

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Geisson Marcos Nardi

**ÓXIDO NÍTRICO PROVENIENTE DA ISOFORMA NEURONAL  
DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS-1): SERÁ A  
NOS-1 O CÉREBRO POR TRÁS DA HIPORESPONSIVIDADE  
VASCULAR DURANTE A SEPSE?**

**Florianópolis  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

Geisson Marcos Nardi

**ÓXIDO NÍTRICO PROVENIENTE DA ISOFORMA NEURONAL  
DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS-1): SERÁ A  
NOS-1 O CÉREBRO POR TRÁS DA HIPORESPONSIVIDADE  
VASCULAR DURANTE A SEPSIS?**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

**Florianópolis  
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

N223o Nardi, Geisson Marcos  
Óxido nítrico proveniente da isoforma neuronal da enzima  
óxido nítrico sintase (NOS-1) [tese] : será a NOS-1 o cérebro  
por trás da hiporesponsividade vascular durante a sepse? /  
Geisson Marcos Nardi ; orientador, Jamil Assreuy. -  
Florianópolis, SC, 2011.  
125 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências


1. Farmacologia. 2. Sepse. 3. Sistema nervoso central.  
4. Pressão arterial. 5. Sistema cardiovascular. 6. Óxido  
Nítrico. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.  
III. Título.

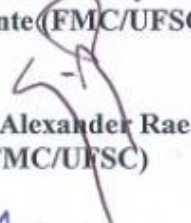
CDU 615

**Óxido nítrico proveniente da isoforma neuronal da enzima  
óxido nítrico sintase (NOS-1): Será a NOS-1 o cérebro por  
trás da hiporesponsividade vascular durante a sepse?**


**GEISSON MARCOS NARDI**

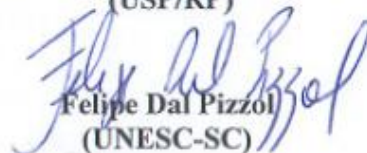
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos  
membros da Banca Examinadora, composta pelos  
Professores Doutores:

  
**Jamil Assreuy**  
Presidente (FMC/UFSC)

  
**Giles Alexander Rae**  
(FMC/UFSC)

  
**André Báfica**  
(FMC/UFSC)

  
**Lusiane Maria Bendack**  
(USP/RP)

  
**Felipe Dal Pizzol**  
(UNESC-SC)

**Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez**  
Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia/UFSC

**Florianópolis, 18 de abril de 2011.**

**A DEUS POR ME TRAZER  
PACIÊNCIA E ÂNIMO NOS  
MOMENTOS MAIS DIFÍCEIS.**

**A MINHA MÃE SELDA  
NARDI E MINHA AVÓ ADELINA  
NARDI PELO SACRIFÍCIO DEDICADO  
À MINHA FORMAÇÃO E AOS SEUS  
ENSINAMENTOS QUE NORTEIAM  
ATÉ HOJE MINHAS CONDUTAS,**

**AOS MEUS AMORES  
VIVIANE KOEPP NARDI E MARCOS  
KOEPP NARDI, SEM VOCÊS NADA  
DISSO SERIA POSSÍVEL,**

**A MINHA  
FAMÍLIA...**



## AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Jamil Assreuy que aceitou realizar a minha orientação de um modo não convencional e acima de tudo pelo seu empenho em fazer da ciência algo tão trivial.

A Universidade do Oeste de Santa Catarina pela concessão da bolsa de capacitação docente, especialmente ao Magnífico Reitor Aristides Cimadon, Pró-reitores, Luis Carlos Lückman, Joviles Trevisol, Nelson Machado, Dagmar Mena Barreto, além de todos os coordenadores de curso e funcionários que direta ou indiretamente me auxiliaram nesta empreitada.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia, em especial à Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro-do-Valle e ao Prof. Dr. João Batista Calixto por disponibilizar equipamentos e reagentes importantes para a realização deste trabalho.

Ao amigo e colega Prof. Dr. Daniel Fernandes, pelas discussões e sugestões que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Aos colegas que me auxiliaram nos experimentos Adriane Madeira, Simone Kobe, Dib Ammar, Karin Scheschowitsch, Glauber Wagner, Ana Maria Favero, Regina de Sordi.

Aos demais colegas do Laboratório do Óxido Nítrico, ou da família NOLab: Ângela Cristina Bet, Edir Rezende, Letícia Pacheco, Bettina T. Heckert, Silvia dal Bó, Daniela Seco, Gustavo Ramos, Lucas Sousa, Veronica Horewicz, Elisabete Regina Bóf vocês tornaram vida muito mais agradável em Florianópolis.

AO CNPq, Capes, Universidade Federal de Santa Catarina e Fapesc pelo auxílio financeiro que propiciaram a realização deste trabalho.

Aos funcionários do departamento de farmacologia.

A todos, Muito Obrigado.





**O que você quer ser quando crescer?**  
*Cientista!*



*“Eu acho que eu posso te ajudar a pensar como um Doutor.”*

*Jamil Assreuy – Novembro de 2005.*



## RESUMO

Vários estudos demonstraram que produção excessiva de NO, relacionada com o aumento da expressão da NOS-2, contribui para as alterações hemodinâmicas observadas durante a sepse. No entanto, alguns trabalhos mostram que a inibição desta enzima não reverte a hipotensão, a hiporeatividade a agentes vasoconstritores e não influencia na sobrevivência de animais sépticos. Portanto, resolvemos investigar o papel do NO proveniente da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase (NOS-1) sobre a reatividade a agentes vasoconstritores, e sua influência na progressão da sepse bem como o efeito de agonistas opióides sobre parâmetros comumente avaliados nesta doença. Nossos resultados demonstram que animais sépticos são sensíveis a analgesia com drogas opióides em modelo de dor por estímulo térmico e, além disso, os analgésicos opióides reduziram a hipotensão e hiporeatividade vascular induzidas pela sepse. Estes compostos quando administrados em doses baixas não interferiram na sobrevivência de animais sépticos, enquanto que doses maiores aumentam a mortalidade. A inibição da NOS-1 melhorou a reatividade vascular a agonistas  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgicos, tanto na fase inicial quanto na fase tardia da sepse. Tanto a NOS-1 quanto a guanilato ciclase solúvel tem sua expressão aumentada nas camadas de músculo liso vascular da aorta e do leito vascular mesentérico, e nos momentos mais tardios, ambas as enzimas interagem fisicamente no leito vascular mesentérico. Parte do mecanismo de reversão da hiporeatividade a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos, após inibição da NOS-1, se deve a redução na formação de GMPc. No entanto, a reversão da hiporeatividade vascular a agentes  $\beta$ -adrenérgicos durante a sepse pelo 7-NI parece ser independente do aumento nos níveis de cAMP. As alterações promovidas pelo NO proveniente da NOS-1 no início da sepse estão relacionadas com a instalação da hipotensão, disfunção vascular, alterações na glicemia e nos níveis de leucócitos sanguíneos. A redução do conteúdo enzimático da NOS-1, reduz ou abole as alterações patológicas induzidas pela sepse. Nosso trabalho demonstra que o NO proveniente da NOS-1 participa ativamente na disfunção vascular promovida pela sepse.

Palavras Chave: Sepse, óxido nítrico sintase neuronal, pressão arterial, reatividade pressórica, óxido nítrico



## ABSTRACT

Several studies have shown that overproduction of NO, associated with the increased expression of NOS-2, contributes to the hemodynamic changes observed in sepsis. However, inhibition of NOS-2 does not reverse hypotension, hyporesponsiveness to vasoconstrictor and does not influence the survival of septic animals. Therefore, we decided to investigate the role of NO derived from the neuronal isoform of nitric oxide synthase (NOS-1) on the reactivity to vasopressor agents and the progression of sepsis as well as the effect of opioid agonists on parameters commonly evaluated in this pathology. Our results demonstrate that septic animals are sensitive to analgesia with opioids in the pain model of thermal stimulation. In addition, opioids reduced the hypotension and vascular hyporesponsiveness induced by sepsis. When administered in low doses these drugs did not affect the survival of septic animals, whereas higher doses increased the mortality. The inhibition of NOS-1 improved the vascular reactivity to  $\alpha$  and  $\beta$ -adrenergic agonists, both in early and late phase of sepsis. The expression of NOS-1 and soluble guanylate cyclase was increased in vascular smooth muscle layers of aorta and mesenteric vascular bed and both enzymes interact physically in the mesenteric vascular bed in late phase of sepsis. At least part of the mechanism of the recovery in the responsiveness to adrenergic agonists, after inhibition of NOS-1, is due to the reduced formation of cGMP. The changes promoted by NOS-1-derived NO in early sepsis are associated with the onset of hypotension, vascular dysfunction and changes in blood glucose levels and blood leukocytes. The reduction in the NOS-1 enzyme content reduces or abolishes the pathological changes induced by sepsis. Our work demonstrates that NOS-1-derived NO plays a role in promoting vascular dysfunction in sepsis.





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Efeito dos opióides sobre a latência no teste de retirada da cauda dos animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO)..... 62
- Figura 2 Efeito do fentanil (painel A), tramadol (painel B) e codeína (painel C) sobre a sobrevivência de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO)..... 63
- Figura 3 Efeito dos opióides sobre pressão arterial média (PAM) de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO)..... 64
- Figura 4 Efeito dos opióides sobre pressão arterial média (PAM) e a reatividade pressórica de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO) 65
- Figura 5 Efeito do L-NAME, 7-NI e aminoguanidina sobre a pressão arterial média (PAM) de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)..... 67
- Figura 6 Efeito do 7-NI sobre a resposta vasoconstritora promovida pela fenilefrina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO)..... 70
- Figura 7 Registros típicos da pressão arterial média mostrando o efeito do 7-NI sobre a resposta vasoconstritora promovida pela fenilefrina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO) 71
- Figura 8 Efeito da aminoguanidina sobre a resposta vasoconstritora promovida pela fenilefrina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO)..... 72
- Figura 9 Efeito do 7-NI sobre a vasoconstrição induzida pela infusão de noradrenalina em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO) 74
- Figura 10 Avaliação dos níveis dos níveis protéicos da óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) e guanilato ciclase (GC) em

	aorta e leito vascular mesentérico de animais sépticos (CLP).....	76
Figura 11	Imuno-histoquímica para óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) e guanilato ciclase (GC) na aorta e artéria mesentérica de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).....	77
Figura 12	Representa a interação proteína:proteína entre a óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) e guanilato ciclase (GC), no leito vascular mesentérico de animais submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).....	78
Figura 13	Efeito do 7-NI sobre o acúmulo de (GMPc) em tecidos de animais submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).....	80
Figura 14	Efeito do 7-NI na presença de fenilefrina sobre a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) pela aorta de animais submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).....	81
Figura 15	Efeito do 7-NI sobre a variação da pressão arterial média (A e B) e frequência cardíaca (C e D) promovida pela isoprenalina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO).....	83
Figura 16	Figura 16. Efeito do 7-NI sobre a variação da pressão arterial média (A e B) e frequência cardíaca (C e D) promovida pelo fenoterol em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO).....	84
Figura 17	Efeito da estimulação com isoprenalina e forskolin sobre a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) pela aorta de animais submetidos a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).....	85
Figura 18	Efeito do 7-NI na sobrevivência de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	87
Figura 19	Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco	

(CLP).....	88
Figura 20 Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre a reatividade pressórica em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	89
Figura 21 Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre a variação da pressão arterial média (Painel A) e frequência cardíaca (Painel B) promovida pela administração de isoprenalina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	90
Figura 22 Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre a glicemia e em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).....	91

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Patologias que são induzidas pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica.....	30
Tabela 2	Efeito do 7-NI na produção de NOx em linhagem de células do músculo liso vascular A7r5 e macrófagos J774 estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$ .....	68
Tabela 3	Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre o nível de leucócitos sanguíneos em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).....	92

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1	Traçado típico da pressão arterial de um experimento mostrando a hipotensão e a redução na resposta vasoconstritora da fenilefrina após o procedimento de ligação e perfuração cecal (CLP).....	37
Esquema 2	Mecanismos dependentes NO e GMPc que contribuem para a perda da contratilidade vascular durante a sepse.....	39
Esquema 3	Mecanismo hipotético da influência da interação da NOS-1 com a PSD-95 na sinalização do sistema nervoso central.....	43
Esquema 4	Protocolo experimental para a avaliação da latência de retirada da cauda em ratos sépticos.....	54
Esquema 5	Protocolo experimental para a avaliação da reatividade pressórica ratos sépticos.....	56
Esquema 6	Possível decurso temporal das mudanças vasculares dependentes de NO durante a sepse ou choque séptico.....	107
Esquema 7	Via de sinalização adrenérgica.....	109
Esquema 8	Possíveis fontes de NO contribuindo para hipotensão e hiporeatividade vascular durante a sepse.....	113

## LISTA DE ABREVIATURAS

7-NI	7-Nitroindazol.
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico.
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina.
ANOVA	Análise de variância.
ATP	Adenosina trifosfato.
CaM	Calmodulina.
CLP	Ligadura e perfuração do ceco.
cNOS	Óxido nítrico sintases constitutivas.
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono.
COX-2	Ciclooxygenase-2.
DAG	Diacilglicerol.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium.
e.v.	Via endovenosa.
FAD	Dinucleotídeo de flavina e adenina.
FMN	Mononucleotídeo de flavina.
FMO	Falência múltipla de órgãos.
FO	Falso-operados.
GC	Guanilato ciclase.
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina.
IBMX	Isobutilmetilxantina.
IFN- $\gamma$	Interferon gama.
IL-13	Interleucina-13.
IL-6	Interleucina-6.
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato.
K <sub>ATP</sub>	Canais de potássio sensíveis ao ATP.
L-NAME	NG-nitro-L-arginine methyl Ester.
L-NIO	N-5-(1-iminoetil)-L-ornitina.
L-NMA	NG-metil-L-arginina.
LNMA	L-N <sup>G</sup> -monometilarginina.
LPS	Lipolissacarídeo bacteriano.
MMP	Metaloproteinase-9.
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro.
Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> /ATPase	Bomba de sódio potássio dependente de ATP.
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato.
NANC	Fibras não-adrenérgicas e não-colinérgicas.
NANC	Não adrenérgico não colinérgico.
NK	Células <i>natural killer</i> .

NO <sup>•</sup>	Radical nitroxil.
NOS	Óxido nítrico sintases.
NOS-1	Óxido nítrico sintase neuronal.
NOS-2	Óxido nítrico sintase induzida.
NOS-3	Óxido nítrico sintase endotelial.
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one.
ONOO <sup>-</sup>	Radical peroxinitrito.
PAM	Pressão arterial média.
PARP	Poli(ADP-ribose) polimerase
PDZ	<i>PDZ é a combinação das primeiras letras de três proteínas — Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA), e Zonula occludens-1 protein (zo-1).</i>
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub> .
PKA	Proteína quinase A.
PKG	Proteína quinase G.
s.c.	Via sub-cutânea.
TEA	Tetraetilamônio.
THB <sub>4</sub>	Tetraidrobiopterina.
TLR4	Receptores do tipo <i>toll</i> 4.
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral.
UTI	Unidade de tratamento intensivo.





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	29
1.1. SEPSE .....	29
1.2. MODELOS DE ESTUDO DA SEPSE .....	31
1.3. ANALGESIA DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL. ....	32
1.4. FENTANIL, TRAMADOL E CODEÍNA.....	34
1.5. ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS DURANTE A SEPSE.....	35
1.6. PAPEL DO NO NAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS DURANTE A SEPSE.....	37
1.7. A ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (NOS-1) .....	40
1.8. NOS-1 E A REGULAÇÃO VASCULAR DO FLUXO SANGUÍNEO	42
1.9. NOS-1 NA SEPSE E ENDOTOXEMIA.....	44
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	47
2.1. JUSTIFICATIVA.....	47
2.2. HIPÓTESE.....	47
2.3. OBJETIVO GERAL .....	47
2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	47
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
3.1. ANIMAIS.....	49
3.2. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS ANIMAIS .....	49
3.2.1. Modelo de septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP) .....	49
3.2.2. Avaliação da Pressão Arterial Média e frequência Cardíaca ...	50
3.2.3. Preparo das amostras para imunoeletroforese e coimunoprecipitação.....	50
3.2.4. Imunoeletroforese das enzimas óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) e guanilato ciclase solúvel ( <i>western blot</i> ).....	51
3.2.5. Estudo da interação proteína:proteína através da técnica de coimunoprecipitação .....	51
3.2.6. Imuno-histoquímica para oxido nítrico sintase neuronal e guanilato ciclase solúvel.....	52
3.2.7. Dosagem dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc. ....	52
3.2.8. Cultura celular.....	53
3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS I.....	54
3.3.1. Avaliação do efeito dos analgésicos opióides sobre a latência no teste de retirada da calda ( <i>tail-flick</i> ) em animais sépticos.....	54
3.3.2. Avaliação do efeito dos analgésicos opióides sobre a sobre a reatividade pressórica e pressão arterial média de animais sépticos .....	54
3.3.3. Avaliação dos opióides sobre a sobrevivência dos animais submetidos à cirurgia de CLP.....	55

3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS II .....	55
3.4.1. Avaliação do efeito da inibição seletiva e não seletiva das óxido nítrico sintases durante a sepse sobre a PAM.....	55
3.4.2. Estudo do efeito da inibição da NOS-1 e da óxido nítrico sintase induzida (NOS-2) sobre a reatividade pressórica de animais sépticos .....	55
3.4.3. Avaliação do efeito do 7-NI sobre a produção de NOx em células estimuladas com LPS/IFN-gama.....	56
3.4.4. Efeito do 7NI sobre a resposta da vasoconstritora induzida pela infusão de noradrenalina em animais sépticos... ..	57
3.4.5. Determinação dos níveis de GMPc nos tecidos de animais sépticos “in vivo” .....	57
3.4.6. Determinação dos níveis de GMPc em aortas de animais sépticos estimuladas com fenilefrina “ex-vivo”... ..	57
3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS III .....	58
3.5.1. Estudo da reatividade pressórica .....	58
3.5.2. Avaliação dos níveis glicêmicos e de leucócitos sanguíneos totais... ..	58
3.5.3. Determinação da sobrevivência dos animais submetidos à cirurgia de CLP.....	59
3.6. COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	59
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	60
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>61</b>
4.1. PRIMEIRA PARTE – ANALGESIA DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL.....	61
4.2. SEGUNDA PARTE – PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (NOS-1) NAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS INDUZIDAS PELA SEPSE .....	66
4.2.1. Caracterização da inibição não seletiva e seletiva das enzimas, óxido nítrico sintases neuronal (NOS-1) e induzida (NOS-2) sobre a pressão arterial média (PAM) de animais submetidos à CLP .....	66
4.2.2. Caracterização da concentração de 7-NI necessária para inibir a produção de nitrito/nitrato (NOx) em células estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$ . .....	67
4.2.3. Consequências da inibição das enzimas NOS-1 e NOS-2 sobre reatividade pressórica de animais sépticos .....	69
4.2.4. Determinação do conteúdo protéico e localização vascular das enzimas NOS-1 e guanilato ciclase solúvel (sGC) durante a sepse .....	75
4.2.5. Avaliação da inibição da enzima NOS-1 sobre o acúmulo de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) em tecidos de animais sépticos “in vivo” e “in vitro” .....	79

4.2.6. Consequências da inibição da enzima NOS-1 sobre resposta vascular a agonistas beta-adrenérgicos em animais submetidos à CLP .....	82
4.2.7. Efeito da inibição da enzima NOS-1 sobre o acúmulo de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) na aorta de animais sépticos .....	85
4.3. TERCEIRA PARTE – INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO PRÉVIA DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (NOS-1) SOBRE A SEPSE .....	86
4.3.1. Avaliação da Sobrevida.....	86
4.3.2. Avaliação da pressão arterial média (PAM) e reatividade pressórica .....	88
4.3.3. Avaliação da glicemia e do nível total de leucócitos sanguíneos .....	91
5. DISCUSSÃO .....	93
6. CONCLUSÕES .....	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	119



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. SEPSE

O termo sepse era utilizado na Grécia antiga para designar casos onde havia putrefação e associação com doença e morte. Hoje em dia, sepse define uma condição clínica resultante de infecção bacteriana, fúngica, viral ou parasitária e o acesso desses microrganismos à corrente sanguínea (Bone, 1996). A presença de bactérias gram-negativas ou positivas, fungos, vírus ou protozoários nos tecidos ou sangue ativa uma resposta inflamatória, que na, sepse ocorre não apenas no foco infeccioso, mas no organismo como um todo.

Estudos epidemiológicos demonstram que a sepse acomete 750.000 pessoas/ano, sendo responsável pela morte de 250.000 (29%) pessoas só nos Estados Unidos. (Martin e Wheeler, 2009; Castellheim *et al.*, 2009). No Brasil, estudos epidemiológicos de grande abrangência são limitados. Um dos mais importantes, o BASES (do inglês, *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*), foi um estudo multicêntrico observacional realizado em unidades de terapia intensiva (UTI) de cinco hospitais em várias regiões do país. Revelou que existe uma incidência maior de sepse grave e choque séptico do que a observada em outros países. Os dados demonstraram que no Brasil a sepse severa atinge aproximadamente 27% dos pacientes de UTI, com uma taxa de mortalidade em torno de 40%. Este índice sobe para perto de 53% quando diagnosticado o choque séptico. Além disso, o grupo de pacientes que apresenta a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *systemic inflammatory reaction syndrome*) associada à infecção tem uma maior probabilidade de morte (Silva *et al.*, 2004).

A SIRS é o termo utilizado para caracterizar um processo inflamatório sistêmico. Ela não é exclusiva da sepse, também estando presente em uma série de estados patológicos como trauma generalizado, hemorragias e queimaduras causam a SIRS. Somente quando infecção por microrganismos é confirmada a patologia é definida como sepse (Tabela 1).

**Tabela 1. Patologias que são induzidas pela síndrome da resposta inflamatória sistêmica.**

Gênese	Condição	Definição
Ausência de infecção	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica <sup>a</sup> (SIRS <sup>a</sup> )	Temperatura corporal >38° C ou < 36° C.
		Frequência cardíaca > 90 batimentos/min <sup>b</sup> .
		Frequência respiratória > 70 batimentos/min.
		Leucócitos > 12.000 ou < 4.000 mm <sup>3</sup>
Presença de infecção	Sepse	SIRS + infecção suspeita ou confirmada
	Sepse Severa	Sepse + disfunção de pelo menos um órgão, hipotensão e hipoperfusão tecidual.
	Choque Séptico	Sepse + Hipotensão refratária <sup>c</sup> + Anormalidades de perfusão vascular.

<sup>a</sup> Causada por trauma generalizado, hemorragia, queimaduras, isquemia-reperusão.

<sup>b</sup> Sem medicação para o controle da frequência cardíaca.

<sup>c</sup> Ausência de resposta pressórica a agentes vasoconstritores ou administração de fluido.

**Fonte:** Adaptado de Castellheim *et al.*, 2009.

A SIRS é desencadeada pela superativação do sistema imune inato, resultado principalmente da ativação dos receptores do tipo Toll (*Toll-Like receptors; TLR*), que induzem a ativação celular após interação com produtos de origem bacteriana (Dejager *et al.*, 2011). Mais especificamente o receptor do tipo 4 (TLR4) reconhece o lipopolissacarídeo (LPS) de parede celular de bactérias gram-negativas e induz a ativação do fator de transcrição kappa B (NF-κB). A ativação do NFκB induz a formação de vários mediadores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α), interleucina-13 (IL-13), interleucina-6 (IL-6); entre outras. (Arnalich *et al.*, 2000; Song e Kellum, 2005; Nguyen e Smith, 2007). Consequentemente, esta ativação inflamatória inicial leva à síntese e à liberação de mediadores secundários, como enzimas inflamatórias e espécies reativas de oxigênio, que amplificam o processo inflamatório, sendo esta fase

inicial classificada como um estado hiperinflamatório (Dejager *et al.*, 2011).

A ativação inicial de neutrófilos, linfócitos e macrófagos é seguida pela redução de sua atividade, que leva a um estado denominado de hipoinflamação. Os mecanismos precisos que induzem um estado de relativa imunossupressão não são completamente conhecidos, mas a rápida indução de apoptose de linfócitos e células dendríticas, e a liberação de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, tem sido relacionadas com esta fase da sepse. Este estado de hipoinflamação é particularmente perigoso uma vez que aumenta o risco de superinfecção (Hotchkiss *et al.*, 2006; Muenzer *et al.*, 2010).

A sepse não altera somente as vias inflamatórias, mas também promove modificações patológicas no sistema de coagulação. Durante a sepse ocorre a ativação das vias pró-coagulantes e redução dos níveis de anticoagulantes endógenos, como a proteína C ativada e antitrombina, o que favorece a formação de trombos na microvasculatura e o desenvolvimento da coagulação intravascular disseminada (van der Poll e Opal, 2008).

Também são observadas alterações metabólicas, como as mudanças na glicemia. A hiperglicemia está associada a um mau prognóstico, e a utilização de insulina resultou em aumento da sobrevida e prevenção da falência múltipla de órgãos (FMO) (Van den Berghe *et al.*, 2001).

Todas as alterações descritas anteriormente associadas às modificações na hemodinâmica, que serão abordadas mais a frente no texto, levam a FMO. Não restam dúvidas de que este fenômeno reduz a probabilidade de sobrevivência dos pacientes com sepse. O risco aumenta em torno de 20% quando um órgão exibe comprometimento funcional, e quando esta disfunção atinge pelo menos dois órgãos a taxa de mortalidade se eleva a 40% (Wheeler e Bernard, 1999). A partir do reconhecimento patofisiológico da sepse vários modelos experimentais foram desenvolvidos com o objetivo de simular a sepse humana.

## 1.2. MODELOS DE ESTUDO DA SEPSE.

A administração endovenosa de toxinas, como zymosano e LPS ou de bactérias viáveis mostrou-se efetiva em reproduzir uma série de condições da sepse humana, tais como hipotensão, hiporeatividade vascular e o status hiper/hipoinflamatório. No entanto, estes modelos têm limitações, principalmente porque a sinalização via LPS é estritamente dependente da ativação de TLR4 e não reflete toda a complexidade fisiológica da sepse humana, como o intenso, rápido e

transitório aumento de citocinas e ainda, por ser um modelo muito controlado e padronizado (Dejager *et al.*, 2011).

O modelo que mais se aproxima de um quadro de sepse humana é sem dúvida o de agressão ao intestino, com consequente liberação de flora microbiana. Este modelo denominado de ligadura e perfuração do ceco (CLP, do inglês, *cecal ligation and puncture*), e seu variante, o CASP (do inglês, *colon ascendens stent peritonitis*, peritonite causada por cateter no cólon ascendente), se caracterizam pela liberação gradativa do conteúdo bacteriano cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (Wichterman *et al.*, 1980; Benjamim, 2001).

Uma das diferenças marcantes entre os modelos que utilizam LPS comparados aos de agressão intestinal, é que estes últimos induzem um quadro de sepse polimicrobiana, mantém a presença de um foco infeccioso e ainda recriam de maneira muito similar as fases hemodinâmicas, metabólicas, hiper e hipoinflamatórias observadas durante a sepse (Dejager *et al.*, 2011).

As características acima descritas, aliadas à facilidade da execução, tornaram o CLP um dos modelos mais utilizados atualmente para o estudo da sepse. Apesar de reproduzir com maior fidelidade a condição patológica humana, é o modelo que causa mais sofrimento aos animais, pois é um procedimento invasivo, em que há ruptura do ceco com o vazamento do conteúdo cecal para o peritônio (Wichterman *et al.*, 1980). Além disso, dependendo do protocolo experimental, os animais são mantidos na condição de sepse por longos períodos (Muenzer *et al.*, 2010).

Por razões éticas, vários grupos de pesquisa que utilizam o modelo de CLP como ferramenta de estudo da sepse administram analgésicos opióides (Martin *et al.*, 1993; Martin e Sibbald 1994; Fox *et al.*, 1996; Lundblad e Giercksky, 1995). No entanto, nenhum destes trabalhos leva em consideração a possibilidade de interferência destas drogas sobre os parâmetros avaliados.

### 1.3. ANALGESIA DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL.

Analgésicos opióides são associados tradicionalmente com anti-nociceção, este efeito decorrendo principalmente da ativação dos receptores  $\mu$ -opióides no sistema nervoso central e tecidos periféricos (Trescot *et al.*, 2008). Outro efeito bem documentado do estímulo deste receptor é a supressão das respostas imunes inata e adaptativa (Sanders *et al.*, 2009). Vários estudos “*in vitro*” e “*in vivo*” demonstram que estes compostos inibem a atividade das células *natural killer* (Carr *et al.*,



1993), a proliferação de linfócitos T (Tsai *et al.*, 2000), a expressão do receptor de complemento e o *burst* respiratório em neutrófilos (Welters *et al.*, 2000), a quimiotaxia induzida por citocinas (Grimm *et al.*, 1998) e a fagocitose (Menzebach *et al.*, 2004).

Os efeitos sistêmicos da inibição do sistema imune pelos opióides, mais especificamente a morfina, incluem o aumento da mortalidade em vários modelos animais de infecção, inclusive potencializando o efeito do LPS e aumentando a expressão de citocinas inflamatórias como IL-6 e TNF- $\alpha$  (MacFarlane *et al.*, 2000; Asakura *et al.*, 2002; Ocasio *et al.*, 2004; Feng *et al.*, 2006). Camundongos tratados com morfina desenvolvem colônias de bactérias gram-negativas no fígado, pâncreas e cavidade peritoneal e, além disso, são mais suscetíveis a morte por doses sub-letais de LPS (Hilburger *et al.*, 1997). Além disso, Greenelch e colaboradores (2004) demonstraram que a administração de naltrexona, antagonista dos receptores opióides, reduziu os níveis plasmáticos de TNF- $\alpha$  e a mortalidade associada ao modelo de endotoxemia.

Os opióides não promovem apenas alterações na fisiologia normal do sistema imunológico, havendo vários relatos da interferência destes compostos na função cardiovascular. Um dos mecanismos propostos é a modulação direta dos receptores adrenérgicos, principalmente os cardíacos (Molina, 2006). Níveis elevados de  $\beta$ -endorfina foram correlacionados com redução do débito cardíaco (Daly *et al.*, 1987), efeitos estes decorrentes da alteração mediada por opióides das vias simpáticas de controle cardíaco (Feuerstein, 1985). Microinjeções de opióides no núcleo do trato solitário promoveram aumento da pressão arterial e frequência cardíaca (Hassen *et al.*, 1982) e, além disso, foi demonstrado que ocorre a liberação concomitante de peptídeos opióides pelos neurônios noradrenérgicos cardíacos (Thureson-Klein, 1983).

Existem poucos trabalhos que investigam o efeito dos opióides sobre o sistema cardiovascular em situações patológicas. Alguns destes trabalhos demonstraram que a morfina, em doses analgésicas causa um choque hipotensão prolongada, maior necessidade de reposição fluídica e aumento dose-dependente da mortalidade de animais submetidos ao choque hemorrágico (Feuerstein e Siren, 1996; Molina, 2006). O uso de antagonistas opióides confirmou a participação dos receptores opióides no prejuízo hemodinâmico em condições patológicas. A naloxona reduziu a instabilidade hemodinâmica, bem como a hipotensão induzida pelo choque hemorrágico (Salerno *et al.*, 1981). Além disso, a administração de naltrexona reduziu a hipotensão e a bradicardia causada pelo LPS e melhorou a resposta vascular à noradrenalina e à

acetilcolina. Estas observações foram correlacionadas com a redução de TNF- $\alpha$  plasmático e produção de espécies reativas de oxigênio induzidas pela ativação opióide (Lin *et al.*, 2005).

Portanto, a influência dos analgésicos opióides nos modelos de CLP não pode ser desprezada. Sem os devidos controles, esta terapia pode induzir a resultados de interpretação duvidosa, ou que não possam ser reproduzidos por outros laboratórios, principalmente quando os objetivos experimentais forem relacionados com alterações imunológicas e cardiovasculares.

#### 1.4. FENTANIL, TRAMADOL E CODEÍNA.

O fentanil é um potente agonista seletivo dos receptores  $\mu$ -opióides e promove intensa analgesia, sendo cerca de 80 vezes mais potente que a morfina. O fentanil compartilha os mesmos efeitos imunossupressores da morfina. Administrado agudamente em camundongos, reduz a proliferação de linfócitos e a atividade das células *natural killer* (NK). No entanto, após o tratamento crônico/continuado esta propriedade tende a desaparecer. Ao contrário, a administração de fentanil em seres humanos, aumenta a atividade NK e a quantidade de linfócitos circulantes (Karst *et al.*, 1999, Yeager *et al.*, 2002; Martucci *et al.*, 2004).

Embora originalmente descrito como um agonista opióide, o tramadol não compartilha os efeitos imunossupressores da codeína e da morfina (Sacerdote *et al.*, 1997; Yu-Chuan *et al.*, 2001). Este composto apresenta atividade dependente e independente do receptor  $\mu$ -opióide (Ide *et al.*, 2006). É um analgésico com potência 5 a 10 vezes menor que a da morfina, apesar de sua afinidade por receptores de opióides ser 6.000 vezes menor (Raffa *et al.*, 1992; Eggers e Power, 1995). Em decorrência, somente parte da analgesia promovida pelo tramadol é inibida pela naloxona (Dayer *et al.*, 1997). Além disso, o tramadol tem um baixo risco de provocar depressão respiratória e não afeta o trânsito gastrointestinal em ratos submetidos à CLP, ao contrário do fentanil, que causa uma redução significativa na motilidade gastrointestinal (Vickers *et al.*, 1992; Topcu *et al.*, 2006).

