

DANIELLE DUMA

**ÓXIDO NÍTRICO E GLICOCORTICÓIDES:
INTERAÇÃO NA SEPSE E NA INFLAMAÇÃO**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção de título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

FLORIANÓPOLIS

2005

DUMA, Danielle. **Óxido nítrico e glicocorticóides: interação na sepse e na inflamação.** Florianópolis, 2005, 135p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Jamil Assreuy

Defesa: 06/06/2005

Avaliamos a relação entre o aumento do [óxido nítrico] (NO) e a incapacidade dos glicocorticóides (GC) de conterem o desenvolvimento da [resposta inflamatória sistêmica] em animais endotoxêmicos. Observamos que: i) o tratamento de animais com endotoxina (LPS) aumentou os níveis de NOS e diminuiu a capacidade de ligação dos [receptores de glicocorticóides] (GR) em vários órgãos do rato, oito horas após a injeção de LPS; ii) o tratamento de ratos com o inibidor da NOS (nitro-arginina metil éster, L-NAME) durante o desenvolvimento do choque endotoxêmico preveniu a inibição da capacidade de ligação do GR e iii) um doador de NO (S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina, SNAP) injetado previamente em animais tratados com dexametasona e injetados com LPS, interferiu com ações anti-inflamatórias e imunossupressoras da dexametasona. Sabendo da afinidade do NO por sulfidrilas livres presentes em vários alvos protéicos e com base nos nossos resultados, sugerimos que o aumento da produção de NO na endotoxemia seja um dos possíveis mecanismos responsáveis pela redução da capacidade de ligação e funcionalidade do GR, talvez pela interação do NO com sulfidrilas críticas ao funcionamento do GR, via S-nitrosilação. Investigamos também se o NO liberado precocemente após um estímulo inflamatório poderia interferir com reações inflamatórias e cardiovasculares desenvolvidas em quadros de sepse. A supressão da liberação precoce de NO nos modelos experimentais LPS e CLP (ligadura e perfuração do ceco), pelo tratamento dos animais com o inibidor seletivo para [óxido nítrico sintase neuronal] (nNOS) 7-nitroindazol (7-NI) impediu o aparecimento da resposta inflamatória e da hiporresponsividade vasoconstritora à fenilefrina, mostrando que o NO liberado inicialmente pela enzima nNOS é importante na iniciação e perpetuação da resposta inflamatória sistêmica. Considerando que o NO causa inibição da capacidade de ligação do GR (quando produzido em maiores quantidades) e que a ativação da nNOS (liberando pequenas quantidades de NO) é um evento importante para o início da resposta inflamatória, sugerimos que o NO modula a resposta inflamatória sistêmica, ativando-a e diminuindo-a em momentos distintos do seu desenvolvimento.

***ATRAVÉS DA BUSCA DO SABER PARA TODOS O HOMEM
APRENDE A IDENTIFICAR OS FENÔMENOS NATURAIS PELOS
QUAIS É INFLUENCIADO.***

***A AVALIAÇÃO CRITERIOSA DE SUAS REAÇÕES FRENTE A ESTES
PROCESSOS MOSTRA QUE, ALÉM DE FAZER PARTE, O HOMEM É
ESSENCIAL PARA O EQUILÍBRIO DO SISTEMA.***

***TAL APRENDIZADO LIBERTA O HOMEM DE SUAS PRÓPRIAS
AFLIÇÕES E DIGNIFICA O SENTIDO DE SUA EXISTÊNCIA.***

DEDICO ESTE TRABALHO A TODOS OS SERES.

***O PROFESSOR SE LIGA À ETERNIDADE;
ELE NUNCA SABE ONDE CESSA A SUA INFLUÊNCIA***

(HENRY ADAMS)

Agradeço imensamente ao professor Jamil Assreuy pela oportunidade
de tê-lo como orientador;

Por mostrar-me que o crescimento pessoal e intelectual dependem de
disposição e paciência;

Pela preocupação constante em ensinar da melhor maneira possível
para que minha formação como cientista fosse completa;

Pelos valiosos ensinamentos;

E pelo carinho, compreensão e amizade oferecidos nestes memoráveis
anos de convívio.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Zenilda Duma e Leonis Duma por todo o carinho e apoio nas escolhas que fiz e por sempre me incentivarem a nunca desistir dos meus sonhos. Aos meus irmãos Alexandre Duma e Cristiano Duma pelos momentos de alegria em nossos encontros.

Ao Daniel Fernandes, pela imensa ajuda prestada para realização deste projeto e principalmente pela verdadeira amizade demonstrada nestes anos de convívio.

Aos professores do Departamento de Farmacologia, pelo aprendizado. Em especial ao professor João Batista Calixto, pela disponibilização de sua infraestrutura e pelo imenso apoio e incentivo em momentos importantes, os quais foram fundamentais para concretização deste projeto científico.

Aos professores e amigos Antônio de Pádua Carobrez e Giles Alexander Rae, pelo aprendizado e constante incentivo.

Aos amigos do laboratório de Farmacologia do Oxido Nítrico: Adriana S. Madeira, Renata S. Costa, Gabriela Cunha, Juliana Antonioli, Regina de Sordi, Carla Charão, Edir Rezende e Gustavo Campos Ramos pelo saudável convívio e amizade.

Aos meus queridos amigos e aos colegas da pós-graduação pela troca de informações e amizade.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pela ajuda prestada.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

LISTA DE TABELAS

1.	Sobrevida dos animais após o tratamento com LPS.....	50
2.	Efeito da aminoguanidina e do 7-nitroindazol sobre alguns parâmetros inflamatórios.....	88
3.	Efeito do 7-nitroindazol sobre os níveis plasmáticos de NOx e sobre a atividade da MPO no pulmão de ratos 36 e 72 horas após CLP.....	96

LISTA DE ABREVIATURAS

7-NI	- 7-nitroindazol
ACTH	- hormônio adrenocorticotrópico
AG	- aminoguanidina
cAMP	- monofosfato cíclico de adenosina
ANOVA	- análise de variância
ATP	- trifosfato de adenosina
CaM	- calmodulina
cGMP	- monofosfato cíclico de guanosina
CLP	- ligadura e perfuração do ceco
cNOS	- óxido nítrico sintase constitutiva
CRH	- fator liberador de corticotrofina
D.O.	- densidade óptica
DEX	- dexametasona
DMSO	- dimetilsulfóxido
DTT	- ditiltreitol
EDTA	- ácido etilenodiaminotetracético
EGTA	- ácido bis (2-aminoetil) etilenoglicol- N, N, N', N'-tetraacético
eNOS	- óxido nítrico sintase endotelial
EPM	- erro padrão da média
FAD	- dinucleotídeo de flavina e adenina
FMN	- mononucleotídeo de flavina
GC	- glicocorticóide
GR	- receptor de glicocorticóide
GRm	- receptor de glicocorticóide membranar
HPA	- hipotálamo-pituitária-adrenal
HSP	- proteína de choque térmico
i.p.	- intraperitoneal
IL1- β	- interleucina 1 β
iNOS	- óxido nítrico sintase induzida
IP ₃	- inositoltrifosfato
L-NAME	- L-nitro-arginina-metil-éster
LPS	- lipopolissacarídeo
mmHg	- milímetros de mercúrio
MPO	- mieloperoxidase
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
NAP	- acetil-DL-penicilamina
NF-kB	- fator nuclear da cadeia leve Kappa

nNOS	- óxido nítrico sintase neuronal
NO	- óxido nítrico
NOS	- óxido nítrico sintase
NO _x	- nitrito+nitrato
PAM	- pressão arterial média
PBS	- salina tamponada com fosfatos
PKC	- proteína quinase C
PLC	- fosfolipase C
ROS	- espécies reativas de oxigênio
RSNO	- espécies reativas de óxido nítrico
s.c.	- subcutâneo
SNAP	- S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
TAT	- tirosina aminotransferase
THB ₄	- tetrahidrobiopterina
TNF- α	- fator de necrose tumoral- α

LISTA DE FIGURAS

1.	Sobrevida dos animais após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	51
2.	Concentrações plasmáticas de nitrito + nitrato (NOx) de animais submetidos aos modelos LPS e CLP.....	52
3.	Efeito da dexametasona na indução da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e dos níveis de nitrito + nitrato (NOx) de animais endotoxêmicos.....	55
4.	Efeito da dexametasona na sobrevida de animais sépticos pela ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	56
5.	Curvas dose-resposta e tempo-resposta da capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (GR) e dos níveis de nitrito + nitrato (NOx) em animais endotoxêmicos.....	59
6.	Curva tempo - resposta da capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (BDGR) e dos níveis de nitrito + nitrato (NOx) em animais sépticos.....	60
7.	Curva dose- e tempo-resposta da capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (GR) no pulmão e no baço em animais normais.....	63
8.	Efeito do composto acetil-DL-penicilamina (NAP) sobre a capacidade de ligação do corticóide a seu receptor no fígado de ratos normais.....	64
9.	Efeito do SNAP na indução corticóide-dependente da atividade da enzima tirosina amino transferase (TAT).....	65
10.	Efeito do inibidor da enzima óxido nítrico sintase em animais endotoxêmicos e do doador de óxido nítrico (S-nitroso-acetil-DL-penicilamina, SNAP) em animais normais sobre a capacidade de ligação do corticóide a seu receptor e sobre a produção de nitrito + nitrato.....	68
11.	Efeito dos compostos L-NAME e D-NAME sobre a capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (GR) do fígado de animais normais.....	69
12.	Efeito do ditioneitol (DTT) sobre capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (GR) do pulmão de ratos normais.....	70

13.	Efeito do S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) sobre a redução dos níveis de nitrito + nitrato (NOx) causada por dexametasona.....	73
14.	Efeito do S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) sobre a inibição da indução de isoformas das enzima óxido nítrico sintases (NOS) causada por dexametasona.....	74
15.	Efeito do S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) sobre a diminuição do peso do baço causada por dexametasona.....	75
16.	Efeito do S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) sobre o aumento da sobrevivência de animais sépticos causada por dexametasona.....	76
17.	Efeito do L-NAME e da aminoguanidina na atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) de ratos tratados com LPS.....	79
18.	Efeito do L-NAME e da aminoguanidina na expressão da iNOS e produção de NOx de ratos tratados com LPS.....	80
19.	Efeito do L-NAME e da aminoguanidina na atividade da mieloperoxidase de ratos tratados com LPS.....	81
20.	Efeito da aminoguanidina e do 7-nitroindazol sobre a queda da PAM causada por LPS.....	84
21.	Efeito da aminoguanidina e do 7-nitroindazol sobre a produção de NOx no início da resposta inflamatória.....	85
22.	Registro típico da pressão arterial média de ratos anestesiados em sepse.....	89
23.	Efeito da aminoguanidina e do 7-nitroindazol sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de ratos sépticos.....	90
24.	Efeito da aminoguanidina na curva de sobrevivência de animais sépticos.....	91
25.	Efeito do 7-nitroindazol na curva de sobrevivência de animais sépticos.....	92
26.	Efeito do 7-nitroindazol sobre o crescimento de bactérias de lavado peritoneal 36 e 72 horas após CLP.....	95
27.	Efeito do SNAP e do LPS sobre a capacidade de ligação do GR.....	99

LISTA DE ESQUEMAS

1. Mecanismo hipotético proposto para o controle da resposta inflamatória sistêmica pelo NO através da inibição do GR..... **111**
2. Mecanismo hipotético para o controle da iniciação da resposta inflamatória pelo NO..... **119**

Resumo

O choque séptico é uma condição potencialmente letal causada por agentes infecciosos e é caracterizado por um estado de baixa perfusão tecidual, podendo conduzir à disfunção múltipla de órgãos e conseqüentemente à morte. Tendo em conta que na sepse a enzima óxido nítrico sintase (NOS) é induzida, que os níveis de glicocorticóides (GC) circulantes estão aumentados e que o tratamento com corticóides sintéticos não é eficaz para tratar pacientes sépticos, o objetivo da primeira parte deste estudo foi avaliar, *in vivo*, se existe uma relação entre o aumento do NO e a incapacidade dos GC de conterem o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica em animais endotoxêmicos. Observamos que: i) o tratamento de animais com endotoxina (LPS) aumentou os níveis de NOS e diminuiu a capacidade de ligação dos receptores de glicocorticóides (GR) em vários órgãos do rato, oito horas após a injeção de LPS; ii) o tratamento de ratos com o inibidor da NOS (nitro-arginina metil éster, L-NAME) durante o desenvolvimento do choque endotoxêmico preveniu a inibição da capacidade de ligação do GR e iii) um doador de NO (S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina, SNAP) injetado previamente em animais tratados com dexametasona e injetados com LPS, interferiu com ações anti-inflamatórias e imunossupressoras da dexametasona. Sabendo da afinidade do NO por sulfidrilas livres presentes em vários alvos protéicos e com base nos nossos resultados, sugerimos que o aumento da produção de NO na endotoxemia seja um dos possíveis mecanismos responsáveis pela redução da capacidade de ligação e funcionalidade do GR, talvez pela interação do NO com sulfidrilas críticas ao funcionamento do GR, via S-nitrosilação. Na segunda parte deste estudo, investigamos se o NO liberado precocemente após um estímulo inflamatório poderia interferir com reações inflamatórias e cardiovasculares desenvolvidas em quadros de sepse. A supressão da liberação precoce de NO nos modelos experimentais LPS e CLP (ligadura e perfuração do ceco), pelo tratamento dos animais com o inibidor seletivo para NOS neuronal 7-nitroindazol (7-NI) impediu o aparecimento da resposta inflamatória e da hiporresponsividade vasoconstritora à fenilefrina, mostrando que o NO liberado inicialmente pela enzima nNOS é importante na iniciação e perpetuação da resposta inflamatória sistêmica. Considerando que o NO causa inibição da capacidade de ligação do GR (quando produzido em maiores quantidades) e que a ativação da nNOS (liberando pequenas quantidades de NO) é um evento importante para o início da resposta inflamatória, sugerimos que o NO modula a resposta inflamatória sistêmica, ativando-a e diminuindo-a em momentos distintos do seu desenvolvimento.

