



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

Luana Nunes Mariot

**Efeitos do  $\beta$ -cariofileno nas alterações cardiovasculares e renais em camundongos machos sobreviventes à sepse**

Florianópolis  
2023

Luana Nunes Mariot

**Efeitos do  $\beta$ -cariofileno nas alterações cardiovasculares e renais em camundongos machos sobreviventes à sepse**

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

Orientador(a): Profa. Dra. Regina de Sordi.

Florianópolis

2023

Mariot, Luana

Efeitos do  $\beta$ -cariofileno nas alterações cardiovasculares e renais em camundongos machos sobreviventes à sepse / Luana Mariot ; orientadora, Regina Sordi, 2023.

51 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Sepse. 3. Disfunção renal. 4. Sistema endocanabinóide. I. Sordi, Regina . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Luana Nunes Mariot

**Efeitos do  $\beta$ -cariofileno nas alterações cardiovasculares e renais em camundongos machos sobreviventes à sepse**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 27 de novembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.(a) Aurea Elizabeth Linder, Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Jonathan Paulo Agnes, Dr.(a)

Instituição: Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

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

Orientador(a)

Florianópolis, 2023.

Esse trabalho é dedicado à minha família, que  
tornou meu sonho possível.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a minha orientadora prof. Dra. Regina de Sordi, que me acolheu e confiou em mim, mesmo nos dias mais difíceis. Pelo convívio leve e agradável, e por todos os ensinamentos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, agradeço imensamente a oportunidade de aprender com alguém tão incrível como você, sempre será um exemplo de pesquisadora, mulher, amiga e mãe.

Ao prof. Dr. Daniel Fernandes e Dr. Jamil Assreuy, pelos ensinamentos e conversas, vocês foram essenciais na minha jornada.

Aos professores que acompanharam minha trajetória até aqui, cada um de vocês tem um lugar especial no meu coração.

À nossa querida Adri, você é muito especial, luz nas manhãs de sexta-feira.

Aos meus colegas do LabCaRe, meus amigos, a família “catitos”, sem vocês nada disso seria possível. A contribuição de cada um foi essencial para que esse trabalho pudesse acontecer, seja com uma ajuda, um ombro amigo, e também as nossas doses de café e risadas diárias, muito obrigada a todos.

À Letícia, que foi minha dupla nesse projeto, foram muitas preparações de *Cecal Slurry* juntas, e assim nasceu uma amizade que vou levar pra vida toda.

Às minhas colegas Dai e Lais, que tornaram as aulas divertidas, nos momentos mais difíceis das disciplinas, vocês estavam lá para me ajudar.

Ao Gustavo, apesar do nosso curto período de tempo juntos, me ensinou com muita paciência.

À minha amiga Débora, que diante das situações mais inusitadas, estava ao meu lado, ajudando de todas as formas possíveis para que eu pudesse estar aqui hoje.

À Universidade Federal de Santa Catarina, CNPq e CAPES, e a todos do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, ao LAMEB, e os funcionários do CCB bloco D, que sempre foram tão queridos e agradáveis, e que deixam o nosso ambiente harmonioso.

Ao pessoal da Nova Acrópole da Lagoa da Conceição, que sempre mantiveram a chama acesa dentro do meu coração.

Um agradecimento muitíssimo importante, à minha família, minha base, vocês são tudo que existe de mais especial na minha vida, sem o apoio que recebi em casa, eu não teria conseguido nem iniciar a vida acadêmica, a maior riqueza que um ser humano pode alcançar é ter uma família tão especial, me sinto extremamente grata por ter nascido com esse tesouro tão grande e precioso que é a nossa união.

Ao Raul, meu grande amor, que topou viver a aventura de se mudar comigo para Florianópolis, embarcou no meu sonho e viveu comigo, e assim a gente se tornou uma família. Meu companheiro, melhor amigo e confidente, sem você a vida não tem a mesma graça.

À família do Raul, que se tornou minha família também.

Não poderia deixar de mencionar minha gratidão ao Sagrado Coração de Jesus e a Nossa Senhora de Fátima, por todas as vezes que minha família rezou com fé, e pela vida cheia de graças que sempre tivemos.

E aos membros da banca, pela atenção e disposição de estar presente avaliando esse trabalho.

Não importa o quão lento você vá, desde que não pare.

(Confúcio)



## RESUMO

A sepse é definida como uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, responsável por grande parte das internações em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) e também por grandes gastos no Sistema Único de Saúde (SUS). Pacientes sobreviventes à sepse têm sua qualidade de vida reduzida, afetando as funções cognitivas, mentais e físicas. Os casos mais graves são em idosos, crianças e pacientes com comorbidades. Não há tratamento específico para a sepse, o seu tratamento é apenas terapia de suporte básico, como fazer reposição volêmica intravenosa e se necessário, terapia com vasopressores, suporte de oxigênio quando necessário, utilização de antibióticos de amplo espectro e controle do foco infeccioso. A insuficiência renal aguda associada à sepse (IRA-AS) causa a diminuição do fluxo sanguíneo renal global e à morte celular epitelial tubular secundária, ou necrose tubular aguda, e em a cada três pacientes sépticos desenvolvem IRA-AS. O sistema endocanabinoide mostrou-se bastante efetivo como alvo terapêutico para algumas patologias, uma vez que pode modular o sistema imune e cardiovascular. Os receptores canabinoides do tipo 2 (CB<sub>2</sub>) têm sido apontados como possíveis alvos terapêuticos em condições patológicas como aterosclerose, dano de isquemia-e-reperfusão e fibrose. Um estudo recente mostrou que a ativação de receptores CB<sub>2</sub> aumenta a perfusão renal por um efeito vascular direto, independente de produtos das ciclooxygenases e das enzimas óxido nítrico sintase. Ainda, estudos apontam que estes receptores são diferentemente regulados dependendo do tecido, de acordo com o gênero e em distintas patologias. Desta forma, o objetivo deste trabalho é testar a hipótese de que os receptores CB<sub>2</sub> aumentam o fluxo sanguíneo e melhoram a função renal decorrentes da sepse e do pós-sepse. Camundongos suíços foram submetidos ao modelo de peritonite “*cecal slurry*” e divididos em dois grupos que receberam veículo e agonista CB<sub>2</sub> ( $\beta$ -cariofileno). Animais sham foram utilizados como controle. Os seguintes parâmetros cardiovasculares foram avaliados: pressão arterial, frequência cardíaca, reatividade à noradrenalina e fluxo sanguíneo do córtex renal. Também foram avaliados os marcadores plasmáticos ureia e creatinina. Finalmente, foi investigada a expressão de receptores CB<sub>2</sub> e expressão da molécula KIM-1, marcadora de dano renal, nos rins pelo método de *Western Blotting*. Com esse estudo, podemos confirmar que o modelo de sepse *Cecal Slurry* mimetiza os danos clínicos da sepse como hipotermia, perda de massa corporal, causa hipotensão e diminuição do fluxo sanguíneo renal. E que o tratamento com o  $\beta$ -cariofileno melhora o fluxo sanguíneo renal dos animais sobreviventes à sepse. De maneira geral, este estudo contribui para o aumento da compreensão do papel do  $\beta$ -cariofileno nas alterações renais e vasculares associadas à sepse, visando apontar novos alvos promissores para futuras intervenções terapêuticas.

**Palavras-chaves:** doença renal; canabinoide; choque séptico.



## ABSTRACT

Sepsis is defined as a life-threatening organic dysfunction caused by a dysregulated host response to infection, responsible for a large proportion of admissions to Intensive Care Units (ICU) and also for large expenses in the Unified Health System (SUS). Sepsis survivors have reduced quality of life, affecting cognitive, mental and physical functions. The most serious cases are in the elderly, children and patients with comorbidities. There is no specific treatment for sepsis, its treatment is only basic supportive therapy, such as intravenous volume replacement and, if necessary, vasopressor therapy, oxygen support when necessary, use of broad-spectrum antibiotics and control of the infectious focus. Acute kidney injury associated-sepsis (AKI-AS) causes decreased global renal blood flow and secondary tubular epithelial cell death, or acute tubular necrosis, and one in three septic patients develops AKI-AS. The endocannabinoid system has proven to be very effective as a therapeutic target for some pathologies, as it can modulate the immune and cardiovascular systems. Type 2 cannabinoid receptors (CB2) have been identified as possible therapeutic targets in pathological conditions such as atherosclerosis, ischemia-reperfusion damage and fibrosis. A recent study showed that the activation of CB2 receptors increases renal perfusion through a direct vascular effect, independent of products from cyclooxygenases and nitric oxide synthase enzymes. Furthermore, studies indicate that these receptors are regulated differently depending on the tissue, according to gender and in different pathologies. Therefore, the objective of this work is to test the hypothesis that CB2 receptors increase blood flow and improve renal function resulting from sepsis and post-sepsis. Swiss mice were subjected to the "cecal slurry" model of peritonitis and divided into two groups that received vehicle and CB2 agonist ( $\beta$ -caryophyllene). Sham animals were used as controls. The following cardiovascular parameters were evaluated: blood pressure, heart rate, renal blood flow. Plasma markers (urea and creatinine) were also evaluated. Finally, the expression of CB2 receptors and expression of the KIM-1 molecule, a marker of kidney damage, were investigated in the kidneys using the Western Blotting method. With this study, we can confirm that the Cecal Slurry sepsis model mimics the clinical damages of sepsis such as hypothermia, loss of body mass, causes hypotension and decreased renal blood flow. And that treatment with  $\beta$ -caryophyllene improves renal blood flow in animals surviving sepsis. Overall, this study contributes to increasing understanding of the role of  $\beta$ -caryophyllene in renal and vascular changes associated with sepsis, aiming to identify new promising targets for future therapeutic interventions.

**Keywords:** kidney disease; cannabinoid; septic shock.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Massa corporal e temperatura na sepse e no pós-sepse.....	30
Figura 2 – Escore de severidade séptica e curva de sobrevida. ....	31
Figura 3 – Alterações cardiovasculares observadas na sepse e no pós-sepse. ....	32
Figura 4 - Parâmetros renais.....	32
Figura 5 – Efeitos do $\beta$ -cariofileno na perda de massa corporal e no consumo de ração na sepse e no pós-sepse. ....	33
Figura 6 – Efeitos do $\beta$ -cariofileno na temperatura na sepse e no pós-sepse.....	34
Figura 7 – Avaliação da severidade séptica por escore e sobrevida.....	34
Figura 8 – Alterações cardiovasculares no pós-sepse em animais tratados com $\beta$ -cariofileno.....	35
Figura 9 – Responsividade à noradrenalina em animais sobreviventes tratados com $\beta$ -cariofileno.....	36
Figura 10 – Parâmetros renais em animais sobreviventes tratados com $\beta$ -cariofileno. ....	36
Figura 11 – Expressão da molécula de lesão renal -1 (KIM-1).....	37
Figura 12 – Expressão de receptores CB <sub>2</sub> . ....	38



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teste rápido em urina.....	37
---------------------------------------	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-AG	2-arachidoylglicerol
AEA	Anandamida
AKI-AS	Acute Kidney Injury Associated Sepsis
BAL	Lavado broncoalveolar
CB <sub>1</sub>	Receptores canabinoides do tipo 1
CB <sub>2</sub>	Receptores canabinoides do tipo 2
CLP	Ligação e perfuração do ceco
CS	Cecal Slurry
DAMP	Danger-Associated Molecular Patterns
DP	Desvio padrão
eCB	Sistema endocanabinoide
EUA	Estados Unidos da América
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IRA	Insuficiência renal aguda
IRA-AS	Insuficiência renal aguda associada à sepse
KIM-1	Kidney injury molecule-1
LabCaRe	Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal
LPS	Lipopolissacarídeos
NFκB	Fator de transcrição nuclear B
NO	Óxido Nítrico
NOS2	Óxido nítrico sintase 2
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PAS	Pressão arterial sistólica
PRR	Pattern Recognition Receptors
qSOFA	Quick Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SOFA	Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment
SPS	Síndrome Pós-Sepse
T-Per	Tissue Protein Extraction Reagent

UFC        Unidade formadora de colônia  
UFSC      Universidade Federal de Santa Catarina  
UTI        Unidade de Terapia Intensiva  
VCAM-1   Molécula de adesão celular-vascular



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1	SEPSE E CHOQUE SÉPTICO: DEFINIÇÃO E FISIOPATOLOGIA.....	16
1.1.1	<b>Fisiopatologia da sepse</b> .....	<b>16</b>
1.1.2	<b>Pós-sepse</b> .....	<b>17</b>
1.1.3	<b>Modelos para estudo da sepse</b> .....	<b>18</b>
1.2	DISFUNÇÃO RENAL E INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA (IRA).....	19
1.3	SISTEMA ENDOCANABINOIDE .....	20
1.3.1	<b>Sistema endocanabinoide nos rins</b> .....	<b>21</b>
1.3.2	<b>Receptores CB<sub>2</sub> como alvo terapêutico</b> .....	<b>22</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1	ANIMAIS .....	23
4.2	INDUÇÃO DA SEPSE PELO MODELO CECAL SLURRY (CS).....	24
<b>4.2.1</b>	<b>Pontos finais humanitários</b> .....	<b>25</b>
4.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROTOCOLOS DE TRATAMENTO .....	25
4.4	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA, ESCORE DE GRAVIDADE SÉPTICA, PESO E TEMPERATURA.....	25
4.5	CONSUMO DE RAÇÃO.....	26
4.6	AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO RENAL .....	26
4.7	AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS NO PLASMA .....	27
4.8	AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL, FREQUÊNCIA CARDÍACA E RESPOSTA AO VASOCONSTRITOR NORADRENALINA .....	27
4.9	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	27
4.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
5.1	PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE SEPSE <i>CECAL SLURRY</i> .....	29
5.2	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM B-CARIOFILENO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE.....	33
5.3	EFEITO DO B-CARIOFILENO NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E RENAIS.....	35

5.4	EXPRESSÃO DA MOLÉCULA DE LESÃO RENAL – 1 EM ANIMAIS SÉPTICOS E SOBREVIVENTES À SEPSE TRATADOS COM B-CARIOFILENO ...	37
5.5	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTORES CB2 NOS RINS DE ANIMAIS SÉPTICOS.....	38
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SEPSE E CHOQUE SÉPTICO: DEFINIÇÃO E FISIOPATOLOGIA

De acordo com o Terceiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico (*Sepsis-3*), a sepse é definida como uma disfunção orgânica com risco de morte causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção. Diferente da definição prévia (*Sepsis-2*) que enfatizava a resposta inflamatória, a atual tem como ponto principal a disfunção de órgãos (Singer *et al.*, 2016).