Diferente do fentanil, a codeína é considerada um analgésico fraco e não é utilizada nas UTIs. No entanto, como sua potência analgésica é similar a do tramadol e tem fraca afinidade sobre os receptores  $\mu$ -opióides, foi adicionada ao estudo. Uma das características importantes da codeína que a distingue dos dois outros compostos em estudo é sua capacidade de provocar intensa depressão respiratória (Vree *et al.*, 2000).

### 1.5. ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS DURANTE A SEPSE

Do ponto de vista hemodinâmico, dois estágios distintos são observados durante a sepse, uma fase inicial (hiperdinâmica circulatória), onde se observa um aumento do débito cardíaco associado à queda da resistência periférica, e uma segunda fase (hipodinâmica circulatória), caracterizada pela diminuição do desempenho cardíaco com redução do débito cardíaco e hipotensão mais severa. Além disso, nesta segunda fase a resposta vascular à administração de agentes vasoconstritores é reduzida (Clowes, 1966). O modelo de CLP reproduz de maneira muito próxima as alterações circulatórias observadas em humanos (Dejager *et al.*, 2011).

Alterações na pressão arterial média (PAM) são comuns em diversas situações fisiológicas ou patológicas. Mesmo que a PAM seja reduzida a 70 mmHg, o sistema de auto-regulação local mantém a perfusão tecidual a um nível adequado. No entanto, em pacientes sépticos esta regulação encontra-se comprometida, já que a grande maioria apresenta reduções de PAM abaixo do nível de auto-regulação. Se a PAM cai a valores próximos de 60 mmHg a perfusão cardíaca cai a 80% e a renal é a metade da normal (Bellomo e Giantomaso, 2001). A maior causa deste declínio é a redução da resistência vascular periférica, resultado de uma vasodilatação inapropriada dos leitos arterial e venoso, com redução do débito cardíaco e aumento do extravasamento plasmático, comprometendo a perfusão adequada dos órgãos (Sladen e Landry, 2000; Bauer, 2002). Este último fenômeno é potencialmente grave porque, associado a outros fatores, compromete a função do órgão afetado.

A baixa perfusão tecidual está associada a disfunções na microvasculatura, e pacientes com sepse que apresentam melhora da perfusão microvascular nos primeiros dias de hospitalização tem uma maior taxa de sobrevivência. Por outro lado, pacientes que mantêm a disfunção microvascular normalmente vão a óbito (De Backer *et al.*, 2002; Bateman e Walley, 2005).

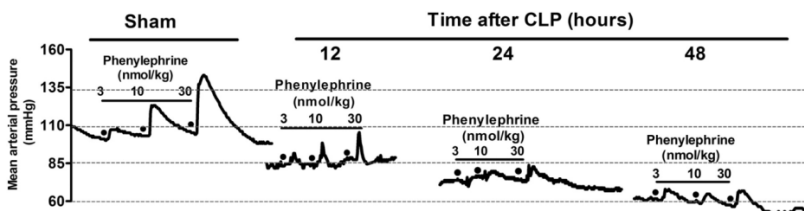
A mais importante alteração na microvasculatura é a redistribuição do fluxo sanguíneo, evento que altera a disponibilidade de oxigênio dos tecidos. No entanto, em estudos clínicos e em animais sépticos observa-se que a tensão de oxigênio é normal e em muitos casos aumentada, nos músculos, intestinos, e bexiga. Isso implica em afirmar que o oxigênio está disponível em nível celular, mas não está sendo utilizado (Singer, 2008).

Segundo os protocolos sugeridos pela Campanha Sobrevivendo à Sepsis (*The Surviving Sepsis Campaign*), quando a PAM cai abaixo de 70 mmHg, com presença de oligúria e saturação venosa central (taxa de dissolução de oxigênio venoso) acima de 70% e pressão venosa central de 12-15 mmHg, faz-se necessário aplicar técnicas de ressuscitação (Dellinger, 2004). A terapia mais indicada neste caso consiste na administração endovenosa de fluido isotônico. No entanto, apesar do aumento considerável da volemia promovido por esta técnica, a PAM em muitos pacientes se mantém abaixo do nível ideal. Nesta fase da sepsis a utilização de terapia vasoconstritora torna-se imperativa. Com o objetivo de elevar a PA e manter a perfusão dos órgãos são administradas catecolaminas como a noradrenalina, a adrenalina, a dopamina e a dobutamina (Dellinger, 2004).

A terapia de volume combinada à de vasoconstritores melhora consideravelmente o fluxo na microcirculação, restabelece a função dos órgãos, e o mais importante, aumenta a taxa de sobrevivência. A aplicação deste protocolo reduz o índice de mortalidade de 46,5 % para 30,5 % (Rivers *et al.*, 2001).

Uma diferença importante entre indivíduos normais e pacientes sépticos, é que nos últimos, estas catecolaminas são administradas em doses relativamente altas e por longos períodos, desta forma, aumentando a probabilidade de promover efeitos colaterais, como induzir isquemia renal e esplâncnica, agravando a hipoperfusão tecidual. Apesar disso, a infusão de noradrenalina na endotoxemia parece reverter a hipotensão e melhorar a circulação sanguínea renal (Bellomo e Giantomaso, 2001). No entanto, com o passar do tempo de infusão, as drogas vasopressoras tendem a reduzir sua capacidade de manter a PAM por um mecanismo ainda pouco compreendido, caracterizando a hiporeatividade progressiva a agentes vasoconstritores.

Do mesmo modo que em humanos, animais submetidos ao procedimento de ligadura e perfuração do ceco (CLP), apresentam os sinais clássicos de hipotensão progressiva e reatividade vascular reduzida, como a observada nos pacientes sépticos (Fernandes *et al.*, 2009). (Esquema 1)



**Esquema 1.** Traçado típico da pressão arterial de um experimento mostrando a hipotensão e a redução na resposta vasoconstritora da fenilefrina após o procedimento de ligação e perfuração cecal (CLP).

**Fonte:** Fernandes, *et al.*, 2009.

## 1.6. PAPEL DO NO NAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS DURANTE A SEPSE

Vários estudos demonstram que a produção excessiva de NO durante a sepse contribui para a incapacidade dos leitos vasculares em responder a estímulos contráteis ou vasodilatadores (vasoplegia). O NO promove ainda disfunção cardíaca, dano hepático e aumento da permeabilidade vascular, tanto em humanos como em animais (Titheradge, 1999).

O NO é sintetizado por um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Três genes codificam três isoformas distintas denominadas de NOS: a óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1), a endotelial (NOS-3) e a induzível (NOS-2). NOS-1 e NOS-3 são consideradas enzimas constitutivas (cNOS), mas a NOS-2 é induzida por diversos estímulos, principalmente inflamatórios. Todas as três enzimas utilizam a L-arginina, oxigênio e NADPH, como substratos, e tetrahydrobiopterina (THB<sub>4</sub>), o dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD) e o mononucleotídeo de flavina (FMN) como cofatores, além da calmodulina, considerada um ativador alostérico da NOS (para uma revisão mais detalhada ver Alderton *et al.*, 2001).

Existem diferenças importantes entre as cNOS e a NOS-2. A atividade das cNOS é estimulada pelo influxo de cálcio extracelular, enquanto que os níveis intracelulares basais de cálcio são suficientes para a atividade da NOS-2. As cNOS apresentam uma atividade transitória e produzem baixas quantidades, na ordem de picomolar, de NO. Ao contrário, a atividade da NOS-2 é sustentada e produz concentrações nanomolares de NO durante sua ativação. Apesar da atividade da NOS-1 ser transitória, Nishida e Ortiz (1998) demonstraram que a produção de NO, “*in vitro*”, pela NOS-1 é

comparável a da NOS-2 (105 e 96 nmol de NO min<sup>-1</sup> para NOS-2 e NOS-1, respectivamente).

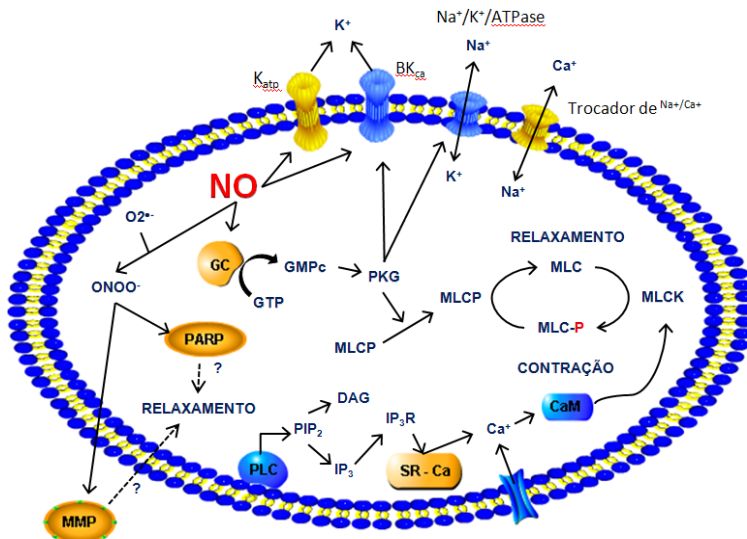
A maioria dos efeitos vasculares do NO são mediados pela ativação da guanilato ciclase solúvel (GC), que produz monofosfato cíclico de guanosina (GMPc). A síntese intracelular de GMPc promove uma cascata de eventos intracelulares, que resulta no relaxamento do músculo liso vascular, inibição da agregação plaquetária e da proliferação do músculo liso, entre outros (Alderton *et al.*, 2001).

A produção excessiva de NO durante a sepse esta relacionada com o aumento da expressão da NOS-2, após ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B. A NOS-2 produz grandes quantidades de óxido nítrico e vários trabalhos demonstram um acúmulo dos metabólitos do NO com o passar do tempo da sepse (Feihl *et al.*, 2001). Os efeitos do excesso do NO sobre os mecanismos de contratilidade vascular podem ser observados no Esquema 2.

Os mecanismos clássicos pelo qual o NO produz relaxamento vascular já foram, de certo modo, bem descritos durante a sepse. A ativação excessiva da via NO-sGC-GMPc foi demonstrada pelo aumento da expressão da sGC e consequente produção de GMPc, principalmente nas fases tardias da sepse. A inibição da sGC melhorou a resposta a agentes vasoconstritores (Fernandes *et al.* 2006; Fernandes *et al.*, 2009). Recentemente foi demonstrado que o GMPc produzido via NO derivado da NOS-2, inibe a via Rho-A/Rho-quinase, prejudicando a fosforilação da miosina fosfatase e consequentemente reduzindo a contratilidade vascular (da Silva-Santos *et al.*, 2009).

A ativação excessiva dos canais de potássio sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>) parece contribuir com o prejuízo da contratilidade vascular, uma vez que a glibenclamida e o tetraetilamônio restauraram a pressão arterial e a reatividade vascular a catecolaminas (da Silva-Santos *et al.*, 2002). Estudos recentes demonstram que a bomba de sódio potássio ATPase (Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>/ATPase) está expressa em maior quantidade nas células do músculo liso vascular, contribuindo para o prejuízo da contratilidade vascular (Chem *et al.*, 2005).

A geração simultânea de NO e superóxido favorece a produção do ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), um radical livre que parece ser o responsável pela maioria dos efeitos tóxicos associados com a produção do NO. O peroxinitrito pode danificar ou depletar os níveis de vários componentes vitais e causar dano no DNA (Beckman *et al.*, 1990; King *et al.*, 1992).



**Esquema 2** – Mecanismos dependentes de NO e GMPc que contribuem para a perda da contratilidade vascular durante a sepse. O LPS induz a expressão de NOS-2 dentro do músculo liso vascular. A produção excessiva de NO leva à hiperpolarização e redução da concentração intracelular de cálcio, resultando no relaxamento vascular e hiporeatividade vascular a agentes vasopressores.

**Fonte:** Adaptado de Szabo e Wu, 2011.

A capacidade do peroxinitrito em prejudicar a contratilidade vascular pode envolver diversas vias. Diretamente, este radical reduz a capacidade de ligação de agonistas com o receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico (Takakura *et al.*, 2002), embora também sejam observados efeitos indiretos. É bem conhecido que o peroxinitrito ativa as metaloproteinases (MMPs) e, recentemente, foi demonstrado que a inibição da MMP-9 protegeu animais da hipotensão e hiporeatividade vascular (Okamoto *et al.*, 2001; Cena *et al.*, 2010). O peroxinitrito provoca dano direto no DNA e conseqüentemente ativa as enzimas poli (ADP-ribose) polimerases (PARP), que promovem o reparo dos danos. Estas enzimas foram originalmente relacionadas apenas com reparo e manutenção do DNA. No entanto, observou-se que durante a sua atividade depletam o seu substrato, a nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $NAD^+$ ). A depleção de  $NAD^+$  prejudica a glicólise, o ciclo de Krebs e reduz os níveis de ATP, levando a disfunção celular (Jagtap e Szabó,

2005). A suplementação com nicotinamida protegeu os animais da disfunção vascular durante a sepse (Zingarelli, 1996).

O aumento da expressão da ciclooxigenase-2 (COX-2) já foi descrito na sepse. Além disso, o NO pode ativar a ciclooxigenase e aumentar a produção de prostaglandinas, em particular a prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>), promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. De fato, o bloqueio seletivo do receptor da PGI<sub>2</sub>, atenuou a hipotensão e reduziu a frequência cardíaca, demonstrando um efeito protetor sobre o sistema cardiovascular (Höcherl *et al.*, 2008).

### 1.7. A ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (NOS-1)

A NOS-1 é uma proteína formada por 1434 aminoácidos com peso molecular estimado em 160 kDa (Boissel *et al.*, 1998). Na sua forma monomérica é inativa e somente se torna ativa após dimerização (Reif *et al.*, 1999). Como nas demais NOS, seu mecanismo catalítico se baseia na conversão de L-arginina em citrulina e óxido nítrico, e envolve uma transferência de elétrons do NADPH para a o domínio flavina e, em seguida, outra transferência para domínio de ligação ao heme (Roman *et al.*, 2006).

A NOS-1 é expressa em neurônios (Yuan *et al.*, 2004), músculo liso vascular (Boulanger *et al.*, 1998), miócitos cardíacos (Wang *et al.*, 2008), músculo esquelético (Nakane *et al.*, 1993), no plexo miotérico intestinal (Sessa *et al.*, 1993), nas células da mácula densa do rim, (Wilcox *et al.*, 1992) e em uma série de outros tipos celulares.

A transcrição do gene da NOS-1 é extremamente complexa devido a diferentes transcrições do primeiro exon e da geração de variantes protéicas (*splicing* alternativo) (Wang *et al.*, 1999). O *splicing* alternativo do ácido ribonucléico mensageiro (mRNA) da NOS-1 gera pelo menos três variantes com diferentes pesos moleculares, a NOS-1 $\alpha$  (160 kDa), NOS-1 $\beta$  (130 kDa), NOS-1 $\gamma$  (125 kDa). A NOS-1 $\alpha$  é a única que contém o domínio PDZ (PDZ é a combinação das primeiras letras de três proteínas: *Post synaptic density protein (PSD95)*, *Drosophila disc large tumor suppressor (DlgA)*, e *Zonula occludens-1 protein (ZO-1)*). Proteínas que apresentam este domínio interagem mutuamente formando complexos protéicos, levando a modificação de localização e de atividade, entre outras alterações (Kone *et al.*, 2003). A falta de tradução do segundo exon não codifica o domínio PDZ, portanto as NOS-1 $\beta$  e NOS-1 $\gamma$ , encontram-se solúveis no citosol (Brenman *et al.*, 1996). A NOS-1 $\gamma$  não apresenta atividade enzimática, enquanto NOS-1 $\beta$  possui atividade 80% menor que NOS-1 $\alpha$ , sugerindo que a associação



da membrana não é estritamente necessária para a atividade catalítica da NOS-1 (Brenman *et al.*, 1996; Eliasson *et al.*, 1997).

A NOS-1 é encontrada predominantemente na membrana plasmática, ligada diretamente ou ancorada com outras proteínas adaptadoras, mas também é encontrada no citosol (Hecker *et al.*, 1994). A localização celular da NOS-1 é dependente de uma série de associações com proteínas adaptadoras, é a única das três isoformas da NOS que apresenta um domínio de ligação PDZ. Os complexos protéicos formados pela união de domínios PDZ normalmente estão localizados próximos a regiões de contato célula-célula e acredita-se que podem modular vias de transdução de sinal, modificando a localização e a funcionalidade das proteínas associadas (Kone *et al.*, 2000).

Um exemplo deste efeito ocorre próximo ao receptor NMDA (*N-Methyl-D-aspartate*). A PSD-95 é uma proteína responsável pela formação de complexos protéicos de transdução de sinal (Garner *et al.*, 2000; Sheng e Pak, 2000). As interações desta proteína são mediadas principalmente por três domínios PDZ, um destes domínios interage com o receptor NMDA (Kornau *et al.*, 1995), enquanto o segundo domínio faz ligação com a NOS-1, aproximando o receptor da enzima (Jaffrey 1998 e 2002). O influxo de cálcio promovido através do receptor NMDA ativa seletivamente a produção de NO pela NOS-1. A proximidade entre as proteínas garante um processo de ativação eficiente e compartimentalizado (ver Esquema 2). Ocorre ainda a interação com receptores alfa-adrenérgicos, de bradicinina e proteínas como caveolinas 1 e 3, mas o significado fisiológico destas interações permanece uma incógnita (Kone, 2003).

O NO está relacionado com diversas funções em nível de sistema nervoso central e também nos tecidos. O NO derivado da NOS participa na formação da potenciação de longo prazo, um mecanismo de formação de memória no hipocampo. A inibição da NOS-1 prejudica o aprendizado e a memória (Böhme *et al.*, 1993; Bone e Garthwaite, 2003). Em modelos de isquemia focal, a ativação da NOS-1 está ligada ao dano neuronal, e inibidores da NOS-1 como o 7-NI (um inibidor dito seletivo da NOS-1), reduzem a área de lesão isquêmica (Eliasson *et al.*, 1999; Sun *et al.*, 2005). Além disso, o 7-NI exibe efeito como de antidepressivos no modelo de nado forçado, que foram revertidos com a administração de L-arginina, indicando uma influência da NOS-1 nos mecanismos moleculares dos distúrbios depressivos.

## 1.8. NOS-1 E A REGULAÇÃO VASCULAR DO FLUXO SANGUÍNEO.

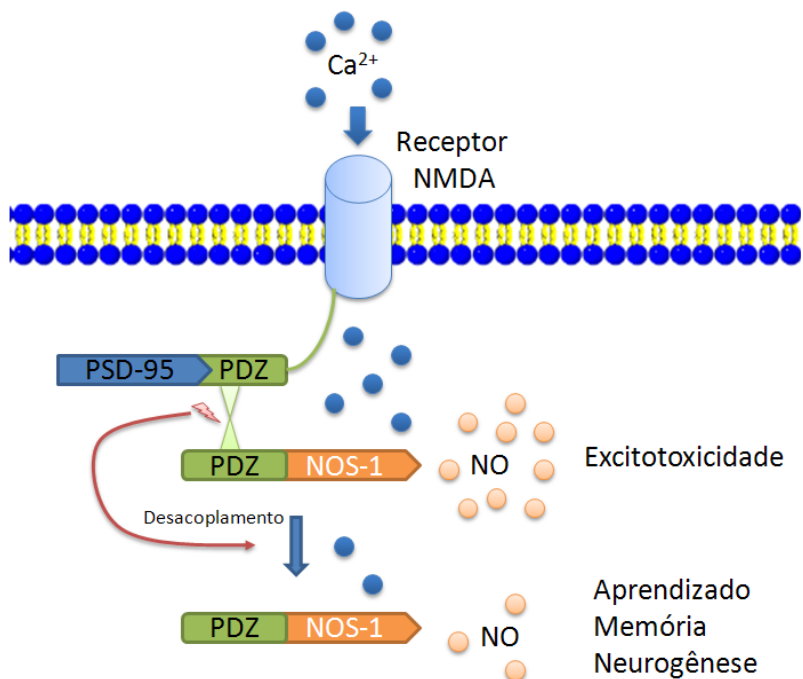
A principal fonte de NO implicado no controle da pressão arterial provém do endotélio. A ativação da isoforma endotelial da NOS relaxa a musculatura lisa vascular através da geração de NO (Palmer *et al.*, 1988; Moncada e Higgs 1993). A ativação desta enzima é devida principalmente ao estresse de cisalhamento (*shear stress*), mas também é induzida por uma variedade de agonistas que agem no endotélio vascular, como a acetilcolina (Vallance e Chan, 2001). No entanto, a regulação do tônus vascular parece não ser uma exclusividade do NO produzido pela NOS-3. Uma substancial quantidade de evidências, tanto de animais quanto em humanos demonstra que a NOS-1 participa fisiologicamente da regulação do tônus vascular especificamente em alguns tecidos.

A inibição seletiva da NOS-1 no rim reduz o tônus arteriolar aferente e eferente, sem, no entanto, afetar a vasodilatação induzida por acetilcolina (Ichihara *et al.*, 1998). A NOS-1 é particularmente expressa nas células da mácula densa e a sua retirada das células abole o efeito vasoconstritor dos inibidores da NOS-1. Além disso, camundongos *knockout* para NOS-1 apresentam reduzida taxa de filtração glomerular em comparação com camundongos normais a altas concentrações de sódio. (Vallon *et al.* 2001).

O tônus vascular cerebral também sofre influência da NOS-1 e a inibição desta enzima aboliu a resposta vasodilatadora induzida pela hipóxia, o aumento do fluxo sanguíneo derivado da hipercapnia e reduziu o diâmetro das artérias cerebrais (Heinert *et al.*, 1999; Bauser-Heaton e Bohlen, 2007). Além disso, camundongos que não expressam o gene da NOS-1 tem resposta cerebrovascular reduzida à acetilcolina e ao L-NAME (Atochin *et al.*, 2003).

A NOS-1 pode alterar o tônus vascular periférico pela inibição da atividade nervosa simpática vascular. A inibição da NOS-1 no leito vascular mesentérico, sem endotélio, aumenta a vasoconstrição e a concentração de noradrenalina após estimulação elétrica. Nesta mesma linha de pensamento, o tratamento com capsaicina reduziu a imunoreatividade para a NOS-1 neste leito e ainda aboliu o aumento da resposta vasoconstritora após estimulação nervosa perivascular (Hatanaka *et al.*, 2006). Estes dados sugerem que o NO liberado pela NOS-1 de fibras nervosas sensíveis a capsaicina podem modular a neurotransmissão simpática e, portanto, o tônus vascular. Além disso, após redução da pressão arterial sistêmica, o NO proveniente da NOS-1 esta relacionado ainda com a vasodilatação e restabelecimento do fluxo

sanguíneo coroidal (Reiner *et al.*, 2010) e também com o tônus das artérias coronárias (Seddon *et al.*, 2009).



**Esquema 3.** Mecanismo hipotético da influência da interação da NOS-1 com a PSD-95 na sinalização do sistema nervoso central. O glutamato induz a ativação do receptor NMDA e leva a formação do complexo NMDA/PSD-95/NOS-1. O influxo de cálcio através do receptor NMDA ativa a NOS-1 que produz grandes quantidades de NO, mediando um componente importante da excitotoxicidade. Agentes que promovem o desacoplamento dissociam o complexo PSD-95/NOS-1 agem como agentes neuroprotetores. Mais importante ainda, a presença de agentes de desacoplamento não afeta a via de sinalização nem a interação com outras proteínas (não representadas na figura), portanto, as funções fisiológicas da NOS-1, como aprendizagem, memória e neurogênese, não são afetadas.

**Fonte:** Adaptado e modificado de Zhou e Zhu, 2009

Uma das evidências mais importantes da participação da NOS-1 na regulação do tônus vascular em processos patológicos vem do estudo de pacientes com distrofia muscular de Duchenne, e do equivalente animal, camundongos *mdx*. A NOS-1 interage com a distrofina e a distrobrevina que ficam ancoradas na membrana, associadas à glicoproteínas. Esta interação aproxima a NOS-1 da membrana e facilita as ações do NO sobre o leito vascular dos músculos esqueléticos (Brenman *et al.*, 1995; Thomas *et al.*, 1998). Pacientes com distrofia muscular de Duchenne não expressam distrofina e, conseqüentemente, a proximidade da NOS-1 com a membrana plasmática é reduzida, bem como sua expressão nos músculos esqueléticos (Brenman *et al.*, 1995). A ausência de vasodilatação do leito vascular dos músculos esqueléticos destes pacientes foi relacionada com redução do NO derivado da NOS-1. Além disso, a hipotensão induzida pelo choque anafilático foi atenuada pela administração de 7-nitroindazol (7-NI), inibidor preferencial NOS-1. No entanto, a inibição não seletiva das NOS aumentaram a PAM promovendo aumento da mortalidade (Zang *et al.*, 2009).

Segundo Melikiana e colaboradores (2009), a NOS-1 tem um papel distinto da NOS-3 na regulação fisiológica do tônus vascular. Enquanto a NOS-3 facilita as alterações dinâmicas da distribuição do fluxo sanguíneo, por exemplo, em resposta ao estresse de cisalhamento e tem efeitos anti-ateroscleróticos, o NO derivado da NOS-1 regula o tônus vascular e fluxo sanguíneo basal.

#### 1.9. NOS-1 NA SEPSE E ENDOTOXEMIA.

A primeira evidência de que a NOS-1 participa ativamente da hiporeatividade vascular na sepse veio das observações de Gocan e colaboradores (2000), de que a inibição seletiva desta enzima melhorava a resposta vasodilatadora da acetilcolina nos músculos. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que animais que não expressavam o gene (*knockout*) da NOS-1, não apresentam hiporeatividade a vasoconstritores nos momentos mais tardios da sepse, enquanto animais *knockout* para NOS-2 e NOS-3 continuam hiporeativos.

Utilizando um modelo de sepse em ovelhas Enkhbaatar e colaboradores (2003), demonstraram que a infusão de 7-NI após a indução de sepse melhorou a troca gasosa pulmonar, reduziu os níveis de NOx e a resposta inflamatória aguda, bem como reduziu o edema e preveniu a obstrução pulmonar. Além disso, a melhora dos parâmetros pulmonares não foi reproduzida pela inibição da NOS-2 com aminoguanidina. Estes dados foram confirmados posteriormente utilizando outro inibidor da NOS-1 (Enkhbaatar *et al.*, 2009). O mesmo

grupo demonstrou que a inibição da NOS-1 nas fases iniciais da sepse, acompanhada da inibição tardia da NOS-2, atenuou a hipotensão arterial, a depressão do miocárdio, e reduziu a lesão renal e hepática (Lange *et al.*, 2010). A administração de 7-NI reduziu a peroxidação lipídica e a produção de superóxido e nitrito e ainda aumentou a atividade da SOD nos capilares cerebrais de ratos sépticos (Ninković *et al.*, 2006).

Os modelos que utilizam LPS como indutor de sepse também nos fornecem informações valiosas sobre o comportamento da NOS-1 durante a endotoxemia. A hipertemia induzida pelo LPS foi parcialmente reduzida pelo bloqueio da NOS-1 (Soszynski e Chelminiak, 2007; Perotti *et al.*, 1999), bem como a administração de 7-NI em animais endotoxêmicos reduziu a ativação do NF- $\kappa$ B no sistema nervoso central (Glezer *et al.*, 2003). O LPS promoveu um aumento da expressão da NOS-1 em camundongos *knockout* para NOS-2 e o aumento da expressão desta enzima foi relacionado com o declínio da força de contração do diafragma (Comtois *et al.*, 1999 e 2001).

Além disso, o LPS induziu um aumento na expressão da NOS-1 em oligodendrócitos, levando a formação de peroxinitrito e resultando na redução da viabilidade celular (Yao *et al.*, 2010). A inibição da NOS-1 reduziu a expressão de TNF- $\alpha$  em cardiomiócitos estimulados com LPS por um mecanismo que envolve a regulação do cálcio intracelular, enquanto a NOS-3 eleva as concentrações desta citocina nas mesmas condições experimentais (Peng *et al.*, 2003; Geoghegan-Morphet *et al.*, 2007).



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. JUSTIFICATIVA

Não resta dúvida de que o NO é um dos principais mediadores envolvidos na instabilidade hemodinâmica durante a sepse, e que a NOS-2 é uma das principais fontes de geração deste mediador. No entanto, a inibição seletiva da NOS-2 falha em restaurar a pressão arterial e a reatividade pressórica no modelo CLP. Além disso, o conteúdo protéico desta enzima se encontra reduzido nas fases mais tardias, onde a hipotensão e hiporeatividade vascular são mais intensas. Deste modo, a importância do NO derivado das outras isoformas de NOS pode participar de forma ativa na disfunção vascular da sepse. Por este motivo resolvemos investigar a participação do NO derivado da NOS-1 nesta disfunção em animais sépticos.

### 2.2. HIPÓTESE

Seria o NO proveniente da NOS-1 um importante mediador da hiporeatividade vascular durante a sepse?

### 2.3. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo principal investigar se o NO proveniente da isoforma neuronal da óxido nítrico sintase prejudica a reatividade vascular durante a sepse. Além disso, determinar se o NO proveniente desta enzima é um mediador importante no início da sepse.

### 2.4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- a) Verificar se a administração de analgésicos opióides altera parâmetros comumente avaliados durante a sepse.
- b) Determinar a seletividade do 7-NI, como inibidor da óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1).
- c) Avaliar o efeito da inibição seletiva da NOS-1 e NOS-2 sobre a pressão arterial.
- d) Investigar o envolvimento da NOS-1 e NOS-2 na reatividade pressórica a vasoconstritores  $\alpha$ -adrenérgico e  $\beta$ -adrenérgico.
- e) Determinar a localização, o conteúdo protéico e a possível interação entre a NOS-1 e a guanilato ciclase.
- f) Avaliar o efeito do 7-NI sobre os níveis de GMPc em tecidos de animais sépticos.
- g) Determinar efeito do 7-NI sobre os níveis de AMPc em tecidos de animais sépticos.
- h) Verificar o envolvimento da NOS-1 no início da sepse.





### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ANIMAIS

Neste estudo foram utilizados ratos Wistar fêmeas, com 2,5 a 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UFSC. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, CCB - UFSC, em temperatura controlada de  $22 \pm 2$  °C, em ciclo claro/escuro de 12 h, com acesso à água e ração *ad libitum*. Os experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde, dos Estados Unidos da América (NIH; EUA). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSC, sob o protocolo PP00319.

#### 3.2. TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

##### 3.2.1. Modelo de septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (90/15 mg/kg, i.p.). Em seguida, foram submetidos a uma laparotomia com incisão de aproximadamente 1 cm e subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco, abaixo da válvula ileocecal. Para indução da septicemia, o ceco dos animais foi perfurado 20 vezes com agulha 18G, seguido de leve compressão para assegurar o extravasamento do conteúdo cecal. Após a perfuração, o ceco foi colocado novamente na cavidade abdominal, seguindo-se a sutura da musculatura e da pele do local. Após a sutura, os animais receberam 2 mL de salina (s.c.) para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (1 a 2 horas). Os animais do grupo controle (animais falso-operados) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, não sofrendo, contudo, ligadura e perfurações do ceco. As avaliações realizadas nos animais sépticos deste estudo foram feitas 6, 12 e 24 horas após a cirurgia. Os animais falso-operados foram sempre avaliados após 24 do procedimento cirúrgico.

### **3.2.2. Avaliação da Pressão Arterial Média (PAM) e frequência Cardíaca (FC).**

Para a avaliação da pressão arterial os animais foram anestesiados com quetamina/xilazina (90/15 mg/kg), injetada por via intramuscular, e posicionados em decúbito dorsal sobre uma plataforma metálica aquecida a 37°C. Em todos os experimentos, a veia femoral esquerda foi dissecada para a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e a uma seringa. Esse acesso venoso foi a via de administração para alguns dos compostos utilizados. A prevenção da formação de coágulos e da obstrução das cânulas foi feita pela injeção de 30 UI de heparina sódica diluída em 100 µL de PBS, através da cânula implantada. Os animais foram então submetidos a uma traqueostomia para facilitar a respiração espontânea e, em seguida, a artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente separada do nervo vago e dos tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da carótida foi interrompido na extremidade distal através de ligadura com fio de sutura, enquanto que o fluxo da extremidade proximal foi temporariamente interrompido através de compressão com uma pinça curva. Um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida, servindo como via de inserção de um cateter de polietileno (Angiocath®, nº 19), devidamente heparinizado. O cateter foi firmemente amarrado à artéria e conectado ao transdutor de pressão (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, EUA) acoplado a um amplificador e analisador Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltda., Castle Hill, Austrália). Os registros de pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) foram avaliados e analisados em um computador (sistema operacional Windows XP™, Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração Chart6™.

### **3.2.3. Preparo das amostras para imunoeletoforese (*Western blotting*) e coimunoprecipitação.**

Os tecidos dos animais foram homogeneizados (100 mg de tecido/1 ml de tampão) em tampão gelado a 4°C contendo 150 mM de NaCl, 10 mM de Tris-HCl, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 0,2 mM de ortovanadato de sódio e 1% de Triton X-100, pH 7,4 e contendo 1 mg/ml de cada um dos seguintes inibidores aprotinina, leupeptina, inibidor de tripsina de feijão de soja (SBTI) e 4 mM de fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF). Ao final deste processo as amostras foram centrifugadas a 14.000 g durante 45 min. Uma amostra de 20 µL foi coletada para determinação dos níveis protéicos através de leitura da absorbância por espectrofotometria a 280 nm.