Abstract

Septic shock is a potentially lethal condition caused by infectious agents characterized by low tissue perfusion which may lead to multiple organ failure and death. Considering that in sepsis inducible nitric oxide (NO) synthase (NOS) is induced, that levels of serum glucocorticoids (GC) are increased in sepsis and that synthetic GC fail to improve the septic patients condition, the objective of the first part of this study was to evaluate *in vivo* whether there would be a relationship between increase in NO production and failure of GC in resolving the systemic inflammatory response in endotoxemic rats. Our results show that: i) treatment of rats with bacterial endotoxin (LPS) increased NOS levels and decreased GC binding to their receptors (GR) in several organs after LPS injection; ii) pre-treatment with the NOS inhibitor L-NAME (L-nitro-arginine-methyl-ester) prevented the decrease in GR binding and iii) injection of SNAP (an NO donor) prior to dexamethasone in LPS-injected rats blocked the onset of anti-inflammatory and immunosuppressive actions of dexamethasone. Considering that NO has high affinity towards protein sulphydryls, our results suggest that LPS-induced NO production may be a possible mechanism whereby GR binding and functionality are reduced, is most likely through GR S-nitrosylation. In the second part of the present study, we have investigated whether NO released the very early (1-2 hours) during initiation of an inflammatory response (sepsis) would sufficiently interfere in the development of the ensuing inflammatory and cardiovascular responses to sepsis induction. The blockade of this early NO release by the highly selective neuronal NOS inhibitor 7-nitroindazol blunted both the development of the inflammatory response and the vasoconstrictor hyporesponsiveness to phenylephrine induced by sepsis. This shows that the early NO released carried out by nNOS is critical for the starting and maintenance of a systemic inflammatory reaction. Taking into account that NO inhibits GR binding at higher concentrations and that low concentrations of NO (achieved by nNOS activation) is an important event for the initiation of inflammation, we suggest that NO (alone or via GR) modulates the systemic inflammatory response, either increasing or decreasing it, at distinct moments of its natural course.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Abreviaturas.....	ii
Lista de Figuras.....	iv
Lista de Esquemas.....	vi
Resumo.....	vii
Summary.....	viii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Sepsis: um breve relato histórico.....	2
1.1 Definição.....	4
1.2 Epidemiologia.....	5
1.3 Causas.....	6
1.4 Fisiopatologia da sepsis severa / choque séptico.....	7
2. Ativação do eixo HPA (hipófise-pituitária-adrenal) em resposta à inflamação.....	11
2.1 Glicocorticóides.....	12
2.2 Mecanismos de ação dos glicocorticóides.....	13
2.2.1 Mecanismo clássico (genômico).....	13
2.2.2 Mecanismos de ação não-genômico dos glicocorticóides.....	17
3. Produção de óxido nítrico na sepsis.....	19
3.1 Enzimas óxido nítrico sintases (NOS).....	19
3.2 Alvos moleculares do óxido nítrico.....	21
3.3 Importância do óxido nítrico na sepsis.....	23
4. Contextualização do problema.....	24
II. OBJETIVOS.....	26
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Animais.....	28
3.2 Modelos experimentais.....	28
3.2.1 Modelo de endotoxemia por LPS.....	28
3.2.2 Modelo de septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	29
3.3 Perfusão dos animais e obtenção das amostras.....	29
3.4 Ensaio.....	30
3.4.1 Ensaio de ligação de receptores de glicocorticóide.....	30
3.4.2 Ensaio da atividade das NOS pelo método da L-citrulina.....	31
3.4.3 Imunoeletroforese para iNOS (<i>Western blot</i>).....	33
3.4.4 Determinação dos níveis de nitrato + nitrito (NO _x).....	33
3.4.5 Determinação da atividade da enzima tirosina aminotransferase (TAT).....	35
3.4.6 Dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).....	36
3.5 Outras determinações.....	36
3.5.1 Mensuração e registro da pressão arterial.....	36
3.5.2 Determinação do crescimento de bactérias de lavado peritonial.....	37
3.5.3 Contagem de leucócitos totais.....	38
3.5.4 Determinação do peso corporal total e do peso relativo do baço.....	38
3.5.5 Avaliação da sobrevivência dos animais.....	38
3.6 Protocolos experimentais – Parte I: Efeito do óxido nítrico sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do receptor de glicocorticóide em	

	modelos experimentais de sepse.....	39
3.6.1	Comparação entre os modelos LPS e CLP: sobrevida e níveis plasmáticos de NOx.....	39
3.6.2	Efeito da dexametasona sobre a produção de NO e sobrevida de animais	39
3.6.3	Avaliação da capacidade de ligação do GR e produção de NO nos modelos LPS e CLP.....	40
3.6.4	Efeito do SNAP sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do GR.....	41
3.6.5	Efeito do L-NAME na capacidade de ligação do GR e produção de NOx em animais endotoxêmicos.....	41
3.3.6	Efeito do SNAP sobre a ação da dexametasona nos modelos LPS e CLP.....	42
3.7	Protocolos experimentais Parte II - Envolvimento do NO na iniciação da resposta inflamatória sistêmica: participação da enzima NOS neuronal.....	43
3.7.1	Efeito do L-NAME e da AG na atividade/expressão da iNOS, produção de NOx e atividade da MPO de ratos tratados com LPS.....	43
3.7.2	Efeito da AG e do 7-NI sobre a queda da PAM e produção de NOx 2 horas após LPS.....	44
3.7.3	Efeito da AG e do 7-NI sobre alguns parâmetros inflamatórios e cardiovasculares no modelo CLP.....	45
3.7.4	Efeito do 7-NI sobre o crescimento de bactérias de lavado peritoneal 36 e 72 horas após CLP.....	45
3.7.5	Efeito do SNAP e do LPS sobre a capacidade de ligação do GR avaliado 2 horas após o tratamento dos animais.....	46
3.8	Drogas e reagentes.....	46
3.9	Análise estatística.....	47
IV.	RESULTADOS	48
4.1	Parte I: Efeito do óxido nítrico sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do receptor de glicocorticóide em modelos experimentais de sepse.....	48
4.1.1	Comparação entre os modelos LPS e CLP: sobrevida e níveis plasmáticos de NOx.....	48
4.1.2	Efeito da dexametasona sobre a produção de NO e sobrevida de animais	53
4.1.3	Avaliação da capacidade de ligação do GR e produção de NO nos modelos LPS e CLP.....	57
4.1.4	Efeito do SNAP sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do GR.....	61
4.1.5	Efeito do L-NAME na capacidade de ligação do GR e produção de NOx em animais endotoxêmicos.....	66
4.1.6	Efeito do SNAP sobre a ação da dexametasona nos modelos LPS e CLP.....	71
4.2	Parte II - Envolvimento do NO na iniciação da resposta inflamatória sistêmica: participação da enzima NOS neuronal.....	77
4.2.1	Efeito do L-NAME e da AG na atividade/expressão da iNOS, produção	77
	de NOx e atividade da MPO de ratos tratados com LPS.....	77
4.2.2	Efeito da AG e do 7-NI sobre a queda da PAM e produção de NOx 2 horas após LPS.....	82

4.2.3	Efeito da AG e do 7-NI sobre alguns parâmetros inflamatórios e cardiovasculares no modelo CLP.....	86
4.2.4	Efeito do 7-NI sobre o crescimento de bactérias de lavado peritoneal 36 e 72 horas após CLP.....	93
4.2.5	Efeito do SNAP e do LPS sobre a capacidade de ligação do GR avaliado 2 horas após o tratamento dos animais.....	97
V.	DISCUSSÃO	100
VI.	CONCLUSÕES	123
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125

I - INTRODUÇÃO

Sepse é descrita como uma síndrome complexa resultante de uma resposta “desordenada” do hospedeiro frente a um processo infeccioso. Nos últimos anos, houve um grande avanço no entendimento dos mecanismos referentes à patogênese que ajudaram na melhor compreensão do desenvolvimento da seps e dos princípios que governam as interações agente infeccioso/hospedeiro. Porém, as observações feitas por diversos pesquisadores ainda não se traduziram em melhoras na prática clínica e a taxa de mortalidade continua sendo de 20 a 80%, mostrando que o avanço que se obteve é apenas o início de um longo processo de aprendizado.

Neste estudo enfatizamos um importante elemento envolvido no controle da resposta inflamatória que é o receptor de glicocorticóide. A observação de que os glicocorticóides são ineficazes para o tratamento da seps e nos despertou muito interesse, aliada ao fato de que grandes quantidades de óxido nítrico são produzidas e liberadas durante o desenvolvimento da septicemia, e que este gás está diretamente envolvido com eventos importantes e definitivos para a recuperação do paciente séptico (tais como hipotensão e lesão tecidual), neste trabalho procuramos investigar se existe uma relação entre a elevada produção de óxido nítrico e a incapacidade dos glicocorticóides controlarem a resposta inflamatória sistêmica em estágios avançados de seps e.

Devido ao aumento crescente de trabalhos mostrando a participação do óxido nítrico no controle da resposta inflamatória em seus momentos iniciais, isto é, logo após o estímulo inflamatório, também investigamos a possível participação do óxido nítrico liberado no início (primeiras 2 horas) do quadro séptico ou endotóxico no

desenvolvimento do quadro séptico/endotóxico. Além disso, procuramos caracterizar a enzima responsável pela liberação inicial de óxido nítrico, determinante para o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica.

Mesmo levando em conta o fato de não termos podido nos aprofundar nos mecanismos moleculares envolvidos nos achados descritos neste trabalho, cremos que os resultados são consistentes com a proposição de um possível mecanismo de controle da resposta inflamatória que envolve o óxido nítrico e o receptor de glicocorticóide. Acreditamos que o melhor entendimento da relação entre o óxido nítrico e os receptores de glicocorticóides, bem como a antecipação deste e de outros mecanismos de controle da resposta inflamatória (através do melhor entendimento da dinâmica da inflamação) poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas capazes de restaurar a homeostasia e conseqüentemente recuperar o paciente séptico.

1. Sepsis: um breve relato histórico

As doenças causadas por microorganismos são um problema antigo enfrentado pela humanidade. Ao longo da História, milhares de pessoas foram vítimas de inúmeras pandemias, tais como cólera, praga, febre tifóide, influenza, tuberculose e outras infecções, responsáveis pela baixa expectativa de vida da população mundial em épocas mais antigas. A partir da descoberta dos microorganismos e da associação destes como agentes causais de diversas doenças, e à medida que as técnicas de assepsia pessoal e de procedimentos cirúrgicos foram sendo descobertas e aplicadas, o número de mortes por doenças infecciosas diminuiu significativamente (World Health Organization, 2000).

Um momento importante na história da humanidade e que significou um enorme avanço para a Medicina ocorreu entre 1920 e 1945. Neste período aconteceu um grande desenvolvimento tecnológico impulsionado pelas grandes guerras mundiais. A partir deste período, a taxa de crescimento da população mundial aumentou espantosamente, passando de 2,5 bilhões de pessoas (contabilizados pelo censo de 1950) para 6 bilhões em apenas 50 anos (censo de 2000) (United Nations, 2004).

A descoberta da penicilina em 1928, pelo cientista britânico Alexander Fleming significou um grande avanço no tratamento da sepse. A taxa de mortalidade causada por esta e por outras doenças infecciosas diminuiu dramaticamente após este período. Diante da provável resolução para o antigo problema causado pelas doenças infecciosas de maneira geral, a comunidade científica, as várias organizações governamentais e órgãos financiadores, voltaram-se para as doenças relacionadas à sociedade moderna (doenças cardiovasculares e do sistema nervoso central) (World Health Organization, 2000).

No entanto, não demorou muito para aparecerem as primeiras cepas de bactérias resistentes à tetraciclina (1955), mostrando que o antigo problema permanecia. À medida que os antibióticos de gerações sucessivas foram sendo criados, o número de cepas de bactérias resistentes aos antibióticos existentes na época também aumentou. Dentre os vários fatores responsáveis pela desenfreada quantidade de mutações de microorganismos destaca-se o uso descontrolado de antibióticos, para o tratamento de enfermidades em seres humanos e em animais, e a utilização destes fármacos na aquicultura e agricultura. Atualmente, cepas de bactérias resistentes aos mais variados tipos de antibióticos existentes foram selecionadas, e as infecções causadas por este tipo de bactérias contribuem de

maneira significativa para manutenção da elevada taxa de mortalidade vista na sepse (World Health Organization, 2000).

Atualmente, a resistência de microorganismos a antibióticos é considerada um problema de saúde pública pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Doenças como tuberculose, gonorréia e febre tifóide (anteriormente dizimadas) estão rapidamente se tornando doenças de difícil tratamento. Além disso, o aumento populacional, o aumento da expectativa de vida e o conseqüente envelhecimento da população são fatores que preocupam a OMS, pois contribuem ainda mais para a disseminação destes “super” agentes infecciosos. A OMS está desenvolvendo uma estratégia globalizada, através da ação conjunta de países e governos, organizações governamentais e não-governamentais e de setores de saúde pública e privada, para diminuir a seleção de cepas resistentes aos antibióticos já existentes e conseqüentemente impedir a disseminação de doenças infecciosas, principalmente nos países mais pobres.

1.1 Definição

Em 1879-80, Louis Pasteur encontrou, pela primeira vez, bactérias no sangue de uma paciente que sobreviveu à sepse. Aproximadamente um século após a observação feita por este pesquisador é que finalmente se chegou a um consenso sobre a definição de sepse. Esta relativa demora se deve principalmente à dificuldade de identificação desta síndrome por clínicos e pesquisadores, uma vez que os sinais e sintomas clínicos variam enormemente dependendo do estágio da síndrome em que o paciente se encontra (para revisão ver Annane *et al.*, 2005).

Por se tratar de uma resposta inflamatória sistêmica com possibilidade de evolução para quadros clínicos, cujos sintomas e sinais diferem enormemente à medida que a doença evolui, em 1991 foram estabelecidos critérios para a classificação de sepse e doenças similares na Conferência de Consenso feita pela *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine* (Bone *et al.*, 1992). Optou-se por enquadrá-las como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*). Além disso, ficou estabelecido também que o termo sepse deverá ser utilizado apenas nos casos onde a infecção é documentada, pois SIRS pode ser causada por diversos outros insultos (além da infecção por bactérias, vírus e fungos), considerados como “estéreis”, tais como trauma, queimaduras, choque hemorrágico e pancreatite aguda (Beishuizen *et al.*, 1999). Esta medida foi necessária para adequação do tratamento à fase de evolução da síndrome em que o paciente se encontra.

Recentemente foi lançada a campanha mundial “*The Surviving Sepsis Campaign*” para unificação dos critérios de diagnóstico e de tratamento da síndrome séptica. Esta campanha está abrangendo todos os profissionais da saúde, sociedades de medicina de terapia intensiva, organizações políticas e financiadoras, além de pacientes e de seus familiares. Dentre os vários objetivos, almeja-se diminuir em 25% a mortalidade associada à sepse até o ano de 2008 (Levy, 2003).