Para a avaliação da severidade séptica em humanos, utiliza-se o escore SOFA (*Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment*), que analisa parâmetros respiratórios (pressão parcial de oxigênio e fração de oxigênio), de coagulação (plaquetas), hepáticos (bilirrubina), cardiovascular (pressão arterial), neurológico (escore de coma de Glasgow) e renal (creatinina e débito urinário). Dessa forma, foi estabelecido que a disfunção de órgãos é definida com o aumento de 2 ou mais pontos na escala SOFA e isto, por sua vez, tem sido correlacionado com o aumento de mais de 10% na mortalidade hospitalar (SINGER *et al.*, 2016). Além do SOFA, desenvolveu-se o qSOFA (*Quick Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment*) que utiliza apenas os parâmetros respiratórios, mentais e cardiovasculares, com o objetivo de uma avaliação mais rápida por não precisar de exames laboratoriais, facilitando o diagnóstico (Singer *et al.*, 2016).

Mundialmente, há uma estimativa de mais de 30 milhões de casos por ano (Fleischmann *et al.*, 2016). No Brasil, a incidência é de 200 mil mortes em pacientes adultos com sepse tratados em UTI por ano. Além disso, houve uma variabilidade substancial na disponibilidade de recursos básicos para o tratamento da sepse, e menos recursos disponíveis foram associados a piores resultados (Machado *et al.*, 2017). Nos EUA, por exemplo, a sepse é a causa mais comum de mortes hospitalares e custa mais de US\$ 24 bilhões anualmente (Rudd *et al.*, 2020).

#### 1.1.1 Fisiopatologia da sepse

A sepse é uma síndrome extremamente complexa e diversificada que se origina de uma resposta desregulada do organismo diante de uma infecção. É essencial destacar que, mesmo após o tratamento bem-sucedido da infecção, a resposta imune descontrolada muitas vezes persiste, embora a infecção seja o evento desencadeador (POLL *et al.*, 2017).

Os sítios de infecções mais comuns que conduzem a sepse são: o sistema respiratório (64% dos casos), seguido pelas infecções abdominais (20%), da corrente sanguínea (15%) e do trato genitourinário e renal (14%) (VINCENT et al., 2006, 2009; KARLSSON et al., 2007). Depois que ocorre a infecção, as células do sistema imune inato do hospedeiro reconhecem o patógeno invasor por meio dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*). Esses receptores identificam estruturas conservadas dos patógenos, conhecidas como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). Além disso, os PRRs também têm a capacidade de reconhecer sinais endógenos de perigo, conhecidos como padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês, *Danger-Associated Molecular Patterns*). Esses DAMPs são liberados durante o estresse inflamatório, o que, por sua vez, complementa a ativação do sistema imune do hospedeiro (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

As células endoteliais desempenham um papel crucial na resposta inflamatória durante um episódio de sepse, influenciando eventos celulares e vasculares. As citocinas liberadas pelas células inflamatórias residentes estimulam a síntese de moléculas de adesão na superfície das células endoteliais, tais como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), a molécula de adesão celular-vascular (VCAM-1) e selectinas. Essas moléculas promovem a migração de leucócitos da microcirculação para as áreas infectadas. Isso resulta em um aumento da permeabilidade vascular, levando ao extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas nos tecidos (KING et al., 2014; PONS et al., 2020).

A resposta inflamatória excessiva é a característica principal da sepse, levando a danos graves ao hospedeiro devido à produção descontrolada de mediadores inflamatórios. Além disso, esses eventos inflamatórios antecedem a disfunção endotelial, resultando no comprometimento do tônus vasomotor e da microcirculação. Esses fatores combinados estão diretamente associados à falência de múltiplos órgãos que é comum na sepse, contribuindo significativamente para as elevadas taxas de mortalidade associadas a essa síndrome (COHEN, 2002; PONS et al., 2020).

### **1.1.2 Pós-sepse**

Pacientes que sobrevivem a sepse podem desenvolver uma variedade de deficiências que afetam funções cognitivas, mentais e físicas, conhecidas como síndrome pós-sepse (SPS) (NEEDHAM, et al., 2012). Como resultado, a qualidade

de vida relacionada à saúde pode ser reduzida por meses ou anos (DAVYDOW, et al., 2009).

A infecção é um importante desencadeador de síndromes coronárias agudas, causando isquemia por aumento da demanda, disfunção endotelial, estados pró-coagulantes e a infiltração de células inflamatórias (como linfócitos T, macrófagos e neutrófilos) nas placas ateroscleróticas. Essas consequências infecciosas podem aumentar o risco a curto prazo de eventos cardiovasculares, incluindo acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio e doença arterial coronária fatal (CORRALES-MEDINA, et al. 2013). A hospitalização devido à pneumonia aumenta quatro vezes o risco de desenvolver doenças cardiovasculares nos primeiros 30 dias pós-infecção e permanece elevada por 10 anos (CORRALES-MEDINA, et al., 2015).

Yende et al. (2014) descobriram que sobreviventes de sepse grave tinham um risco aumentado em 13 vezes de desenvolver eventos cardiovasculares em comparação com controles não pareados e um risco aumentado em 1,9 vezes em comparação com controles da população correspondente (YENDE, et al., 2014).

Os efeitos a longo prazo da sepse incluem desregulações imunometabólicas, neurocognitivas, psiquiátricas e físicas. Esses efeitos levam a um aumento na mortalidade e uma piora na qualidade de vida relacionada à saúde. Profissionais de saúde e membros da família suportam um custo significativo, tanto financeiro quanto energético, no cuidado a esses pacientes com graves problemas de saúde. Esse período, conhecido como síndrome pós-sepse, é uma entidade de importância recém-descoberta e objeto de muita exploração (MOSTEL, et al., 2020).

### **1.1.3 Modelos para estudo da sepse**

Os modelos que mimetizam o quadro séptico incluem rompimento de barreiras de proteção naturais como o CLP (ligação e perfuração do ceco) e modelos que incluem a administração de um patógeno viável como a injeção de bactérias (RITTIRSCH et al., 2009), como por exemplo, o modelo de sepse induzido por pneumonia através da administração intratraqueal da bactéria *K. pneumoniae*. Este modelo mimetiza um foco infeccioso de início pulmonar que irá progredir para um quadro séptico (SORDI, et al., 2013)

Um outro modelo que vem sendo bastante utilizado é o *Cecal Slurry* (CS). Este modelo mimetiza o quadro de sepse de maneira semelhante ao modelo de CLP, no entanto, é um modelo de fácil execução, baixo custo e maior reprodutibilidade (STARR

et al., 2014). Além disso, por não necessitar de procedimento cirúrgico é menos agressivo e promove menos sofrimento aos animais. Ele consiste em coletar resíduo cecal fresco de um animal doador, solubilizá-lo em salina, para então o conteúdo padronizado ser administrado com auxílio de agulha e seringa na cavidade peritoneal (STARR et al., 2014).

De acordo com recentes estudos sobre refinamento de modelos de sepse, é aconselhável para melhor mimetizar o que acontece na clínica, que variáveis biológicas relevantes e comorbidades devam ser incluídas nos designs experimentais em estudos de sepse (ZINGARELLI et al., 2019).

Pessoas de idade avançada, sexo masculino e condições crônicas de saúde preexistentes são particularmente propensas a desenvolver sepse grave; portanto, estudos visando atingir este público e estratégias de prevenção devem ser direcionadas a essas populações vulneráveis (MAYR et al., 2014).

## 1.2 DISFUNÇÃO RENAL E INSUFICIÊNCIA RENAL AGUDA (IRA)

Insuficiência renal aguda (IRA) é definida por uma perda imediata na função renal devido a uma série de fatores, incluindo o início de sepse, exposição a nefrotoxinas. Órgãos como rins, fígado e baço sofrem hipoperfusão devido à isquemia (BASILE, et al., 2012; WANG, et al., 1992).

A sepse é uma das principais causas de IRA, e vários mecanismos, incluindo alterações na microcirculação, estresse oxidativo e disfunção das células endoteliais, estão envolvidos (revisado em OLIVEIRA, et al., 2022).

O paradigma fisiopatológico predominante atribui a insuficiência renal aguda associada à sepse (IRA-AS) à diminuição do fluxo sanguíneo renal global e à morte celular epitelial tubular secundária, ou necrose tubular aguda (PEERAPORNATANA et al., 2019).

A verdadeira incidência é difícil de estimar, mas alguns estudos relatam que a IRA ocorre em um a cada cinco pacientes adultos hospitalizados, o que representa quase 50% dos pacientes adultos que recebem cuidados intensivos (revisado em OLIVEIRA, et al., 2022).

Estima-se até 19 milhões de casos de IRA em todo o mundo por ano, mas a verdadeira incidência é presumivelmente muito maior. Sendo uma complicação frequente em pacientes criticamente enfermos e associada a uma alta morbidade e mortalidade. Embora a sepse seja o principal fator para o desenvolvimento de IRA, a

IRA de qualquer origem é associada com um alto risco de desenvolvimento de sepse (PEERAPORNATANA et al., 2019).

A molécula de lesão renal (KIM) -1, também conhecida como domínios de mucina de imunoglobulina de células T (TIM) -1, é uma proteína da superfamília de imunoglobulinas que é marcadamente regulada positivamente no túbulo proximal do rim lesionado ou doente (MORI, et al., 2021). Recentemente foi relatado que o transdutor de sinal do fator de transcrição e ativador da transcrição 3 (STAT3) é fosforilado pela quinase de checkpoint 1 e/ou quinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1/2) após lesão renal, o que leva a regulação positiva da expressão de KIM-1 (AL-BATAINEH, et al., 2021).

### 1.3 SISTEMA ENDOCANABINOIDE

O sistema endocanabinoide (eCB) compreende os receptores canabinoides do tipo 1 (CB<sub>1</sub>) e do tipo 2 (CB<sub>2</sub>) e seus ligantes endógenos conhecidos como endocanabinoides. Até o momento, ambos os receptores canabinoides clonados são acoplados a proteínas Gi/o, por meio das quais eles modulam a atividade de adenilato ciclase (efeito inibitório), quinases de proteína ativadas por mitógenos (efeito estimulatório) e, no caso dos receptores CB<sub>1</sub>, canais de cálcio sensíveis à voltagem (efeito inibitório) e canais de potássio retificadores internos (efeito estimulatório), para transmitir a ligação de agonistas em respostas biológicas (revisado em MARZO, et al., 2004)

A AEA e o 2-AG são sintetizados a partir de lipídeos de membrana de maneira dependente de cálcio e sob demanda, não sendo, portanto, armazenados, e atuam principalmente como neuromoduladores e imunomoduladores, mostraram alta afinidade de ligação aos receptores CB<sub>1</sub> quanto aos receptores CB<sub>2</sub> (PERTWEE, 2005).

O receptor CB<sub>2</sub> foi clonado em 1993 a partir de células humanas de leucemia promielocítica da linhagem HL-60 (MUNRO, et al, 1993). Sua sequência de aminoácidos apresenta aproximadamente 44% de homologia com os resíduos de aminoácidos do CB<sub>1</sub>. O CB<sub>2</sub> é encontrado principalmente em células do sistema imunológico, onde os níveis de expressão foram encontrados mais altos do que os do CB<sub>1</sub> (YE, et al., 2019).

O eCB desempenha um papel crítico nas dores crônicas e nos transtornos de humor, e tem sido extensivamente estudado devido ao seu amplo potencial

terapêutico e por ser um alvo promissor para o desenvolvimento de novos medicamentos (revisado em REZENDE, et al., 2023).

### 1.3.1 Sistema endocanabinoide nos rins

A maioria dos estudos até o momento tem focado no papel dos receptores CB<sub>1</sub> no sistema nervoso central e em nervos e gânglios (FORD, *et al.*, 2021), em grande parte devido aos seus efeitos psicotrópicos e no tratamento da dor. No entanto, nos rins, os receptores CB<sub>1</sub> consistentemente demonstram efeitos prejudiciais (PRESSLY, *et al.*, 2019). De grande interesse para este projeto, os receptores canabinoides são expressos em células do túbulo proximal e células mesangiais (BARUTTA, *et al.*, 2011).