### **3.2.4. Imunoeletroforese das enzimas óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) e guanilato ciclase solúvel.**

Após o preparo das amostras como descrito no **Item 3.2.3.**, a concentração de proteínas em cada uma das amostras foi corrigida para 10 mg/mL e então adicionado tampão de amostra SDS azul (1:5) e aquecida a 95° C durante 5 min. As amostras (70µg por poço de leito vascular mesentérico, rim e músculo e 100 µg por poço/aorta torácica) foram submetidas à eletroforese desnaturante em gel SDS (eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, 10% de gel) e transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL, 150 min.; 0,8 mA/cm<sup>2</sup>; 15 V) em tampão tris-glicina (48 mM de tris-HCl/39 mM glicina/10% de metanol). Após a eletroforese, as membranas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com Tween-PBS (137 mM de NaCl; 2,7 mM de KCl; 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 10,8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O e 0,05% Tween 20 em pH 7,4), contendo leite em pó desnatado 0,1%. Para a imunodeteção as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-NOS-1 (1:1000, sc-1025) ou anti-sGC (1:1000, sc-20955), durante a noite à 4°C. Estas membranas foram lavadas (3x) com tampão Tween-PBS e incubadas com um anticorpo secundário biotilado (1:5000). Após 1h, as membranas foram novamente lavadas (3x) com tampão Tween-PBS e, em seguida, incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase por mais 1 hora (1:2000). Os imunocomplexos foram visualizados por uma reação de quimiluminescência e a intensidade das bandas foi quantificada por densitometria utilizando o software Scion Image<sup>®</sup> (Scion Corporation, Frederick, MD, EUA).

### **3.2.5. Estudo da interação proteína:proteína por coimunoprecipitação.**

Depois do preparo das amostras como descrito no **Item 3.2.3.**, as concentrações de proteínas no sobrenadante foram corrigidas para 5 mg/mL e incubadas com anticorpos anti-sGC (1 µL de anticorpo/1 mL de amostra) durante 12 h, à 4°C, sob rotação. Após este período foi adicionado a cada uma das amostras 10 µL de proteína A/G agarose e, a incubação foi mantida por mais 90 min. Os complexos formados foram centrifugados (1000 RPM, 10 min), lavados três vezes com tampão e suspensos em 20 µL de tampão de amostra SDS azul e aquecidos a 95 ° C por 5 min. O conteúdo total resultante foi submetido à eletroforese desnaturante em gel (eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, 7% de gel) e transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL, 150

min.; 0,8 mA/cm<sup>2</sup>; 15 V) em tampão tris-glicina (48 mM Tris-HCl/39 mM glicina/10% de metanol). Após a eletroforese, as membranas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente com tween-PBS (137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,5 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10,8 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, e 0,05% de tween 20, pH 7,4), contendo leite em pó desnatado 0,1%. Para a imunodeteção as membranas foram incubadas com anticorpo policlonal de coelho anti-NOS-1 (1:1000) durante 12 h, a 4 ° C. Posteriormente estas membranas foram lavadas (3x) com tampão tween-PBS e incubadas com um anticorpo secundário biotilado (1:5000). Após 1h, as membranas foram novamente lavadas (3x) com tampão tween-PBS e, em seguida, incubadas com estreptavidina conjugada com peroxidase (1:2000). Os imunocomplexos foram visualizados por uma reação de quimiluminescência e intensidade das bandas foi quantificada por densitometria utilizando o software Scion Image<sup>®</sup> (Scion Corporation, Frederick, MD, EUA).

### **3.2.6. Imuno-histoquímica para óxido nítrico sintase neuronal e guanilato ciclase solúvel.**

Os tecidos foram fixados em solução de Bouin alcoólico por 4 h, incluídas em paraplast e seccionadas em 10 µm no plano horizontal. Os cortes foram montados em lâminas revestidas de gelatina. Uma série de cortes foram desparafinados, hidratados e as seções destinadas à reação imuno-histoquímica. Estes cortes foram lavados em PBS contendo 0,3% Triton X-100, incubados com soro de cabra a 5%, e depois com o anticorpo primário durante 12 h, à 4°C. Para imunodeteção de NOS-1 e sGC, foram utilizados os mesmos anticorpos descritos acima, diluídos na concentração de 1:100. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em PBS com 0,1% Tween 20 e incubadas com o anticorpo secundário (Alexa Fluor 633, vermelho) por 2 h antes de lavar com PBS 0,1 M. Finalmente, os cortes foram montados com Gel Mount e então observados e fotografados usando o microscópio confocal do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (Leica DMI6000 B Microscope, Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Para visualizar a NOS-1 e GC, os cortes foram submetidos à excitação com o laser de 543 nm (filtro: LP 570 nm). Os controles negativos seguiram o mesmo procedimento, exceto que o anticorpo primário foi omitido.

### 3.2.7. Dosagem dos nucleotídeos cíclicos GMPc e AMPc.

Fragmentsos dos tecidos pesando aproximadamente 100 mg foram homogeneizados em 1 mL de ácido tricloroacético 6%, gelado. Os homogenatos foram então centrifugados (4000 g, 4° C) por 30 minutos, o sobrenadante foi coletado em tubos plásticos com tampa, e lavado quatro vezes com éter etílico saturado com água (1,6% v/v), realizando 10 inversões dos tubos a cada lavagem. As amostras foram acondicionadas em tubos tipo eppendorf e liofilizadas, e os nucleotídeos cíclicos foram determinados pelo método de ELISA utilizando-se kits comercialmente disponíveis (GMPc-RPN226 e AMPc-RPN225), seguindo-se as instruções do fabricante. Para dosagem de GMPc utilizou-se o método de acetilação dos kits (*Acetylation EIA procedures*), que permite a dosagem de GMPc em uma faixa de 2 a 512 fmol/poço, e para as dosagens de AMPc utilizou-se o método sem acetilação (*Non-Acetylation EIA Procedure*) que permite a dosagem de AMPc em uma faixa de 12 a 3200 fmol/poço. O princípio do método se baseia na competição entre o GMPc da amostra e cGMP conjugado a uma peroxidase na ligação a um anticorpo específico para GMPc. A quantidade total de proteína foi dosada pelo método de Bradford. .

### 3.2.8. Cultura celular.

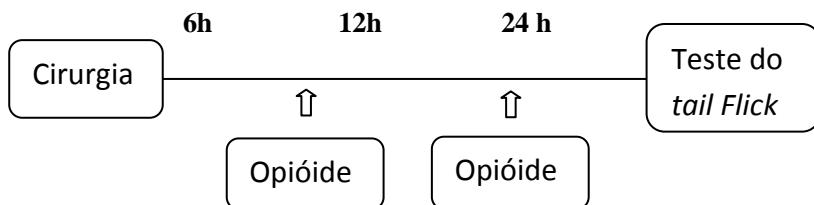
As células utilizadas foram de músculo liso vascular de aorta de rato (A7r5) e de macrófagos de camundongos (J774), ambas originalmente obtidas a partir do Banco de Células do Rio de Janeiro (UFRJ, RJ, Brasil). As células foram cultivadas e passadas para frascos de cultura de plástico ou placas de Petri descartáveis no meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), suplementado com soro fetal bovino a 10%, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 10 mM de HEPES; pH 7,4. As células foram mantidas em uma incubadora de CO<sub>2</sub> (HF 212UV, Axiom, Alemanha) a 37°C, com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A cada 4-5 dias, as culturas se tornavam confluentes e os repiques foram realizados por remoção completa do meio com PBS estéril e adição 1 mL de solução de 0,25% de tripsina/0,03% de EDTA, pré-aquecida a 37°C (para a célula A7r5) ou por raspagem (para a célula J774). As células foram centrifugadas, e o sobrenadante descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de DMEM, o qual foi utilizado para contagem do número de células, preparação dos demais protocolos experimentais.

### 3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS I

Nesta seção são apresentados os protocolos dos experimentos realizados para o estudo dos efeitos dos analgésicos opióides fentanil, tramadol e codeína sobre a reatividade pressórica, pressão arterial e sobrevivência de animais submetidos ao procedimento de ligadura e perfuração do ceco.

#### 3.3.1 Avaliação do efeito dos analgésicos opióides sobre a latência no teste de retirada da cauda (*tail-flick*) em animais sépticos

Seis horas após indução da sepse, como descrito no **Item 3.2.1**, os animais CLP e falso-operados foram tratados por via subcutânea com fentanil (5, 20 e 60  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ), tramadol (20, 40 e 60  $\text{mg}/\text{Kg}$ ) e codeína (10 e 30  $\text{mg}/\text{Kg}$ ), a cada 12 horas. Conforme representado no esquema 4, uma hora após o último tratamento os animais foram submetidos ao teste de analgesia e a latência na retirada da cauda foi avaliada através de um aparelho de *tail-flick* (Ugo-Basile, Itália). A intensidade do calor foi ajustada de tal forma que a latência média fosse de 2 a 4 segundos e o tempo máximo de corte foi padronizado em 22 segundos para evitar danos aos tecidos. Os resultados são expressos como média  $\pm$  EPM de latência (seg) para a retirada de cauda.



**Esquema 4.** Protocolo experimental para a avaliação da latência de retirada da cauda (*tail flick*) em ratos sépticos.

#### 3.3.2 Avaliação do efeito dos analgésicos opióides sobre a reatividade pressórica e pressão arterial média (PAM) de animais sépticos

Vinte e quatro horas após a cirurgia e tratamento com os opióides como descrito acima, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial, conforme descrito no **Item 3.2.2**. Após a estabilização pressórica (10-20 min.) foram registrados os valores da PAM e logo após, administradas por via endovenosa duas doses consecutivas de fenilefrina, agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico (3 e 30  $\text{nmol}/\text{kg}$ ). Ao término dos

experimentos, todos os animais foram sacrificados através da administração intravenosa de altas doses de lidocaína. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM da variação da PAM de 6-12 animais por grupo experimental.

### **3.3.3. Avaliação dos opióides sobre a sobrevivência de animais submetidos à cirurgia de CLP**

Após a indução da sepse e tratamento com os opióides como descrito acima, os animais foram observados em intervalos de 12 em 12 h pelo período de 96 dias e a sobrevivência foi quantificada.

## **3.4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS II**

Nesta seção são apresentados os protocolos dos experimentos que descrevem o efeito agudo da inibição da NOS-1 sobre a reatividade pressórica e pressão arterial durante a sepse, bem como a expressão e localização das enzimas NOS-1 e GC e os níveis de nucleotídeos cíclicos nos tecidos de animais sépticos.

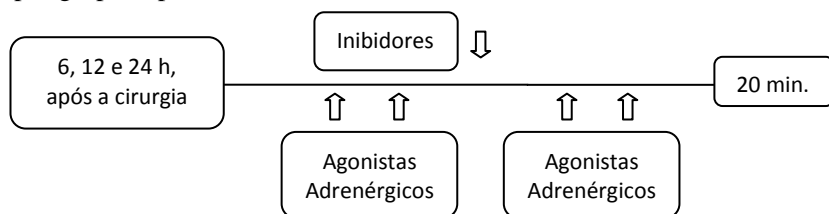
### **3.4.1 Avaliação do efeito da inibição seletiva e não seletiva de óxido nítrico sintases durante a sepse sobre a PAM**

Vinte e quatro horas após da cirurgia de CLP, os animais foram novamente anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial, conforme descrito no **Item 3.2.2**. Após a estabilização pressórica os animais receberam por via subcutânea uma injeção de 7-NI (30  $\mu\text{mol/Kg}$ ; s.c.), L-NAME, inibidor não-seletivo das NOS, (150  $\mu\text{mol/Kg}$ ; s.c.) e aminoguanidina (150  $\mu\text{mol/Kg}$ ; s.c.). As alterações pressóricas foram acompanhadas por mais 25 minutos. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) da PAM de 4-7 animais por grupo experimental.

### **3.4.2 Estudo do efeito da inibição das enzimas NOS-1 e óxido nítrico sintase induzida (NOS-2) sobre a reatividade pressórica de animais sépticos**

Como exemplificado no esquema baixo, seis, doze e vinte e quatro horas após da cirurgia de CLP (**Item 3.2.1**), os animais foram novamente anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial, conforme descrito no **Item 3.2.2**. Após a estabilização pressórica (10-20 min.) foram administradas por via endovenosa duas doses consecutivas de fenilefrina, agonista  $\alpha_1$ -adrenérgico (3 e 30 nmol/kg), isoprenalina, agonista  $\beta$ -adrenérgico (0,1 e 1 nmol/kg) e fenoterol, agonista  $\beta_2$ -

adrenérgico (0,1 e 1 nmol/kg). Logo após a obtenção das respectivas curvas de dose-resposta, os animais foram tratados com o inibidor seletivo da NOS-1, 7-NI (30  $\mu\text{mol/Kg}$ , s.c.) ou com inibidor seletivo da NOS-2, aminoguanidina, inibidor seletivo da NOS-2 (150  $\mu\text{M/Kg}$ , s.c.). Após 20 minutos as três doses dos compostos vasoativos foram novamente repetidas. As concentrações destes compostos foram administradas na forma de *bolus* em um volume de 80  $\mu\text{L}$ , seguidos por mais 150  $\mu\text{L}$  de PBS estéril, para garantir a lavagem eficiente da cânula. Após a administração da última dose das drogas vasoativas os animais receberam novamente 500  $\mu\text{L}$  de PBS estéril para retirada completa de resíduos de vasoconstritor ou vasodilatador que poderiam estar presentes na cânula e influenciar na repetição da nova série de doses. Ao término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através da administração intravenosa de lidocaína. Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  EPM da variação da PAM de 6-12 animais por grupo experimental.



**Esquema 5.** Protocolo experimental para a avaliação da reatividade pressórica em ratos sépticos.

### 3.4.3. Avaliação do efeito do 7-NI sobre a produção de NOx em células estimuladas com LPS/IFN-gama

As células A7r5 ou J774 confluentes foram preparadas conforme mencionado no **Item 3.2.8.**, ressuspensas em meio de cultura, e a viabilidade celular foi determinada pela exclusão do Azul de Tripán. Um total de  $3,5 \cdot 10^3$  células viáveis/poço foram semeadas em 200  $\mu\text{l}$  de meio DMEM em placas de 96 poços e estimulados com LPS/IFN-gama. Após 24 h foram adicionados ao meio de 7-NI nas concentrações de 10-1000  $\mu\text{M}$  e aminoguanidina (100  $\mu\text{M}$ ). O NOx foi medido 72 horas depois da adição dos inibidores pela reação de Griess. Os valores foram expressos na média  $\pm$  EPM do NOx (nitrato/nitrito) de 4-8 poços por grupo experimental.



#### **3.4.4. Efeito do 7NI sobre a resposta da vasoconstritora induzida pela infusão de noradrenalina em animais sépticos**

Com objetivos de simular a administração de vasoconstritores que ocorre na clínica a pacientes sépticos, realizamos a infusão de noradrenalina em animais submetidos ao procedimento de CLP. Vinte e quatro horas após a cirurgia, canulou-se a veia femoral esquerda de animais, por onde foi infundida uma solução contendo noradrenalina (10 µg/mL/min.) através de uma bomba peristáltica calibrada na velocidade de 1,4 mL/hora. A resposta pressórica a infusão do agonista adrenérgico foi monitorada por 150 minutos. Após 90 minutos do início da infusão, foi administrado por via subcutânea 7-NI (30 µmol/Kg; s.c.) e acompanhada as alterações da PAM por mais 45 min. Todo o sistema foi envolvido em papel alumínio para evitar uma possível degradação da noradrenalina na solução. Os resultados foram expressos como a média ± EPM de 4-8 animais por grupo experimental.

#### **3.4.5. Determinação dos níveis de GMPc nos tecidos de animais sépticos “in vivo”**

A sepse foi induzida como descrita no **Item 3.2.1** e seis, doze e vinte e quatro horas após da cirurgia de CLP os animais foram tratados com 7-NI (30 µmol/kg; s.c.). Após 20 minutos da injeção do inibidor, os animais foram mortos por overdose de lidocaína e pedaços de pulmão, músculo estriado esquelético, rim e a aorta foram removidos, rapidamente congelados e mantidos a -80° C para determinação do conteúdo de GMPc, como descrito no **Item 3.2.7**. Os resultados foram expressos como média ± EPM de fentomoles de GMPc por miligrama de proteína de 3-5 animais por grupo experimental.

#### **3.4.6. Determinação dos níveis de GMPc em aortas de animais sépticos estimuladas com fenilefrina “ex-vivo”**

Após a indução da sepse (**Item 3.2.1**), os animais foram sacrificados por overdose de ketamina/xilasina e tiveram suas aortas retiradas e cortadas em secções transversais de 2 mm. Estes vasos foram incubados “in vitro” com isobutilmetilxantina (IBMX), um inibidor inespecífico de fosfodiesterase (0,1 mM) por 20 minutos a 37° C em solução de Hank's (138 mM de NaCl; 5,3 mM de KCl; 0,44 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,4 mM de MgSO<sub>4</sub>; 0,49 mM de MgCl<sub>2</sub>; 1,26 mM de CaCl<sub>2</sub>; 0,34 mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub> e 5,5 mM de D-glicose). Após o tempo de incubação com IBMX, foi adicionado aos tubos fenilefrina (1 µM) ou PBS, em presença ou ausência de 7-NI (30 µmol/mL), e a incubação prosseguiu

por mais 15 minutos. Posteriormente as aortas foram retiradas dos tubos e rapidamente congeladas e mantidas a  $-80^{\circ}\text{C}$  para determinação do conteúdo de GMPc como descrito no **Item 3.2.7**. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de picomoles de GMPc por miligrama de proteína de 4 a 5 animais por grupo experimental.

### 3.5. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS III

Nesta seção são apresentados os protocolos dos experimentos que descrevem o efeito do tratamento prévio por uma semana com 7-NI, e posterior cirurgia de CLP, sobre a reatividade pressórica, pressão arterial e outros parâmetros utilizados para avaliar a severidade da sepse. Nos protocolos experimentais que se seguem todos os animais receberam o 7-NI na concentração de ( $30\ \mu\text{mol/Kg}$ , s.c.), duas vezes ao dia, durante uma semana. Após este período foram submetidos à cirurgia de CLP.

#### 3.5.1. Estudo da reatividade pressórica

Este protocolo foi executado de acordo com a técnica descrita no **Item 3.3.2**. No entanto, neste estudo as curvas de reatividade pressórica foram obtidas apenas com fenilefrina (3, 10 e  $30\ \text{nmol/kg}$ ) e isoprenalina, (0,1; 0,3 e  $1\ \text{nmol/kg}$ ), sendo o restante do experimento similar ao descrito no item citado acima.

#### 3.5.2. Avaliação dos níveis glicêmicos e de leucócitos sanguíneos totais

Uma alíquota de  $10\ \mu\text{L}$  de sangue retirado no tempo zero, antes do procedimento cirúrgico, e três, seis, quinze e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico da CLP foi diluída em solução de Türk (1/20). A contagem dos leucócitos totais foi realizada em câmara de Neubauer em microscópio óptico comum. Os níveis de glicose sanguínea foram mensurados eletroquimicamente por meio do sistema de monitoramento da glicemia TracKease Smart System (Home Diagnostics, Inc.; Fort Lauderdale, Florida, USA), utilizando tiras reativas adequadas para o mesmo. Em todos os casos, os resultados foram expressos como as médias  $\pm$  EPM da quantidade de leucócitos sanguíneos totais ( $\times 10^6$ ) e glicose no sangue (mg/dL).

### 3.5.3. Determinação da sobrevivência dos animais submetidos à cirurgia de CLP

Os animais foram randomizados e submetidos à cirurgia de CLP, como descrito no **Item 3.2.1**. Após a realização do procedimento cirúrgico, os animais foram observados em intervalos de 12 em 12 h pelo período de 96 dias e a sobrevivência foi quantificada. Foram considerados apenas os animais que morreram após a recuperação completa da anestesia, aproximadamente 4 horas após o procedimento. Os grupos experimentais foram divididos pelo tempo do início do tratamento. Seis, doze e vinte e quatro horas após a cirurgia os animais receberam 7-NI (30  $\mu\text{mol/Kg}$ , s.c.), repetindo-se a mesma dose a cada doze horas. Em um segundo protocolo os animais foram tratados com 7-NI durante uma semana e então submetidos à cirurgia de CLP.

### 3.6. COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: NaCl, KCl,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{NaHPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , EGTA, D-glicose, Tris-HCl, ácido acético e aminoguanidina (adquiridos de Merck, Brasil); ketamina (Dopalen<sup>TM</sup>, adquiridos de Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), xilazina (Anasedan<sup>TM</sup>, adquiridos de Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) heparina sódica (gentilmente cedida por Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP, Brasil), fenilefrina, angiotensina I e II, isoprenalina, 7-nitroindazol, dimetil-sulfóxido (DMSO), aprotinina, leupeptina, inibidor de tripsina de soja, fluoreto de fenilmetanosulfonil (PMSF), EGTA, Triton X-100, Tween 20, ácido tricloroacético, L-NAME, mercaptoetanol, persulfato de amônio, tetrametiletenodiamina (TEMED) e HEPES (adquiridos de Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA). Isobutil-metilxantina, ortovanadato de sódio e fenoterol (Sigma; doação do Prof. Dr. João Batista Calixto, UFSC), anticorpo policlonal de coelho anti-NOS-1 (sc-1025), anticorpo policlonal de coelho anti-sGC (sc-20955) e proteína A/G agarose (adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), glicina, tris-HCl, acrilamida, bisacrilamida e Alexa Fluor 633 (adquiridos de Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Metanol e ácido acético (adquiridos de VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) Gel Mount (Biomed Corporation, CA, USA), membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL), estreptavidina conjugada com peroxidase e anticorpo secundário biotilado (adquiridos de Amersham Biosciences, São

Paulo, SP, Brasil), DMEM, soro fetal bovino, penicilina, estreptomicina, e glutamina (adquiridos de GIBCO, Invitrogen, São Paulo, SP, Brasil). Todos os compostos foram diluídos para uso em PBS estéril. O 7-NI foi diluído em DMSO puro na concentração de 20 mg/mL e para os estudos em “*in vitro*” na concentração de 0,5 mg/mL.

### 3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

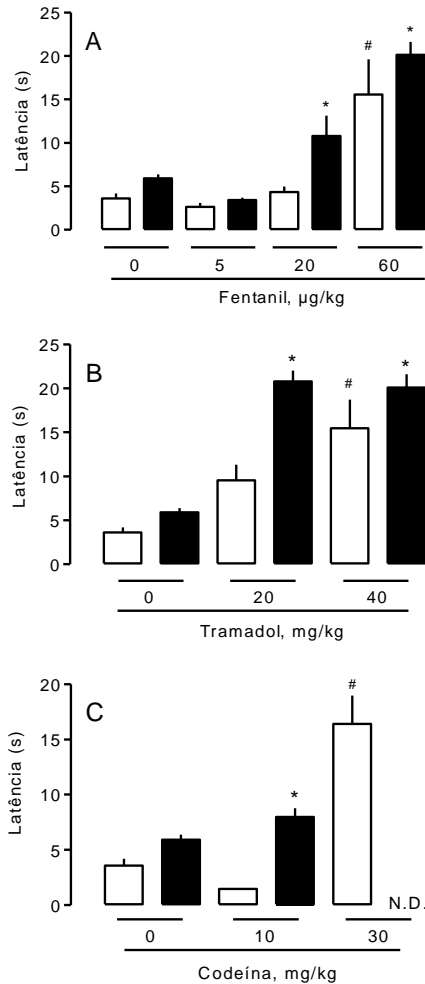
Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) dos parâmetros avaliados. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) de uma ou de duas vias seguida pelos testes *post-hoc* de Newman-Keuls ou Bonferroni quando necessário, utilizando o programa Graph Pad Prism 5 for Windows<sup>®</sup> (Graph Pad Software<sup>®</sup>, La Jolla, CA, USA). Valores de *P* menores que 0,05 foram considerados indicativos de significância. As curvas de sobrevivência foram expressas como porcentagem de animais vivos observados em um intervalo de 12 horas durante quatro dias avaliados. Para análise estatística das curvas e cálculo da média foi utilizado o teste de *logrank*. As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes para um  $P < 0,05$ . Todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do mesmo programa.

## 4. RESULTADOS

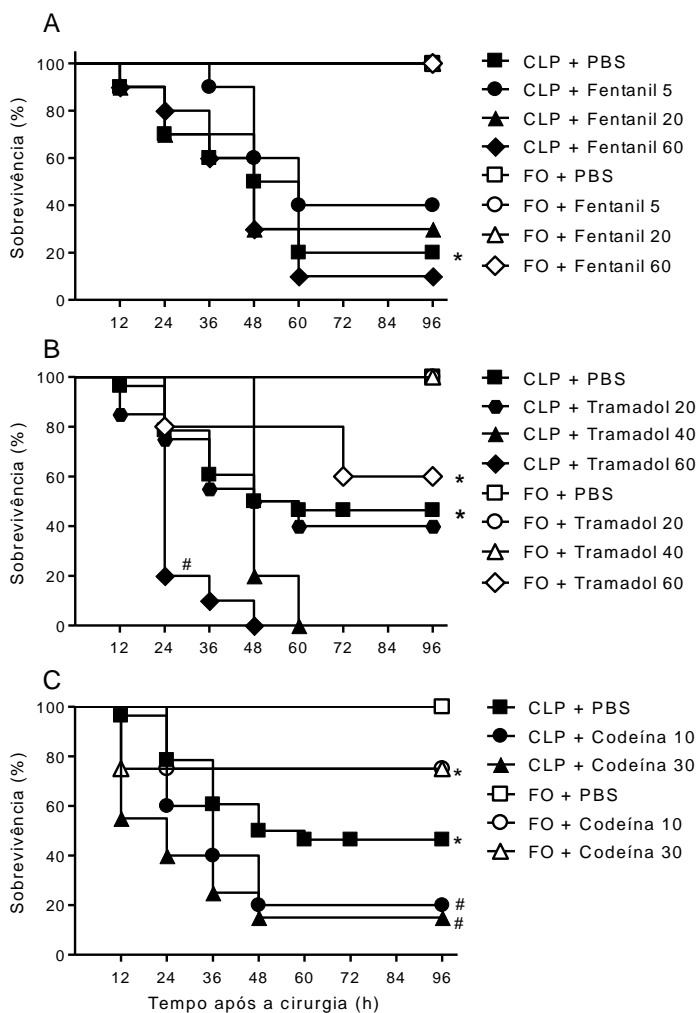
### 4.1. PRIMEIRA PARTE – ANALGESIA DURANTE A SEPSE EXPERIMENTAL.

O estudo da analgesia foi realizado através do modelo de latência de retirada da cauda (*tail flick*), e demonstrou que os analgésicos opióides aumentam a latência, tanto de animais sépticos quanto falso-operados de maneira dose-dependente (Figura 1). Nos animais controle, que receberam somente soro fisiológico, a cirurgia de CLP não alterou significativamente a latência de retirada da cauda ( $5,9 \pm 0,46s$ ), se comparado com animais falso-operados ( $3,6 \pm 0,6 s$ ). No entanto, quando os animais foram tratados com doses intermediárias de fentanil ( $20 \mu g/Kg$ ) e tramadol ( $20 mg/Kg$ ), seus efeitos analgésicos foram mais pronunciados nos animais do grupo CLP. A codeína promoveu analgesia tanto em animais FO quanto em animais CLP, no entanto, não determinamos a mortalidade deste grupo na dose de  $30 mg/Kg$  devido a grande mortalidade. (Figura 1).

Uma vez determinada a sensibilidade dos animais sépticos à analgesia induzida por opióides, o próximo passo foi avaliar se estes compostos poderiam interferir nos parâmetros comumente avaliados durante a sepse. A sobrevivência no grupo CLP começou a declinar 12 horas após a cirurgia, chegando à mortalidade de 50 a 80% no quarto e último dia do experimento (Figura 2). O fentanil não modificou o curso ou a gravidade da mortalidade induzida pela sepse e também não afetou a sobrevivência dos animais falso-operados (Figura 2, painel A). Por outro lado, a mortalidade foi maior em animais sépticos tratados com tramadol ( $40$  e  $60 mg/kg$ ) ou codeína (Figura 2, Painel B e C). Além disso, estes dois opióides aumentaram a mortalidade do grupo falso-operado. Por esta razão, fomos impedidos de obter dados hemodinâmicos e de analgesia nas doses mais elevadas destes dois compostos (Figura 2, Painel B e C).

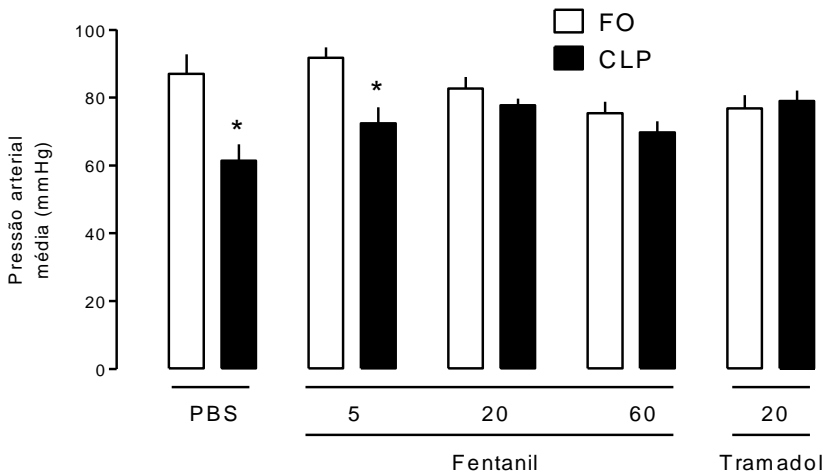


**Figura 1. Efeito dos opióides sobre a latência no teste de retirada da cauda dos animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).** Os opióides fentanil (5, 20 e 60 µg/kg, painel A) tramadol (20 e 40 mg/kg, painel B) e codeína (10 e 30 mg/Kg, painel C) e o veículo (PBS) foram administrados (s.c.) 6 e 18 h após a cirurgia de CLP, e o teste de retirada da cauda foi realizado 24 h após a cirurgia em animais conscientes. As barras abertas representam os animais falso-operados e as fechadas os animais CLP. Cada barra representa a média e as linhas verticais o E.P.M de 3-10 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO e # $P < 0,05$  quando comparados com o controle (PBS), N.D. não determinado (ANOVA de uma via; *post hoc* de Bonferroni).



**Figura 2. Efeito do fentanil (Painel A), tramadol (Painel B) e codeína (Painel C) na sobrevivência de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO).** Os opióides (fentanil em  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , tramadol e codeína em  $\text{mg}/\text{kg}$ ) ou o veículo (PBS) foram administrados (s.c.) 6 h após o procedimento cirúrgico e novamente a cada 12 h. Em todos os grupos a sobrevivência foi avaliada ao longo de 96 h. \*  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo FO e #  $P < 0,05$  quando comparado com o grupo CLP (logrank; FO n= 4-10 e CLP, n=10-28)

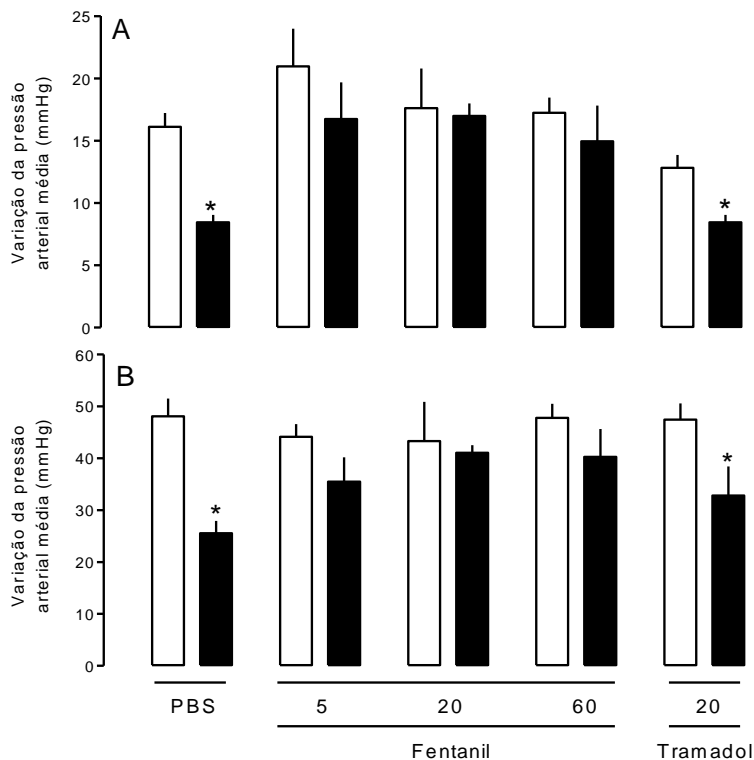
A hipotensão é um dos parâmetros mais significativos da gravidade da seps e normalmente está associada a um mau prognóstico na recuperação desta patologia. Os animais submetidos à cirurgia de CLP apresentaram hipotensão significativa ( $61,4 \pm 4,8$  mmHg) quando comparados com os animais falso-operados ( $86 \pm 5,8$  mmHg). O fentanil reduziu a hipotensão nos animais sépticos nas doses de 20 e 60 mg/Kg, como fez o tramadol na dose de 20 mg/kg. No entanto, há que se ressaltar que o fentanil provocou uma leve hipotensão (não significativa) nos animais falso-operados (Figura 3).



**Figura 3. Efeito dos opióides sobre pressão arterial média (PAM) de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).** Os opióides (fentanil em  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e tramadol em  $\text{mg}/\text{kg}$ ) ou o veículo (PBS) foram injetados (s.c.) 6 e 18 h após o procedimento cirúrgico, e a PAM foi mensurada 24 horas depois da cirurgia. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M de 4-7 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO (barras abertas) (ANOVA de duas vias; *post hoc* de Bonferroni).



No que diz respeito à reatividade pressórica, a sepse induziu uma profunda redução na vasoconstrição induzida pela fenilefrina (Figura 4). O tratamento com fentanil impediu a hiporeatividade vascular induzida pela sepse às doses de 3 (Painel A) ou 30 nmol/kg (Painel B) de fenilefrina. O tramadol por sua vez, não modificou a reatividade pressórica ao agonista adrenérgico (Figura 4).