1.2 Epidemiologia

Sepse e choque séptico são as maiores causas de morte em unidades de terapia intensiva de países desenvolvidos, apesar dos recentes avanços na medicina de terapia intensiva. Um estudo epidemiológico recente feito por Martin *et*

al., (2003) aponta uma incidência anual de 660 mil casos de sepse no Estados Unidos da América (EUA), estimando que ocorram 50-95 casos de sepse por ano para cada 100 mil habitantes, com uma taxa de crescimento anual de 9%. Já outro estudo realizado por Angus *et al.*, 2001 apontou uma ocorrência de 750 mil casos de sepse a cada ano nos EUA, sendo que 210 mil do total de pacientes notificados morreram. Os custos para o tratamento da sepse já excedem o valor de U\$ 16 bilhões por ano nos EUA e estima-se (com base nos dados apontados no estudo), que nos próximos anos este valor deva ser ainda muito maior (Angus *et al.*, 2001).

Esta alta incidência, como dito anteriormente, se deve em parte ao aumento da expectativa de vida de idosos e pacientes com enfermidades graves, associado ao emprego descontrolado da antibioticoterapia (responsável pelo aumento do número de bactérias resistentes), ao número de procedimentos invasivos e de pacientes imunodeprimidos (como pacientes HIV-positivos) e à elevada frequência de infecções hospitalares. Além disso, outros fatores predispõem ao desenvolvimento de sepse, tais como câncer, falência de órgão crônica (rim, por exemplo), fatores iatrogênicos e genéticos (prevalência em homens) e polimorfismos em genes que regulam a imunidade (Annane *et al.*, 2005).

1.3 Causas

A maioria dos casos de sepse (mais de 80%) ocorre por infecções pulmonares, abdominais, do sistema genitourinário e infecções primárias na circulação sangüínea. Dentre estes locais preferenciais, o pulmão e a corrente sangüínea são responsáveis pelo maior número de casos. Nos últimos anos, a incidência de sepse decorrente de infecção no abdome não se modificou e no sistema genitourinário diminuiu (Annane *et al.*, 2005).

Apesar do número de casos de sepse por bactérias gram-negativas estar diminuindo ao longo dos anos, a incidência de infecção por este tipo de bactérias ainda é bastante alta (25-30%). A bactéria *E. coli* é responsável por 9-27% das infecções causadas por bactérias gram-negativas. O número de casos de sepse decorrentes de infecções por fungos (1-3%), parasitas (1-3%) e vírus (2-3%), apesar de baixos em relação a outros tipos de agentes causais, está aumentando consideravelmente nos últimos anos. Mais recentemente observou-se que as infecções causadas por bactérias gram-positivas estão se tornando responsáveis pela maioria dos casos de sepse (30-50%). Só as infecções causadas pela bactéria *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (bactéria resistente a vários antibióticos) são responsáveis por 14-24% do total de casos de sepse decorrentes de infecções por bactérias gram-positivas (Annane *et al.*, 2005).

1.4 Fisiopatologia da sepse severa / choque séptico

O choque séptico é considerado um agravamento do quadro de sepse, resultante de uma descompensação hemodinâmica, que ocorre na presença de agentes infecciosos e mediadores inflamatórios na circulação sanguínea (Hollenberg *et al.*, 2004).

Primariamente trata-se de uma forma de choque distributivo, caracterizado por uma incapacidade de fornecimento e de extração de oxigênio dos tecidos, associado a uma vasodilatação periférica inadequada, que ocorre apesar do débito cardíaco estar preservado ou até mesmo aumentado (Parrillo *et al.*, 1990). Embora muitos pacientes acabem morrendo nos estágios iniciais da síndrome, em um grande número de casos estas alterações hemodinâmicas evoluem gradualmente

para um estado hipodinâmico (estágio tardio do choque), caracterizado por baixa resistência vascular periférica, queda do débito cardíaco e hiporresponsividade dos vasos a vasoconstritores. Mesmo após a restauração do volume intravascular, a microcirculação permanece alterada, e a persistência desta anormalidade resulta na má distribuição do débito cardíaco (Ince *et al.*, 1999).

As manifestações clínicas vistas no choque séptico são o resultado de uma resposta excessiva do hospedeiro à infecção (geralmente bactérias gram-negativas e gram-positivas). Na presença do patógeno dois componentes da resposta imune são ativados: o inato e o adaptativo. A resposta imune inata constitui a primeira linha de defesa contra a infecção. Nela, uma grande variedade de patógenos são reconhecidos (de maneira inespecífica) e a resposta desencadeada pelo reconhecimento é imediata. Em contraste à resposta inata, a resposta imune adaptativa é caracterizada pelo reconhecimento altamente específico de antígenos “estranhos” ao organismo e pela capacidade do sistema de armazenar “memória imunológica”. A resposta inata do hospedeiro às infecções causadas por fungos e bactérias é mediada inicialmente por neutrófilos, monócitos/macrófagos. Estas células expressam receptores (PRR; *Pattern Recognition Receptors*) capazes de reconhecer regiões específicas e conservadas (PAMP; *Pathogen Associated Molecular Patterns*), presentes em uma grande variedade de microorganismos (para revisão ver Weigand, 2004)

Os fatores desencadeantes da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são componentes da parede celular dos microorganismos, como o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanas, derivados de bactérias Gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias Gram-negativas (endotoxinas). O LPS e as exotoxinas são liberados normalmente durante a

replicação da bactéria e ou como consequência da sua morte, devido à lise da parede celular. A importância do LPS como fator desencadeador da sepse foi demonstrada após sua administração em humanos saudáveis, com reprodução de alterações hemodinâmicas observadas em pacientes com sepse e em modelos experimentais (Suffradin *et al.*, 1989).

O LPS ativa as células fagocíticas através dos receptores *Toll-like* (TLR-4) complexado à proteína ligadora de LPS e CD14. Vários tipos de receptores TLR foram identificados (TLR-1 a 11) e também possuem afinidade específica (por exemplo, TLR-2 que traduz sinais de bactérias gram-positivas e de LTA). Após a ativação destes receptores ocorre o recrutamento de várias proteínas citoplasmáticas acessórias, tais como a proteína adaptadora MyD88 e o receptor para IL-1 associado à quinase (IRAK). O recrutamento destas proteínas acessórias causa auto-fosforilação das mesmas e conseqüentemente ocorre a ativação do *TNF-receptor activated factor-6* (TRAF-6). Este, por sua vez, causa a ativação de várias proteínas, tais como p38, JNK e IKK α/β , cujas ações convergem para ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Sherwood, 2004).

Portanto, além das alterações hemodinâmicas descritas acima, uma enorme variedade de tipos celulares, bem como mediadores inflamatórios, estão envolvidos na patogênese do choque séptico. Citocinas pró-inflamatórias são liberadas na circulação sanguínea levando à ativação de células como neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais. Aliado a isso, ocorre ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas como o complemento, a coagulação, o sistema fibrinolítico e de contato. Mediadores lipídicos como eicosanóides e fator de ativação plaquetária, bem como radicais de oxigênio e nitrogênio são produzidos e liberados (Beishuizen *et al.*, 1999).

Nos estágios iniciais do choque, mecanismos de compensação são ativados na tentativa de restaurar a pressão, o fluxo sanguíneo e o fornecimento de oxigênio para órgãos vitais. Porém, quando estes mecanismos de compensação deixam de funcionar, ocorre a perda da funcionalidade da membrana celular com conseqüente perda de gradientes iônicos, liberação de enzimas lisossomais, proteólise (devido à ativação de proteases) e redução dos estoques celulares de energia. No momento em que uma parcela considerável de células pertencentes a órgãos vitais alcançam este estágio, o choque pode tornar-se irreversível e pode ocorrer morte do paciente, mesmo que o foco infeccioso já tenha sido eliminado (Parrillo *et al.*, 1990).

É a complexa interação entre os diferentes mediadores inflamatórios e as alterações hemodinâmicas observadas durante o choque séptico que dificultam o tratamento desta patologia, sendo este um dos motivos pelos quais o manejo do paciente em choque não sofreu alterações substanciais nas duas últimas décadas. A manobra terapêutica prioritária tem sido a manutenção da pressão arterial e do débito cardíaco, através de reposição de líquido e utilização de agentes inotrópicos e vasopressores (Wheeler *et al.*, 1999). Em seguida, busca-se a identificação e eliminação do foco infeccioso através da utilização de antibióticos e em casos extremos, a remoção cirúrgica (Hollenberg *et al.*, 2004).

2. Ativação do eixo HPA (hipófise-pituitária-adrenal) em resposta à inflamação

Durante o choque séptico ocorrem várias alterações nos mecanismos que regulam a homeostasia celular. Em resposta ao severo estresse produzido durante este quadro ocorre a indução de sistemas responsáveis pelos mecanismos de defesa do organismo como o sistema nervoso, sistema imune e o sistema endócrino. O sistema endócrino é responsável pela coordenação das reações do organismo frente às várias mudanças fisiopatológicas que podem ocorrer durante a vida normal de um indivíduo. Um dos órgãos centrais, envolvido na resposta do sistema endócrino frente ao estresse produzido pela invasão de microorganismos na corrente sangüínea é a glândula adrenal (Miller *et al.*, 1995), que nestas situações secreta quantidades apreciáveis dos hormônios adrenalina e noradrenalina e dos hormônios adrenocorticais mineralocorticóides e glicocorticóides, além de secretar pequenas quantidades de hormônios sexuais, como os hormônios androgênicos (Guyton, 1996).

Sinais originados de áreas centrais do cérebro como o hipocampo ou amígdala modulam a síntese e liberação do fator de liberação de corticotrofina (CRH, do inglês *Corticotrophin-releasing Hormone*) e arginina-vasopressina (AVP) do hipotálamo, que então resulta na formação de um sinal do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH, do inglês, *Adrenocorticotropic Hormone*) no interior da pituitária, que por sua vez causa a síntese e liberação de hormônios adrenocorticais por um mecanismo ainda não totalmente esclarecido (Guyton, 1996).

2.1 Glicocorticóides

Os glicocorticóides (GC: cortisol no ser humano e corticosterona no rato) afetam virtualmente todos os órgãos e sistemas do organismo, participando da

regulação no metabolismo de carboidratos, proteínas e lipídios. Participam ainda do balanço hidroeletrólítico, da manutenção da fisiologia dos sistemas cardiovascular, imune e renal, além da musculatura esquelética, e dos sistemas endócrino e nervoso. Devido às suas ações anti-inflamatórias e imunossupressoras são descritos como os anti-inflamatórios mais eficazes existentes na clínica, uma vez que seus mecanismos de ação geralmente suprimem a resposta inflamatória desde o início do processo. Por este motivo, os glicocorticóides são utilizados clinicamente através de diferentes formulações e formas farmacêuticas, estando entre uma das classes de fármacos mais comercializados.

Os glicocorticóides são produzidos em condições catabólicas e são liberados rapidamente na corrente sanguínea (em minutos) em resposta a uma perturbação osmótica e a um estímulo estressante. Como descrito anteriormente, os glicocorticóides são secretados a partir da ação do ACTH sobre o córtex da adrenal. Nas células adrenocorticais o ACTH liga-se a um receptor de membrana acoplado à proteína G, chamado receptor ACTH. Desta forma ocorre ativação da adenilato ciclase e aumento na concentração intracelular de cAMP (segundo mensageiro). As células adrenocorticais, em resposta ao ACTH, aumentam a oferta de colesterol, o substrato das enzimas esteroidogênicas, durante a fase aguda da biossíntese de glicocorticóides que ocorre em poucos segundos após a ativação do receptor ACTH (Guyton, 1996).

O cortisol combina-se no sangue com uma globulina chamada de globulina fixadora do cortisol ou transcortina e, em menor extensão, com albumina (cerca de 94% são normalmente transportados na forma fixada e cerca de 6% na forma livre). Em geral os corticóides são fixados nos tecidos alvo ou destruídos dentro de uma

ou duas horas. Os esteróides adrenais são degradados sobretudo no fígado e conjugados especialmente para formar glicuronídeos e, em menor extensão em sulfatos. Cerca de 25% destes são excretados na bile e, depois, nas fezes, e os 75% restantes, na urina. As formas conjugadas destes hormônios são inativas (Guyton *et al.*, 1996).

2.2 Mecanismos de ação dos glicocorticóides

Devido a sua alta lipossolubilidade, os glicocorticóides atravessam facilmente a membrana plasmática e se ligam aos seus receptores específicos (GR) no citosol, com conseqüente transporte para o núcleo celular e interação com regiões específicas no DNA, promovendo a transcrição e/ou repressão de determinados elementos responsivos a eles (modelo clássico de ativação de GR).

Por décadas, este foi considerado como o único mecanismo de ação dos glicocorticóides. No entanto, recentes evidências indicam que os GC também podem agir através de receptores específicos expressos na membrana das células (mecanismo de ação não-genômico dos glicocorticóides) (para revisão ver Falkenstein *et al.*, 2000 e Borski, 2000).

2.2.1 Mecanismo clássico (genômico)

Os efeitos genômicos dos hormônios corticosteróides ou glicocorticóides são mediados através de um receptor intracelular, o receptor glicocorticóide (GR)

(Hollemborg *et al.*, 1985, Arriza *et al.*, 1987). Este, após ativação por seu respectivo hormônio nos tecidos alvos, regula a expressão de genes responsivos a glicocorticóides, alterando os níveis de determinadas proteínas. Devido a esta interação (receptor-DNA) e à necessidade de síntese protéica, a resposta induzida por glicocorticóides não é imediata, ocorrendo ao longo de algumas horas.

O receptor de glicocorticóide é membro de uma superfamília de receptores nucleares que incluem os receptores para mineralocorticóides, progesterona, androgênios, estrogênios, hormônios da tireóide, vitamina D e ácido retinóico. Duas isoformas do GR humano, GR α e GR β são gerados pelo *splicing* alternativo de um único gene. O GR α é formado por 777 aminoácidos, e através da ligação com corticóides causa a ativação de genes responsivos a glicocorticóides. Contrariamente ao GR α , a isoforma β tem apenas 742 aminoácidos, diferindo do GR α na região C-terminal e, além disso, os corticóides não se ligam a esta isoforma do receptor. A função do GR β ainda não está clara, mas acredita-se que este receptor possa agir como um regulador negativo da transativação mediada pelo GR α , uma vez que o GR β também é capaz de ligar nas regiões responsivas ao glicocorticóide no núcleo da célula. O aumento da expressão da isoforma β do receptor tem sido associada à resistência aos glicocorticóides encontradas durante respostas inflamatórias (Smoak *et al.*, 2004, Lu *et al.*, 2004).