A infusão de AEA (agonista de receptor CB<sub>1</sub>) diminui a taxa de filtração glomerular e aumenta o fluxo sanguíneo renal, independentemente das alterações na pressão arterial. *In vitro* foi mostrado que o AEA dilata as arteríolas de maneira dependente de receptores CB<sub>1</sub> (BARUTTA, *et al.*, 2018).

Estudos exploraram a possibilidade de que os efeitos benéficos do bloqueio de receptores CB<sub>1</sub> no metabolismo resultariam na melhoria da lesão renal associada à obesidade e à síndrome metabólica (JANIÁK, *et al.*, 2007).

Dados disponíveis até o momento sugerem que insultos metabólicos e outros induzem um desequilíbrio no eCB renal com a sinalização de receptores CB<sub>1</sub> prevalecendo sobre CB<sub>2</sub>, resultando em estresse oxidativo e inflamação seguida de disfunção celular, apoptose e fibrose (BARUTTA, *et al.*, 2018).

Por outro lado, a ativação de receptores CB<sub>2</sub> aumenta a perfusão cortical renal, promove dilatação arteriolar aferente e também, promove o aumento da perfusão renal de animais saudáveis (PRESSLY, *et al.*, 2019). PRESSLY e colaboradores (2019) mostraram aumento no fluxo sanguíneo cortical renal mediado pelo agonista CB<sub>2</sub> SMM-295. Esse efeito pode ser atribuído à dilatação dos vasos sanguíneos periféricos que ocorre através da ativação dos receptores CB<sub>2</sub>, incluindo aqueles nos rins, uma vez que uma redução significativa na pressão arterial média foi associada ao aumento na perfusão renal mediado pelo SMM-295.

Jenkins e colaboradores (2014), avaliaram os efeitos da ativação e do antagonismo de receptores CB<sub>2</sub> nos rins de ratos com obesidade induzida por dieta. A estimulação dos receptores CB<sub>2</sub> com AM1241 diminui a progressão da disfunção renal relacionada à obesidade, conforme medido pelas taxas de proteína na urina e



excreção de sódio renal. Por outro lado, o antagonismo dos receptores CB<sub>2</sub> com AM630 reduz a depuração de creatinina, indicando uma piora na função renal.

### 1.3.2 Receptores CB<sub>2</sub> como alvo terapêutico

Por se tratar de uma condição que permanece sem tratamento adequado, a busca de novos alvos terapêuticos na sepse são de grande importância e de extrema urgência. Desta forma, o sistema endocanabinoide, particularmente os receptores CB<sub>2</sub>, surge como uma possibilidade interessante devido ao seu envolvimento na fisiologia cardiovascular e na inflamação (STEFFENS; et al., 2012), objetos de interesse do nosso grupo de pesquisa.

Neste sentido, agonistas CB<sub>2</sub> têm sido apontados como possível terapia em condições como aterosclerose, dano de isquemia e reperfusão, fibrose renal e hepática, câncer e osteoporose (revisado em DHOPESHWARKAR & MACKIE, 2014).

Estudos prévios demonstraram que em animais submetidos ao modelo de CLP, o tratamento com agonista CB<sub>2</sub> aumentou a sobrevivência de animais e diminuiu a bacteremia, o dano pulmonar e o recrutamento de neutrófilos (TSCHOP et al., 2009). Foi demonstrado no modelo de sepse induzido por pneumonia que ativação dos receptores CB<sub>2</sub> pode ser benéfica na sepse ao atenuar o estado hiperinflamatório que ocorre nessa condição, promovendo a redução da migração de células para o foco infeccioso, número de UFC no lavado broncoalveolar (BAL), extravasamento de proteínas, atividade da mieloperoxidase, expressão da enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e ativação do fator de transcrição nuclear kappa B (NFκB) (SOUZA, 2021).

Entre os agonistas CB<sub>2</sub> utilizados hoje na pesquisa, o β-cariofileno tem se mostrado interessante por ser encontrado naturalmente em óleos essenciais de diversas plantas como a pimenta preta, orégano e a canela, e é um componente importante, que pode representar até 35% do óleo essencial de *Cannabis sativa*. O β-cariofileno é volátil, pouco solúvel em água e sensível à luz, oxigênio, umidade e alta temperatura (LIU, et al.; 2013).

Sabe-se que além de apresentar alta afinidade por receptores CB<sub>2</sub> e baixa, ou nenhuma, afinidade por receptores CB<sub>1</sub> (GERTSCH *et al.*, 2008), o β-cariofileno pode atuar em outros receptores, como o PPARγ (YOUSSEF; EL-FAYOUMI; MAHMOUD, 2019).

Os efeitos do β-cariofileno já foram avaliados em um modelo murino de nefropatia induzida por cisplatina, os resultados demonstraram uma melhora na

função renal, na lesão morfológica, na resposta inflamatória, bem como uma redução do estresse oxidativo e da morte celular. Além disso, este estudo revelou que tais efeitos estavam ausentes em camundongos knockout para o receptor CB<sub>2</sub> (HORVÁTH *et al.*, 2012).

Assim, o receptor CB<sub>2</sub> é considerado um potencial alvo terapêutico em diversas patologias com componente inflamatório, já que é predominantemente expresso em células e tecidos do sistema imune (MORALES *et al.*, 2016; DIMARZO, 2018).

## **2 HIPÓTESE**

A hipótese deste estudo é que os receptores CB<sub>2</sub> exercem um papel chave na insuficiência renal associada à sepse e ao pós-sepse, aumentando o fluxo sanguíneo local e melhorando a função renal.

## **3 OBJETIVOS**

O objetivo principal deste estudo é avaliar o efeito do  $\beta$ -cariofileno nas alterações vasculares e renais associadas à sepse e ao pós-sepse em um modelo de peritonite em camundongos machos.

Como objetivos específicos, temos:

1- Padronizar e induzir a sepse experimental através do modelo *Cecal Slurry* e avaliar temperatura, peso, escore de severidade séptica e taxa de mortalidade;

2- Avaliar na sepse e no pós-sepse os seguintes parâmetros renais: expressão da molécula KIM-1 e de receptores CB<sub>2</sub>, fluxo sanguíneo renal, determinação de marcadores plasmáticos de função renal (ureia e creatinina) e parâmetros urinários (pH, densidade, proteinúria);

3- Avaliar na sepse e no pós-sepse os seguintes parâmetros cardiovasculares: pressão arterial, frequência cardíaca, e resposta a agentes vasopressores;

4- Avaliar os efeitos do  $\beta$ -cariofileno nas alterações observadas pelos objetivos específicos 1 a 3.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 ANIMAIS**

Foram utilizados 472 camundongos suíços machos com idade entre 135 e 180 dias, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina

(UFSC). O cálculo amostral foi realizado utilizando-se o programa GPower (Franz Faul, Germany). O cálculo amostral foi realizado com base em estudos prévios realizados com metodologia semelhante (JIAN et al., 2019). Foi adotado um nível de significância de  $\alpha=0,05$  para 2 grupos experimentais (pós-sepse + veículo; pós-sepse + tratamento). Os cálculos foram realizados com base na variância média e desvio padrão comuns, estabelecendo um poder do teste de 90%. Assim, para a variável NGAL, foi obtido um desvio padrão de 41 e 184, respectivamente, resultando em um tamanho amostral de 12 animais por grupo. Em média, é necessário 1 camundongo doador para cada 3 camundongos receptores.

Os animais foram trazidos para o biotério setorial do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e Renal (LabCaRe) onde foram tratados com anti-helmíntico Albendazol (2mL/300mL água de beber) por 3 dias. Após este tratamento, os animais foram mantidos em repouso por 7 dias antes da realização dos experimentos. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), ciclo claro/escuro (12 h/12 h) e com livre acesso à comida e água.

#### 4.2 INDUÇÃO DA SEPSE PELO MODELO CECAL SLURRY (CS)

O modelo foi realizado conforme trabalhos prévios (STARR et al, 2014; RINCON et al., 2021).

Preparação do Cecal Slurry: camundongos suíços machos utilizados como doadores, foram sacrificados com cetamina e xilazina seguido por deslocamento cervical. Realizou-se uma laparotomia, o ceco foi localizado, retirado e o conteúdo cecal coletado, pesado e homogeneizado com PBS para se obter uma suspensão cecal com a concentração final de 100 mg de conteúdo cecal em 1 mL de solução. Para garantir a reprodutibilidade, o procedimento foi padronizado pelo uso de uma solução fresca preparada a partir de camundongos doadores que vivem nas mesmas condições que os animais experimentais. A solução foi filtrada 3 vezes através de um filtro de malha de náilon de 70  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences, Franklin, NJ) para remover grandes partículas.

Indução da sepse: A sepse foi induzida através da administração intraperitoneal (i.p.) de diferentes volumes da solução cecal utilizando seringa e agulha 27G. Os animais foram divididos em 3 grupos e receberam 350, 400 ou 500  $\mu\text{L}$  da solução cecal 100 mg/mL. Ou seja, cada animal recebeu X mg, Y mg ou Z mg de conteúdo cecal, respectivamente.

#### 4.2.1 Pontos finais humanitários

Embora não seja um procedimento cirúrgico, após a administração da solução cecal, foram feitas observações e aferições como massa corporal, temperatura, desidratação, comportamentos, corrimento ocular e/ou nasal, os quais foram anotados em fichas individuais. Os animais que apresentaram um ou mais sinais clínicos descritos abaixo foram imediatamente submetidos a eutanásia por sobredosagem anestésica [cetamina e xilazina (200/50 mg/kg)]:

- 1) redução de peso igual ou superior a 20% em relação ao peso inicial
- 2) hipotermia: diferença de temperatura de 4°C abaixo do normal
- 3) desidratação severa: pinçamento de pele sem retorno indica perda hídrica de até 10%, sem os demais sinais, poderá ser feito fluido para reidratação
- 4) letargia ou decúbito, inabilidade em se mover na gaiola e/ou irresponsividade quando tocado
- 5) incapacidade de alcançar comida / água / deambular normalmente
- 6) sempre que o experimentador julgar que o sofrimento do animal está acima do esperado para o procedimento em questão.

#### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROTOCOLOS DE TRATAMENTO

Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Controle (sham); Sepses + veículo; Pós-sepses + veículo; Pós-sepses +  $\beta$ -cariofileno. Os animais sépticos receberam tratamento por administração oral por ingestão voluntária, o tratamento e/ou óleo eram oferecidos em uma pipeta, sem necessidade de treinar esses animais, com o agonista CB<sub>2</sub>  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg) ou veículo (óleo de amendoim) administrado uma vez por dia durante 7 dias, a primeira administração foi realizada 4 horas após a indução da sepsis. A dose e a via de administração foram escolhidas de acordo com os dados da literatura (HORVÁTH *et al.*, 2012; KRUK-SLOMKA; *et al.*, 2017; JENKIN; *et al.*, 2016). Animais sham foram utilizados como controle e receberam uma injeção de PBS (350  $\mu$ L, i.p.).

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA, ESCORE DE GRAVIDADE SÉPTICA, PESO E TEMPERATURA

A sobrevivência dos animais sépticos foi observada a cada 12 horas pelo tempo de 7 dias após indução da sepsis. A temperatura foi aferida de hora em hora durante as

6 primeiras horas e uma vez ao dia por 7 dias após a administração de *cecal slurry*. Em seguida, foi avaliado o escore de gravidade séptica, onde foram analisados 6 parâmetros: letargia, pilo ereção, tremor, exsudato periorbital, estresse respiratório e diarreia. Para cada um dos sintomas citados foi atribuído 1 ponto e ao final das análises, esses pontos foram somados (ALVES et al., 2022). A pesagem dos animais foi realizada a cada 24 horas por 7 dias. Durante a avaliação os animais foram mantidos em local com temperatura e ciclo de luz controlados, com livre acesso à ração e água. Ao final dos 7 dias os animais que sobreviveram foram submetidos à avaliação do fluxo sanguíneo renal conforme descrito abaixo, e em seguida foram eutanasiados com sobredose anestésica e deslocamento cervical e o sangue, urina e rins foram coletados.

Após a indução da sepse, foi fornecido fonte de calor aos animais, que constituía em um pano de algodão.

#### 4.5 CONSUMO DE RAÇÃO

Para a avaliação do consumo de ração, foi utilizada uma balança e um recipiente plástico, e toda a ração da caixa era pesada do dia 0 até o dia 7.

O peso diário da ração era dividido pela quantidade de animais que estavam dentro da caixa. Logo, foi feita a média de consumo de ração diária individual.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO RENAL

Neste grupo de experimentos, foi realizada a aferição do fluxo sanguíneo renal através do laser doppler. Os animais foram anestesiados com isoflurano 3% por via inalatória (3% indução, 2% manutenção). Foi realizada a antisepsia do abdômen com álcool iodado (iodo 0,1% e álcool etílico 50% v/v) e uma incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm foi feita no flanco esquerdo do animal em decúbito lateral. Ao localizar o rim esquerdo, foi inserido sob a superfície renal uma sonda (modelo VP1T) conectado ao laser Doppler de monitoramento de fluxo sanguíneo (moor VMS-LDF2, Moor Instruments, Inglaterra). A sonda laser foi mantida fixa para evitar variações bruscas nos valores do fluxo. A incisão cirúrgica era coberta com uma gaze embebida de solução salina estéril e os valores de fluxo sanguíneo renal foram obtidos através do software PowerLab® acoplado ao sistema.