**Figura 4. Efeito dos opióides sobre a reatividade pressórica de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).** Os opióides (fentanil em  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e tramadol em  $\text{mg}/\text{kg}$ ) e o veículo (PBS) foram injetados (s.c.), 6 e 18 h após o procedimento cirúrgico. Para o estudo da reatividade pressórica, a fenilefrina foi administrada nas doses de 3 nmol/kg (e.v., **Painel A**) e 30 nmol/kg (e.v., **Painel B**) e as variações na PAM registradas. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 4-7 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO (barras abertas) (ANOVA de duas vias seguido; *post hoc* de Bonferroni).

## 4.2. SEGUNDA PARTE – PARTICIPAÇÃO DA ENZIMA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE NEURONAL (NOS-1) NAS ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS INDUZIDAS PELA SEPSE.

### 4.2.1. Caracterização da inibição não seletiva e seletiva das enzimas, óxido nítrico sintases neuronal (NOS-1) e induzida (NOS-2) sobre a pressão arterial média (PAM) de animais submetidos à CLP.

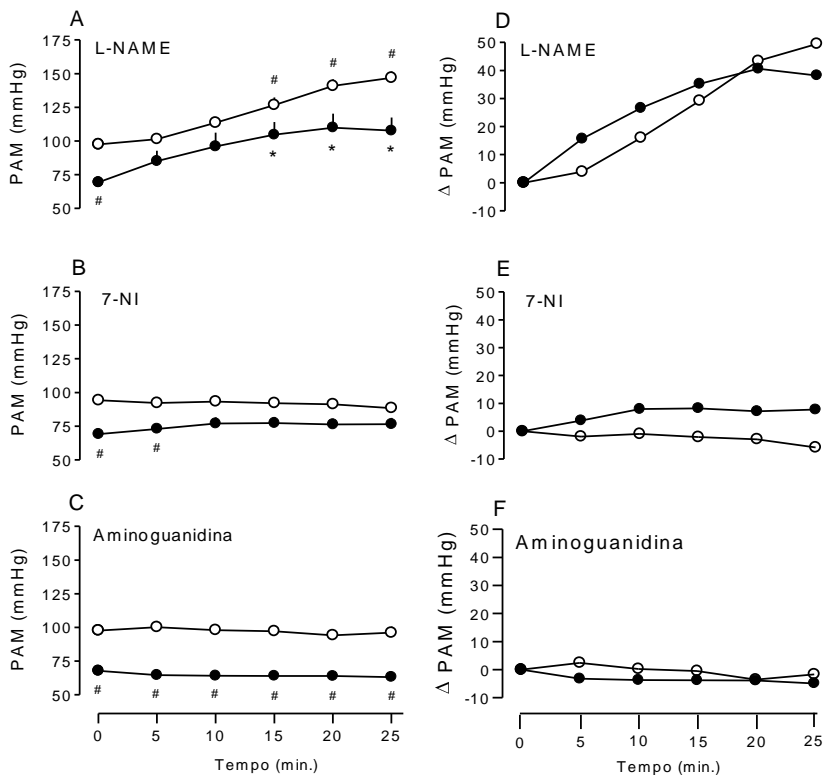
O 7-nitroindazol (7-NI) é considerado um inibidor seletivo da NOS-1. No entanto, esta afirmação é contestada por alguns trabalhos que afirmam que este composto também influencia a atividade da isoforma enzima endotelial (NOS-3) (Wolff *et al.*, 1994). Por este motivo, testamos o efeito do 7-NI, na dose de 30  $\mu\text{mol/Kg}$ , sobre a pressão arterial basal.

A sepsse induziu uma queda de aproximadamente 30 % na PAM dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ( $69,4 \pm 2,9$  mmHg) quando comparados com os animais falso-operados ( $97,5 \pm 3,3$  mmHg) (Figura 5, Painel A).

O L-NAME, inibidor não seletivo das NOS, promoveu um aumento da PAM tanto nos animais sépticos ( $107,6 \pm 9,7$  mmHg), quanto nos falso-operados ( $146,9 \pm 4,8$  mmHg) atingindo seu pico máximo de efeito 25 min após sua administração (Figura 5, Painel A).

Os tratamentos com 7-NI (inibidor seletivo da NOS-1) ou com aminoguanidina (inibidor seletivo da NOS-2) foram ineficazes em modificar a PAM de animais falso-operados. Além disso, estes inibidores não reverteram à hipotensão induzida pela sepsse nos animais submetidos à cirurgia de CLP (Figura 5, Painel B e C).

O  $\Delta$  PAM foi determinado diminuindo-se o valor obtido da PAM nos tempos determinados após a administração dos inibidores do tempo zero. Como podemos observar na figura 5 (D, E e F) os inibidores não apresentaram alteração significativa do  $\Delta$  PAM entre os grupos CLP e FO.



**Figura 5. Efeito do L-NAME, 7-NI e aminoguanidina sobre a pressão arterial média (PAM) (Painel A-C) e o  $\Delta$  da PAM (Painel D-F) de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).** Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP os animais foram preparados para o registro da PAM, e após a estabilização, receberam uma injeção subcutânea de L-NAME (150  $\mu\text{mol/Kg}$ , **Painel A e D**), 7-NI (30  $\mu\text{mol/Kg}$ , **Painel B e E**) e aminoguanidina (150  $\mu\text{mol/Kg}$ , **Painel C e F**). Os compostos foram administrados no tempo zero, e seu efeito contabilizado a cada 5 min, durante 25 min. Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M. PAM de 6 a 12 animais por grupo experimental. # $P < 0,05$  quando comparados com a PAM no tempo zero (0) dos animais falso-operados. \* $P < 0,05$ ; quando comparados com a PAM no tempo zero (0) dos animais CLP (ANOVA de uma via; *post-hoc* de Newman-Keuls).

#### 4.2.2. Caracterização da concentração de 7-NI necessária para inibir a produção de nitrito/nitrato (NOx) em células estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$ .

AS células do músculo liso A7r5 e os macrófagos J774 ativados com LPS/IFN- $\gamma$  expressam a NOS-2. Com o objetivo de investigar em qual faixa de concentrações o 7-NI poderia exercer um efeito inibitório na produção de NOx, estimulamos células de linhagem de músculo liso vascular A7r5 e macrófagos J774 com LPS/IFN- $\gamma$ . Setenta e duas horas após o estímulo observou-se um aumento dos níveis de NOx no sobrenadante em ambas as culturas.

O 7-NI inibiu a produção de NOx pelas células A7r5 em concentrações acima de 100  $\mu$ M e pelos macrófagos acima de 300  $\mu$ M (Tabela 1). Em contraste, a incubação das células com aminoguanidina (100 $\mu$ M) aboliu a produção de NOx por ambos os tipos celulares (Tabela 2).

**Tabela 2.** Efeito do 7-NI na produção de NOx em linhagem de células do músculo liso vascular A7r5 e macrófagos J774 estimuladas com LPS/IFN- $\gamma$ .

Grupos	Concentração ( $\mu$ M)	A7r5 NOx ( $\mu$ M)	J774 NOx ( $\mu$ M)
Controle	0	43,1 $\pm$ 2,1	48,1 $\pm$ 1,3
7-Nitroindazol	10	55,0 $\pm$ 3,4*	68,9 $\pm$ 2,5*
	30	43,9 $\pm$ 3,8	65,0 $\pm$ 0,2
	100	31,2 $\pm$ 1,7*	68,3 $\pm$ 1,0
	300	24,2 $\pm$ 3,3*	28,8 $\pm$ 0,9*
	1000	19,1 $\pm$ 2,4*	21,3 $\pm$ 0,6*
Aminoguanidina	100	1,9 $\pm$ 0,1*	1,4 $\pm$ 0,4*

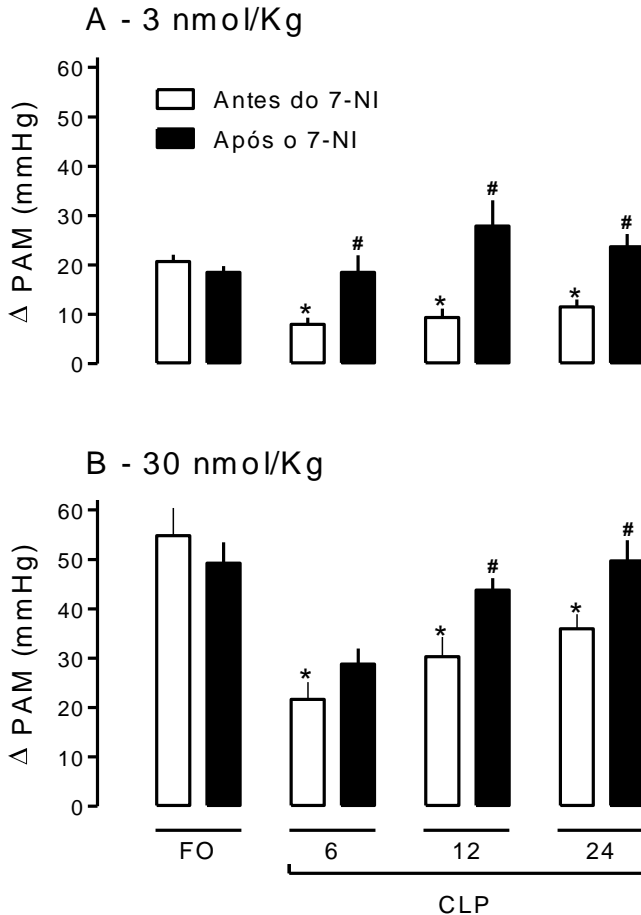
Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M da produção de NOx. n=4-8 por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo controle. (ANOVA de uma via, *post-hoc* de Newman-Keuls).

#### **4.2.3. Consequências da inibição das enzimas NOS-1 e NOS-2 sobre a reatividade pressórica de animais sépticos.**

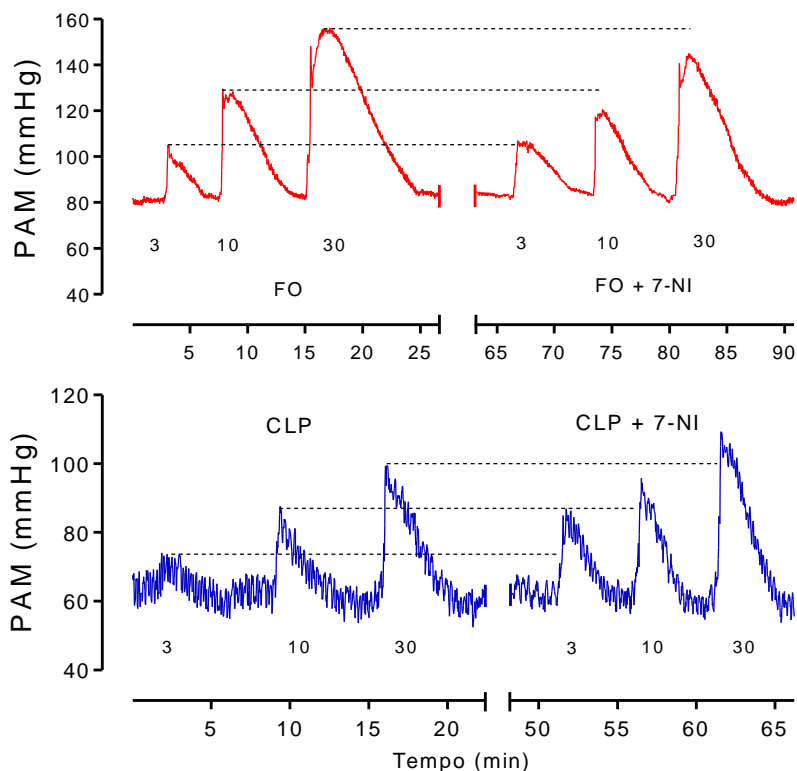
Após determinado que a dose de 30  $\mu\text{mol/Kg}$  de 7-NI inibe seletivamente a NOS-1, fomos investigar o efeito da inibição desta enzima sobre a reatividade pressórica. Seis horas após a indução da sepse, os animais apresentaram uma redução proeminente da resposta vasoconstritora à administração endovenosa de 3 e 30  $\text{nmol/Kg}$  de fenilefrina, quando comparados aos animais falso-operados. Além disso, esta hiporeatividade se manteve ao longo de 24 h (Figuras 6 e 7).

No entanto, a inibição da NOS-1 com 7-NI, reverteu a hiporeatividade vascular a fenilefrina em todos os tempos avaliados. Este efeito foi mais intenso para a menor dose de 3  $\text{nmol/Kg}$  do agonista adrenérgico (Figura 6, Painel A e B). Para uma melhor visualização deste efeito, a Figura 7 demonstra um registro típico do efeito do 7-NI sobre a resposta vasoconstritora a fenilefrina em animais CLP e sépticos.

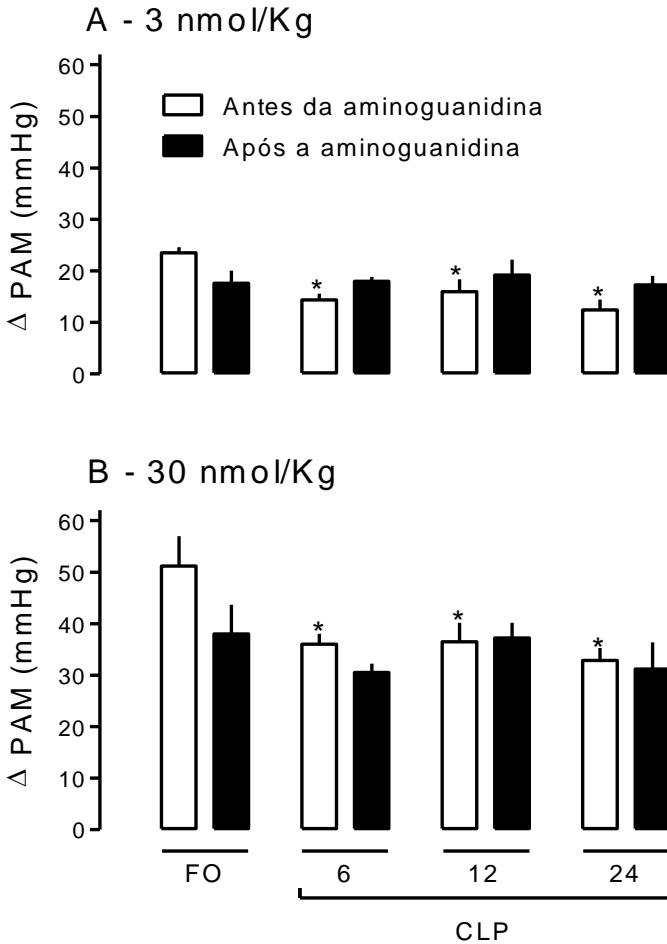
Além do estudo descrito acima, avaliamos o papel da NOS-2 sobre a reatividade pressórica no modelo de CLP. Em contraste com os resultados obtidos a partir da inibição da NOS-1, a inibição da NOS-2 com aminoguanidina, não reverteu a hiporeatividade vascular a fenilefrina induzida pela sepse em nenhum dos tempos avaliados (Figura 8).



**Figura 6. Efeito do 7-NI sobre a resposta vasoconstritora promovida pela fenilefrina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO). Seis, 12 e 24 horas após o procedimento cirúrgico os animais receberam duas doses consecutivas de fenilefrina (3 e 30 nmol/Kg, e.v.) antes (barras em aberto) e 20 minutos após (barras sólidas) da administração de 7-NI (30  $\mu$ mol/kg, s.c., **Painéis A e B**). Cada barra representa a média  $\pm$  o E.P.M. da variação da pressão arterial média de 5-12 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO e # $P < 0,05$  quando comparados com o grupo CLP antes da administração de 7-NI ou aminoguanidina (ANOVA de duas vias via, *post hoc* de Bonferroni).**



**Figura 7. Registros típicos da pressão arterial média mostrando o efeito do 7-NI sobre a resposta vasoconstritora promovida pela fenilefrina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).** Os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média e 24 h após, receberam três injeções consecutivas de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg, e.v.). Logo após, os animais receberam 7-NI (30  $\mu$ mol/Kg, s.c.) e 20 minutos após, as três injeções de fenilefrina foram novamente repetidas. As linhas pontilhadas representam o pico da pressão arterial média antes do tratamento com 7-NI e tem o objetivo de facilitar a observação das diferenças da pressão arterial média antes e após o tratamento com 7-NI.



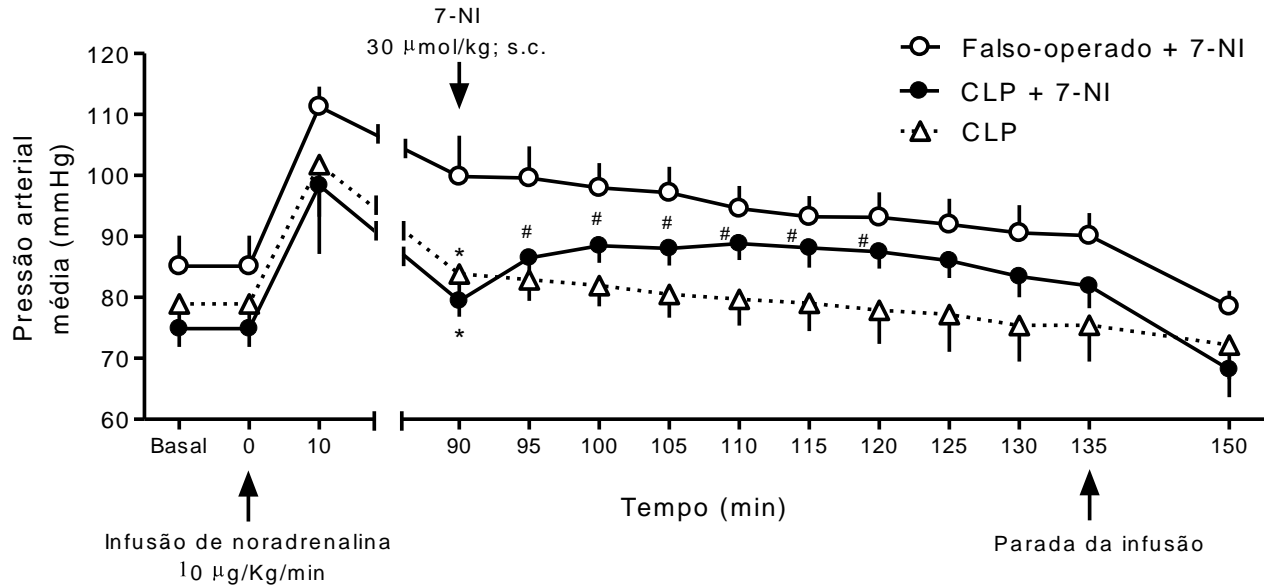
**Figura 8. Efeito da aminoguanidina sobre a resposta vasoconstritora promovida pela fenilefrina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO). Seis, 12 e 24 horas após o procedimento cirúrgico os animais receberam duas doses consecutivas de fenilefrina (3 e 30 nmol/Kg, e.v.) antes (barras em aberto) e 20 minutos após (barras sólidas) a administração de aminoguanidina (150  $\mu$ mol/kg, s.c., painéis A e B). Cada barra representa a média  $\pm$  o E.P.M. da variação da pressão arterial média de 5-12 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO e # $P < 0,05$  quando comparados com o grupo CLP antes da administração de 7-NI ou aminoguanidina (ANOVA de duas vias via; *post hoc* de Bonferroni).**



A administração endovenosa de fenilefrina não é indicada como terapia vasopressora inicial no tratamento do choque séptico (Dellinger *et al.*, 2008). A indicação é para a utilização de noradrenalina. Além disso, vasoconstritores durante a sepse não são administrados em *bolus*, mas sim, infundidos por longos períodos até o restabelecimento de níveis pressóricos adequados.

A infusão de noradrenalina (10µg/Kg/min) promoveu um aumento da PAM em ambos os grupos, falso-operados e CLP. Noventa minutos após o início desta infusão a PAM nos animais falso-operados havia reduzido em aproximadamente 10%. No entanto, nos animais sépticos esta redução foi muito maior (~23%), demonstrando a incapacidade dos animais sépticos para manterem a pressão arterial em níveis adequados, mesmo em presença de vasoconstritor (Figura 9).

A administração de 7-NI promoveu um aumento da MAP nos animais sépticos que foi mantida por ~30 minutos, sem no entanto afetar a MAP dos animais falso-operados (Figura 9). O tempo de 90 minutos foi escolhido porque a PAM dos animais sépticos na presença de vasoconstritor estava muito próxima à PAM basal, antes da infusão do vasoconstritor.



**Figura 9. Efeito do 7-NI sobre a vasoconstrição induzida pela infusão de noradrenalina em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).** Vinte e quatro horas após a CLP, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média (PAM). Após 10 min. de estabilização foi iniciada a infusão de noradrenalina (10  $\mu\text{g/kg/min}$ ). Noventa minutos após o início da infusão, os ratos receberam 7-NI (30  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) ou PBS. Cada ponto representa à média  $\pm$  E.P.M da MAP de 4-8 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  foram quando comparados com o grupo FO no tempo de 90 minutos e # $P < 0,05$  comparado com o grupo de CLP no tempo de 90 minutos. (ANOVA de duas vias; *post hoc* de Bonferroni).

#### **4.2.4. Determinação do conteúdo protéico e localização vascular das enzimas NOS-1 e sGC durante a sepse.**

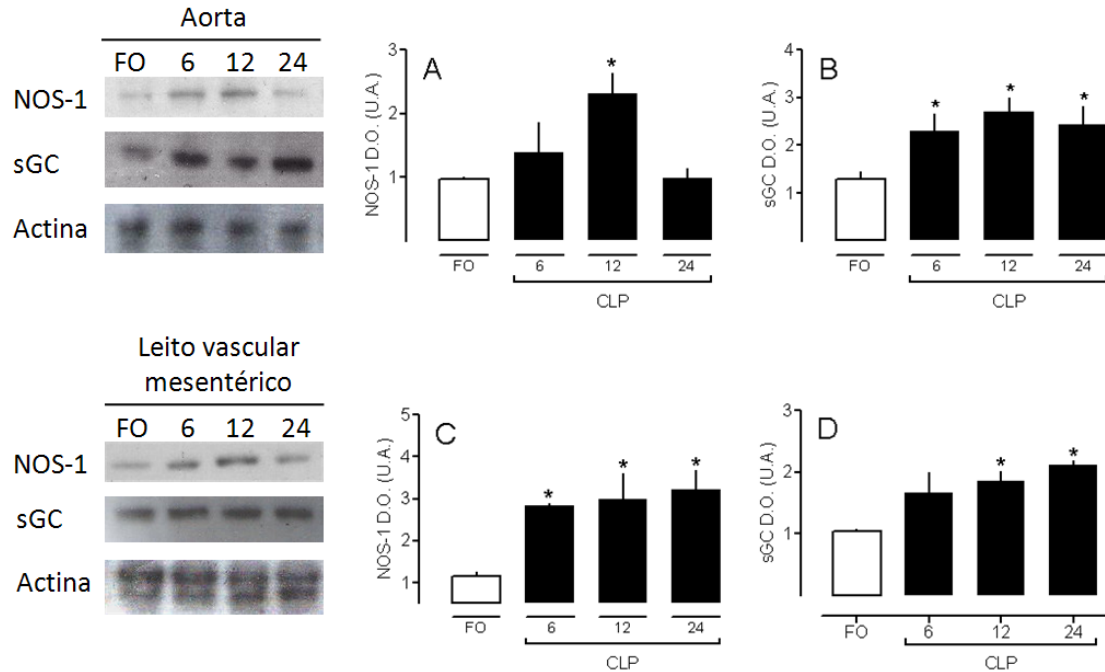
A fim de obter mais conhecimentos sobre a importância da NOS-1 e da sGC (o principal efetor vascular do NO) nas alterações vasculares da sepse, avaliamos a expressão de ambas as proteínas em vasos de condutância (aorta) e de resistência vascular (leito vascular mesentérico).

Nossos resultados demonstram que quantidade de ambas as proteínas está aumentada na artéria aorta e no leito vascular mesentérico. Os dados apresentados na Figura 10 indicam que, exceto para NOS-1 em 24 h, o conteúdo de ambas as enzimas permaneceu consistentemente acima dos níveis observados nas amostras do grupo controle durante o curso da sepse.

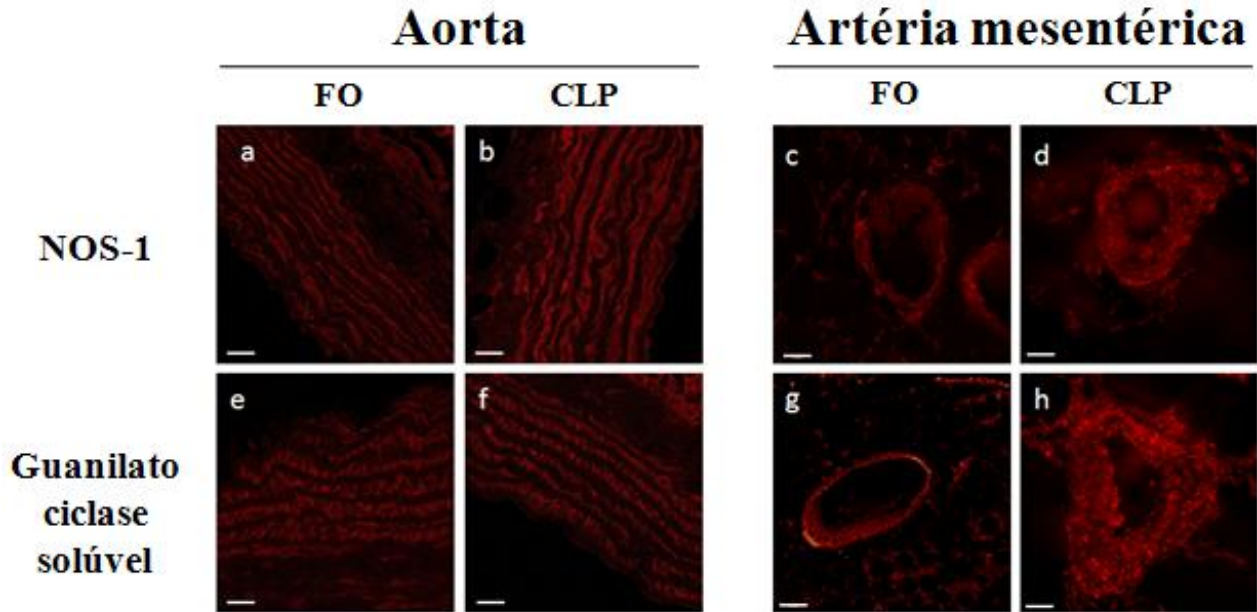
Além disso, a análise imuno-histoquímica de ambas as enzimas nos tecidos vasculares demonstrou que a NOS-1 e sGC estão presentes nos vasos, mais precisamente intercaladas nas camadas de músculo liso vascular, tanto nos animais sépticos quanto nos falso-operados. Além disso, no nível de resolução apresentado, a localização das enzimas parece ser idêntica nestes grupos (Figura 11).

Uma análise mais atenta da Figura 11, nos Painéis C e D, G e H, mostra que a parede da artéria mesentérica obtida de ratos CLP é mais espessa do que a de animais falso-operados. No entanto, não realizamos a quantificação da espessura e nem da densidade óptica relativa, uma vez que o objetivo deste experimento foi apenas determinar a localização espacial das enzimas nos tecidos vasculares (Figura 11).

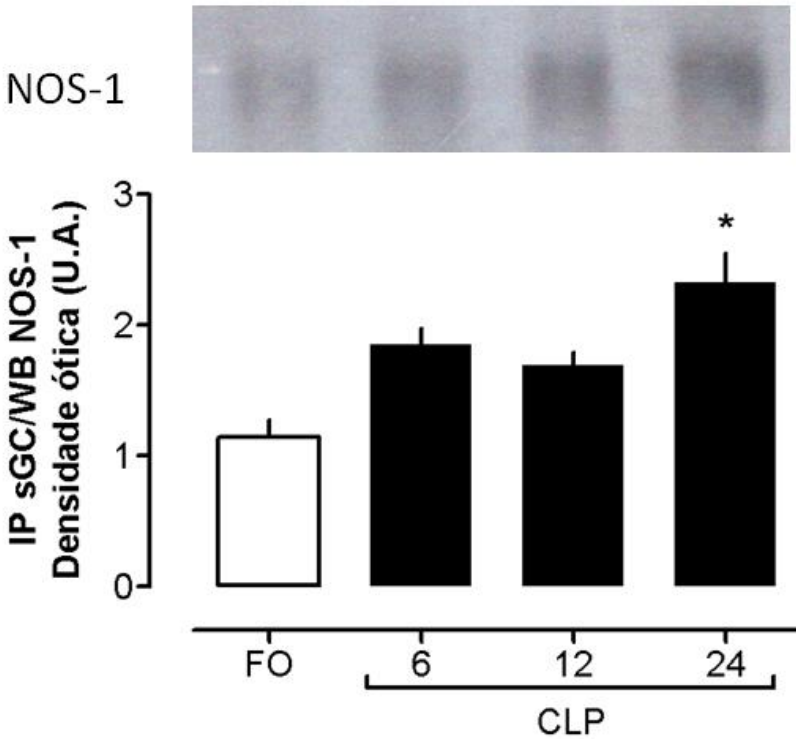
Os resultados da Figura 12 demonstram que NOS-1 e sGC estão fisicamente associadas durante a sepse. Quando o homogenato do leito vascular mesentérico foi imunoprecipitado com o anticorpo anti-sGC, a imunodeteção com o anticorpo NOS-1 foi positiva. A associação física entre as duas enzimas foi significativamente mais proeminente 24 horas após o início da sepse, embora possa ser observada em períodos anteriores. Os resultados referentes à imunoprecipitação da aorta foram inconclusivos (dados não apresentados).



**Figura 10. Avaliação dos níveis protéicos das enzimas óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) e guanilato ciclase (GC) em aorta e leito vascular mesentérico de animais sépticos (CLP).** Seis, 12 e 24 h após a cirurgia, os animais foram sacrificados e a aorta (**Painéis A e B**) e o leito vascular mesentérico (**Painéis C e D**) foram colhidos e processados. Cada barra representa a média  $\pm$  o erro padrão da média de 3-4 animais por grupo experimental. No lado esquerdo observa-se uma imuno eletroforese representativa da NOS-1 e GC. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo falso operado (FO) (ANOVA de uma via, *post hoc* de Newman-Keuls). D.O. densidade ótica. U.A. unidades arbitrárias.



**Figura 11. Imuno-histoquímica para as enzimas óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) e guanilato ciclase solúvel (sGC) na aorta e artéria mesentérica de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO). Os painéis superiores representam a NOS-1 e os inferiores a sGC. Os dados foram obtidos de cortes transversais da aorta e da artéria mesentérica de animais CLP (b, f, d, h) e FO (a, e, c, g), colhidas 12 h após a cirurgia. Devido ao tamanho da aorta, apenas um segmento do anel é mostrado. A barra branca no canto inferior esquerdo equivale a 20 micrometros.**



**Figura 12. Interação proteína:proteína entre as enzimas óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) e guanilato ciclase solúvel (sGC), no leito vascular mesentérico de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).** O leito vascular mesentérico foi colhido em 6, 12 e 24 h após a cirurgia de CLP. As amostras foram imunoprecipitadas com anticorpos anti-guanilato ciclase, e após a eletroforese e transferência, a imunomarcação foi realizada com anticorpos anti-NOS-1. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M das unidades arbitrárias (U.A.) da densidade ótica dos leitos mesentéricos de 2-3 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO (ANOVA de uma via seguido, *post hoc* de Bonferroni)

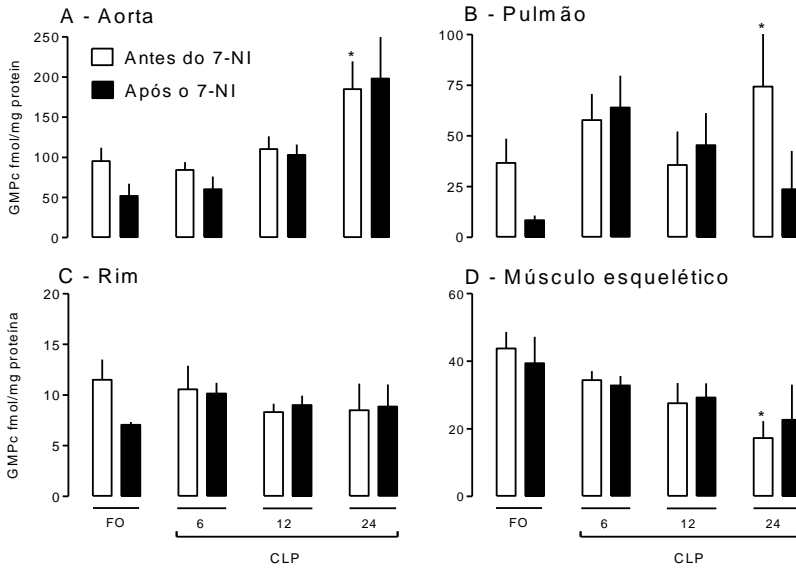
#### **4.2.5. Avaliação da influência da inibição da enzima NOS-1 sobre o acúmulo de GMPc em tecidos de animais sépticos “*in vivo*” e “*in vitro*”.**

Com objetivo de entender por qual mecanismo a inibição da NOS-1 reverte a hiporeatividade vascular na sepse, resolvemos avaliar os níveis tissulares de GMPc. A ativação da enzima sGC e consequente produção de GMPc é reconhecida como a principal via ativada pelo NO para promover vasodilatação. Desta forma, a avaliação do conteúdo de GMPc poderia fornecer informações valiosas acerca do possível mecanismo de ação.

