receberam analgesia com tramadol (conforme item 3.2.1 i). O CS foi descongelado em banho maria à 37 °C. Após o equilíbrio térmico, 10 µL/g de CS foi aplicado no peritônio dos animais utilizando agulha 20 × 0,55 mm, portanto, a dose final de conteúdo cecal administrada foi de 1 g/Kg. Essa dose foi determinada experimentalmente, conforme descrito no item 3.3.2.3.

Imediatamente após a injeção, os animais receberam reposição volêmica com 50 mL/kg de solução NaCl 0,9% aquecida a 37 °C, via subcutânea.

3.3.2.3 *Determinação da dose de cecal slurry*

A dose foi escolhida com base na porcentagem de sobrevivência dos animais após a aplicação. Para isso, os animais foram submetidos a aplicação intraperitoneal de 1; 1,5 ou 2 g/kg de CS. A sobrevivência foi avaliada a cada 12 horas por 5 dias. Foi considerada como a dose mais apropriada para a condução desse estudo, a qual mais se aproximou de 50% de sobrevivência (porcentagem usualmente observada no modelo CLP nos estudos anteriores do laboratório).

3.3.2.4 *Avaliação da disseminação bacteriana para órgãos e tecidos*

Vinte e quatro horas após a indução de sepse, os animais foram sacrificados por sobredose anestésica (3.2.3) e o material biológico foi coletado sob condições assépticas. O lavado peritoneal e o sangue foram coletados por punção intraperitoneal e cardíaca, respectivamente. Na sequência, os animais foram perfundidos por 1 minuto com PBS estéril e aproximadamente 100 mg do tecido pulmonar e hepático foram coletados e homogeneizados com 200 µL de PBS estéril.

As amostras foram imediatamente diluídas em PBS estéril (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000) e 10 µL de cada diluição foi plaqueada em meio de cultura ágar Mueller-Hinton. As placas foram incubadas a 37 °C e, após 24 horas, as UFC foram contabilizadas. O crescimento bacteriano foi expresso como Log UFC/mL. Os resultados foram comparados com amostras de ratos naïve, sem intervenção.

3.3.3 Acompanhamento do quadro séptico

O escore de sepse foi baseado no estudo de Shrum et al., (2014), o qual descreve a avaliação de sete parâmetros: aparência do pelo do animal, nível de consciência, atividade, resposta a estímulos, aparência dos olhos, frequência e qualidade da respiração. Cada animal foi avaliado individualmente, 6 e 24 horas após a indução da sepse, e recebeu um escore de 0 à 4 para cada parâmetro, sendo 0 o estado normal e 4 o estado mais alterado, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros avaliados no escore de sepse

Parâmetro	0	1	2	3	4
Aparência	Pelagem lisa	Pontos de piloereção	Maioria com piloereção	Rato “inchado”	Rata “raquítico”
Nível de consciência	Rato ativo	Rato evita ficar de pé	Rato lento	Pouco movimento com tremor	Rato imóvel
Atividade	Comer, beber, escalar, correr, lutar	Rato se move pouco	Rato com movimentos de investigação ocasionais	Rato parado	Rato parado com tremores nas patas traseiras
Resposta ao estímulo	Responde imediatamente a som e toque	Resposta lenta ao estímulo auditivo	Sem resposta ao estímulo auditivo	Sem resposta ao estímulo auditivo, resposta suave ao toque	Sem resposta ao estímulo auditivo e ao toque
Olhos	Aberto	Com secreções	Parcialmente fechado, com secreção	Semicerrados, com secreções	Olhos fechados ou leitosos
Taxa de respiração	Normal – Rápida	Respiração lenta	Respiração diminuída (perceptível a olho nu)	Respiração severamente diminuída	Respiração extremamente diminuída (> 1 s entre respirações)
Qualidade de respiração	Normal	Breves períodos de respiração difícil	Respiração difícil	Suspiros intermitentes	Ofegante

Fonte: Adaptado de Shrum et al., 2014.

Os níveis de lactato no sangue foram avaliados no mesmo período. Para isso, uma gota do sangue periférico foi coletada diretamente da cauda dos animais e a concentração de lactato foi imediatamente mensurada em fitas reagentes por meio do aparelho Accutrend® Plus. O valor de lactato foi expresso como mmol/L.

3.3.4 Avaliação da sobrevivência à sepse

Os animais foram submetidos à sepse por CLP ou CS, nas condições supracitadas. Em seguida, o número de animais sobreviventes em cada grupo foi contabilizado a cada 12 horas, durante 5 dias. Foi estabelecido que, a qualquer momento do experimento, animais que demonstrassem escore de sepse acima de 13 ou sinais de sofrimento excessivo, como incapacidade de se locomover ou de se

alimentar, poderiam ser imediatamente sacrificados por sobredose anestésica (*endpoint* humanitário).

3.3.5 Avaliação hemodinâmica

A avaliação hemodinâmica foi realizada 24 horas após a indução de sepse em animais anestesiados com quetamina-xilazina (3.2.2 item ii). Por se tratar de um experimento terminal, não foi administrado analgesia preemptiva. Os procedimentos foram realizados sob manta de aquecimento a 37 °C e a anestesia foi reforçada com metade da dose de quetamina a cada 30 min, se necessário (45 mg/kg i.m.).

A veia jugular direita e a artéria carótida esquerda foram isoladas e cânulas de polietileno 20 e 50 (preenchidas com solução NaCl heparinizada 50 UI/mL) foram inseridas. Cerca de 100 µL da solução heparinizada foi injetada pelo acesso venoso a fim de evitar possíveis coágulos. A cânula arterial foi conectada a um transdutor de pressão acoplado ao sistema de aquisição de dados PowerLab®, obtendo-se os valores basais de pressão arterial média (mmHg) e frequência cardíaca (bpm).

Foi realizada uma incisão de aproximadamente 2,5 cm na lateral esquerda do animal (logo abaixo da última costela) para o acesso da cavidade abdominal. O rim esquerdo foi identificado e isolado com algodões umedecidos com solução NaCl 0,9% a fim de evitar o ressecamento do órgão. A probe do equipamento Laser Doppler acoplado ao PowerLab® foi posicionada acima do centro do órgão, sendo obtidos os valores de fluxo sanguíneo do córtex renal em unidades arbitrárias de perfusão (UP).

Após 10 minutos de estabilização, a resposta pressórica foi avaliada por meio da administração intravenosa de agentes vasoativos em doses crescentes e não cumulativas: angiotensina II (0,3; 1; 3; 10 e 30 pmol/kg) e fenilefrina (0,3; 1; 3; 10 e 30 nmol/kg). Os valores foram registrados em um computador pelo software LabChart e expressos como o integral relativo ao basal (mmHg/s) que integra a variação da pressão arterial média (mmHg) pela duração da resposta pressórica (segundos).

3.3.6 Avaliação da resposta contrátil *ex vivo*

Em um novo bloco de experimentos, animais anestesiados com quetamina-xilazina (3.2.2 ii) tiveram a aorta torácica coletada e transferida imediatamente para uma placa de Petri com solução nutritiva de Krebs a 4 °C. Após a retirada de todo o tecido adiposo perivascular, o vaso foi seccionado em anéis de 4 mm e montado em um miógrafo de tensão nas seguintes condições: solução nutritiva de Krebs; 37 °C; 5% CO₂; 95% O₂. A tensão basal foi ajustada para 3 g e mantida durante 45 minutos, com troca da solução nutritiva a cada 15 minutos para a estabilização da preparação. Em seguida, foi adicionado uma solução de KCl 60 mM para a avaliação da viabilidade dos vasos. A contração foi mantida por 5 minutos e, em seguida, a preparação foi lavada 3 vezes. Os anéis foram estabilizados por 30 minutos com troca da solução nutritiva a cada 10 minutos, e a tensão foi ajustada novamente para 3 g, se necessário. Em seguida, foi adicionado 1 µM de fenilefrina e, após alcançar o platô de contração, 1 µM de acetilcolina. A integridade do endotélio foi avaliada pela resposta vasorelaxante induzida pela acetilcolina após a pré-contratação. O percentual médio de relaxamento dependente do endotélio foi de $90 \pm 3,7\%$. As preparações foram lavadas 3 vezes e estabilizadas por 30 minutos (1 troca a cada 10 minutos). Ao final do período de estabilização, as aortas foram avaliadas quanto a responsividade vascular frente a adição de concentrações cumulativas de fenilefrina (0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 µM). A tensão foi registrada por transdutores de tensão isométrica (Panlab, modelTRI 201) acoplados a um sistema de aquisição de dados PowerLab 8/30, registrados pelo Software LabChart 8. Os dados foram representados graficamente em um gráfico do tipo XY, relacionando a resposta contrátil (em gramas) à concentração do fármaco em escala logarítmica a fim de obter uma curva sigmoide. O ajuste da curva foi realizado por regressão não linear, utilizando o modelo de quatro parâmetros. Além disso, cada curva concentração-resposta foi avaliada individualmente, a fim de obter os dados de efeito máximo (E_{max}), logaritmo da concentração efetiva média ($LogCE_{50}$), e área sob a curva (AUC).

3.3.7 Determinação do nível plasmático de nitrato e nitrito (NOx)

Os níveis plasmáticos dos produtos da oxidação do óxido nítrico (nitrato e nitrito; NOx) foram estimados por um método espectofotométrico. Após a centrifugação do sangue ($1.500 \times g$; 10 min; 4 °C), o plasma obtido foi

homogeneizado com sulfato de zinco 20% (p/v) (para desproteinização) na proporção 1:10 da amostra diluída, seguido de banho de gelo (1 hora, 4 °C). Após nova centrifugação ($7.300 \times g$; 15 min; 4 °C), o sobrenadante foi incubado a 37 °C com *Escherichia coli* para a conversão de nitrato em nitrito durante 3 horas. O reagente de Griess foi utilizado para revelação. As absorbâncias foram determinadas em 540 nm utilizando o leitor de placas SpectraMAX e comparadas com curva-padrão de nitrato e nitrito (0 a 150 μ M). Por meio de regressão linear, os valores foram expressos como μ M de NOx.

3.3.8 Dosagem plasmática de marcadores de disfunção de órgãos

Cerca de 4 mL de sangue foi coletado com heparina (5 UI/mL) ao final da avaliação hemodinâmica pelo acesso arterial. Após centrifugação ($1.500 \times g$, 10 min, 4 °C), o plasma foi coletado e armazenado a -80 °C. As análises dos níveis plasmáticos de creatinina e nitrogênio ureico (BUN) foram realizadas no analisador bioquímico automático do Hospital Universitário Polydoro Ernani São Thiago.

3.3.9 Caracterização do período de recuperação após a indução de sepse por CS

Para avaliar o momento de recuperação da fase aguda da sepse, um novo grupo foi avaliado ao longo do tempo após a administração do CS. A disseminação de bacteriais para o tecido pulmonar e hepático foi avaliada nos tempos de 48 horas, 72 horas, 96 horas, 15 dias e 30 dias por meio da contagem de UFC/mL.

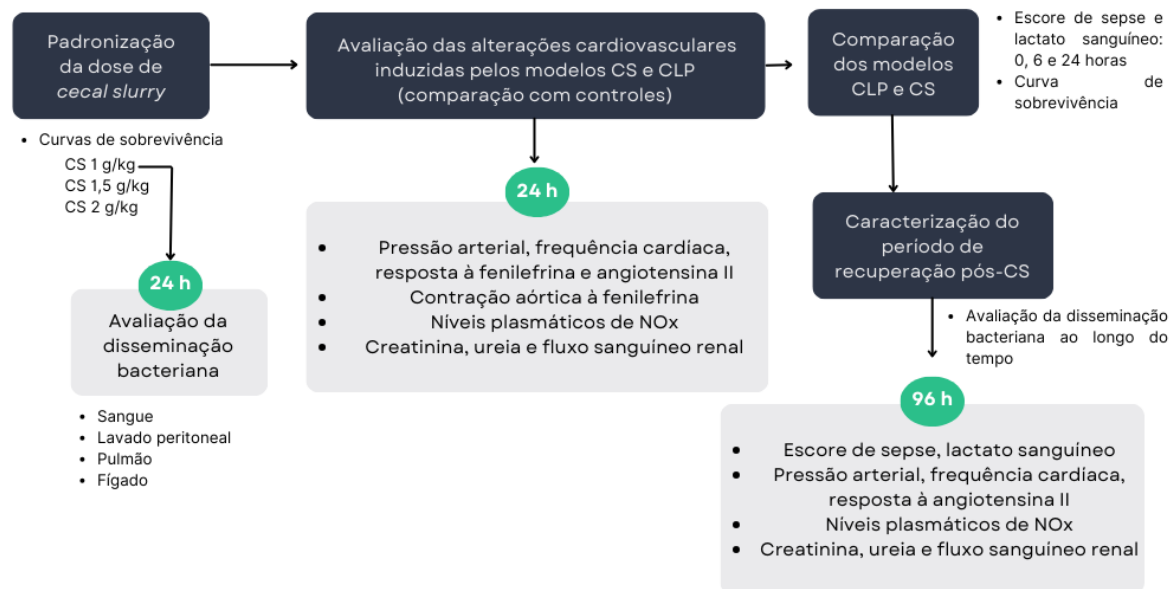
Além disso, os seguintes parâmetros foram reavaliados no tempo de 96 horas: escore de sepse, lactato sanguíneo, pressão arterial média, frequência cardíaca, fluxo sanguíneo do córtex renal, resposta pressórica à angiotensina II, NOx plasmático, creatinina e nitrogênio ureico plasmáticos.

3.3.10 Delineamento experimental da caracterização do modelo

Primeiramente, para a padronização da dose, animais foram submetidos à três diferentes doses de CS (1; 1,5 ou 2 g/kg). Em seguida, foi avaliada a

disseminação de bactérias do lavado peritoneal para o sangue, tecido pulmonar e hepático, 24 horas após a aplicação de 1 g/kg de CS. A avaliação das alterações cardiovasculares induzidas pelos modelos CS e CLP foram avaliadas no tempo de 24 horas e comparadas com animais naïve (sem intervenção). O escore de sepse e lactato sanguíneo dos modelos CLP e CS foram acompanhados nos tempos 0, 6 e 24 horas após a indução, bem como a avaliação da sobrevivência até 120 horas. A fim de caracterizar o período de recuperação do quadro de sepse aguda, a disseminação bacteriana para os tecido pulmonar e renal foi avaliada ao longo do tempo após a aplicação de CS, nos tempos de 48 horas, 72 horas, 96 horas, 15 dias e 30 dias. Além disso, outros parâmetros foram reavaliados no período de 96 horas (Figura 1).

Figura 1 - Delineamento experimental da padronização do modelo *cecal slurry*



Fonte: elaborado pelo autor em Canva.com.

3.4 AVALIAÇÃO DO DESENVOLVIMENTO DE ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES PÓS-SEPSE

3.4.1 Indução de sepse por *cecal slurry* (método adaptado)

Para a avaliação das alterações cardiovasculares em sobreviventes à sepse, foi utilizado o modelo *cecal slurry*, padronizado conforme item 3.3.2, com algumas adaptações.

O volume final de glicerol utilizado na preparação do CS (item 3.3.2.1) foi reduzido de 15% para 5%, a fim de diminuir as possíveis interferências do glicerol como veículo, o que também foi sugerido por Steele, Starr e Saito (2017). A fim de realizar o controle de qualidade de diferentes preparações de CS, as suspensões foram identificadas com a data de preparo, e o crescimento de UFC por mL foram avaliadas em água Mueller-Hinton (Apêndice A). Para garantir a viabilidade das bactérias após o congelamento, as UFC/mL das suspensões foram novamente avaliadas ao longo das aplicações (dados não mostrados).

Além disso, animais sham receberam a aplicação de PBS-5% de glicerol (10 µL/g i.p.) e foram avaliados como controles após 15 ou 30 dias. Os controles também foram submetidos ao mesmo protocolo analgésico e de reposição volêmica dos animais CS.

O protocolo analgésico foi modificado de tramadol para buprenorfina (item 3.2.1), por ser mais utilizado em modelos de sepse experimental (JEGER et al., 2016). Esse protocolo não foi utilizado anteriormente pois a formulação veterinária desse analgésico recebeu aprovação no Brasil apenas em 2022 (Beniv® - buprenorfina - Licenciado no Ministério da Agricultura sob nº SP 000005-1.000045 em 15/08/2022). Além disso, a reposição volêmica administrada foi reduzida de 50 mL/kg para 30 mL/kg. A dose de 50 mL/kg foi baseada no protocolo de CLP descrito por Rittirsch e colaboradores (2009). Entretanto, como não há procedimento cirúrgico e anestesia no modelo CS, os animais estão sujeitos a um menor nível de desidratação. Logo, foi adotada a dose de administração de fluidos recomendada em pacientes sépticos (30 mL/kg) (DE BACKER et al., 2024).

3.4.2 Acompanhamento do quadro séptico (adaptado)

Os animais avaliados 15 e 30 dias pós-sepse foram acompanhados no período basal (0 hora, antes da indução de sepse), durante a sepse aguda (24 horas após a aplicação), bem como no período de recuperação do animal (96 horas após a aplicação).

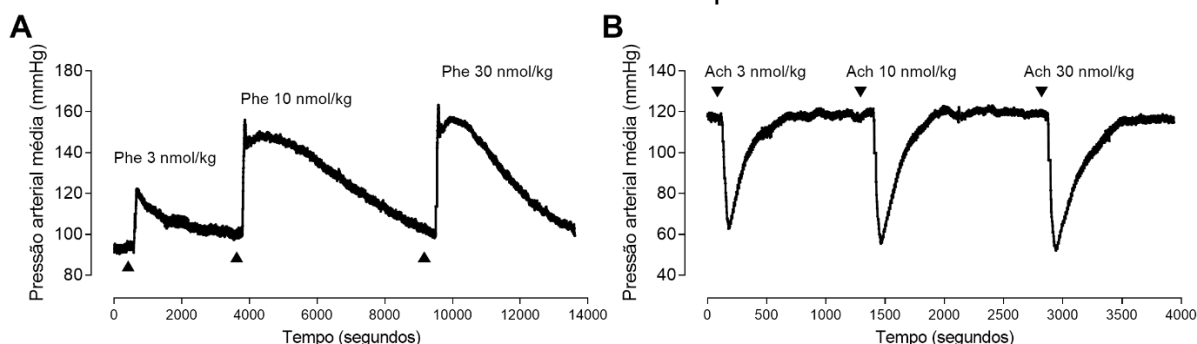
Além da avaliação do escore qualitativo de sepse e dos níveis de lactato no sangue (conforme descrito no item 3.3.3), a glicemia e o peso corporal dos animais também foram avaliados. A glicemia foi mensurada em uma gota de sangue

periférico por meio do glicosímetro On call plus II. O valor da glicemia foi expresso como mg/dL.

3.4.3 Avaliação hemodinâmica de animais sobreviventes à sepse

A avaliação hemodinâmica foi realizada conforme previamente descrito no item 3.3.5. Entretanto, os agentes vasoativos utilizados foram: fenilefrina (3; 10 e 30 nmol/kg) e acetilcolina (3; 10 e 30 nmol/kg), conforme demonstrado na figura representativa abaixo (Figura 2). Os resultados foram expressos como a integral relativa aos valores basais (em mmHg por segundo).

Figura 2 - Registro típico da avaliação hemodinâmica realizada em animais sobreviventes à sepse



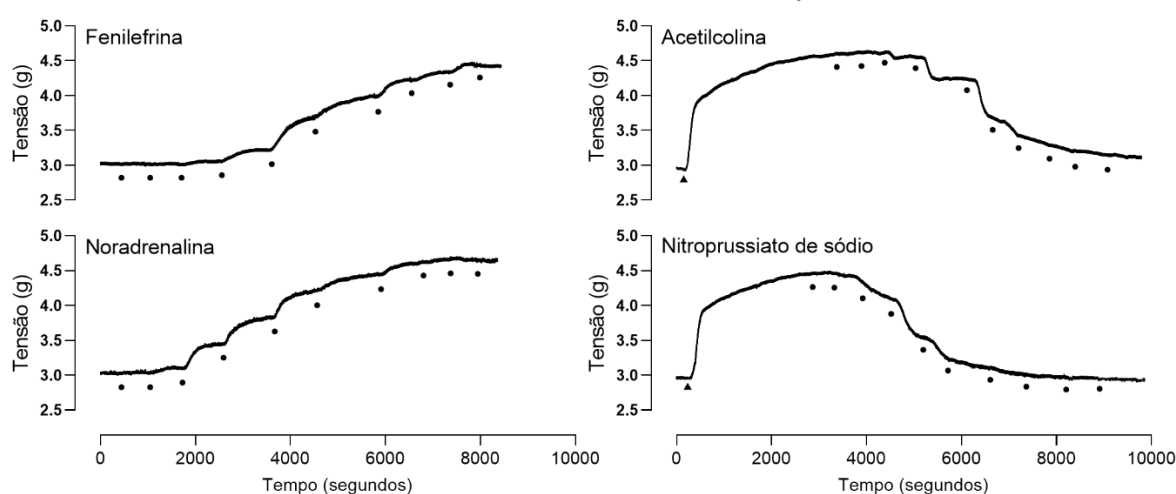
Os animais foram anestesiados com quetamina-xilazina e a artéria carótida foi canulada para a medida da pressão arterial invasiva. Após 10 minutos de estabilização, foram administradas doses crescentes, não cumulativas, de fenilefrina *in bolus* (3, 10 e 30 nmol/kg, i.v.), indicadas pelo triângulo preto (▲) (Painel A). Após um novo período de estabilização, doses de acetilcolina (3, 10 e 30 nmol/kg), indicadas pelo triângulo preto (▲), foram administradas i.v. (Painel B). O eixo x representa o tempo, em segundos. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.4 Avaliação em anel de aorta isolado de animais sobreviventes à sepse

A resposta contrátil e de relaxamento *ex vivo* foi avaliada em anéis de aorta torácica com ou sem endotélio preservado, sem tecido adiposo perivascular. O protocolo de coleta e estabilização dos vasos foi realizado conforme descrito no item 3.3.6. O percentual médio de relaxamento dependente do endotélio para esse bloco de experimentos foi de $90 \pm 5\%$ para os vasos com endotélio preservado. Em alguns protocolos, o endotélio foi removido por meio do atrito do vaso com a haste fixa, nesse caso, foram utilizados apenas os anéis que demonstraram percentual de relaxamento à acetilcolina inferior à 25%. Foram realizadas curvas concentração-

resposta a fenilefrina, acetilcolina, noradrenalina e nitroprussiato de sódio (0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 μM), com 30 minutos de estabilização entre cada vasoativo. O relaxamento dos vasos foi avaliado após a pré-contracção com 1 μM de fenilefrina e o resultado expresso como percentual de relaxamento. A contracção dos vasos foi expressa como percentual de contracção em relação à contracção inicial com KCl 60 mM por 5 minutos. Curvas concentração-resposta representativas do experimento estão demonstradas na Figura 3.

Figura 3 - Registro típico da construção de curvas concentração-resposta na aorta torácica de sobreviventes à sepse



A aorta torácica foi coletada em solução nutritiva de Krebs à 4 °C, limpa de tecidos conectivos e tecido adiposo perivascular, e montada em miógrafo de tensão (Krebs 37 °C; 95% O₂; 5% CO₂). A tensão foi ajustada para 3 gramas. Após protocolo de estabilização, foram realizadas curvas concentração-resposta para fenilefrina, acetilcolina, noradrenalina e nitroprussiato de sódio. O triângulo preto (▲) indica a adição de 1 μM de fenilefrina para a pré-contracção dos vasos. Os pontos pretos (●) indicam a adição de concentrações cumulativas (0,001; 0,003; 0,01; 0,03; 0,1; 0,3; 1; 3; 10 e 30 μM). O eixo x representa o tempo, em segundos. Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4.5 Avaliação da função cardíaca em coração isolado

Os animais foram anestesiados com isoflurano (item 3.2.2 i). O arco da aorta foi pinçado e o coração retirado e colocado imediatamente em solução de Krebs a 0 °C. Em seguida, o coração foi canulado pela aorta e transferido para o aparelho de Langendorff acoplado a um transdutor de pressão, onde permaneceu em perfusão retrógrada (10 mL/minuto) com solução de Krebs modificada (37 °C; 95% O₂; 5% CO₂ – pressão de perfusão = 43,8 ± 10 mmHg). O átrio esquerdo do coração foi cortado e um balão de látex preenchido com água destilada foi inserido no ventrículo esquerdo, o balão foi acoplado a um transdutor de pressão conectado ao

sistema PowerLab e inflado para obter uma pressão diastólica final entre 8 e 10 mmHg ($8,9 \pm 0,8$ mmHg). A pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo (PDVE) foi calculada por meio da diferença da pressão máxima (sistólica) e mínima (diastólica) do ventrículo esquerdo. O produto frequência-pressão (RPP, do inglês *rate pressure-product*) foi calculado pela fórmula: $RPP = (\text{frequência cardíaca} \times PDVE/1000)$. Este índice foi utilizado como medida complementar à PDVE, visto que esta pode ser influenciada por variações na frequência cardíaca (AKSENTIJEVIĆ; LEWIS; SHATTOCK, 2016; WATANABE; OKADA, 2018). A derivada da pressão pela derivada do tempo (dP/dT) foi obtida automaticamente por meio do software LabChart, a partir do traçado da pressão ventricular esquerda. O valor de dP/dT máximo representa a taxa máxima de aumento da pressão pelo tempo da contração ventricular (sístole) e foi utilizado como índice de contratilidade, enquanto o valor da dP/dT mínima representa a taxa máxima de diminuição da pressão pelo tempo de relaxamento ventricular (diástole) e foi utilizado como índice de relaxamento.

Após 20 minutos de estabilização, foi administrado um desafio com isoprenalina 0,01 nM por meio de uma bomba de infusão (0,5 $\mu\text{L/s}$). Os dados foram registrados no LabChart. O procedimento e a avaliação dos resultados foi realizada de forma cega para os grupos experimentais.

Ao final do experimento, o coração foi seco em papel filtro e pesado em balança de precisão. Em seguida, o tecido foi seco em estufa (60 °C) e novamente pesado após 24 e 48 horas (até peso constante). Foi obtido a razão do peso do coração seco pelo comprimento da tíbia esquerda de cada animal (g/cm) e do peso do coração seco pelo peso corporal total do animal (mg/g).

3.4.6 Avaliação do eletrocardiograma

Os animais foram anestesiados com quetamina-xilazina (item 3.2.2 ii). Após a confirmação da anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal. Foi inserida uma cânula de polietileno na veia jugular direita dos animais para a administração de droga cardioativa. Os três eletrodos do aparelho do eletrocardiograma foram inseridos no espaço subcutâneo do animal, nas seguintes posições: 1- face distal do membro superior direito (polo negativo); 2 – face distal do membro superior esquerdo (polo positivo); e 3 – face distal do membro inferior direito (fio condutor de proteção). Os eletrodos foram conectados ao sistema PowerLab,

registrando-se a derivação bipolar DI. O sinal eletrocardiográfico foi registrado nas seguintes configurações: frequência 0-500 Hz (50 Hz cut-off) e escala 100/s. Após 10 minutos de estabilização foram administradas 2 doses independentes de isoprenalina (0,03 e 0,3 nmol/kg). O software LabChart foi utilizado para análise.

3.4.7 Dosagem plasmática de marcadores de disfunção de órgãos de animais sobreviventes à sepse

Os marcadores plasmáticos disfunção renal foram mensurados no plasma conforme descrito no item 3.3.8.

3.4.8 Avaliação de marcadores hematológicos

Cerca de 1 mL de sangue foi coletado da veia cava inferior dos animais em tubo com heparina (5 UI/mL). Após homogeneização, o sangue foi avaliado em contador hematológico automático (MedMax). O número de leucócitos, granulócitos, linfócitos, monócitos e plaquetas foram expressos como $10^9/L$, enquanto o número de eritrócitos foi expresso como $10^{12}/L$. Além disso, a fim de avaliar o volume de sangue ocupado por eritrócitos ou plaquetas, também foi avaliado o hematócrito e plaquetócrito, respectivamente, representados em porcentagem.

3.4.9 Determinação de NOx plasmático e nitrito cardíaco

Os níveis de NOx foram avaliados no plasma conforme descrito no item 3.3.7. A dosagem de nitrito no tecido no tecido cardíaco foi avaliada por fluorescência utilizando 2,3 – diaminoftaleno (DAN). O tecido cardíaco foi macerado com PBS 1 M (200 mg/mL) e a precipitação de proteínas da amostra foi realizada adicionando 10% de sulfato de zinco. Após centrifugação ($4.000 \times g$; 10 min; 4 °C), o DAN 158 μM foi adicionado à 50 μL do sobrenadante em meio ácido (HCl 1,5 M). Após 5 minutos de incubação a 30 °C, a reação foi interrompida pela adição de NaOH 3 M. A fluorescência foi mensurada na multileitura Tecan (excitação = 365 nm; emissão = 410 nm). O valores de nitrito foram obtidos pela interpolação das

fluorescências com uma curva padrão (0,039; 0,078; 0,156; 0,312; 0,625; 1,25; 2,5; 5; 10 μ M). Os dados foram expressos como μ M de nitrito por mg de tecido.

3.4.10 Avaliação dos níveis de guanosina monofosfato cíclico

A mensuração de GMPc foi realizada no plasma e tecidos. O sangue foi coletado com isobutil-metilxantina (IBMX) 0,1 mM + ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA) 0,35 mg/mL e centrifugado ($1.800 \times g$; 10 min; 4 °C). Foi adicionado 1 mL de álcool etílico absoluto gelado à 250 μ L de plasma coletado e, depois de 5 minutos, o precipitado foi removido por centrifugação ($1.800 \times g$; 10 min; 4°C). O etanol da amostra foi removido por meio da secagem em nitrogênio gasoso e as amostras foram ressuspensas em 250 μ L de Elisa Buffer.

Os tecidos foram coletados em nitrogênio líquido e pulverizados. Foi adicionado uma solução de ácido tricloroacético (TCA) 5% em PBS (1 mL a cada 100 mg de tecido). As amostras foram centrifugadas ($1.500 \times g$; 10 min; 4°C) e o TCA foi extraído do sobrenadante por meio da mistura com uma solução de éter etílico saturada e separação da fase aquosa. Para retirar o éter, as amostras foram aquecidas em banho-maria a 70°C por 10 min.

Os níveis de GMPc foram mensurados por ensaio imunoenzimático conforme as instruções do kit (Cayman, n°581021). Os resultados foram expressos como pmol de GMP por mL.

3.4.11 Determinação de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico tecidual de animais sobreviventes à sepse

Os níveis de superóxido e NO em tecidos foram determinados utilizando as sondas fluorescêntes de dihidroetídio (DHE) e diacetato de diaminofluoresceína (DAF), respectivamente. Amostras de tecidos cardíaco e vascular (aorta), não fixados, incluídas em meio de congelamento *Tissue Plus*, foram cortadas em segmentos de 8 μ m de espessura em criostato a -20°C. As secções foram obtidas em lâminas preparadas com poli-L-lisina. Em seguida, as lâminas foram submersas em PBS (37 °C, 30 min) para retirar o meio de congelamento. Após secagem, os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica e incubados com as sondas

fluorescentes (DHE 5 μm ou DAF 10 μm) por 30 min a 37 °C em câmara escura e úmida. As lâminas foram lavadas com PBS, os núcleos foram contra corados com DAPI 1 $\mu\text{g/mL}$ e montadas com lamínula em meio de montagem aquoso (CC/Mount™). Quatro imagens de cada corte foram obtidas em microscópios de fluorescência (DHE – 515/560 nm; DAF – 350/460 nm) sob as mesmas configurações, com objetiva de 20 $\times$ (aumento estimado de 200 vezes). Controles negativos (amostras sem a incubação das sondas) foram utilizadas para a avaliação da autofluorescência do tecido. A intensidade de fluorescência foi avaliada por meio do software ImageJ e expressa em unidades arbitrárias (UA). Não houve identificação de autofluorescência no tecido cardíaco nos comprimentos de onda avaliados. Foi observada autofluorescência intrínseca da aorta, com emissão na faixa do verde. Portanto, a média das autofluorescências ($13,6 \pm 1$ UA) foi descontada dos valores obtidos com a sonda DAF no tecido vascular.