#### 4.7 AVALIAÇÃO DE MARCADORES BIOQUÍMICOS NO PLASMA

Amostras de sangue foram centrifugadas a 1500 g por 10 minutos para obtenção do plasma. Os níveis plasmáticos de ureia e creatinina foram realizados utilizando kits comerciais da Labtest, UREIA CA e CRETININA K VE, respectivamente, e os resultados foram obtidos através da multileitora Infinite m200 TECAN. Os valores foram expressos em mg/dL.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL, FREQUÊNCIA CARDÍACA E RESPOSTA AO VASOCONSTRITOR NORADRENALINA

Foi feita a aferição da pressão arterial e frequência cardíaca de forma invasiva nos animais. Os camundongos foram anestesiados com a solução de cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, respectivamente) por via intramuscular (i.m.). Posteriormente, foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (37 °C). Após a localização da artéria femoral esquerda, foi inserida uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso foi utilizado como via de administração dos diferentes agentes vasoativos. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente separada do nervo vago e tecidos adjacentes. A artéria teve seu fluxo sanguíneo temporariamente suprimido por compressão de uma pinça curva. Em seguida, foi inserida uma cânula de polietileno (PE 50) devidamente heparinizada (50 UI/mL solução salina), a qual foi amarrada na artéria e conectado a um transdutor de pressão descartável acoplado ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Austrália). Os valores basais de pressão arterial média (PAM), sistólica (PAS), diastólica (PAD) (em mmHg) e frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram obtidos após 10 minutos de estabilização, sendo registrados em um computador por um software de integração (LabChart7®). E para a avaliação da resposta ao vasoconstritor noradrenalina, foi feita a canulação da artéria femoral e utilizada uma bomba de infusão para infundir a droga na concentração de 2, 6 e 20 nmol/kg.

#### 4.9 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS POR *WESTERN BLOTTING*

Para a técnica de *Western blotting* os tecidos de interesse (rins) foram pulverizados em nitrogênio líquido. Após, foi adicionado, nas amostras já pulverizadas, tampão de lise [(Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM, coquetel de inibidores de proteases 1% (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA; P8340) em T-Per (*Tissue Protein Extraction Reagent*; Thermo

Scientific, Rockford, IL, EUA), que promove a ruptura das células do tecido para a extração das proteínas. Em seguida as amostras foram homogeneizadas por sonicação (60 Watts, 10 segundos). Os homogenatos foram centrifugados a 9000 g por 20 minutos, a 4 °C e o sobrenadante foi obtido. Foi separada uma alíquota do sobrenadante para a quantificação das proteínas das amostras, realizada através do ensaio de Bradford. Foi feita a desnaturação das proteínas no restante do sobrenadante através da adição do tampão de amostra (glicerol 25%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas (95 °C, 10 minutos) e permaneceram armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese. As amostras foram submetidas à eletroforese utilizando um gel de separação (acrilamida 7%, bis-acrilamida 0,2%, Tris 1.5 M, SDS 0,1%, persulfato de amônia 0,04% e TEMED 0,06%) e um gel de entrada (acrilamida 5%, Tris 0.5 M, SDS 0,1%, persulfato de amônia 0,04% e TEMED 0,06%), que separam as proteínas de acordo com o peso molecular. A eletroforese foi realizada em uma cuba específica (90 V; ~ 3 horas) e logo após, as proteínas presentes no gel foram transferidas para membranas de nitrocelulose (100 V; 1 hora; 4 °C). As membranas foram coradas com vermelho de Ponceau 0,2% (v/v) em ácido tricloacético 3% (v/v) para visualização e controle da transferência das proteínas, e lavadas três vezes (10 minutos), sob agitação, com TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, Tween 20 (0,05%; v/v), pH 7,5) para retirada do corante. Então foram incubadas por 1 hora sob agitação, com solução para bloqueio das possíveis ligações inespecíficas (leite desnatado 5% em TBS-T;), e posteriormente incubadas com os anticorpos primários específicos anti-CB2 (1:1000; Cayman, 101550) e molécula de lesão renal 1 (KIM-1, do inglês *kidney injury molecule 1*, Thermofischer 1:1000) por 18 horas a 4 °C, sob agitação. Depois, foram realizadas três lavagens (10 minutos), sob agitação, com TBS-T, e as membranas foram incubadas com um anticorpo secundário – Rabbit, anti-IgG conjugado com peroxidase (1:5000; CellSignalling Tech, Danvers, MA, EUA, Lote: 0022). Novamente foram realizadas três lavagens, e os imunocomplexos foram revelados através da técnica de quimioluminescência usando um sistema de fotodocumentação (ChemiDoc MP, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA). As análises quantitativas foram determinadas através da densitometria das bandas através do programa ImageLab™ software (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram expressos graficamente como uma porcentagem relativa ao grupo controle. Na análise de *Western blotting*, as bandas mais proeminentes foram selecionadas para

serem quantificadas. As membranas eram reutilizadas para mais uma incubação após passarem por tratamento para remoção dos anticorpos primários e secundários com *strip buffer* (1,5% glicina, 0,1% SDS, 1% [v/v] tween® 20, pH = 2,2).

#### 4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo post hoc de Tukey (múltiplas comparações). Quando necessário, os dados foram transformados em logaritmos para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância, os quais foram comprovados através dos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Para análise da curva de sobrevivência, foi utilizado o teste de Mantel-Cox.

O nível de significância aceito para os testes foi de 0,05. Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando o software GraphPadPrism® versão 9.

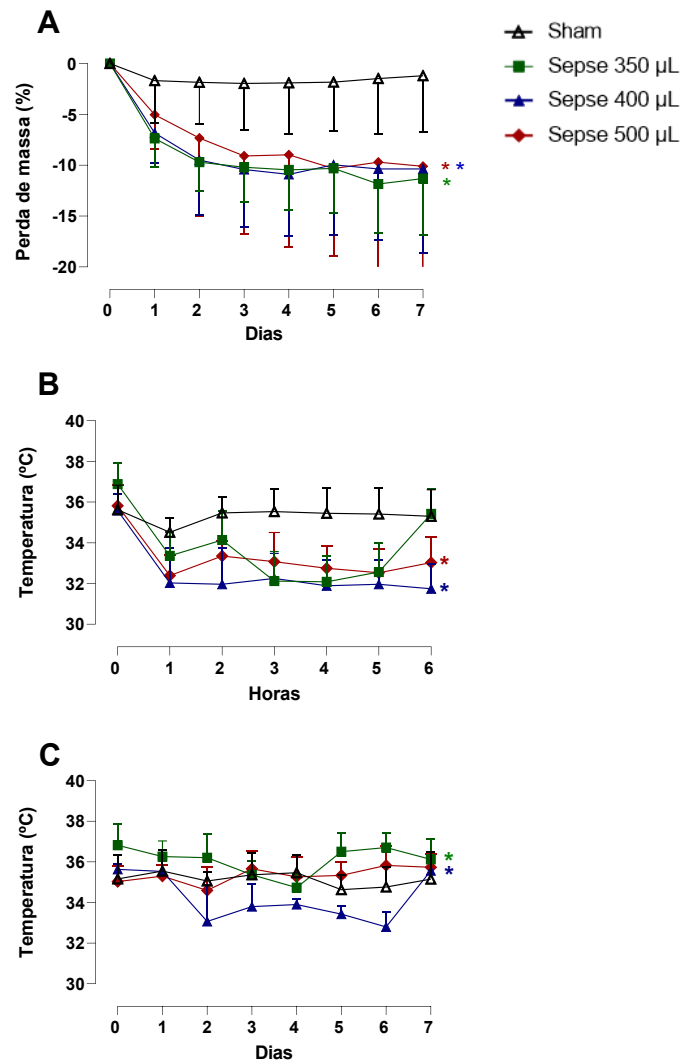
## 5 RESULTADOS

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DO MODELO DE SEPSE CECAL SLURRY

Inicialmente foi feita a padronização do modelo de sepse experimental *Cecal Slurry*. Para isso, diferentes volumes da solução cecal (350 a 500  $\mu$ L) foram administrados pela via intraperitoneal em cada animal. Foi possível observar uma perda de massa corporal ao longo dos 7 dias nos animais sépticos quando comparados ao grupo sham (Figura 1A). Foi observada redução da temperatura nos animais sépticos nas 6 horas iniciais após o procedimento em todos os grupos quando comparados ao grupo sham (Figura 1B). Entretanto, ao se avaliar ao longo de 7 dias, apenas os grupos que receberam 350 e 400  $\mu$ L exibiram alteração na temperatura (Figura 1C).



Figura 1 – Massa corporal e temperatura na sepse e no pós-sepse.



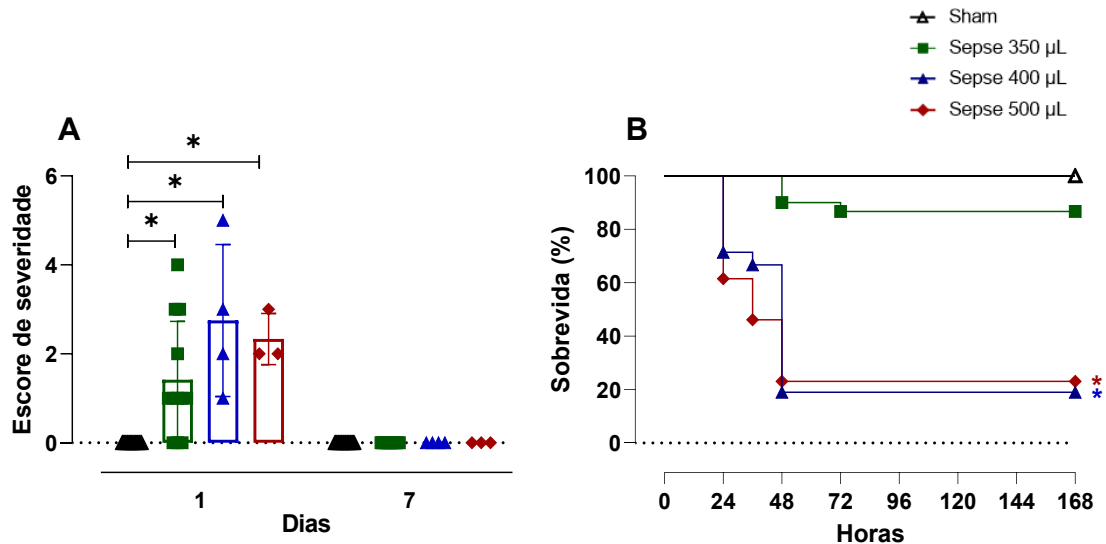
Os animais sobreviventes foram acompanhados por 7 dias após a indução do modelo de sepse *Cecal Slurry* e foi aferida a massa corporal (A) e a temperatura (C); Sham (n=12); 350  $\mu$ L (n=12-15); 400  $\mu$ L (n=4); 500  $\mu$ L (n=3). No painel B, foi aferida a temperatura dos animais por 6 horas consecutivas após a indução da sepse; Sham (n=25); 350  $\mu$ L (n=12); 400  $\mu$ L (n=21); 500  $\mu$ L (n=13). Os resultados representam a média  $\pm$  DP. \*p < 0,05 em relação ao grupo sham (ANOVA de duas vias).

É possível ver diferença significativa na pontuação do escore de todos os grupos sépticos em 24 horas em relação ao sham. Em 7 dias, os animais já haviam se recuperado, observando-se o escore 0 em todos os grupos (Figura 2A). Como esperado, o grupo de animais que recebeu 350  $\mu$ L de CS foi o que obteve um menor escore e conseqüentemente menor mortalidade.

Como a dose de 350  $\mu$ L de conteúdo cecal foi a que causou menor mortalidade (Figura 2B), mas ainda assim, os animais exibiram sinais de sepse, esta foi a dose escolhida para seguir com as demais análises. Foram então avaliados parâmetros

cardiovasculares como frequência cardíaca, pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS) e pressão arterial diastólica (PAD).

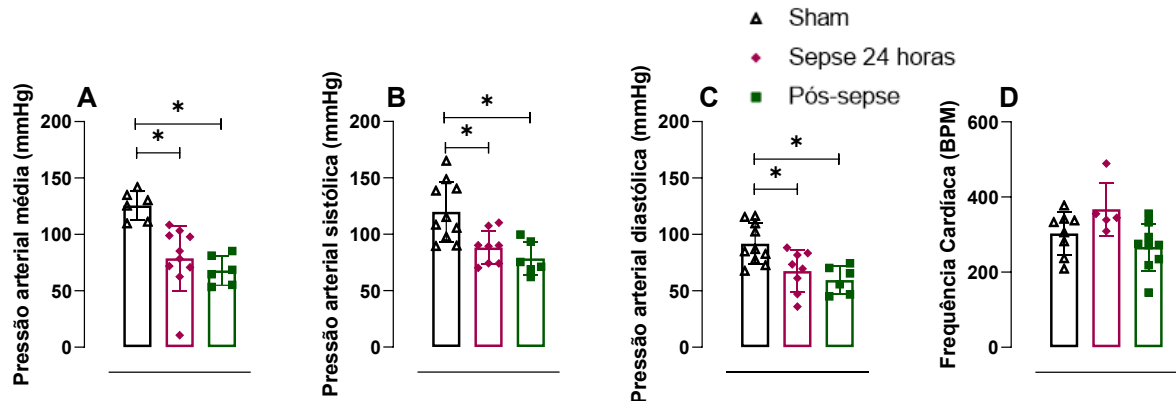
Figura 2 – Escore de severidade séptica e curva de sobrevida.