A sepse induz um acúmulo de GMPc na aorta e pulmão de animais sépticos principalmente 24 h após a cirurgia de CLP (Figura 13, Painel A e B). No entanto, os níveis de GMPc não sofreram alteração no rim, e estavam reduzidos no músculo esquelético com a progressão da sepse (Figura 13, Painel C e D). O tratamento com 7-NI não alterou o conteúdo de GMPc em nenhum dos tecidos pesquisados.

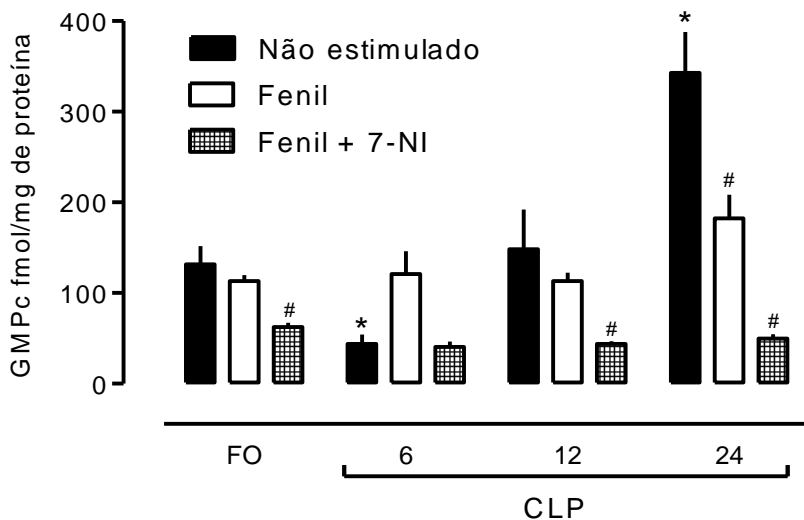
Devido à ausência de resultados positivos nos experimentos “*in vivo*”, investigamos se o estímulo com fenilefrina poderia influenciar a produção de GMPc. Nos experimentos “*in vitro*”, a produção de GMPc pela aorta de ratos sépticos é reduzida nas primeiras seis horas após a sepse. No entanto, em tecidos retirados 24 horas após a cirurgia, os níveis de GMPc são três vezes superiores aos dos animais falso-operados (Figura 14, barras abertas).

Quando estimulada com fenilefrina, a aorta de ratos falso-operados produziu a mesma quantidade de GMPc comparados com o tecido não-estimulado. O mesmo padrão foi observado em tecidos de animais CLP em 12 horas. No entanto, 24 horas após a CLP, a incubação da aorta com fenilefrina reduziu o acúmulo de GMPc em 50% (Figura 14, barras fechadas). A dependência do NO derivado da NOS-1 sobre o acúmulo de GMPc é evidenciado pelo bloqueio quase total da produção de GMPc causada pelo 7-NI nos vasos estimulados com fenilefrina em todos os tempos avaliados (Figura 14, barras hachuradas).



**Figura 13. Efeito do 7-NI sobre o acúmulo de (GMPC) em tecidos de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).** Os painéis demonstram o acúmulo de GMPC na aorta (A), pulmão (B), rim (C) e músculo estriado esquelético de animais (D) de animais FO e CLP (6, 12 e 24 h após o procedimento cirúrgico) antes (barras abertas) e 25 minutos após (barras fechadas) a administração de 7-NI (30  $\mu\text{mol/Kg}$ , s.c.). Cada barra representa a média  $\pm$  o E.P.M. do acúmulo de GMPC nos tecidos de 4-5 animais por grupo experimental.  $*P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO (ANOVA de duas vias; *post hoc* de Bonferroni).





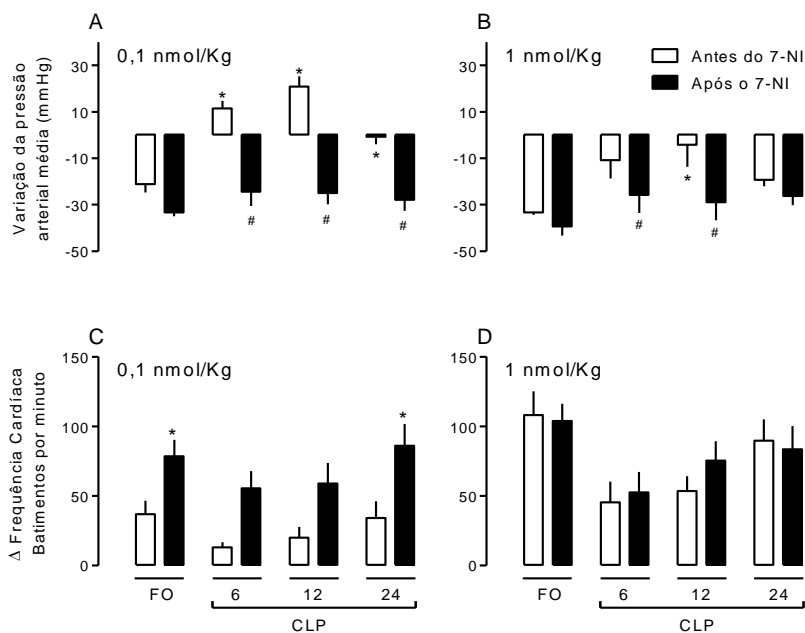
**Figura 14.** Efeito do 7-NI na presença de fenilefrina sobre a produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) pela aorta de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO). Os anéis de aorta foram retirados de ratos 6, 12 e 24 h após a cirurgia. Os grupos experimentais foram não-estimulados, (Controle, barras fechadas), estimulados com fenilefrina (1  $\mu$ M, barras abertas) ou incubados com fenilefrina na presença de 7-NI (30  $\mu$ M; barras cruzadas) durante 15 min. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 3-5 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO e <sup>#</sup> $P < 0,05$  quando comparados com o grupo antes da administração de 7-NI (ANOVA de duas vias; *post hoc* de Bonferroni)

#### **4.2.6. Consequências da inibição da enzima NOS-1 sobre a resposta pressórica de animais submetidos à CLP a agonistas $\beta$ -adrenérgicos.**

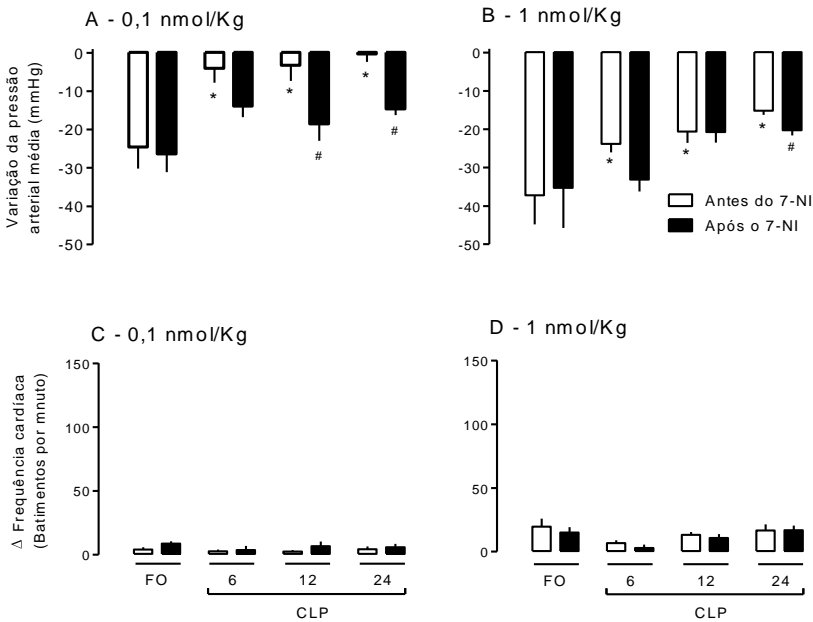
A sepse não induz apenas alterações na reatividade pressórica dos receptores alfa-adrenérgicos. Vários trabalhos demonstram a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, também estão comprometidas (Matsuda e Hattori, 2007). Por este motivo, resolvemos investigar se a inibição da NOS-1 poderia restabelecer a funcionalidade destes receptores nos tecidos vasculares.

A administração de isoprenalina (0,1 e 10 nmol/Kg) promoveu uma queda abrupta da pressão arterial e um aumento da frequência cardíaca quando administrada em animais falso-operados. No entanto, sepse induziu uma alteração importante na resposta pressórica à administração de isoprenalina, caracterizada pelo aumento da PAM. Este efeito foi mais proeminente na dose de 3 nmol/Kg, e nas fases iniciais da sepse (6 e 12 h) (Figura 15, Paineis A e B, barras abertas). Após o tratamento com 7-NI a resposta pressórica da isoprenalina foi prontamente restaurada nos animais sépticos, em todos os tempos avaliados (Figura 15, painéis A e B, barras fechadas). A inibição da NOS-1 promoveu ainda um aumento da frequência cardíaca em resposta a administração do agonista  $\beta$ -adrenérgico na dose mais baixa (0,1 nmol/Kg).

Para verificar de modo mais apurado a perda da resposta  $\beta_2$ -adrenérgica, nós utilizamos o fenoterol, um agonista  $\beta_2$ -seletivo. Do mesmo modo como o observado com a isoprenalina, ocorreu uma queda na pressão arterial dos animais falso-operados, sem, no entanto apresentar uma variação significativa da frequência cardíaca (característica da isoprenalina estimulando receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos). Do mesmo modo, o 7-NI restaurou a resposta vasodilatadora do agonista seletivo beta 2-adrenérgico, o fenoterol, em todas as doses, sem interferir na frequência cardíaca (Figura 16).



**Figura 15.** Efeito do 7-NI sobre a variação da pressão arterial média (A e B) e frequência cardíaca (C e D) promovida pela isoprenalina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO). Seis, 12 e 24 h após do procedimento cirúrgico os animais receberam duas doses consecutivas de isoprenalina (0,1 e 1 nmol/Kg, e.v.) antes (barras em aberto) e 20 minutos após (barras sólidas) a administração de 7-NI (30  $\mu$ mol/kg, s.c.). Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da variação da pressão arterial média e o  $\Delta$  da frequência cardíaca de 5-12 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO e # $P < 0,05$  quando comparados com o grupo CLP antes do tratamento com 7-NI (ANOVA de duas vias via, *post hoc* de Bonferroni).

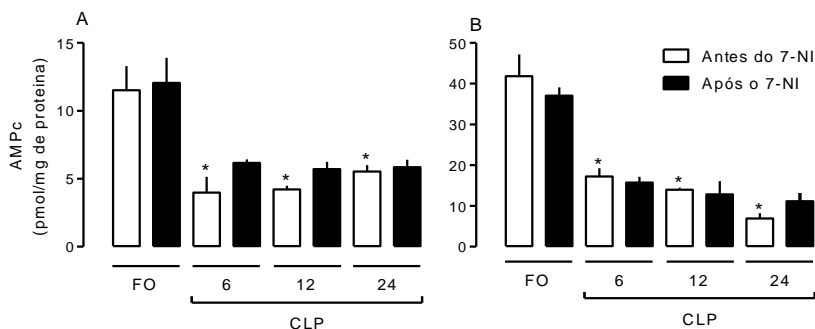


**Figura 16.** Efeito do 7-NI sobre a variação da pressão arterial média (A e B) e frequência cardíaca (C e D) promovida pelo fenoterol em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) ou falso-operados (FO). Seis, 12 e 24 h após o procedimento cirúrgico os animais receberam duas doses consecutivas de fenoterol (0,1 e 1 nmol/Kg, e.v.) antes (barras em aberto) e 20 minutos após (barras sólidas) da administração de 7-NI (30  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.). Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da variação da pressão arterial média e o  $\Delta$  da frequência cardíaca de 5-12 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO e # $P < 0,05$  quando comparados com o grupo CLP (ANOVA de duas vias; *post hoc* de Bonferroni)

#### 4.2.7. Efeito da inibição da enzima NOS-1 sobre o acúmulo de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) na aorta de animais sépticos.

O estímulo dos receptores beta-adrenérgicos nos vasos promove ativação da adenilato ciclase, via proteína G estimulatória, e promove vasodilatação devido ao aumento das concentrações de AMPC. Desta forma, verificamos se o restabelecimento da resposta vasodilatadora da isoprenalina pelo 7-NI poderia ser devido a um aumento no acúmulo de AMPC na aorta de animais sépticos.

As aortas de animais sépticos produziram menor quantidade de AMPC após estimulação com isoprenalina (Figura 17, Painel A, barras abertas) ou com forskolin, ativador direto da adenilato ciclase (Figura 17, Painel B, barras abertas) em todos os tempos avaliados. Curiosamente e diferente do esperado, a inibição da NOS-1 com 7-NI não influenciou o acúmulo deste segundo mensageiro (Figura 17, Painel A e B, barras fechadas).



**Figura 17. Efeito da inibição da NOS-1 sobre a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) em aortas de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO) estimuladas com isoprenalina e forskolin.** Os anéis de aorta foram retirados de ratos 6, 12 e 24 h após a cirurgia e estimulados com isoprenalina (0,1  $\mu$ M; **Painel A**) ou forskolin (100  $\mu$ M; **Painel B**) na ausência (barras abertas) ou na presença (barras fechadas) de 7-NI (30  $\mu$ M) durante 15 min. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 3-5 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO. (ANOVA de duas vias; *post hoc* de Bonferroni).

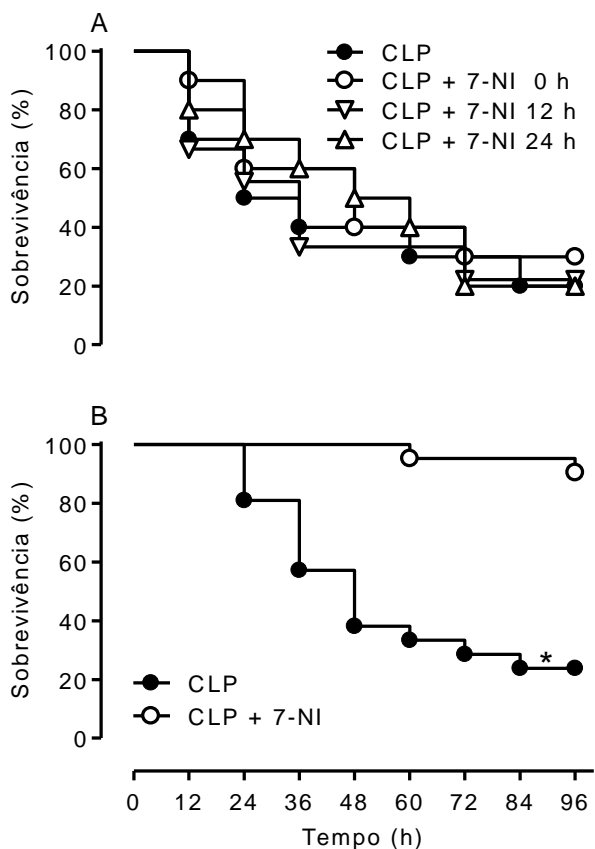
### 4.3. TERCEIRA PARTE – INFLUÊNCIA DA INIBIÇÃO PRÉVIA NOS-1 SOBRE A SEPSE.

Uma das características do 7-NI é a capacidade de reduzir os níveis protéicos da NOS-1 quando administrado previamente, e apesar de bem documentado, o mecanismo preciso deste efeito permanece a ser desvendado (Xu *et al.*, 2000). Com objetivo de determinar se a enzima NOS-1 pode influenciar a progressão da sepse, administramos o 7-NI durante uma semana e investigamos o efeito deste tratamento sobre diversos parâmetros normalmente utilizados para avaliar a gravidade da sepse.

#### 4.3.1. – Avaliação da Sobrevida

A sobrevida no grupo CLP começou a declinar 12 horas após a cirurgia, com mortalidade de aproximadamente 80% no quarto e último dia do experimento (Figura 18, painel A e B). O tratamento com 7-NI, logo após (0h) e em 12 e 24 h depois da cirurgia de CLP não modificou a mortalidade induzida pela sepse (Figura 18, Painel A).

Por outro lado, o grupo dos animais tratados previamente com 7-NI, durante uma semana, teve apenas 10 % de mortalidade. Além disso, os óbitos ocorreram apenas a partir da sexagésima hora após o procedimento cirúrgico (Figura 18, Painel B)

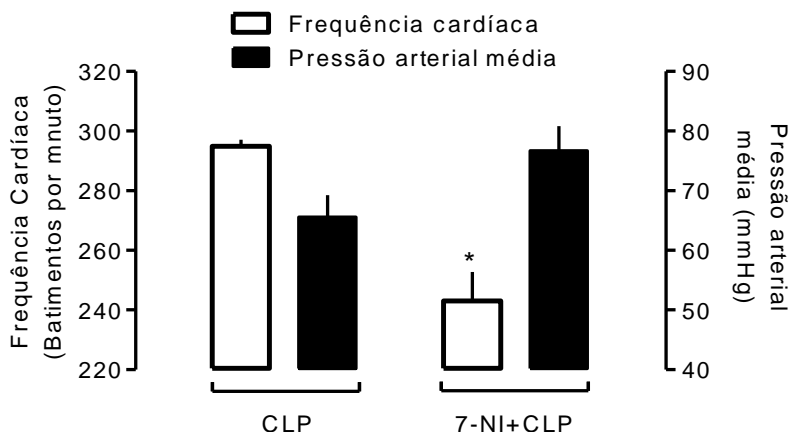


**Figura 18. Efeito do 7-NI na sobrevivência de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).** No Pannel A, os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de perfuração e ligadura do ceco (CLP). Um grupo recebeu 7-NI (30  $\mu\text{mol/Kg}$ , sc.) logo após a cirurgia (0 h), e os outros grupos receberam o inibidor 12 e 24 h após o procedimento. Além disso, todos os grupos tratados receberam o 7-NI a cada 12 horas, após o primeiro tratamento. No pannel B os animais foram tratados com 7-NI (12/12 h) durante uma semana. Seis horas após o último tratamento foram submetidos ao procedimento de CLP. Em ambos os grupos a sobrevivência foi avaliada ao longo de 96 h. \* $P < 0,05$  quando comparados ao grupo CLP. (logrank,  $n = 10-20$  por grupo).

#### 4.3.2. – Avaliação da PAM e reatividade pressórica.

O tratamento com 7-NI durante uma semana não alterou a PAM ( $76,7 \pm 4,1$  mmHg), quando comparada com a PAM dos animais que não receberam o tratamento ( $65,6 \pm 3,7$  mm Hg) com o inibidor da NOS-1.

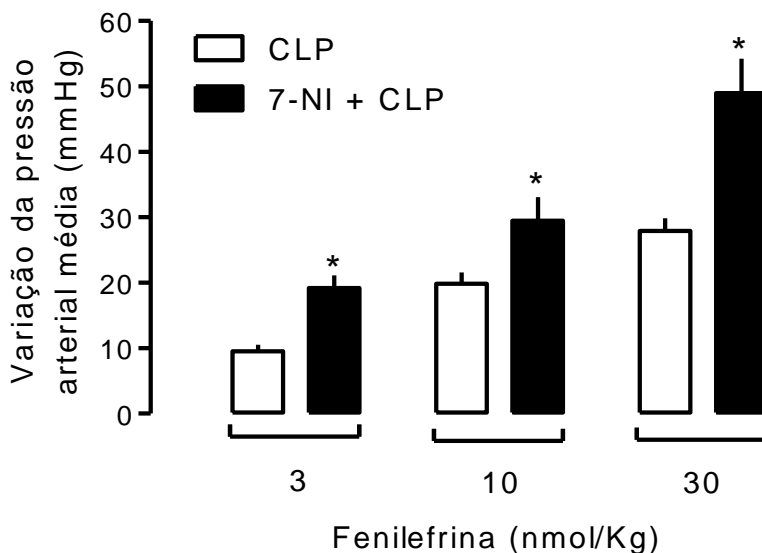
No entanto, a frequência cardíaca que estava reduzida em 17,5 % ( $294,8 \pm 2,3$  bpm) no grupo tratado com 7-NI, em relação aos animais que não receberam o 7-NI ( $243,0 \pm 9,8$  bpm) (Figura 19).



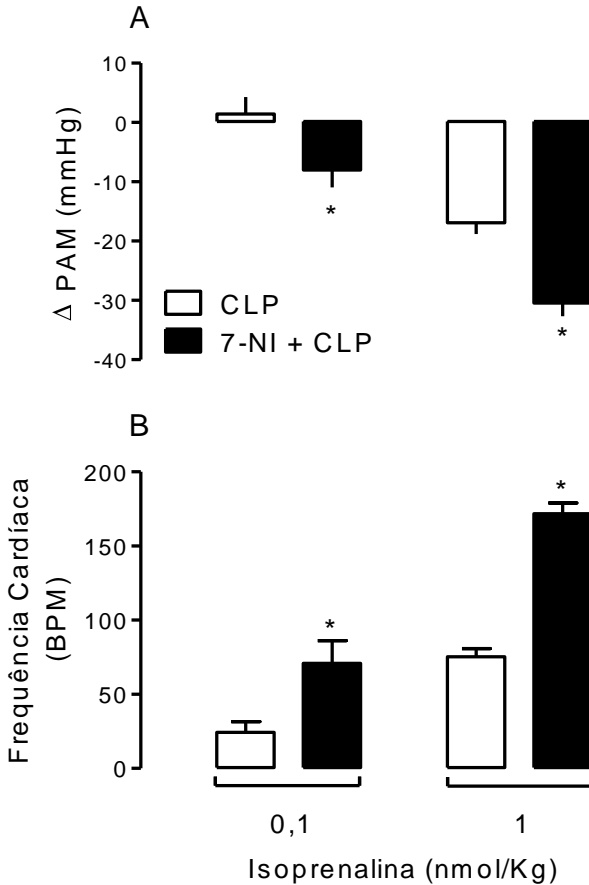
**Figura 19. Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre a pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).** Os animais foram tratados com 7-NI ( $30\mu\text{mol/Kg}$ , s.c., 12/12 h) por uma semana e então submetidos à cirurgia de CLP. Vinte e quatro horas após os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média (PAM). O painel demonstra a PAM (barras fechadas) e a frequência cardíaca (barras abertas). Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-11 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo que não tratado com 7-NI (teste “ $t$ ” de Student).



Os animais tratados previamente com 7-NI apresentaram uma maior resposta vascular à administração de fenilefrina, em todas as doses (Figura 20). Além disso, a queda da PAM e o aumento da frequência cardíaca promovida pela isoprenalina, em todas as doses, foram maiores do que as observadas no grupo que não recebeu o inibidor da NOS-1 (Figura 21).



**Figura 20. Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre a reatividade pressórica em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).** Os animais foram tratados com 7-NI (30 $\mu$ mol/Kg, s.c., 12/12 h) por uma semana e então submetidos à cirurgia de CLP. Vinte e quatro horas após os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média (PAM). O painel demonstra a reatividade pressórica frente à administração três doses consecutivas de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg, e.v.) em animais que receberam (barras fechadas) e não receberam (barras abertas) 7-NI por uma semana. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. de 6-11 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo não tratado com 7-NI (ANOVA de duas vias; *post hoc* de Bonferroni)



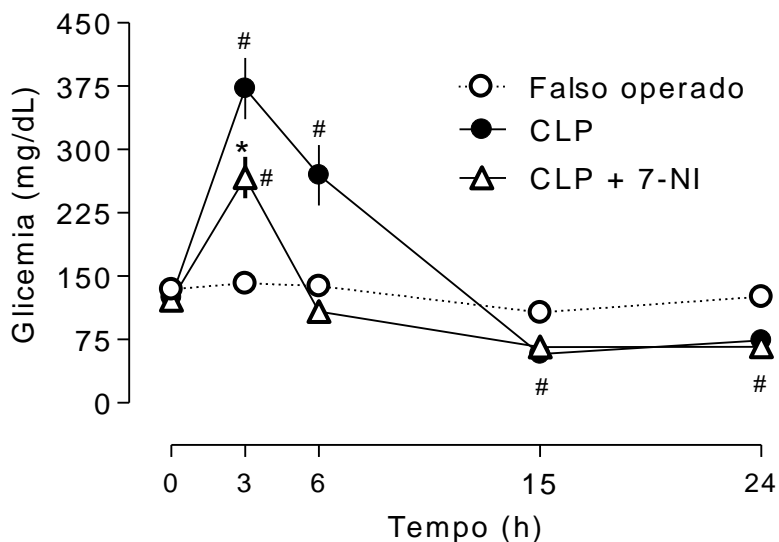
**Figura 21. Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre a variação da pressão arterial média (Painel A) e frequência cardíaca (Painel B) promovida pela administração de isoprenalina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).** Os animais foram tratados com 7-NI (30  $\mu\text{mol/Kg}$ , s.c., 12/12 h) por uma semana e então submetidos à cirurgia de CLP. Vinte e quatro horas após os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média (PAM) e receberam duas doses consecutivas de fenilefrina (0,1 e 1  $\text{nmol/Kg}$ , e.v.). As barras abertas representam os animais controle e as barras fechadas os que receberam 7-NI, ambas representam a média  $\pm$  o E.P.M. da variação da pressão arterial média e da frequência cardíaca de 5-12 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo controle (ANOVA de duas vias; *post hoc* de Bonferroni). BPM batimentos por minuto

### 4.3.3 – Avaliação da glicemia e do nível total de leucócitos sanguíneos.

A glicemia é um dos parâmetros indicativos da gravidade da sepse, bem como as alterações na quantidade de leucócitos sanguíneos.

Os animais sépticos tiveram uma intensa variação nos níveis glicêmicos. Na terceira e na sexta hora após a cirurgia observou-se uma intensa hiperglicemia, que evoluiu para uma hipoglicemia a partir da décima quinta hora (Figura 22).

O tratamento prévio dos animais com 7-NI, não normalizou completamente os níveis glicêmicos, mas atenuou a magnitude da hiperglicemia nas primeiras seis horas. No entanto, não impediu a hipoglicemia após a décima quinta hora.



**Figura 22.** Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre a glicemia e em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO). Os animais foram tratados com 7-NI (30  $\mu$ mol/Kg, s.c., 12/12 h) durante uma semana, e então submetidos à cirurgia de CLP. Antes da cirurgia (0) e 3, 6, 15 e 24 horas após o procedimento cirúrgico foram avaliados os níveis de glicemia. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  o E.P.M. da glicemia (mg/dL) de 4 – 8 animais por grupo experimental. \* $P < 0,05$  quando comparados com o grupo CLP. # $P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO (ANOVA de uma via; *post hoc* de Newman-Keuls).

A inibição prévia da NOS-1 também modificou o padrão da celularidade sanguínea durante a sepse. Nas primeiras 3 horas após o CLP os animais sépticos apresentaram uma intensa leucocitose. No entanto, a partir da décima quinta hora estes mesmos animais tornaram-se leucopênicos. O tratamento prévio com 7-NI preveniu a leucopenia tardia (Tabela 3).

Tabela 3. Efeito do tratamento prévio com 7-NI sobre o nível de leucócitos sanguíneos em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e falso-operados (FO).

Leucócitos sanguíneos totais ( $10^6$ )			
Tempo	CLP	7-NI + CLP	Falso-operado
0	$10,2 \pm 0,6$	$10,0 \pm 1,0$	$11,9 \pm 0,8$
3	$17,9 \pm 1,4^{\#}$	$12,4 \pm 0,9^*$	$11,1 \pm 0,4$
6	$11,0 \pm 1,9$	$5,7 \pm 0,9^{\#}$	$14,7 \pm 2,3$
15	$5,8 \pm 0,9^{\#}$	$18,8 \pm 1,8^*$	$14,8 \pm 1,6$
24	$8,0 \pm 1,2^{\#}$	$15,3 \pm 2,4^*$	$19,9 \pm 0,3^{\ddagger}$

Os resultados estão expressos como médias  $\pm$  E.P.M. de 4 – 8 animais por grupo experimental.  $^*P < 0,05$  quando comparados com o grupo CLP.  $^{\#}P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO.  $^{\ddagger}P < 0,05$  quando comparados com o grupo FO no tempo zero (0) (ANOVA de uma via; *post hoc* de Newman-Keuls).

## 5. DISCUSSÃO

As terapias utilizadas para o tratamento da sepse permanecem essencialmente inalteradas durante as últimas três décadas. A utilização de antibióticos de largo espectro, ressuscitação hemodinâmica e a manutenção da função dos órgãos continuam sendo ainda as terapias mais efetivas (Osuchowski, 2009).

As tentativas de se incluir no tratamento drogas que interferissem com o processo inflamatório, como os corticosteróides, mostraram-se efetivas apenas numa parcela de pacientes com sepse grave, principalmente naqueles com resposta inadequada à administração de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) (Annane *et al.*, 2002). O dotrecogin alfa (proteína C ativada recombinante), um agente que exibe atividade anti-inflamatória, anti-trombolítica e pró-fibrinolítica também se mostrou efetivo apenas nos casos de sepse grave. No entanto, em pacientes com baixo risco de morte, esta terapia aumenta o risco de hemorragias podendo ser até prejudicial (Abraham *et al.*, 2005). Do mesmo modo, as abordagens envolvendo fármacos vasopressores não evoluíram a contento. As linhas de pesquisa focaram apenas na comparação entre as drogas já existentes sem se preocupar em melhorar a resposta a estes agentes durante a sepse (Marik *et al.*, 1994; Martin *et al.*, 2000)

Não existe consenso também na utilização de sedação e analgesia em pacientes com sepse ou choque séptico. A dor é uma das principais causas de sofrimento para muitos pacientes de unidades de tratamento intensivo (UTI), devido às condições médicas subjacentes (como a síndrome de dor crônica), doença médica ou procedimentos cirúrgicos, bem como várias manobras de rotina em UTI, tais como ventilação mecânica, introdução de tubos e cateteres, efeitos colaterais dos medicamentos e da rotina de cuidado da enfermagem (Sessler e Wilhelm, 2008). Além disso, estudos em UTI revelaram que a dor, agitação e ansiedade podem provocar uma resposta ao estresse, levando a efeitos adversos, tais como aumento do consumo de oxigênio pelo miocárdio, hipercoagulabilidade, imunossupressão, alterações na ventilação e remoção de tubos endotraqueais e outros dispositivos. (Epstein e Breslow, 1999; Fraser *et al.*, 2000; Tipples *et al.*, 2000).

Assim como em seres humanos, acreditamos que os animais submetidos à cirurgia de CLP sentem dor. A CLP é o modelo mais utilizado para indução de sepse em roedores, porque se assemelha muito à patologia humana. É um procedimento invasivo, que provoca extenso

dano tecidual, como a abertura da cavidade abdominal e perfuração do ceco. De fato, da mesma forma que nos seres humanos, animais submetidos a modelos de injúria intestinal também apresentam sinais de desconforto, tais como piloereção, baixa mobilidade e atenção, déficit cognitivo, comprometimento da aprendizagem e memória, e sintomas característicos de depressão e ansiedade (Barichello *et al.*, 2005; Tuon *et al.*, 2007; Nakagawa *et al.*, 2007).

Portanto, não há razão para não acreditarmos que os animais submetidos a diferentes modelos de sepse não sintam dor e desconforto após o procedimento cirúrgico. Como descrito anteriormente, por razões éticas, vários grupos utilizam analgésicos nos modelos experimentais de sepse, sem, contudo levar em consideração a possibilidade de interferência destas drogas nos parâmetros avaliados.

Nós resolvemos investigar o efeito de três agonistas opióides no modelo de CLP. Os critérios que definiram a escolha dos analgésicos foram: opióides de utilização clínica em UTI, facilidade de aquisição, baixo custo e diferenças relacionadas ao perfil farmacológico. Os três fármacos que se enquadraram nos quesitos foram o fentanil, o tramadol e a codeína.

Ao contrário de um estudo recentemente publicado (Hugunin *et al.*, 2010), queríamos ter certeza de que as doses de opióides utilizadas neste estudo fossem de fato analgésicas. Deste modo, estudamos o efeito dos três opióides no teste de retirada da cauda. É importante notar que o modelo de dor utilizado envolve estímulo térmico. A dor visceral é difícil de avaliar em animais experimentais, tornando difícil estudar se a sepse induz ou não esse tipo de dor e se os opióides interferem com ela.

Nossos resultados mostram que os três opióides aumentaram a latência de resposta no teste de retirada da cauda. Animais não tratados, tanto CLP, quanto falso-operados, apresentaram a mesma latência de retirada da cauda, sugerindo que a cirurgia não induz hiperalgesia ou alodínia, pelo menos ao estímulo térmico.

Curiosamente, a Figura 1 mostra que doses de opióides que não causam analgesia em animais falso-operados são ativas no grupo CLP. Podemos especular neste caso que a redução do metabolismo hepático seja responsável pela analgesia mais intensa nos animais CLP, visto que a redução do fluxo sanguíneo hepático resultado da sepse altera substancialmente o metabolismo de fármacos (McKindley *et al.*, 1998). Realmente, o tempo de meia via plasmática da morfina foi aumentada em duas vezes e a eliminação sistêmica reduzida em 53 % em pacientes sépticos (Macnab *et al.*, 1986). Se o aumento da susceptibilidade dos

animais sépticos ao efeito analgésico dos opióides é consequência de razões farmacocinéticas ou farmacodinâmicas, este mecanismo ainda necessita de comprovação.

Outros sinais não quantificados no presente relato sugerem que os opióides realmente melhoraram o estado geral dos animais. Por exemplo, após a cirurgia os animais do grupo CLP apresentavam piloereção, olhos úmidos e fechados, tremores, postura curvada e falta de reação de fuga quando manipulados. Esses sinais foram diminuídos ou completamente abolidos após administração dos compostos analgésicos. Portanto, em qualquer caso, a analgesia pode ser obtida em animais sépticos com baixas doses de opióides em comparação com ratos falso-operados.