3.4.12 Avaliação histológica do tecido cardíaco e vascular

Os tecidos foram coletados e lavados em PBS a 0 °C. O coração foi seccionado transversalmente na altura do plano médio ventricular e a aorta torácica foi limpa do tecido adiposo perivascular e seccionada em um anel de 4 mm, na sequência, foram fixados por 24 horas em solução de paraformaldeído (PFA) 4%. Foram realizadas 3 lavagens de 30 minutos com PBS, e duas passagens de 30 minutos em álcool 30% e 50%, respectivamente. Os tecidos permaneceram em álcool 70% até o processamento.

Após a análise macroscópica do tecido e inserção em cassetes histológicos, o processamento foi realizado de forma manual através da troca sequencial das soluções: Álcool 90% (2 horas); Álcool 100% (1 hora); Álcool 100% (1 hora); Xilol/ Álcool 1:1 (2 horas); Xilol absoluto (30 minutos); Xilol/ Parafina 1:1 (30 minutos); Parafina I (1 hora); Parafina II (1 hora).

Para inclusão em blocos de parafina, os tecidos foram posicionados de modo que a superfície da secção ficasse em contato com a base do molde. Cortes de 4 μm foram realizados em micrótomo manual (Olympus), transferidos para água da torneira com 2,5 g/L de gelatina a 42 °C em banho-maria, coletados em lâminas histológicas 24 $\times$ 50 mm e mantidos em estufa a 40 °C para secagem até coloração.

A coloração com hematoxilina e eosina (HE) foi realizada em corador automático, passando pelas etapas de desparafinação, hidratação, coloração (6 minutos de hematoxilina de Harris e 2 minutos de Eosina amarelada), desidratação e montagem da lâminula com meio de montagem Entellan®.

A coloração tricrômico de Masson foi realizada manualmente. Após desparafinação e hidratação, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris (3 minutos), diferenciadas com água amoniacal 1%, coradas com escarlat de Bielbrich (5 minutos), transferidas para o diferenciador de Masson (5 minutos), coradas com azul de anilina (5 minutos), diferenciadas com água acética 1% (1 min), lavadas com água destilada e desidratadas com álcoois graduados. As lâminas foram transferidas para xilol e as lamínulas foram montadas com Entellan®.

As análises foram realizadas no software ImageJ. A análise de espessura da aorta foi realizada nas imagens coradas com HE obtidas com objetiva de 4 × (aumento de 40 vezes). Após calibração em µm, foram realizadas 8 medidas da espessura das túnicas íntima e média, descontando a túnica adventícia. O resultado foi expresso como a média das 8 medidas para cada aorta, em µm.

A análise de deposição de colágeno no tecido cardíaco e vascular foi realizada nas imagens coradas com o tricrômico de Masson. As imagens foram obtidas na objetiva de 40 × (aumento estimado de 400 ×). Para isso, foi utilizado a ferramenta “*Color Threshold*” (*Image > Adjust > Color Threshold*), a qual permite a segmentação com base em diferentes espaços de cor. A matriz foi ajustada para 120 a 210 para marcar apenas a cor azul. A imagem foi transformada em um binário (*Process > Binary > Make Binary*), marcando a região de interesse em preto e o fundo branco. A área em preto foi mensurada em relação a área total do coração ou da aorta. Foi feito a média de 4 imagens por animal. Os valores foram expressos como a porcentagem de área em azul.

3.4.13 Avaliação da mieloperoxidase e N-acetilglucosaminidase

Cerca de 100 mg de tecido cardíaco (ventrículo) e pulmonar foram triturados em homogeneizador de tecidos *Tissue Tearor* em 1mL de PBS 20 mM (pH 7,4). Após centrifugação (13.000 × g; 10 min; 4 °C), o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspendido em PBS 50 mM (pH 6,0) + 0,5% brometo de

hexadeciltrimetilamônio (HTAB). As amostras foram novamente centrifugadas ($13.000 \times g$; 10 min; 4°C), obtendo-se o sobrenadante.

Para a avaliação da mieloperoxidase (MPO), um marcador indireto da infiltração de neutrófilos, 30 μL do sobrenadante obtido foi adicionado em placa de 96 poços, em duplicata. Foi adicionado 20 μL de 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) 18,4 mM e 180 μL de solução de peróxido de hidrogênio 0,4 mM. Imediatamente, 10 leituras das absorbâncias foram obtidas com intervalo de 1 minuto em 650 nm a 37°C na Multileitora Infinite M200 (Tecan). Foi utilizado a leitura mais estável antes da saturação da absorbância, sendo que para o tecido pulmonar foi a leitura de 1 minuto e para o tecido cardíaco a leitura de 10 minutos.

Para a avaliação da N-acetilglucosaminidase (NAGase), um marcador indireto da ativação de macrófagos, 25 μL do sobrenadante foi transferido em duplicata para placa de 96 poços. Foi adicionado 25 μL do substrato N-acetilglucosamina 2,24 mM e 100 μL de tampão citrato (50 mM; pH 4,5). Após incubação à 37°C por 60 minutos, foi adicionado 100 μL de tampão glicina (200 mM; pH 10,4) para interromper a reação. A absorbância pontual foi avaliada a 405 nm.

A dosagem de proteínas totais na amostra foi avaliada no sobrenadante por meio do método de Bradford. Para isso, foi utilizado uma curva padrão de albumina sérica bovina nas concentrações 0; 25; 50; 75; 100; 150; 200; 250 $\mu\text{g/mL}$. As amostras foram diluídas com água destilada (1:20) e foi adicionado 20 μL em cada poço, em duplicata. Em seguida, foi adicionado 180 μL do reagente de Bradford e as absorbâncias foram lidas em 595 nm. As absorbâncias obtidas foram interpoladas com a curva padrão para obter a concentração de proteínas na amostra em $\mu\text{g/mL}$. Assim, os resultados da atividade de MPO e NAGase foram expressos como densidade óptica (D.O.) por mg de proteína.

3.4.14 Avaliação da enzima NADPH oxidase no tecido cardíaco

A atividade da enzima nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase foi avaliada por luminescência, por meio da detecção do ânion superóxido gerado pela oxidação de NADPH na presença do substrato luminescente lucigenina. Para isso, o coração foi macerado com PBS 1M pH 7,4 (200 mg/mL) em aparato de vidro. Foram transferidas 50 μL da extração total de cada amostra, em duplicata, para uma placa de 96 poços branca. Foi adicionado 175 μL de tampão NADPH e

lucigenina 1 mM em cada poço. A luminescência inicial da placa foi medida, e em seguida, foi adicionado 25 µL de NADPH. A luminescência foi medida a cada 30 segundos por 15 minutos à 37 °C. Em seguida, foi feita a média de 5 medidas para cada amostra (incluindo o pico de luminescência) e descontado a luminescência inicial. O resultado foi expresso como a luminescência gerada pelo peso do tecido utilizado (em mg).

3.4.15 Avaliação da glutathiona reduzida e oxidada no tecido cardíaco

As amostras utilizadas no ensaio anterior foram centrifugadas ($4.000 \times g$; 10 min; 4 °C) e as proteínas foram dosadas no sobrenadante por Bradford. A avaliação da glutathiona reduzida (GSH) e oxidada (GSSH) foi realizada por meio da reação desses compostos com o-ftalaldeído (OPT), a qual gera compostos fluorescentes. Para a avaliação de GSH, as amostras foram homogeneizadas com EDTA e ácido fosfórico 25% para a precipitação de proteínas. Após centrifugação ($4.000 \times g$; 10 min; 4 °C), 10 µL do sobrenadante foi transferido para placa de 96 poços preta, em duplicata. Foi adicionado 175 µL de PBS 100 mM e 10 µL de OPT 7 mM por poço. Após 15 minutos de incubação, foi medido a fluorescência em multileitora de placas (Tecan) (excitação/emissão = 350/420 nm) e comparado com curva padrão de GSH (1,5 mM; 1mM; 0,5 mM; 0,25 mM; 0,1 mM; branco). Para a avaliação de GSSG, as amostras iniciais foram homogeneizadas com N-etilmaleimida 40 mM, o qual se liga as sulfidrilas livres da GSH. Após 30 min de repouso, as amostras foram centrifugadas ($4.000 \times g$; 10 min; 4 °C) e 14 µL do sobrenadante foi transferido para uma placa de 96 poços preta, em duplicata, juntamente com 176 µL de NaOH 100 mM e 10 µL de OPT 7 mM. Após 15 minutos, a fluorescência foi medida (excitação/emissão = 350/420 nm) e comparada com a curva padrão. Os resultados foram expressos como µmol de GSH ou GSSG por mg de tecido.

3.4.16 Delineamento da avaliação do impacto da tadalafila em sobreviventes à sepse experimental

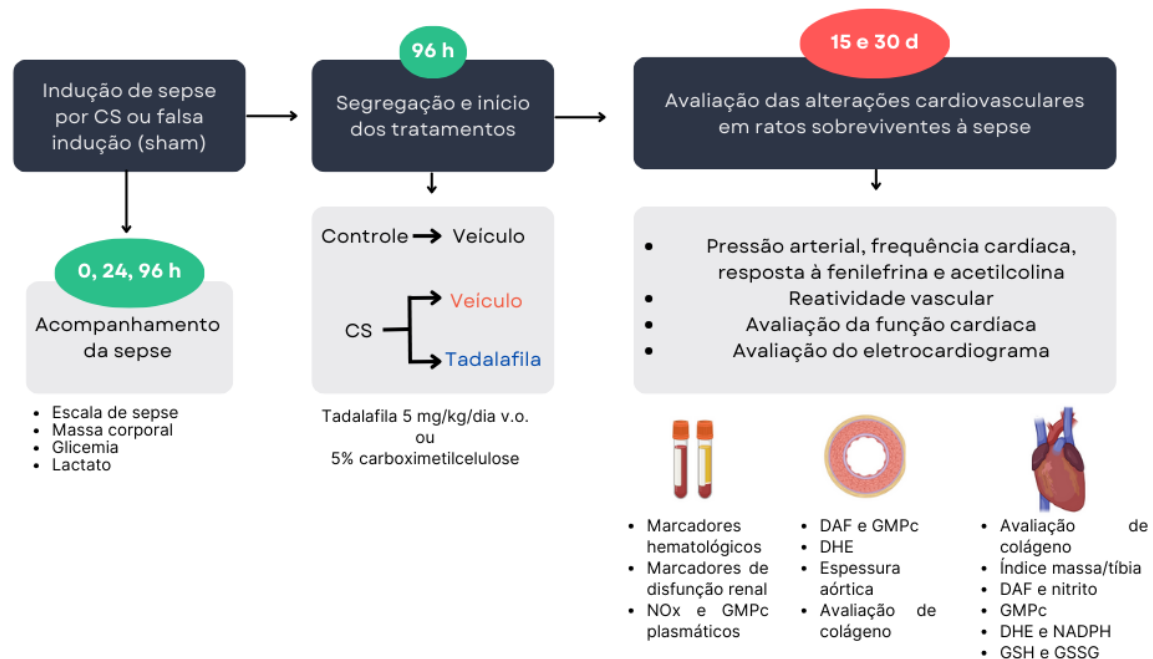
Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.). Animais sham receberam a aplicação de PBS-5% de glicerol (10 µL/g i.p.) e foram utilizados como

controles. Imediatamente após a aplicação, os animais receberam reposição volêmica com PBS estéril (30 mL/kg s.c.; 37 ° C). Todos os animais receberam analgesia com buprenorfina (conforme protocolo 3.2.1 ii). Vinte e quatro horas após a indução, foi administrado um antibiótico de amplo espectro e duração prolongada (Pentabiótico® Veterinário; 70% penicilina benzatina e 30% estreptomicina), na dose única de 24.000 UI/kg via intramuscular.

A escala de sepse, massa corporal, glicemia e lactato sanguíneo foram acompanhados nos tempos 0, 24 e 96 horas, a fim de avaliar, de forma não invasiva, a fase aguda do quadro séptico. No tempo de 96 horas, os animais considerados sobreviventes à sepse foram segregados em dois grupos de tratamento: veículo e tadalafila. O tratamento com tadalafila foi realizado uma vez ao dia na dose de 5 mg/kg via oral, até o dia 15 ou 30. A dose equivalente humana foi estimada com base no método da área de superfície corporal, utilizando os fatores Km (rato = 6; humano = 37), conforme descritos por Nair e Jacob (2016). Portanto, a dose de 5 mg/kg administrada em ratos equivale a aproximadamente 49 mg para indivíduos de 60 kg, o que se aproxima do utilizado para o tratamento da hipertensão pulmonar (OUDIZ et al., 2012). Além disso, a administração oral de 5 mg/kg de tadalafila demonstrou ser efetiva, ao reduzir a pressão arterial média de ratos após 1 hora, em comparação a controles sem tratamento (Apêndice B).

A tadalafila foi dissolvida em água de beber com 5% de carboximetilcelulose (CMC), a fim de formar uma suspensão homogênea. Para a administração oral do fármaco, a extremidade da seringa foi levemente recoberta com creme de avelã ou geleia de morango, a fim de estimular a ingestão espontânea pelos animais, evitando a necessidade de gavagem. A mesma estratégia foi utilizada para os animais dos grupos CS + veículo e controle, os quais receberam água-5% CMC. A função cardiovascular, bem como alterações sistêmicas, vasculares e cardíacas foram investigadas 15 e 30 dias após a indução da sepse. O delineamento experimental desse bloco de experimentos está ilustrado na Figura 4.

Figura 4 - Delineamento experimental da avaliação do efeito da tadalafila nas alterações cardiovasculares de ratos sobreviventes à sepse



Fonte: elaborado pelo autor em Canva.com.

3.5 NÚMERO AMOSTRAL

O número amostral foi calculado previamente no software Gpower, mantendo α de 0,05 e poder do teste de 80%. O tamanho do efeito (f) foi calculado baseado no desvio padrão e magnitude da diferença, conforme o principal desfecho de cada experimento.

Em relação aos animais utilizados para a padronização do modelo, uma amostra de 15 animais por grupo foi considerada adequada para a avaliação da sobrevivência, conforme demonstrado por Benedet et al., (2018). A aplicação das doses maiores de CS (1,5 e 2 g/kg) induziram taxas de mortalidade próximas de 100%, portanto, julgou-se desnecessário atingir o n amostral de 15.

Para a avaliação hemodinâmica, o cálculo amostral foi baseado na diferença obtida na pressão arterial (em mmHg) de um estudo prévio (KOVALSKI et al., 2017). Considerando três grupos experimentais (Controle, CLP e CS) e $f = 0,6$, o n amostral necessário foi de 10 animais por grupo.

Para a avaliação em anel de aorta isolado, foi obtido um $f = 0,716$, calculado com base no desvio padrão e na magnitude de diferença da resposta contrátil à

fenilefrina de um estudo prévio (KOVALSKI et al., 2017). Mantendo α de 0,05 e poder do teste de 80%, o n amostral necessário foi de 8 animais por grupo.

Para a avaliação da disseminação de órgãos e tecidos, o n amostral de 6 animais por grupo foi considerado adequado, conforme descrito por Gonçalves et al., (2017).

Considerando a mortalidade inerente aos modelos de sepse experimental de cerca de 50%, foi utilizado um número maior de animais a fim de obter um n experimental suficiente. Devido taxa de mortalidade desigual entre os grupos e eventuais exclusões durante a experimentação, houve diferenças entre o n amostral calculado e o obtido. Portanto, os animais utilizados para a padronização do CS, comparação com o CLP e avaliação do período de recuperação do CS, bem como os n experimentais finais estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 – Animais utilizados na padronização do modelo CS e comparação com CLP

Experimentos	Controle (Naïve)	CLP	CS	Perdas	N experimental final	Coletas
Padronização da dose	-	-	29	-	CS 1 g/kg = 11 CS 1,5 g/kg = 8 CS 2 g/kg = 10	-
Avaliação da sobrevida	-	15	15	-	CLP = 15 CS = 15	-
Avaliação hemodinâmica em 24 h	10	22	13	12 CLP 3 CS	Controle = 10 CLP = 11 CS = 11	Plasma e tecidos
Avaliação hemodinâmica em 96 h	-	-	15	7 CS	CS 96h = 8	Plasma e tecidos
Avaliação em anel de aorta isolado	8	8	8	-	Controle = 8 CLP = 8 CS = 8	-
Avaliação da disseminação bacteriana	6	-	28	-	Controle = 6 CS 24h = 6 CS 48h = 3 CS 72h = 6 CS 96h = 3 CS 15h = 5 CS 30h = 5	Sangue, lavado peritoneal e tecidos

O número de perdas relata a quantidade animais que morreram antes de serem avaliados. Fonte: elaborada pelo próprio autor.

Em relação aos grupos utilizados para as avaliações em sobreviventes à sepse, o cálculo amostral para a avaliação hemodinâmica foi baseado na tese de Corrêa (2021), que avaliou a frequência cardíaca de ratos 30 dias pós-sepse em comparação aos controles. Mantendo α de 0,05 e poder do teste de 80%, o n amostral total considerando três grupos experimentais (Controle, CS e CS tratado) e $f = 0,56$ foi de 36 animais ($n = 12$ por grupo).

Para a avaliação da contratilidade na aorta de ratos sobreviventes à sepse, o tamanho do efeito foi calculado com base no estudo de (MERDJI et al., 2021), que avaliou a resposta à acetilcolina na aorta de ratos sobreviventes à sepse. Sendo assim, o n amostral total para 3 grupos experimentais (Controle, CS e CS tratado), considerando $f = 0,61$, foi de 30 animais ($n = 10$ por grupo).

Os experimentos em preparação de Langendorff e eletrocardiograma foram baseados nos dados da tese de Nóbrega (2021), que descreveu essas avaliações em camundongos sobreviventes à sepse. Foi obtido $f = 0,85$ e $0,62$ levando em consideração o desfecho $dP/dT +$ e intervalo da onda T, respectivamente. Portanto, foi estimado um n experimental de 6 animais por grupo para Langendorff, e 10 animais por grupo para a avaliação do eletrocardiograma.

Da mesma forma, foi utilizado um número maior de animais, devido a mortalidade inerente ao modelo de sepse experimental. Devido às perdas e exclusões após a indução de sepse, houve diferenças entre o n amostral calculado e o obtido, conforme descritos na Tabela 4. As perdas relatam a quantidade de animais que morreram antes de serem avaliados. Já o número de animais excluídos corresponde aos animais que não atenderam aos critérios de sepse aguda em 24 horas ou animais que foram excluídos durante a experimentação. Vinte e quatro horas pós-CS, animais que demonstraram valores de lactato sanguíneo $\leq 2,45$ mmol/L foram excluídos, com base em um estudo prévio do laboratório que observou que esse valor pode ser utilizado para prever a ocorrência de alterações hemodinâmicas em um modelo de sepse aguda (CALENTE et al., 2024). Ao total, 25 animais de 267 foram excluídos com base nesse critério. Além disso, 2 animais foram excluídos da análise hemodinâmica por demonstrarem hemorragia e queda de pressão durante a cirurgia, 2 animais foram excluídos da avaliação em aorta isolada

por demonstrarem baixa contração ao KCl 60 mM, e 3 corações não puderam ser utilizados no Langendorff por falta de viabilidade/estabilização.

Tabela 4 – Animais utilizados no estudo das alterações cardiovasculares pós-sepse

Experimentos	Controle (Sham)	CS	Perdas	Exclusões	N experimental final	Coletas
Avaliação hemodinâmica	18	100	44	8	Controle 15 d = 8 CS 15 d = 12 CS + Tad 15 d = 11 Controle 30 d = 9 CS 30 d = 12 CS + Tad 30 d = 14	Plasma - marcadores bioquímicos, NOx e dosagem de cGMP.
Avaliação em anel de aorta isolado	20	85	31	15	Controle 15 d = 10 CS 15 d = 10 CS + Tad 15 d = 9 Controle 30 d = 10 CS 30 d = 10 CS + Tad 30 d = 10	Tecidos – histologia, fluorescência, cGMP, nitrito, estresse oxidativo, MPO.
Avaliação em Langendorff	14	59	26	9	Controle 15 d = 5 CS 15 d = 6 CS + Tad 15 d = 6 Controle 30 d = 7 CS 30 d = 7 CS + Tad 30 d = 7	Sangue, aorta e coração - marcadores hematológicos, cGMP da aorta, peso seco do coração.
Avaliação de ECG	10	23	4	-	Controle 30 d = 10 CS 30 d = 10 CS + Tad 30 d = 9	-
Avaliação plasmática de ratos controles tratados com TAD	7	-	-	-	Controle + Tad 30 d = 7	Plasma – NOx e GMPc

O número de perdas relata a quantidade animais que morreram antes de serem avaliados. O critério de exclusão adotado foi baseado nos valores de lactato sanguíneo. Animais com lactatemia $\leq 2,45$ mmol/L, 24 horas pós-CS, foram excluídos. Fonte: elaborado pelo próprio autor.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando o GraphPad Prism 9. As curvas de sobrevivência representadas pelo método de Kaplan-Meier e as diferenças entre os grupo foram avaliadas pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon.

A normalidade das distribuições dos dados foi avaliada pelos testes de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov. A grande maioria das comparações foram

realizadas entre três grupos experimentais, utilizando a análise da variância (ANOVA) de uma via, seguido do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas. A homogeneidade da variância foi observada pelos testes de Brown-Forsythe e de Bartlett. Quando necessário, os dados foram transformados para escala logarítmica ou raiz quadrada para atender aos pressupostos de normalidade e homogeneidade das variâncias. As transformações estão indicadas nas legendas das figuras.

Os dados hemodinâmicos, de função cardíaca e de eletrocardiograma foram avaliados por ANOVA de duas vias sem medidas repetidas, pois as doses administradas são fatores independentes. As curvas concentração-resposta foram construídas de forma cumulativa e, portanto, foram avaliadas por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, aplicando-se a correção de Greenhouse-Geisser. Em ambos os casos, se identificado variação no fator grupo experimental, o teste de Tukey foi aplicado para identificar as diferenças. Após a regressão não linear de cada curva concentração-resposta, os valores de E_{max} , $LogCE_{50}$ e AUC foram avaliados por teste t de Student não pareado, para a comparação entre dois grupos ou por ANOVA de uma via, seguido de Tukey para a comparação entre três grupos.

Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão, exceto os resultados de disseminação bacteriana, escore de sepse e consumo de ração, que por apresentarem grupos com variância nula (todos os valores iguais a zero) ou distribuição não paramétrica, foram representados como mediana $\pm$ intervalo interquartil e avaliados por testes não paramétricos. Os resultados da disseminação bacteriana foram avaliados pelo teste de Mann-Whitney para comparações entre o grupo controle e CS, ou por Kruskal-Wallis seguido de teste de Dunn's para a comparação de mais de dois grupos experimentais. Os resultados do escore de sepse foram avaliados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas para a comparação ao longo do tempo, ou por Kruskal-Wallis para a comparação de três grupos experimentais. Os valores de lactato sanguíneo ao longo do tempo também foram avaliados por ANOVA de duas vias com medidas repetidas.

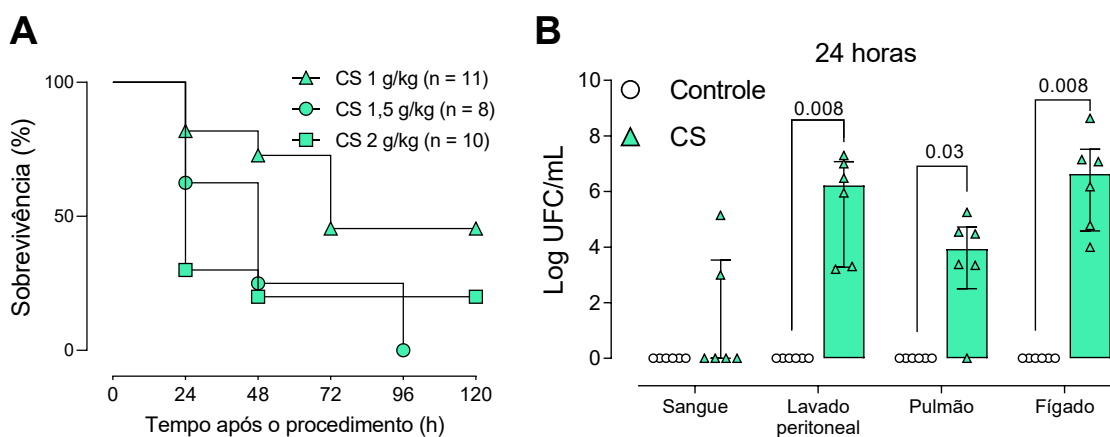
Valores considerados outliers foram identificados por meio do método de ROUT ($Q = 1\%$) utilizando o próprio software. Os outliers foram excluídos caso a inclusão dos valores resultasse em violação dos pressupostos de normalidade. Os resultados com valores excluídos estão descritos nas legendas das figuras, bem como a análises estatística utilizada. O nível de significância adotado (α) foi de 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE SEPSE AGUDA POR CECAL SLURRY

A fim de determinar a dose a ser administrada, os animais receberam 1; 1,5 ou 2 g/kg i.p. de CS e a sobrevivência foi observada ao longo do tempo. As doses de 1,5 e 2 g/kg induziram taxas de sobrevivência de 0 e 20%, respectivamente, enquanto 1 g/kg demonstrou uma taxa de sobrevivência mais adequada para a realização dos experimentos (45,46%) (Figura 5A). Portanto, os demais experimentos foram realizados utilizando a dose de 1g/kg. Para confirmar que essa dose induziu disseminação bacteriana, foi avaliado o crescimento de unidades formadoras de colônia em homogenatos de tecidos e líquidos biológicos vinte e quatro horas após a indução de sepse. Foi observado a presença de bactérias no lavado peritoneal, sangue, pulmão e fígado (Figura 5B).

Figura 5 - Padronização da dose de *cecal slurry* e avaliação da disseminação bacteriana

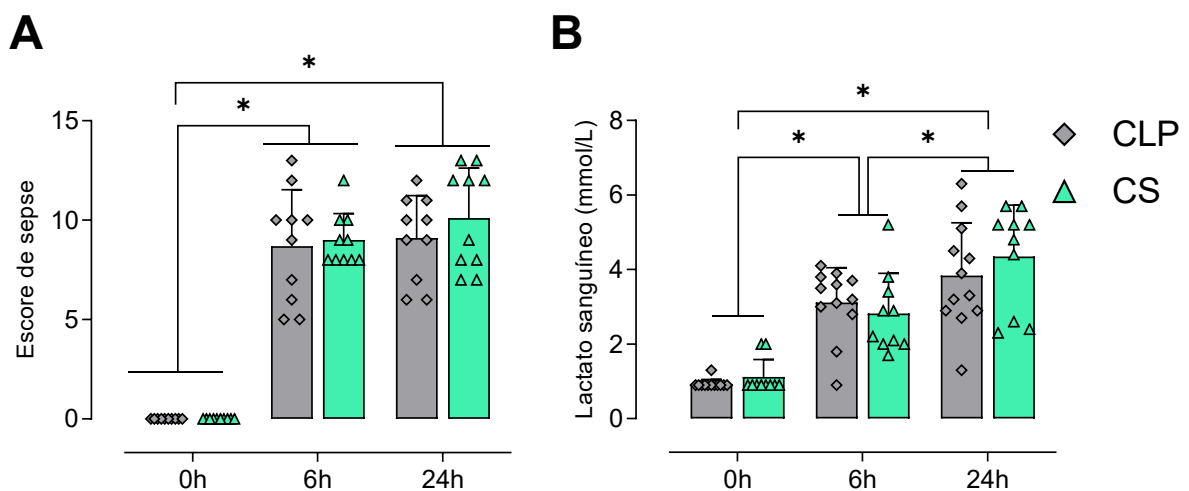


Sobrevivência dos animais após a administração intraperitoneal de 1; 1,5 ou 2 g/kg de CS (A). Os símbolos representam a porcentagem de sobrevivência de cada grupo ao longo do tempo, o n de cada grupo está descrito no painel. A análise estatística foi realizada pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. (B) Crescimento bacteriano em fluidos biológicos e homogenatos de tecidos de ratos 24 horas após a aplicação intraperitoneal de 1 g/kg de CS. O grupo controle foi composto por animais naïve (sem intervenção). As barras representam a mediana $\pm$ intervalo interquartil e cada símbolo corresponde a um animal, n = 6 animais/grupo. A análise estatística foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Por meio do escore do sepse, foi possível observar a alteração no estado dos animais 6 e 24 horas após a aplicação do CS ou do procedimento CLP, evidenciado principalmente por exsudato periorbital, piloereção, letargia e dificuldade

respiratória nos animais submetidos a ambos os modelos de sepse (Figura 6A). Concomitantemente, os animais sépticos demonstraram um aumento progressivo nos níveis de lactato no sangue, um marcador amplamente utilizado como indicador de respiração anaeróbica no quadro séptico. Houve um aumento de 2,3 e 1,5 vezes de 0 à 6 horas nos grupos CLP e CS, respectivamente. Ainda, a média de lactatemia do grupo CS aumentou 0,54 vezes de 6 à 24 horas (Figura 6B).

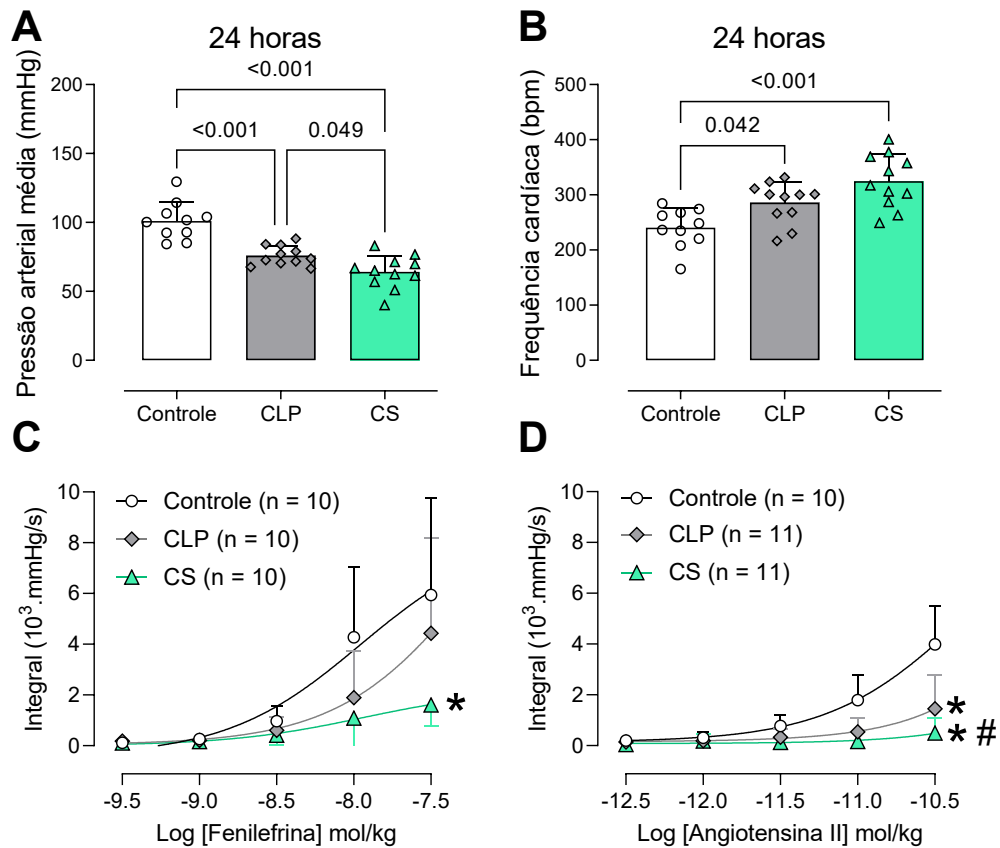
Figura 6 - Acompanhamento do quadro séptico de animais submetidos aos modelos *cecal slurry* ou CLP



Foi utilizado 1 g/kg de CS i.p. (A) Escore de sepse e (B) níveis de lactato no sangue 6 e 24 horas após a indução de sepse. As barras representam a mediana $\pm$ intervalo interquartil no painel A e média $\pm$ desvio padrão no painel B. Cada símbolo corresponde ao valor de um animal, $n = 12$ animais/grupo CLP e $n = 10$ animais/grupo CS. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de Tukey. * $p < 0,05$. Fonte: elaborada pelo autor.