O escore de severidade séptica foi determinado em 24 horas e 7 dias, e parâmetros como letargia, piloereção, tremor, exsudato periorbital, estresse respiratório e diarreia foram avaliados. Sham (n=12); sepse 350 µL (n=12); sepse 400 µL (n=4); sepse 500 µL (n=3) (A). Os animais foram submetidos a indução do modelo de sepse Cecal Slurry e a sobrevida foi avaliada por 7 dias nos animais sobreviventes. Sham (n=30); sepse 350 µL (n=30); sepse 400 µL (n=21); sepse 500 µL (n=13). \*p < 0,05 (Mantel-Cox) (B). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. \*p < 0,05 (ANOVA de uma via, Tukey post hoc).

Os animais sépticos exibiram uma diminuição significativa na PAM (Figura 3A), PAS (Figura 3B), PAD (Figura 3C), tanto em 24 horas como em 7 dias, em relação ao grupo sham. Entretanto, não houve diferença significativa na frequência cardíaca (Figura 3D).

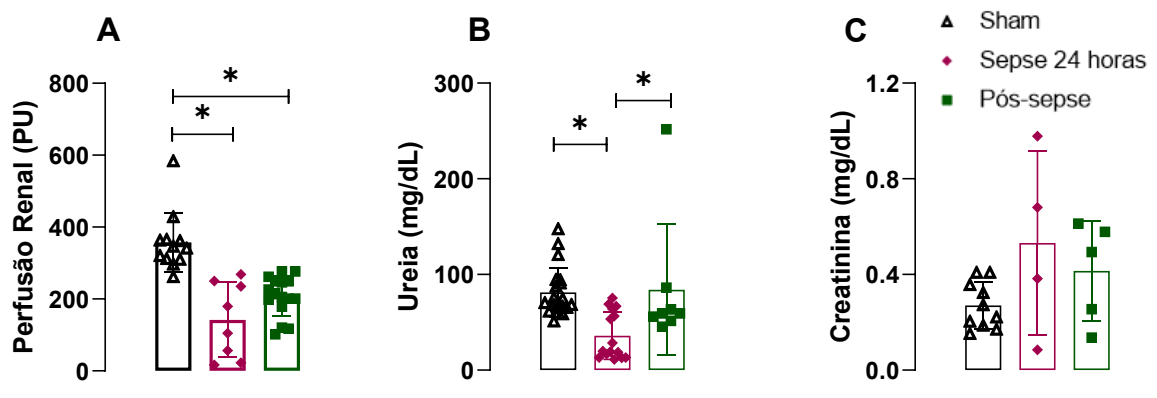
Figura 3 – Alterações cardiovasculares observadas na sepse e no pós-sepse.



Vinte e quatro horas e 7 dias após a indução da sepse, os animais foram anestesiados e após a canulação da artéria carótida foram obtidos os resultados pelo sistema de aquisição de dados PowerLab. Sham (n= 6 - 10); Sepse 24 horas (n= 5 - 8); Pós-sepse (n= 6 - 9). Os resultados representam a média ± DP. \*p < 0,05 (ANOVA de uma via).

É possível observar uma diferença significativa no fluxo sanguíneo renal (4A) dos animais sépticos e sobreviventes em relação ao sham. Na ureia (4B) há uma diferença significativa no grupo séptico, em relação ao grupo sham e também em relação aos sobreviventes. Na creatinina (4C) não foi possível observar diferença significativa entre os grupos.

Figura 4 - Parâmetros renais.

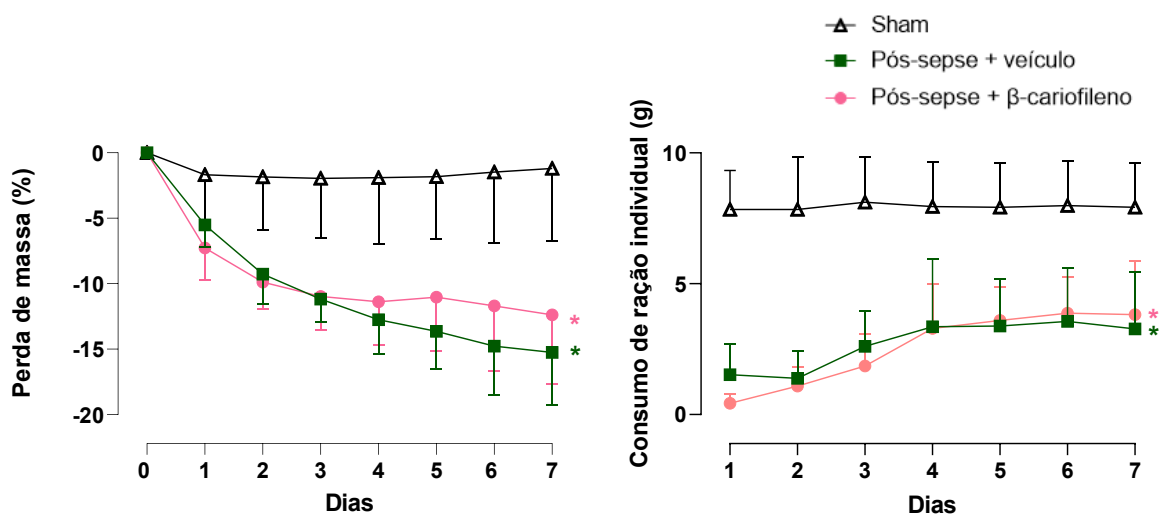


Vinte e quatro horas e sete dias após a indução da sepse e tratamento com  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.), avaliação dos níveis plasmáticos de ureia (B) e creatinina (C). Sham (n= 10-20); Sepse 24 horas (n=4-15); Pós-sepse + veículo (n=6-8). Sete dias após a indução da sepse e tratamento com  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.) avaliação da perfusão renal (A). Sham (n=12); Sepse 24 horas (n=8); Pós-sepse + veículo (n=16). Os resultados representam a média ± DP. \*p < 0,05 (ANOVA de duas vias).

## 5.2 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM B-CARIOFILENO EM ANIMAIS SOBREVIVENTES À SEPSE

Os animais sépticos exibiram redução da massa corporal (Figura 5A) e do consumo de ração (Figura 5B) quando comparados ao grupo sham. O tratamento dos animais sépticos com o agonista CB<sub>2</sub>,  $\beta$ -cariofileno, não causou alterações significativas na perda de peso ou no consumo de ração quando comparado ao grupo séptico que recebeu apenas veículo.

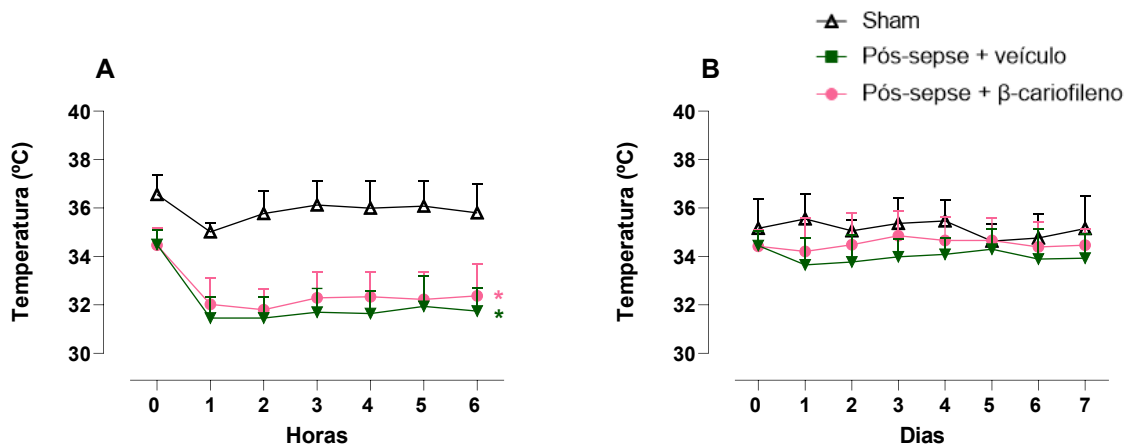
Figura 5 – Efeitos do  $\beta$ -cariofileno na perda de massa corporal e no consumo de ração na sepse e no pós-sepse.



Os animais sobreviventes foram acompanhados e tratados com  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o) por 7 dias após a indução da sepse e/ou animais sham. Sham (n=12); Pós-sepse+ veículo (n=12); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n=17); foi aferida diariamente a quantidade de ração de cada caixa e dividida pela quantidade de animais. Sham (n=6); Pós-sepse + veículo (n=6); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n=7). \*p < 0,05 (ANOVA de duas vias).

Tanto os animais sobreviventes à sepse que receberam veículo ou  $\beta$ -cariofileno demonstraram uma diminuição significativa na temperatura nas 6 primeiras horas (Figura 6A) após a indução da sepse. Após 7 dias (Figura 6B) a temperatura normalizou em todos os grupos.

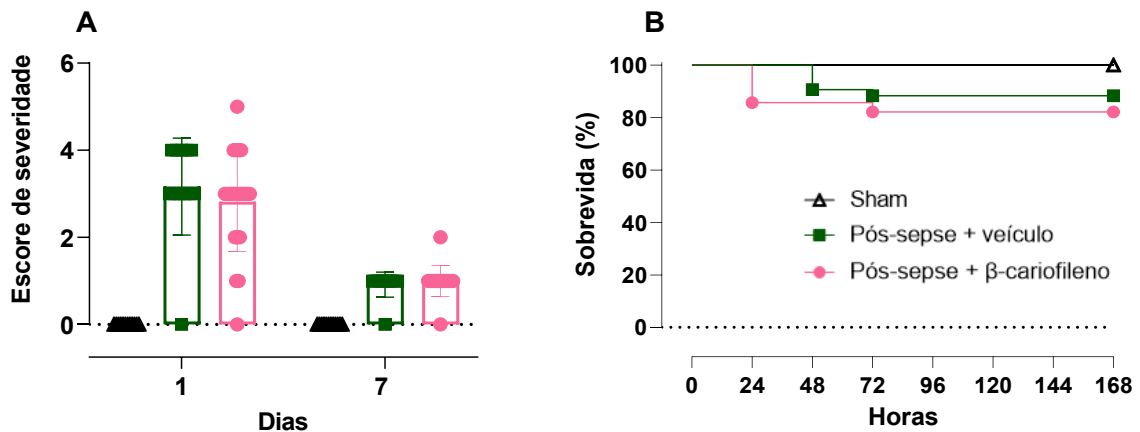
Figura 6 – Efeitos do  $\beta$ -cariofileno na temperatura na sepse e no pós-sepse.



Temperatura dos animais obtida por via retal por 6 horas consecutivas e 7 dias após a indução da sepse e tratamento com  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o). Sham (n=12); Pós-sepse + veículo (n= 12-13); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n= 17-20). \*p < 0,05 (ANOVA de duas vias).

O tratamento dos animais sépticos com  $\beta$ -cariofileno não foi capaz de alterar o escore de gravidade séptica (Figura 7A) ou a sobrevivência dos animais (Figura 7B).

Figura 7 – Avaliação da severidade séptica por escore e sobrevivência.



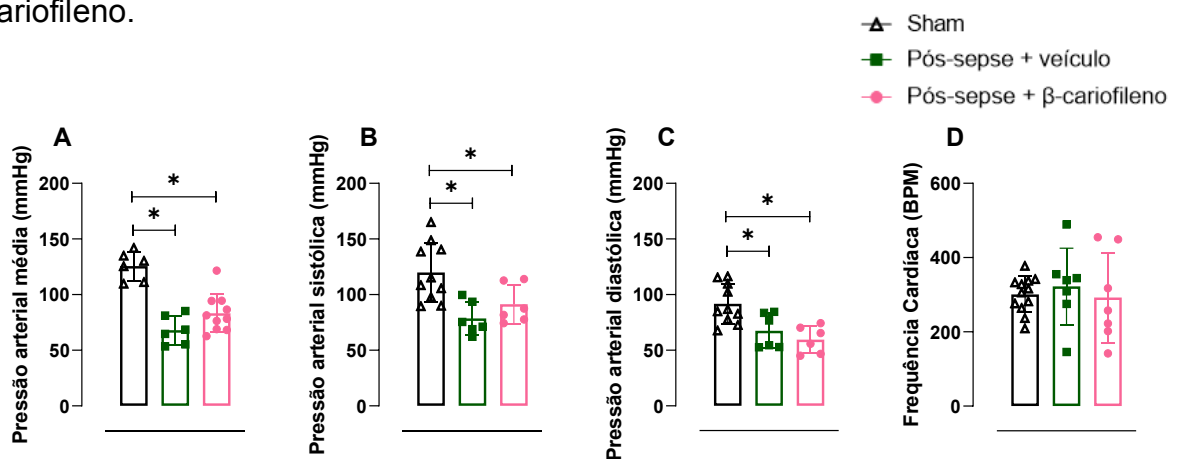
Foram avaliados parâmetros como letargia, piloereção, tremor, exsudato periorbital, estresse respiratório e diarreia 1 e 7 dias após a indução da sepse e tratamento com  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o) (A). Sham (n=12); Pós-sepse + veículo (n=12); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n=20). Avaliação dos efeitos do agonista CB<sub>2</sub>,  $\beta$ -cariofileno, na sobrevivência 7 dias após a indução da sepse (B). Sham (n=12); Pós-sepse + veículo (n=47), Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n=28). Os resultados representam a média  $\pm$  DP. \*p < 0,05 (ANOVA de duas vias).