Além da analgesia, os opióides interferiram em parâmetros normalmente avaliados durante a sepse. Em doses analgésicas, tanto o tramadol quanto o fentanil normalizaram a pressão arterial. Já a perda da resposta vasoconstritora a fenilefrina induzida pela sepse não foi afetada pelo tramadol, mas foi abolida pelo fentanil. A melhora hemodinâmica induzida pelos opióides talvez constitua o achado mais importante do presente estudo. Portanto, futuros trabalhos que tenham como objetivo estudar as alterações hemodinâmicas na sepse e desejem utilizar tramadol ou fentanil em seus protocolos devem ter cautela na interpretação de seus resultados, pelo menos naqueles que usam o rato como animal experimental.

Apesar de promover analgesia e melhorar a resposta vasoconstritora da fenilefrina, o fentanil não modificou o curso ou a letalidade da mortalidade induzida pela sepse e também não afetou a sobrevivência dos animais falso-operados. O tramadol em baixas doses não influenciou a sobrevivência, mas doses mais elevadas aumentaram a mortalidade. Do mesmo modo, a codeína em ambas as doses testadas induziu um aumento na mortalidade, tanto em animais sépticos quanto falso-operados.

Os resultados aqui apresentados podem indicar que: a) existe uma janela de dose para o uso de opióides na sepse experimental, sem interferir com o seu curso natural; b) o aumento da mortalidade induzida por tramadol e, em menor grau, pelo fentanil pode ser dependente de outros mecanismos além da disfunção vascular, tais como a imunossupressão e depressão respiratória. Além disso, nossos resultados demonstram que o uso da codeína é certamente contra-indicado.

Os estudos de Hugunin *et al.*, (2010); demonstraram que o tramadol não afeta parâmetros imunológicos durante a sepse, mas promove um

aumento da mortalidade de camundongos após a cirurgia de CLP. Nosso estudo é limitado no contexto de que é válido para os ratos, na sepse induzida pela cirurgia de CLP. O efeito da analgesia opióide em outras espécies de animais deve ser avaliado em estudos posteriores. Em conclusão, apesar de o fentanil e o tramadol minimizarem a dor e o sofrimento geral dos animais submetidos à cirurgia de CLP, seus efeitos sobre parâmetros cardiovasculares, bem como na mortalidade indicam que o uso deve ser desaconselhado ou feito com cautela e com todos os grupos de controle adequados.

Portanto, nos estudos de caracterização da inibição da enzima NOS-1 sobre a disfunção vascular, optamos por não utilizar opióides, pelo fato de que estas drogas influenciam parâmetros hemodinâmicos durante a sepse.

A disfunção vascular é considerada uma das principais alterações hemodinâmicas que ocorrem durante a sepse, e manifesta-se na incapacidade dos vasos responderem a estímulos vasoconstritores e vasodilatadores. A hiporeatividade vascular é progressiva, e pacientes sépticos necessitam normalmente da infusão de grandes doses de agentes vasopressores para manutenção de níveis pressóricos adequados (Leone e Martin, 2008).

Não resta dúvida que produção excessiva de óxido nítrico (NO) durante a sepse contribui para a incapacidade dos leitos vasculares em responder a fármacos vasoconstritores ou vasodilatadores (vasoplegia) (Titheradge, 1999). Wu e colaboradores (1996) demonstraram que o tratamento com aminoguanidina, inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS-2), antes da administração de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) reduziu a hipotensão e melhorou a reatividade pressórica e a mortalidade subsequentes. Além disso, estudos posteriores mostraram que aminoguanidina, em altas doses, restaurava a resposta contrátil de aortas isoladas de animais endotoxêmicos (Erol e Koşay, 2000). Além disso, animais que não expressavam a NOS-2 eram resistentes aos efeitos deletérios do LPS (MacMicking *et al.*, 1995; Gunnett *et al.*, 1998).

Apesar de vários estudos demonstrarem que a inibição não-seletiva das enzimas óxido nítrico sintase (NOS) ou a inibição seletiva da NOS-2 melhora os parâmetros hemodinâmicos, não existe consenso de que esta abordagem farmacológica seja benéfica durante a sepse experimental. Alguns estudos têm demonstrado resultados contraditórios, em que a inibição da síntese de NO pode ser mais prejudicial do que benéfica (Park *et al.*, 1996; Fukatsu *et al.*, 1995).



A administração de inibidores não seletivos de NOS, como L-NMMA (L-N<sup>G</sup>-monometilarginina) ou com S-(2-aminoetil)-isotiluréia, não reduziram a mortalidade de animais submetidos à cirurgia de CLP (Strand *et al.*, 1997). Em outro estudo, a inibição da NOS-2 com aminoguanidina não preveniu o desenvolvimento da reatividade vascular nem modificou a sobrevivência dos animais CLP (Vromen *et al.*, 1996). Mesmo inibidores considerados mais seletivos da NOS-2 produziram um aumento na mortalidade em um modelo utilizando o LPS (Tracey *et al.*, 1995). Estas evidências sugerem que o NO proveniente da NOS-2 pode não ter um papel tão importante no modelo de CLP. Diferenças entre os modelos de agressão intestinal e administração de endotoxina, na dose de inibidores de NOS usados e o momento da inibição têm sido apontadas como algumas das variáveis que dificultam a reprodução de alguns resultados, mesmo utilizando o mesmo inibidor.

Outro fato relevante é de que o pico de expressão de NOS-2 ocorre por volta de 12 horas após o início da sepse experimental. No entanto, 24 horas após, o nível protéico e atividade da NOS-2 já não são suficientes para explicar a disfunção vascular tão intensa da fase tardia da sepse (da Silva-Santos *et al.*, 2002; Kadoi e Goto, 2004). Além disso, a expressão da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC - o principal efetor vascular do NO) aumenta junto com a sua atividade na aorta e pulmão de animais sépticos, nas fases mais tardias (Fernandes *et al.*, 2009). Neste caso, existe uma falta de sincronia entre a produção de NO via NOS-2 e o aumento do conteúdo protéico e atividade da sGC, que possa explicar um aumento tão grande da produção de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) nos momentos mais tardios da sepse.

Com base nessas evidências foi sugerido que se o conteúdo protéico da sGC estivesse elevado nas fases tardias, concentrações fisiológicas de NO (como os produzidos pela isoforma endotelial da NOS) seriam suficientes para causar a disfunção vascular durante a sepse grave/choque séptico (Fernandes *et al.*, 2009). Desta forma, o NO proveniente das NOS constitutivas desempenhariam um papel importante na hipotensão e hiporeatividade vascular. Por esta razão verificamos a influência do NO proveniente da NOS-1 sobre as alterações hemodinâmicas induzidas pela sepse, tanto na fase tardia (24 h), quanto nas fases iniciais (6 e 12 h).

Um dos objetivos mais importantes deste trabalho foi determinar se efetivamente estaríamos inibindo a isoforma neuronal da NOS. A seletividade do 7-NI para com a NOS-1 é aceita por alguns, mas

contestada por outros. Alguns autores afirmam que o 7-NI não inibe a enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS-3), uma vez que este composto não modifica a pressão arterial média (PAM) e não interfere na vasodilatação promovida pela acetilcolina (Moore *et al.*, 1993, Zagvazdin *et al.*, 1996; Wangenstein *et al.*, 2006; Cacanyiova *et al.*, 2009). Contestando esta afirmação, Wolff e colaboradores (1994), demonstraram que o 7-NI inibe a atividade da NOS-3 em células endoteliais bovinas. Além disso, outro grupo havia obtido resultados semelhantes sobre a atividade da NOS-2 em células de baço de ratos, apesar de ser seis vezes menos potente que o L-NAME (Babbedge *et al.*, 1993). Segundo Moore (1997), a seletividade do 7-NI “*in vivo*” se deve a fatores farmacocinéticos que não são reproduzidos em condições “*in vitro*”.

Desta forma, queríamos ter certeza de que a dose de 30  $\mu\text{mol/Kg}$  de 7-NI utilizada em nossos experimentos era realmente seletiva para a NOS-1. Reproduzimos em parte os experimentos de Moore *et al.*, (1993), e observamos que o 7-NI (Figura 5) foi incapaz de modificar a pressão arterial tanto em animais falso-operados quanto CLP. Este dado é indicativo de que este composto não exerce um efeito inibitório sobre a NOS-3, uma vez que a inibição desta isoforma aumenta a pressão arterial e também reduz a vasodilatação promovida pela acetilcolina (Moore *et al.*, 1993).

Além disso, a Figura 5 revela que a hipotensão em animais sépticos é dependente de NO, porque o inibidor não seletivo das NOS, o L-NAME, reverteu a hipotensão induzida pela sepse. No entanto, este NO não deve ser derivado da isoforma NOS-1, como mencionado anteriormente. Portanto, o NO derivado da NOS-2 e NOS-3 deve exercer um papel mais importante na hipotensão.

Curiosamente, a aminoguanidina (inibidor da NOS-2), também não modificou a PAM de ambos os grupos. O efeito inibitório deste composto sobre parâmetros hemodinâmicos é controverso e muito dependente do modelo de sepse e da dose utilizada, como relatada acima. No entanto, nossos resultados estão de acordo com os de Vromen e colaboradores (1996) e demonstram que, em nossas condições experimentais, a NOS-2 não participa da hipotensão induzida pela sepse.

Portanto, por exclusão, o NO proveniente da NOS-3 seria o responsável pela hipotensão. Este é um dado divergente dos demais, porque a disfunção endotelial é uma das principais características observadas durante a sepse.

Matsuda e colaboradores (2003 e 2004) demonstraram que a expressão da NOS-3 estava reduzida no leito vascular mesentérico de coelhos e pulmões de camundongos após a administração de LPS, e ainda observaram uma redução na fosforilação da NOS-3, sugerindo uma menor produção de NO por esta enzima (Matsuda, 2006). Estas observações foram confirmadas também no modelo CLP, onde a expressão da NOS-3 e a atividade das NOS constitutivas estavam reduzidas nos momentos mais tardios da sepse (Scott *et al.*, 2002). Sendo assim, dificilmente o NO proveniente apenas da NOS-3 seria responsável pela hipotensão.

Os nossos dados não permitem concluir de forma concreta o papel da NOS-3 na hipotensão porque não utilizamos um inibidor seletivo da NOS-3. Além disso, o bloqueio de uma das isoformas poderia aumentar a disponibilidade de substrato (L-arginina) para as outras NOS, que continuariam produzindo NO, mascarando assim um possível efeito inibitório. De fato, em homogenato de aorta de animais sépticos, a inibição da NOS-2 com aminoguanidina, aumentou a produção de NO pelas enzimas constitutivas (Scott *et al.*, 2002).

Fora isso, o resultado mais importante é que o 7-NI não interferiu com a atividade da NOS-3. Este achado é relevante no contexto de que a inibição não-seletiva da NOS foi testada experimental e clinicamente com consequências danosas (Liaudet *et al.*, 1998; López *et al.*, 2004). Sendo assim a inibição seletiva de apenas uma das isoformas pode não representar um dano tão considerável sobre a evolução da patologia.

Para verificar se a dose de 30  $\mu\text{mol/Kg}$  de 7-NI também inibia a NOS-2, estimulamos células de músculo liso vascular e macrófagos em cultura com LPS/IFN- $\gamma$ . Este estímulo causa ativação do fator de transcrição NF- $\kappa\text{B}$  e consequente aumento na expressão da NOS-2. A atividade desta enzima pode ser medida indiretamente pelo acúmulo de nitrito/nitrato no meio de cultura (Scheschowitsch, 2011). “*In vitro*”, o 7-NI bloqueou a atividade da NOS de células endoteliais e macrófagos e ativados com LPS/IFN- $\gamma$ , somente em concentrações superiores a 100 e 300  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Tabela 2). Por isso, assumimos que as concentrações utilizadas nos experimentos “*in vivo*” (30  $\mu\text{mol/kg}$ ) não estariam afetando a isoforma induzível.

De posse destas informações verificamos se a inibição da NOS-1 poderia interferir na reatividade pressórica a agentes vasoconstritores. Gocan e colaboradores (2000) já haviam relatado que a perda da resposta vasodilatadora à acetilcolina em músculos esqueléticos de

camundongos sépticos era restaurada pela inibição seletiva da NOS-1. Além disso, os níveis desta proteína estavam elevados e a reatividade não era restaurada pela inibição seletiva da NOS-2, sugerindo uma participação mais importante das NOS constitutivas na menor resposta vasodilatadora à acetilcolina.

Quando administrado agudamente em animais sépticos, o 7-NI restaurou prontamente a resposta vasoconstritora à fenilefrina em todos os tempos e doses avaliadas, sem interferir na resposta vascular dos animais falso-operados (Figuras 6 e 7). Estes dados complementam os citados anteriormente, de que o 7-NI, além de restaurar a resposta vasodilatadora à acetilcolina, melhora a resposta vasoconstritora à fenilefrina em todas as fases da sepse. Levando em conta que o 7-NI não alterou a pressão arterial basal, mas melhorou a resposta vasoconstritora à fenilefrina durante a sepse, parece razoável sugerir que o NO derivado da NOS-1 está contribuindo para a disfunção vascular na sepse.

Além disso, a inibição da NOS-2 com aminoguanidina não reverteu a hiporeatividade vascular à fenilefrina (Figura 8), demonstrando que, pelo menos em nossas condições experimentais, nem a hipotensão nem a hiporeatividade vascular a agentes vasoconstritores é dependente do NO sintetizado pela NOS-2.

A partir destes resultados podemos formular algumas questões importantes sobre a origem do NO produzida pela isoforma neuronal durante a sepse. A NOS-1 se encontra presente nas fibras não-adrenérgicas e não-colinérgicas (NANC) que inervam vários tecidos, inclusive músculo liso vascular. A ativação destas fibras promove vasodilatação de origem neurogênica, que é dependente de GMPc, induzida por NO e abolida por inibidores da sGC, como o ODQ (Schmidt *et al.*, 1993; Toda e Okamura *et al.*, 1996). Portanto um aumento da atividade ou expressão da NOS-1 nas fibras NANC, contribuiria para elevar a produção de NO na sepse e contribuir para o estabelecimento da disfunção vascular. Igualmente, parte deste NO pode também estar sendo produzido pelas próprias células do músculo liso, uma vez que a NOS-1 é expressa neste tecido (Boulanger, 1998).

Desta forma, avaliamos o conteúdo protéico e a localização da NOS-1 e da sGC em tecidos vasculares de animais sépticos. Os resultados da Figura 10 indicam claramente que os níveis protéicos da NOS-1 e sGC estão aumentados em vasos de condutância e de resistência de animais CLP. Resultados anteriores do nosso laboratório demonstraram que os níveis protéicos da sGC e produção de GMPc aumentaram com o desenvolvimento da sepse no pulmão e na aorta (Fernandes *et al.*, 2009).

Estes dados confirmam e expandem os citados anteriormente, que tanto NOS-1 e sGC são de fato induzidas em ambos os vasos de condutância e de resistência dos animais sépticos. Importante, a localização de ambas as enzimas parece ser a mesma tanto nos vasos de animais falso-operados quanto nos dos sépticos, intercaladas na camada muscular. Além disso, a localização/proximidade de ambas as proteínas poderia resultar em acoplamento e ativação mais eficiente da sGC pelo NO, contribuindo com a hiporeatividade vascular.

Sabe-se que a NOS-1 pode ser induzida sob certas condições patológicas, inclusive a sepse (Gocan *et al.*, 2000; Kwon *et al.*, 2007). Um dos fatores que poderiam contribuir para a síntese “*de novo*” da NOS-1 pode estar relacionado com a disponibilidade de oxigênio. Alterações na microvasculatura levam à redistribuição do fluxo sanguíneo durante a sepse, e este evento altera a disponibilidade de oxigênio dos tecidos. Sinais como pele cianótica, hipóxia tecidual e aumento nos níveis de lactato, são comuns em pacientes acometidos por esta patologia (Singer, 2008). Da mesma forma, modelos de endotoxemia têm fornecido evidências de anormalidades relacionadas com a utilização de oxigênio. A existência de um número maior de neutrófilos aderidos na microcirculação coronariana (Goddard *et al.*, 1995 e 1998) está associado com a heterogeneidade na distribuição do fluxo sanguíneo e extração diminuída de oxigênio pelo miocárdio (Herbertson *et al.*, 1995). Recentemente, Bateman e colaboradores (2008) demonstraram que o NO proveniente da NOS-2 desempenha um papel importante na redução da utilização de oxigênio pelo músculo esquelético de ratos submetidos à cirurgia de CLP.

A NOS-1 é particularmente regulada pela tensão de oxigênio. Ward e colaboradores (2005) demonstraram que durante a hipóxia crônica (12 a 48 h) ocorre um aumento da expressão/atividade desta proteína nas células do músculo liso vascular. Sob situação de oferta normal de oxigênio um promotor alternativo localizado no primeiro exon do gene da NOS-1 regula a transcrição de um mRNA deficiente, que não é traduzido em proteína. Durante a hipóxia, o mRNA da NOS-1 é transcrito sem a influência deste promotor, mais adiante, a partir do segundo exon. Desta forma, um mRNA alternativo é transcrito e traduzido de forma eficiente até a NOS-1 funcionalmente ativa. Portanto, a alteração dos níveis de oxigênio produz mudanças na estrutura do mRNA da NOS-1 que resulta em mudanças quantitativas nos níveis protéicos da NOS-1. Logo, podemos especular que o aumento

dos níveis protéicos da NOS-1 pode ser resultado das alterações na disponibilidade/utilização de oxigênio promovidas pela sepse.

Estudos publicados há alguns anos tem revelado um papel cada vez mais importante da associação física da NOS-1 com uma variedade de proteínas estruturais e regulatórias (para revisão ver Kone *et al.*, 2003). Utilizando um modelo experimental que induz hipertensão portal, Kwon e colaboradores, (2007) demonstraram que a vasodilatação esplâncnica observada nesta condição é devido a um aumento da expressão da NOS-1 e sua associação física proteína:proteína com a sGC. Mais interessante ainda é o fato de que associação física foi relacionada com a redução da PAM (Kwon, 2007).

A hipertensão portal é descrita como uma vasodilatação arterial periférica, inicialmente restrita ao leito esplâncnico, que evolui para acometer outros leitos vasculares, tornando-se sistêmica. O leito vascular mesentérico de animais com hipertensão portal apresenta reatividade reduzida a diversos vasoconstritores como adrenalina, angiotensina II e vasopressina, sendo este quadro de hiporeatividade revertido pela administração de inibidores não seletivos das NOS (Murray e Pailer, 1986; Castro *et al.*, 1993; Weighert *et al.*, 1995; Schrier *et al.*, 1998). Mesmo sendo uma patologia distinta da sepse, as semelhanças fisiopatológicas com as alterações vasculares da sepse são muito grandes. Portanto, resolvemos avaliar se a NOS-1 interagiria com a sGC nos leitos vasculares.

Nossos resultados mostram claramente que a NOS-1 e sGC interagem fisicamente durante a sepse, principalmente nos períodos mais tardios (Figura 12). Esta interação, especialmente no leito vascular mesentérico, pode sugerir uma ativação mais eficiente e compartimentalizada da sGC pelo NO. Resultados anteriores de nosso laboratório descreveram a perda progressiva da resposta vasoconstritora à fenilefrina no modelo de CLP. Essa perda foi associada com o aumento da expressão e atividade da sGC (Fernandes *et al.*, 2009). Naquela ocasião, foi sugerido que o NO derivado da NOS-3 seria a principal responsável pela ativação de sGC. Na verdade, a partir das observações do presente trabalho, a fonte mais provável de NO nos leitos vasculares, que contribui para hiporeatividade vascular, parece ser a derivada da NOS-1. A localização nas camadas de músculo liso vascular, associada à interação entre as duas proteínas pode proporcionar uma ativação mais íntima da sGC pelo NO, proporcionando uma maior eficácia e maior ativação sustentada da sGC, principalmente nos momentos mais tardios da sepse. Neste caso,

podemos supor ainda que não seja necessária a produção de grandes quantidades de NO para ativação da sGC, visto que pequenas quantidades neste ambiente compartimentalizado seriam suficientes para ativação da sGC e aumento na produção de GMPc.

A principal via efetora ativada pelo NO para promover vasodilatação envolve a sua ligação com o grupamento heme da sGC e consequente produção e acúmulo de GMPc no interior do músculo liso vascular (Lucas *et al.*, 2000). Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que existe um aumento nos níveis de GMPc na fase tardia da sepse, que foi correlacionado com hipotensão e hiporeatividade vascular tardia (Fernandes *et al.*, 2009). Desta forma resolvemos avaliar se a inibição da NOS-1 poderia reduzir o acúmulo de GMPc nos leitos vasculares revertendo assim a hiporeatividade vascular a fenilefrina.

De acordo com os resultados de Fernandes e colaboradores (2009), observamos que a sepse induziu um aumento dos níveis de GMPc na aorta e pulmão de animais sépticos (Figura 13). Expandindo ainda o estudo, verificamos que a sepse não alterou os níveis deste segundo mensageiro no rim, e ainda promoveu uma redução de GMPc no músculo esquelético. Este dado indica que, durante a sepse, a cinética de acúmulo de GMPc nos tecidos é heterogênea, que as conclusões baseadas em uma análise de um tipo específico de tecido não podem ser extrapoladas para todo organismo, pelo menos no que se refere ao conteúdo de GMPc.

Além disso, este dado pode representar um novo olhar sobre a reatividade pressórica durante a sepse. É bem conhecido que os leitos vasculares respondem de maneiras distintas ao estímulo vasoconstritor durante a sepse. A aorta e o leito vascular mesentérico normalmente apresentam reatividade reduzida à fenilefrina. No entanto, isso não acontece no rim. De fato, o leito renal apresenta sensibilidade normal à angiotensina II, noradrenalina e L-NAME durante a endotoxemia (Boffa e Arendshorst, 2005). Desta forma, a infusão de vasoconstritores poderia aumentar a pressão arterial média agindo em vasos pouco reativos, e causar constrição intensa de leitos vasculares que não são afetados pela sepse.

Portanto, podemos supor que leitos vasculares que produzam menos GMPc devam ser mais sensíveis à ação de vasoconstritores, comparados a vasos onde existe uma intensa produção deste nucleotídeo cíclico. Se estas alterações tecido-específicas nos níveis de GMPc podem representar mudanças na reatividade pressórica em diferentes tipos de tecidos durante a sepse, e/ou se são resultado de modificações na

atividade/expressão da sGC, e/ou refletem atividade diferenciada de fosfodiesterases em diferentes tecidos durante a sepse, são questões que ainda permanecem a ser melhor investigadas.

O que podemos afirmar de concreto é que apenas uma administração de 7-NI é insuficiente para reduzir o acúmulo de GMPc nos tecidos avaliados, sendo que apenas uma leve redução foi observada no pulmão, 24 h após o CLP. Desta forma, parece que o NO derivado da NOS-1 não altera a produção de GMPc. Contudo, estes resultados corroboram com dados de avaliação da PAM, uma vez que o 7-NI também não alterou a PAM (Figura 5), ou seja, caso promovesse redução no conteúdo de GMPc esperaríamos um aumento da PAM.

Ainda assim, não se pode descartar por completo a participação da NOS-1 na produção de GMPc durante a sepse, uma vez que administramos apenas uma dose de 7-NI, e talvez se o inibidor fosse injetado ou infundido por um tempo maior, poderíamos ter resultados significativos na redução de GMPc. Um dado que reforça essa hipótese é de que a infusão de 7-NI melhorou uma série de parâmetros hemodinâmicos e respiratórios em um modelo de sepse em ovelhas (Enkhbaatar *et al.*, 2003). Além disso, como a inibição da NOS-1 reverteu a hiporeatividade à fenilefrina, é possível supor que os efeitos do 7-NI dependam de um estímulo vasoconstritor para se tornarem visíveis.

Deste modo, verificamos o efeito da inibição da NOS-1 sobre o acúmulo de GMPc na aorta, “*in vitro*” e em presença de vasoconstritor (Figura 14). Nossos resultados mostram que a fenilefrina causou um pequeno aumento na produção de GMPc nas fases iniciais da sepse. No entanto, ela diminuiu de forma constante a produção de cGMP nos momentos mais tardios na sepse, período em que a NOS-1 e sGC estão interagindo fisicamente.

Agonistas adrenérgicos podem induzir a formação de GMPc que normalmente atenua a resposta vasoconstritora. Por exemplo, noradrenalina aumenta a produção de GMPc, agonistas seletivos do receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico promovem relaxamento, em parte devido à ativação da via NO-sGC-GMPc e mesmo agonistas seletivos de receptores alfa-1 adrenérgicos aumentam os níveis GMPc no leito mesentérico vascular (Bigaud *et al.*, 1984; Kamata e Makino, 1997; Hashimoto *et al.*, 1998; Molin e Bendhack, 2004).

Esta diferença na produção de GMPc nas aortas estimuladas com fenilefrina pode ser explicada em parte pela redução dos níveis de NOS-3 nas fases mais tardias, como já descrito anteriormente. Kamata e



Makino (1997), demonstraram que a metoxamina, agonista seletivo alfa-adrenérgico, induz a produção de GMPc nas artérias mesentéricas somente em presença de endotélio. Sendo assim, nas fases mais iniciais da sepse, a fenilefrina poderia aumentar a produção de GMPc via endotélio, que ainda estaria presente. No entanto, nas fases mais tardias, o aumento de GMPc via endotélio estaria prejudicado devido ao dano endotelial disseminado e conseqüente redução da atividade/expressão da NOS-3. Sendo assim, poderíamos esperar a diminuição do acúmulo de GMPc nas aortas estimuladas com fenilefrina nos momentos mais tardios da sepse (24 h).

Mais importante ainda é que 7-NI reduziu substancialmente a produção de GMPc em todos os períodos de sepse quando o vaso foi estimulado com fenilefrina. É tentador especular que pelo menos parte da melhora no efeito da fenilefrina causada pelo 7-NI pode ser devido a uma redução da produção de NO/GMPc.

Um dos mecanismos que pode estar envolvido com a perda da resposta vasoconstritora durante a sepse pode estar relacionado ao cálcio. A fenilefrina promove seu efeito vasoconstritor elevando os níveis intracelulares de cálcio. O estímulo dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos, que são acoplados a uma proteína Gq/11, ativa a enzima forfolipase C. Esta enzima promove a hidrólise do fosfatidilinositol, gerando inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG). O IP<sub>3</sub> e o DAG atuam como os segundos mensageiros, elevando os níveis de cálcio intracelular e ativando a proteína quinase C, respectivamente. O efeito final da estimulação dos receptores adrenérgicos é a contração do músculo liso vascular (Guimarães e Moura 2001).

Portanto, podemos especular que a elevação dos níveis de cálcio promovidos pela fenilefrina, nas células do músculo liso vascular, poderia ativar a NOS-1, devido ao aumento da expressão e interação com a sGC a subseqüente liberação de NO, o que elevaria os níveis de GMPc, contrapondo-se à resposta contrátil da fenilefrina. No entanto, experimentos adicionais devem ser realizados para comprovar esta hipótese.

Quando a pressão arterial de pacientes sépticos começa a diminuir e estes se tornam refratários à infusão de catecolaminas, a equipe da UTI tem um indício claro de que a sepse está se transformando em sepse grave e choque séptico. Deste ponto em diante, o prognóstico torna-se sombrio e mesmo com intervenções farmacológicas agressivas as taxas de mortalidade podem chegar a 80% (Quezado e Natanson 1992; Bernardin *et al.*, 1996). Neste estágio, grandes doses de catecolaminas

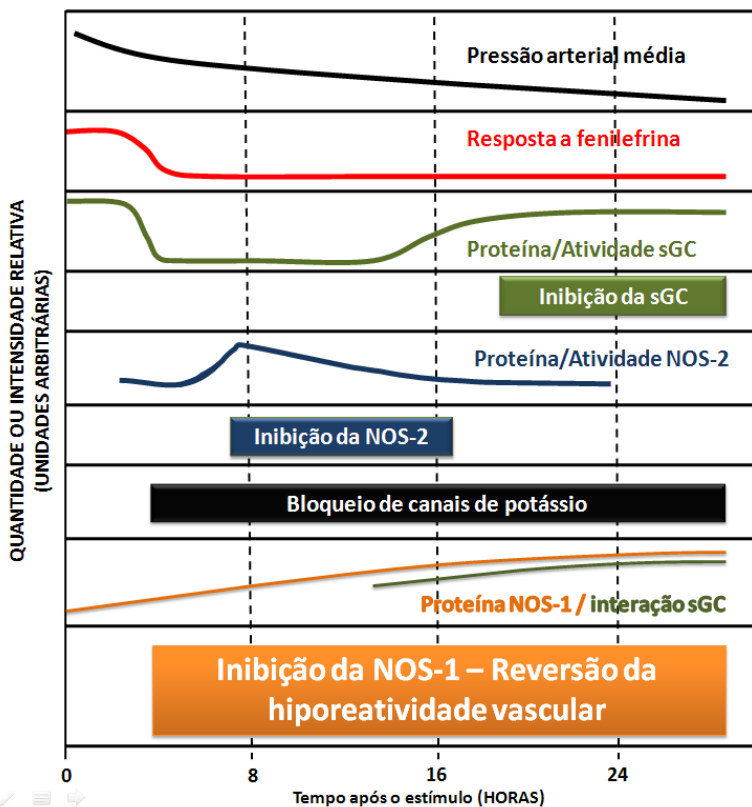
são infundidas em um esforço de elevar da pressão arterial a níveis que permitam a adequada perfusão dos órgãos (Benedict e Rose 1992; Georger *et al.*, 2010; Hamzaoui 2010). Quando bem sucedida, esta manobra está associada a um aumento da PAM, do fluxo nas artérias mesentéricas e melhora da oxigenação tecidual, se comparados com a reposição volêmica por si só (Bellomo 2003; Sennoun *et al.*, 2007).

A fenilefrina não é indicada como agente vasopressor inicial no choque séptico devido aos seus efeitos deletérios sobre as funções vasculares e cardíacas, quando comparados com outros vasoconstritores. Neste caso a indicação mais apropriada é a infusão de noradrenalina (Dellinger *et al.*, 2008). Além disso, vasoconstritores não são administrados em “bolus”, como no estudo da reatividade pressórica, mas sim infundidos por longos períodos.

Procurando simular as condições de tratamento com vasoconstritores a pacientes de UTI, infundimos noradrenalina em animais sépticos. A infusão desta catecolamina reproduziu as alterações vasculares encontradas na prática clínica, ou seja, a incapacidade dos vasoconstritores em para manter a pressão arterial estável em pacientes em choque séptico. Mais relevante, no entanto, foi que quando uma dose única de 7-NI foi administrada, ocorreu uma melhora imediata do efeito vasoconstritor da catecolamina.

Apesar de consistente, o efeito benéfico do 7-NI foi transitório, provavelmente devido à sua extrema meia-vida curta, na ordem de 30 min, para doses de 10 mg/kg (Bush e Pollac, 2000). Apesar dessa ressalva, este resultado mostra claramente que a inibição da NOS-1 pode ser benéfica na sepse, em especial nos seus estágios mais avançados. Este dado demonstra mais uma vez que o NO derivado da NOS-1 desempenha um papel importante na hiporeatividade a vasoconstritores adrenérgicos durante a sepse, mas não em animais saudáveis, visto que a mesma abordagem sobre animais falso-operados não resultou em nenhuma alteração da PAM.

A inibição seletiva da NOS-1 difere da de outros compostos utilizados para restaurar a reatividade pressórica durante a sepse. O ODO, inibidor seletivo da sGC, reverte a hiporeatividade apenas nas fases mais tardias (Fernandes *et al.*, 2009). Inibidores da NOS-2 revertem a hiporeatividade apenas nas fases iniciais da sepse, quando da presença de quantidades significativas de NO derivado da NOS-2 (da Silva-Santos, 2002). Nossos resultados indicam o 7-NI reverte a hiporeatividade em todas as fases da sepse. Para uma melhor interpretação e comparação dos dados ver Esquema 6.



**Esquema 6 - Possível decurso temporal das mudanças vasculares dependentes de NO durante a sepse ou choque séptico.** Após um estímulo inflamatório, a expressão e a atividade da enzima óxido nítrico sintase induzível (NOS-2) estão aumentadas elevando a produção de NO, que são implicados na mudança da reatividade pressórica, tais como a redução da resposta contrátil da fenilefrina e hipotensão progressiva. Estes efeitos combinados contribuem para o prejuízo da perfusão tecidual. O excesso de NO é igualmente responsável pela diminuição na atividade/quantidade da sGC (guanilato ciclase solúvel). A recuperação da resposta da sGC é dependente da síntese “*de novo*” da enzima. Os inibidores das NOS são eficazes em restaurar a reatividade pressórica somente nas fases mais iniciais da sepse, quando a expressão NOS-2 e produção de NO estão elevadas. Por outro lado, os inibidores da sGC são eficazes somente quando administrados nos períodos mais tardios, quando a atividade/quantidade da sGC é mais elevada. Os canais de potássio, por sua vez, parecem estar envolvidos nos efeitos do NO, tanto nos períodos iniciais, quanto mais tardiamente durante a sepse. Existe ainda um aumento da expressão e interação da NOS-1 com a sGC. A inibição da NOS-1 reverte a hiporeatividade vascular a fenilefrina, mas não a hipotensão.