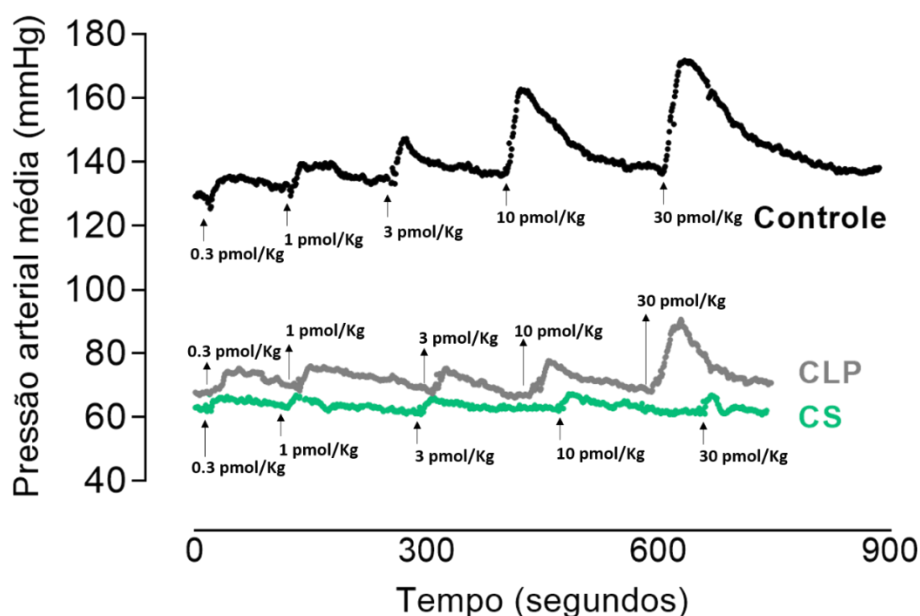
Vinte e quatro horas após a aplicação do CS, os animais demonstraram diminuição significativa da pressão arterial média (Figura 7A: controle $101,1 \pm 13,7$ mmHg; CLP $75,9 \pm 7,1$ mmHg; CS $64,1 \pm 11,9$ mmHg) e aumento da frequência cardíaca (Figura 7B: controle 240 ± 35 bpm; CLP 286 ± 36 bpm; CS 324 ± 48 bpm), além da diminuição severa da resposta pressórica aos vasoconstritores fenilefrina (Figura 7C) e angiotensina II (Figura 7D), em comparação ao grupo controle. Resultados semelhantes foram observados no grupo CLP, todavia, os animais submetidos ao modelo CS demonstraram pressão arterial média basal e a resposta à angiotensina II reduzidas em relação ao CLP (Figura 7A e D), o que também pode ser visualizado na figura representativa do experimento (Figura 8).

Figura 7 - Avaliação hemodinâmica de ratos submetidos aos modelos *cecal slurry* ou CLP



Foi utilizado 1 g/kg de CS i.p. (A) Pressão arterial média, (B) frequência cardíaca, (C) resposta à fenilefrina e (D) à angiotensina II, 24 horas após a indução da sepse. O grupo controle foi composto por animais naïve (sem intervenção). Nos painéis A e B, as barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde a um animal, $n=10-11$ animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey e os valores de p estão representados acima das barras. Nos painéis C e D, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão, o n de cada grupo está indicado. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguido de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP. Fonte: elaborada pelo autor.

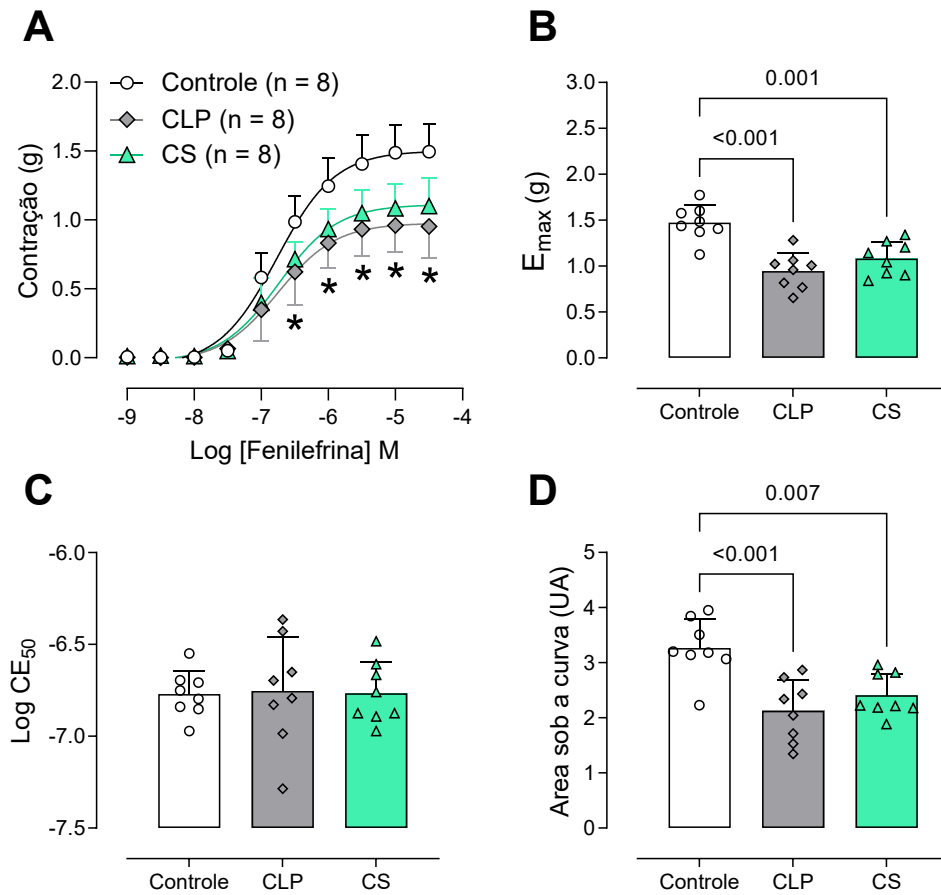
Figura 8 - Registro típico do experimento de curva dose-resposta à angiotensina II em ratos submetidos aos modelos *cecal slurry* ou CLP



Note que além dos grupos CLP e CS demonstrarem pressão arterial menor do que o controle, a amplitude e duração da resposta às doses do vasoconstritor angiotensina II também estão diminuídas. Fonte: elaborada pelo autor.

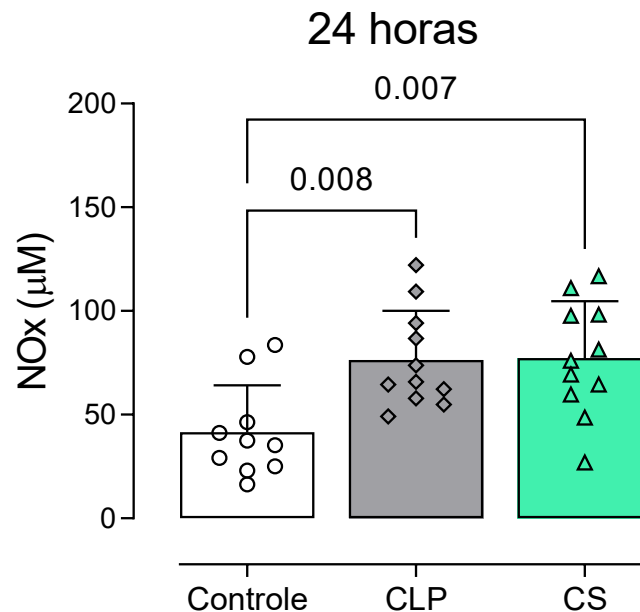
Para investigar se a hipotensão e hiporreatividade à vasoconstritores do modelo CS estaria relacionada a vasoplegia, foi realizado a avaliação da resposta contrátil em anel de aorta isolada 24 horas pós-sepse. Foi observado uma redução significativa da contração à fenilefrina nos vasos dos animais CS e CLP em comparação às do grupo controle (Figura 9A). Na análise individual da curva contração-resposta (CCR), não houve diferença na potência (LogCE_{50}) da fenilefrina (Figura 9C: controle $-6,77 \pm 0,13$; CLP $-6,75 \pm 0,29$; CS $-6,76 \pm 0,17$), porém, foi observado a redução da eficácia (E_{max}) do vasoconstritor (Figura 9B: controle $1,47 \pm 0,19$ g; CLP $0,95 \pm 0,19$ g; CS $1,08 \pm 0,18$ g) e área sob a CCR (Figura 9D: controle $3,26 \pm 0,53$; CLP $2,13 \pm 0,56$; CS $2,41 \pm 0,39$) nos vasos dos animais de ambos os grupos sépticos, em comparação ao controle. Além disso, os níveis dos produtos da oxidação do NO foram avaliados 24 horas pós-sepse. Foi identificado um aumento nos níveis plasmáticos de NOx no grupo CS em comparação ao grupo controle, resultados similares foram observados no grupo CLP (Figura 10).

Figura 9 - Reatividade vascular à fenilefrina em ratos submetidos aos modelos *cecal slurry* ou CLP



Foi utilizado 1 g/kg de CS i.p. (A) Contração da aorta à fenilefrina 24 horas após a indução de sepse. As curvas foram avaliadas de forma individual, obtendo-se os valores de (B) Efeito máximo (E_{max}), (C) $LogCE_{50}$ e (D) área sob a curva. O grupo controle foi composto por animais naïve (sem intervenção). No painel A, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão, o n de cada grupo está indicado. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, com medidas repetidas, seguido de Tukey. O asterisco (*) representa diferença ($p < 0,05$) entre os grupos CLP e CS em comparação ao grupo controle. Nos painéis B, C e D, as barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde a um animal, n=8 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey e os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

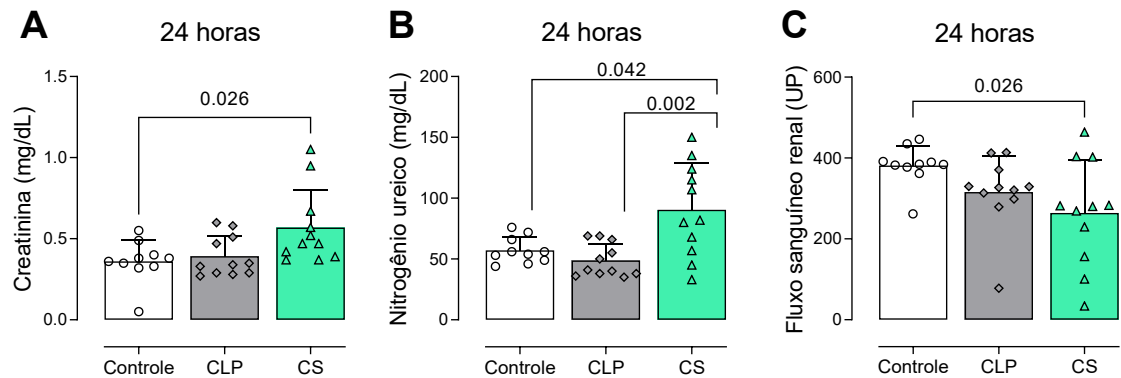
Figura 10 - Níveis plasmáticos de nitrato e nitrito de ratos submetidos aos modelos *cecal slurry* ou CLP



Foi utilizado 1 g/kg de CS i.p. O plasma foi obtido vinte e quatro horas após a indução de sepse. O grupo controle foi composto por animais naïve (sem intervenção). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde a um animal, n = 10-11 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey e os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Para avaliar a disfunção de órgãos relacionada à sepse em ambos os modelos experimentais, a função renal foi utilizada como repórter. Os animais submetidos ao modelo CS demonstraram sinais de disfunção renal após 24 horas, caracterizado pelo aumento dos níveis plasmáticos de creatinina (Figura 11A) e nitrogênio ureico (Figura 11B), além da diminuição do fluxo sanguíneo do córtex renal (Figura 11C) em comparação ao grupo controle. Tais alterações não foram observadas no modelo CLP (Figura 11 A, B e C).

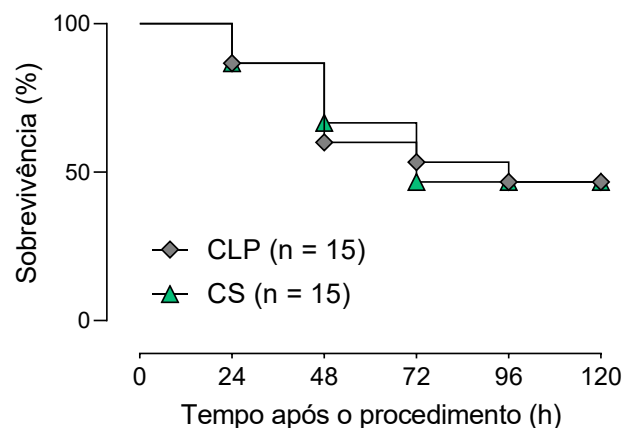
Figura 11 - Avaliação da função renal, vinte e quatro horas após a indução de sepse por *cecal slurry* ou CLP



Foi utilizado 1 g/kg de CS i.p. (A) Creatinina plasmática, (B) nitrogênio ureico e (C) fluxo sanguíneo do córtex renal. O grupo controle foi composto por animais naïve (sem intervenção). As barras representam a média $\pm$ desvio e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n=10-11 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido de Tukey. No painel B e C, os dados foram transformados em logaritmo e raiz quadrada, respectivamente, para se obter distribuição normal. Os valores de p, representados acima das barras, referem-se à análise estatística dos dados transformados. Fonte: elaborada pelo autor.

A taxa de sobrevivência dos animais submetidos à sepse por ambos os modelos experimentais foi avaliada ao longo de 5 dias. Os modelos CS e CLP demonstraram um padrão de mortalidade semelhante, exibindo uma taxa de sobrevivência de cerca de 47% ao final dos 5 dias (Figura 12). Portanto, a indução de sepse por CS demonstrou reproduzir alterações cardiovasculares de maneira semelhante ao modelo CLP e com menor grau de invasividade. Assim, o estudo das alterações cardiovasculares em sobreviventes à sepse foi realizado utilizando o modelo CS.

Figura 12 - Sobrevivência dos animais submetidos ao modelo *cecal slurry* ou CLP.

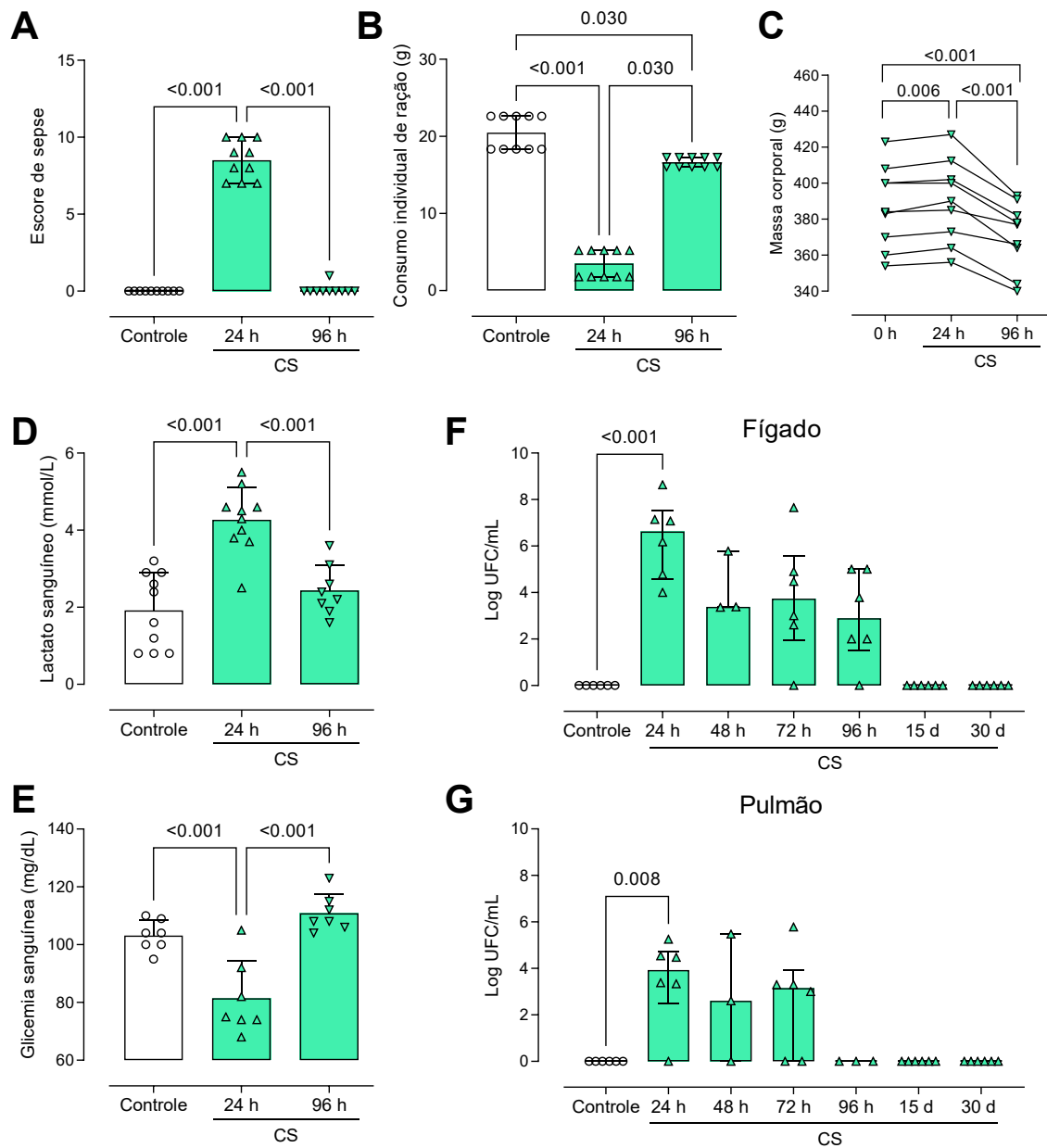


Ratos do grupo CLP foram submetidos à anestesia geral seguida de abertura do peritônio, ligação e perfuração do ceco. Ratos do grupo CS receberam aplicação intraperitoneal de uma suspensão de cecal slurry (1 g/kg i.p.). Em ambos os procedimentos, os animais receberam analgesia com tramadol (10 mg/kg i.p. + 5 mg/kg i.p. a cada 12 horas por 3 dias) e reposição volêmica com solução NaCl 0,9% (50 mL/kg, s.c., 37°C). Os símbolos representam a porcentagem de sobrevivência de cada grupo ao longo do tempo, o n de cada grupo está descrito no painel. A análise estatística foi realizada pelo teste de Gehan-Breslow-Wilcoxon. Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO PERÍODO DE RECUPERAÇÃO DA FASE AGUDA DA SEPSE

Para determinar a duração do período crítico do quadro séptico no modelo CS, os animais foram avaliados 96 horas após a indução da sepsé. Nesse período, os animais demonstraram a redução do escore de sepsé, exibindo a recuperação da aparência, atividade e respiração (Figura 13A). Foi observado um aumento do consumo de ração dos animais 96 horas pós-sepsé, em comparação ao tempo de 24 horas, porém, ainda foi observado redução do consumo em relação ao grupo controle (Figura 13B). Além disso, os animais demonstraram uma redução na massa corporal no tempo de 96 horas (Figura 13C). Foi observado a diminuição dos níveis de lactato no sangue (Figura 13D), bem como a restauração dos níveis glicêmicos (Figura 13E), após 96 horas. A carga bacteriana do tecido pulmonar demonstrou uma diminuição gradual após 24 horas, não sendo mais detectado bactérias no tempo de 96 horas, 15 dias e 30 dias (Figura 13F). Foi observado a presença de bactérias no tecido hepático no tempo de 96 horas, porém, não houve crescimento bacteriano nos tempos de 15 e 30 dias (Figura 13G).

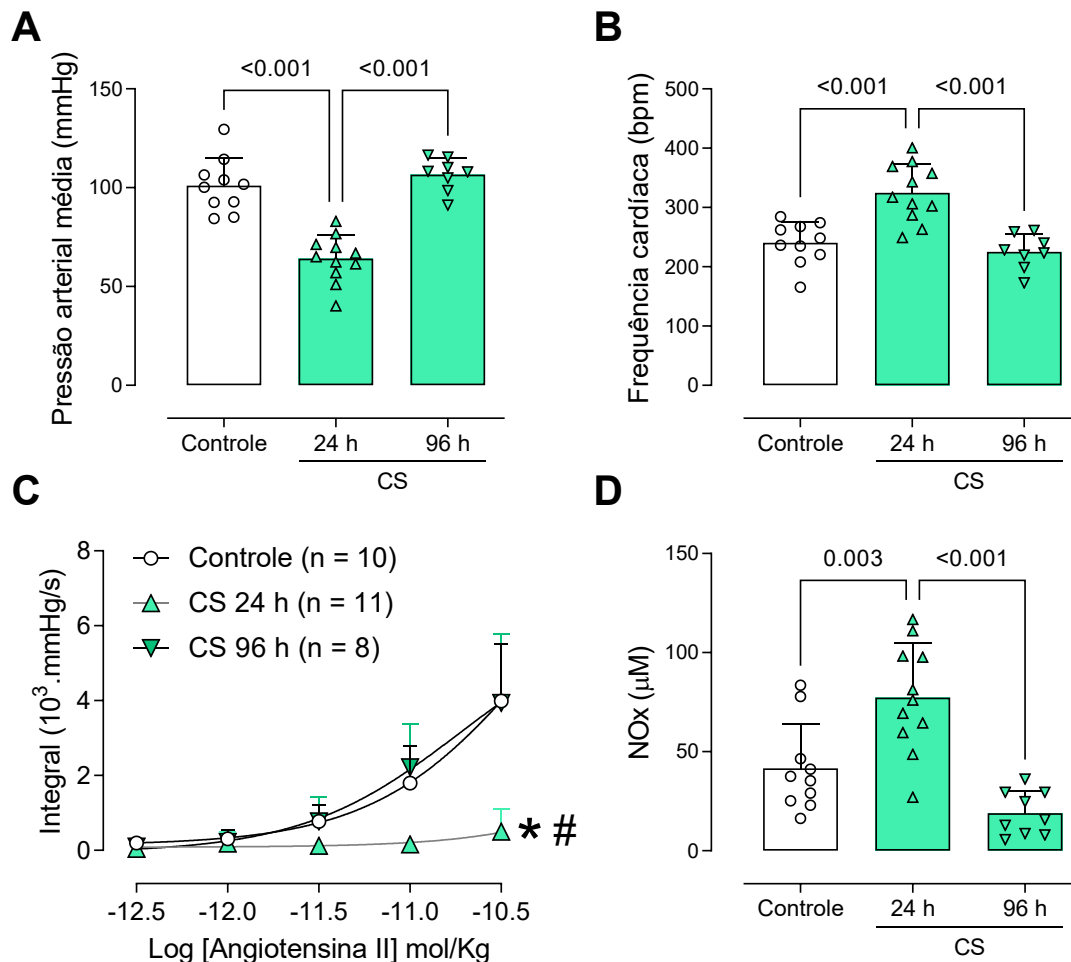
Figura 13 - Caracterização do período de recuperação pós-sepse



Animais foram submetidos à sepse por cecal slurry (1 g/kg i.p.) e acompanhados ao longo do tempo. O escore de sepse (A), consumo de ração (B), lactatemia (D) e glicemia (E) foram avaliados em 96 horas. O grupo controle foi composto por animais naïve (sem intervenção). A massa corporal (C) foi avaliada no mesmo animal, nos tempos 0, 24 e 96 horas. O crescimento de unidades formadoras de colônia em homogenato hepático (F) e pulmonar (G) foi avaliado em animais distintos, nos tempos 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 15 e 30 dias pós-sepse e comparados com um grupo controle. Nos painéis A, B, F e H, as barras representam a mediana $\pm$ intervalo interquartil e cada símbolo corresponde ao valor de um animal. A análise estatística foi realizada por Kruskal-Wallis, seguido de Dunn's. No painel C, cada símbolo corresponde ao valor da massa de um animal, acompanhado ao longo do tempo, $n = 8$. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via com medidas repetidas, seguido de Tukey. Nos painéis D e G, as barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Também foi observado uma aparente normalização dos parâmetros hemodinâmicos avaliados 96 horas após a indução de sepse por CS (pressão arterial média = $106,6 \pm 8$ mmHg e frequência cardíaca = 225 ± 29 bpm). Os animais demonstraram aumento nos valores de pressão arterial média (Figura 14A), diminuição da frequência cardíaca (Figura 14B), e aumento da resposta pressórica à angiotensina II (Figura 14C), em comparação ao grupo CS 24 horas, com valores similares ao grupo controle. Também foi observado uma diminuição dos níveis plasmáticos de NOx 96 horas pós-CS, em comparação ao tempo de 24 horas (Figura 14D).

Figura 14 - Parâmetros hemodinâmicos e níveis de NOx no plasma 96 horas após a indução de sepse

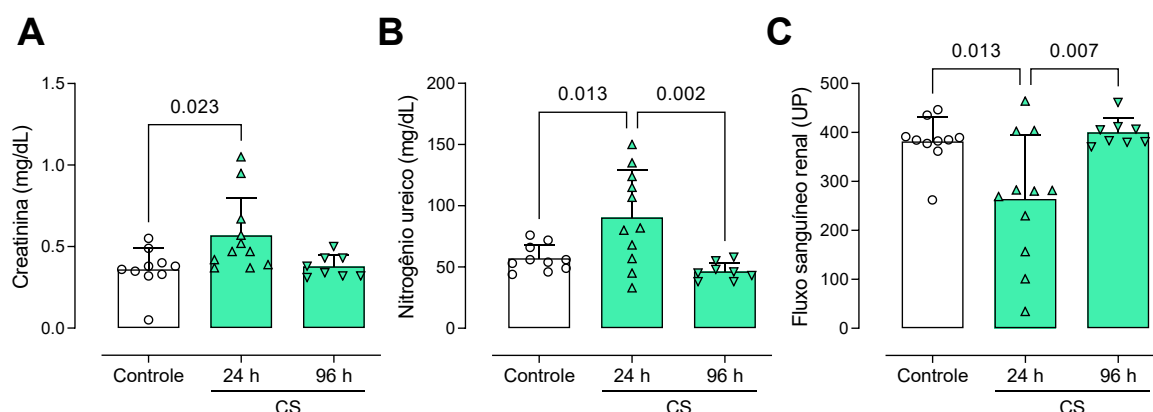


Os animais foram submetidos à sepse por cecal slurry (1 g/kg i.p.) e a pressão arterial média (A), frequência cardíaca (B), resposta pressórica à angiotensina II (C) foram avaliados in vivo após 24 e 96 horas, sob anestesia. Ao fim do protocolo, o sangue foi coletado e o NOx plasmático (D) foi avaliado. O grupo controle foi composto por animais naïve (sem intervenção). Nos painéis A, B e D, as barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal,

n = 10 animais/grupo controle, n = 11 animais/grupo CS 24 h e n = 8 animais/grupo CS 96 h. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. No painel C, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão e o n experimental está indicado. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguido de Tukey. *p < 0,05 em relação ao grupo controle; #p < 0,05 em relação ao grupo CS 96 h. Fonte: elaborada pelo autor.

Os animais submetidos ao modelo CS também demonstraram a aparente recuperação da função renal após 96 horas, evidenciada pela diminuição dos níveis plasmático de creatinina (Figura 15A) e nitrogênio ureico (Figura 15B), e aumento do fluxo sanguíneo do córtex renal (Figura 15C), em comparação a avaliação realizada 24 horas pós-CS. Dessa forma, a partir dos resultados hemodinâmicos, de disfunção de órgãos e disseminação bacteriana, os animais foram considerados sobreviventes à sepse 96 horas após a aplicação do CS.

Figura 15 - Avaliação da função renal 96 horas após a indução de sepse



Os animais foram submetidos à sepse por cecal slurry (1 g/kg i.p.) e o plasma foi coletado após 24 ou 96 horas para avaliação dos níveis de creatinina (A) e nitrogênio ureico (B). O fluxo sanguíneo do córtex renal (C) foi mensurado em animais anestesiados por meio do equipamento laser doppler. O grupo controle foi composto por animais naïve (sem intervenção). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde a um animal (n = 10 animais/grupo controle, n = 11 animais/grupo CS 24 h e n = 8 animais/grupo CS 96 h). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. No painel C, os dados foram transformados em raiz quadrada para se obter distribuição normal e os valores de p referem-se à análise estatística dos dados transformados. Fonte: elaborada pelo autor.

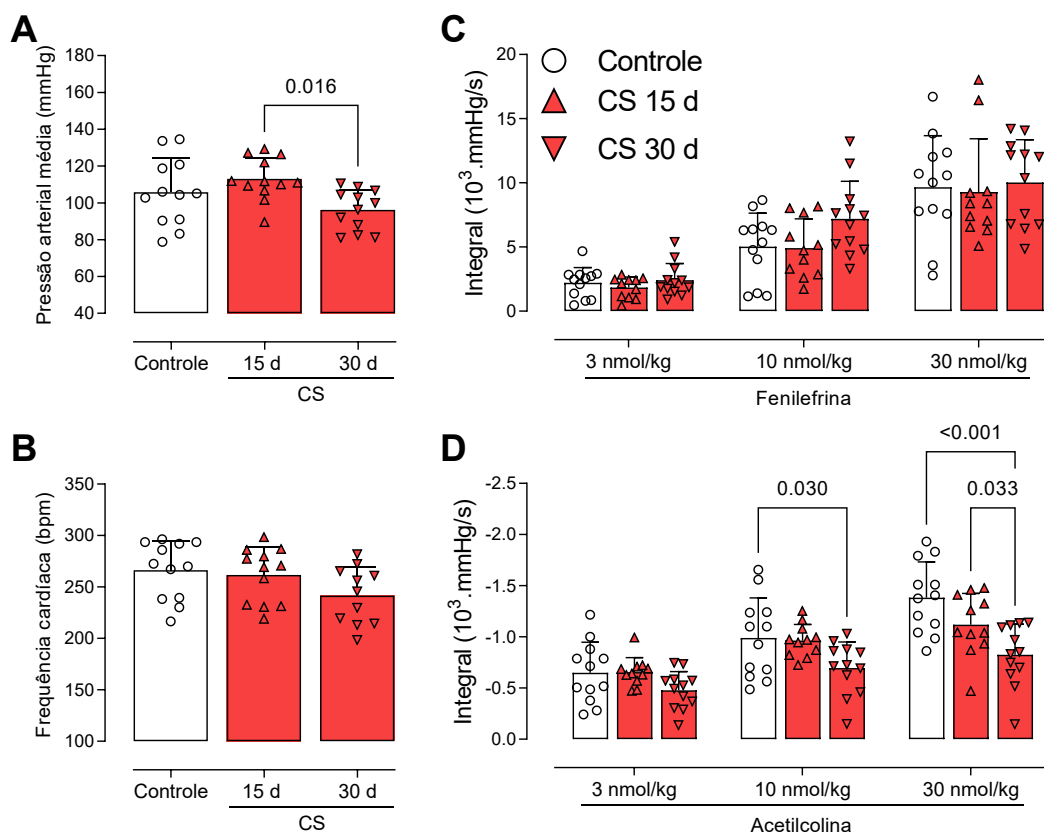
4.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES EM RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE

A fim de investigar o efeito da sepse no comprometimento cardiovascular a longo prazo, alterações cardiovasculares foram avaliadas 15 e 30 dias pós-sepse, contudo, alguns parâmetros foram acompanhados na fase aguda a fim de confirmar

que os animais de fato passaram pelo quadro séptico. Foi observado aumento do escore de sepse, diminuição da glicemia e aumento de lactatemia 24 horas após a aplicação do CS. Houve redução na massa corporal dos animais 96 horas pós-sepse, porém, essa diferença não se manteve nos tempos de 15 e 30 dias (Apêndice C). A taxa de sobrevivência foi de aproximadamente 50% até 96 horas e após esse período, observou-se uma taxa de mortalidade de 8,15%.

Nos animais sobreviventes à sepse, foi observado uma diminuição na pressão arterial média no tempo de 30 dias em comparação aos de 15 dias, mas não em comparação ao grupo controle (Figura 16A). Não foi observado variação significativa na frequência cardíaca (Figura 16B). Também não houve diferença na resposta pressórica ao vasoconstritor fenilefrina entre os grupos experimentais (Figura 16C). Os ratos submetidos à sepse demonstraram uma resposta pressórica diminuída à acetilcolina após 30 dias, evidenciada principalmente nas doses de 10 e 30 nmol/kg. Por outro lado, não houve diferença significativa nos sobreviventes à sepse de 15 dias (Figura 16D).