O receptor de glicocorticóide humano foi clonado em 1985 por Hollemborg e colaboradores (Hollemborg *et al.*, 1985). Além deste, os receptores de rato e camundongo também foram clonados (para revisão ver Funder, 1997). Existe uma alta homologia estrutural entre os receptores de diferentes espécies, em torno de

89%. O peso molecular do GR α humano é de aproximadamente 80-90 kDa, podendo ser dividido em três domínios funcionais.

A maior diferença entre os receptores é observada no domínio N-terminal, considerado como uma região "moduladora" envolvida na regulação da transcrição mediada por receptor. Nesta região existem resíduos de serina passíveis de regulação via fosforilação. No entanto, o efeito destas fosforilações sobre as ações dos glicocorticóides ainda não estão totalmente esclarecidas, podendo estar envolvidas com o *turnover*, com a translocação intracelular do GR ou regulação da ativação das ações genômicas deste receptor. Perto do centro da proteína está um segundo domínio de ligação, uma região altamente básica, enriquecida de resíduos de cisteína, lisina e arginina. Esta região tem aproximadamente 70 aminoácidos e nela está localizado o domínio de ligação do receptor ao DNA (DBD, do inglês *DNA Binding Domain*). Existem também nesta região duas projeções em forma de dedo, as quais interagem com o DNA, chamadas de "dedos de zinco" (do inglês *zinc fingers*). Estes dedos de zinco por sua vez, são formados por um átomo de zinco ligado a quatro resíduos de cisteína. O terceiro e último domínio, chamado de domínio de ligação do hormônio (HBD, do inglês *Hormone Binding Domain*) está localizado no extremo C-terminal do receptor. A ligação do glicocorticóide ocorre nesta região e ativa as respostas biológicas mediadas pelo receptor (Ismaili *et al.*, 2004).

O receptor para glicocorticóides em repouso é um complexo protéico de aproximadamente 300 kDa localizado no citosol celular e resulta da associação do receptor propriamente dito a proteínas do choque térmico (*heat shock proteins*; hsp). Uma molécula do receptor encontra-se associado a duas moléculas de hsp com 90 kDa cada, as hsp90. A ligação com a hsp90 confere ao receptor uma

conformação de alta afinidade de ligação ao esteróide. Já a dissociação que ocorre sob algumas condições, como elevação da temperatura e do pH, promove a alteração da conformação do receptor para um estado de alta afinidade de ligação ao DNA. A ligação do esteróide ao GR também acarreta a dissociação da hsp90 e possibilita a translocação do mesmo para o núcleo. Além da hsp90, outras proteínas como a hsp70 e a hsp56 fazem parte do heterocomplexo que forma o GR. Estas proteínas de choque térmico existem no citosol independentes de sua ligação com o receptor (Kumar *et al.*, 1999).

No núcleo, o receptor glicocorticóide interage com sítios específicos no DNA, chamados de elementos responsivos a glicocorticóide (GRE, do inglês *Glucocorticoid Response Element* - 5'-GGTACA-nnn-TGTGCT-3') ou elemento negativo responsivo ao glicocorticóide (nGREs) cuja seqüência de identificação varia muito mais (Yamamoto, 1985; Beato, 1987).

Através da interação com fatores de transcrição como o AP-1, a expressão de genes pode ser controlada pelo GR sem que ocorra necessariamente a ligação do receptor ao DNA. Neste caso, a interação com outras proteínas, possivelmente mediadas por fatores de transcrição, previne a transativação dos genes resultando num efeito repressor. Desde a descoberta deste mecanismo em 1990 (Jonat *et al.*, 1990, Schüle *et al.*, 1990, Yang Yen *et al.*, 1990), um crescente número de exemplos deste modo de ação foi descrito incluindo a interação do GR com AP-1, NF- κ B, GATA-1 e CREB (Chang *et al.*, 1993, Imai *et al.*, 1993, Caldenhoven *et al.*, 1995). Este pode ser um dos mecanismos pelos quais os glicocorticóides exercem seus efeitos anti-inflamatórios, uma vez que a ativação da transcrição de vários mediadores da inflamação é reprimida pela interação direta com o GR. Os efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticóides parecem ocorrer através da interação do GR

com NF- κ B e AP-1 em diferentes tecidos. Outra forma de regulação da transcrição de mediadores da inflamação é através da elevação da expressão de I- κ B α e da interação de GR com a cromatina através de um modelo de competição com fatores de transcrição como CBP (*CREB binding protein*) e p300 (para revisão ver Barnes, 1998 e McKay *et al.*, 1999)

2.2.2 Mecanismo de ação não-genômico dos glicocorticóides

As primeiras observações do efeito rápido dos esteróides foram feitas na década de 40. No entanto, estes efeitos (não-genômicos) demonstrados para vários esteróides e mediados por mecanismos associados à membrana plasmática, foram melhor explicados apenas nos últimos 15 anos (Borski, 2000).

Através deste mecanismo, os esteróides modulam a secreção de hormônios, a excitabilidade neuronal, o comportamento, a morfologia celular e o metabolismo de carboidratos. Os efeitos não-genômicos destes esteróides sobre as várias funções celulares envolvem segundos mensageiros clássicos, tais como fosfolipase C (PLC), fosfatidilinositol (IP_3), cálcio, proteína quinase C (PKC; Falkenstein *et al.*, 2000) e mais recentemente, a família de proteínas fosfatidilinositol-3-quinases (PI3K/Akt). Foi demonstrado por Simoncini e colaboradores (2002) que a ativação desta família de proteínas quinase decorrentes da ativação do receptor para estrogênio (localizado na membrana plasmática) leva ao aumento da produção rápida NO pela enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) em células endoteliais de cordão umbilical humano.

Recentemente, os receptores de glicocorticóides de membrana (GRm) foram demonstrados no cérebro de anfíbios, em células leucêmicas humanas (linfoblastos)

e em células S-49 (linfoma de camundongos). No entanto, a existência fisiológica destes receptores ainda é controversa. Isto se deve à dificuldade de marcação do GR na membrana das células, por inúmeras técnicas e conseqüentemente aos resultados controversos obtidos por diferentes grupos de pesquisadores (Buttgereit *et al.*, 2002). Porém, como pequenas concentrações de glicocorticóides são necessárias para ativação das ações rápidas relacionadas a estes corticóides (sugerindo especificidade de ação) e estas mesmas ações são bloqueadas por antagonistas específicos do GR, assume-se a existência destes receptores na membrana celular de uma variedade de tipos celulares. Além disso, vários efeitos dos glicocorticóides são observados após um curto período de tempo (segundos a minutos), e por isso não podem ser explicados pelo mecanismo clássico de ação dos glicocorticóides (ação genômica). Aliado a isso, as respostas rápidas mediadas por glicocorticóides não causam ativação/repressão do GRE, e não são inibidas por bloqueadores de transcrição gênica e de síntese protéica, como actimomicina D e cicloheximida, respectivamente (Borski, 2000)

Já está descrita a participação de ações rápidas dos glicocorticóides na modulação da função cerebral e do comportamento, bem como em respostas celulares em geral, ocorrendo através da ativação de segundos mensageiros como cálcio, cAMP, IP₃ e PKC. Recentemente, foi demonstrado que a dexametasona aumenta rapidamente o influxo de cálcio em gânglios de neurônios espinais (pertencentes ao sistema auditivo) através da ativação de receptores para ATP extracelulares (P2X), os quais interagem com o receptor GRm. A ativação conjunta destes receptores causa o aumento rápido da produção de NO por enzimas óxido nítrico sintases (NOS), sugerindo que este mediador pode desenvolver importante papel na transdução de sinal do sistema auditivo (Yukawa *et al.*, 2005).

3. Produção de óxido nítrico na sepse

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos foram publicados demonstrando o envolvimento de uma elevada produção de NO durante a sepse. É considerado como um dos principais fatores envolvidos na vasodilatação e no dano tecidual observado no desenvolvimento desta síndrome (Knowles *et al.*, 1992), tanto em animais de experimentação quanto em humanos (Tsuneyoshi *et al.*, 1996).

3.1 Enzimas óxido nítrico sintases (NOS)

O NO é um radical livre formado endogenamente por uma família de enzimas, NOS, através da conversão de L-arginina em L-citrulina (Ignarro, 1990, Moncada *et al.*, 1991). Foram identificadas três diferentes isoformas de NOS em células de mamíferos (produtos de diferentes genes): NOS endotelial (eNOS ou NOS III) encontrada em células endoteliais, epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (nNOS ou NOS I) encontrada em neurônios, células musculares esqueléticas e neutrófilos (Greenberg, *et al.*, 1998) e a NOS induzida (iNOS ou NOS II), encontrada em macrófagos, hepatócitos, células musculares lisas (Titheradge, 1999).

A eNOS e nNOS são classificadas como enzimas constitutivas e dependentes de cálcio, enquanto que a iNOS é classificada como uma enzima induzida, cujas ações independem de cálcio. No entanto, esta classificação atualmente está deixando de ser utilizada, devido à enorme variedade de tecidos onde todas as isoformas da NOS são expressas constitutivamente e à capacidade de indução de NOS dependentes de cálcio em alguns tecidos, como por exemplo, o aumento da expressão e da atividade da enzima nNOS na musculatura esquelética

de ratos horas após a injeção de LPS (Hussain *et al.*, 1997). A ativação de todas as enzimas NOS necessita dos seguintes cofatores: calmodulina, flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina adenina mononucleotídeo (FMN), tetrahidrobiopterina (THB₄) e nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida (NADPH) (Titheradge, 1999).

Talvez a mais importante diferença entre as enzimas NOS esteja relacionada à quantidade de NO gerado por cada uma destas enzimas. A ativação das enzimas eNOS e nNOS induz à liberação de pequenas quantidades de NO, durante curtos períodos de tempo (segundos a minutos), Porém, entre estas duas isoformas, a enzima neuronal tem a maior capacidade de produzir NO (velocidade máxima [V_{máx}]: nNOS 90 e eNOS 10 nmol/min/mg). Por sua vez, quando expressa, a iNOS libera grandes quantidades de NO, quando comparada às outras isoformas da NOS ([V_{máx}] da iNOS 290 nmol/min/mg), além disso, a isoforma induzida é capaz de produzir NO durante longos períodos.

A atividade da NOS pode ser regulada em níveis transcricionais, translacionais e pós-translacionais. Todas as enzimas podem ter sua atividade aumentada por citocinas e podem ser reguladas transcricionalmente por hipóxia. A nNOS e a eNOS são ativadas pela interação com cálcio e calmodulina. Além disso, essas duas isoformas podem ser reguladas através da fosforilação de resíduos de serina. Estudos mostraram que a fosforilação da Ser¹¹⁷⁹ da isoforma endotelial pela proteína Akt resulta no aumento da produção de NO. No entanto, a fosforilação da isoforma neuronal na Ser⁸⁴⁷ por proteínas quinases dependentes de calmodulina diminui a atividade desta enzima. Já a ativação da isoforma induzida independe diretamente do aumento intracelular de cálcio. Esta enzima possui a habilidade de

ligar-se à calmodulina diante de pequenas concentrações de cálcio (para revisão ver Alderton *et al.*, 2001 e Stamler *et al.*, 2001).

A atividade das NOS pode ser regulada ainda por interação com outras proteínas. A atividade da eNOS e nNOS pode ser aumentada pela interação (direta em células endoteliais e indiretamente em células da musculatura esquelética de ratos, respectivamente) com hsp90. Recentemente foi descrita a interação da iNOS com a proteína calirina no sistema nervoso central. Esta interação parece impedir a dimerização da iNOS, representando uma função neuroprotetora durante a inflamação (Alderton *et al.*, 2001). Outras interações proteína-proteína parecem ser importantes para a regulação da atividade das NOS, tais como a interação da isoforma neuronal com a proteína inibidora de NOS (PIN), e o domínio PDZ (ambos no sistema nervoso central e na musculatura esquelética) e a interação da eNOS com resíduos de glicina miristoilados e de cisteína palmitoilados na membrana plasmática. Além disso, pode ocorrer a interação destas duas isoformas (eNOS e nNOS) com caveolinas (proteínas integrantes das cavéolas formadas de invaginações da membrana plasmática) de células endoteliais e células da musculatura esquelética (Stamler *et al.*, 2001).

3.2 Alvos moleculares do óxido nítrico

O NO é uma molécula gasosa, altamente hidrofóbica, facilmente difusível através de membranas biológicas. Tem um número ímpar de elétrons com um elétron desemparelhado, o que o torna um radical instável, mas não muito reativo (Cotton *et al.*, 1989). Devido a este aspecto químico, o NO tem vida média muito curta (cerca de 5-10 seg – (Palmer *et al.*, 1988)), resultando em imediatas e variadas reações químicas. Estas reações produzem efeitos diretos (reação do NO

com metais de várias proteínas/enzimas, como a guanilato ciclase) ou indiretos (reações com espécies reativas de oxigênio, tais como ânion superóxido ou oxigênio *singlet* com conseqüente formação de peroxinitrito) (Adams *et al.*, 1999, Wink *et al.*, 1998).

O NO (na verdade, a forma nitrosônio NO^+) tem também uma elevada capacidade reativa frente a grupamentos tióis (R-SH), muito comuns em proteínas que contenham resíduos de cisteína (Stamler, 1994). Esta reação induz à formação de S-nitrosotióis (R-SNO), que podem ser considerados como estoques endógenos de NO e estão presentes no plasma e nos tecidos. Em decorrência da liberação de NO de R-SNO protéicos, pode ocorrer a formação de pontes de dissulfeto entre sulfidrilas vicinais. Esta modificação pós-translacional por sua vez, pode também modular a funcionalidade de proteínas e enzimas. A S-nitrosilação de sulfidrilas de cisteínas é apontada como a maior responsável pela modulação redox e modificações funcionais de proteínas (Marshall *et al.*, 2000). Embora exista uma grande quantidade de sulfidrilas de cisteína em uma única proteína ou enzima, somente algumas são nitrosiladas. Este fenômeno é atribuído à especificidade do NO em reagir com resíduos de cisteínas desde que elas estejam em determinadas seqüências de aminoácidos (Broillet, 1999). Como exemplo de proteínas cuja funcionalidade pode ser modificada por nitrosilação de sulfidrilas podemos destacar os canais de K^+ dependentes de cálcio na musculatura lisa vascular (Bolotina *et al.*, 1994), os canais de cálcio do tipo L no músculo cardíaco (Campbell *et al.*, 1996), os canais de Na^+ presentes em barorreceptores (Li *et al.*, 1998) e os receptores de glicocorticóides (Galigniana *et al.*, 1999). Além disso, espécies reativas de NO como o NO^+ , podem ativar MAP-quinases pela ativação direta de proteínas G de baixo peso molecular como a p21^{ras} , RAC 1 ou Cdc42. Estas espécies são também

capazes de ativar diretamente alguns eventos de sinalização como as quinases ERK, JNK e p38 (Broillet, 1999).