### 5.3 EFEITO DO B-CARIOFILENO NOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E RENAIIS

A sepse e o choque séptico são caracterizados pela instalação de uma série de eventos cardiovasculares deletérios, comprometendo níveis macro e micro circulatórios. A incapacidade de manter a pressão arterial durante a sepse é consequência de uma contratilidade vascular inadequada. Desta forma, a capacidade contrátil promovida pela ativação dos receptores biológicos foi avaliada *in vivo*.

Assim, nota-se que em 24 horas e em 7 dias após a indução da sepse, os animais apresentaram uma importante hipotensão (Figuras 8A – C), evidenciando, portanto, características comuns da sepse. O tratamento com o agonista CB<sub>2</sub> não alterou nem os níveis pressóricos dos animais submetidos ao CS (Figuras 8A – C), nem a frequência cardíaca (Figura 8D).

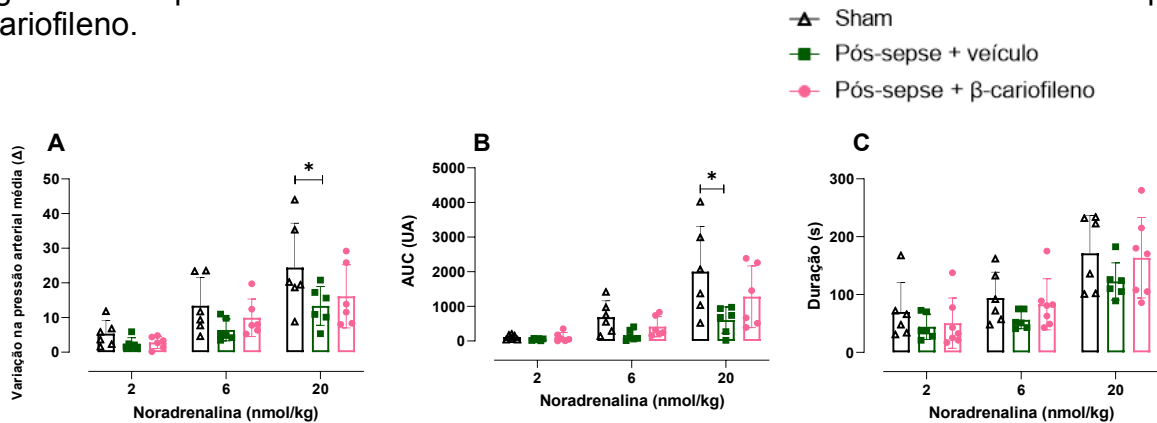
Figura 8 – Alterações cardiovasculares no pós-sepse em animais tratados com  $\beta$ -cariofileno.



Sete dias de tratamento com Veículo ou  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.) os animais foram canulados para a obtenção dos resultados do painel A, B, C e D. Sham (n= 6-12); Pós-sepse + veículo (n=6); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n= 7 - 10). (ANOVA de duas vias).

Foi avaliada a resposta ao agente vasoconstritor noradrenalina *in vivo* e, de acordo com as curvas obtidas, não houve diferença entre os grupos experimentais na duração da resposta ao vasoconstritor (Figura 9C). Porém, ao se analisar a área sob a curva da resposta ao vasoconstritor noradrenalina (Figura 9B) e a reatividade vascular em relação à variação da PAM (delta) (Figura 9A), foi possível observar que os animais sépticos têm a resposta prejudicada em relação ao sham.

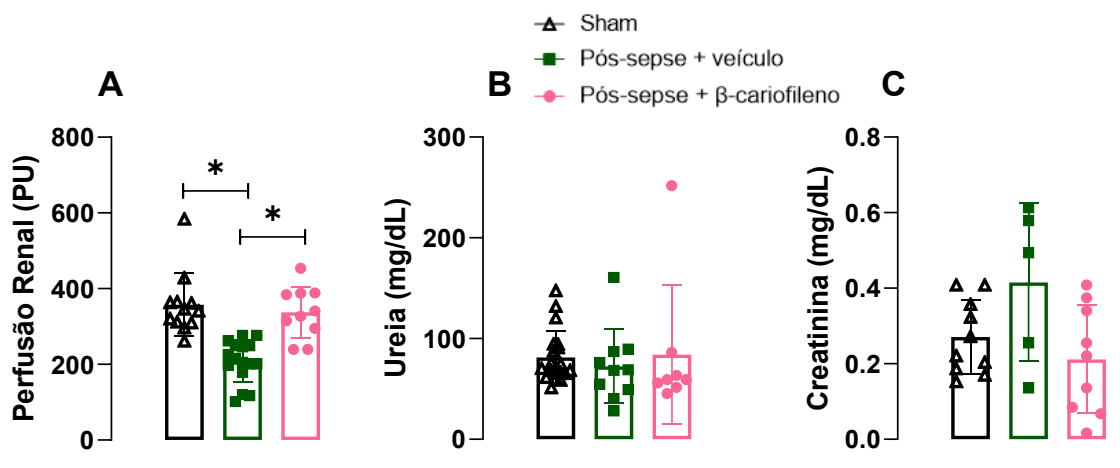
Figura 9 – Responsividade à noradrenalina em animais sobreviventes tratados com  $\beta$ -cariofileno.



Sete dias de tratamento com veículo ou  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.). Doses crescentes de noradrenalina foram administradas i.v. e curvas do tipo dose-resposta foram construídas para a obtenção da variação da pressão arterial média (PAM; A), área sob a curva (AUC; B) e duração da resposta em segundos (s; C). Sham (n= 6); Pós-sepse + veículo (n= 6); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n= 7). Os resultados representam a média  $\pm$  DP. \*p < 0,05 (ANOVA de duas vias).

Foi possível observar que os animais sépticos apresentam redução do fluxo sanguíneo renal (Figura 10A) em relação ao controle. O tratamento com  $\beta$ -cariofileno não mostrou diferença significativa quando comparado com animais sham ou sépticos que receberam veículo. E não houve alterações significativas nos níveis plasmáticos de ureia e creatinina (Figuras 10B-C).

Figura 10 – Parâmetros renais em animais sobreviventes tratados com  $\beta$ -cariofileno.



Sete dias após a indução da sepse e tratamento com  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.), avaliação dos níveis plasmáticos de ureia (B) e creatinina (C). Sham (n= 10); Pós-sepse + veículo (n= 6 - 7); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n= 9 - 10). Sete dias após a indução da sepse e tratamento com  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.) avaliação da perfusão renal (A). Sham (n=12); Pós-sepse + veículo (n=16); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n=10). Os resultados representam a média  $\pm$  DP. \*p < 0,05 (ANOVA de duas vias).

Foi possível observar através dos testes feitos a partir da urina dos animais, que os animais sépticos apresentam reação positiva para urobilinogênio ao comparar com animais sham. Os animais sépticos exibiram ausência de ácido ascórbico em relação ao controle e ao tratamento com  $\beta$ -cariofileno, embora ainda dentro do valor de referência.

Tabela 1 - Teste rápido em urina.

Grupos	Sham	Pós-sepse + veículo	Pós-sepse + $\beta$ -cariofileno
Bilirrubina	2	3	2
Urobilinogênio	0	1	0
Cetonas	0	0	0
Ácido Ascórbico	2	0	2
Glicose	0	0	0
Proteína	1	2	2
Sangue	0	2	1
pH	5	5	6
Nitrito	1	1	1
Leucócitos	1	1	1
Densidade	4	3	4

Valor mínimo-máximo

Bilirrubina	0-3
Urobilinogênio	0-4
Cetonas	0-4
Ácido Ascórbico	0-2
Glicose	0-5
Proteína	0-4
Sangue	0-7
pH	5-9
Nitrito	0-2
Leucócitos	0-3
Densidade	0-6

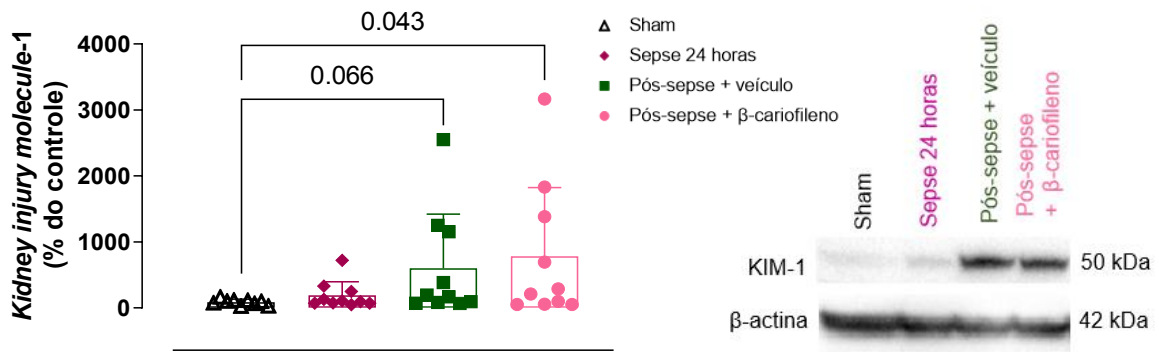
Sete dias após a indução da sepse e tratamento com  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.), teste rápido realizado a partir da urina dos animais. Sham (n= 10); Pós-sepse + veículo (n= 7); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n= 7). Resultados representam a mediana.

#### 5.4 EXPRESSÃO DA MOLÉCULA DE LESÃO RENAL – 1 EM ANIMAIS SÉPTICOS E SOBREVIVENTES À SEPSE TRATADOS COM B-CARIOFILENO

Ao se avaliar a molécula de lesão renal – 1, KIM-1, (do inglês, *kidney injury molecule 1*) podemos observar que há o aumento significativo no grupo pós-sepse + veículo em relação ao grupo sham e sepse 24 h. Entretanto, o tratamento dos animais com o  $\beta$ -cariofileno não alterou a expressão desta proteína.

Figura 11 – Expressão da molécula de lesão renal -1 (KIM-1).



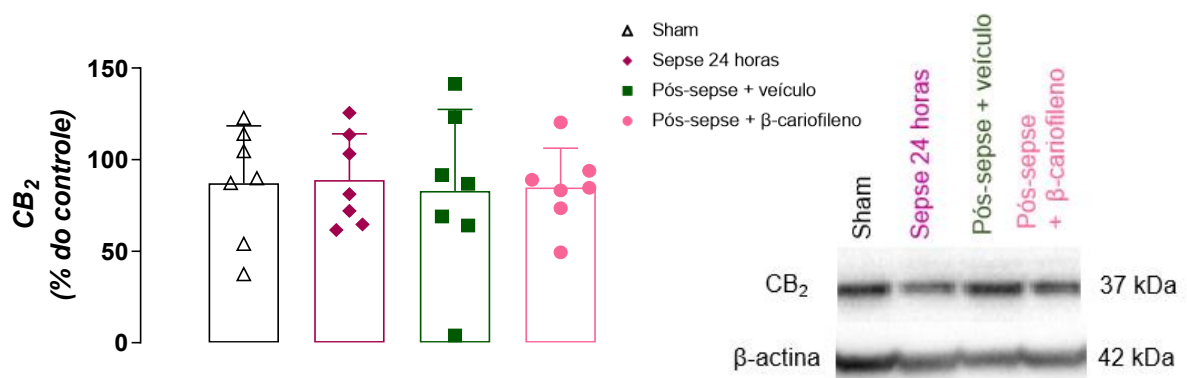


Após 24 horas da indução da sepse e 7 dias de tratamento com veículo ou  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.) foram coletados os rins dos animais e posteriormente submetidos ao ensaio de *Western blotting*. Sham (n= 9); Sepse 24 horas (n=10) Pós-sepse + veículo (n=10); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n=10). Os resultados representam a média  $\pm$  DP. \*p < 0,05 (ANOVA de uma via).

## 5.5 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTORES CB<sub>2</sub> NOS RINS DE ANIMAIS SÉPTICOS

Através da técnica de *Western blotting*, observamos que a expressão de receptores CB<sub>2</sub> não foi alterada nos rins dos animais que passaram pelo processo de sepse, tanto aguda quanto pós-sepse, quando comparado aos animais sham. O tratamento com  $\beta$ -cariofileno também não alterou a expressão destes receptores nos animais 7 dias após a indução da sepse.

Figura 12 – Expressão de receptores CB<sub>2</sub>.



Após 24 horas da indução da sepse e 7 dias de tratamento com veículo ou  $\beta$ -cariofileno (25 mg/kg, v.o.) foram coletados os rins dos animais e posteriormente submetidos ao ensaio de *Western blotting*. Sham (n= 7); Sepse 24 horas (n=7) Pós-sepse + veículo (n=7); Pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno (n=7). Os resultados representam a média  $\pm$  DP. \*p < 0,05 (ANOVA de uma via).

## 6 DISCUSSÃO

Existem poucos dados que descrevam as consequências a longo prazo da sepse e como otimizar a saúde pós-sepse. As taxas de mortalidade de sobreviventes à sepse permanecem altas: dependendo da gravidade da sepse, a taxa de mortalidade pós-alta em um ano varia entre 7-43%, e a taxa de mortalidade em cinco anos após sepse grave é de 82% (SLIKKE, et al., 2020). Metade das mortes após sepse são causadas por infecções recorrentes e eventos cardiovasculares (WANG, et al., 2014). A mortalidade a longo prazo é frequentemente devida à chamada “síndrome pós-sepse” (SPS): um fenômeno definido como uma síndrome física, médica, cognitiva e consistente. A SPS aumenta o risco de readmissão por infecções e a incidência de deficiência cognitiva, problemas de saúde mental, insuficiência renal e acontecimentos cardiovasculares, em comparação com doentes hospitalizados sem sepse (SLIKKE, et al., 2020). Os sobreviventes da sepse têm um risco aumentado de doenças cardiovasculares e renais fatais, incluindo acidente vascular cerebral, infarto do miocárdio, insuficiência cardíaca, arritmia ventricular e doença renal crônica (OU, et al., 2016 & DEVARAJAN, et al., 2015).