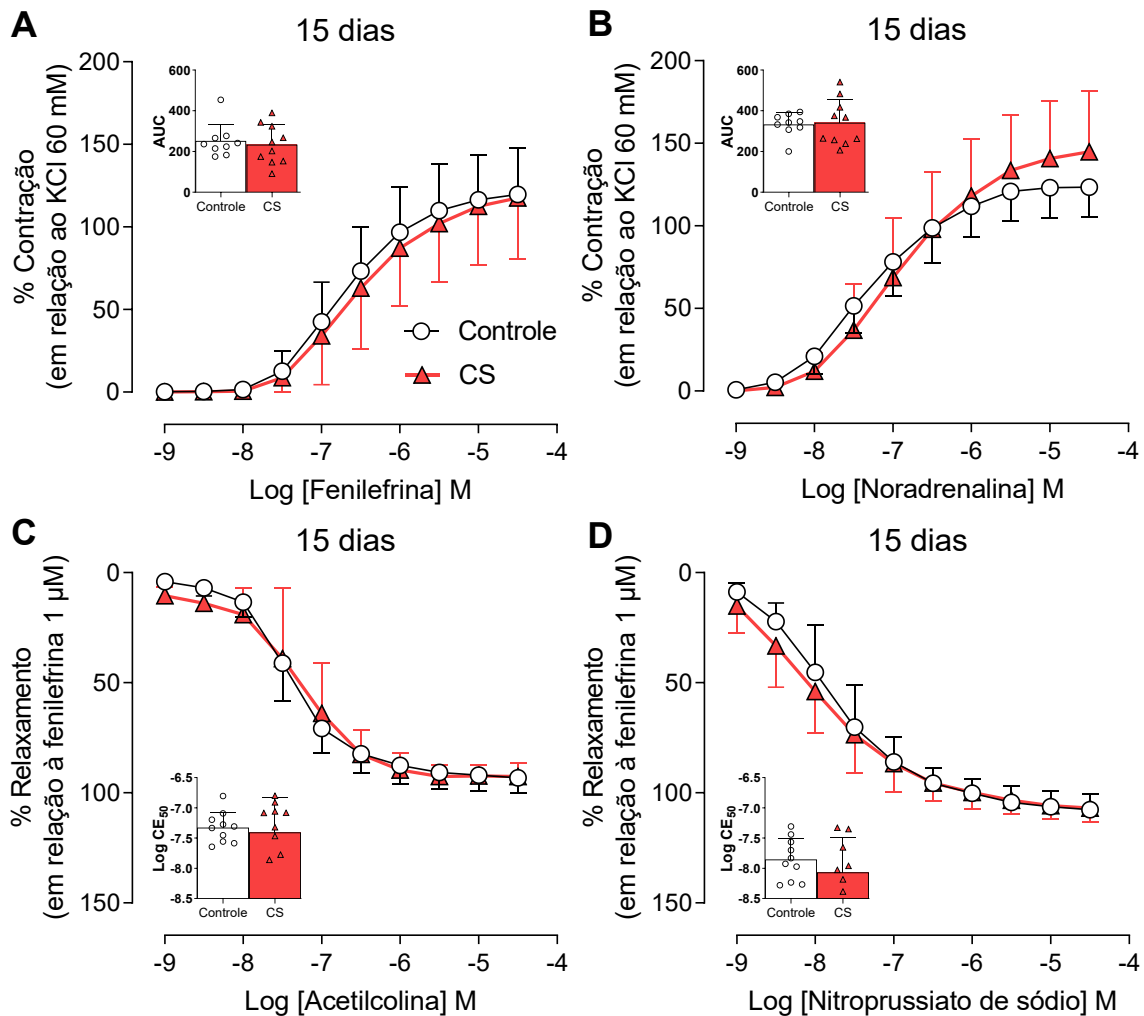
Figura 16 - Hemodinâmica de animais sobreviventes à sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.), tratados com antibiótico em 24 horas (24.000 UI/kg) e a pressão arterial média (A), frequência cardíaca (B) e resposta à fenilefrina (C) e acetilcolina (D) foram avaliados 15 ou 30 dias pós-sepse. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 12 animais/grupo. O grupo controle foi composto por animais sham, 15 e 30 dias após a falsa indução (PBS-5% de glicerol; 10 μ L/g i.p.). A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via nos painéis A e B, e ANOVA de duas vias nos painéis C e D, seguidos de pós teste de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

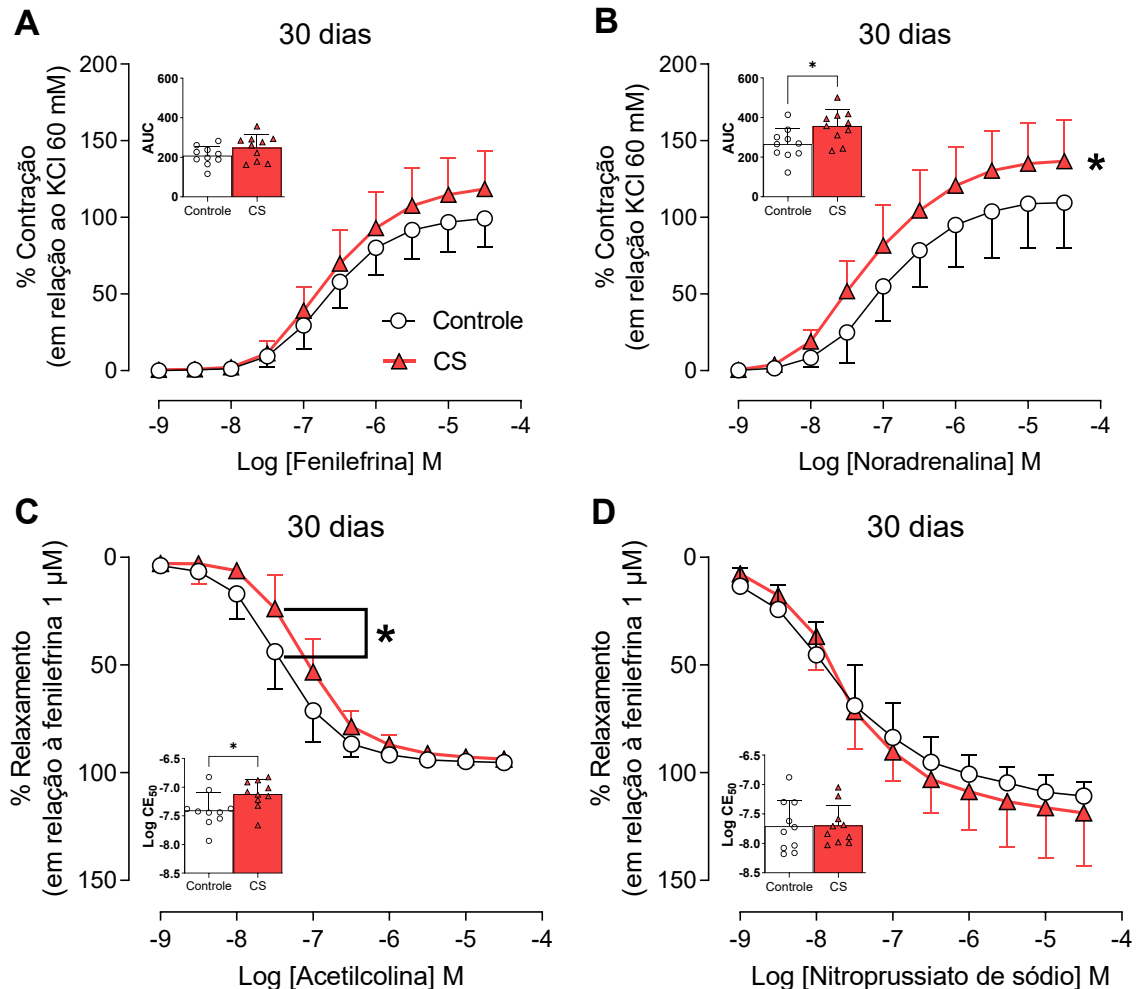
Apesar de extremamente relevante, a avaliação das respostas pressóricas à vasoconstritores e vasodilatadores sofre a influência de diversas respostas compensatórias, as quais podem mascarar alterações vasculares mais sutis. Portanto, a resposta à vasoativos também foi avaliada em anéis de aorta torácica. Não foram detectadas diferenças significativas na contração inicial ao KCl 60 mM, bem como na pré-contração à fenilefrina 1 μ M (Apêndice D), portanto, a contração foi expressa como porcentagem em relação ao KCl e o relaxamento como porcentagem em relação à pré-contração à fenilefrina. Não foi observada diferença na resposta contrátil à fenilefrina e noradrenalina, bem como no relaxamento à acetilcolina e nitroprussiato de sódio, nos vasos de ratos 15 dias pós-sepse (Figura 17A, B, C e D). Por outro lado, foi observado um aumento da resposta à vasoconstritores nos vasos de ratos 30 dias pós-sepse (Figura 18A e B), evidenciado, principalmente, pelo aumento da área sobre a CCR à noradrenalina em relação ao controle (Controle $265,8 \pm 79$; CS 30 d 358 ± 81). O relaxamento aórtico à acetilcolina também foi menor em ratos 30 dias pós-sepse, sendo observado o deslocamento à direita da CCR e aumento do LogCE₅₀ em comparação ao grupo controle (Figura 18C: Controle $-7,4 \pm 0,3$; CS 30 d $-7,1 \pm 0,2$). Em contrapartida, não houve diferença no relaxamento induzido por nitroprussiato de sódio (Figura 18D).

Figura 17 - Avaliação da resposta contrátil e de relaxamento na aorta de ratos 15 dias pós-sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.). O grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Ambos os grupos foram tratados com antibiótico em 24 horas (24.000 UI/kg) e avaliados após 15 dias. Nos painéis A e B, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de contração à fenilefrina (A) e noradrenalina (B) em relação à contração máxima com KCl 60 mM por 5 minutos. O gráfico de barras representa o efeito máximo (E_{max}) de cada curva avaliada de forma individual, em que cada símbolo corresponde a um animal ($n = 10$ animais/grupo). Nos painéis C e D, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de relaxamento à acetilcolina (C) e nitroprussiato de sódio (D) em relação à contração máxima com fenilefrina 1 μ M. O gráfico de barras representa o LogCE_{50} de cada curva avaliada de forma individual, em que cada símbolo corresponde a um animal ($n = 10$ animais/grupo). A análise estatística das curvas concentração-resposta foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de Tukey e dos gráficos de barras por teste t de Student. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 18 - Avaliação da resposta contrátil e de relaxamento na aorta de ratos 30 dias pós-sepse

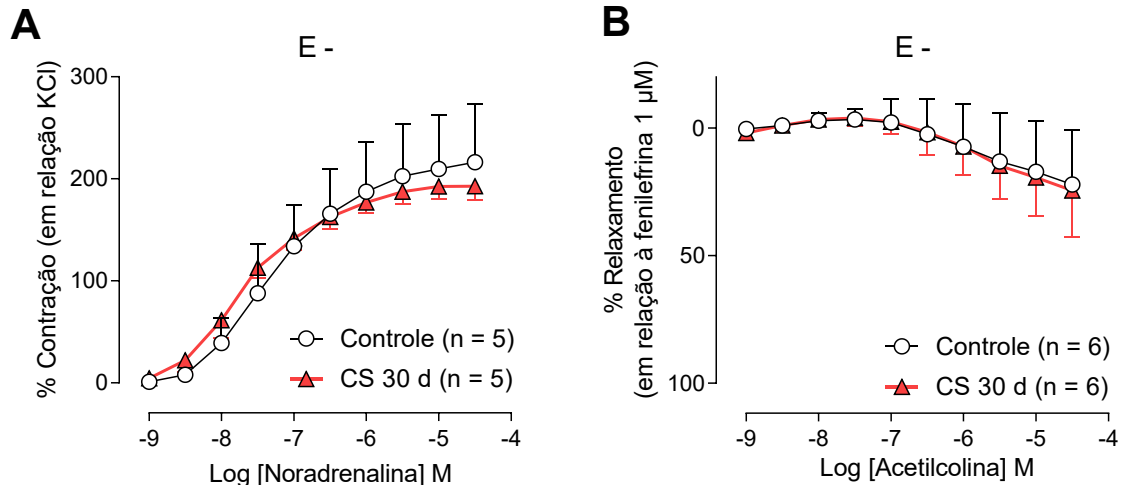


Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.). O grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Ambos os grupos foram tratados com antibiótico em 24 horas (24.000 UI/kg) e avaliados após 30 dias. Nos painéis A e B, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de contração à fenilefrina (A) e noradrenalina (B) em relação à contração máxima com KCl 60 mM por 5 minutos. O gráfico de barras representa o efeito máximo (E_{max}) de cada curva avaliada de forma individual, em que cada símbolo corresponde a um animal ($n = 10$ animais/grupo). Nos painéis C e D, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de relaxamento à acetilcolina (C) e nitroprussiato de sódio (D) em relação à contração máxima com fenilefrina 1 μ M. O gráfico de barras representa o LogCE₅₀ de cada curva avaliada de forma individual, em que cada símbolo corresponde a um animal ($n = 10$ animais/grupo). A análise estatística das curvas concentração-resposta foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Os gráficos de barras foram avaliados por teste t de Student (* $p < 0,05$). Fonte: elaborada pelo autor.

Para avaliar a relação das alterações encontradas com a função endotelial das aortas, a resposta contrátil à noradrenalina e vasodilatadora à acetilcolina foram avaliadas em vasos sem o endotélio preservado (Relaxamento dependente do endotélio: Controle $9,8 \pm 12\%$; CS 30 d $6,45 \pm 7,9\%$). Não foi observado diferença entre os anéis do grupo controle e do grupo CS 30 d (Figura 19A e B). Portanto, as

alterações observadas nos anéis de 30 dias são dependentes da presença do endotélio.

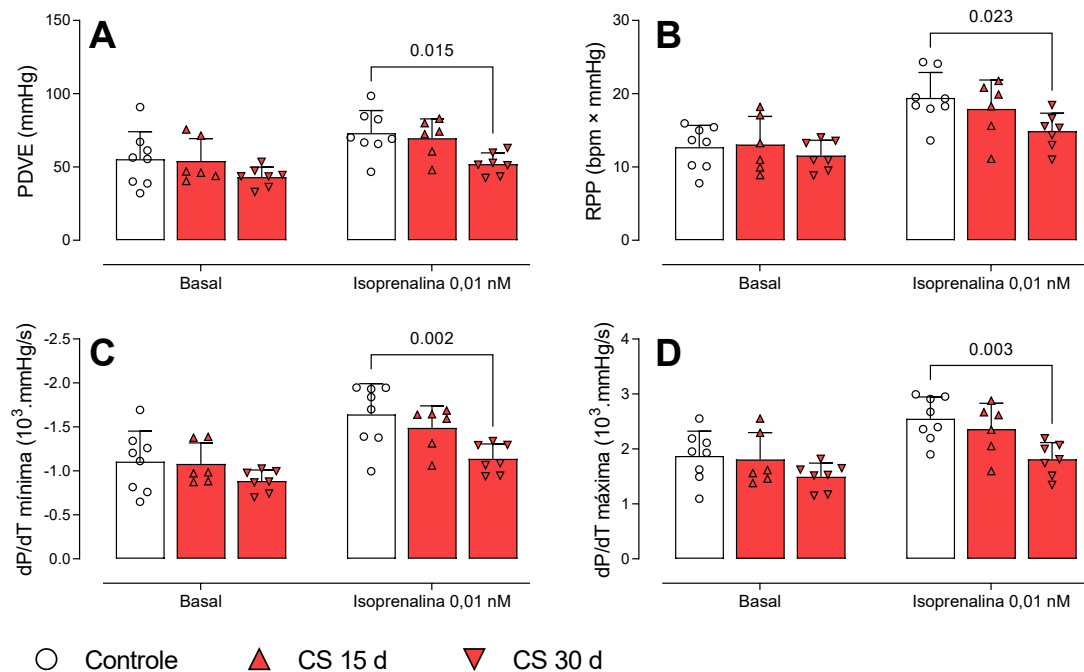
Figura 19 - Avaliação da resposta contrátil e de relaxamento em aortas sem o endotélio preservado



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.). O grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μL/g i.p.). Ambos os grupos foram tratados com antibiótico em 24 horas (24.000 UI/kg) e avaliados após 30 dias. No painel A, os símbolos representam a média ± desvio padrão da porcentagem de contração à noradrenalina em relação à contração máxima com KCl 60 mM por 5 minutos, n = 5 animais/grupo. No painel B, os símbolos representam a média ± desvio padrão da porcentagem de relaxamento à acetilcolina em relação à contração máxima com fenilefrina 1 μM, n = 6 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de Tukey. Fonte: elaborada pelo autor.

As alterações cardíacas em sobreviventes à sepse foram investigadas por meio da avaliação do coração isolado em preparação de Langendorff. Não foram observadas diferenças nos parâmetros PDVE, RPP, dP/dT mínima e máxima dos corações em repouso. Entretanto, foi observada uma redução significativa da função cardíaca dos animais 30 dias pós-sepse em relação ao grupo controle, durante o desafio com isoprenalina 0,01 nM (Figura 20A-D). A diminuição da PDVE e RPP indica menor força de contração miocárdica (Figura 20A e B). Enquanto a diminuição das dP/dT mínima e máxima sugerem um menor índice de relaxamento e de contração ventricular, respectivamente (Figura 20C e D). Essas alterações não foram observadas no tempo de 15 dias após a indução da sepse.

Figura 20 - Avaliação da função cardíaca de animais sobreviventes à sepse em sistema de Langendorff



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.), tratados com antibiótico em 24 horas (24.000 UI/kg) e avaliados 15 ou 30 dias pós-sepse. O grupo controle foi composto por animais sham, 15 e 30 dias após a falsa indução (PBS-5% de glicerol; 10 $\mu\text{L/g}$ i.p.). Os corações foram perfundidos retrogradamente (pressão de perfusão média = $44,2 \pm 10$ mmHg) e os parâmetros foram registrados por meio de um balão de látex inserido no ventrículo esquerdo inflado até pressão fixa (pressão diastólica do ventrículo esquerdo média = $9 \pm 0,7$ mmHg). O painel A representa a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, calculada pela diferença da pressão sistólica e diastólica. O produto frequência-pressão (RPP; painel B) foi calculado por meio fórmula frequência cardíaca $\times$ PDVE/1000. O painel C indica a taxa máxima de diminuição da pressão pelo tempo de relaxamento ventricular (diástole) (dP/dT mínima), enquanto o painel D indica a taxa máxima de aumento da pressão pelo tempo da contração ventricular (sístole) (dP/dT máxima). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde a um animal, n = 6-8 animal/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

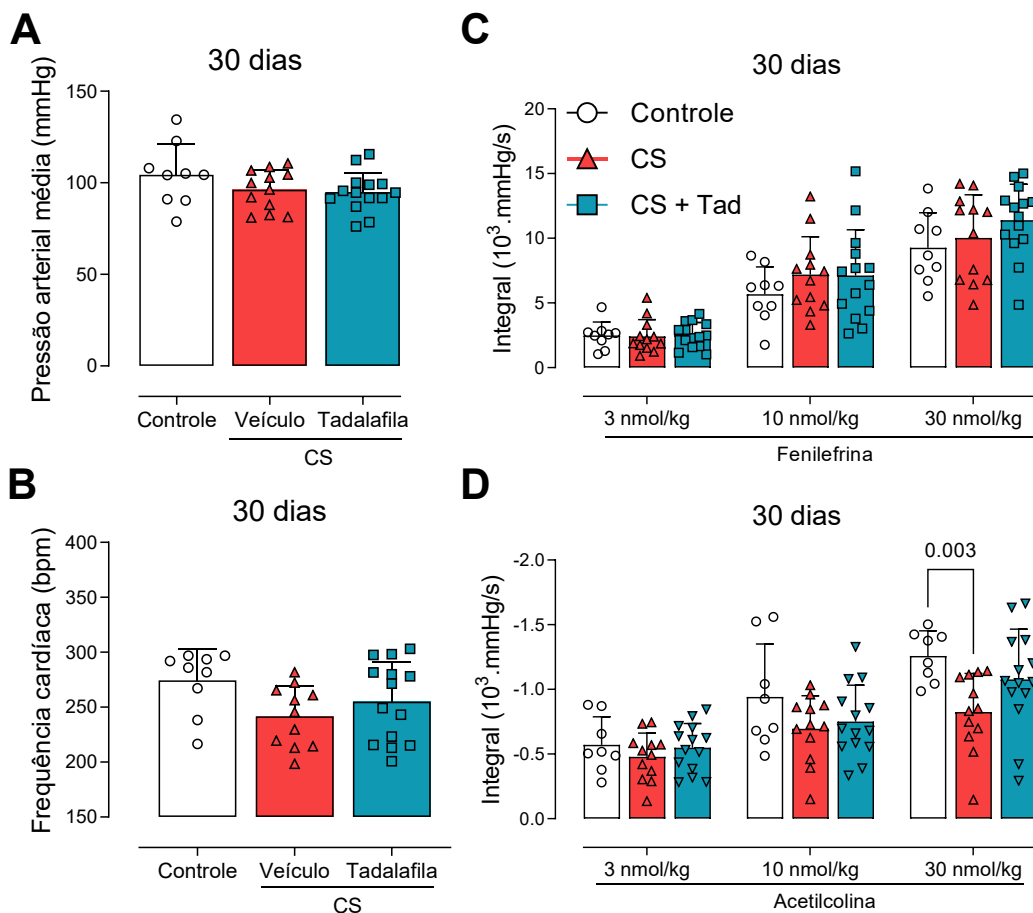
4.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PDE5 EM RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE

Para a melhor visualização dos resultados, estes foram segregados em análises *in vivo* e de marcadores sistêmicos (sanguíneos e plasmáticos) e, posteriormente, em avaliações *ex vivo* vasculares e cardíacas.

4.4.1 Análises *in vivo* e sistêmicas

O efeito do tratamento com tadalafila foi avaliado na hemodinâmica de ratos 30 dias pós-sepse. Não foi observada diferença nos valores de pressão arterial média (Figura 21A) e frequência cardíaca (Figura 21B) entre os grupos experimentais. Também não houve diferença na resposta pressórica à fenilefrina (Figura 21C). Já a redução da resposta pressórica à acetilcolina, observada nos animais 30 dias pós-sepse, não foi observada nos animais tratados com tadalafila (Figura 21).

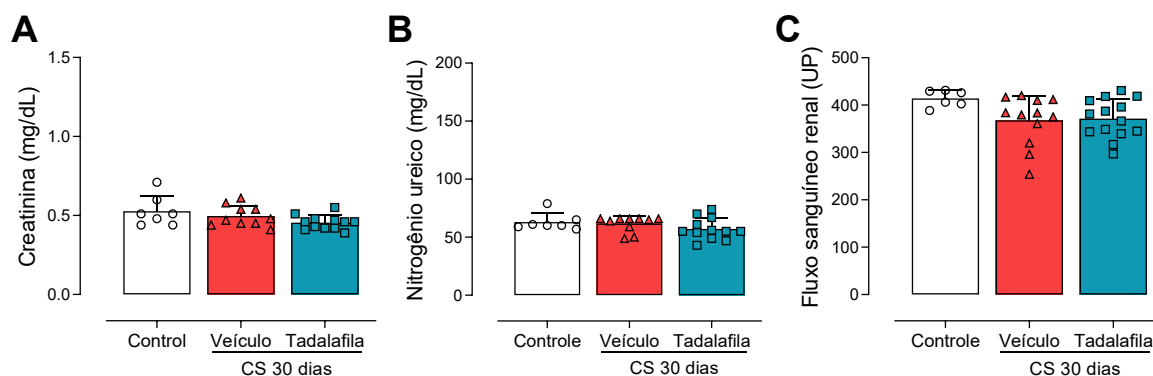
Figura 21 – Efeito da tadalafila na hemodinâmica de animais 30 dias pós-sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). A pressão arterial média (A), frequência cardíaca (B), e resposta à administração intravenosa de fenilefrina (C) e acetilcolina (D) foram avaliadas in vivo, em animais anestesiados. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 9 animais/grupo controle, n = 12 animais/grupo CS e n = 14 animais/grupo CS + Tad. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

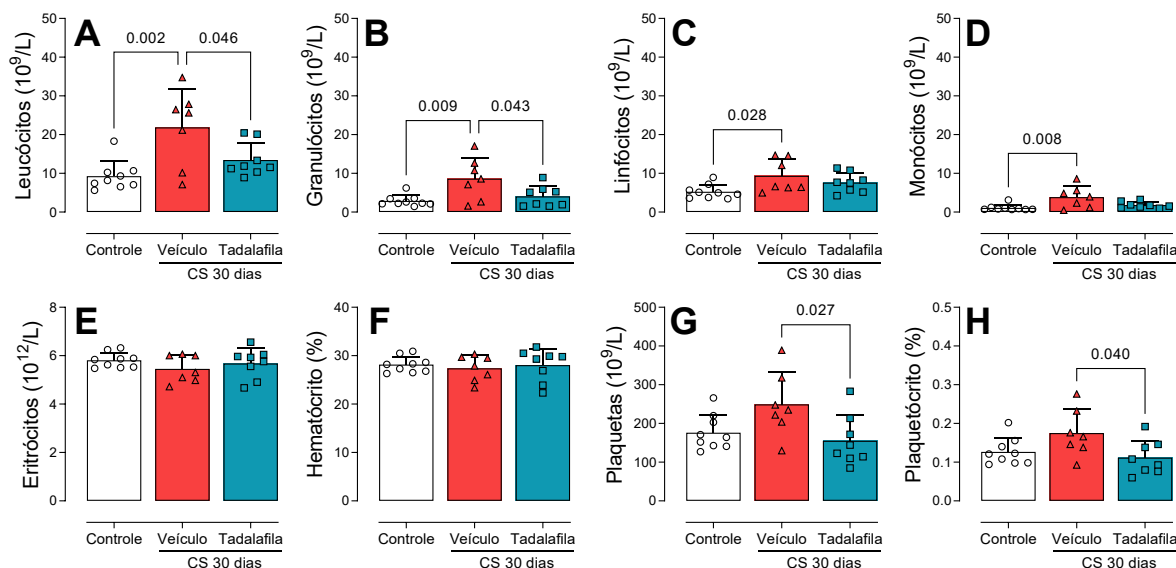
Não foram identificadas alterações nos marcadores plasmáticos de função renal dos animais 30 dias pós-sepse, com e sem tratamento (Figura 22A e B). Também não houve redução no fluxo sanguíneo do córtex (Figura 22C). Por outro lado, os ratos sobreviventes à sepse demonstraram um aumento na inflamação sistêmica, conforme indicado pelo aumento do número de leucócitos no sangue (Figura 23A). A análise diferencial revelou o aumento de granulócitos, linfócitos e monócitos no grupo CS 30 d em relação ao controle (Figura 23B-D). Nesse aspecto, o tratamento com tadalafila demonstrou um efeito anti-inflamatório, ao reduzir o número de leucócitos e granulócitos no sangue de ratos 30 dias pós-sepse (Figura 23A e B). Não houve diferença no número de eritrócitos e porcentagem de hematócrito entre os grupos experimentais (Figura 23E e F). Já a avaliação de plaquetas mostrou um aumento no número e volume de sangue ocupado por plaquetas (plaquetócrito) no grupo CS 30 d em comparação ao CS 30 d tratado com tadalafila (Figura 23G e H). Não houve diferença na avaliação do perfil hematológico no período de 15 dias (Apêndice E).

Figura 22 - Efeito da tadalafila na função renal de animais 30 dias pós-sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Os níveis de creatinina (A) de nitrogênio ureico (B) foram avaliados no plasma. O fluxo sanguíneo renal (C) foi avaliado em animais anestesiados por meio do equipamento laser doppler. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 6-14 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido de Tukey. Fonte: elaborada pelo autor.

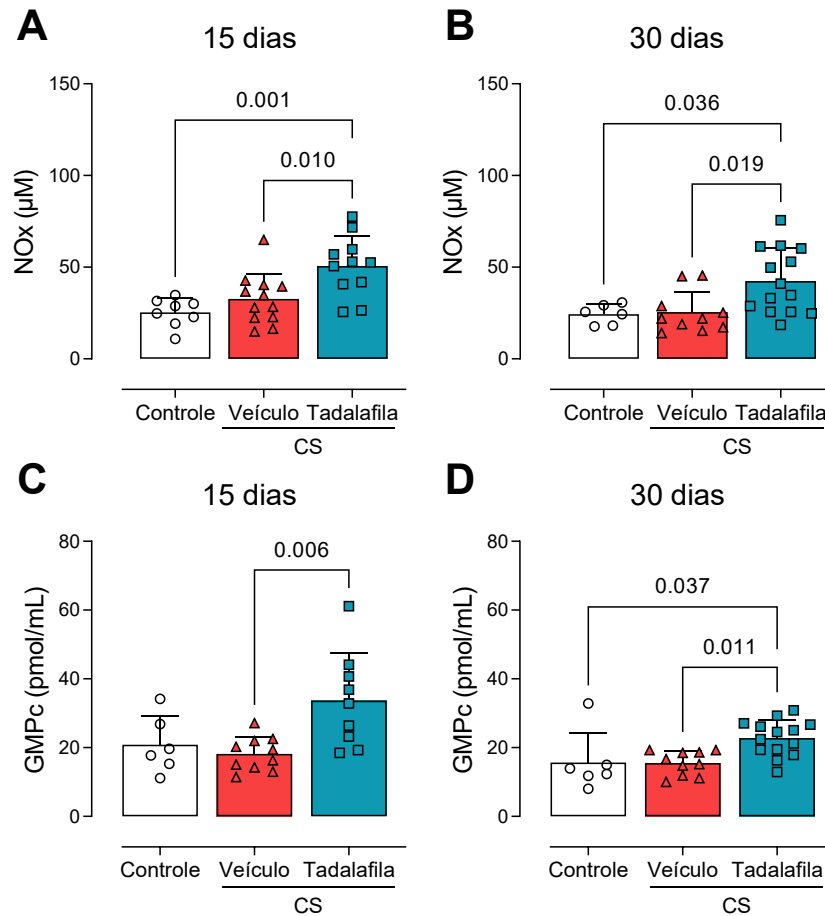
Figura 23 – Efeito da tadalafila em parâmetros hematológicos 30 dias pós-sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Número de leucócitos (A), granulócitos (B), linfócitos (C), monócitos (D), eritrócitos (E) e plaquetas (G) no sangue. O volume de sangue ocupado por eritrócitos e plaquetas estão representados nos painéis F e H, como hematócrito (%) e plaquetócrito, respectivamente. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 9 animais/grupo controle, n = 7 animais/grupo CS e n = 8 animais/grupo CS + Tad. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. No painel D, os dados foram transformados em escala logarítmica para se obter distribuição normal. Os valores de p, representados acima das barras, referem-se à análise estatística dos dados transformados.

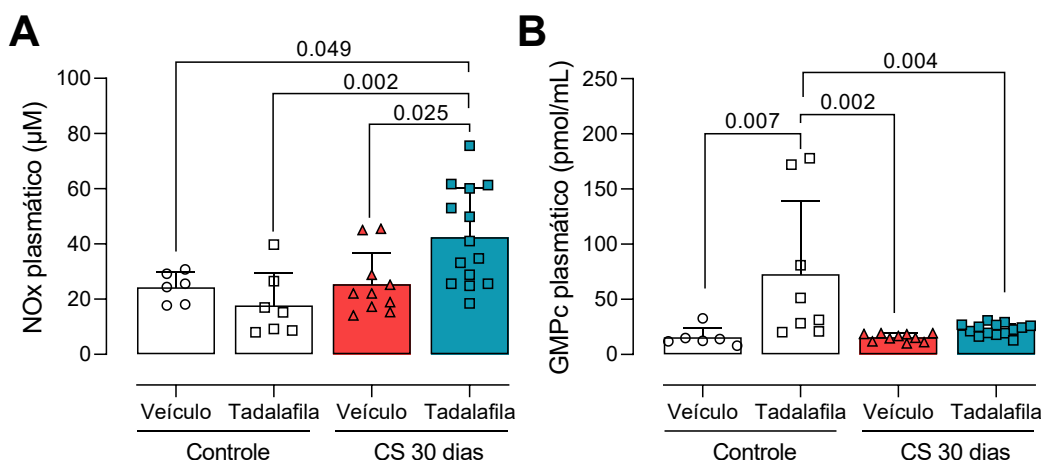
A fim de investigar se há comprometimento da via de sinalização do NO pós-sepse, os níveis plasmáticos de NOx e GMPc foram avaliados. Não houve diferença nos níveis plasmáticos de NOx e GMPc entre os sobreviventes à sepse tratados com veículo e os animais controle, tanto em 15 (Figura 24A e C) quanto em 30 dias (Figura 24B e D). Entretanto, foi observado um aumento de NOx e GMPc no plasma dos ratos sobreviventes à sepse tratados com tadalafila nos tempos de 15 e 30 dias (Figura 24), sugerindo a potencialização dessa via de sinalização. Diante disso, julgou-se necessário avaliar também o efeito do tratamento crônico com tadalafila nos níveis plasmáticos de NOx e GMPc em animais saudáveis. Em contraste com o aumento pronunciado em animais sobreviventes à sepse tratados com tadalafila, não foi observado aumento de NOx no plasma de animais saudáveis submetidos ao mesmo tratamento (Figura 25A). Já os níveis de GMPc foram significativamente elevados no plasma de animais controle tratados com tadalafila em comparação aos demais grupos experimentais (Figura 25B).