3.3 Importância do óxido nítrico na sepse

A maior parte do NO relevante para o desarranjo cardiovascular do choque séptico tem origem na atividade da iNOS (Rees *et al.*, 1990, Salter *et al.*, 1991). O aumento na expressão de iNOS (proteína) e de seu mRNA durante a endotoxemia/bacteremia é observada em vários tipos celulares, como células endoteliais, células de Kupffer, hepatócitos, células da musculatura lisa vascular, células renais, condrócitos, miócitos e fibroblastos. O processo de indução desta enzima pode ser prevenido se glicocorticóides forem administrados previamente à instalação do choque séptico/endotóxico (Rees *et al.*, 1990).

Admite-se que a contínua e excessiva produção de NO pela indução da iNOS seja a causa da hipotensão e da hiporresponsividade a vasoconstritores observada no choque séptico. Pacientes sépticos apresentam níveis elevados de cGMP, nitrito e nitrato (metabólitos do NO (Beishuien *et al.*, 1999).

Recentemente, o papel do NO produzido pela isoforma nNOS na sepse vem sendo valorizado. Hussain e colaboradores (Hussain *et al.* 1997) mostraram que ocorre aumento na atividade e na expressão desta enzima em diversos músculos do rato, horas após a exposição à endotoxina bacteriana. A relevância deste fenômeno para a perda da capacidade de contração do diafragma em animais endotoxêmicos foi em seguida demonstrada pelo mesmo grupo de pesquisadores (Comtois *et al.*, 2001). Neste trabalho os autores mostraram que a capacidade de contração do diafragma, perdida em animais normais pela injeção de LPS, era preservada em

animais que não possuíam o gene para a nNOS. Os mecanismos pelos quais o NO influencia a contratilidade muscular ainda não são muito bem compreendidos, mas vários trabalhos demonstram que o NO pode diminuir a contratilidade muscular por interferir com a mobilização de cálcio intracelular, principalmente pela ação direta em receptores de rianodina. Estes receptores têm importante papel na contratilidade muscular, pois mobilizam estoques intracelulares de cálcio (Stamler *et al.*, 2001).

Um outro efeito relacionado à produção de NO pela nNOS é o aumento da captação de glicose pelas células da musculatura esquelética durante o exercício físico. Alguns trabalhos demonstram que ocorre um aumento de 50% nos níveis do transportador de glicose GLUT-1 em células isoladas de musculatura esquelética de ratos, expostas a uma combinação de citocinas e LPS (Stamler *et al.*, 2001). Desta maneira, é provável que a produção de NO pela ativação da nNOS na sepse desempenhe as funções acima descritas, para que a função celular (de maneira geral) seja desviada para mobilização de energia (através do metabolismo de carboidratos via GR) e não para contração celular.

4. Contextualização do problema

Devido às propriedades anti-inflamatórias dos glicocorticóides e de suas habilidades em afetar vários sistemas envolvidos no desenvolvimento do choque séptico, glicocorticóides sintéticos foram utilizados em indivíduos com sepse. Embora alguns estudos tenham demonstrado que os glicocorticóides sintéticos melhoraram os sintomas do choque séptico em humanos, isto não foi observado em todos os tipos de sepse (Thompson, 1993). Foi verificado também que na maioria dos casos, a utilização dos glicocorticóides não melhorou o quadro dos pacientes estudados (Bone, 1991, Cohen *et al.*, 1991).

Embora ocorra um aumento considerável na concentração de cortisol durante o choque séptico (Molijn *et al.*, 1995) em resposta ao estresse provocado pela infecção, estes glicocorticóides endógenos não foram capazes de inibir, por exemplo, a indução da iNOS. Esta falha pode ser causada pela redução da capacidade de ligação do GR com as proteínas responsáveis por seu transporte plasmático (Pugeaut *et al.*, 1989) ou pela diminuição da capacidade de ligação do GC com o seu receptor GR (Huang *et al.*, 1987, Li *et al.*, 1988). Em 1999 foi demonstrado por Galigniana e colaboradores (1999) que a incubação do GR com doadores de NO (os quais poderiam estar mimetizando o efeito do NO produzido em grande quantidade durante o choque séptico) diminui a capacidade de ligação do GR de fibroblastos L929. Considerando a alta afinidade que o NO tem por sulfidrilas (-SH) ou resíduos de cisteína e que GR possui cisteínas críticas ao seu funcionamento, os autores sugeriram que a falha que ocorre no sistema considerado o "freio" da resposta inflamatória, durante o choque séptico, pode ser atribuída ao fato de que as altas quantidades de NO produzidas nestas condições patológicas estariam diminuindo a afinidade e o número de receptores funcionais, possivelmente por S-nitrosilação de grupos -SH críticos à ativação e ligação do glicocorticóide ao receptor GR (Galigniana *et al.*, 1999).

II - OBJETIVOS

Considerando i) a possibilidade de que altas quantidades de NO produzidas no choque séptico poderiam reduzir a afinidade e o número de receptores de glicocorticóides; ii) que a atividade da enzima nNOS aumenta no músculo esquelético de ratos durante a sepse e iii) que o NO produzido por esta enzima também está envolvido em várias reações vistas no processo de inflamação sistêmica, o objetivo geral deste estudo foi investigar a relação entre o NO e o GR, bem como a participação do NO no controle e conseqüentemente desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica em momentos distintos de um quadro de sepse. Para isso, o trabalho teve dois objetivos principais:

2.1 Efeito do NO sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do GR em modelos experimentais de sepse

Dentro deste objetivo geral, listamos objetivos específicos, a saber:

1. Avaliar o efeito da dexametasona sobre a produção de óxido nítrico em animais endotoxêmicos (pela injeção de LPS) e na sobrevivência de animais sépticos pela ligadura e perfuração do ceco (CLP);
2. Avaliar a capacidade de ligação do GR e produção de óxido nítrico em modelos experimentais de sepse;
3. Avaliar o efeito de doadores de NO sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do GR em animais normais;
4. Avaliar o efeito de um inibidor da NOS na capacidade de ligação do GR e produção de NO em animais endotoxêmicos;
5. Avaliar o efeito de um doador de NO sobre a ação da dexametasona em animais endotoxêmicos e sépticos.

2.2 Envolvimento do NO na iniciação da resposta inflamatória sistêmica: participação da enzima NOS neuronal

Dentro deste objetivo geral, listamos objetivos específicos, a saber:

1. Avaliar o efeito de inibidores da NOS (L-NAME e AG) sobre a atividade/expressão da iNOS, produção de NO e atividade da enzima mieloperoxidase de animais endotoxêmicos;
2. Avaliar o efeito de inibidores da NOS (AG e 7-NI) sobre a variação da pressão arterial e produção de NO_x, 2 horas após o início do estímulo inflamatório (modelo LPS);
3. Avaliar o efeito de inibidores da NOS (AG e 7-NI) sobre alguns parâmetros inflamatórios e cardiovasculares no modelo CLP;
4. Avaliar o efeito do inibidor seletivo da nNOS (7-NI) sobre o crescimento de bactérias de lavado peritoneal em estágios avançados de sepse (modelo CLP);
5. Avaliar o efeito de um doador de NO e do LPS sobre a capacidade de ligação do GR 2 horas após o tratamento.

III - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas pesando entre 200 e 250 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial da Coordenadoria Especial de Farmacologia até a realização dos experimentos. Os animais foram mantidos em local com temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h) com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC.

3.2 Modelos experimentais

3.2.1 Modelo de endotoxemia por LPS

Para indução do quadro endotóxico os animais foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS) de membrana de *Escherichia coli* (sorotipo 011:B4) pela via intraperitoneal. O LPS foi dissolvido em PBS (salina tamponada com fosfatos de Dulbecco; composta por 137 mM de NaCl, 2,7 mM de KCl, 1,5 mM de KH_2PO_4 e 8,1 mM de NaHPO_4 , pH 7,4) para uma concentração final de 10 mg/ml. O estoque de LPS foi mantido em freezer - 20°C . Os animais controle foram tratados apenas com PBS (100 μl /100 g, i.p.).

3.2.2 Modelo de septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 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 íleo-cecal. Para indução da septicemia o ceco dos animais foi perfurado (40 vezes) com agulhas 21G, seguido de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Após a perfuração do ceco o intestino era recolocado na cavidade abdominal e a musculatura e a pele suturadas. Após a sutura, os animais receberam 2 ml de salina s.c. para reposição fluídica (Benjamin *et al.*, 2000) e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (60 a 120 minutos). Os animais controles foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos não sofrendo, contudo, perfurações no ceco (animais falso-operados ou sham).

3.3 Perfusão dos animais e obtenção das amostras

Para realização da perfusão, coleta de sangue e de amostras de tecido para posterior análise, os animais foram previamente pesados e em seguida anestesiados com uma solução de uretana (1 g/Kg), administrada pela via intraperitoneal. Após a abertura da cavidade torácica, aproximadamente 1 ml de sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubo apropriado contendo solução anti-coagulante (heparina 20 UI/ml de sangue). O sangue coletado foi posteriormente centrifugado por 15 minutos a 200 g para separação do plasma. Em seguida iniciou-se a perfusão para exsanguinação do animal. Uma agulha de escalpe conectada a um reservatório contendo salina (NaCl 0,9%) à 37°C, mantido a uma altura de aproximadamente 1 m, foi inserida no ventrículo

esquerdo. Para garantia da completa perfusão foi feito um pequeno corte no ventrículo direito permitindo o escoamento do sangue. Os órgãos (ou fragmentos deles, dependendo do caso) e o plasma foram rapidamente coletados e armazenadas em freezer -80 °C até o momento das dosagens.

Para obtenção do lavado peritonial os animais foram pesados e em seguida anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 mg/kg) pela via intramuscular. Todos os procedimentos a seguir foram realizados dentro da capela de fluxo laminar com o auxílio de material previamente esterilizado. Após a exposição da porção abdominal do peritônio, 20 ml de PBS foram injetados na cavidade abdominal. Em seguida a região exposta foi levemente massageada por cerca de 1 minuto. Aproximadamente 1 ml do lavado peritonial foi então coletado com o auxílio de outra seringa estéril e rapidamente congelado em freezer -80° C, onde permaneceu estocado até o momento da dosagem.

3.3 Ensaios

3.4.1 Ensaio de ligação de receptores de glicocorticóide

A capacidade de ligação do glicocorticóide a seu receptor (BDGR) foi avaliada através do “ensaio de troca” descrito por Kalami e Hubbard, com algumas modificações (Kalami *et al.*, 1983). Os homogenatos de tecidos provenientes de diferentes grupos experimentais foram preparados em tampão gelado na proporção 1/5 (p/v) composto por 320 mM de sacarose, 50 mM de Tris-HCl, 2 mM de DTT, 10 µg/ml de inibidor de tripsina do feijão de soja, SBTI, 20 mM de molibdato de sódio e 10% de glicerol (pH 7,2). Após o período de centrifugação (60 min, 10 000 x g, 4 °C) os sobrenadantes (~ 1 mg de proteína) foram incubados com 25 nM de [³H] -

dexametasona em tampão apropriado (10 mM de HEPES; 1 mM de EDTA e 20 mM de molibdato de sódio, pH 7,5) por 24 h à 0°C. O volume final da reação foi 100 µl. Após o período de incubação, ao tubo de ensaio foram adicionados 150 µl de uma suspensão formada por 2% de carvão ativado + 0,2% de dextrana (peso molecular 40 kDa). Este procedimento permite a separação do ligante radioativo livre por adsorção. Após centrifugação (10.000 x g, 10 minutos), 100 µl do sobrenadante foram transferidos para outro tubo de ensaio onde foi adicionado 1 ml de líquido de cintilação (58% de fluido de cintilação [6 g/l de PPO + 0,2 g/l de POPOP em tolueno], 34% de Triton X-100 e 8% de água de Milli-Q). Após vigorosa agitação, a radioatividade foi quantificada em um contador de cintilação líquida. A ligação não-específica (cerca de 20% da ligação total) foi determinada pela adição de 25 µM de dexametasona fria ao ensaio. A determinação da concentração protéica dos homogenatos foi feita através da absorção ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm em cubetas de quartzo, assumindo que 1 unidade de absorbância 280 nm = 1 mg de proteína. Os resultados foram expressos como pmol de [³H]-dexametasona/mg de proteína.

3.4.2 Ensaio da atividade das NOS pelo método da L-citrulina

A atividade da enzima NOS foi medida pela conversão de ³H-L-arginina em ³H-L-citrulina, onde o produto é separado do substrato graças à afinidade diferencial por uma resina de troca iônica (descrito por Gopalakrishna e Nagarajan, 1980 e aplicado por Bredt e Snyder, 1990). Os homogenatos teciduais foram preparados no mesmo tampão e nas mesmas condições utilizadas para dosagem da ligação de GR, conforme descrito acima. Ao sobrenadante resultante (~1 mg de proteína em 50 µl [volume máximo amostra] por tubo de ensaio) foram adicionados 50 µl do coquetel de ensaio (composto por 35 nM de ³H-L-arginina, 50 mM de KH₂PO₄; 1,2

mM de $MgCl_2$; 0,25 mM de $CaCl_2$; 60 mM de L-valina; 1,2 mM de L-citrulina e 1 mM de DTT, 5 μM de L-arginina, 4 μM de flavina adenina dinucleotídeo [FAD], 4 μM de flavina adenina mononucleotídeo [FMN], 10 μM de tetrahidrobiopterina [THB₄] e 200 μM de nicotinamida adenina difosfato reduzido [NADPH], pH 7,2). Após o período de incubação (1 h, 37 °C), a reação foi terminada com a adição de 400 μl de suspensão de resina (Dowex AG-50x8, forma sódica, 1:1 em água, pH 6,7). Após agitação, os tubos foram centrifugados por 3 minutos a 5.000 rpm a temperatura ambiente. Cem microlitros do sobrenadante foram retirados e adicionados a 1 ml de líquido de cintilação e a radioatividade foi quantificada em um contador de cintilação líquida. A determinação da concentração protéica dos homogenatos foi feita através da absorção ultravioleta no comprimento de onda de 280 nm em cubetas de quartzo. Os resultados da medida da atividade das NOS foram expressos como pmol de citrulina/min/mg de proteína.