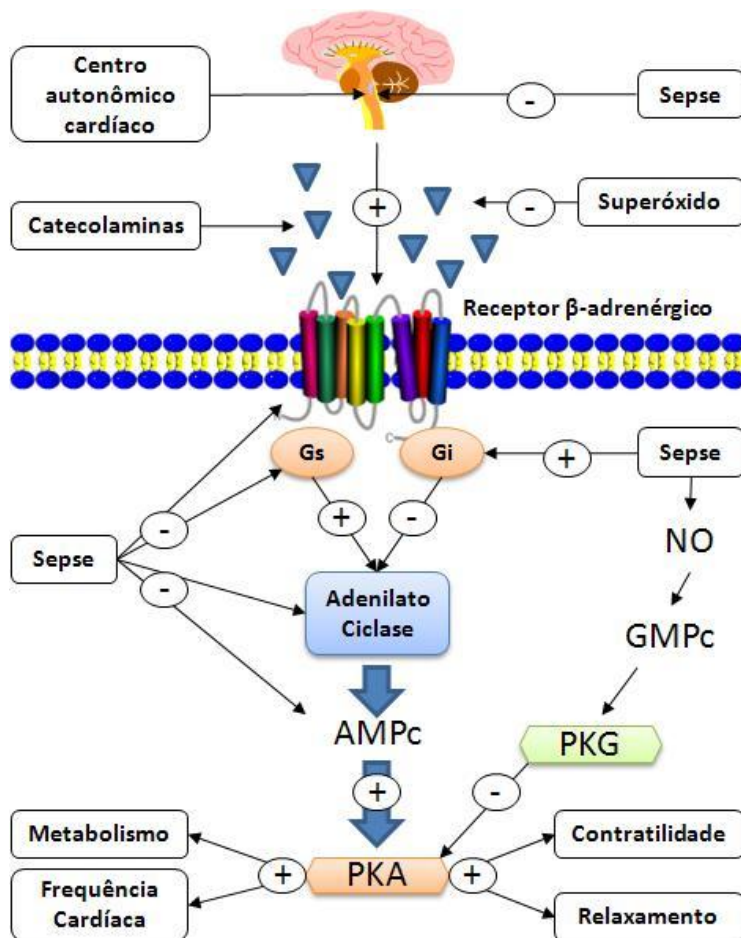
**Fonte:** Adaptado e modificado de Fernandes e Assrey, 2008.

Além disso, o tetraetilamônio (TEA), um bloqueador não seletivo dos canais de potássio, reverte a hiporeatividade vascular em ambas as fases (da Silva-Santos *et al.*, 2002). Os efeitos do 7-NI sobre a reatividade pressórica apresentam uma similaridade com as respostas do TEA (Esquema 6). Portanto, podemos sugerir que o NO proveniente da NOS-1 pode ser responsável por parte das alterações nos canais de potássio observadas na sepse.

A sepse induz alterações nos receptores beta-adrenérgicos e em suas vias de sinalização. O mecanismo preciso desta alteração permanece uma incógnita, mas se supõe que citocinas inflamatórias e principalmente o NO são mediadores importantes na redução da resposta dos tecidos a estimulação beta-adrenérgica. Um esquema das principais alterações provocadas pela sepse sobre os receptores beta-adrenérgicos pode ser visto no Esquema 7.

O aumento da quantidade de catecolaminas circulantes é observado tanto em humanos quanto em animais (Bocking *et al.*, 1979; Hahn *et al.*, 1995; Bernardin *et al.*, 1998). No entanto, a atividade destes mediadores sobre os tecidos é baixa, devido em parte a sua oxidação e inativação por espécies reativas de oxigênio (Macarthur *et al.*, 2000). A densidade dos receptores beta-adrenérgicos é menor durante a sepse e ocorrem ainda alterações nas vias de sinalização, tais como a redução das proteínas G estimulatórias e aumento das inibitórias. Estas mudanças reduzem a atividade da adenilato ciclase e conseqüentemente os níveis de AMPc (Rudiger e Singer, 2007).

A maioria dos estudos que relacionam a redução da resposta beta-adrenérgica durante a sepse tem como foco as alterações cardíacas. Nas fases mais tardias da sepse, após a administração de endotoxina, os animais apresentam redução na contratilidade cardíaca, principalmente pela redução na reatividade de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos (Bhagat *et al.*, 1970; Shepherd *et al.*, 1986). Os receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos têm uma redução de mais de 70% no fígado de animais sépticos, devido principalmente a um aumento na taxa de degradação e redução da estabilidade do RNAm. Além disso, a hiperglicemia observada nestes animais é associada à reduzida ativação deste receptor (Yang *et al.*, 1999).



**Esquema 7 – Via de sinalização adrenérgica.** Após o estímulo dos centros autonômicos cardíaco, a secreção de catecolaminas estimula os receptores  $\beta$ -adrenérgicos nos cardiomiócitos. Estes receptores são acoplados a adenilato ciclase, que transforma ATP (adenosina trifosfato) em AMPc (monofosfato cíclico de adenosina). As proteínas G, tanto estimulatórias (Gs), quanto inibitórias (Gi), promovem a transmissão dos sinais através da membrana. O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que fosforila grupos específicos de enzimas que estimulam o metabolismo, a contração e relaxamento do cardiomiócito e influenciam na frequência cardíaca. A sepsis promove alterações em vários pontos desta via de sinalização, principalmente pela produção de óxido nítrico (NO), monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e consequente ativação da proteína quinase G (PKG).

**Fonte:** Rudiger e Singer, 2007.

Certos de que a inibição da NOS-1 restaurava a resposta a fenilefrina, resolvemos investigar se o 7-NI poderia restaurar a resposta vascular beta-adrenérgica durante a sepse. Nossos resultados demonstram que existe uma redução da resposta hipotensora da isoprenalina (agonista  $\beta$ -adrenérgico não seletivo), em todas as fases da sepse (Figura 15). Curiosamente, a isoprenalina promoveu aumento da pressão arterial nas fases iniciais da sepse, e provavelmente este efeito não se deve a um aumento de frequência cardíaca dos animais CLP, uma vez que a isoprenalina não aumentou significativamente os batimentos cardíacos.

A perda de resposta  $\beta$ -adrenérgica é em parte devida à produção de NO pela NOS-1, uma vez que o 7-NI restaurou a resposta vasodilatadora da isoprenalina tanto na fase inicial, quanto na fase tardia. Além disso, promoveu um aumento significativo da frequência cardíaca nos momentos mais tardios da sepse e também em animais falso-operados.

O aumento da frequência cardíaca observada após a inibição da NOS-1 pode ser resultado da modificação das correntes de cálcio no miocárdio. A NOS-1 está fisicamente associada com proteínas que regulam o conteúdo de cálcio citoplasmático nos cardiomiócitos, como os canais liberadores de  $\text{Ca}^{2+}$  e as bombas de cálcio do retículo sarco/endoplasmático (SERCA) (Burkard *et al.*, 2007; Damy *et al.*, 2004). Estudos têm demonstrado que a inibição da NOS-1 está associada com aumento da amplitude das correntes de  $\text{Ca}^{2+}$  através do canal de cálcio do tipo L. Além disso, o NO derivado da NOS-1 inibe a resposta do miocárdio à estimulação  $\beta$ -adrenérgica (Ashley *et al.*, 2002; Heaton *et al.*, 2006). Portanto, parte do mecanismo de aumento da frequência cardíaca pode ser devido à redução da produção de NO pela inibição da NOS-1 e conseqüente melhora da resposta cardíaca à administração de isoprenalina.

A ação da isoprenalina não é seletiva, já que ela age nos três receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Como o objetivo principal era verificar a resposta  $\beta$ -adrenérgica vascular, utilizamos o fenoterol, um agonista  $\beta_2$ -seletivo. O fenoterol confirmou que a sepse induz a perda da funcionalidade do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico. Do mesmo modo, o 7-NI restaurou a resposta vasodilatadora do fenoterol para doses mais baixas deste vasoconstritor, demonstrando um papel importante do NO derivado da NOS-1. A ausência de alterações na frequência cardíaca confirma a seletividade do fenoterol sobre o receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (Figura 16).

A ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos gera um aumento intracelular de AMPc via ativação da proteína G estimulatória ( $G_{\alpha}$ ) acoplada ao receptor. Vários trabalhos têm demonstrado que a seps altera o teor intracelular de AMPc. A administração de LPS reduziu o acúmulo intracelular de AMPc após a administração de isoprenalina. Em coelhos, observou-se uma redução significativa dos níveis protéicos, e de RNAm da  $G_{\alpha}$ , associado ainda a uma menor atividade da adenilato ciclase. Os autores sugeriram que parte deste efeito seja resultado do excesso de NO produzido pela NOS-2 (Matsuda, 2000). Além disso, a produção de TNF- $\alpha$  reduz a geração de AMPc em linfócitos estimulados com isoprenalina, demonstrando que o TNF- $\alpha$  também pode modular as vias de sinalização do receptor  $\beta_2$ -adrenérgico durante a seps (Singh, 1993).

Por isso, verificamos se o efeito do 7-NI em melhorar a resposta  $\beta$ -adrenérgica durante a seps era dependente do aumento de AMPc. Observamos que nossos dados estavam de acordo com os da literatura, porque as aortas de animais sépticos produzem menos AMPc após a estimulação com isoprenalina e forskolin (ativador da adenilato ciclase), do que os vasos de animais falso-operados. Portanto, existe um prejuízo não somente do receptor  $\beta$ -adrenérgico, mas também da adenilato ciclase em produzir AMPc. Diferente do esperado, o 7-NI não interferiu na formação de AMPc induzido pela isoprenalina e pelo forskolin em ambos os grupos de animais (Figura 17).

Várias hipóteses podem ser formuladas para esta redução na formação de AMPc, tais como: i) redução dos níveis de ATP durante a seps, ii) acoplamento do receptor com proteínas G inibitórias, iii) redução da transcrição e do conteúdo de adenilato ciclase, iv) atividade excessiva de fosfodiesterases. Todas estas alterações reduziriam o conteúdo de AMPc. No entanto, como não obtivemos alteração do conteúdo de AMPc após inibição da NOS-1, nenhuma delas explica a melhora da resposta vasodilatadora de ambos os agonistas adrenérgicos utilizados neste estudo. Desta forma podemos concluir que a melhora da resposta vasodilatadora à isoprenalina e ao fenoterol, após inibição da NOS-1, é independente da formação/acúmulo de AMPc.

O bloqueio da formação de NO, melhorando o efeito vasodilatador de agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos pode parecer estranho, uma vez que parte do efeito vasodilatador de agonistas deste receptor, é derivada da síntese de NO, proveniente da fosforilação da NOS-3 em células endoteliais (Ferro *et al.*, 1999; Yao *et al.*, 2003; Michell *et al.*, 2001). Além disso,

o estímulo dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgico das fibras NANC aumenta a produção de NO via ativação da NOS-1, o que contribui para o efeito vasodilatador. Portanto, pelo menos em teoria, a inibição da NOS-1 reduziria a resposta vasodilatadora aos agonistas  $\beta_2$ -adrenérgicos. Ao que tudo indica, na sepse, este mecanismo é distinto das respostas fisiológicas normais. Portanto, o mecanismo pelo qual o 7-NI restaura a resposta vasodilatadora de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos permanece desconhecido. Um dado que contribui para esta exceção é o fato de que a inibição da NOS-1 restaura a resposta vasodilatadora à acetilcolina (mediada por ativação da NOS-3 no endotélio vascular) em vasos de músculo esquelético de ratos, reforçando mais uma vez o papel do NO derivado da NOS-1 na hiporeatividade vascular (Gocan *et al.*, 2000).

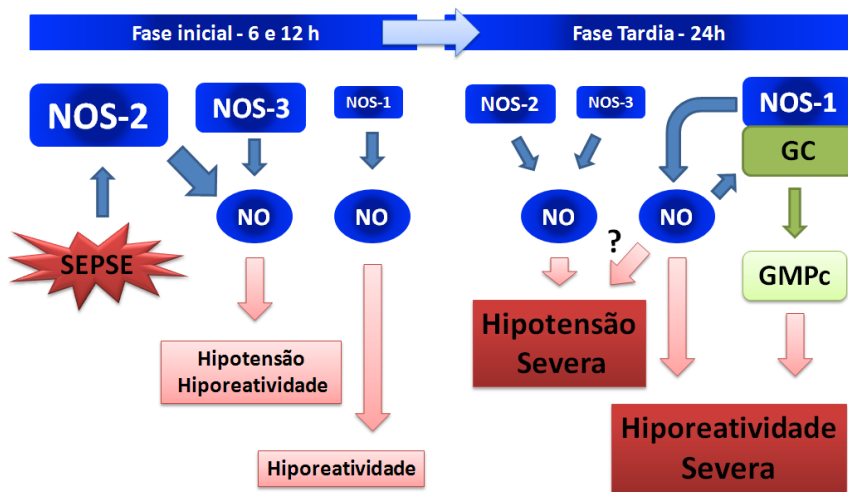
A possibilidade de se restaurar a resposta ao receptor  $\beta_2$ -adrenérgico durante a sepse não seria importante apenas do ponto de vista hemodinâmico. Agonistas deste receptor também exibem atividade antiinflamatória importante, inibindo a expressão de moléculas de adesão e de citocinas inflamatórias em monócitos (Kuroki *et al.*, 2004; Mizuno *et al.*, 2005). O aumento dos níveis de AMPc após estimulação do receptor beta-2 em células de cultura expostas ao LPS foi relacionado à redução da produção de NO, superóxido e TNF- $\alpha$  (Zhang *et al.*, 2002).

Além disso, recentemente, Tsao e colaboradores (2010) demonstraram que a administração de terbutalina (agonista seletivo  $\beta_2$ -adrenérgico) em animais sépticos reduziu a expressão de IL-1 e NOS-2 e, além disso, inibiu a migração de neutrófilos no pulmão e a produção de espécies reativas de oxigênio e de NO, no modelo de CLP. A redução da resposta inflamatória foi relacionada com a manutenção da PAM e a redução da mortalidade do grupo CLP. Portanto, o restabelecimento da função beta adrenérgica através da inibição da NOS-1 durante a sepse pode resultar numa redução do processo inflamatório, determinando um prognóstico mais favorável na evolução da sepse.

Após o exposto, podemos sugerir as possíveis fontes de NO que interferem na hiporeatividade vascular. Nas fases iniciais da sepse, a produção de NO derivado da NOS-2 e NOS-3 estaria relacionada com a instalação da hipotensão e da hiporeatividade vascular, sendo esta última em parte devido ao NO proveniente da NOS-1. Nas fases mais tardias, quando ocorre a redução dos níveis protéicos da NOS-2 e NOS-3, o NO proveniente da NOS-1 teria um papel mais importante. A associação física da NOS-1 e sGC poderia aumentar a produção de GMPc promovendo hiporeatividade mais severa e possivelmente



hipotensão arterial. Para um melhor entendimento deste processo, ver Esquema 8.



**Esquema 8 – Possíveis fontes de NO contribuindo para hipotensão e hiporeatividade vascular durante a sepse.**

**Fonte: o Autor**

Ao que tudo indica, o NO proveniente da NOS-1 não participa apenas da hiporeatividade aos vasoconstritores durante a sepse. A atividade desta enzima também exerce um papel importante no início da resposta inflamatória sistêmica. Duma (2005), demonstrou que o 7-NI, quando administrado 30 minutos antes da indução da sepse, bloqueia um pulso inicial de NO que seria responsável por melhorar diversos parâmetros avaliados durante a sepse. No entanto, alguns problemas, como a inacessibilidade a animais *knockout* para a isoforma neuronal da NOS, nos fez buscar métodos alternativos para reforçar a idéia de que o NO proveniente da NOS-1 influencia o início da sepse.

Certos compostos induzem a degradação da NOS-1. O tratamento com guanabenzol, L-NIO (*N*-5-(1-iminoetil)-L-ornitina) e L-NMA (*NG*-metil-L-arginina) e inibidores da Hsp 90 aumentam a degradação proteolítica por ubiquitinação e degradação proteolítica da NOS-1, via proteassoma (Noguchi *et al.*, 2000; Dunbar *et al.*, 2004). Xu e colaboradores (2000), demonstraram que o tratamento repetido com 7-

NI durante uma semana reduz os níveis protéicos de NOS-1 e a quantidade de GMPc. No entanto, a redução da NOS-1 pelo 7-NI não é devida à degradação proteolítica, e o mecanismo deste efeito ainda não foi esclarecido (Dunbar *et al.*, 2004).

Com o objetivo de verificar se a redução do conteúdo protéico de NOS-1 poderia interferir com o curso natural da sepse, administramos o 7-NI durante uma semana, e seis horas (12 meias-vidas) após a última administração do inibidor da NOS-1 os animais foram submetidos à sepse.

Os dados da Figura 18 mostram que o tratamento prévio com o inibidor da NOS-1, reduziu significativamente a mortalidade de animais sépticos. No entanto, quando o 7-NI foi administrado logo após o término da cirurgia de CLP, não modificou a sobrevivência dos animais CLP, indicando que o pulso de NO proveniente da NOS-1 acontece de maneira extremamente rápida, reduzindo a probabilidade de sobrevivência durante a sepse.

Os animais que foram tratados previamente com 7-NI apresentaram uma melhor condição hemodinâmica, a PAM foi mantida levemente mais elevada, a frequência cardíaca se manteve menor (Figura 19). A disfunção vascular foi menor nestes animais, eles apresentaram uma reatividade mais elevada à fenilefrina e à isoprenalina (Figuras 20 e 21).

A hiperglicemia é uma das alterações mais importantes que ocorrem a nível metabólico durante a sepse. Níveis elevados de glicose já foram determinados em humanos e animais sépticos. A hiperglicemia produz efeitos deletérios em pacientes com sepse, aumentando a adesão leucocitária ao endotélio, prejudicando a quimiotaxia e fagocitose e facilitando a coagulação intravascular disseminada. Além disso, níveis elevados de glicose aumentam a expressão de NOS-2 em ratos saudáveis (Turina *et al.*, 2005; Pacheco *et al.*, 2006).

Nossos resultados demonstram que o tratamento prévio com 7-NI atenuou a hiperglicemia induzida pela sepse, mas não reverteu a hipoglicemia tardia. A manutenção da função  $\beta$ -adrenérgica pode ter sido um fator decisivo na menor variação da glicemia nos animais tratados com 7-NI. Além disso, estes animais não apresentaram leucopenia proeminente na fase tardia da sepse, demonstrando que o 7-NI modifica a cinética leucocitária durante a sepse.

Ou seja, de maneira geral, a redução do conteúdo protéico da NOS-1 interferiu na evolução natural da sepse. Assim, os animais tiveram a sua condição hemodinâmica preservada, a hiperglicemia foi atenuada e o perfil da cinética leucocitária foi mais parecido com o dos animais falso-

operados e, em consequência, houve um aumento da sobrevivência dos animais CLP.

Recentemente, foi demonstrado em nosso laboratório que este pulso inicial de NO pode ser derivado tanto da NOS-1 quanto da NOS-3 e que está associado com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), em particular o superóxido, o que levaria à formação de peroxinitrito. A formação deste radical livre potencializaria a translocação nuclear de NF- $\kappa$ B e a ativação de sua cascata de sinalização, iniciando a transcrição de genes pró-inflamatórios e a expressão de enzimas inflamatórias como a NOS-2 (Scheschowitsch, 2011). Neste caso, a ausência deste pulso inicial de NO reduziria a ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B e consequentemente sua influência sobre a resposta inflamatória sistêmica. Pela falta de tempo hábil, não verificamos se o tratamento prévio com 7-NI reduz os níveis protéicos da NOS-3, o que confirmaria também a participação desta enzima no pulso inicial de NO. Apesar disso, nossos dados reforçam os obtidos por Duma (2005), e também sugerem que um pulso inicial de NO derivado da NOS-1 desempenha um papel importante no início da resposta inflamatória sistêmica da sepse.

Ao que tudo indica a inibição da NOS-1 não apresenta efeitos benéficos apenas no início da sepse. Enkhbaatar e colaboradores (2009) infundiram o ZK 234238, um novo inibidor mais seletivo para NOS-1 (CI<sub>50</sub> para NOS-1, NOS-3 e NOS-2 de 0,38 mM, 11,5 mM e 200 mM respectivamente). Este composto, quando infundido uma hora após a indução da sepse, atenuou a hipotensão, diminuiu os níveis plasmáticos de NOx e o edema pulmonar. Além do mais, atenuou a resposta inflamatória reduzindo a atividade da mieloperoxidase, a expressão de IL-6 e a produção de espécies reativas de oxigênio, sugerindo um papel da NOS-1 mais abrangente na promoção da disfunção orgânica do que apenas no início da resposta inflamatória. Portanto a inibição seletiva da NOS-1 pode ser uma ferramenta útil para controlar as disfunções orgânicas que ocorrem durante a sepse.

Nosso trabalho representa uma mudança de paradigma na fisiopatologia da sepse, pois determina que as alterações hemodinâmicas não sejam exclusivas do NO proveniente da NOS-2. Além disso, parte do NO estaria sendo produzido dentro do próprio músculo liso vascular pela NOS-1. A interação da NOS-1 com a sGC, facilitaria a produção de GMPc, principalmente nas fases mais tardias contribuindo para hipotensão e hiporeatividade severa durante a sepse. Mais do que isso, este trabalho abre caminho para uma abordagem farmacológica mais racional em um momento crítico da sepse, a fase tardia.



## 6. CONCLUSÕES

A partir do exposto podemos concluir que:

1. Animais sépticos são sensíveis aos efeitos analgésicos de drogas opióides em modelo de dor por estímulo térmico.
2. Doses baixas de opióides não interferem na sobrevivência de animais sépticos, enquanto que doses maiores aumentam a mortalidade.
3. Analgésicos opióides reduzem a hipotensão e a hiporeatividade vascular induzidas pela sepse.
4. O NO proveniente da NOS-1 não participa na hipotensão induzida pela sepse, mas é responsável em parte, pela hiporeatividade vascular a agonistas  $\alpha$  e  $\beta$ -adrenérgicos.
5. A inibição da NOS-2 não reverteu a hipotensão e hiporeatividade a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos no modelo de CLP.
6. Nos momentos mais tardios, a enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1) interage fisicamente com a guanilato ciclase solúvel (sGC).
7. Parte do mecanismo de reversão da hiporeatividade a agonistas  $\alpha$ -adrenérgicos se deve à redução na formação de GMPC.
8. O mecanismo de melhora da resposta  $\beta_2$ -adrenérgica promovida pela inibição da síntese de NO pela NOS-1 durante a sepse é independente do aumento AMPc.
9. As alterações promovidas pelo NO proveniente da NOS-1 no início da sepse, estão relacionadas com a instalação da hipotensão, disfunção vascular, alterações na glicemia e nos níveis de leucócitos sanguíneos. A redução do conteúdo enzimático da NOS-1, reduz ou abole as alterações patológicas induzidas pela sepse.



## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abraham E, Laterre PF, Garg R, Levy H, Talwar D, Trzaskoma BL, François B, Guy JS, Brückmann M, Rea-Neto A, Rossaint R, Perrotin D, Sablotzki A, Arkins N, Utterback BG, Macias WL. Drotrecogin alfa (activated) for adults with severe sepsis and a low risk of death. **N Engl J Med.** 353: 1332-1341, 2005.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J.** 357: 593-615, 2001.
- Annane D, Sébille V, Charpentier C, Bollaert PE, François B, Korach JM, Capellier G, Cohen Y, Azoulay E, Troché G, Chaumet-Riffaud P, Bellissant E. Effect of treatment with low doses of hydrocortisone and fludrocortisone on mortality in patients with septic shock. **JAMA.** 288: 862-871, 2002.
- Arnalich F, Garcia-Palomero E, Lopez J, Jiménez M, Madero R, Renart J, Vázquez JJ, Montiel C. Predictive value of nuclear factor kappaB activity and plasma cytokine levels in patients with sepsis. **Infect Immun.** 68: 1942-1945, 2000.
- Asakura H, Watarai M, Shirahata T, Makino S. Viable but nonculturable *Salmonella* species recovery and systemic infection in morphine-treated mice. **J Infect Dis.** 186: 1526-1529, 2002.
- Ashley EA, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B. Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and b-adrenergic contractility in murine ventricular myocytes. **Circulation.** 105: 3011-3016, 2002.
- Atochin DN, Demchenko IT, Astern J, Boso AE, Piantadosi CA, Huang PL. Contributions of endothelial and neuronal nitric oxide synthases to cerebrovascular responses to hyperoxia. **J Cereb Blood Flow Metab.** 23: 1219-1226, 2003.
- Babbedge RC, Bland-Ward PA, Hart SL, Moore PK. Inhibition of rat cerebellar nitric oxide synthase by 7-nitroindazole and related substituted indazoles. **Br J Pharmacol.** 110: 225-228, 1993.
- Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. **Crit Care Med.** 33: 221-223, 2005.
- Bateman R, Walley K. Microvascular resuscitation as a therapeutic goal in severe sepsis. **Critical Care.** 9: S27:S32, 2005.
- Bateman RM, Sharpe MD, Goldman D, Lidington D, Ellis CG. Inhibiting nitric oxide overproduction during hypotensive sepsis increases local oxygen consumption in rat skeletal muscle. **Crit Care Med.** 36: 225-231, 2008.

- Bauer PR. Microvascular responses to sepsis: Clinical significance. **Pathophysiol.** 8: 141-148, 2002.
- Bauser-Heaton HD, Bohlen HG. Cerebral microvascular dilation during hypotension and decreased oxygen tension: a role for nNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293: H2193-H2201, 2007.
- Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc Natl Acad Sci.** 87: 1620-1624, 1990.
- Bellomo R, Giantomasso D. Noradrenaline and the kidney: friends or foes? **Critical Care.** 5: 294-298, 2001.
- Bellomo R. Noradrenaline: friend or foe? **Heart, Lung and Circ.** 12: S42-S48, 2003.
- Benedict CR, Rose JA. Arterial norepinephrine changes in patients with septic shock. **Circ Shock.** 38: 165-172, 1992.
- Benjamin CF. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de seps. **Medicina, Ribeirão Preto.** 34: 18-26, 2001.
- Bernardin G, Pradier C, Tiger F, Deloffre P, Mattei M. Blood pressure and arterial lactate level are early indicators of short-term survival in human septic shock. **Intensive Care Med.** 22: 17-25, 1996.
- Bernardin G, Strosberg AD, Bernard A, Mattei M, Marullo S. Beta-adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylate cyclase is impaired during severe sepsis in humans. **Intensive Care Med.** 24: 1315-1322, 1998.
- Bhagat B, Cavanaugh D, Merrild BN, Rana MW, Roa PS: Noradrenaline and tyramine action on isolated atrial muscle of endotoxin-treated guinea-pigs. **Br J Pharmacol.** 39: 688-695, 1970.
- Bigaud M, Schoeffter P, Stoclet JC, Miller RC. Dissociation between endothelium-mediated increases in tissue cGMP levels and modulation of aortic contractile responses. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** 328: 221-223, 1984.
- Bocking JK, Sibbald WJ, Holliday RL, Scott S, Viidik T. Plasma catecholamine levels and pulmonary dysfunction in sepsis. **Surg Gynecol Obstet.** 148: 715-719, 1979.
- Boffa JJ, Arendshorst WJ. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock. **J Am Soc Nephrol.** 16: 117-124, 2005.
- Böhme GA, Bon C, Lemaire M, Reibaud M, Piot O, Stutzmann JM, Doble A, Blanchard JC. Altered synaptic plasticity and memory



- formation in nitric oxide synthase inhibitor-treated rats. **Proc Natl Acad Sci.** 90: 9191–9194, 1993.
- Boissel JP, Schwarz PM, Förstermann U. Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. **Nitric Oxide.** 2: 337–349, 1998.
- Bon CL, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation. **J Neurosci.** 23: 1941–1948, 2003.
- Bone RC. Immunologic Dissonance: A Continuing Evolution in Our Understanding of the Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and the Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS). **Annals of Internal Medicine.** 125: 680–87, 1996.
- Boulanger CM, Heymes C, Benessiano J, Geske RS, Lévy BI, Vanhoutte PM. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. **Circ Res.** 1998; 83: 1271–1278.
- Brenman JE, Chao DS, Gee SH, McGee AW, Craven SE, Santillano DR, Wu Z, Huang F, Xia H, Peters MF, Froehner SC, Bredt DS. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha 1 syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell.** 84: 757–767, 1996.
- Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Bredt DS. Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. **Cell** 82: 743–752, 1995.
- Burkard N, Rokita AG, Kaufmann SG, Hallhuber M, Wu R, Hu K, Hofmann U, Bonz A, Frantz S, Cartwright EJ, Neyses L, Maier LS, Maier SK, Renné T, Schuh K, Ritter O. Conditional neuronal nitric oxide synthase overexpression impairs myocardial contractility. **Circ Res.** 100: 32–44, 2007.
- Bush MA, Pollac GM. Pharmacokinetics and protein binding of the selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole. **Biopharm Drug Dispos.** 2: 221–228, 2000.
- Cacanyiova S, Kristek F, Gerova M, Krenek P, Klimas J. Effect of chronic nNOS inhibition on blood pressure, vasoactivity, and arterial wall structure in Wistar rats. **Nitric Oxide.** 20: 304–310, 2009.
- Carr D, Gebhart B, Paul D. Alpha adrenergic and mu-2 opioid receptors are involved in morphine-induced suppression of splenocyte natural killer activity. **J Pharmacol Exp Ther.** 264: 1179–86, 1993.
- Castellheim A, Brekke OL, Especik T, Harboe M, Mollnes TE. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory

- response syndrome and sepsis. **Scand J Immunol.** 69: 479-449, 2009.
- Castro A, Jimenez W, Claria J, Ros J, Martinez JM, Bosch M, Arroyo V, Piulats J, Rivera F, and Rode's J. Impaired responsiveness to angiotensin II in experimental cirrhosis: role of nitric oxide. **Hepatology.** 18: 367-372, 1993.
- Cena JJ, Lalu MM, Cho WJ, Chow AK, Bagdan ML, Daniel EE, Castro MM, Schulz R. Inhibition of matrix metalloproteinase activity in vivo protects against vascular hyporeactivity in endotoxemia. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 298: H45-51, 2010.
- Chen SJ, Chen KH, Wu CC. Nitric oxide-cyclicGMP contributes to abnormal activation of  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPase in the aorta from rats with endotoxic shock. **Shock.** 23: 179-185, 2005.
- Clowes GHA, Vucinic M, Weidner MG. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. **Ann Surg.** 163: 844-866, 1966.
- Comtois AS, Barreiro E, Huang PL, Marette A, Perrault M, Hussain SN. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction and sarcolemmal injury in mice lacking the neuronal nitric oxide synthase. **Am J Respir Crit Care Med.** 163: 977-982, 2001.
- Comtois AS, El-Dwairi Q, Laubach VE, Hussain SN. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction in mice lacking the inducible nitric oxide synthase. **Am J Respir Crit Care Med.** 159: 1975-1980, 1999.
- da Silva-Santos JE, Chiao CW, Leite R, Webb RC. The Rho-A/Rho-kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms during endotoxaemia in small mesenteric arteries. **Crit Care Med.** 37: 1716-1723, 2009.
- da Silva-Santos JE, Terluk MR, Assreuy J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. **Shock.** 17:70-76, 2002.
- Daly T, Beamer KC, Vargish T, Wilson A. Correlation of plasma beta-endorphin levels with mean arterial pressure and cardiac output in hypovolemic shock. **Crit Care Med.** 15: 723-725, 1987.
- Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C. Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. **Lancet.** 363: 1365-1367, 2004.

- Dayer P, Desmeules J, Collart L. Pharmacology of tramadol. **Drugs**. 53: 18-24, 1997.
- De Backer D, Creteur J, Preiser JC, Dubois MJ, Vincent JL. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. **Am J Resp Crit Care Med**. 166: 98-104, 2002.
- Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends Microbiol**. Artigo "in press".
- Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent JL, Levy MM; Surviving Sepsis Campaign Guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med**. 32: 858-873, 2004.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Taylor Thompson B, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med**. 36:296-327, 2008.
- Duma, D. Óxido nítrico e glicocorticóides: interação na sepse e na inflamação. (Tese de doutorado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis. 2005.
- Dunbar AY, Kamada Y, Jenkins GJ, Lowe ER, Billecke SS, Osawa Y. Ubiquitination and degradation of neuronal nitric-oxide synthase in vitro: dimer stabilization protects the enzyme from proteolysis. **Mol Pharmacol**. 66: 964-969, 2004.
- Eggers KA, Power I. Tramadol. **Br J Anaesth**. 74: 247-249, 1995.
- Eliasson MJ, Blackshaw S, Schell MJ, Snyder SH. Neuronal nitric oxide synthase alternatively spliced forms: prominent functional localization in the brain. **Proc Natl Acad Sci**. 94: 3396-3401, 1997.
- Eliasson MJ, Huang Z, Ferrante RJ, Sasamata M, Molliver ME, Snyder SH, Moskowitz MA. Neuronal nitric oxide synthase activation and peroxynitrite formation in ischemic stroke linked to neural damage. **J Neurosci**. 19: 5910-5918, 1999.
- Enkhbaatar P, Lange M, Nakano Y, Hamahata A, Jonkam C, Wang J, Jaroch S, Traber L, Herndon D, Traber D. Role of neuronal nitric oxide synthase in ovine sepsis model. **Shock**. 32: 253-7, 2009.