Figura 24 - Efeito da tadalafila nos níveis plasmáticos de NOx e GMPc em ratos sobreviventes à sepse.



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μL/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Os níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (painéis A e B) e guanosina monofosfato cíclico (painéis C e D) foram avaliados 15 e 30 dias pós-sepse. As barras representam a média ± desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 6-14 animais/grupo. Os valores 206 e 74 foram identificados como outlier nos painéis B e C, respectivamente, e foram excluídos. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 25 - Efeito do tratamento crônico com tadalafila nos níveis plasmáticos de NOx e GMPc de animais controle



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μL/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). Os grupos controle + Tad e CS + Tad receberam tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.) até 30 dias, enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Níveis plasmáticos de NOx (A) e GMPc (B). As barras representam a média ± desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 6-14 animais/grupo. O valor 206 foi identificado como outlier no painel A e foi excluído. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

4.4.2 Análises vasculares

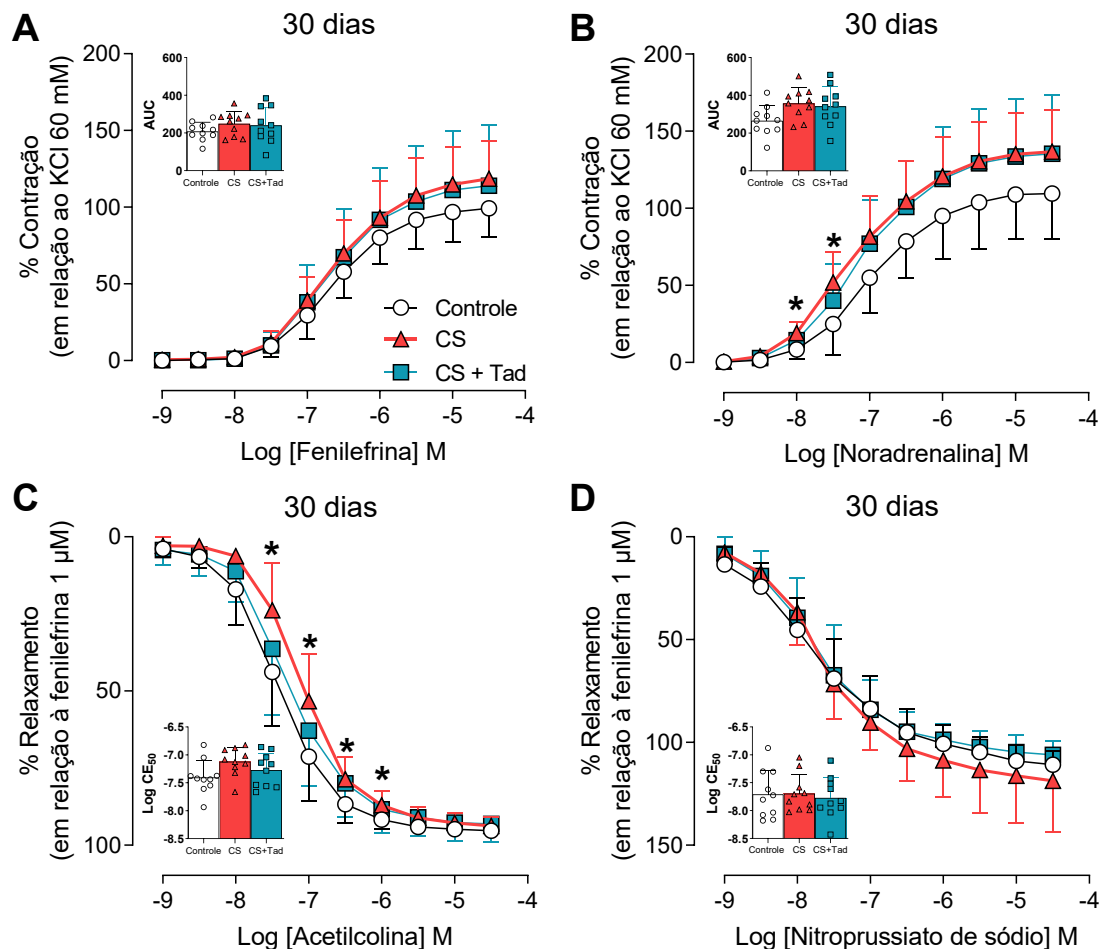
Não foram detectadas diferenças na reatividade aórtica de animais sobreviventes à sepse, tratados ou não com tadalafila, em relação ao grupo controle, no período de 15 dias (Apêndice F). Também não foi observado diferença nos valores de E_{max} , $LogCE_{50}$ e área sob a curva, obtidos por meio da análise individual das CCR à fenilefrina, noradrenalina, acetilcolina e nitroprussiato em aortas de ratos 30 dias pós-sepse, em relação ao grupo controle (Tabela 5). Contudo, foram identificadas diferenças na interação do grupo experimental e concentração utilizada. Houve um aumento na contratilidade aórtica à noradrenalina (10 nM e 30 nM), bem como a diminuição no relaxamento à acetilcolina (30 nM; 100 nM; 300nM e 1 μM) no grupo CS 30 d em comparação aos controles de mesma idade. Essas alterações não foram observadas no grupo CS tratado com tadalafila (Figura 26).

Tabela 5 – Eficácia e potência de vasoativos na aorta de ratos 15 dias pós-sepse, tratados ou não com tadalafila, em comparação ao controle

Droga	Grupo	E_{max}	LogCE₅₀	AUC	N amostral
Fenilefrina	Controle 30 d	98,8 ± 18,7	-6,63 ± 0,21	208,6 ± 47,9	10
	CS 30 d	117,8 ± 23,9	-6,64 ± 0,17	249,4 ± 64,6	10
	CS + Tad 30 d	112,4 ± 38,5	-6,65 ± 0,21	240,6 ± 94,3	10
	<i>P</i>	0,32	0,99	0,41	
Noradrenalina	Controle 30 d	108,6 ± 29,6	-6,99 ± 0,28	265,8 ± 79,3	10
	CS 30 d	133,7 ± 24,7	-7,19 ± 0,31	358,0 ± 81,5	10
	CS + Tad 30 d	132,9 ± 36,2	-7,11 ± 0,25	342,5 ± 103,1	10
	<i>P</i>	0,13	0,29	0,06	
Acetilcolina	Controle 30 d	94,28 ± 2,3	-7,40 ± 0,30	277,8 ± 24,6	10
	CS 30 d	92,24 ± 2,5	-7,12 ± 0,25	242,5 ± 7,4	10
	CS + Tad 30 d	91,75 ± 5,6	-7,27 ± 0,30	258,5 ± 40,7	10
	<i>P</i>	0,3	0,10	0,06	
Nitroprussiato de sódio	Controle 30 d	110,4 ± 6,2	-7,71 ± 0,44	346,9 ± 41,6	10
	CS 30 d	116,4 ± 24,0	-7,70 ± 0,34	360,6 ± 46,9	10
	CS + Tad 30 d	104,2 ± 8,1	-7,77 ± 0,37	333,9 ± 50,6	10
	<i>P</i>	0,21	0,89	0,45	

Siglas: E_{max} – resposta máxima; LogCE₅₀ – logaritmo da concentração que gera 50% do E_{max}; AUC – área sob a curva; Tad – tadalafila. Os parâmetros foram obtidos por regressão não linear das curvas contração-resposta, considerando quatro parâmetros. O valor de P corresponde a análise estatística realizada por ANOVA de uma via. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 26 - Efeito da tadalafila na resposta contrátil e de relaxamento na aorta de ratos 30 dias pós-sepse

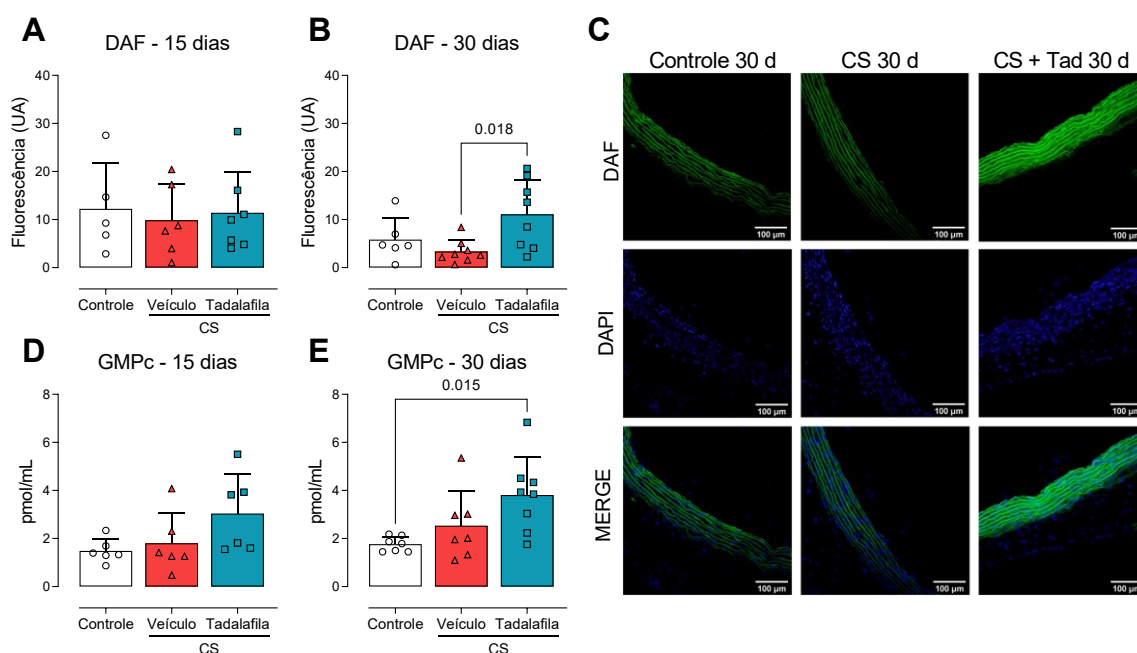


Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Nos painéis A e B, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de contração à fenilefrina (A) e noradrenalina (B) em relação à contração máxima com KCl 60 mM por 5 minutos. O gráfico de barras representa o efeito máximo (E_{max}) de cada curva avaliada de forma individual, em que cada símbolo corresponde a um animal ($n = 10$ animais/grupo). Nos painéis C e D, os símbolos representam a média $\pm$ desvio padrão da porcentagem de relaxamento à acetilcolina (C) e nitroprussiato de sódio (D) em relação à contração máxima com fenilefrina 1 μ M. O gráfico de barras representa o Log CE_{50} de cada curva avaliada de forma individual, em que cada símbolo corresponde a um animal ($n = 10$ animais/grupo). A análise estatística das curvas concentração-resposta foi realizada por ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido de Tukey. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. Os gráficos de barras foram avaliados ANOVA de uma via. Fonte: elaborada pelo autor.

Diante do indício de disfunção endotelial, os níveis de NO na aorta de sobreviventes à sepse foram estimados pela marcação com a sonda fluorescente DAF. Foi observado um aumento de fluorescência nas aortas dos animais 30 dias pós-sepse tratados com tadalafila em comparação aos animais tratados com veículo (Figura 27B e C). De maneira similar, foi observado um aumento dos níveis de

GMPc na aorta dos animais CS tratados com tadalafila, em comparação ao grupo controle, no período de 30 dias (Figura 27E). Todavia, não foi detectado redução desses parâmetros no grupo CS tratado com veículo nos períodos avaliados (Figura 27A-E).

Figura 27 - Efeito da tadalafila nos níveis de óxido nítrico e GMPc na aorta de sobreviventes à sepse

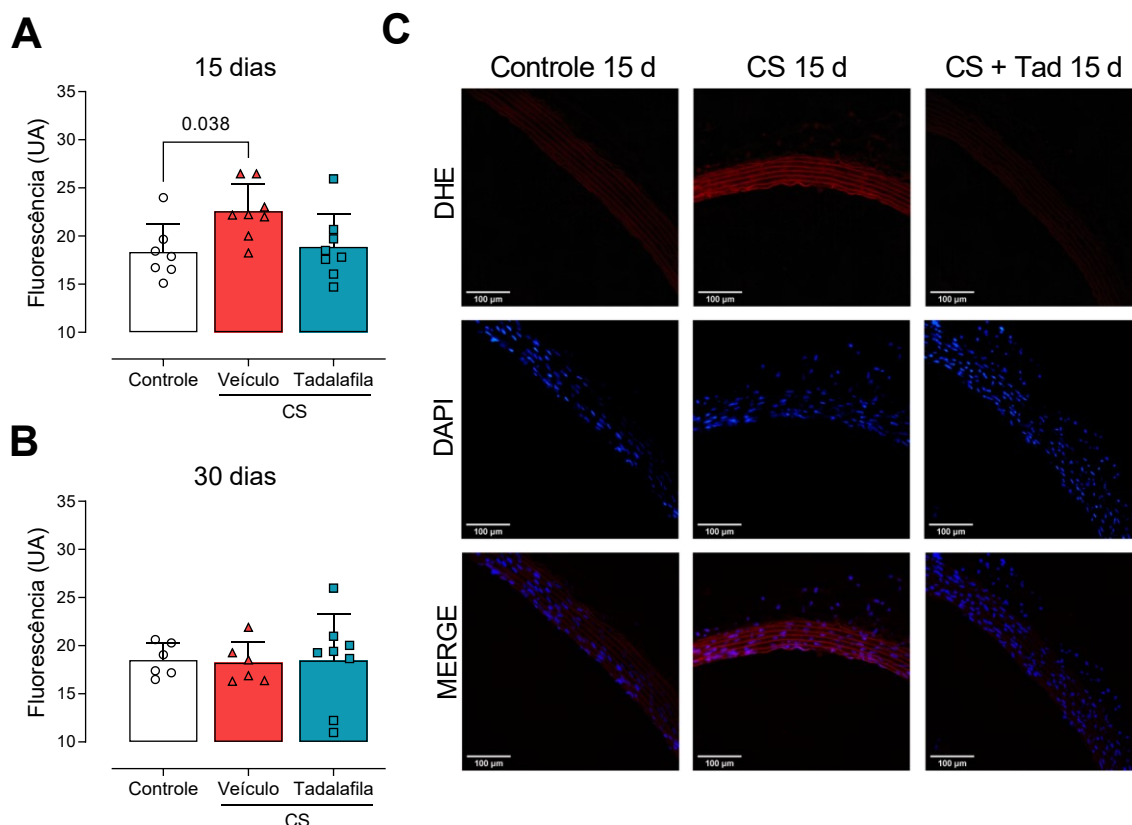


Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Os níveis de óxido nítrico na aorta foram mensurados por meio da sonda fluorescente diacetato de diaminofluoresceína (DAF) 15 e 30 dias pós-sepse (painéis A e B). A média de autofluorescência ($13,6 \pm 1$ UA) foi descontada de cada quantificação, valores negativos foram excluídos. (C) Imagens representativas da fluorescência observada com DAF (em verde) 30 dias pós-sepse. Os núcleos foram contra-corados com DAPI (em azul). A barra branca representa 100 μ m. Os níveis de GMPc na aorta foram avaliados por ensaio imunoenzimático 15 e 30 dias pós-sepse (painéis D e E). Os valores 66 (CS) e 55 (CS + Tad) foram identificados como outlier no painel A, e os valores 4,59 e 6,72 (Controle) foram identificados como outlier no painel E, e foram excluídos. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 5-8 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Visto a relação do aumento de EROs com a disfunção vascular, a sonda fluorescente DHE foi utilizada para estimar os níveis de superóxido no tecido aórtico. Foi observado um aumento da fluorescência de DHE na aorta dos ratos sobreviventes à sepse tratados com veículo em comparação ao controle no tempo de 15 dias. Essa elevação não foi observada no grupo tratado com tadalafila (Figura

28A e C). Não foi observada diferença entre os grupos experimentais no período de 30 dias (Figura 28B).

Figura 28 - Efeito da tadalafila nos níveis de espécies reativas de oxigênio na aorta de sobreviventes à sepse

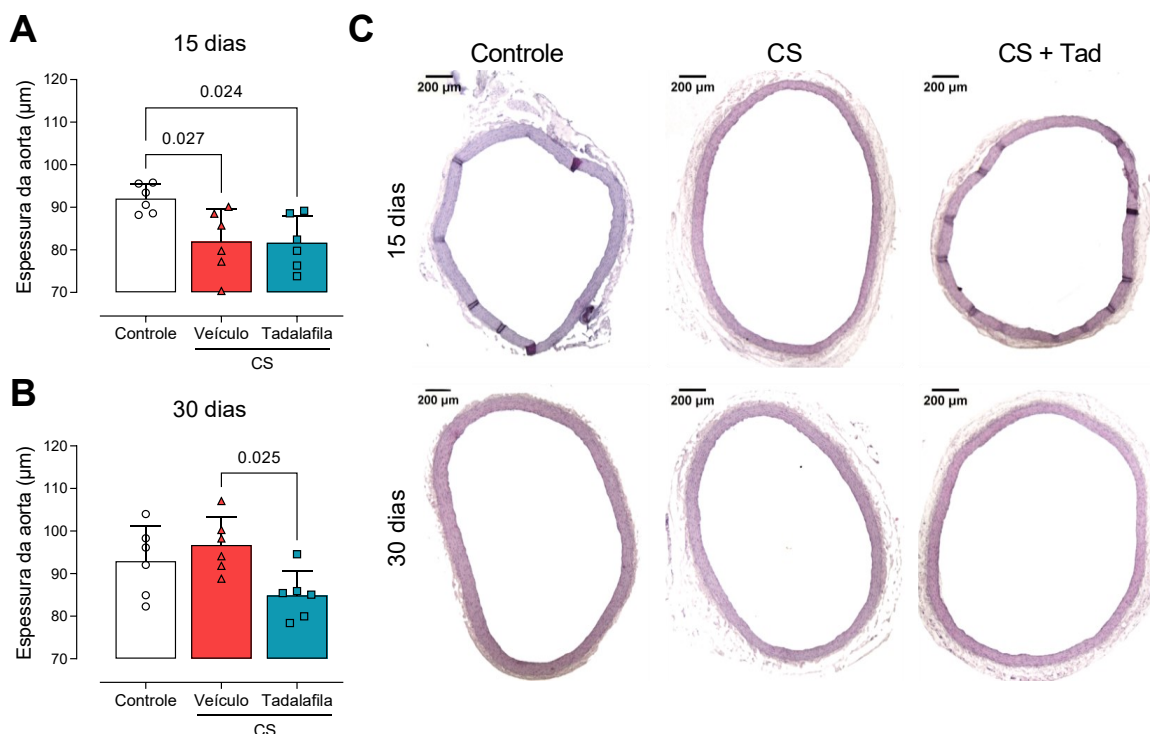


Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 µL/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Os níveis de superóxido na aorta foram mensurados por meio da sonda fluorescente de dihidroetídio (DHE) 15 e 30 dias pós-sepse (painéis A e B). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor médio de quatro imagens de um animal, $n = 6-8$ animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. (C) Imagens representativas da fluorescência observada com DHE (em vermelho) 15 dias pós-sepse. A barra branca representa 100 µm. Para melhor visualização, o fundo das imagens foi removido pelo método "Subtract Background" no ImageJ, aplicando um raio de rolagem fixo de 300 pixels para as três imagens. Os núcleos foram contra-corados com DAPI (em azul). Fonte: elaborada pelo autor.

O efeito da sepse na espessura das camadas da parede vascular foi avaliado por meio da avaliação histomorfométrica da aorta após 15 e 30 dias. Foi observado uma diminuição na espessura da aorta (soma das túnica íntima e média) de animais sobreviventes à sepse tratados com veículo ou com tadalafila em relação ao controle no tempo de 15 dias (Figura 29A e C). Já no período de 30 dias, houve

um aumento na espessura do grupo CS, que demonstra medida similar ao controle, sugerindo um processo de remodelação vascular pós-sepse (Figura 29 B e C). Por outro lado, no grupo tratado com tadalafila, os valores observados em 30 dias permanecem similares aos de 15 dias.

Figura 29 - Efeito da tadalafila na espessura aórtica de ratos sobreviventes à sepse

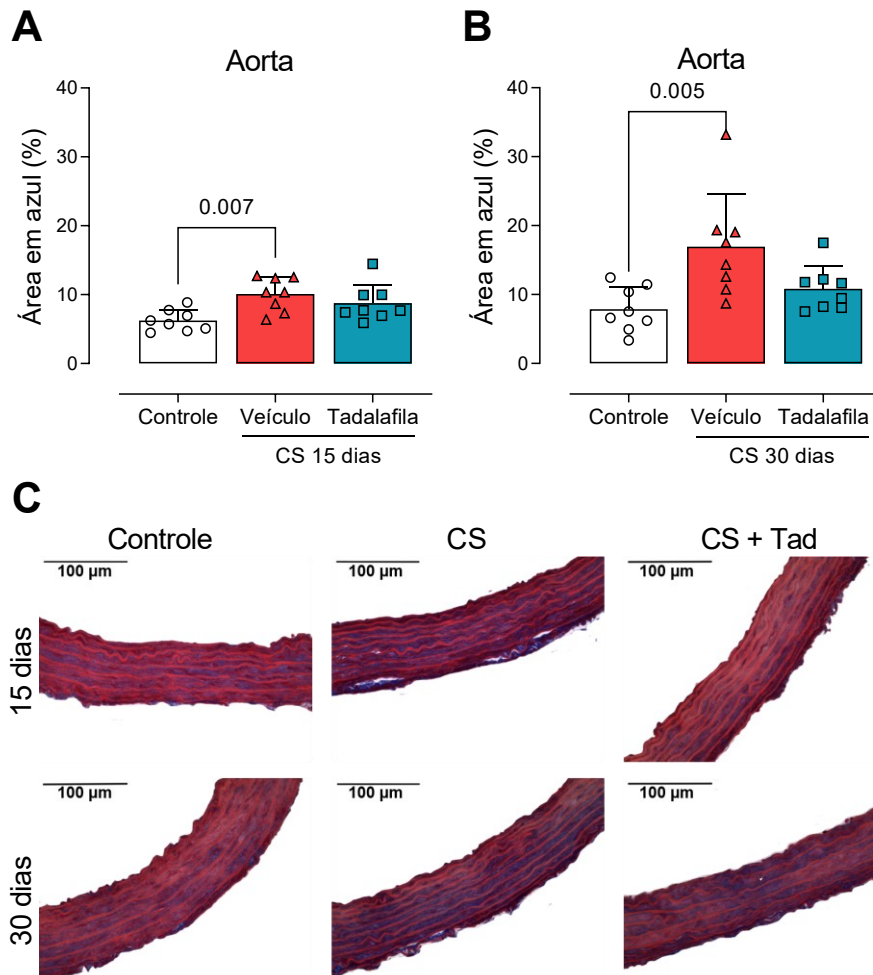


Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 $\mu\text{L/g}$ i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). A espessura das tûnicas íntima e média (descontando a tûnica adventícia) da aorta foi avaliada 15 e 30 dias pós-sepse (painéis A e B). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor médio de oito medidas de um animal, $n = 6$ animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. (C) Imagens representativas das aortas. As barras pretas representam 200 μm . Para a melhor visualização, o fundo das imagens foi substituído por branco. Fonte: elaborada pelo autor.

O processo de remodelação vascular pode ocorrer por hipertrofia do músculo liso vascular e/ou alterações na matriz extracelular, como deposição de colágeno. Portanto, a coloração diferencial de tricrômico de Masson foi utilizada para avaliar a deposição de fibras colágenas na aorta, coradas em azul. Foi observado um aumento na deposição de colágeno nas aortas dos animais sobreviventes à sepse tratados com veículo em comparação ao grupo controle, nos tempos de 15 e

30 dias. Em contrapartida, não foi observado diferença nos animais tratados com tadalafila pós-sepse (Figura 30A-C).

Figura 30 - Efeito da tadalafila na deposição de colágeno na aorta de ratos sobreviventes à sepse

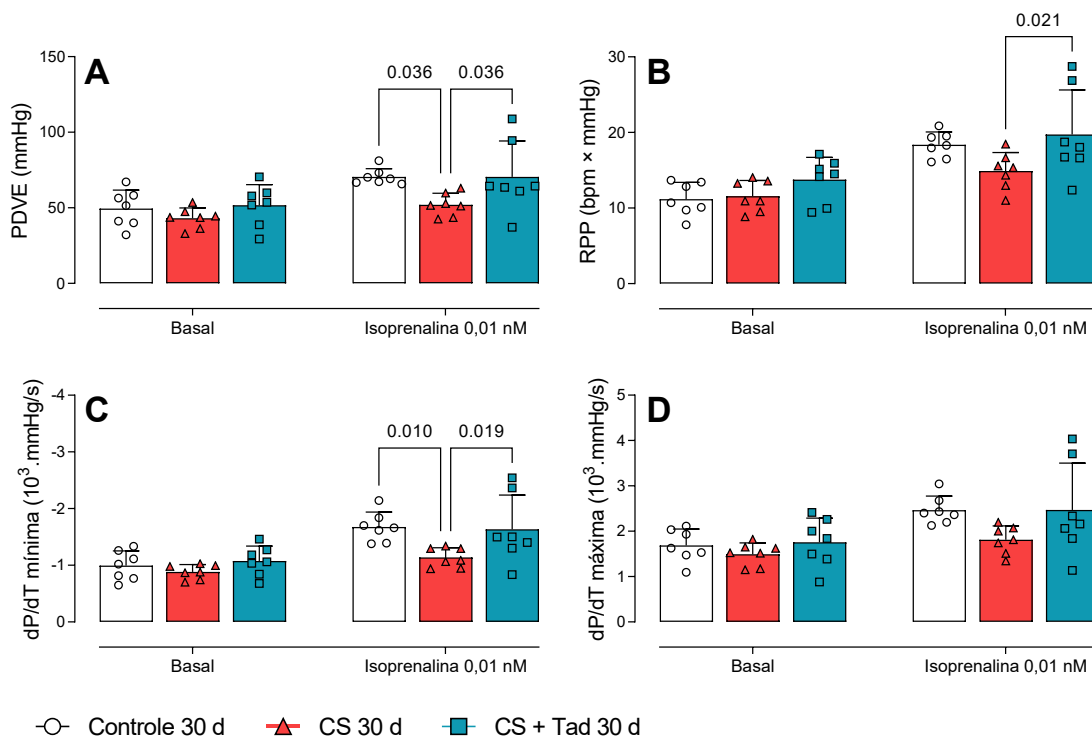


Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Cortes do tecido vascular foram realizados 15 e 30 dias pós-sepse, corados com tricrômico de Masson. Foi avaliada a porcentagem da área corada em azul, proporcional à quantidade de colágeno do tipo I e III na aorta (painéis A e B). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor médio de quatro imagens de cada animal, $n = 8$ animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. (C) Imagens representativas das aortas. As barras pretas representam 100 μ m. Para a melhor visualização, o brilho de todas as imagens foi aumentado em 10% e o fundo foi substituído por branco. Fonte: elaborada pelo autor.

4.4.3 Análises cardíacas

O tratamento com tadalafila atenuou os parâmetros de disfunção cardíaca observados em ratos 30 dias pós-sepse (Figura 31). Os sobreviventes à sepse tratados com veículo demonstraram uma redução da PDVE (Figura 31A) e dP/dT mínima (Figura 31C) durante a infusão de isoprenalina (0,01 nM), em comparação aos controles de mesma idade, sugerindo comprometimento na força de contração e relaxamento do ventrículo esquerdo quando submetidos ao estresse, apesar de não ser observado comprometimento significativo da taxa frequência-pressão e dP/dT máxima (Figura 31B e D). Já os animais tratados com tadalafila demonstraram aumentar significativamente a PDVE, RPP e dP/dT mínima em comparação aos animais tratados com veículo, 30 dias pós-sepse (Figura 31).

Figura 31 - Efeito da tadalafila na função cardíaca de ratos 30 dias pós-sepse em sistema de Langendorff

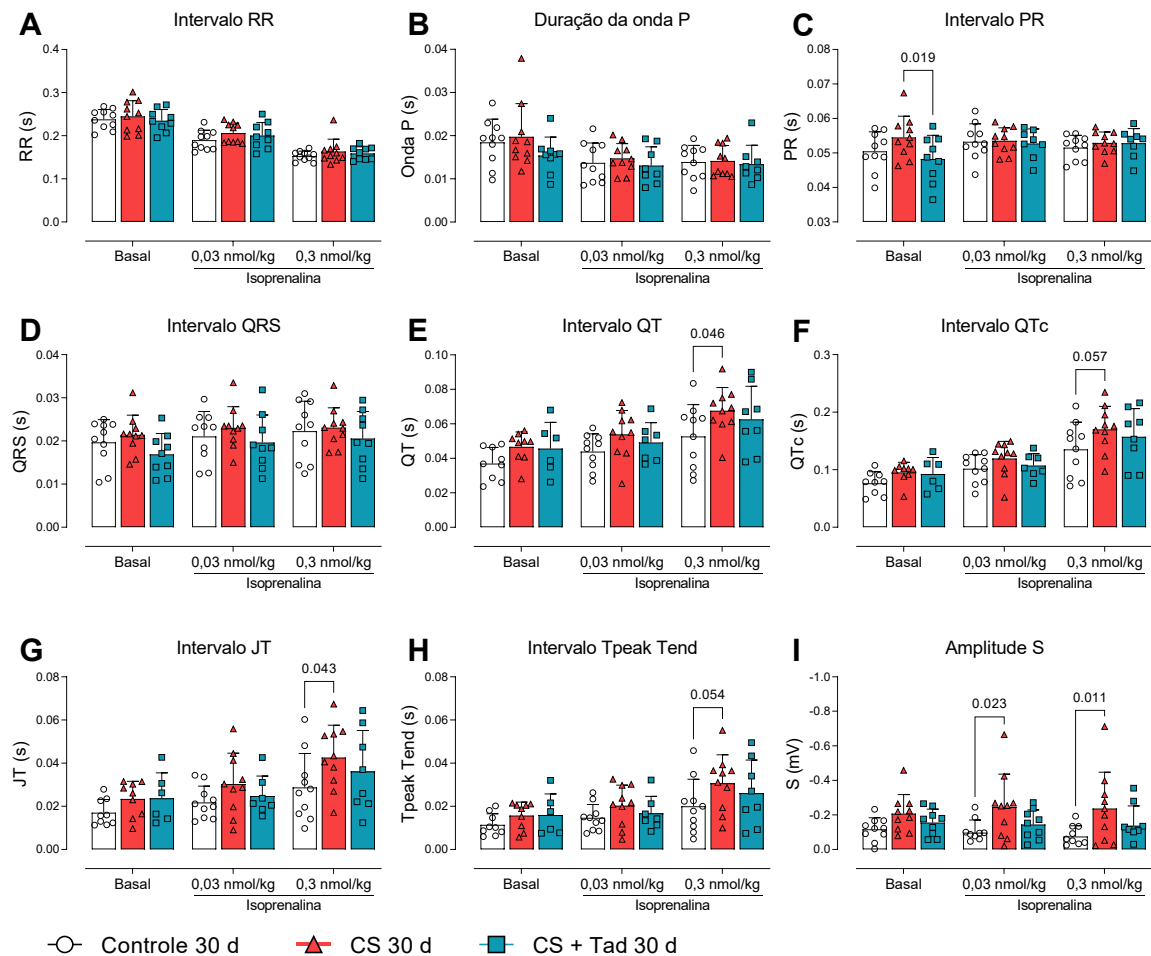


Os animais sépticos receberam CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) após 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.). Os corações foram perfundidos retrogradamente (pressão de perfusão média = $44,0 \pm 10$ mmHg) e os parâmetros foram registrados por meio de um balão de látex inserido no ventrículo esquerdo inflado até pressão fixa (pressão diastólica do ventrículo esquerdo média = $8,9 \pm 0,7$ mmHg). Foram obtidos os valores basais, bem como após a administração de isoprenalina 0,01 nM. O painel A representa a pressão desenvolvida pelo ventrículo esquerdo, calculada pela diferença da pressão sistólica e diastólica. O produto frequência-pressão (RPP; painel B) foi calculado por meio fórmula frequência cardíaca $\times$ PDVE/1000. O painel C indica a taxa máxima de diminuição da pressão pelo tempo de relaxamento ventricular (diástole) (dP/dT mínima), enquanto o painel D indica a taxa máxima de aumento da pressão pelo tempo da contração ventricular (sístole).