Uma das vantagens do método da L-citrulina é que ele permite a determinação simultânea das duas categorias de NOS, as enzimas cálcio-dependentes e as enzimas cálcio-independentes. Para tanto, cada amostra é ensaiada em três condições distintas, cada uma delas em um tubo distinto. A primeira delas chamado de tubo T, consiste na incubação do homogenato com o tampão de ensaio somente. A segunda, chamado de tubo E, consiste na incubação do mesmo volume de homogenato em questão com o tampão de ensaio (como acima descrito) mas acrescido de 1 mM de EGTA. Na última delas, chamado L, o homogenato é incubado com tampão de ensaio acrescido de 1 mM de L-NAME ou L-NMMA (ou outro inibidor potente não-seletivo das NOS). Assim, a subtração dos resultados dos tubos T e E dos resultados dos tubos L, para cada amostra de homogeneizado, desconta a contagem "não-específica". O valor de [E-L] representa

a atividade cálcio-independente e o valor [(T-L) – (E-L)] representa a atividade cálcio-dependente.

3.4.3 Imunoeletroforese para iNOS (*Western blot*)

A separação de proteínas (50 a 100 µg/poço) provenientes dos homogenatos teciduais (também preparados no mesmo tampão e nas mesmas condições utilizadas para dosagem da ligação do GR) foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Terminado o período de corrida das amostras (1 h, 150 V, 25 mA) as proteínas foram transferidas do gel de migração para uma membrana de nitrocelulose através da aplicação de corrente elétrica (15 V; 250 mA; 1 h). Em seguida, a membrana foi incubada em TBS/Tween (composto por Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, contendo 0,05% de Tween-20, em pH 7,5) contendo leite desnatado a 5%, pelo período de 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com TBS/Tween a membrana foi incubada durante a noite, 4°C, com anticorpo anti-iNOS (policlonal) de coelho (2 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Ao término do período de incubação e lavagem com TBS/Tween (para retirada do excesso de anticorpo) as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (1 h, temperatura ambiente). A revelação da membrana foi feita através do kit de quimioluminescência ECL-Amersham®.

3.4.4 Determinação dos níveis de nitrato + nitrito (NO_x)

A determinação da concentração plasmática e/ou tecidual de NO_x foi feita pela redução enzimática de nitrato pela enzima nitrato redutase expressa em *E. coli* cultivada em meio anaeróbico, descrita detalhadamente por Granger *et al.* (1990).

Preparo das amostras

Para determinação da concentração de NOx nos tecidos, homogenatos foram preparados em tampão gelado na proporção 2/3 (p/v) composto por 320 mM de sacarose, 50 mM de Tris-HCl, 1 mM de DTT, 10 µg/ml de inibidor de tripsina do feijão de soja, SBTI (pH 7,2). Após o período de centrifugação (30 min. 10.000 x g, 4° C), a solução protéica (sobrenadante) foi ajustada para concentração final 30 mg/ml de proteína (no mesmo tampão utilizado para o preparo do homogenato) e mantidos em gelo (4° C) até o momento da desproteinização.

O plasma (~ 60 mg/ml de proteína) previamente separado e mantido estocado em freezer -80° C (conforme descrito na seção “Perfusão dos animais e obtenção das amostras”) foi diluído com água destilada 1:2 (concentração final 30 mg/ml de proteína) e mantido 4° C até o momento da desproteinização.

Desproteinização

À 200 µl de plasma ou homogenato tecidual (ambos ~ 30 mg/ml de proteína) foram adicionados 20µl de sulfato de zinco (10%) e em seguida incubados em banho de gelo (0° C) por 1h. Após o período de incubação as amostras foram centrifugadas (20 min 10.000 x g, 4° C) e 100 µl do sobrenadante foram transferidos para uma placa de 96 poços para posterior conversão de nitrato a nitrito pela enzima nitrato redutase.

Conversão

Às amostras previamente desproteinizadas foram adicionados 20 µl de tampão fosfato de sódio (0,5 M, pH 7,2), 20 µl tampão formiato de amônio (2,4 M, pH 7,2) e 10 µl de uma suspensão de *E. coli* cultivada anaerobicamente, o que a

leva a expressar a enzima nitrato redutase. Após o período de incubação (3 horas, 37 °C) as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria, e 100 µl do sobrenadante foram misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico e 0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q) em placas de 96 poços para leitura em 540 nm em um leitor de placas. Curvas-padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram feitas simultaneamente. Por meio de uma regressão linear, os valores plasmáticos foram expressos como µM de NO_x (nitrito + nitrato) e os valores dos homogenatos teciduais em pmol de NO_x/mg de proteína.

3.4.5 Determinação da atividade da enzima tirosina aminotransferase (TAT)

O ensaio da atividade da enzima hepática TAT (induzida por glicocorticóides) foi realizado conforme o método desenvolvido por Granner e Tomkins, descrito por Rehman *et al.* (2004) com algumas modificações. Fígados de ratos foram homogeneizados com 5 volumes (p/v) de tampão gelado (composto por 125 mM de KH₂PO₄; 1 mM de DTT e 10 mg/ml de PMSF, pH 7,6) e centrifugados a 30.000 x g durante 30 min à 4 °C. A reação enzimática foi iniciada pela adição de 50 µl do sobrenadante (10-50 µg de proteína) a 465 µl do coquetel de ensaio (composto por 400 µl de KH₂PO₄ [125 mM] contendo 7 mM de L-tirosina [pH 7,6], 100 µl de alfa-oxoglutarato [500 mM, pH 7, 0] e 50 µl de piridoxal-5'-fosfato [5 mM, pH 6,5]). Após o período de incubação (30 min, 37°C) a reação foi finalizada pela adição de 35 µl de KOH 10 M. A formação de p-hidroxifenil piruvato foi determinada em espectrofotômetro (331 nm). Os resultados das medidas da atividade da TAT foram expressos em unidades, onde uma unidade de atividade enzimática corresponde à formação de 1 µM p-hidroxifenil piruvato/min/mg de proteína.

3.4.6 Dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

O recrutamento de neutrófilos foi quantificado indiretamente através da determinação da atividade da MPO no pulmão de ratos, os quais foram previamente coletados (conforme descrito anteriormente) e mantidos congelados em freezer - 80 °C até o momento da dosagem. O homogenato de pulmão foi feito em tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 5,4), contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5%, p/v). Após a trituração do tecido com o auxílio de um homogeneizador do tipo Ultra-Turrax, a solubilização final foi feita usando-se um sonicador (Ultrasonic Processor, Cole-Parmer, Il, EUA) por 10 segundos à 4 °C. O homogenato resultante foi centrifugado (15 min, 10.000 x g, 4° C) e uma alíquota (25 µL, ~ 0,02 mg de proteína) do sobrenadante foi utilizado para o ensaio da MPO. A reação enzimática foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (1.6 mM) e H₂O₂ 0,5 mM (em solução tampão fosfato 80 mM; pH 5,4) em volume final de 150 µl. Após o período de incubação (5 min, 37° C) a reação foi finalizada pela adição de 100 µl de H₂SO₄ (1 N). A absorbância foi medida em um leitor de placa a 450 nm (Ultra Microplate Reader EL 808, Biot-Tek Instruments, Inc., EUA) e a atividade da MPO foi expressa como unidades de densidade óptica a 450 nm por mg de proteína.

3.5 Outras determinações

3.5.1 Mensuração e registro da pressão arterial

Foi feita pela medida direta da pressão arterial de ratos anestesiados com cetamina/xilazina (100/20 mg/kg, i.p.), injetado pela via intramuscular. Os animais anestesiados foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica

aquecida (~36° C). Em seguida foi feita a canulação da veia femoral esquerda (dissecação e inserção de agulha acoplada à cânula de polietileno [PE 50] e seringa). A prevenção da formação de coágulos na região foi feita pela injeção de 30 UI de heparina diluída em 100 µl de PBS, através da cânula implantada. Os animais foram submetidos então a traqueostomia, para facilitar a respiração espontânea e em seguida foi feita a canulação da artéria carótida (localização do vaso, suspensão temporária do fluxo sangüíneo com auxílio de pinças curvas e fio de sutura e inserção de cateter de polietileno [Angiocath[®], número 19]). Ao cateter, devidamente heparinizado e amarrado na artéria, foi conectado um transdutor de pressão interligado a um equipamento de análise de pressão arterial Digi-Med (Modelo 190, NY, EUA). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em mmHg) foram registrados a cada 10 segundos por um software de integração Digi-Med (Modelo 200), trabalhando em ambiente Windows 98[™] (Microsoft do Brasil, SP, São Paulo).

3.5.2 Determinação do crescimento de bactérias de lavado peritoneal

Em vista da dificuldade de realizar a determinação de unidades formadoras de colônias em tantos grupos experimentais, optamos por usar um método indireto de crescimento bacteriano que oferece maior facilidade de trabalho. O método escolhido foi o de turbidez para avaliação do crescimento bacteriano de lavado peritoneal de animais sham e/ou sépticos pelo CLP. Todos os procedimentos a seguir descritos foram realizados em capela de fluxo laminar com o auxílio de material previamente esterilizado. Em placa de 96 poços foram colocados 20 µl do lavado peritoneal (previamente coletado e mantido em freezer -80⁰C, conforme descrito na seção “Perfusão dos animais e obtenção das amostras”) e em seguida foram adicionados 200 µl de meio de cultura (tioglicolato 3%). Após o período de

incubação (48 horas, 37°C, em estufa úmida) as amostras foram ressuspensas com auxílio de uma pipeta automática para dissolução total dos grumos formados pelo acúmulo de bactérias. Em seguida a turbidez foi medida em um leitor de placas a 630 nm (Ultra Microplate Reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA) e o crescimento bacteriano foi expresso como unidades de densidade óptica a 630 nm.

3.5.3 Contagem de leucócitos totais

A amostra de sangue total foi diluída em líquido de Türk numa proporção de 1/20. Em seguida, a contagem de células foi feita em Câmara de Neubauer. O número de leucócitos totais foi expresso como células/mm³x10³.

3.5.4 Determinação do peso corporal total e do peso relativo do baço

Os animais sham ou tornados sépticos pelo CLP foram pesados 36 horas após o início do procedimento cirúrgico, imediatamente antes do sacrifício. Estes valores foram expressos em g. O peso do baço foi determinado oito horas após a injeção de LPS e/ou PBS (dependendo do grupo experimental) e foi expresso como % de peso corporal.

3.5.5 Avaliação da sobrevida dos animais

A avaliação da sobrevida dos animais sham ou sépticos pelo CLP foi feita durante 7 dias. Neste período, os animais foram mantidos em local com temperatura ambiente controlada (22 ± 2°C) e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h), com livre acesso à ração e água.

Protocolos experimentais

3.6 Parte I: Efeito do óxido nítrico sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do receptor de glicocorticóide em modelos experimentais de sepse

3.6.1 Comparação entre os modelos LPS e CLP: sobrevida e níveis plasmáticos de NOx

Para comparação dos níveis plasmáticos de NOx nos modelos de inflamação sistêmica estudados, um grupo de animais recebeu LPS (5 mg/Kg, i.p.) e outro grupo foi submetido ao procedimento de ligadura e perfuração do ceco (conforme descrito anteriormente). Oito horas após a injeção de LPS ou da cirurgia (CLP), foi realizada coleta de sangue para posterior dosagem de NOx (descrito em “Perfusão dos animais e obtenção das amostras”). A avaliação da sobrevida dos animais no modelo CLP foi feito até o sétimo dia após a cirurgia, em intervalos de 12 horas.

3.6.2 Efeito da dexametasona sobre a produção de NO e sobrevida de animais

A avaliação do efeito da dexametasona em animais endotoxêmicos (atividade de iNOS e produção de NOx) e animais sépticos (sobrevida) foi realizada pela injeção do corticóide em dois momentos distintos, a saber antes e após o início do estímulo inflamatório.

No modelo LPS um grupo de animais (DEX+LPS) recebeu dexametasona (2 mg/Kg, s.c.) 12 e 1 hora *antes* da injeção da endotoxina. Outro grupo de animais (LPS+DEX) recebeu a injeção do corticóide 4 horas *após* a injeção de LPS (5 mg/Kg, i.p.). Oito horas após o início do estímulo inflamatório os animais foram sacrificados para coleta de amostras (descrito em “Perfusão dos animais e obtenção das amostras”) e posteriores dosagens.

No modelo CLP um grupo de animais (DEX+CLP) recebeu dexametasona (0,2 mg/Kg, s.c.) 1 hora *antes* do início do procedimento cirúrgico. Outro grupo de animais (CLP+DEX) recebeu a injeção do corticóide (na mesma dose) 4 horas *após* o CLP. A sobrevivência foi determinada pela observação dos animais no intervalo de 12 horas, feita até o sétimo dia.

3.6.3 Avaliação da capacidade de ligação do GR e produção de NO nos modelos LPS e CLP

Oito ou vinte e quatro horas após o tratamento com doses crescentes de LPS (0,5; 1,0 e 5 mg/Kg, i.p.) ou PBS, os animais foram sacrificados para medida da capacidade de ligação do GR e determinação dos níveis plasmáticos de NOx.

No modelo CLP 12, 24, 36, 48 e 72 horas após o início do procedimento cirúrgico os animais foram sacrificados e a capacidade de ligação do GR e níveis plasmáticos de NOx determinados.

3.6.4 Efeito do SNAP sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do GR.

A avaliação do efeito do NO sobre a capacidade de ligação de GR foi feita pela injeção de S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP, nas doses 3 e 6 mg/Kg, s.c.) em animais normais. Duas, oito e vinte e quatro horas após a injeção do doador de NO, os animais foram sacrificados e a medida da capacidade de ligação do GR foi determinada no pulmão e no baço dos animais. Além disso, foi realizado um experimento controle para confirmar o efeito do NO liberado pelo doador sobre a capacidade de ligação de GR, utilizando para isso o composto acetil-DL-penicilamina (NAP). Oito horas após a injeção de SNAP (3 mg/Kg, s.c.) e/ou NAP (na mesma dose) os animais foram sacrificados e a capacidade de ligação de GR foi determinada no fígado.

A determinação da atividade da enzima TAT é comumente utilizada como “ensaio padrão” para avaliação da funcionalidade do receptor de glicocorticóide. Animais (grupo SNAP+DEX) receberam SNAP (3mg/Kg, s.c) 4 horas antes da injeção de dexametasona (2 mg/kg, s.c.). Outro grupo (SNAP) recebeu a injeção do doador (na mesma dose) 4 horas antes da injeção de PBS. Doze horas após a injeção do corticóide e/ou PBS os animais foram sacrificados para determinação da atividade da TAT no fígado.