Neste cenário, nos propusemos a estudar sobre a sepse aguda e os efeitos do  $\beta$ -cariofileno nas alterações decorrente da sepse em sobreviventes.

Para atingir nossos objetivos, iniciamos com a padronização do modelo de sepse experimental *cecal slurry* em camundongos machos, desenvolvido por STARR e colaboradores (2014). Diferentes dosagens foram testadas, 500  $\mu$ L, 400  $\mu$ L e 350  $\mu$ L, para a obtenção da dosagem que melhor reproduzisse os danos que a sepse costuma causar em pacientes na clínica.

Pode-se observar que houve uma queda significativa de temperatura durante essas 6 horas nos grupos de 500  $\mu$ L e 400  $\mu$ L em relação ao controle. Logo, a temperatura foi aferida por 7 dias, e é possível observar que no 7º dia os animais haviam recuperado a temperatura normal. Segundo Fonseca (2017) a sepse frequentemente está associada a alterações na temperatura corporal, que podem incluir febre ou hipotermia. A resposta termo regulatória é influenciada pela gravidade da inflamação e pela temperatura ambiente. Em situações mais críticas de sepse, é comum observar a ocorrência natural de hipotermia, afetando cerca de 10% dos pacientes hospitalizados. A massa corporal desses animais foi avaliada também por 7 dias, e todos os grupos tiveram redução significativa em relação ao controle. Pacientes que apresentam a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS),

seja de origem séptica ou não, frequentemente vivenciam um aumento no metabolismo, que tem como objetivo fornecer substratos calóricos e proteicos necessários para os mecanismos imunológicos de defesa e reparação de tecidos (JUNIOR, et al., 1998). Uma consequência desse estado metabólico elevado é a considerável perda de massa muscular magra no corpo, que ocorre de maneira desproporcional em relação ao período de jejum, resultando em um balanço nitrogenado acentuadamente negativo (CAMPOS, et al., 1996).

Um escore clínico observado acima de 3 foi classificado como o desenvolvimento de sepse grave, ao passo que uma pontuação  $\leq 3$  indicou o desenvolvimento de sepse moderada (ALVES, et al., 2022). Observou-se que apenas o grupo de 400  $\mu\text{L}$  apresentou sepse grave, os grupos de 500 e 350  $\mu\text{L}$  obtiveram sepse moderada. Logo, observou-se na curva de sobrevida, uma maior mortalidade nos grupos de 400 e 500  $\mu\text{L}$  em relação ao grupo controle e também ao grupo de 350  $\mu\text{L}$  o que corrobora com os dados discutidos acima.

Uma vez que a sobrevida dos demais grupos foi extremamente baixa, para a realização das demais análises, foi escolhido o volume de 350  $\mu\text{L}$ . O segundo passo foi avaliar se a administração desse volume de pasta cecal reproduzia os danos que ocorrem na clínica.

Nesse estudo, podemos observar que os animais sépticos e animais que sobreviveram à sepse obtiveram valores de PAM, PAS e PAD reduzidos em relação ao controle, com base em dados do grupo (FERNANDES, et al., 2021) que relatam que na condição séptica, a disfunção cardiovascular é caracterizada por hipotensão que necessita de terapia vasopressora e está relacionada a uma redução na sobrevida. Essa disfunção está presente em pelo menos 66% dos pacientes com sepse e é considerada um fator prognóstico desfavorável (OSTERBUR, et al., 2014).

Como citado anteriormente, os animais sépticos têm uma maior perda de massa e menor consumo de ração em relação ao sham, e o tratamento com o  $\beta$ -cariofileno não alterou significativamente esses parâmetros. Também pode-se observar que o  $\beta$ -cariofileno não alterou a temperatura durante as 6 horas após a indução da sepse e nem durante os 7 dias que esses animais foram acompanhados. Parâmetros como escore de severidade séptica e curva de sobrevida também não demonstraram alterações com o tratamento com  $\beta$ -cariofileno.

Foi possível observar que há diferença significativa na PAM, na PAS e PAD dos animais sépticos em relação aos animais sham, o que confirma, mais uma vez, que o

modelo reproduz uma das características da sepse que é a hipotensão. Na clínica, na tentativa de aumentar a pressão arterial de pacientes em choque séptico, além da reposição volêmica, comumente são administrados agentes vasopressores. No presente trabalho foi também avaliada a resposta pressórica para a noradrenalina e, conforme os resultados, os animais sobreviventes à sepse apresentaram uma resposta reduzida quando comparado com o grupo sham. Entretanto, não há diferença na resposta ao vasoconstritor noradrenalina entre os animais sépticos que receberam veículo e os que foram tratados com  $\beta$ -cariofileno.

Nossos dados mostraram uma queda significativa na perfusão cortical renal dos animais sépticos 24 horas após a sepse, sendo que esta redução permaneceu por pelo menos 7 dias. Estes dados corroboram trabalhos prévios que mostram redução da perfusão renal na sepse e no pós-sepse. ALVES (2019) mostrou a redução do fluxo sanguíneo renal em ratos, 24 horas após a indução da sepse pelo modelo de ligadura e perfuração cecal. E a diminuição do FSR em animais 96 horas após a indução da sepse por *E. Coli* (LANGENBERG, et al., 2007). O tratamento dos animais sépticos com o  $\beta$ -cariofileno aumentou o fluxo sanguíneo renal, sendo os valores praticamente iguais aos dos animais sham. Portanto, nossos resultados mostram que o  $\beta$ -cariofileno melhora a perfusão renal dos animais sépticos. Corroborando estes dados, um estudo que utilizou o agonista de receptores CB<sub>2</sub>, SMM-295 mostrou que a ativação dos receptores CB<sub>2</sub> está envolvida no aumento da perfusão renal. Este aumento da perfusão renal foi atribuído a um efeito vascular direto, uma vez que o SMM-295 gerou um aumento significativo nos diâmetros luminiais das células de arteríolas aferentes pré-constritas com noradrenalina (PRESSLY, et al., 2019).

Podemos observar que 24 horas após a indução da sepse, a ureia se encontra diminuída nos animais sépticos em relação aos animais sham. Acreditamos que seja devido ao menor consumo de ração diária desses animais, uma vez que a relação proteína/energia alimentar tem consequências potencialmente importantes no controle do funcionamento do ciclo da ureia, dietas ricas em energia tendem a inibir a função desse ciclo (OLIVA, et al., 2019). Nossos dados que avaliam o consumo de ração confirmam esta hipótese, já que o consumo é muito baixo nas primeiras horas após a sepse, e aumenta ao longo dos 7 dias. E os valores de ureia, também são restabelecidos 7 dias após. Continuando nos marcadores de função renal, não observamos aumento na creatinina dos animais sépticos em relação aos animais sham, muito provavelmente pelo baixo n amostral do grupo sepse.

Observamos presença de urobilinogênio na urina dos animais do grupo pós-sepse + veículo, essa presença não se manifesta nos grupos sham e pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno. O urobilinogênio é derivado da degradação da bilirrubina, sendo eliminado pelos rins. Além disso, está correlacionado a distúrbios hepáticos, e também a condições hemolíticas (STRASINGER, et al., 2009). Sua presença mostra que há uma possível disfunção hepática nos animais sobreviventes à sepse e essa condição melhora após o tratamento com  $\beta$ -cariofileno. Também observamos que os animais sépticos não apresentaram ácido ascórbico na urina. A ausência de ácido ascórbico nas amostras dos animais sépticos pode ser um indicativo de baixa ingestão do mesmo, o que corrobora com os achados referentes ao baixo consumo de ração.

A molécula de lesão renal 1, KIM-1, é uma glicoproteína transmembrana do tipo 1, expressa em baixas concentrações nos rins em estado normal, não sendo detectada fisiologicamente no tecido renal ou na urina. A KIM-1 é tanto um marcador de lesão de células epiteliais tubulares, cuja concentração apresenta-se elevada quando há lesão renal, quanto um marcador de proliferação e regeneração celular no túbulo proximal. Além disso, a KIM-1 parece estar envolvida tanto no processo de dano renal quanto no processo de recuperação pós lesão (FOREST; COLLE, 2018). Vale destacar que os biomarcadores mais eficazes frequentemente desempenham papéis cruciais na regulação dos danos, podendo alguns deles evoluir para alvos terapêuticos significativos.

Ainda há poucos estudos que avaliam a KIM-1 nos rins de animais sépticos e não encontramos estudos que tenham avaliado a KIM-1 em animais sobreviventes à sepse. Entretanto, alguns estudos mostraram que os níveis urinários de KIM-1 estão elevados na LRA induzida por cisplatina e podem ajudar no diagnóstico diferencial de lesões de células epiteliais proximais (revisado em TANASE, et al., 2019). Embora sejam necessários mais estudos para explorar os mecanismos por trás da nefrotoxicidade da cisplatina e o papel da KIM-1 neste cenário, este novo biomarcador mostra-se promissor no diagnóstico precoce e no prognóstico da LRA. YU e colaboradores (2022), mostraram que o nível urinário de KIM-1 aumentou dramaticamente após realizarem queimaduras em ratos e foi aumentando ainda mais no período de sepse por queimadura.

Podemos observar que na fase aguda da sepse, não há aumento de KIM-1 em relação ao sham, entretanto, notamos um aumento no grupo pós-sepse + veículo e no grupo pós-sepse +  $\beta$ -cariofileno. Nossos dados sugerem que: 1) os níveis de KIM-

1 podem estar mais elevados nos grupos pós-sepse devido a uma fase de regeneração celular, o que corrobora com a melhora do fluxo sanguíneo renal nos animais tratados; ou 2) este marcador de dano renal aparece apenas tardiamente no pós-sepse, e o tratamento com agonista CB<sub>2</sub> não reduz este marcador, pelo menos quando avaliado por 7 dias. Desta forma, são necessários mais estudos para sanar questionamentos que surgiram após os resultados que encontramos, como por exemplo, em que momento após a sepse inicia o aumento da KIM-1? Até quantos dias após a sepse, os sobreviventes mostram altos níveis de KIM-1? Seria um sinal de lesão ou de tentativa de regeneração, uma vez que, como citado anteriormente, pacientes sobreviventes à sepse desenvolvem doenças renais com mais recorrência? Assim, a KIM-1 mostra-se um alvo de grande interesse para estudos IRA-AS, uma vez que seus mecanismos não estão bem elucidados.

Ao contrário dos receptores CB<sub>1</sub>, ainda há controvérsia quanto à expressão dos receptores CB<sub>2</sub> nos rins (TAM, 2016). Embora tenha sido mostrado que há redução da expressão de receptores CB<sub>2</sub> em biópsias de rins de pacientes com nefropatia diabética (BARUTTA et al., 2011), nossos dados mostram que não há alteração na expressão dos receptores CB<sub>2</sub> nos rins dos animais submetidos ou não à sepse. Dados prévios do nosso grupo mostraram redução da expressão destes receptores nos pulmões e em células do lavado broncoalveolar de animais sépticos (SOUZA, et al., 2023), sugerindo que a regulação da expressão destes receptores difere entre os órgãos na sepse. Apesar da falta de informações sobre a expressão e ativação dos receptores canabinoides CB<sub>2</sub> na sepse humana, é amplamente reconhecido que sua ativação desempenha um papel crucial na polarização e migração de leucócitos, regulando assim a resposta inflamatória excessiva (KURIHARA, et al., 2006). Idealmente, teria sido interessante realizar a técnica de RT-PCR para avaliar a expressão do mRNA do receptor CB<sub>2</sub> para que tivéssemos um melhor entendimento sobre a relação da expressão gênica e da densidade de receptores CB<sub>2</sub>. Portanto, mais estudos são necessários para o melhor entendimento do papel dos receptores CB<sub>2</sub> na sepse e no pós-sepse.