(dP/dT mínima). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde a um animal, n = 7 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Diante do efeito da tadalafila nas alterações na função cardíaca, os parâmetros eletrocardiográficos de ratos 30 dias pós-sepse foram avaliados no repouso e durante o estresse com isoprenalina (0,03 nmol/kg e 0,3 nmol/kg) (Figura 32). Durante o basal, foi observado apenas o aumento do intervalo PR nos animais tratados com veículo, em comparação aos animais que receberam tadalafila (Figura 28C). Durante o estresse com isoprenalina, foi observado um aumento dos intervalos QT (Figura 32E) e JT (Figura 32G), bem como o aumento da amplitude da onda S (Figura 32I) nos sobreviventes à sepse em comparação ao grupo controle. Parâmetros relacionados à fase de despolarização e repolarização ventricular. Essas alterações não foram observadas nos sobreviventes à sepse tratados com tadalafila. Além disso, o número de extrassístoles durante a resposta à isoprenalina foi quantificado no registro eletrocardiográfico. Foram contabilizadas 9, 16 e 5 extrassístoles nos grupos controle, CS e CS + Tad, respectivamente, após a administração de 0,3 nmol/kg de isoprenalina. Na dose de 0,03 nmol/kg apenas uma extrassístole foi observada, no grupo CS tratado com veículo.

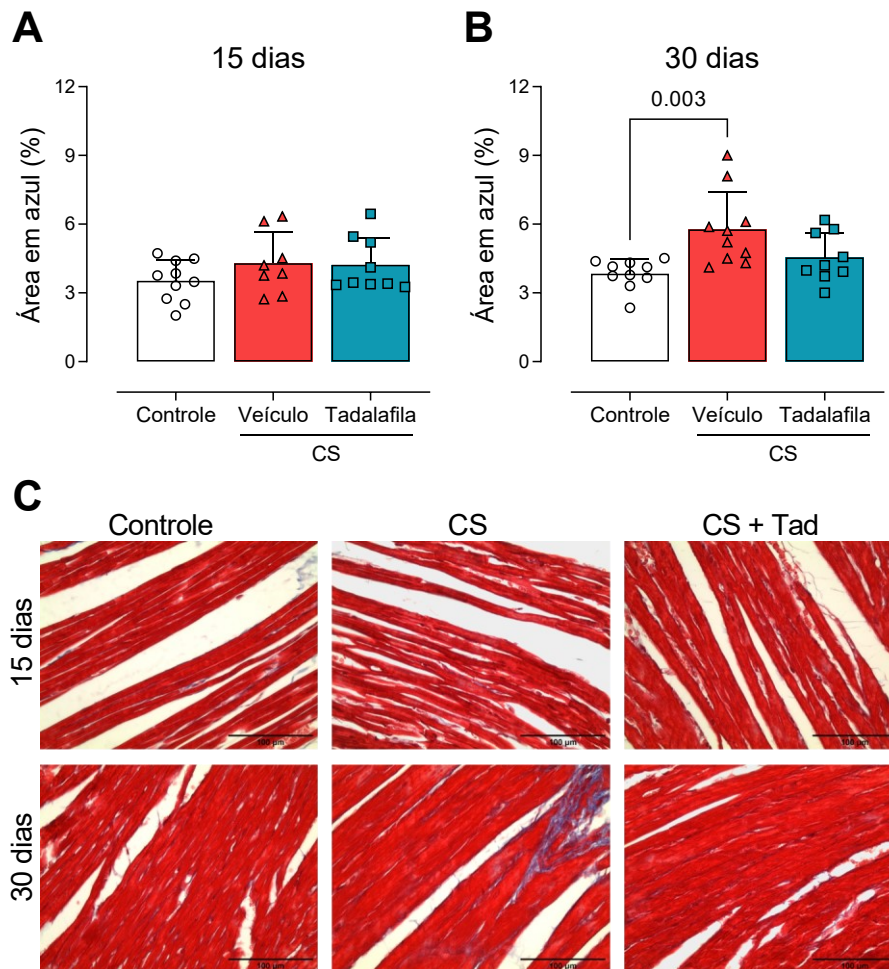
Figura 32 - Efeito da tadalafila nos parâmetros eletrocardiográficos de ratos 30 dias pós-sepse



Os animais sépticos receberam CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) após 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.). Foram avaliados os parâmetros basais e após duas doses independentes de isoprenalina (0,03 e 0,03 nmol/kg i.v.), em animais anestesiados. (A) Intervalo RR. (B) Duração da onda P. (C) Intervalo PR. (D) Intervalo QRS. (E) Intervalo QT. (F) Intervalo QT corrigido. (G) Intervalo JT. (H) Intervalo Tpeak Tend. (I) Amplitude S. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde a um animal, n = 10 animal/grupo controle, n = 10 animal/grupo CS, n = 9 animal/grupo CS + Tad. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

O aumento dos intervalos eletrocardiográficos supracitados pode indicar hipertrofia ou fibrose do tecido cardíaco, visto que há o atraso na condução elétrica. A avaliação do tecido cardíaco corado com tricrômico de masson revelou um aumento da área em azul no ventrículo esquerdo, condizente com aumento da deposição de colágeno nos animais sobreviventes à sepse em comparação aos controles, no período de 30 dias (Figura 33B e C). Não foi observado diferença no período de 15 dias, bem como nos animais tratados com tadalafila (Figura 29).

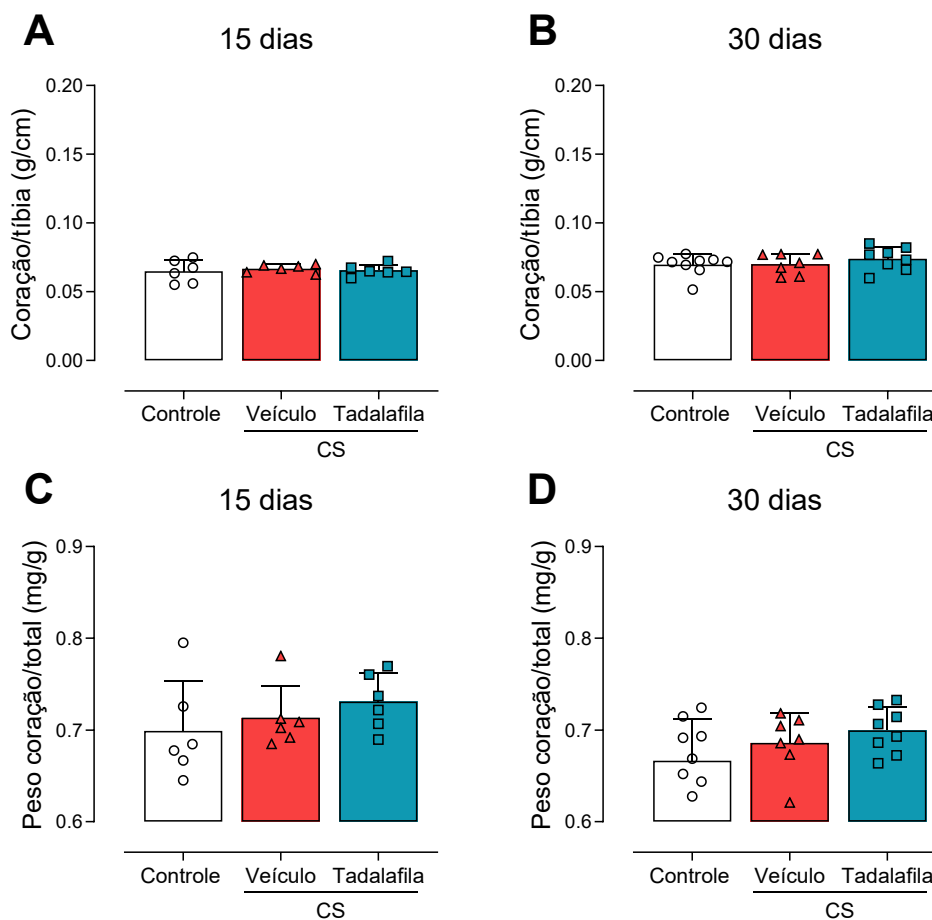
Figura 33 - Efeito da tadalafila na deposição de colágeno no tecido cardíaco de ratos sobreviventes à sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Cortes do tecido cardíaco foram realizados 15 e 30 dias pós-sepse, corados com tricrômico de Masson. Foi avaliada a porcentagem da área corada em azul, proporcional à quantidade de colágeno do tipo I e III no tecido cardíaco (painéis A e B). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor médio de quatro imagens de um animal, $n = 8-10$ animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. (C) Imagens representativas das fibras cardíacas. As barras pretas representam 100 μ m. Para melhor visualização, o brilho de todas as imagens foi aumentado em 10%. Fonte: elaborada pelo autor.

A hipertrofia do músculo cardíaco foi estimada por meio do peso do coração seco em relação ao comprimento da tíbia ou à massa corporal de cada animal. Não foi identificado aumento desses índices nos grupos experimentais em nenhum grupo experimental (Figura 34).

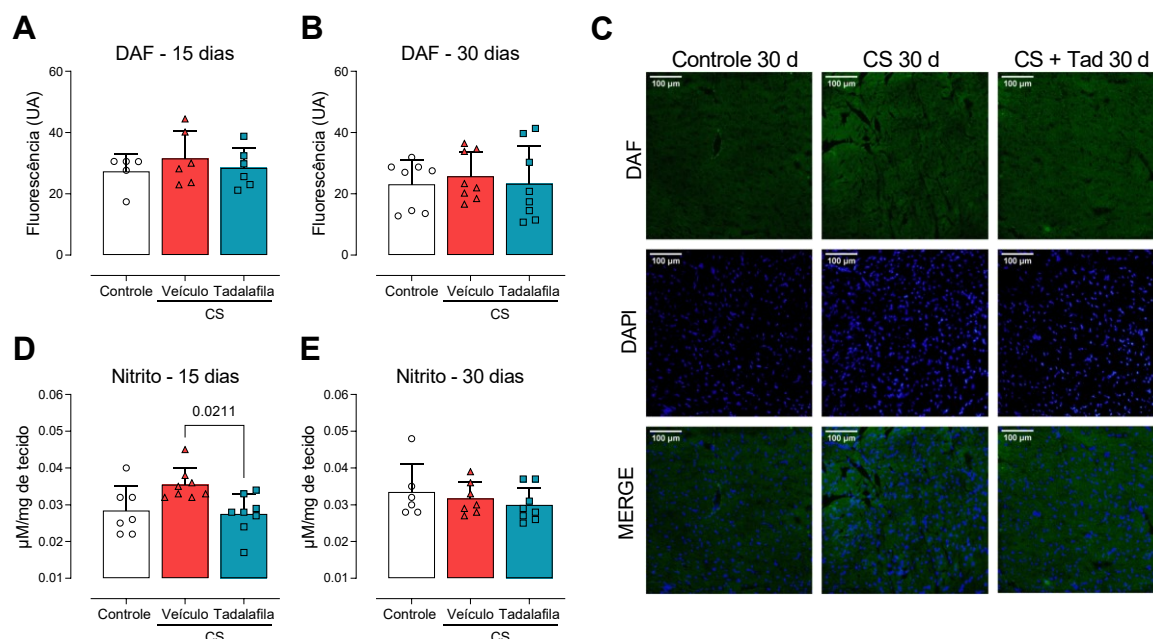
Figura 34 - Efeito da tadalafila no índice de hipertrofia do músculo cardíaco.



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido cardíaco, 15 e 30 dias pós-sepse (painéis A e B). Níveis de glutathiona oxidada (GSSG) no tecido cardíaco, 15 e 30 dias pós-sepse (painéis C e D). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 6-8 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Os níveis de NO no tecido cardíaco foram estimados pela sonda fluorescente DAF. Não foi observado diferença na fluorescência DAF entre os grupos experimentais 15 e 30 dias pós-sepse (Figura 35A-C). Entretanto, foi observado o aumento de um dos metabólitos da oxidação do NO, nitrito, no grupo CS que recebeu veículo em comparação ao CS tratado com tadalafila, 15 dias pós-sepse (Figura 35D). Não houve diferença nos níveis de nitrito no tecido cardíaco no período de 30 dias (Figura 35E).

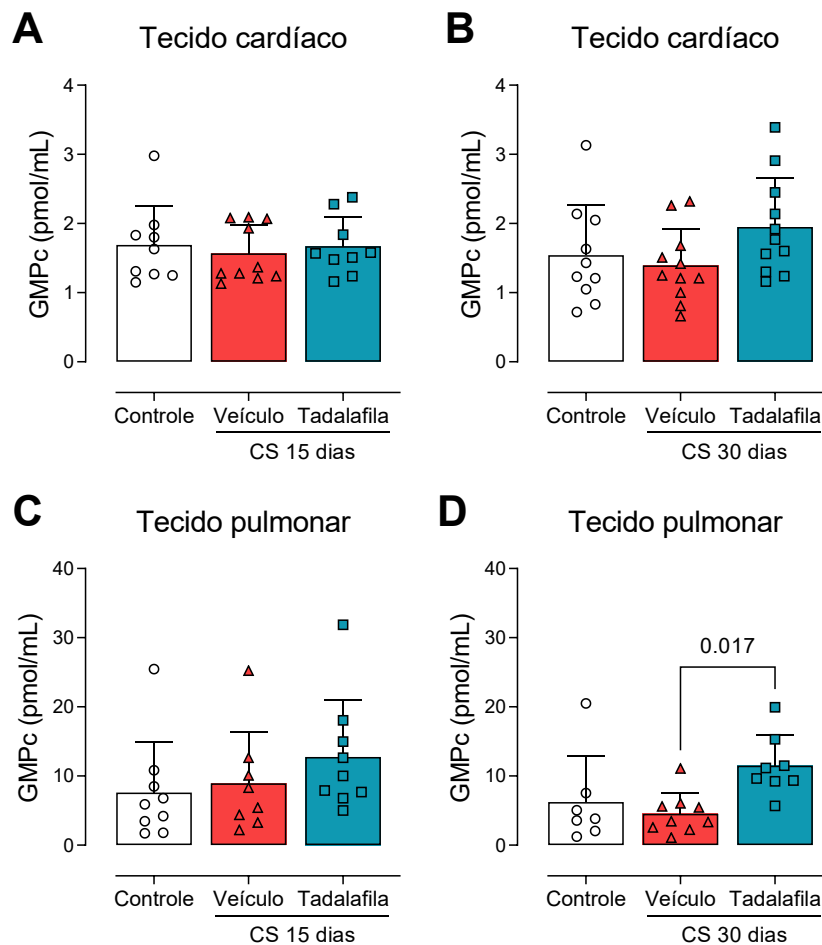
Figura 35 - Efeito da tadalafila nos níveis de óxido nítrico e nitrito no tecido cardíaco de sobreviventes à sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 µL/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Os níveis de óxido nítrico no ventrículo esquerdo foram mensurados por meio da sonda fluorescente diacetato de diaminofluoresceína (DAF) 15 e 30 dias pós-sepse (painéis A e B). Foi avaliado 4 imagens de cada animal. (C) Imagens representativas da fluorescência observada com DAF (em verde) 30 dias pós-sepse. A barra branca representa 100 µm. Para melhor visualização, o fundo das imagens foi removido pelo método "Subtract Background" no ImageJ, aplicando um raio de rolagem fixo de 200 pixels para as três imagens. Os núcleos foram contra-corados com DAPI (em azul). Os níveis de nitrito no tecido cardíaco foram mensurados por fluorescência, 15 e 30 dias pós-sepse (painéis D e E). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, $n = 5-8$ animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Também não foi identificado diferença nos níveis cardíacos de GMPc entre os grupos experimental em nenhum tempo avaliado (Figura 36A e B), bem como no tecido pulmonar, no tempo de 15 dias (Figura 36C). Contudo, o aumento de GMPc foi observado no tecido pulmonar dos animais CS tratados com tadalafila, 30 dias pós-sepse, em comparação ao grupo CS tratado com veículo (Figura 36C). O que pode estar relacionado aos diferentes níveis teciduais de PDE5 e ao efeito pronunciado da inibição crônica dessa enzima.

Figura 36 - Efeito da tadalafila nos níveis GMPc no tecido cardíaco e pulmonar de ratos sobreviventes à sepse

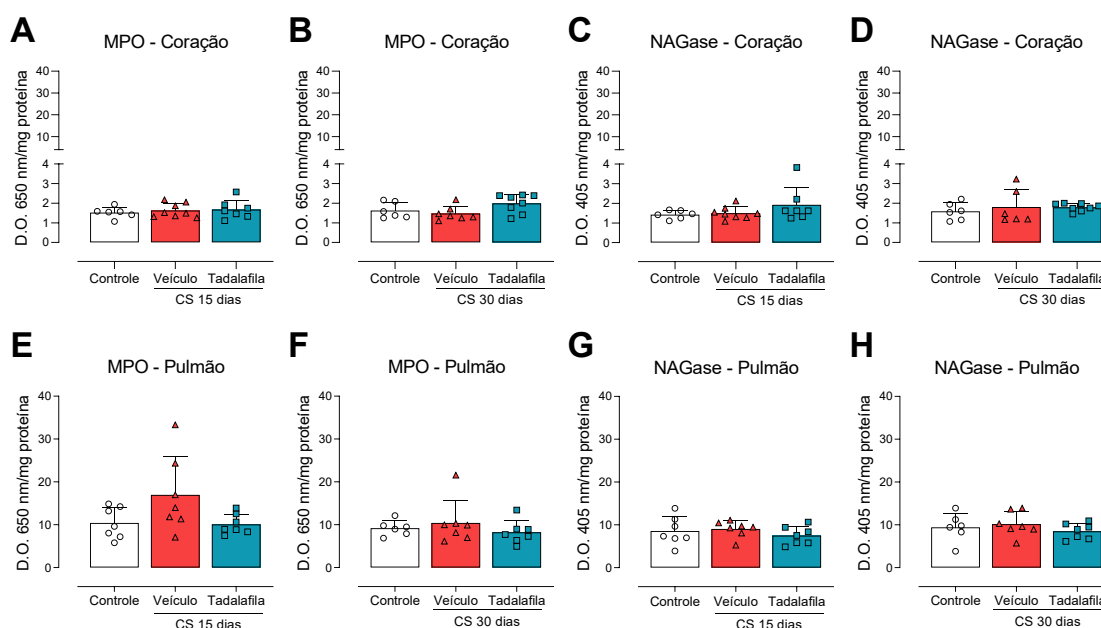


Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Os níveis de GMPc foram avaliados por ensaio imunoenzimático 15 e 30 dias pós-sepse no tecido cardíaco (painéis A e B) e pulmonar (painéis C e D). Os valores 63,6 (CS + Tad) foi identificado como outlier no painel C, e os valores 106,12 (Controle), 46,56 (CS), 67 e 164 (CS + Tad) foram identificados como outlier no painel D, e foram excluídos. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 7-11 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

A fim de investigar se as alterações estruturais do tecido cardíaco estariam relacionadas a inflamação tecidual, a atividades das enzimas MPO e NAGase foram avaliadas. Não foi observado aumento da infiltração de neutrófilos e ativação de macrófagos nos tecidos cardíacos e pulmonar 15 e 30 dias pós-sepse (Figura 37). Diante disso, parâmetros relacionados ao estresse oxidativo foram avaliados. Não foi observado diferença nos níveis de superóxido no tecido cardíaco, bem como na atividade da enzima NADPH oxidase (Figura 38). Também não houve diferença nos

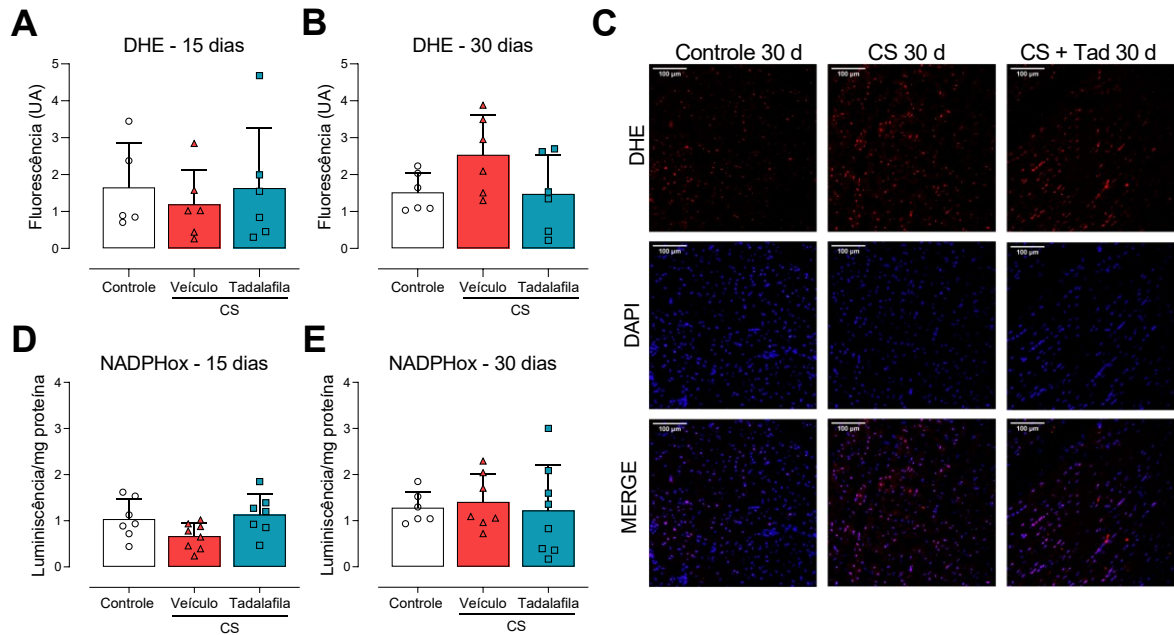
níveis de glutathiona oxidada, 15 e 30 dias pós-sepse e glutathiona reduzida, 15 dias pós-sepse (Figura 39A, C e D). Porém, foi observado um aumento dos níveis de glutathiona oxidada no grupo CS + Tad em comparação ao grupo CS sem tratamento no período de 30 dias (Figura 39B). Para a melhor visualização dos resultados, um resumo gráfico dos principais efeitos observados foi elaborado (Figura 40).

Figura 37 - Efeito da tadalafila na atividade das enzimas mieloperoxidase (MPO) e N-acetilglucosaminidase (NAGase) no tecido cardíaco e pulmonar de ratos sobreviventes à sepse



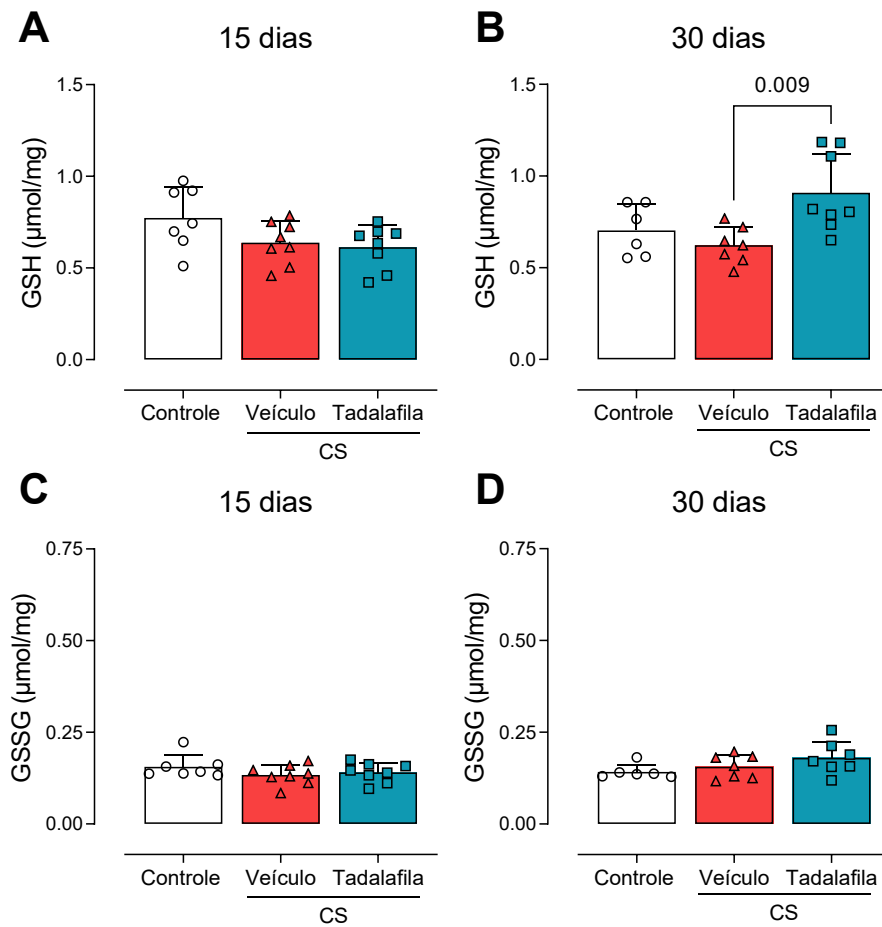
Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). O nível de infiltração de neutrófilos foi estimado por meio do ensaio da MPO, 15 e 30 dias pós sepse nos tecidos cardíaco (painéis A e B) e pulmonar (painéis E e F). A ativação de macrófagos foi estimada por meio do ensaio da NAGase, 15 e 30 dias pós sepse nos tecidos cardíaco (painéis C e D) e pulmonar (painéis G e H). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 6-8 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 38 - Efeito da tadalafila na produção de espécies reativas de oxigênio no tecido cardíaco de sobreviventes à sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μ L/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Os níveis de superóxido no ventrículo esquerdo foram mensurados por meio da sonda fluorescente de dihidroetídio (DHE) 15 e 30 dias pós-sepse (painéis A e B). (C) Imagens representativas da fluorescência observada com DHE (em vermelho) 30 dias pós-sepse, com ampliação de 200 vezes. Os núcleos foram contra-corados com DAPI (em azul). A atividade da enzima NADPHoxidase foi avaliada no tecido cardíaco, por luminiscência, 15 e 30 dias pós-sepse (painéis D e E). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 5-8 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Fonte: elaborada pelo autor.

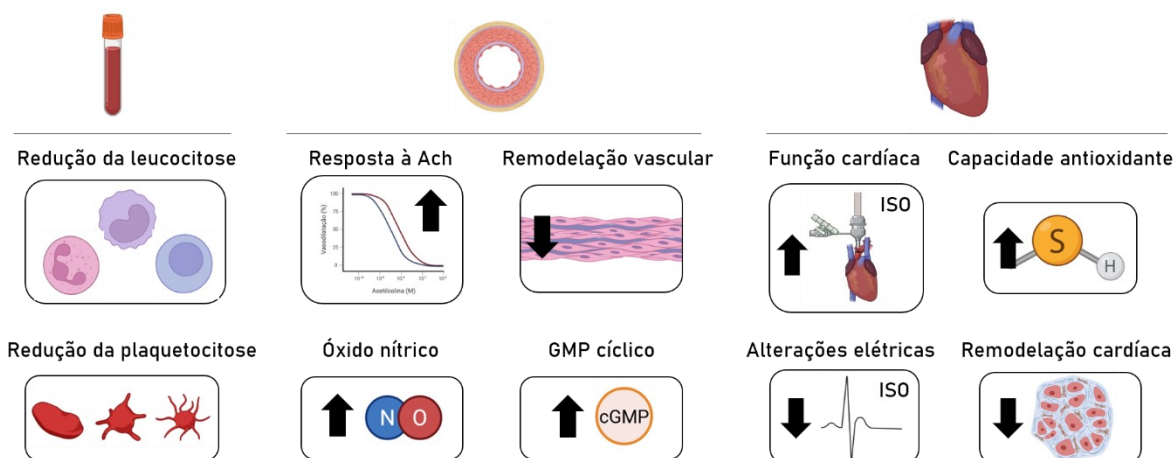
Figura 39 - Efeito da tadalafila no estado redox no tecido cardíaco de ratos sobreviventes à sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 μL/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). Níveis de glutathiona reduzida (GSH) no tecido cardíaco, 15 e 30 dias pós-sepse (painéis A e B). Níveis de glutathiona oxidada (GSSG) no tecido cardíaco, 15 e 30 dias pós-sepse (painéis C e D). As barras representam a média ± desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 6-8 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Os valores de p estão representados acima das barras. Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 40 - Resumo gráfico dos resultados

Efeito do tratamento com tadalafila nas alterações cardiovasculares de ratos 30 dias pós-CS



O tratamento crônico com 5 mg/kg de tadalafila a partir de 96 horas pós-CS mitigou as alterações vasculares e cardíacas encontradas em ratos sobreviventes à sepse, no período de 30 dias. A inibição da PDE5 também resultou em redução de células inflamatórias no sangue e da plaquetocitose. Fonte: Elaborado pelo autor em BioRender.com.

5 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que: i) a aplicação de CS é um método adequado para a indução de sepse experimental em ratos, visto que as alterações cardiovasculares identificadas foram semelhantes ao modelo CLP e os marcadores de disfunção renal foram mais pronunciados; ii) os animais foram considerados sobreviventes 96 horas pós-CS, visto a recuperação aparente dos parâmetros relacionados à fase aguda da sepse; iii) alterações da função cardiovascular foram identificadas no tempo de 30, mas não em 15, dias pós-sepse; iv) o tratamento crônico com o inibidor da PDE5 tadalafila, a partir de 96 horas, resultou na preservação da função cardíaca, redução de leucócitos e plaquetas no sangue, aumento de NOx e GMPc sistêmicos, aumento de GSH no tecido cardíaco e atenuação da remodelação vascular e cardíaca em ratos sobreviventes à sepse.

A reprodutibilidade dos modelos de sepse tem sido discutida ao longo dos anos (REMICK et al., 2019). O modelo CLP é amplamente utilizado, porém, a dor relacionada ao processo cirúrgico e a falta de quantificação da carga bacteriana são apontados como fatores de variabilidade (LILLEY et al., 2015). Portanto, o objetivo inicial deste estudo foi realizar a validação do modelo CS em ratos, em comparação ao modelo CLP. Apesar de já haver a demonstração de que a administração

intraperitoneal de conteúdo fecal em ratos induz alterações inflamatórias e lesões teciduais (BREALEY et al., 2004; FANG et al., 2020), não era descrito se esse modelo reproduzia a disfunção cardiovascular que ocorre na sepse aguda. Os animais submetidos ao modelo CS (1 g/kg) demonstraram hipotensão severa e resposta diminuída à vasoconstritores *in vivo* e *ex vivo* após 24 horas, sugerindo que os animais se encontravam na fase hipodinâmica da sepse. Além disso, o aumento nos níveis de lactato e marcadores de disfunção renal sugerem perfusão tecidual inadequada. O aumento dos níveis plasmáticos de NOx sugere o aumento global da produção de NO, amplamente documentado em modelos de sepse aguda (BARP; BENEDET; ASSREUY, 2020; ROSALES et al., 2021; VASQUES-NÓVOA et al., 2018). Tais alterações foram observadas de forma semelhante no modelo CLP. Portanto, o modelo CS oferece vantagens significativas em relação ao modelo CLP, pois elimina a necessidade de procedimento cirúrgico e padroniza a quantidade de conteúdo cecal (e, portanto, a carga bacteriana) para a indução de sepse polimicrobiana, representando um avanço para melhorar a reprodutibilidade e reduzir o sofrimento animal.