3.6.5 Efeito do L-NAME sobre a capacidade de ligação do GR e produção de NOx em animais endotoxêmicos

Para avaliação do efeito do NO sobre a capacidade de ligação de GR em animais endotoxêmicos, um grupo de animais (L-NAME+LPS) recebeu duas injeções do inibidor da NOS (10 mg/Kg, s.c.), 1 hora antes e 3 horas após a injeção

de LPS (5 mg/Kg, i.p.). Outro grupo de animais (SNAP) foi tratado somente com o doador de NO (3mg/Kg, s.c.). Oito horas após o tratamento com a endotoxina e/ou SNAP os animais foram sacrificados e a capacidade de ligação de GR (pulmão e baço) e os níveis plasmáticos de NOx foram determinados.

Sobrenadantes de homogeneizados de fígado de animais normais foram incubados com de L-NAME e/ou D-NAME. O ensaio da capacidade de ligação da [³H]-dexametasona ao GR foi feita na presença destes compostos (ambos na concentrações 4, 40 e 400 µM) durante 24 horas a 0° C. Este experimento foi realizado como controle do experimento anterior, para avaliação da possibilidade de ação direta do L-NAME sobre a capacidade de ligação do GR.

Além disso, um terceiro experimento foi realizado para avaliar o efeito do NO sobre a capacidade de ligação do GR em animais endotoxêmicos. Sobrenadantes de homogeneizados de pulmão de animais endotoxêmicos por LPS (5 mg/Kg, i.p., oito horas após) foram incubados com o agente redutor ditioneitol (DTT) nas doses 1, 3 e 10 mM. Duas horas após a incubação com DTT (0° C), o coquetel de ensaio contendo [³H]-dexametasona foi adicionado aos tubos, dando início ao ensaio de ligação do ligante marcado radioativamente ao GR.

3.3.6 Efeito do SNAP sobre a ação da dexametasona nos modelos LPS e CLP

Para avaliação do efeito do NO sobre algumas das ações da dexametasona no modelo LPS, o seguinte protocolo foi utilizado. Um grupo de animais (SNAP+DEX+LPS) foi tratado com SNAP (3 mg/Kg, s.c.) duas horas antes das injeções de dexametasona (2 mg/Kg, s.c.), que por sua vez foram administradas 12 e 1 hora antes da injeção de LPS (5 mg/Kg, i.p.). As injeções do doador de NO

foram feitas antes da administração do corticóide com o objetivo de modificar a capacidade de ligação do GR e conseqüentemente alterar a ação da dexametasona. Um outro grupo (DEX+LPS) recebeu apenas dexametasona (na mesma dose) 12 e 1 hora antes da injeção da endotoxina bacteriana. Oito horas após a injeção de LPS e/ou PBS (e em outros grupos controles) os animais foram sacrificados para determinação dos níveis plasmáticos de NOx e atividade da enzima NOS no pulmão, baço e musculatura esquelética (quadríceps femoral). Estas dosagens foram consideradas, neste estudo, como índice da ação anti-inflamatória da dexametasona. Além disso, o peso relativo do baço dos animais foi determinado, sendo considerado como índice da ação imunossupressora da dexametasona.

No modelo CLP o efeito do NO sobre a ação da dexametasona na sobrevivência dos animais sépticos foi feito pela administração de SNAP (3 mg/Kg, s.c.) 2 horas antes da injeção de dexametasona (0,2 mg/Kg, s.c.), que por sua vez foi injetada 1 hora antes da ligadura e perfuração do ceco (grupo SNAP+DEX+CLP). Outro grupo de animais (DEX+CLP) recebeu apenas a injeção do corticóide (na mesma dose), 1 hora antes do início do procedimento cirúrgico. A sobrevivência foi avaliada até o sétimo dia após a cirurgia.

3.7 Parte II: Envolvimento do NO na iniciação da resposta inflamatória sistêmica: participação da enzima NOS neuronal

3.7.1 Efeito do L-NAME e da AG na atividade/expressão da iNOS, produção de NOx e atividade da MPO de ratos tratados com LPS

A interferência do NO (liberado minutos após a injeção de LPS) sobre alguns parâmetros da resposta inflamatória sistêmica, foi avaliado pelo tratamento prévio de animais endotoxêmicos com inibidores da enzima NOS. Animais (grupos: L-NAME+LPS e AG+LPS) foram tratados com os respectivos inibidores (ambos na dose 10 mg/Kg, i.p.) 1 hora antes da injeção de LPS (5 mg/Kg, i.p.). Oito horas após o início do estímulo inflamatório os animais foram sacrificados e amostras de sangue e tecido coletados para posteriores dosagens (atividade e expressão da iNOS, produção de NOx e atividade da MPO).

3.7.2 Efeito da AG e do 7-NI sobre a queda da PAM e produção de NOx

2 horas após LPS

Para a avaliação da participação da nNOS na hipotensão gerada por LPS no início da resposta inflamatória, animais endotoxêmicos foram pré - tratados com inibidores da NOS (AG, 20 mg/Kg, i.p. ou 7-NI, 0,2 mg/Kg, i.p.). Quinze minutos após o tratamento, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial. No momento correspondente a 1 hora após a injeção dos inibidores da NOS, os animais foram tratados com LPS (10 mg/kg) pela via intraperitoneal. O registro da PAM foi feito até 120 minutos após a injeção da endotoxina bacteriana. Ao término do período de registro da PAM, amostras de sangue e tecidos foram rapidamente coletados e congelados (freezer - 80° C) para posterior dosagem de NOx plasmático e tecidual (pulmão e musculatura esquelética – quadríceps femoral).

3.7.3 Efeito da AG e do 7-NI sobre alguns parâmetros inflamatórios e cardiovasculares no modelo CLP

Com objetivos semelhantes aos descritos no protocolo da seção 3.7.1, os inibidores da NOS (AG, 10 mg/kg, i.p. e 7-NI, 0,1 mg/Kg, i.p.) foram injetados 1 hora antes da ligadura e perfuração do ceco de animais sépticos (modelo CLP). Após a cirurgia os animais foram divididos em dois grupos.

O primeiro grupo de animais foi utilizado 36 horas após o início do procedimento cirúrgico. Estes animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial e em seguida os efeitos vasoconstritores para a fenilefrina (nas doses de 3, 10 e 30 nmol/Kg, i.v.) foram avaliados. Ao término destas avaliações os animais foram sacrificados e amostras de sangue e tecidos foram rapidamente coletados e congelados. A determinação do peso corporal total foi feita antes da anestesia dos animais. A determinação do número de leucócitos totais, da atividade da enzima MPO, dos níveis plasmáticos de NOx e da atividade da NOS (pulmão e musculatura esquelética – quadríceps femoral) foram realizados com as amostras coletadas. O segundo grupo de animais foi utilizado para determinação da sobrevivência. A observação dos animais foi feita até o sétimo dia após a cirurgia.

3.7.4 Efeito do 7-NI sobre o crescimento de bactérias de lavado peritoneal 36 e 72 horas após CLP

Animais foram tratados com 7-NI (0,1 mg/Kg, i.p.) 1 hora antes do CLP. Nos tempos 36 e 72 horas após o início da cirurgia, os animais foram sacrificados para coleta de lavado peritoneal, sangue e tecido (descrito em “Perfusão dos animais e

obtenção das amostras”). O material biológico coletado foi utilizado para a determinação do crescimento bacteriano no lavado peritoneal, dos níveis plasmáticos de NOx e da atividade da MPO no pulmão de ratos.

3.7.5 Efeito do SNAP e do LPS sobre a capacidade de ligação do GR avaliado 2 horas após o tratamento dos animais

Animais foram tratados com SNAP (0,3 mg/Kg) ou LPS (10 mg/Kg) ambos pela via intraperitoneal. Duas horas após, os animais foram sacrificados para coleta do fígado. A capacidade de ligação do GR foi avaliada no órgão coletado.

3.8 Drogas e Reagentes

Os seguintes compostos foram utilizados neste estudo: LPS de *E. coli* (sorotipo 0111:B4), L-NAME, D-NAME, aminoguanidina, 7-NI, NAP, dexametasona, uretana, DTT, PMSF, SBTI, sulfanilamida, alfa-naftil-etilenodiamina, fenilefrina. L-tirosina, alfa-oxoglutarato, piridoxal-5'-fosfato, tetrametilbenzidina, dextrana, PPO, POPOP, Dowex AG-50xs forma sódica, NADPH, FAD, FMN, THB₄, todos provenientes da Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA; SNAP foi sintetizado em nosso laboratório pelo método de Field *et al.*, (1978); [³H]-L-arginina (58.0 Ci /mmol) e [³H]-dexametasona (89.0 Ci /mmol), ambos provenientes da Amersham, Buckinghamshire, UK; anticorpo anti-iNOS comprado da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EUA; cetamina (Parke-Davis, São Paulo, SP); xilazina (RompumTM, Bayer, São Paulo, SP); heparina sódica (gentilmente doada pela Cristália produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP). O restante dos sais e compostos foram adquiridos de companhias com comprovada certificação de qualidade. Os sais e reagentes utilizados nos ensaios realizados foram dissolvidos e/ou diluídos

em água destilada. Os compostos utilizados para o tratamento de animais foram diluídos em PBS, com exceção do composto 7-NI (estoque preparado em DMSO). A partir do estoque em DMSO, as diluições sucessivas foram feitas em PBS. A concentração final de DMSO foi de 2%.

3.9 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média, ($n = 4 - 15$ animais em cada grupo). As diferenças estatísticas entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), sujeito à correção pelo teste t de Bonferroni (comparações múltiplas) ou Dunnett's (comparações feitas apenas com o grupo controle). Em alguns grupos foi aplicado o teste t de Student de amostras não-pareadas (comparações entre duas amostras). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

As curvas de sobrevida foram expressas como porcentagem de animais vivos observados em um intervalo de 12 horas durante os 7 dias avaliados. Para análise estatística das curvas de sobrevida e cálculo da média de sobrevida foi utilizado o teste de Logrank. As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$. A sobrevida média de cada grupo foi considerada como o tempo em que 50% dos animais morreram.

Todas as análises estatísticas e todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do programa GraphPad Prism versão 3.02 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

IV – RESULTADOS

PARTE I

4.1 Efeito do óxido nítrico sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do receptor de glicocorticóide em modelos experimentais de sepse

4.1.1 Comparação entre os modelos LPS e CLP: sobrevida e níveis plasmáticos de NOx

No modelo de endotoxemia a dose de 5 mg/kg causou a morte de todos os animais, 24 horas após a injeção da endotoxina bacteriana pela via intraperitoneal (**Tabela 1**). No entanto, neste mesmo tempo, todos os animais que receberam doses menores de LPS (0,5 e 1 mg/kg, i.p.) continuaram vivos. Além disso, os sinais clínicos de instalação de uma resposta inflamatória sistêmica como piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação foram mais intensos e portanto facilmente identificados nos animais que receberam a maior dose de LPS.

A curva de sobrevida de animais submetidos ao modelo de sepse (CLP) e de animais sham-operados está representada na **Figura 1**. A curva do grupo CLP (círculos abertos) representa a sobrevida de animais que sofreram 40 perfurações no ceco. A construção das curvas foi feita a partir da observação dos animais em intervalos de 12 horas, durante sete dias. A morte de 50% dos animais sépticos aconteceu no tempo médio de 2,5 dias. Variações no número de perfurações (80 e 20 furos) sugerem que a sobrevida média dos animais neste modelo é linear quanto ao número de perfurações (dados não mostrados). Nenhum dos animais falso-

operados (grupo SHAM) morreu durante o período de avaliação. Além disso, os sinais clínicos (descritos acima) foram identificados nos animais CLP, mas não nos animais SHAM.

A determinação dos níveis plasmáticos de NOx mostra que ocorre um aumento de aproximadamente 10 vezes nos valores registrados dos metabólitos do NO no modelo LPS (dose 5 mg/Kg, i.p.) (grupo CON $39,7 \pm 2,9$ e grupo LPS $375,2 \pm 14,0$ μ M). No entanto, no modelo CLP este aumento é de apenas 3,7 vezes (grupo SHAM $29,1 \pm 6,7$ μ M e grupo CLP $108,2 \pm 16,1$ μ M), representado em gráfico na **Figura 2**.

SOBREVIDA			
Dose LPS	8 horas	24 horas	(n)
0,5 (mg/kg, i.p.)	100%	100%	5
1,0 (mg/kg, i.p.)	100%	100%	5
5,0 (mg/kg, i.p.)	100%	0%	5

Tabela 1: Sobrevida dos animais após o tratamento com LPS. Diferentes grupos de animais foram tratados com doses crescentes de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Durante o período de observação dos animais (8 e 24 horas após LPS) os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. O número de animais por grupo experimental também está indicado na tabela.

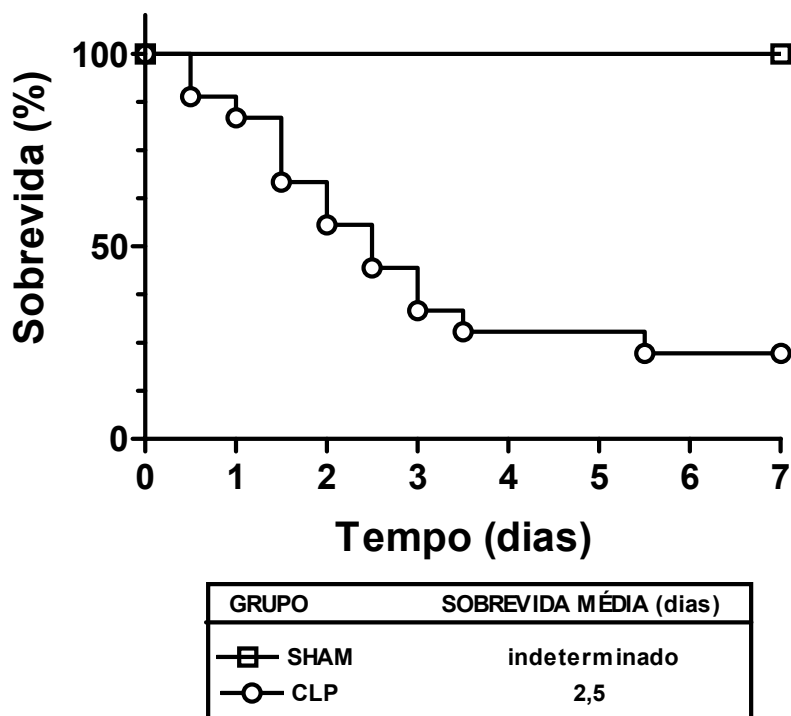


Figura 1: Sobrevida dos animais após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP). O grupo de animais CLP foi submetido a 40 perfurações do ceco. Após a cirurgia e recuperação da anestesia, os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. Os animais do grupo falso-operados (SHAM) foram submetidos à anestesia e abertura do abdome, mas não sofreram a ligadura e perfuração do ceco. A curva de sobrevivência foi construída pela observação dos animais a cada 12 horas, durante 7 dias. O grupo CLP é diferente estatisticamente do grupo SHAM ($n= 7-15$ animais; $p < 0,05$, Teste de Logrank). A sobrevivência média do grupo CLP foi calculada e esta indicada na legenda desta figura.