- Enkhbaatar P, Murakami K, Shimoda K, Mizutani A, McGuire R, Schmalstieg F, Cox R, Hawkins H, Jodoin J, Lee S, Traber L, Herndon D, Traber D. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole attenuates acute lung injury in an ovine model. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 285: R366-372, 2003.
- Epstein J, Breslow MJ. The stress response of critical illness. **Crit Care Clin.** 15: 17–33, 1999.
- Erol A, Koşay S Effects of aminoguanidine administration on vascular hyporeactivity in thoracic aorta from endotoxaemic rats. **Eur J Pharmacol.** 408: 175-181, 2000.
- Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacol Ther** 91: 179–213, 2001.
- Feng P, Truant AL, Meissler JJ Jr, Gaughan JP, Adler MW, Eisenstein TK. Morphine withdrawal lowers host defense to enteric bacteria: spontaneous sepsis and increased sensitivity to oral *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Infect Immun.** 74: 5221–5226, 2006.
- Fernandes D, Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis shock. **Shock.** S30: 10-13, 2008.
- Fernandes D, da Silva-Santos JE, Duma D, Villela CG, Barja-Fidalgo C, Assreuy J. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Mol Pharmacol.** 69: 983-990, 2006.
- Fernandes D, Sordi R, Pacheco LK, Nardi GM, Heckert BT, Villela CG, Lobo AR, Barja-Fidalgo C and Assreuy J: Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **J Pharmacol Exp Ther.** 328: 991-999, 2009.
- Ferro A, Queen LR, Priest RM, Xu B, Ritter JM, Poston L, Ward JP. Activation of nitric oxide synthase by *b2*-adrenoceptors in human umbilical vein endothelium *in vitro*. **Br. J. Pharmacol.** 126: 1872–1880, 1999.
- Feuerstein G, Siren AL. Effect of naloxone and morphine on survival of conscious rats after hemorrhage. **Circ Shock.** 19: 293–300, 1986.
- Feuerstein G. The opioid system and central cardiovascular control: analysis of controversies. **Peptides.** 6: S51–S56, 1985.
- Fox GA, Paterson NA, McCormack DG. Cyclooxygenase inhibition and vascular reactivity in a rat model of hyperdynamic sepsis. **J Cardiovasc Pharmacol.** 28: 30–35, 1996.

- Fraser GL, Prato BS, Riker RR, Berthiaume D, Wilkins ML. Frequency, severity, and treatment of agitation in young versus elderly patients in the ICU. **Pharmacotherapy**. 20: 75–82, 2000.
- Fukatsu K, Saito H, Fukushima R, Inoue T, Lin MT, Inaba T, Muto T. Detrimental effects of a nitric oxide synthase inhibitor (N-w-nitro-L-argininemethyl- ester) in a murine sepsis model. **Arch Surg**. 130: 410–414, 1995.
- Garner CC, Nash J, Haganir RL. PDZ domains in synapse assembly and signaling. **Trends Cell Biol**. 10: 274–280, 2000.
- Geoghegan-Morphet N, Burger D, Lu X, Sathish V, Peng T, Sims SM, Feng Q. Role of neuronal nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in neonatal mouse cardiomyocytes. **Cardiovasc Res**. 75: 408–416, 2007.
- Geoger JF, Hamzaoui O, Chaari A, Maizel J, Richard C, Teboul JL. Restoring arterial pressure with norepinephrine improves muscle tissue oxygenation assessed by near-infrared spectroscopy in severely hypotensive septic patients. **Intensive Care Med**. 36: 1882–1889, 2010.
- Glezer I, Munhoz CD, Kawamoto EM, Marcourakis T, Avellar MC, Scavone C. MK-801 and 7-Ni attenuate the activation of brain NF-kappa B induced by LPS. **Neuropharmacology**. 45: 1120–1129, 2003.
- Gocan NC, Scott JA, Tymk K. Nitric oxide produced via neuronal NOS may impair vasodilatation in septic rat skeletal muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. 278: H1480–H1489, 2000.
- Goddard CM, Allard MF, Hogg JC, Herbertson MJ, Walley KR: Prolonged leukocyte transit time in coronary microcirculation of endotoxemic pigs. **Am J Physiol**. 269: H1389–H1397, 1995.
- Goddard CM, Poon BY, Klut ME, Wiggs BR, vanEeden SF, Hogg JC, Walley KR: Leukocyte activation does not mediate myocardial leukocyte retention during endotoxemia in rabbits. **Am J Physiol**. 275: H1548–H1557, 1998.
- Greeneltch KM, Haudenschild CC, Keegan AD, Shi Y. The opioid antagonist naltrexone blocks acute endotoxic shock by inhibiting tumor necrosis factor-alpha production. **Brain Behav Immun**. 18:476–484, 2004.
- Grimm MC, Ben-Baruch A, Taub DD, Howard OM, Wang JM, Oppenheim JJ. Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis. **Ann N Y Acad Sci**. 840: 9–20, 1998.

- Guimarães S, Moura D. Vascular Adrenoceptors: An Update. **Pharmacol Rev.** 53: 319–356, 2001.
- Gunneth CA, Chu Y, Heistad DD, Loihl A, Faraci FM. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. **Am J Physiol.** 275: H416–H421, 1998.
- Hahn PY, Wang P, Tait SM, Ba ZF, Reich SS, Chaudry IH. Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. **Shock.** 4: 269–273, 1995.
- Hamzaoui O, Georger JF, Monnet X, Ksouri H, Maizel J, Richard C and Teboul JL: Early administration of norepinephrine increases cardiac preload and cardiac output in septic patients with life-threatening hypotension. **Crit Care.** 14: R142, 2010.
- Hashimoto M, Gamoh S, Hossain S, Okunishi H, Shimoura K, Yasui Y, Ando A, Masumura S. Age-related changes in aortic sensitivity to noradrenaline and acetylcholine in rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** 25: 676–81, 1998.
- Hassen AH, Feuerstein G. Faden AI.  $\mu$ -Receptors and opioid cardiovascular effects in the NTS of rat. **Peptides.** 3: 1031–1037; 1982
- Hatanaka Y, Hobara N, Honghua J, Akiyama S, Nawa H, Kobayashi Y, Takayama F, Gomita Y, Kawasaki H. Neuronal nitric-oxide synthase inhibition facilitates adrenergic neurotransmission in rat mesenteric resistance arteries. **J Pharmacol Exp Ther.** 316: 490–497, 2006.
- Heaton DA, Lei M, Li D, Golding S, Dawson TA, Mohan RM, Paterson DJ. Remodeling of the cardiac pacemaker L-type calcium current and its  $\beta$ -adrenergic responsiveness in hypertension after neuronal NO synthase gene transfer. **Hypertension.** 48: 443–452, 2006.
- Hecker M, Mülsch A, Busse R. Subcellular localization and characterization of neuronal nitric oxide synthase. **J Neurochem.** 62: 1524–1529, 1994.
- Heinert G, Nye PC, Paterson DJ. Nitric oxide and prostaglandin pathways interact in the regulation of hypercapnic cerebral vasodilatation. **Acta Physiol Scand.** 166: 183–193, 1999.
- Herbertson MJ, Werner HA, Russell JA, Iversen K, Walley KR: Myocardial oxygen extraction ratio is decreased during endotoxaemia in pigs. **J Appl Physiol** 79: 479–486, 1995.
- Hilburger ME, Adler MW, Truant AL, Meissler JJ Jr, Satishchandran V, Rogers TJ, Eisenstein TK. Morphine induces sepsis in mice. **J Infect Dis.** 176: 183–188, 1997.

- Höcherl K, Schmidt C, Kurt B, Bucher M Activation of the PGI(2)/IP system contributes to the development of circulatory failure in a rat model of endotoxic. **Hypertension**. 52: 330-335, 2008.
- Hotchkiss RS, Coopersmith CM, McDunn JE, Ferguson TA. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. **Nat Med**. 15: 496-497, 2009.
- Huginin KM, Fry C, Shuster K, Nemzek JA. Effects of tramadol and buprenorphine on select immunologic factors in a cecal ligation and puncture model. **Shock**. 34: 250-260, 2010.
- Ichihara A, Inscho EW, Imig JD, Navar LG. Neuronal nitric oxide synthase modulates rat renal microvascular function. *Am J Physiol*. 274: F516-F524, 1998.
- Ide S, Minami M, Ishihara K, Uhl GR, Sora I, Ikeda K. Mu opioid receptor dependent and independent components in effects of tramadol. **Neuropharmacol**. 51: 651-58, 2006.
- Jaffrey SR, Benfenati F, Snowman AM, Czernic AJ, Snyder SH. Neuronal nitric-oxide synthase localization mediated by ternary complex with synapsin and CAPON. **Proc Natl Acad Sci**. 99: 3199-3204, 2002.
- Jaffrey SR, Snowman AM, Eliasson MJ, Cohen NA, Snyder SH. CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95. **Neuron**. 20: 115-124, 1998.
- Jagtap P, Szabó C. Poly(ADP-ribose) polymerase and the therapeutic effects of its inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**. 4: 421-440, 2005.
- Kadoi Y, Goto F. Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats. **Anesth Analg**. 99: 212-220, 2004.
- Kamata K, Makino A. A comparative study on the rat aorta and mesenteric arterial bed of the possible role of nitric oxide in the desensitization of the vasoconstrictor response to an  $\alpha$ 1-adrenoceptor agonist. **Br J Pharmacol**. 120: 1221-1228, 1997.
- Karst JR, Scheinichen D, Bevilacqua C, Schneider U, Heine J, Schedlowski M, Schmidt RE. Effects of fentanyl on cellular immune functions in man. **Int J Immunopharmacol**. 21: 445-454, 1999.
- King PA, Anderson VE, Edwards JO, Gustafson G, Plumb RC and Suggs JW. A stable solid that generates hydroxyl radical upon dissolution in aqueous solutions: reaction with proteins and nucleic acid. **J Am Chem Soc**. 114: 5430-5432, 1992.

- Kone BC, Kunczewicz T, Zhang W, Yu Z-Y. Protein interaction with nitric oxide synthases: controlling the right place, and the right amount of nitric oxide. **Am J Physiol Renal Physiol.** 285: F178-F190, 2003.
- Kone BC. Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. **Acta Physiol Scand.** 168: 27-31, 2000.
- Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science.* 269: 1737-1740, 1995.
- Kuroki K, Takahashi HK, Iwagaki H, Murakami T, Kuinose M, Hamanaka S, Minami K, Nishibori M, Tanaka N, Tanemoto K. Beta2-adrenergic receptor stimulation-induced immunosuppressive effects possibly through down-regulation of costimulatory molecules, ICAM-1, CD40 and CD14 on monocytes. **J Int Med Res.** 32: 465-483, 2004.
- Kwon SY, Groszmann RJ, Iwakiri Y. Increased neuronal nitric oxide synthase interaction with soluble guanylate cyclase contributes to the splanchnic arterial vasodilation in portal hypertensive rats. **Hepatol Res.** 37: 58-67, 2007.
- Lange M, Hamahata A, Traber DL, Nakano Y, Esechie A, Jonkam C, Whorton EB, von Borzyskowski S, Traber LD, Enkhbaatar P. Effects of early neuronal and delayed inducible nitric oxide synthase blockade on cardiovascular, renal, and hepatic function in ovine sepsis. **Anesthesiology.** 113: 1376-84, 2010.
- Leone M, Martin C. Vasopressor use in septic shock: an update **Curr Opin Anesthesiol.** 21: 141-147, 2008.
- Leone M, Martin C. Vasopressor use in septic shock: an update. *Curr Opin Anaesthesiol.* 21: 141-147, 2008.
- Liaudet L, Rosselet A, Schaller MD, Markert M, Perret C, Feihl F. Nonselective versus selective inhibition of inducible nitric oxide synthase in experimental endotoxic shock. **J Infect Dis.** 177: 127-132, 1998.
- Lin SL, Lee YM, Chang HY, Cheng YW, Yen MH. Effects of naltrexone on lipopolysaccharide-induced sepsis in rats. **J Biomed Sci.** 12:431-40, 2005.
- López A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, Silverman MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, Grover R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study



- of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Crit Care Med.** 32: 21-30, 2004.
- Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacol Rev.** 52: 375-414, 2000.
- Lundblad R, Giercksky KE. Effect of volume support, antibiotic therapy, and monoclonal antiendotoxin antibodies on mortality rate and blood concentrations of endothelin and other mediators in fulminant intra-abdominal sepsis in rats. **Crit Care Med.** 23:1382-1390, 1995.
- Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. **Proc Natl Acad Sci.** 97: 9753-9758, 2000.
- MacFarlane AS, Peng X, Meissler JJ Jr, Rogers TJ, Geller EB, Adler MW, Eisenstein TK. Morphine increases susceptibility to oral *Salmonella typhimurium* infection. **J Infect Dis.** 181: 1350-1358, 2000.
- MacMicking JD, Nathan C, Hom G, Chartrain N, Fletcher DS, Trumbauer M, Stevens K, Mudgett J.S. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell.** 81: 641-650, 1995.
- Macnab MS, Macrae DJ, Guy E, Grant IS, Feely J. Profound reduction in morphine clearance and liver blood flow in shock. **Intensive Care Med.** 12: 366-369, 1986.
- Marik PE, Mohedin M. The contrasting effects of dopamine and norepinephrine on systemic and splanchnic oxygen utilization in hyperdynamic sepsis. **JAMA.** 272: 1354-1357, 1994.
- Martin C, Viviand X, Leone M, Thirion X. Effect of norepinephrine on the outcome of septic shock. **Crit Care Med.** 28: 2758-2765, 2000.
- Martin CM, Yaghi A, Sibbald WJ, McCormack D, Paterson AM. Differential impairment of vascular reactivity of small pulmonary and systemic arteries in hyperdynamic sepsis. **Am Rev Respir Dis.** 148: 164-172, 1993.
- Martin JB, Wheeler AP. Approach to the Patient with Sepsis. **Clinics in Chest Medicine.** 30: 1-16, 2009.
- Martin M, Sibbald WJ. Modulation of hemodynamics and organ blood flow by nitric oxide synthase inhibition is not altered in normotensive, septic rats. **Am J Respir Crit Care Med.** 150:1539-1544, 1994.

- Martucci C, Panerai AE, Sacerdote P. Chronic fentanyl or buprenorphine infusion in the mouse: similar analgesic profile but different effects on immune responses. **Pain**. 110: 385-392, 2004.
- Matsuda N, Hattori Y, Akaishi Y, Suzuki Y, Kemmotsu O, Gando S. Impairment of cardiac  $\beta$ -adrenoceptor cellular signaling by decreased expression of Gs $\alpha$  in septic rabbits. **Anesthesiology**. 93: 1465-1473, 2000.
- Matsuda N, Hattori Y, Takahashi Y, Nishihira J, Jesmin S, Kobayashi M, Gando S. Therapeutic effect of in vivo transfection of transcription decoy to NF- $\kappa$ B on septic lung in mice. **Am J Physiol**. 287: L1248-L1255, 2004.
- Matsuda N, Hattori Y, Zhang X, Fukui H, Kemmotsu O, Gando S. Contractions to histamine in pulmonary and mesenteric arteries from endotoxemic rabbits: Modulation by vascular expressions of inducible nitric-oxide synthase and histamine H1-receptors. **J Pharmacol Exp Ther**. 307: 175-181, 2003.
- Matsuda N, Hayashi Y, Takahashi Y, Hattori Y. Phosphorylation of endothelial nitricoxide synthase is diminished in mesenteric arteries from septic rabbits depending on the altered phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway: Reversal effect of fluvastatin therapy. **J Pharmacol Exp Ther**. 319: 1348-1354, 2006.
- McKindley DS, Hanes S, Boucher BA. Hepatic drug metabolism in critical illness. **Pharmacotherapy**. 18: 759-778, 1998.
- Melikiana N, Seddona MD, Casadeib B, Chowienzyka PJ, Shaha AM. Neuronal Nitric Oxide Synthase and Human Vascular Regulation. **Trends Cardiovasc Med**. 19: 256-262, 2009.
- Menzebach A, Hirsch J, Nost R, Mogk M, Hempelmann G, Welters ID. Morphine inhibits complement receptor expression, phagocytosis and oxidative burst by a nitric oxide dependent mechanism. **Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther**. 39: 204-211, 2004.
- Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. **J Biol Chem**. 276: 17625-17628, 2001.
- Mizuno K, Takahashi HK, Iwagaki H, Katsuno G, Kamurul HA, Ohtani S, Mori S, Yoshino T, Nishibori M, Tanaka N. Beta2-adrenergic receptor stimulation inhibits LPS-induced IL-18 and IL-12 production in monocytes. **Immunol Lett**. 101: 168-72, 2005.

- Molin JC, Bendhack LM. Clonidine induces rat aorta relaxation by nitric oxide-dependent and -independent mechanisms. **Vascul Pharmacol.** 42: 1-6, 2004.
- Molina PE. Opioids and opiates: analgesia with cardiovascular, haemodynamic and immune implications in critical illness. **J Inter Med.** 259: 138–154, 2006.
- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **N Engl J Med.** 329: 2002-2012, 1993.
- Moore PK, Handy RLC. Selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase – is no NOS really good NOS for the nervous system? **TIPS.** 18: 2004-2011, 1997.
- Moore PK, Wallace P, Gaffen Z, Hart SL, Babbedge RC. Characterization of the novel nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole and related indazoles: antinociceptive and cardiovascular effects. **Br J Pharmacol.** 110: 219-224, 1993.
- Muenzer JT, Davis CG, Chang K, Schmidt RE, Dunne WM, Coopersmith CM, Hotchkiss RS. Characterization and modulation of the immunosuppressive phase of sepsis. **Infect Immun.** 78: 1582-92, 2010.
- Murray BM, Paller MS. Pressor resistance to vasopressin in sodium depletion, potassium depletion, and cirrhosis. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.** 251: R525–R530, 1986.
- Nakagawa NK, Jukemura J, Aikawa P, Nogueira RA, Poli-de-Figueiredo LF, Sannomiya P. In vivo observation of mesenteric leukocyte-endothelial interactions after cecal ligation/puncture and surgical sepsis source control clinics. **Shock.** 62: 321-326, 2007.
- Nakane M, Schmidt HH, Pollock JS, Forstermann U, Murad F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. **FEBS.** 316: 175-180, 1993.
- Nguyen HB, Smith D. Sepsis in the 21st century: recent definitions and therapeutic advances. **Am J Emerg Med.** 25, 564–571, 2007.
- Ninković M, Malicević I, Jelenković A, Jovanović DM, Dukić M, Vasiljević I. Oxidative stress in the rats brain capillaries in sepsis-the influence of 7-nitroindazole. **Acta Physiol Hung.** 93: 315-323, 2006.
- Nishida CR, Ortiz de Montellano PR. Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases. Chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. **J Biol Chem.** 273: 5566–5571, 1998.
- Noguchi S, Jianmongkol S, Bender AT, Kamada Y, Demady DR, Osawa Y. Guanabenz-mediated inactivation and enhanced

- proteolytic degradation of neuronal nitric-oxide synthase. **J Biol Chem.** 275: 2376-2380, 2000.
- Ocasio FM, Jiang Y, House SD, Chang SL Chronic morphine accelerates the progression of lipopolysaccharide induced sepsis to septic shock. **J Neuroimmunol.** 149:190-100, 2004.
- Okamoto T, Akaike T, Sawa T, Miyamoto Y, van der Vliet A, Maeda H. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. **J Biol Chem.** 276: 29596-29602, 2001.
- Osuchowski MF, Connett J, Welch K, Granger J, Remick DG. Stratification is the key: inflammatory biomarkers accurately direct immunomodulatory therapy in experimental sepsis. **Crit.Care Med.** 37: 1567-1573, 2009.
- Pacheco ME, Beltrán A, Redondo J, Manso AM, Alonso MJ, Salaices M.High glucose enhances inducible nitric oxide synthase expression. Role of protein kinase C-beta II. *Eur J Pharmacol.* 538: 115-123, 2006.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature.* 333: 664-666, 1988.
- Park JH, Chang SH, Lee KM, Shin SH. Protective effect of nitric oxide in an endotoxin-induced septic shock. **Am J Surg.** 171: 340-345, 1996.
- Peng T, Lu X, Lei M, Feng Q. Endothelial nitric oxide synthase enhances lipopolysaccharide-stimulated tumor necrosis factor- $\alpha$  expression via cAMP-mediated p38 MAPK pathway in cardiomyocytes. **J Biol Chem.** 278: 8099-8105, 2003.
- Perotti CA, Nogueira MS, Antunes-Rodrigues J, Cárnio EC. Effects of a neuronal nitric oxide synthase inhibitor on lipopolysaccharide-induced fever. **Braz J Med Biol Res.** 32: 1381-7138, 1999.
- Quezado ZM, Natanson C. Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock. **Am J Kidney Dis.** 20: 214-222, 1992.
- Raffa RB, Friderichs E, Raimann W, Shank RP, Codd EE, Vaught JL, Jacoby HI, Selve N. Complementary and synergistic antinociceptive interaction between the enantiomers of tramadol. **J Pharmacol Exp Ther.** 270: 30290-30293, 1992.
- Reif A, Fröhlich LG, Kotsonis P, Frey A, Bömmel HM, Wink DA, Pfeleiderer W, Schmidt HH. Tetrahydrobiopterin inhibits monomerization and is consumed during catalysis in neuronal NO synthase. **J Biol Chem.** 274: 24921-24929, 1999.

- Reiner A, Li C, Del Mar N, Fitzgerald, MEC. Choroidal blood flow compensation in rats for arterial blood pressure decreases is neuronal nitric oxide-dependent but compensation for arterial blood pressure increases is not. **Exp Eye Res.** 90:734-741, 2010.
- Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med.** 345: 1368-1377, 2001.
- Roman LJ, Masters BS. Electron transfer by neuronal nitric-oxide synthase is regulated by concerted interaction of calmodulin and two intrinsic regulatory elements. **J Biol Chem.** 281: 23111–23118, 2006.
- Rosser DM, Stidwill RP, Jacobson D, Singer M. Oxygen tension in the bladder epithelium rises in both high and low cardiac output endotoxemic sepsis. **J Appl Physiol.** 79: 1878–1882, 1995.
- Rudoger Rudiger A, Singer M. Mechanisms of sepsis-induced cardiac dysfunction. **Crit Care Med.** 35: 1599-1608, 2007.
- Sacerdote P, Bianchi M, Manfredi B, Panerai AE. Effects of tramadol on immune responses and nociceptive thresholds in mice. **Pain.** 72: 325-330, 1997.
- Salerno TA, Milne B, Jhamandas KH. Hemodynamic effects of naloxone in hemorrhagic shock in pigs. **Surg Gynecol Obstet.** 152: 773–776, 1981.
- Sanders RD, Hussell T, Maze M. Sedation & Immunomodulation. **Crit Care Clin.** 25: 551–570, 2009.
- Scheschowitzsch, K. Translocação nuclear de NF- $\kappa$ B e de receptores de glicocorticoides em células musculares lisas: envolvimento do óxido nítrico e do peroxinitrito. (Dissertação de mestrado em Farmacologia. Centro de ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis. 2011.
- Schimidt HHHW, Lohmann, U Walter. The nitric oxide and cGMP signal transduction system. **Biochem Biophys Acta.** 1178: 153-175, 1993.
- Schrier RW, Arroyo V, Bernardi M, Epstein M, Henriksen JH, and Rode's J. Peripheral arterial vasodilation hypothesis: a proposal for the initiation of renal sodium and water retention in cirrhosis. **Hepatology.** 8: 1151–1157, 1988.
- Schweickert WD, Hall J. ICU-acquired weakness. **Chest.** 131: 1541–9, 2007.

- Scott JA, Mehta S, Duggan M, Bihari A, McCormack DG. Functional inhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. **Am J Respir Crit Care Med.** 165: 1426-1432, 2002.
- Seddon M, Melikian N, Dworakowski R, Shabeeh H, Jiang B, Byrne J, Casadei B, Chowienzyk P, Shah AM. Effects of neuronal nitric oxide synthase on human coronary artery diameter and blood flow in vivo. **Circulation.** 119: 2656-2662, 2009.
- Sennoun N, Montemont C, Gilnot S, Lacolley P, Levy B. Comparative effects of early versus delayed use of norepinephrine in resuscitated endotoxic shock. **Crit Care Med.** 35: 1736-1740, 2007.
- Sessa WC, Harrison JK, Luthin DR, Pollock JS, Lynch KR. Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. **Hypertension.** 21: 934-938, 1993.
- Sessler CN, Wilhelm W. Analgesia and sedation in the intensive care unit: an overview of the issues. **Crit Care** 12: S1, 2008.
- Sheng M, Pak DT. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. **Annu Rev Physiol.** 62: 755-778, 2000.
- Shepherd RE, McDonough KH, Burns AH: Mechanisms of cardiac dysfunction in hearts from endotoxin-treated rats. **Circ Shock.** 19: 371-84, 1986.
- Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care.** 4: 251-260, 2004.
- Singer M. Cellular Dysfunction in Sepsis. **Clin Chest Med.** 29: 655-660, 2008.
- Singh M, Notterman DA, Metakis L. Tumor necrosis factor produces homologous desensitization of lymphocyte  $\beta_2$ -adrenergic responses. **Circ Shock.** 39: 275-278, 1993.
- Sladen RN, Landry D. Renal blood flow regulation, autoregulation, and vasomotor nephropathy. **Anesthesiol Clin North America.** 18: 791-807, 2000.
- Song M, Kellum, JA. Interleukin-6. **Crit Care Med.** 33: S463-465, 2005.
- Soszynski D, Chelminiak M. Intracerebroventricular injection of neuronal and inducible nitric oxide synthase inhibitors attenuates fever due to LPS in rats. **J Physiol Pharmacol.** 58: 551-561, 2007.

- Strand Ø, Kirkebøen KA, Giercksky KE. Inhibition of nitric oxide synthase does not affect survival in a rat model of abdominal sepsis. **Scand J Clin Lab Invest.** 57: 105–110, 1997.
- Sun Y, Jin K, Childs JT, Xie L, Mao XO, Greenberg DA. Neuronal nitric oxide synthase and ischemia-induced neurogenesis. **J Cereb Blood Flow Metab.** 25: 485–492, 2005.
- Szabo C, Wu CC. Role of nitric oxide in the development of vascular contractile dysfunction in circulatory shock. **J Med Sci.** 31: 001-016, 2011.
- Takakura K, Taniguchi T, Muramatsu I, Takeuchi K, Fukuda S. Modification of alpha<sub>1</sub>-adrenoceptors by peroxynitrite as a possible mechanism of systemic hypotension in sepsis. **Crit Care Med.** 30: 894-899, 2002.
- Thomas G, Sander M, Lau KS. Impaired metabolic modulation of  $\alpha$ -adrenergic vasoconstriction in dystrophin-deficient skeletal muscle. **Proc Natl Acad Sci.** 95: 15090-15095, 1998.
- Thureson-Klein A. Exocytosis from large and small dense cored vesicles in noradrenergic nerve terminals. **Neuroscience.** 10: 245–59, 1983.
- Tipps LB, Coplin WM, Murry KR, Rhoney DH. Safety and feasibility of continuous infusion of remifentanyl in the neurosurgical intensive care unit. **Neurosurgery.** 46: 596–602, 2000.
- Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. **Biochim Biophys Acta.** 141: 437–455, 1999.
- Toda N, Okamura. Nitroergic nerve: regulation of vascular tone and blood flow in the brain. **J Hypertens.** 14: 423-434, 1996.
- Topcu I, Ekici NZ, Isik R, Sakarya M. The effects of tramadol and fentanyl on gastrointestinal motility in septic rats. **Anesth Analg.** 102: 876-881, 2006.
- Tracey WR, Nakane M, Basha, Carter G. In vivo pharmacological evaluation of two novel type II (inducible) nitric oxide synthase inhibitors. **Can J Physiol Pharmacol.** 73: 665–669, 1995.
- Trescot AM, Datta S, Lee M, Hansen H. Opioid Pharmacology. **Pain Physician.** 11: S133-S153, 2008.
- Tsai YC, Won SJ, Lin MT. Effects of morphine on immune response in rats with sciatic constriction injury. **Pain.** 88: 155-160, 2000.
- Tsao CM, Chen SJ, Shih MC, Lue WM, Tsou MY, Chen A, Liaw WJ, Wu CC. Effects of terbutaline on circulatory failure and organ dysfunction induced by peritonitis in rats. **Intensive Care Med.** 36: 1571-1578, 2010.

- Tuon L, Comim CM, Antunes MM, Constantino LS, Machado RA, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Imipramine reverses the depressive symptoms in sepsis survivor rats. **Intensive Care Med.** 33: 2165-2167, 2007.
- Turina M, Fry DE, Polk HC. Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects. **Crit Care Med.** 33: 1624-1633.
- Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. **Heart.** 85: 342-350, 2001.
- Vallon V, Traynor T, Barajas L, Huang YG, Briggs JP, Schnermann J. Feedback control of glomerular vascular tone in neuronal nitric oxide synthase knockout mice. **J Am Soc Nephrol.** 12: 1599-606, 2001.
- Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. **N Engl J Med.** 345: 1359-1367, 2001.
- vander Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infect Dis.** 8: 32-43, 2008.
- Vickers MD, O'Flaherty D, Szekely SM, Read M, Yoshizumi J. Tramadol: pain relief by an opioid without depression of respiration. **Anaesthesia.** 47:291-296, 1992.
- Vree TB, Van Dongen RT, Koopman-Kimenai PM. Codeine analgesia is due to codeine-6-glucuronide, not morphine. **Int J Clin Pract.** 54: 395-398, 2000.
- Vromen A, Arkovitz MS, Zingarelli B, Salzman AL, Garcia VF, Szabo C. Low-level expression and limited role for the inducible isoform of nitric oxide synthase in the vascular hyporeactivity and mortality associated with cecal ligation and puncture in the rat. **Shock.** 6: 248-253, 1996.
- Wang H, Kohr MJ, Traynham CJ, Wheeler DG, Janssen PM, Ziolo MT. Neuronal nitric oxide synthase signaling within cardiac myocytes targets phospholamban. **Am J Physiol Cell Physiol.** 294: C1566-C1575, 2008.
- Wang Y, Newton DS, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA.. RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. **Proc Natl Acad Sci.** 96: 1242-1246, 1999.
- Wangensteen R, Rodríguez-Gómez I, Moreno JM, Alvarez-Guerra M, Osuna A, Vargas F. Effects of chronic treatment with 7-nitroindazole in hyperthyroid rats. **Am J Physiol.** 291: R1376-R1382, 2006.



- Ward ME, Toporsian M, Scott JA, Teoh H, Govindaraju V, Quan A, Wener AD, Wang G, Bevan SC, Newton DC, Marsden PA. Hypoxia induces a functionally significant and translationally efficient neuronal NO synthase mRNA variant. **J Clin Invest.** 115: 3128-39, 2005.
- Weigert AL, Martin PY, Niederberger M, Gine's P, Higa EMS, McMurtry I, Schrier RW. Endothelium-dependent vascular hyporesponsiveness without detection of nitric oxide synthase induction in aorta of cirrhotic rats. **Hepatology.** 22: 1856-1862, 1995.
- Welters ID, Menzebach A, Goumon Y, Langefeld TW, Teschemacher H, Hempelmann G, Stefano GB. Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. **J Neuroimmunol.** 111: 139-45, 2000.
- Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. **N Engl J Med.** 340: 207-214, 1999.
- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res.** 29: 189-201, 1980.
- Wilcox CS, Welch WJ, Murad F, Gross SS, Taylor G, Levi R, Schmidt HHHW. Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure. **Proc Natl Acad Sci.** 89: 11993-11997, 1992.
- Wolff DJ, Lubeskie A, Umansky C. The inhibition of the constitutive bovine endothelial nitric oxide synthase by imidazole and indazole agents. **Arch Biochem Biophys.** 314: 360-366, 1994.
- Wu CC, Ruetten H, Thiemermann C. Comparison of the effects of aminoguanidine and N omega-nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat. **Eur J Pharmacol.** 300: 99-104, 1996.
- Xu L, Carter EP, Ohara M, Martin PY, Rogachev B, Morris K, Cadnapaphornchai M, Knotek M, Schrier RW. Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. **Am J Physiol Renal Physiol.** 279: 1110-1115, 2000.
- Yang J, Dong LW, Tang C, Liu MS. Transcriptional and posttranscriptional regulation of beta(2)-adrenergic receptor gene in rat liver during sepsis. **Am J Physiol.** 277: R132-139, 1999.
- Yao K, Xu B, Liu YP, Ferro A. Effects of betaadrenoceptor stimulation on endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation of human

- umbilical vein endothelial cells. **Acta Pharmacol Sin** 24: 219–224, 2003.
- Yao SY, Ljunggren-Rose A, Chandramohan N, Whetsell WO Jr, Sriram S. In vitro and in vivo induction and activation of nNOS by LPS in oligodendrocytes. **J Neuroimmunol**. 229: 146-156, 2010.
- Yeager MP, Procopio M, De Leo JA, Arruda JL, Hildebrandt L, Howell AL. Intravenous fentanyl increases natural killer cell cytotoxicity and circulating CD16+lymphocytes in human. **Anesth Analg**. 94: 94–99, 2002.
- Yuan Z, Liu B, Yuan L, Zhang Y, Dong X, Lu J. Evidence of nuclear localization of neuronal nitric oxide synthase in cultured astrocytes of rats. **Life Sci**. 74: 3199–3209, 2004.
- Yu-Chuan T, Shen-Jeu W. Effects of tramadol on T lymphocyte proliferation and natural killer cell activity in rats with sciatic constriction injury. **Pain**. 92:63-69, 2001.
- Zagvazdin YS, Fitzgerald MEC, Sancesario G, Reiner A. Neural nitric oxide mediates Edinger-Westphal nucleus evoked increase in choroidal blood flow in the pigeon. **Invest Ophthalmol Vis Sci**. 37: 666–672, 1996.
- Zhang B, Yang L, Konishi Y, Maeda N, Sakanaka M, Tanaka J. Suppressive effects of phosphodiesterase type IV inhibitors on rat cultured microglial cells: comparison with other types of cAMP elevating agents. **Neuropharmacology**. 42: 262–269, 2002.
- Zhang W, Shibamoto T, Cui S, Takano S, Kurata Y. 7-nitrindazole, but not L-NAME or aminoguanidine, attenuates anaphylactic hypotension in conscious rats. **Shock**. 31: 201-206, 2009.
- Zhou L, Zhu DY. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**. 20: 223-320, 2009.
- Zingarelli B, Salzman AL, Szabó C. Protective effects of nicotinamide against nitric oxide-mediated delayed vascular failure in endotoxic shock: potential involvement of polyADP ribosyl synthetase. **Shock**. 5: 258-64, 1996.