A partir da escolha do modelo experimental, o objetivo subsequente foi determinar em que período os animais poderiam ser considerados sobreviventes à sepse, a fim de definir o início do tratamento farmacológico. O quadro de sepse aguda é caracterizado, principalmente, pela presença de infecção, disfunção de órgãos, alterações hemodinâmicas e metabólicas (SINGER et al., 2016). Foi observado uma redução gradual na carga bacteriana no tecido hepático e pulmonar ao longo do tempo pós-CS, não sendo detectado a presença de bactérias no tecido pulmonar no tempo de 96 horas. Esse resultado indica que os animais estavam se recuperando do processo infeccioso nesse período. Além disso, os animais demonstraram a recuperação da função renal, pressão arterial, frequência cardíaca e resposta à angiotensina II, e melhora do metabolismo energético, evidenciado pela redução da hiperlactatemia e hipoglicemia. A aparente normalização desses parâmetros indica que os animais não estavam mais sob o quadro de sepse aguda, porém, isso não significa que houve recuperação total do estado de saúde.

Os níveis de NOx plasmático reduziram significativamente de 24 para 96 horas pós-sepse. A diminuição dos níveis de nitrato e nitrito pode indicar a redução da expressão e ativação da NOS-2 nesse período, provavelmente acompanhado pela redução de mediadores inflamatórios. Contudo, esses dados não foram

avaliados. Ainda, os níveis de nitrato são altamente influenciados pela dieta dos animais (ALZAHIRANI et al., 2021), portanto, a redução do consumo de ração pode ter contribuído para os valores observados.

Assim, o próximo passo foi avaliar a função cardiovascular de ratos sobreviventes à sepse, nos tempos de 15 e 30 dias. Não foram identificadas alterações hemodinâmicas, vasculares e cardíacas 15 dias pós-sepse. Por outro lado, ratos 30 dias pós-sepse demonstraram disfunção endotelial e função cardíaca reduzida frente a um desafio com isoprenalina. Não foram identificadas alterações significativas na pressão arterial e frequência cardíaca, parâmetros amplamente utilizados como repórteres da saúde cardiovascular. O resultado desse trabalho indica que o comprometimento cardiovascular pode estar em curso, mesmo em pacientes pós-sepse com valores hemodinâmicos dentro da normalidade, destacando a importância de uma investigação aprofundada da saúde cardiovascular.

Foi observado a hiperreatividade aórtica à noradrenalina 30 dias pós-sepse, o que pode estar relacionado ao aumento dos mecanismos contráteis (i.e. aumento na densidade de receptores α -adrenérgicos) ou diminuição dos mecanismos anti-contráteis, como diminuição de mediadores químicos e rigidez arterial. Porém, a ausência de diferença na contração à noradrenalina em aortas sem endotélio preservado favorece a última hipótese. Além disso, foi observado a diminuição da potência da acetilcolina, um vasorelaxante dependente da liberação de NO endotelial, mas não houve diferença na vasodilatação induzida pelo doador de NO nitroprussiato de sódio, sugerindo disfunção endotelial.

A inflamação é um fator de risco para doenças cardiovasculares que está relacionado a ativação e dano da célula endotelial. A disfunção endotelial é caracterizada por desregulação do tônus vascular, aumento da permeabilidade, adesão e agregação, sendo que a redução da vasodilatação dependente do endotélio é um marco importante para o comprometimento vascular (VANHOUTTE et al., 2017). No quadro de sepse aguda, o endotélio sofre diversas alterações, às quais envolvem a ativação de vias inflamatórias, expressão de moléculas de adesão, aumento de EROs, perda de glicocálice, ruptura de moléculas de junção celular e aumento de atividade pró-coagulante (revisado em DOLMATOVA et al., 2021). Além disso, embora haja liberação massiva de NO, principalmente pela expressão de NOS-2 em células do sistema imune, também é observado a redução da atividade

da NOS-3 (SCOTT et al., 2002), a qual resulta em diminuição da resposta à acetilcolina nos vasos de camundongos 24 horas pós-CLP (HU et al., 2021). Contudo, pouco se sabe sobre a recuperação do dano endotelial pós-sepse.

Interessantemente, os sinais de disfunção endotelial foram observados apenas 30 dias pós-CS, indicando uma recuperação transitória da função vascular no período de 15 dias. Em um estudo em ratos submetidos ao modelo CLP, não foi observado alteração na resposta vasorelaxante da acetilcolina na aorta, após 30 e 60 dias (DE SOUZA et al., 2016). Já Merdji et al., (2021) demonstraram a diminuição do relaxamento à acetilcolina e da resposta contrátil à fenilefrina em anéis de aorta 90 dias pós-CLP. Esses estudos ressaltam a dificuldade de identificar padrões nos efeitos da sepse sobre a função vascular ao longo do tempo.

Foi identificado prejuízo na contração e relaxamento ventricular de ratos 30 dias pós-CS durante um desafio com o agonista β -adrenérgicos isoprenalina. De maneira similar, um trabalho observou a diminuição da resposta ao agonista β -adrenérgicos dobutamina na pressão cardíaca intravascular e dP/dT máxima de ratos 30 dias pós-CLP (CORRÊA, 2021). A diminuição da resposta a esses agonistas pode estar relacionada à dessensibilização e internalização de receptores β -adrenérgicos no tecido cardíaco, mecanismo já demonstrado na sepse aguda (DAL-SECCO et al., 2017). Porém, não foi observada diferença da resposta a esse cardioativo no tempo de 15 dias pós-sepse, indicando uma aparente recuperação na densidade dos receptores. É possível sugerir que as alterações funcionais observadas são o resultado de alterações inflamatórias e lesões teciduais ocorridas na fase aguda, que podem se agravar ao longo do tempo, e se manifestar sob condições de estresse, como por exemplo, o aumento do trabalho cardíaco induzido pela isoprenalina.

De maneira geral, esses resultados corroboram outros dados da literatura que sugerem que o quadro séptico pode induzir alterações cardiovasculares funcionais à longo prazo (DE SOUZA et al., 2016; MERDJI et al., 2021; NÓBREGA, 2021; CORRÊA, 2021), devendo ser considerado como um fator de risco cardiovascular por si só. Atualmente, não há diretriz que guie o tratamento do paciente séptico após a alta hospitalar, principalmente no que diz respeito à prevenção de risco cardiovascular. Considerando a importância da via de sinalização do NO na homeostase cardiovascular, e a possibilidade de que essa via esteja comprometida após a sepse, o próximo objetivo foi investigar o impacto do

aumento dos níveis de GMPc por meio do tratamento crônico com a tadalafila, na prevenção das alterações cardiovasculares pós-sepse.

O tratamento de ratos 30 dias pós-sepse com tadalafila atenuou o prejuízo na resposta à acetilcolina *in vivo* e *ex vivo*, sugerindo atuar na prevenção dos achados relacionados à disfunção endotelial. Corroborando com esses achados, o tratamento crônico de ratos espontaneamente hipertensos com um inibidor da PDE5, demonstrou aumentar o relaxamento à acetilcolina, além de reverter o aumento da resposta vasoconstritora à fenilefrina (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2019; YAGUAS et al., 2010). No presente estudo, o efeito da tadalafila em reduzir a hiperreatividade à noradrenalina não foi evidente, pois diante de um tamanho de efeito pequeno, quando inserido um terceiro grupo experimental (CS + Tad) foi observado uma redução do poder de teste e, conseqüentemente, de diferenças significantes. Isso se deve às alterações sutis observadas na aorta. É possível que esse efeito fosse mais evidente em vasos de resistência. No entanto, como o objetivo deste estudo foi avaliar aspectos sistêmicos, cardíacos e vasculares, a aorta foi inicialmente utilizada como repórter das alterações vasculares devido à sua acessibilidade. Seria interessante avaliar vasos de resistência em futuros estudos além de veias, considerando que eventos trombóticos nesses segmentos representam um aspecto clínico relevante nesses pacientes. Vale a pena destacar também que no presente estudo, a sepse foi induzida em ratos adultos sem comorbidades, o que não reflete plenamente a realidade clínica. Portanto, a utilização de ratos idosos ou um maior tempo experimental, somados à um outro fator estressante, como uma segunda infecção, poderia aumentar a magnitude da diferença encontrada.

Além disso, os sobreviventes à sepse de 30 dias, mas não de 15 dias, demonstraram leucocitose periférica. O curso inflamatório e imunológico na sepse não segue um padrão linear. No estudo de Assis et al. (2024), foi observado que, após a resposta hiperinflamatória aguda, camundongos submetidos à sepse por CS apresentaram leucopenia transitória 3 dias após a indução, com posterior recuperação no tempo de 21 dias. No entanto, os autores identificaram alterações fenotípicas em células T CD4⁺, que persistiram por até 9 semanas pós-CS. Esse fenótipo alterado, caracterizado principalmente pelo aumento da produção de interleucina 17 (IL-17), foi associado a prejuízo na formação de uma resposta imune eficaz a uma infecção secundária por *Klebsiella pneumoniae* (ASSIS et al., 2024).

Portanto, apesar de ser observado um aumento do número de leucócitos circulantes, alterações funcionais dessas células podem comprometer a resposta imunológica. O tratamento com tadalafila demonstrou reduzir o número de leucócitos circulantes, o que pode estar relacionado aos efeitos anti-inflamatórios do aumento de GMPc (ISIDORI et al., 2021). Notavelmente, foi observado um aumento no número de plaquetas nos ratos 30 dias pós-CS, o qual foi reduzido pelo tratamento com tadalafila. O aumento de plaquetas em sobreviventes à sepse já foi demonstrado em ratos 30 dias pós-CLP (CORRÊA, 2021), e pode estar relacionado ao aumento de eventos tromboembólicos. A redução de plaquetas nos animais tratados com tadalafila pode estar associada ao aumento de NOx e GMPc plasmático, que interferem em plaquetas, inibindo a sua agregação (ANTL et al., 2007). Contudo, experimentos adicionais para a avaliação da função plaquetária pós-sepse seriam necessários para investigar a sua relevância biológica, bem como o possível efeito protetor do tratamento com tadalafila.

Interessantemente, foi observado aumento de NOx no plasma de ratos sobreviventes à sepse tratados com tadalafila, mas não em animais saudáveis submetidos ao mesmo tratamento. Isso sugere que o aumento dos níveis de NO por meio da inibição da PDE5 pode ser favorecido pelo estado pós-sepse, mas o mecanismo pelo qual isso ocorre não foi elucidado. A utilização da dosagem de nitrato e nitrito como repórter dos níveis de NO não é específica, visto que a alimentação, excreção renal, pH e flora bacteriana são fatores que podem interferir na análise. Contudo, os animais sépticos tratados com tadalafila também demonstraram aumento de NO na aorta aos 30 dias pela sonda fluorescente DAF, aumentando a confiabilidade dos resultados observados. Um possível mecanismo envolve a regulação positiva da NOS-3, cuja expressão já foi descrita como reduzida na aorta de ratos 90 dias pós-sepse (MERDJI et al., 2021).

A relação positiva entre a produção de NO endotelial e o efeito dos iPDE5 também foi descrita por Teixeira-da-silva et al. (2019), que demonstraram que os efeitos protetores de um iPDE5 no vaso foram abolidos em anéis sem endotélio ou inibindo NOS-3. Além disso, estudos prévios demonstraram que o tratamento com tadalafila aumentou a expressão gênica e proteica de NOS-3, enquanto reduziu a de NOS-2, em modelos experimentais de artrite e lesão renal (ABDEL-RAHMAN et al., 2024; AZOUZ; SALEH; ABO-SAIF, 2020).

Ainda, o aumento de superóxido e formação de ONOO^- pode resultar na diminuição da biodisponibilidade de NO. O trabalho de Souza et al., (2016) identificou o aumento de nitrotirosina, o qual reflete maiores níveis de ONOO^- , na aorta de ratos 60 dias pós-sepse. O tratamento com iPDE5 já foi associado a diminuição de EROs na aorta de ratos hipertensos (TEIXEIRA-DA-SILVA et al., 2019), logo, o aumento de NO também poderia estar relacionado aos efeitos antioxidantes exercidos pela tadalafila. Porém, o aumento de superóxido vascular foi observado apenas em 15 e não em 30 dias pós-sepse. A avaliação dos níveis de nitrotirosina seria essencial para avaliar essa hipótese.

Aos 15 dias, também foi observado a redução da espessura aórtica. Esse achado pode refletir apoptose celular ocorrida na fase aguda da sepse (POWER; FANNING; REDMOND, 2002; ZHANG et al., 2025). Nesse contexto, ambos os grupos submetidos ao modelo CS demonstraram essa hipoplasia. Interessantemente, aos 30 dias, somente o grupo tratado com tadalafila manteve a espessura da aorta reduzida. Esse achado está provavelmente relacionado ao aumento do remodelamento vascular no grupo CS sem tratamento, o qual foi observado por meio do aumento da deposição de colágeno. O tratamento com tadalafila atenuou essa remodelação, o que pode estar relacionado a um efeito antioxidante sutil, observado por meio da prevenção da identificação de superóxido na aorta de animais 15 dias pós-CS, além do aumento de NO e GMPc nesse tecido. Ainda, o aumento de colágeno vascular pós-sepse é corroborado pelo estudo de Merdji et al., (2021), que identificaram o aumento da expressão de metaloproteinase da matriz extracelular 9 (MMP-9) na aorta de ratos 90 dias pós-sepse.

Além disso, apesar de os sobreviventes à sepse tratados com tadalafila demonstrarem níveis plasmáticos de GMPc maiores que o grupo controle e CS + veículo, os níveis desse nucleotídeo cíclico no plasma de animais saudáveis tratados com tadalafila foi expressivamente mais elevado. Esse resultado sugere alterações nessa via de sinalização em sobreviventes à sepse. Uma hipótese seria o aumento da expressão ou atividade da enzima PDE5. Entretanto, não foi identificado a diminuição nos níveis de GMPc no plasma, tecido vascular, cardíaco ou pulmonar de ratos sobreviventes à sepse tratados com veículo. Portanto, a avaliação da atividade das enzimas GCs e PDE5, bem como da PKG seria essencial para avaliar essa hipótese.

Nesse trabalho, também foi observado que o tratamento com tadalafila potencializou a via do NO de forma mais pronunciada no tecido vascular do que no tecido cardíaco, sendo que não houve aumento significativo nos níveis de GMPc no coração. De fato, é descrito que os níveis de PDE5 são menores no tecido cardíaco, chegando a demonstrar expressão cerca de 15 vezes menor do que no tecido pulmonar (CORBIN et al., 2005). Apesar disso, a administração de tadalafila claramente preveniu o prejuízo na função cardíaca de ratos sobreviventes à sepse, ao restaurar a contratilidade e relaxamento do ventrículo esquerdo durante o desafio com isoprenalina. A administração intravenosa de isoprenalina é uma abordagem que pode ser utilizada na clínica para a identificação de alterações cardíacas, principalmente arritmogênicas (DENIS et al., 2014). Nesse sentido, ratos 30 dias pós-CS apresentaram alterações eletrocardiográficas, destacando-se a aumento do intervalo QT e amplitude da onda S, sugerindo um atraso na condução elétrica do coração, o que pode aumentar o risco de reentradas e arritmias. O tratamento com tadalafila atenuou parcialmente esses achados, pois não foi identificada diferença em relação ao grupo controle.

A alteração desses parâmetros eletrocardiográficos pode ser desencadeada por múltiplos mecanismos, incluindo a disfunção no relaxamento diastólico, além de lesões cardíacas, degeneração do nó sinusal, inflamação tecidual, hipertrofia ou fibrose. Não foi observado infiltrado de neutrófilos e ativação de macrófagos no tecido cardíaco, utilizados como marcadores de inflamação aguda e crônica. Mesmo assim, alterações fenotípicas nesses grupos celulares podem estar presentes, as quais podem ser interessantes de serem avaliadas por meio de outras técnicas, como citometria de fluxo. Em relação as alterações estruturais, foi observado o aumento da deposição de colágeno no ventrículo esquerdo de ratos 30 dias pós-sepse, o que corrobora os resultados funcionais observados. Porém, não foi identificada hipertrofia cardíaca nesse tempo experimental.

O tratamento com tadalafila atenuou esse processo de remodelação tecidual. Numerosas pesquisas têm sugerido o efeito protetor dos iPDE5 no tecido cardíaco. O tratamento crônico com um iPDE5 demonstrou atenuar hipertrofia e fibrose cardíaca, além de melhorar a fração de ejeção em modelos experimentais de insuficiência cardíaca ou hipóxia intermitente crônica (LI et al., 2024; LU et al., 2010). Além disso, um estudo demonstrou que a sildenafil aumentou a função mitocondrial de corações e cardiomiócitos submetidos a isquemia-reperfusão, os efeitos foram

dependentes de NO e ativação de canais mitocondriais (mitoKATP e mitoBK) (SALLOUM et al., 2003). No presente trabalho, não foi identificado o aumento da produção ou níveis de EROs, bem como de estresse oxidativo no tecido cardíaco, entretanto, os sobreviventes à sepse tratados com tadalafila demonstraram um aumento da capacidade antioxidante nesse tecido.

Dessa forma, o efeito benéfico da tadalafila pode ser justificado pelas propriedades antioxidantes, anti-proliferativas e anti-hipertróficas, que previnem alterações estruturais nos tecidos cardíaco e vascular. Esses efeitos são descritos como consequência do aumento de GMPc e ativação da PKG (NAKAMURA; TSUJITA, 2021). Contudo, não podemos descartar a possibilidade de efeitos pleiotrópicos mediados pela tadalafila, pois não é elucidado se essa molécula atua em outros alvos além da PDE5. A ampla distribuição e expressão dessa enzima justifica a gama de efeitos associados à sua inibição. Ainda assim, seria interessante investigar a contribuição de efeitos indiretos para os resultados observados, como por exemplo, a participação do *cross-talk* entre os nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc (ZACCOLO 2007), e o aumento dos níveis de NO, que medeia efeitos dependentes e independentes da ativação da via GCs/GMPc/PKG (FARAH; MICHEL; BALLIGAND, 2018).

Este estudo apresentou limitações. A utilização de protocolos experimentais prolongados e procedimentos terminais impossibilitaram que todas as análises fossem realizadas no mesmo animal, impedindo a análise de correlação entre os resultados. Em relação às análises hemodinâmicas e eletrocardiográficas, foi utilizado animais anestesiados, o que embora reproduza algumas condições clínicas, pode gerar interferência nos valores observados. Contudo, visto que todos os animais passaram pelo mesmo protocolo anestésico, não é esperado que esse fator interfira na diferença encontrada entre grupos experimentais. Mesmo diante do refinamento do modelo de sepse experimental, o estudo de sobreviventes à sepse exigiu a utilização de uma grande quantidade de animais experimentais, diante da sobrevivência de cerca de 50% dos animais submetidos à CS. Portanto, estratégias para reduzir a mortalidade, como o início precoce do protocolo antimicrobiano, podem ser importantes para otimizar futuros estudos. É possível refletir ainda, que mesmo diante do mesmo insulto, nem todos os animais sobreviventes à sepse irão desenvolver as mesmas sequelas, refletindo a heterogeneidade intrínseca de cada organismo, igualmente observada na clínica. Nesse estudo inicial, foram utilizados

apenas ratos machos, contudo sabe-se que existem diferenças importantes no quadro de sepse aguda relacionadas ao sexo biológico. Portanto, a confirmação desse resultado em fêmeas sobreviventes à sepse, bem como a investigação de possíveis diferenças na manifestação de alterações cardiovasculares e resposta ao tratamento com tadalafila, é de extrema relevância.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, o modelo *cecal slurry* induziu disfunção de órgãos e alterações cardiovasculares observadas na fase aguda da sepse (24 horas), aparente recuperação dos sobreviventes (96 horas), e desenvolvimento de disfunção endotelial e cardíaca na fase tardia (30 dias). O tratamento crônico com tadalafila (a partir de 96 horas) atenuou parte das alterações tardias, ao reduzir remodelação tecidual e marcadores de inflamação sistêmica, potencializar a via de sinalização do óxido nítrico na aorta, aumentar a capacidade antioxidante do tecido cardíaco e prevenir alterações da função cardíaca. Este estudo é o primeiro a explorar a inibição da PDE5 como estratégia terapêutica em sobreviventes à sepse. Os achados sugerem que o aumento dos níveis de GMPc por meio da tadalafila pode ser benéfico, contudo, o mecanismo envolvido no prejuízo da via de sinalização do NO pós-sepse não foi totalmente esclarecido e ainda necessita ser elucidado.

REFERÊNCIAS

ABDEL-RAHMAN, D. M. et al. Regulation of renal nitric oxide and eNOS/iNOS expression by tadalafil participates in the mitigation of amphotericin B–induced renal injury: Down-regulation of NF- κ B/iNOS/caspase-3 signaling. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 397, n. 5, p. 3141–3153, 2024.

ADLER, J. et al. Targets of cGMP/cGKI in Cardiac Myocytes. **Journal of Cardiovascular Pharmacological**, v. 75, p. 494–507, 2020.

AKSENTIJEVIĆ, D.; LEWIS, H. R.; SHATTOCK, M. J. Is rate–pressure product of any use in the isolated rat heart? Assessing cardiac ‘effort’ and oxygen consumption in the Langendorff-perfused heart. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 2, p. 282–294, 2016.

ALZAHIRANI, H. S. et al. The role of dietary nitrate and the oral microbiome on blood pressure and vascular tone. **Nutrition Research Reviews**, v. 34, n. 2, p. 222–239, 2021.

ANDERSSON, K. E. PDE5 inhibitors – pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 13, p. 2554–2565, 2018.

ANGRIMAN, F. et al. Sepsis hospitalization and risk of subsequent cardiovascular events in adults: a population-based matched cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 48, n. 4, p. 448–457, 2022.

ANTL, M. et al. IRAG mediates NO/cGMP-dependent inhibition of platelet aggregation and thrombus formation. **Hemostasis, Thrombosis, and vascular biology**, v. 109, n. 2, p. 552–559, 2007.

ASSIS, P. A. et al. Metabolic reprogramming and dysregulated IL-17 production impairs CD4 T cell function post sepsis. **iScience**, v. 27, n. 7, 19 jul. 2024.

AZOUZ, A. A.; SALEH, E.; ABO-SAIF, A. A. Aliskiren, tadalafil, and cinnamaldehyde alleviate joint destruction biomarkers; MMP-3 and RANKL; in complete Freund's adjuvant arthritis model: Downregulation of IL-6/JAK2/STAT3 signaling pathway. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 28, n. 9, p. 1101–1111, 2020.

BARP, C. G.; BENEDET, P. O.; ASSREUY, J. Perivascular adipose tissue phenotype and sepsis vascular dysfunction: Differential contribution of NO, ROS and beta 3-adrenergic receptor. **Life Sciences**, v. 254, 2020.

BENEDET, P. O. et al. The therapeutic value of protein (de)nitrosylation in experimental septic shock. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 1, p. 307–316, 2018.

BLANCO-RIVERO, J.; XAVIER, F. E. Therapeutic Potential of Phosphodiesterase Inhibitors for Endothelial Dysfunction- Related Diseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 30, p. 3633–3651, 2020.

BREALEY, D. et al. Mitochondrial dysfunction in a long-term rodent model of sepsis and organ failure. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 286, p. 491–497, 2004.

BUCHER, M. et al. Downregulation of Angiotensin II Type 1 Receptors During Sepsis From the Departments of Anesthesiology. **Hypertension**, v. 38, p. 177–182, 2001.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 854–865, 2005.

CALENTE, T. J. N. et al. Early Blood Lactate as a Biomarker for Cardiovascular Collapse in Experimental Sepsis. **Shock**, v. 61, n. 1, p. 142–149, 2024.

CASTRO, L. R. V. et al. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. **Circulation**, v. 113, n. 18, p. 2221–2228, 2006.

COBB, J. P.; DANNER, R. L.; CASE, C. R. Nitric Oxide and Septic Shock. **JAMA**, v. 275, n. 15, p. 1192–1196, 1996.

CORBIN, J. D. et al. High lung PDE5: A strong basis for treating pulmonary hypertension with PDE5 inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 334, n. 3, p. 930–938, 2005.

CORRÊA, T. **Disfunção cardíaca durante a sepse: da fase aguda à sobrevivência**. 2021. 1–117 f. Tese (doutorado)–Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2021.

COSTA, A. D. T. et al. Protein kinase G transmits the cardioprotective signal from cytosol to mitochondria. **Circulation Research**, v. 97, n. 4, p. 329–336, 2005.

DAL-SECCO, D. et al. Cardiac hyporesponsiveness in severe sepsis is associated with nitric oxide-dependent activation of G protein receptor kinase. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 313, n. 1, p. 149–163, 2017.

DAO, V. T. V. et al. Non-canonical chemical feedback self-limits nitric oxide-cyclic GMP signaling in health and disease. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 2020.

DE BACKER, D. et al. Surviving Sepsis Campaign Research Priorities 2023. **Critical Care Medicine**, v. 52, n. 2, p. 268–296, 2024.

DE SOUZA, P. et al. Impaired vascular function in sepsis-surviving rats mediated by oxidative stress and Rho-Kinase pathway. **Redox Biology**, v. 10, p. 140–147, 2016.

DENIS, A. et al. Diagnostic value of isoproterenol testing in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. **Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology**, v. 7, n. 4, p. 590–597, 2014.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the c NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 334–350, 1999.

DOLMATOVA, E. V. et al. The effects of sepsis on endothelium and clinical implications. **Cardiovascular Research**, v. 117, n. 1, p. 60–73, 2021.

DU SERT, N. P. et al. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 18, n. 7, p. 1769-1777, 2020.

DUNKERLY-EYRING, B.; KASS, D. A. Myocardial Phosphodiesterases and Their Role in cGMP Regulation. **Journal of Cardiovascular Pharmacological**, v. 75, n. 6, p. 368–369, 2020.

FANG, H. et al. Evaluation of 2 Rat Models for Sepsis Developed by Improved Cecal Ligation/Puncture or Feces Intraperitoneal-Injection. **Medical Science Monitor**, v. 26, n. 919054, p. 1–7, 2020.

FARAH, C.; MICHEL, L. Y. M.; BALLIGAND, J. L. Nitric oxide signalling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292–316, 2018.

FERNANDES, D. et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, n. 3, p. 991–999, 2009.

FLEISCHMANN-STRUZEK, C. et al. Evaluation of Infection-Related Hospitalizations and Drug Prescriptions among Sepsis Survivors in Germany. **JAMA Network Open**, v. 5, n. 7, p. E2220945, 2022.

FLEISCHMANN-STRUZEK, C. et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 8, p. 1552–1562, 2020.

FRANCIS, S. H.; BUSCH, J. L.; CORBIN, J. D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 525–563, 2010.

FRANKENREITER, S. et al. cGMP-Elevating Compounds and Ischemic Conditioning Provide Cardioprotection Against Ischemia and Reperfusion Injury via Cardiomyocyte-Specific BK Channels. **Circulation**, v. 136, n. 24, p. 2337–2355, 2017.

FUKAO, M. et al. Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BK(Ca) channels expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 16, p. 10927–10935, 1999.

GHOFRANI, H. A.; OSTERLOH, I. H.; GRIMMINGER, F. Sildenafil: From angina to erectile dysfunction to pulmonary hypertension and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 689–702, 2006.

GONÇALVES, M. C. et al. Experimental Sepsis Severity Score Associated to Mortality and Bacterial Spreading is Related to Bacterial Load and Inflammatory Profile of Different Tissues. **Inflammation**, v. 40, n. 5, p. 1553–1565, 2017.

GRITTE, R. B. et al. Why Septic Patients Remain Sick After Hospital Discharge? **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 605666, 2021.

HALBRIIGGES, M. et al. Stoichiometric and Reversible Phosphorylation of a 46-kDa Protein in Human Platelets in Response to cGMP-and CAMP-elevating Vasodilators*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 6, p. 3088–3093, 1990.

HOBAL, I. A. Mechanisms of cardiac dysfunction in sepsis. **Shock**, v. 59, n. 4, p. 515–539, 2023.

HOFMANN, F. et al. cGMP Regulated Protein Kinases (cGK). **Handb Exp Pharmacol**. [S.l: s.n.], 2009. v. 191. p. 137–162.

HOLLENBERG, S. M.; CUNNION, R. E.; ZIMMERBERG, J. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats.

American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology, v. 264, n. 2 p. 660–663, 1993.

HU, S. et al. Disrupted eNOS activity and expression account for vasodilator dysfunction in different stage of sepsis. **Life Sciences**, v. 264, p. 118606, 2021.

HUBERS, S. A. et al. Cardiorenal Effects of Long-Term Phosphodiesterase V Inhibition in Pre– Heart Failure. **Journal of the American Heart Association**, v. 11, n. 2, p. e022126, 2022.

ISIDORI, A. M. et al. Targeting the NO-cGMP-PDE5 pathway in COVID-19 infection. The DEDALO project. **Andrology**, v. 9, n. 1, p. 33–38, 2021.

IWASHYNA, T. J. et al. Population burden of long-term survivorship after severe sepsis in Older Americans. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 60, n. 6, p. 1070–1077, 2012.

JANSSON, E. Å. et al. A mammalian functional nitrate reductase that regulates nitrite and nitric oxide homeostasis. **Nature Chemical Biology**, v. 4, n. 7, p. 411–417, 2008.

JEGER, V. et al. Analgesia in clinically relevant rodent models of sepsis. **Laboratory Animals**, v. 50, n. 6, p. 418–426, 2016.

JENTZER, J. C. et al. Cardiovascular Events Among Survivors of Sepsis Hospitalization: A Retrospective Cohort Analysis. **Journal of the American Heart Association**, v. 12, n. 3, p. e027813, 2023.

KANDASAMY, K. et al. Erythropoietin Reverses Sepsis-Induced Vasoplegia to Norepinephrine Through Preservation of α 1D-Adrenoceptor mRNA Expression and Inhibition of GRK2-Mediated Desensitization in Mouse Aorta. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 21, n. 1, p. 100–113, 2016.

KARBACH, S. et al. eNOS Uncoupling in Cardiovascular Diseases - the Role of Oxidative Stress and Inflammation. **Current Pharmaceutical Design**, v. 20, n. 22, p. 3579–3594, 2014.

KATO, M. et al. Direct binding and regulation of RhoA protein by cyclic GMP-dependent protein kinase I α . **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 49, p. 41342–41351, 2012.

KATO, S. et al. The Golgi apparatus regulates cGMP-dependent protein kinase I compartmentation and proteolysis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 308, n. 11, p. C944–C958, 2015.

KÖHLER, D. et al. Phosphorylation of vasodilator-stimulated phosphoprotein contributes to myocardial ischemic preconditioning. **Basic Research in Cardiology**, v. 113, n. 2, p. 1-15, 2018.

KOITABASHI, N. et al. Cyclic GMP/PKG-dependent inhibition of TRPC6 channel activity and expression negatively regulates cardiomyocyte NFAT activation: Novel mechanism of cardiac stress modulation by PDE5 inhibition. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 48, n. 4, p. 713–724, 2010.

KOSYAKOVSKY, L. B. et al. Association between sepsis survivorship and long-term cardiovascular outcomes in adults: a systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, v. 47, n. 9, p. 931–942, 2021.

KOVALSKI, V. et al. Protective role of cGMP in early sepsis. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 174–181, 2017.

KRÜGER, M. et al. Protein kinase G modulates human myocardial passive stiffness by phosphorylation of the titin springs. **BMC Pharmacology**, v. 9, n. 1, p. 37, 2009.

LAMBDEN, S. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis—an update. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 7, n. 1, p. 64, 2019.

LAYLAND, J.; SOLARO, R. J.; SHAH, A. M. Regulation of cardiac contractile function by troponin I phosphorylation. **Cardiovascular research**, v. 66, n. 1, p. 12–21, 2005.

LI, S. et al. Pde5 Inhibition Reduced Blood Pressure and Alleviated Target Organ Damage in Chronic Intermittent Hypoxia. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 84, n. 1, p. 81–91, 2024.

LILLEY, E. et al. Refinement of animal models of sepsis and septic shock. **Shock**, v. 43, n. 4, p. 304–316, 2015.

LIN, C.-S. et al. Human PDE5A gene encodes three PDE5 isoforms from two alternate promoters. **International Journal of Impotence Research**, v. 14, n. 1, p. 15–24, 2002.

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

LU, Z. et al. Oxidative stress regulates left ventricular PDE5 expression in the failing heart. **Circulation**, v. 121, n. 13, p. 1474–1483, 2010.

LUNDBERG, J. O.; GLADWIN, M. T.; WEITZBERG, E. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 623–641, 2015.

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): An observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, 2017.

MELICHAR, V. O. et al. Reduced cGMP signaling associated with neointimal proliferation and vascular dysfunction in late-stage atherosclerosis. **PNAS**, v. 101, n. 47, p. 16671–16676, 2004.