## 7 CONCLUSÃO

Os nossos dados sugerem que o modelo experimental Cecal Slurry mimetiza os danos necessários para que possamos estudar a sepse e o pós-sepse pois causou alterações importantes que são observadas em humanos, como hipotensão, redução da reatividade vascular e redução do fluxo sanguíneo renal. Este modelo se mostrou bastante interessante por ser menos invasivo, de baixo custo e fácil reprodução. Além disso, nossos resultados sugerem que os receptores CB<sub>2</sub> podem estar envolvidos nas alterações de fluxo sanguíneo renal decorrentes da sepse e do pós-sepse, uma vez que o tratamento dos animais sépticos com β-cariofileno restabeleceu o fluxo renal dos animais. E finalmente, o biomarcador KIM-1 aparece aumentado 7 dias após a indução do modelo e pode ser um alvo de grande interesse para estudos futuros relacionados ao dano renal associado ao pós-sepse.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, G. F., AIMARETTI, E., EINAUDI, G., MASTROCOLA, R., DE OLIVEIRA, J. G., COLLOTTA, D., PORCHIETTO, E., ARAGNO, M., CIFANI, C., SORDI, R., THIEMERMANN, C., FERNANDES, D., & COLLINO, M. (2022). Pharmacological Inhibition of FAK-Pyk2 Pathway Protects Against Organ Damage and Prolongs the Survival of Septic Mice. **Frontiers in Immunology**, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.837180>
- ALVES, G.F. Efeitos da inibição da fosfodiesterase-4 sobre parâmetros cardiovasculares e inflamatórios durante a sepse. Dissertação de mestrado. **Repositório UFSC**. 2019. 124 p.
- ASSREUY, J. Nitric Oxide and Cardiovascular Dysfunction in Sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 165–173, 2006.
- BARUTTA F, PISCITELLI F, PINACH S, BRUNO G, GAMBINO R, RASTALDI MP, SALVIDIO G, DI MARZO V, CAVALLO PERIN P, GRUDEN G. Protective role of cannabinoid receptor type 2 in a mouse model of diabetic nephropathy. *Diabetes*. 2011 Sep;60(9):2386-96. <http://doi.org/10.2337/db10-1809>.
- BARUTTA F, BRUNO G, MASTROCOLA R, BELLINI S, GRUDEN G. The role of cannabinoid signaling in acute and chronic kidney diseases. *Kidney Int*. 2018 Aug;94(2):252-258. <http://doi.org/10.1016/j.kint.2018.01.024>
- CAMPOS, A.B., SILVA, L.F.G., MARINHO, L.E., CHAVES, C.R., MARTINS, M.C.R., QUEIROZ, D.A.F., LEITÃO-FILHO, P.R., VASCONCELOS, P.R.L. Efeitos da L-Alanil-Glutamina sobre a Concentração *in vivo* de Metabólitos da Via Glicolítica durante Isquemia-Reperfusão de Intestino Delgado em Ratos Wistar. **Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva**, v. 15, n.2, p.63 – 66, 1996.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, 2002.
- DEVARAJAN P., JEFFERIES J.L. Progression of chronic kidney disease after acute kidney injury. **Prog Pediatr Cardiol** 2016;41:33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ppedcard.2015.12.006>
- DHOPESHWARKAR A, MACKIE K. CB2 Cannabinoid receptors as a therapeutic target-what does the future hold? **Mol Pharmacol**. 86(4):430-7, 2014.
- DI MARZO V, BIFULCO M, DE PETROCELLIS L. The endocannabinoid system and its therapeutic exploitation. *Nat Rev Drug Discov*. 2004 Sep;3(9):771-84. doi: <https://doi.org/10.1038/nrd1495>
- DI MARZO V. New approaches and challenges to targeting the endocannabinoid system. **Nat Rev Drug Discov**. 17(9):623-639, 2018.
- FERNANDES D., PACHECO L. K., SORDI R., SCHESCHOWITSCH K., RAMOS G.C., ASSREUY J., Angiotensin II receptor type 1 blockade improves



hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock, **European Journal of Pharmacology**, Volume 897, 2021, 173953, ISSN 0014-2999, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.173953>.

FLEISCHMANN, C. et al. (2016) 'Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations', **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, 193(3), pp. 259–272. <https://doi.org/10.1164/rccm.201504-0781OC>

FORD ZK, REKER AN, CHEN S, KADAKIA F, BUNK A AND DAVIDSON S Cannabinoid Receptor 1 Expression in Human Dorsal Root Ganglia and CB13-Induced Bidirectional Modulation of Sensory Neuron Activity. **Front. Pain Res.** 2021. 2:721332. <http://doi.org/10.3389/fpain.2021.721332>

GERTSCH, J. et al. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.0803601105>

HORVÁTH, B. et al. B-Caryophyllene Ameliorates Cisplatin-Induced Nephrotoxicity in a Cannabinoid 2 Receptor-Dependent Manner. **Free Radical Biology and Medicine**, [S. l.], v. 52, n. 8, p. 1325–1333, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.014>

JANIAK P, POIRIER B, BIDOUCARD JP, CADROUVELE C, PIERRE F, GOURAUD L, BARBOSA I, DEDIO J, MAFFRAND JP, LE FUR G, O'CONNOR S, HERBERT JM. Blockade of cannabinoid CB1 receptors improves renal function, metabolic profile, and increased survival of obese Zucker rats. *Kidney Int.* 2007 Dec;72(11):1345-57. <http://doi.org/10.1038/sj.ki.5002540>.

JENKIN KA, O'KEEFE L, SIMCOCKS AC, BRIFFA JF, MATHAI ML, MCAINCH AJ, HRYCIW DH. Renal effects of chronic pharmacological manipulation of CB2 receptors in rats with diet-induced obesity. **Br J Pharmacol.** 173(7):1128-42, 2016.

KARLSSON, S. et al. Incidence, treatment, and outcome of severe sepsis in ICU-treated adults in Finland: the Finnsepsis study. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 3, p. 435-443, 2007.

KING, E. G. et al. Pathophysiologic mechanisms in septic shock. **Laboratory Investigation**, v. 94, n. 1, p. 4–12, 2014.

KRUK-SLOMKA, M., BANASZKIEWICZ, I., & BIALA, G. (2017). The Impact of CB2 Receptor Ligands on the MK-801-Induced Hyperactivity in Mice. **Neurotoxicity Research**, 31(3), 410–420. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9702-4>

KURIHARA, R., TOHYAMA, Y., MATSUSAKA, S., NARUSE, H., KINOSHITA, E., TSUJIOKA, T., KATSUMATA, Y., YAMAMURA, H., 2006. Effects of peripheral cannabinoid receptor ligands on motility and polarization in neutrophil-like HL60 cells and human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 281, 12908–12918. <https://doi.org/10.1074/jbc>.

LIU H, YANG G, TANG Y, CAO D, QI T, QI Y, FAN G. Physicochemical characterization and pharmacokinetics evaluation of  $\beta$ -caryophyllene/ $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex. *Int J Pharm*. 2013 Jun 25;450(1-2):304-10.

<http://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.04.013>

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

[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30322-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30322-5)

MAYR, F. B., YENDE, S., & ANGUS, D. C. (2014). Epidemiology of severe sepsis. In **Virulence** (Vol. 5, Issue 1, pp. 4–11). Taylor and Francis Inc.

<https://doi.org/10.4161/viru.27372>

MORALES P, HERNANDEZ-FOLGADO L, GOYA P, JAGEROVIC N. Cannabinoid receptor 2 (CB2) agonists and antagonists: a patent update. **Expert Opin Ther Pat**. 26(7):843-56, 2016.

MUNRO S, THOMAS KL, ABU-SHAAR M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**. 365(6441):61-5, 1993.

OU S.M., CHU H., CHAO P.W., et al. Long-term mortality and major adverse cardiovascular events in sepsis survivors. a nationwide population-based study. **Am J Respir Crit Care Med** 2016;194:209–17.

<https://doi.org/10.1164/rccm.201510-2023OC>

PEERAPORN RATANA, S., MANRIQUE-CABALLERO, C. L., GÓMEZ, H., & KELLUM, J. A. (2019). Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. In **Kidney International** (Vol. 96, Issue 5, pp. 1083–1099). Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/j.kint.2019.05.026>

PERTWEE RG. Pharmacological actions of cannabinoids. *Handb Exp Pharmacol*. (168):1-51, 2005.

POLL, T. V. D. et al. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 7, p. 407-420, 2017.

PONS, S. et al. Immune Consequences of Endothelial Cells' Activation and Dysfunction During Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 2, p. 401–413, 2020.

PRESSLY J. D., SONI H., AND PARK F., Activation of the cannabinoid receptor 2 increases renal perfusion. **Physiol Genomics**. 2019 Mar 1; 51(3): 90–96.

RITTIRSCH, D., HUBER-LANG, M. S., FLIERL, M. A., & WARD, P. A. (2009). Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, 4(1), 31–36.

<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.214>

ROSS RA, BROCKIE HC & PERTWEE RG. Inhibition of nitric oxide production in RAW264.7 macrophages by cannabinoids and palmitoylethanolamine. **Eur J**

**Pharmacol** 401, 121–130, 2000.

RUDD, K.E. et al. (2020) 'Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study', **The Lancet**, 395(10219), pp. 200–211. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32989-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32989-7)

SACCOL, A. Z.; REINHARD, N. Tecnologias de informação móveis, sem fio e ubíquas: definições, estado-da-arte e oportunidades de pesquisa. **RAC: Revista de Administração Contemporânea**, v.11, n.4, 2007.

SINGER, M. (2014) 'The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure', **Virulence**, 5(1), pp. 66–72. doi:10.4161/viru.26907.

SLIKKE E.C., AN A.Y., HANCOCK R.E.W., BOUMA H.R. Exploring the pathophysiology of post-sepsis syndrome to identify therapeutic opportunities. **EBioMedicine**. 2020 Nov;61:103044. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103044> Epub 2020 Oct 8. PMID: 33039713; PMCID: PMC7544455.

SORDI, R., O.; *et al.* Pneumonia-induced sepsis in mice: Temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 94, n. 2, p. 144–155, 2013.

SORDI, R., O.; *et al.* Dual role of lipoxin A4 in pneumosepsis pathogenesis. **International Immunopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 283–292, 2013.

SOUZA C.F., BORGES L. B., OLIVEIRA F.R.M.B., SILVA P.C.S., PATRICIO D.O., ROSALES T.O., SOUZA N.F., SPILLER F., MANSUR D.S., ASSREUY J., SORDI R., Cannabinoid CB2 receptor agonist reduces local and systemic inflammation associated with pneumonia-induced sepsis in mice, **European Journal of Pharmacology**, Volume 959, 2023, 176092, ISSN 0014-2999, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.176092>.

STRASINGER, S. K.; LORENZO, M. S. D. *Urinálise e Fluídos Corporais*. 5. ed. São Paulo: Editorial Premier, 2009. 328 p.

STARR ME, STEELE AM, SAITO M, HACKER BJ, EVERS BM, et al. (2014) A New Cecal Slurry Preparation Protocol with Improved Long-Term Reproducibility for Animal Models of Sepsis. **PLOS ONE** 9(12): e115705. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115705>

STEFFENS, S., & PACHER, P. (2012). Targeting cannabinoid receptor CB2 in cardiovascular disorders: Promises and controversies. In **British Journal of Pharmacology** (Vol. 167, Issue 2, pp. 313–323). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02042.x>

TAM, J. "The emerging role of the endocannabinoid system in the pathogenesis and treatment of kidney diseases" **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, vol. 27, no. 3, 2016, pp. 267-276. <https://doi.org/10.1515/jbcpp-2015-0055>

TANASE DM, GOSAV EM, RADU S, COSTEA CF, CIOCOIU M, CARAULEANU A, LACATUSU CM, MARANDUCA MA, FLORIA M, REZUS C. The Predictive Role of the Biomarker Kidney Molecule-1 (KIM-1) in Acute Kidney Injury (AKI) Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Int J Mol Sci*. 2019 Oct 22;20(20):5238.

<http://doi.org/10.3390/ijms20205238>

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TSCHOP, J. et al. The Cannabinoid Receptor 2 Is Critical for the Host Response to Sepsis. *The Journal Of Immunology*, 183 (1):499-505, 2009.

VINCENT, J. et al. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP study\*. *Critical Care Medicine*, v. 34, n. 2, p.344-353, 2006.

VINCENT, J. et al. International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. *Jama*, v. 302, n. 21, p. 2323-2329, 2009.

WANG H.E., SZYCHOWSKI J.M., GRIFFIN R., SAFFORD M.M., SHAPIRO N.I., HOWARD G. Long-term mortality after community-acquired sepsis: a longitudinal population-based cohort study. *BMJ Open* 2014;4:e004283.

<https://doi.org/10.1136/bmjopen2013-004283>

WANG, P., ZHOU, M., RANA, M. W., BA, Z. F., & CHAUDRY, I. H. Differential alterations in microvascular perfusion in various organs during early and late sepsis. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 1992. 263(1), G38–G43. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1992.263.1.g38>

YE L, CAO Z, WANG W, ZHOU N. New Insights in Cannabinoid Receptor Structure and Signaling. *Curr Mol Pharmacol*. 2019;12(3):239-248. doi:

<https://doi.org/10.2174/1874467212666190215112036> PMID: 30767756; PMCID: PMC6864585.

YOUSSEF, D. A.; EL-FAYOUMI, H. M.; MAHMOUD, M. F. Beta-caryophyllene alleviates diet-induced neurobehavioral changes in rats: The role of CB2 and PPAR- $\gamma$  receptors. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, [S. l.], v. 110, n. October 2018, p. 145–154, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.039>

YU, Y., LI, X., HAN, S. *et al.* miR-181c, a potential mediator for acute kidney injury in a burn rat model with following sepsis. *Eur J Trauma Emerg Surg* 49, 1035–1045 (2023). <https://doi.org/10.1007/s00068-022-02124-5>

ZINGARELLI, B., COOPERSMITH, C. M., DRECHSLER, S., EFRON, P., MARSHALL, J. C., MOLDAWER, L., WIERSINGA, W. J., XIAO, X., OSUCHOWSKI, M. F., & THIEMERMANN, C. (2019). Part I: Minimum Quality Threshold in Preclinical Sepsis Studies (MQTiPSS) for Study Design and Humane Modeling Endpoints. In *Shock* (Vol. 51, Issue 1, pp. 10–22). Lippincott Williams and Wilkins.

<https://doi.org/10.1097/SHK.0000000000001243>