MERDJI, H. et al. Septic shock as a trigger of arterial stress-induced premature senescence: A new pathway involved in the post sepsis long-term cardiovascular complications. **Vascular Pharmacology**, v. 141, n. 1, p. 106922, 2021.

MEURER, S. et al. Nitric oxide-independent vasodilator rescues heme-oxidized soluble guanylate cyclase from proteasomal degradation. **Circulation Research**, v. 105, n. 1, p. 33–41, 2009.

MEYER, N. J.; PRESCOTT, H. C. Sepsis and Septic Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 391, n. 22, p. 2133–2146, 2024.

MIRA, J. C. et al. Sepsis pathophysiology, chronic critical illness, and persistent inflammation-immunosuppression and catabolism syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 2, p. 253–262, 2017.

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, n. 27, p. 2002–2012, 1993.

MONJE, M.; IWASAKI, A. The neurobiology of long COVID. **Neuron**, v. 110, n. 21, p. 3484–3496, 2022.

MOSTEL, Z. et al. Post-sepsis syndrome- A n evolving entity that afflicts survivors of sepsis. **Molecular Medicine**, v. 26, n. 1, p. 1-14, 2019.

NAIR, A.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacology**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NAKAMURA, T. et al. Prevention of PKG-1 α Oxidation Suppresses Antihypertrophic/Antifibrotic Effects From PDE5 Inhibition but not sGC Stimulation. **Circulation. Heart failure**, v. 11, n. 3, p. e004740, 2018.

NAKAMURA, T.; TSUJITA, K. Current trends and future perspectives for heart failure treatment leveraging cGMP modifiers and the practical effector PKG. **Journal of Cardiology**, v. 78, n. 4, p. 261–268, 2021.

NARDI, G. M. et al. Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 42, n. 6, p. 391–400, 2014.

NIN, N. et al. Vascular dysfunction in sepsis: Effects of the peroxynitrite decomposition catalyst MnTMPyP. **Shock**, v. 36, n. 2, p. 156–161, 2011.

NISHIDA, M. et al. Phosphorylation of TRPC6 Channels at Thr69 Is Required for Anti-hypertrophic Effects of Phosphodiesterase 5 Inhibition. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 17, p. 13244, 2010.

NÓBREGA, N. R. C. **Animais sobreviventes à sepse apresentam hiperreatividade aórtica e prejuízo da função cardíaca**. 2021. 1–75 f. Tese (doutorado)—Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2021.

OU, S. M. et al. Long-term mortality and major adverse cardiovascular events in sepsis survivors a nationwide population-based study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 194, n. 2, p. 209–217, 2016.

ODDIZ, R. J. et al. Tadalafil for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension: A Double-Blind 52-Week Uncontrolled Extension Study. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 60, n. 8, p. 768–774, 2012.

POTTER, L. R. Guanylyl cyclase structure, function and regulation. **Cellular Signalling**, v. 23, n. 12, p. 1921–1926, 2011.

POWER, C.; FANNING, N.; REDMOND, H. P. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. **Shock**, v. 18, n. 3, p. 197–211, 2002.

PRYSYAZHNA, O. et al. Phosphodiesterase 5 Inhibition Limits Doxorubicin-induced Heart Failure by Attenuating Protein Kinase G α Oxidation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 33, p. 17427–17436, 2016.

QUARTIN, A. A. et al. Magnitude and Duration of the Effect of Sepsis on Survival. **JAMA**, v. 277, n. 13, p. 1058–1063, 1997.

RAHMEL, T. et al. Long-term mortality and outcome in hospital survivors of septic shock, sepsis, and severe infections: The importance of aftercare. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, p. e0228952, 2020.

RANEK, M. J. et al. PKG1-modified TSC2 regulates mTORC1 activity to counter adverse cardiac stress. **Nature**, v. 566, n. 7743, p. 264–269, 2019.

REMICK, D. G. et al. Premise for Standardized Sepsis Models. **Shock**, v. 51, n. 1, p. 4–9, 2019.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009.

ROSALES, T. O. et al. Dynamics of GRK2 in the kidney: A putative mechanism for sepsis-associated kidney injury. **Clinical Science**, v. 135, n. 20, p. 2341–2356, 2021.

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

SALLOUM, F. et al. Sildenafil induces delayed preconditioning through inducible nitric oxide synthase-dependent pathway in mouse heart. **Circulation Research**, v. 92, n. 6, p. 595–597, 2003.

SAYED, N. et al. Desensitization of soluble guanylyl cyclase, the NO receptor, by S-nitrosylation. **PNAS**, v. 104, n. 30, p. 12312–12317, 2007.

SCHLOSSMANN, J. et al. Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ib. **Nature**, v. 404, n. 6774, p. 197–201, 2000.

SCOTT, J. A. et al. Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 165, n. 10, p. 1426–1432, 2002.

SCOTT, J. D. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Pharmacology Therapy**, v. 50, n. 1, p. 123–145, 1991.

SELLAK, H. et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of cGMP-dependent protein kinase (PKG-I): Pathophysiological significance. **Cardiovascular Research**, v. 97, n. 2, p. 200–207, 2013.

SHEN, X. et al. The Effect of Grapefruit Juice on the Pharmacokinetics of Tadalafil in Rats. **BioMed Research International**, v. 2020, n. 1, p. 1631735, 2020.

SHIMABUKURO, M. L-Arginine, Nitric Oxide, and Endothelial Dysfunction Underlying Atherosclerotic Cardiovascular Disease (ASCVD). **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 30, n. 10, p. 1311–1312, 2023.

SHRUM, B. et al. A robust scoring system to evaluate sepsis severity in an animal model. **BMC Research Notes**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

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

SONG, L.; ZOU, Y.; CAO, Z. Comparison of two different models of sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats. **Journal of Surgical Research**, v. 229, n. 1, p. 277–282, 2018.

SPILLER, F. et al. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. **Nitric Oxide - Biology and Chemistry**, v. 89, p. 32–40, 2019.

STARR, M. et al. A New Cecal Slurry Preparation Protocol with Improved Long-Term Reproducibility for Animal Models of Sepsis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e115705, 2014.

STEELE, A. M.; STARR, M. E.; SAITO, H. Late Therapeutic Intervention with Antibiotics and Fluid Resuscitation Allows for a Prolonged Disease Course with High Survival in a Severe Murine Model of Sepsis. **Shock**, v. 47, n. 6, p. 726–734, 2017.

SURKS, H. K. et al. Regulation of Myosin Phosphatase by a Specific Interaction with cGMP-Dependent Protein Kinase Ia. **Science**, v. 288, n. 3, p. 307–326, 1999.

TAKIMOTO, E. et al. Regulator of G protein signaling 2 mediates cardiac compensation to pressure overload and antihypertrophic effects of PDE5 inhibition in mice. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 2, p. 408, 2009.

TANNI, S. E. et al. Post-COVID-19 syndrome: Cardiovascular manifestations. **International Journal of Cardiology**, v. 369, p. 80–81, 2022.

TEIXEIRA-DA-SILVA, J. J. et al. Chronic administration of sildenafil improves endothelial function in spontaneously hypertensive rats by decreasing COX-2 expression and oxidative stress. **Life Sciences**, v. 225, p. 29–38, 2019.

THOONEN, R. et al. Molecular Screen Identifies Cardiac Myosin-Binding Protein-C as a Protein Kinase G- α Substrate. **Circulation: Heart Failure**, v. 8, n. 6, p. 1115–1122, 2015.

TZOUMAS, N. et al. Established and emerging therapeutic uses of PDE type 5 inhibitors in cardiovascular disease. **British Journal of Pharmacology**, v. 177, n. 24, p. 5467–5488, 2020.

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

_____. Understanding Post-Sepsis Syndrome: How Can Clinicians Help? **Infection and Drug Resistance**, v. 16, p. 6493–6511, 2023.

VAN HEEREBEEK, L. et al. Low Myocardial Protein Kinase G Activity in Heart Failure With Preserved Ejection Fraction. **Circulation**, v. 126, n. 7, p. 830–839, 2012.

VANHOUTTE, P. M. et al. Endothelial dysfunction and vascular disease – a 30th anniversary update. **Acta Physiologica**, v. 219, n. 1, p. 22–96, 2017.

VASQUES-NÓVOA, F. et al. MicroRNA-155 amplifies nitric oxide/cGMP signaling and impairs vascular angiotensin II reactivity in septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 9, p. 945–954, 2018.

VINNAKOTA, S. et al. The Cardiorenal Effects of Chronic Phosphodiesterase-V Inhibition in Preclinical Diastolic Dysfunction (Stage B Heart Failure). **Journal of Cardiac Failure**, v. 29, n. 10, p. 1461–1465, 2023.

WAN, S. H. et al. Effects of phosphodiesterase V inhibition alone and in combination with BNP on cardiovascular and renal response to volume load in human preclinical diastolic dysfunction. **Physiological Reports**, v. 9, n. 16, p. 14974, 2021.

WANG, P. G. et al. Nitric oxide donors: Chemical activities and biological applications. **Chemical Reviews**, v. 102, n. 4, p. 1091–1134, 2002.

WANG, T. et al. Subsequent infections in survivors of sepsis: Epidemiology and outcomes. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 2, p. 87–95, 2014.

WATANABE, M.; OKADA, T. Langendorff perfusion method as an ex vivo model to evaluate heart function in rats. **Methods in Molecular Biology**. [S.l.]: Humana Press Inc., 2018. v. 1816. p. 107–116.

WHALEN, E. J. et al. Regulation of β -Adrenergic Receptor Signaling by S-Nitrosylation of G-Protein-Coupled Receptor Kinase 2. **Cell**, v. 129, n. 3, p. 511–522, 2007.

YAGUAS, K. et al. Chronic sildenafil treatment corrects endothelial dysfunction and improves hypertension. **American Journal of Nephrology**, v. 31, n. 4, p. 283–291, 2010.

YANG, L. et al. Protein Kinase G Phosphorylates Cav1.2 $\alpha 1c$ and $\beta 2$ Subunits. **Circulation Research**, v. 101, n. 5, p. 465–474, 2007.

YENDE, S. et al. Risk of cardiovascular events in survivors of severe sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 189, n. 9, p. 1065–1074, 2014.

ZHANG, J. et al. Parthenolide improves sepsis-induced coagulopathy by inhibiting mitochondrial-mediated apoptosis in vascular endothelial cells through BRD4/BCL-xL pathway. **Journal of translational medicine**, v. 23, n. 1, p. 80, 2025.

ZHAO, L. et al. Sildenafil Inhibits Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension. **Circulation**, v. 104, n. 4, p. 424–428, 2001.

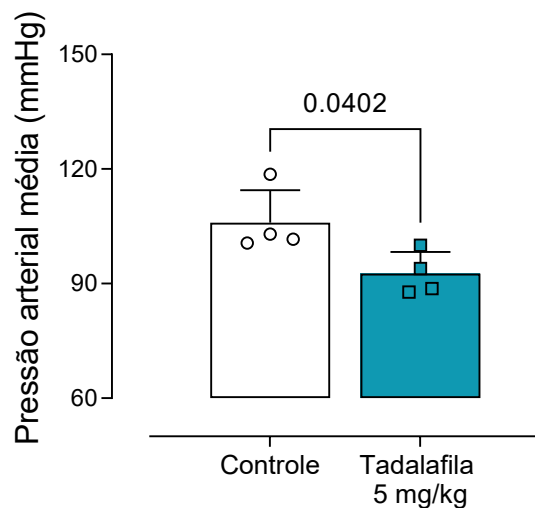
ZHAO, Y. Y. et al. Persistent eNOS activation secondary to caveolin-1 deficiency induces pulmonary hypertension in mice and humans through PKG nitration. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 7, p. 2009–2018, 2009.

APÊNDICE A – Viabilidade de bactérias em preparações de *cecal slurry*

Número do lote	Log UFC/mL (à fresco)	Experimentos
CS-230914	7,97	Avaliação hemodinâmica
CS-240221	7,95	Avaliação em aorta isolada
CS-241119	8	Avaliação em coração isolado

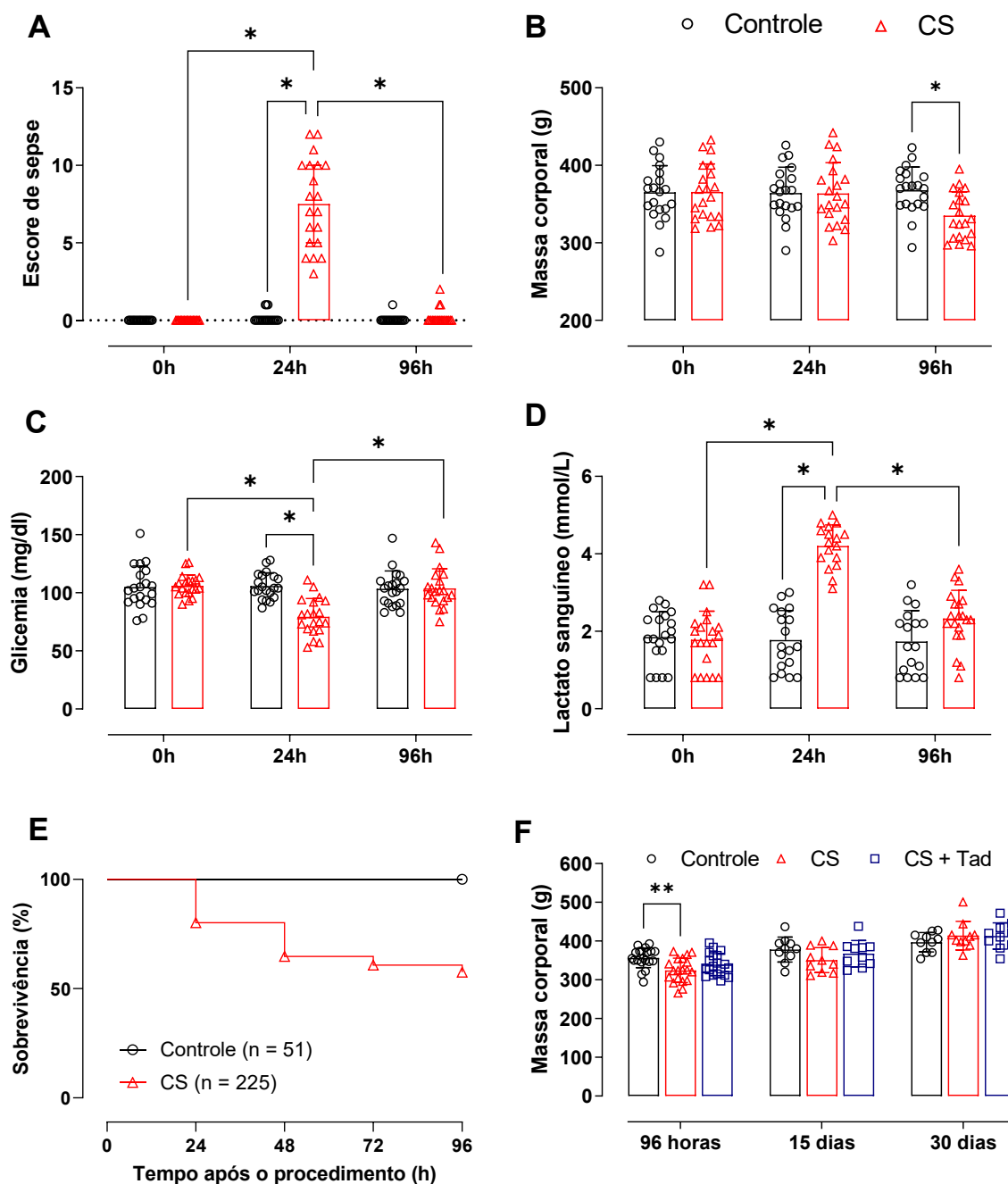
As preparações de *cecal slurry* foram realizadas em três momentos, utilizando animais doadores. As suspensões à fresco foram incubadas em ágar Mueller Hinton à 37 °C e a quantidade de unidades formadoras de colônia foi contabilizada após 24 horas. O resultado foi expresso como Log UFC/mL. Ao lado, estão descritos os experimentos em que os lotes de CS foram utilizados.

APÊNDICE B – Resposta hipotensora 1 hora após administração oral de 5 mg/kg de tadalafila em ratos sem intervenção



Animais sem intervenção (naïve) receberam a administração oral de tadalafila 5 mg/kg e a pressão arterial invasiva foi avaliada após 1 hora. Foi observado uma redução da pressão arterial média nos animais de $105,9 \pm 8,5$ para $92,62 \pm 5,6$ mmHg nos animais que receberam tadalafila. As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, $n = 4$ animais/grupo. A análise estatística foi realizada por teste T de Student. Os valores de p estão representados acima da barra. Fonte: elaborada pelo autor.

APÊNDICE C – Caracterização do quadro séptico agudo dos animais avaliados 15 e 30 dias pós-sepse



Animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e os controles receberam PBS-5% de glicerol (10 µL/g i.p.). O escore de sepse (A), massa corporal (B), glicemia (C) e lactato sanguíneo (D) foram acompanhados nos tempos 0, 24 e 96 horas após a aplicação (n = 20 animais/grupo). Porcentagem de sobrevivência ao longo de 4 dias de acompanhamento dos animais submetidos à sepse (E). O painel E representa a massa corporal dos animais após 15 e 30 dias (n = 20 animais/grupo em 96 horas; n = 10 animais/grupos de 15 e 30 dias). As barras representam a média $\pm$ desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 20 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de duas vias seguido de Tukey. * p < 0,05. Fonte: elaborada pelo autor.

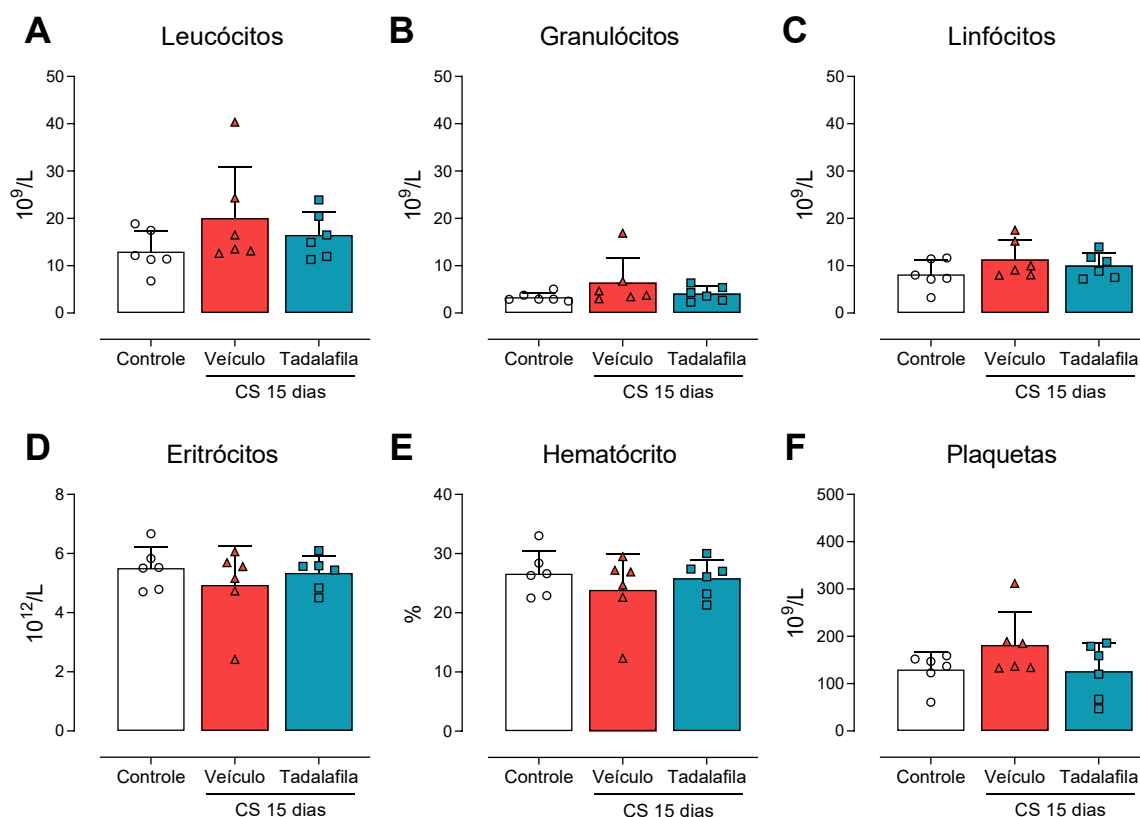
**APÊNDICE D – Parâmetros obtidos em anel de aorta isolado de sobreviventes
à sepse em comparação à controles de mesma idade.**

Contração inicial à KCl 60 mM, contração inicial à fenilefrina 1 μ M e porcentagem de relaxamento à acetilcolina 1 μ M na aorta de ratos 15 e 30 dias pós-sepse, tratados ou não com tadalafila, em comparação ao controle

Grupo	15 dias				30 dias			
	Controle	CS	CS + Tad	P	Controle	CS	CS + Tad	P
Contração à 5 min KCl 60 mM (g)	1,24 $\pm$ 0,15	1,08 $\pm$ 0,16	1,13 $\pm$ 0,23	0,16	1,23 $\pm$ 0,18	1,23 $\pm$ 0,14	1,21 $\pm$ 0,16	0,95
Contração à fenilefrina 1 μM (g)	1,28 $\pm$ 0,29	1,12 $\pm$ 0,41	1,22 $\pm$ 0,28	0,57	1,02 $\pm$ 0,13	1,20 $\pm$ 0,26	1,20 $\pm$ 0,27	0,16
Relaxamento à acetilcolina 1 μM (%)	90,27 $\pm$ 5,25	86,81 $\pm$ 4,65	90,17 $\pm$ 5,04	0,223	92,31 $\pm$ 4,27	91,48 $\pm$ 4,77	89,63 $\pm$ 5,33	0,45

Os parâmetros foram obtidos por regressão não linear considerando quatro parâmetros. O valor de P corresponde a análise estatística realizada por ANOVA de uma via. Os dados estão expressos como média $\pm$ desvio padrão. Fonte: elaborada pelo autor.

APÊNDICE E – Perfil hematológico de animais 15 dias pós-sepse



Os animais foram submetidos à sepse por CS (1 g/kg i.p.) e o grupo controle recebeu PBS-5% de glicerol (10 µL/g i.p.). Todos os grupos foram tratados com antibiótico (70% benzilpenicilina e 30% estreptomicina) em 24 horas (24.000 UI/kg). O grupo CS + Tad recebeu tratamento com tadalafila a partir de 96 horas (5 mg/kg/dia v.o.), enquanto os demais grupos receberam o veículo (5% carboximetilcelulose). O número de leucócitos (A), granulócitos (B), linfócitos (C), eritrócitos (D) e plaquetas (F) no sangue. O volume de sangue ocupado por eritrócitos está representado no painel E, como hematócrito (%). As barras representam a média ± desvio padrão e cada símbolo corresponde ao valor de um animal, n = 6 animais/grupo. A análise estatística foi realizada por ANOVA de uma via, seguido de Tukey. Fonte: elaborada pelo autor.

APÊNDICE F – Avaliação da reatividade vascular em animais 15 dias pós-sepse

Tabela – Eficácia e potência de vasoativos na aorta de ratos 15 dias pós-sepse, tratados ou não com tadalafila, em comparação ao controle.

Droga	Grupo	E_{máx}	LogCE₅₀	AUC	N amostral
Fenilefrina	Controle 15 d	111,7 ± 14,2	-6,66 ± 0,20	234,8 ± 45,3	10
	CS 15 d	119,0 ± 32,0	-6,54 ± 0,35	241,8 ± 92,9	10
	CS + Tad 15 d	127,7 ± 26,2	-6,53 ± 0,22	256,9 ± 73,9	9
	<i>P</i>	0,39	0,53	0,8	
Noradrenalina	Controle 15 d	125,7 ± 19,2	-7,22 ± 0,41	327,6 ± 65,8	10
	CS 15 d	149,6 ± 31,9	-6,95 ± 0,34	353,7 ± 104,5	10
	CS + Tad 15 d	149,7 ± 46,8	-6,86 ± 0,48	351,3 ± 151,6	9
	<i>P</i>	0,21	0,16	0,85	
Acetilcolina	Controle 15 d	92,92 ± 5,8	-7,34 ± 0,25	268,0 ± 28,8	10
	CS 15 d	92,56 ± 4,4	-7,40 ± 0,57	273,2 ± 62,1	10
	CS + Tad 15 d	92,11 ± 4,8	-7,14 ± 0,33	246,8 ± 33,7	10
	<i>P</i>	0,93	0,32	0,38	
Nitroprussiato de sódio	Controle 15 d	107,1 ± 10,2	-7,90 ± 0,47	348,7 ± 44,2	10
	CS 15 d	106,7 ± 7,3	-9,40 ± 4,25	356,5 ± 44,6	10
	CS + Tad 15 d	103,0 ± 5,3	-7,70 ± 0,48	324,7 ± 45,8	10
	<i>P</i>	0,45	0,26	0,27	

Siglas: E_{máx} – resposta máxima; LogCE₅₀ – logaritmo da concentração que gera 50% do E_{máx}; AUC – área sob a curva; Tad – tadalafila. Os parâmetros foram obtidos por regressão não linear das curvas contração-resposta, considerando quatro parâmetros. O valor de P corresponde a análise estatística realizada por ANOVA de uma via. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. Fonte: elaborada pelo autor.

ANEXO A – Certificado 1 da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização do modelo animal de injeção intraperitoneal de fezes para o estudo das alterações cardiovasculares induzidas pela sepse", protocolada sob o CEUA nº 9785211221 (10.002000), sob a responsabilidade de **Daniel Fernandes e equipe; Gabrielle Delfrate** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 22/02/2022.

We certify that the proposal "Characterization of the animal model of feces intraperitoneal-injection for the study of sepsis-induced cardiovascular changes", utilizing 144 Heterogenics rats (144 males), protocol number CEUA 9785211221 (10.002000), under the responsibility of **Daniel Fernandes and team; Gabrielle Delfrate** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 02/22/2022.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2022** a **01/2023** Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

Idade: **2 a 3 meses**

N: **144**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **200 a 400 g**

Local do experimento: Sala 112 de Departamento de Farmacologia (Bloco D), centro de Ciências Biológica

Florianópolis, 23 de fevereiro de 2022

Luciana A. Honorato

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaela Foletto da Silva

Vanessa Rafaela Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

ANEXO B – Certificado 2 da Comissão de Ética no Uso de Animais



Universidade Federal de Santa Catarina

*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Inibição da fosfodiesterase-5 como potencial terapêutico no manejo das alterações cardiovasculares de sobreviventes à sepse", protocolada sob o CEUA nº 7262240423 (ID 002432), sob a responsabilidade de **Daniel Fernandes e equipe; Gabrielle Delfrate** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 06/06/2023.

We certify that the proposal "Phosphodiesterase-5 inhibition as a therapeutic potential in the management of cardiovascular changes in sepsis survivors", utilizing 176 Isogenic rats (176 males), protocol number CEUA 7262240423 (ID 002432), under the responsibility of **Daniel Fernandes and team; Gabrielle Delfrate** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 06/06/2023.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 06/2023 a 05/2025 Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Ratos isogênicos**

Linhagem: **Wistar**

sexo: **Machos**

idade: **80 a 100 dias**

Quantidade: **176**

Peso: **300 a 350 g**

Florianópolis, 06 de junho de 2023

Luciana Aparecida Honorato
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Vanessa Rafaela Foletto da Silva
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina



ANEXO C – Artigos publicados durante o doutorado

DELFRATE, G.; MROCZEK, T.; MECCA, L. E. A.; ANDREIS, J. D.; FERNANDES, D.; LIPINSKI, L. C.; CLAUDINO, M.; FRANCO, G. C. N. Effect of pentoxifylline and α -tocopherol on medication-related osteonecrosis of the jaw in rats: Before and after dental extraction. **Archives of Oral Biology**, v. 137, p. 105397, 2022.

MROCZEK, T.; DELFRATE, G.; MECCA, L. E. A.; ANDREIS, J. D.; LIPINSKI, L. C.; FERNANDES, D.; AZEVEDO, M. C. S.; MELCHIADES, J. L.; GARLET, G. P.; FRANCO, G. C. N.; CLAUDINO, M. Sildenafil reduces bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis in rats. **Clinical Oral Investigations**, v. 27, n. 5, p. 2437-2448, 2023.

CALENTE, T. J. N.; ALBINO, L. B.; DE OLIVEIRA, J. G.; DELFRATE, G.; SORDI, R.; SANTOS, F. A.; FERNANDES, D. Early Blood Lactate as a Biomarker for Cardiovascular Collapse in Experimental Sepsis. **Shock**, v. 61, n. 1, p. 142-149, 2024.

DELFRATE, G.; ALBINO, L. B.; ASSREUY, J.; FERNANDES, D. Cecal Slurry as an Alternative Model to Cecal Ligation and Puncture for the study of Sepsis-induced Cardiovascular Dysfunction. **Shock**, p. 10.1097, 2024

ALBINO, L. B.; DELFRATE, G.; FERNANDES, D. The effect of caffeine on sepsis induced cardiovascular dysfunction. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 60, p. c24055, 2024.

ALVES, G. F.; OLIVEIRA, J. G.; NAKASHIMA, M. A.; DELFRATE, G.; Regina SORDI; ASSREUY, J.; SILVA-SANTOS, J. E.; COLLINO, M.; FERNANDES, D. Cardiovascular effects of Roflumilast during sepsis: Risks or benefits?. **European Journal of Pharmacology**, v. 983, p. 177015, 2024.

NAKASHIMA, M. A.; DELFRATE, G.; ALBINO, L. B.; ALVES, G. F.; OLIVEIRA, J. G.; FERNANDES, D. Impact of Tadalafil on Cardiovascular and Organ Dysfunction Induced by Experimental Sepsis. **Acute and Critical Care**, v. 40, n. 1, p. 46, 2025.

IZUMI G. K.; PASETO C. V.; COSTA R. F.; DELFRATE G.; HAUSER B. A.; FERNANDES D.; MACHADO M. A. N.; MENDES R. T. Relationship Between Periodontitis and Nitric Oxide in Patients Undergoing Maintenance Hemodialysis (Aprovado para publicação na revista **Hemodialysis International** em maio de 2025).

ANEXO D – Artigos em preparação ou submetidos

GRUNDMANN D. D. R.; LOURENÇO C.; SANCHES M. P.; SAATKAMP R. H.; PARIZE A. L.; DELFRATE G.; ALBINO L. B.; FERNANDES D.; SONVICO F.; STULZER H. K. Improving Oral Bioavailability: Lipid-Polymeric Nanoparticles of Simvastatin and Coenzyme Q10 (Submetido para publicação na revista **Journal of Molecular Liquids** em Dezembro de 2024).

DELFRATE, G.; NEVES, P.G.; ALBINO, L.B.; MOREIRA, D.H.; PINHEIRO, L.C.; NARDI, G.; ASSREUY, J.; FERNANDES, D. Tadalafil restores cardiac function and decreases cardiac remodeling in sepsis-surviving rats.

ANEXO E – Outras publicações

1. Organização de livro para divulgação científica:

SIMAS, A.; BOBERMIN, D. M.; FERNANDES, D.; MOREIRA, D. H.; ECKERT, F. B.; DELFRATE, G.; GRIEBNER, G.; CIMAROSTI, H. I.; TUBBS, H. R.; BOLZAN, J. A.; VIEIRA JUNIOR, J. C.; OLIVEIRA, M. K. S.; HAHMEYER, M. L. S.; KRUGER, N. R. Z.; SOMENSI, N.; MARTINS, T.; SANTOS, T. M.; SANTOS, T. L. Pequenos grandes cientistas: caderno de experimentos 1. 1. ed. Florianópolis: UFSC, 2023. v. 1. 31p.

2. Publicações em site de divulgação científica:

FERNANDES, D.; DELFRATE, G. A microbiota do pai importa para a saúde do bebê?. Cientistas descobriram que, Florianópolis, 24 set. 2024. Disponível em: <https://cientistasdescobriramque.com/2024/09/24/a-microbiota-do-pai-importa-para-saude-do-bebe/>

FERNANDES, D.; DELFRATE, G. Revolucionando o Tratamento da Insuficiência Cardíaca. Cientistas descobriram que, Florianópolis 07 nov. 2024. Disponível em: <https://cientistasdescobriramque.com/2024/11/07/revolucionando-o-tratamento-da-insuficiencia-cardiaca/>