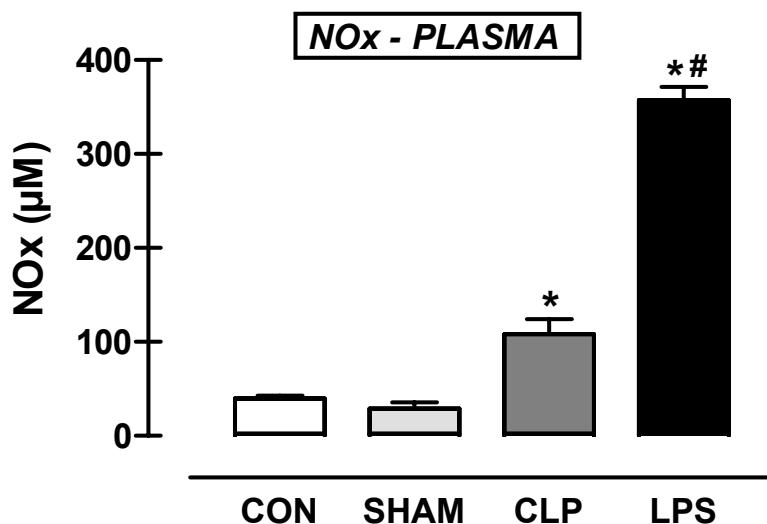


Figura 2: Concentrações plasmáticas de nitrito + nitrato (NOx) de animais submetidos aos modelos LPS e CLP. Amostras de sangue foram coletadas 8 horas após a injeção de lipopolissacarídeo (LPS 5 mg/Kg, i.p.) ou da ligadura e perfuração do ceco (CLP 40 furos) e em seguida processadas para a quantificação da concentração de NOx, determinada pela redução enzimática de nitrato, através da incubação de amostras de soro com a enzima nitrato redutase expressa em *E.coli* (item 3.4.4). Os grupos CON (animais controle) e SHAM (animais submetidos à cirurgia falsa, sem ligadura e perfuração do ceco) receberam apenas PBS (1 ml/Kg, i.p.). Os resultados representam a média \pm EPM de 7-15 animais por grupo experimental. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * $p < 0,05$; em relação ao grupo CON e # $p < 0,05$; em relação ao grupo CLP.

4.1.2 Efeito da dexametasona sobre a produção de NO e sobrevida

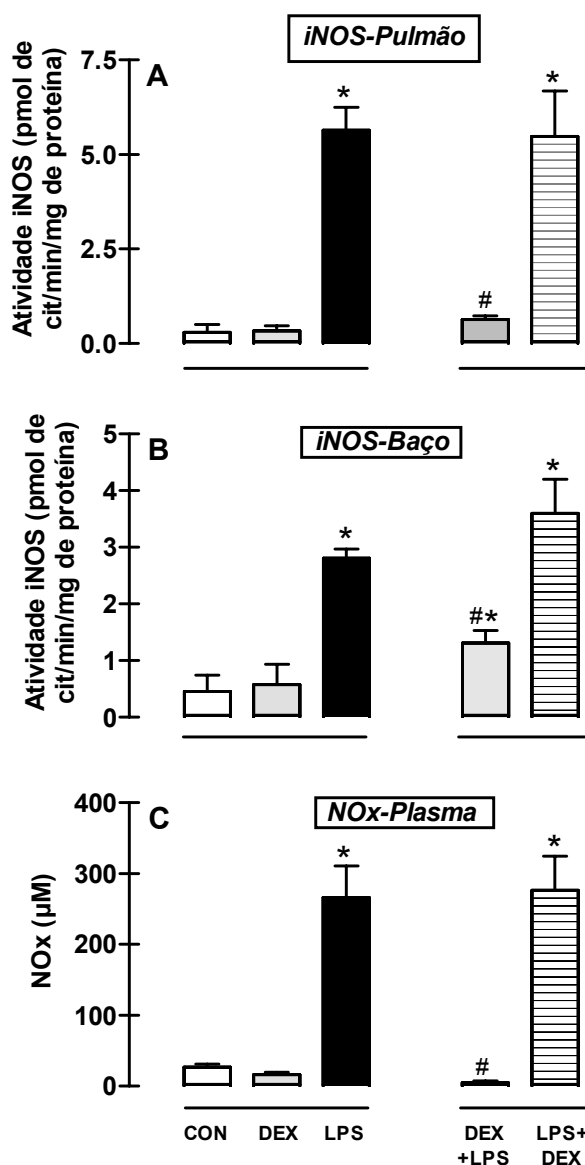
O tratamento de animais com dexametasona (na dose 2 mg/Kg, s.c. - grupo DEX+LPS) 12 horas e 1 hora antes da injeção da endotoxina preveniu totalmente o aumento da atividade da iNOS no pulmão (grupos: CON $0,3 \pm 0,2$; LPS $5,6 \pm 0,6$ e DEX+LPS $0,6 \pm 0,1$ pmol de citrulina/min/mg de proteína, **Figura 3A**), e parcialmente no baço (grupos: CON $0,5 \pm 0,3$; LPS $2,8 \pm 0,2$ e DEX+LPS $1,3 \pm 0,2$ pmol de citrulina/min/mg de proteína, **Figura 3B**), quando determinados 8 horas após a injeção de 5 mg/Kg de LPS. Além disso, este mesmo tratamento (grupo DEX+LPS) preveniu o aparecimento de NO_x no plasma dos mesmos animais utilizados na dosagem da atividade da iNOS (grupos: CON $27,1 \pm 4,1$; LPS $256,9 \pm 44,6$ e DEX+LPS $4,9 \pm 2,8$ μM, **Figura 3C**).

No entanto, quando a dexametasona foi administrada após a injeção dos animais com LPS a atividade da enzima iNOS (pulmão e baço) e os níveis plasmáticos de NO_x atingiram valores semelhantes aos encontrados no grupo LPS (grupo: LPS+DEX $5,47 \pm 1,2$ e $3,6 \pm 0,6$ pmol de citrulina/min/mg de proteína, pulmão e baço respectivamente; e $276,7 \pm 4,8$ μM, plasma).

Resultado semelhante foi obtido no modelo de septicemia quando avaliou-se a interferência do tratamento com dexametasona (1 hora antes ou 4 horas depois do CLP) na sobrevida dos animais sépticos (**Figura 4**). Além do tratamento prévio com dexametasona (0,2 mg/Kg, i.p.) ter aumentado a média da sobrevivência dos animais (CLP 2,25 e DEX+CLP 4 dias) as curvas de sobrevida destes grupos são estatisticamente diferentes ($n= 6$; $p < 0,05$, Teste de Logrank). O mesmo não ocorreu para o grupo que recebeu dexametasona (na mesma dose), após a cirurgia.

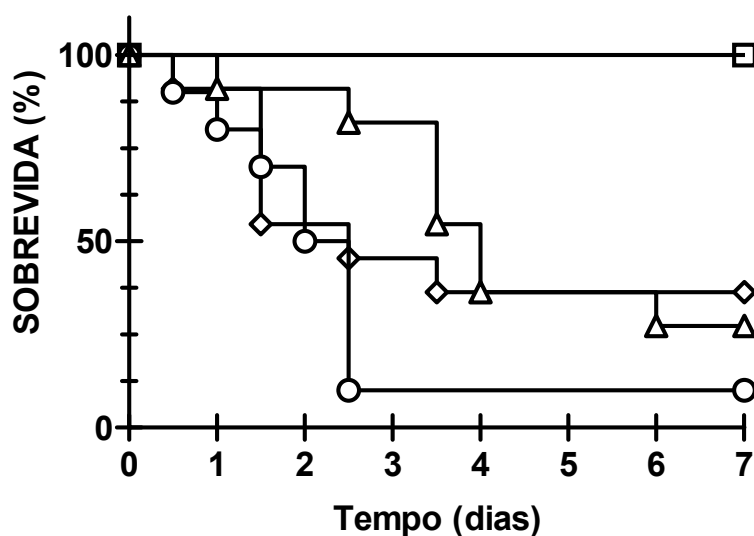
O grupo CLP+DEX apresentou uma sobrevida média de 2,5 dias e não difere significativamente do grupo CLP.

Os dados apresentados nas **Figuras 3 e 4** mostram que a injeção da dexametasona evita o desenvolvimento de algumas reações, comumente observadas em modelos experimentais de sepse, somente quando administrada antes do início do estímulo inflamatório.



GRUPO	TEMPO (horas)				
	-12	-1	0	+4	+8
CON	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS
DEX	DEX	DEX	PBS	PBS	PBS
LPS	PBS	PBS	LPS	PBS	†
DEX+LPS	DEX	DEX	LPS	PBS	
LPS+DEX	PBS	PBS	LPS	DEX	

Figura 3: Efeito da dexametasona na indução da atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS - Painéis A e B) e dos níveis de nitrito + nitrato (NOx – Painel C) de animais endotoxêmicos. Ratos receberam a injeção de lipopolissacarídeo (grupo LPS, 5mg/Kg, i.p.) ou salina tamponada com fosfatos (grupo PBS, 1 ml/Kg, i.p.) e oito horas após foram sacrificados para coleta de amostras de sangue e tecido. Ratos do grupo DEX+LPS, receberam duas injeções de dexametasona (DEX 2 mg/Kg, s.c.), administradas 12 e 1 hora **antes** da injeção de LPS. O grupo LPS+DEX recebeu apenas uma injeção do corticóide na mesma dose, porém 4 horas **após** a indução do choque endotóxico pela injeção de LPS (conforme indicado na tabela ao lado do Painel C). A atividade da enzima iNOS foi medida através da conversão de ^3H -L-arginina em ^3H -L-citrulina (descrito no item 3.4.2). A concentração dos níveis plasmáticos de nitrito foi determinada pela redução enzimática de nitrato, através da incubação de amostras de plasma com a enzima nitrato redutase expressa em *E.coli* (item 3.4.4). Cada barra representa a média \pm EPM de 4-7 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # do grupo LPS ($p < 0,05$). † Este símbolo representa o sacrifício dos animais.



GRUPO	SOBREVIDA MÉDIA (dias)
SHAM	indeterminado
DEXA+CLP	4
CLP	2,25
CLP+DEXA	2,5

GRUPO	TEMPO			
	-1h	0	+4h	7d
SHAM	PBS	PBS	PBS	
DEX+CLP	DEX	CLP	PBS	👁
CLP	PBS	CLP	PBS	
CLP+DEXA	PBS	CLP	DEX	

Figura 4: Efeito da dexametasona na sobrevivência de animais sépticos pela ligadura e perfuração do ceco (CLP). Um grupo de ratos (grupo DEX+CLP), recebeu uma injeção de dexametasona (DEX 0,2 mg/Kg, s.c.), administrada 1 hora **antes** da ligadura e perfuração do ceco (40 furos). Outro grupo (grupo CLP+DEX) recebeu a injeção do corticóide na mesma dose, 4 horas **após** a indução o CLP (conforme indicado no protocolo experimental abaixo da figura). Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. A curva de sobrevivência foi construída pela observação dos animais a cada 12 horas, durante 7 dias. O grupo CLP difere estatisticamente do grupo de animais falso-operados (SHAM) e do grupo DEX+CLP (n= 4-6 animais; p< 0,05, Teste de Logrank). A sobrevivência média dos grupos DEX+CLP, CLP e CLP+DEX foi calculada e está indicada na legenda desta figura. 👁 Este símbolo representa observação dos animais.

4.1.3 Avaliação da capacidade de ligação do GR e produção de NO nos modelos LPS e CLP

No modelo de endotoxemia, a injeção de LPS nas doses de 0,5; 1,0 e 5,0 mg/Kg (pela via intraperitoneal) causou respectivamente uma redução de 14, 32 e 68% na capacidade de ligação da [³H]-dexametasona no fígado dos animais, oito horas após a injeção da endotoxina. Vinte e quatro horas após as injeções das mesmas doses de LPS, não houve redução na capacidade de ligação da [³H]-dexametasona, quando comparado com o grupo que recebeu PBS (**Figura 5**, painel A). A determinação dos níveis plasmáticos de NOx destes mesmos animais mostrou que, no tempo 8 horas, todas as doses de LPS aumentaram os níveis de NOx em torno de 9 vezes, em relação ao grupo controle. Já no tempo 24 horas não houve aumento de NOx estatisticamente significativo.

A capacidade de ligação da [³H]-dexametasona foi medida no baço de animais sépticos pelo CLP em intervalos 12 horas, durante 3 dias (**Figura 6 B**). No primeiro tempo observado (12 h após a cirurgia) houve uma redução de 3 vezes na capacidade de ligação da [³H]-dexametasona (grupos: tempo zero $0,069 \pm 0,01$; tempo 12 h $0,024 \pm 0,01$ pmol de [³H]-dexametasona/mg de proteína). Nos tempos seguintes, a capacidade de ligação da [³H]-dexametasona variou, aumentando ou diminuindo em relação ao tempo anterior (melhor visualizado na tabela da **Figura 6**).

Os níveis de NOx, no plasma destes mesmos animais (**Figura 6A**), apresentaram perfil semelhante de variação da resposta nos diferentes tempos analisados, quando comparados ao perfil mostrado pela dosagem da capacidade de

ligação da [³H]-dexametasona. No entanto, nos tempos onde houve *aumento* de NOx em relação ao tempo anterior, houve *redução* na de capacidade de ligação da [³H]-dexametasona e vice-versa. Por exemplo, no tempo de 12 horas, os níveis de NOx aumentaram 3 vezes em relação ao tempo zero e no tempo 24 h, reduziu 1,8 vezes em relação ao tempo de 12 h. A capacidade de ligação da [³H]-dexametasona no tempo de 12 h reduziu 3 vezes em relação ao tempo zero e no tempo 24 h, aumentou 1,6 vezes em relação ao grupo 12 h.

Portanto, este conjunto de dados (**Figuras 5 e 6**) sugere a existência de uma relação de dependência de efeito entre a produção de NO e a capacidade de ligação da [³H] dexametasona ao GR, nos modelos de sepse estudados.

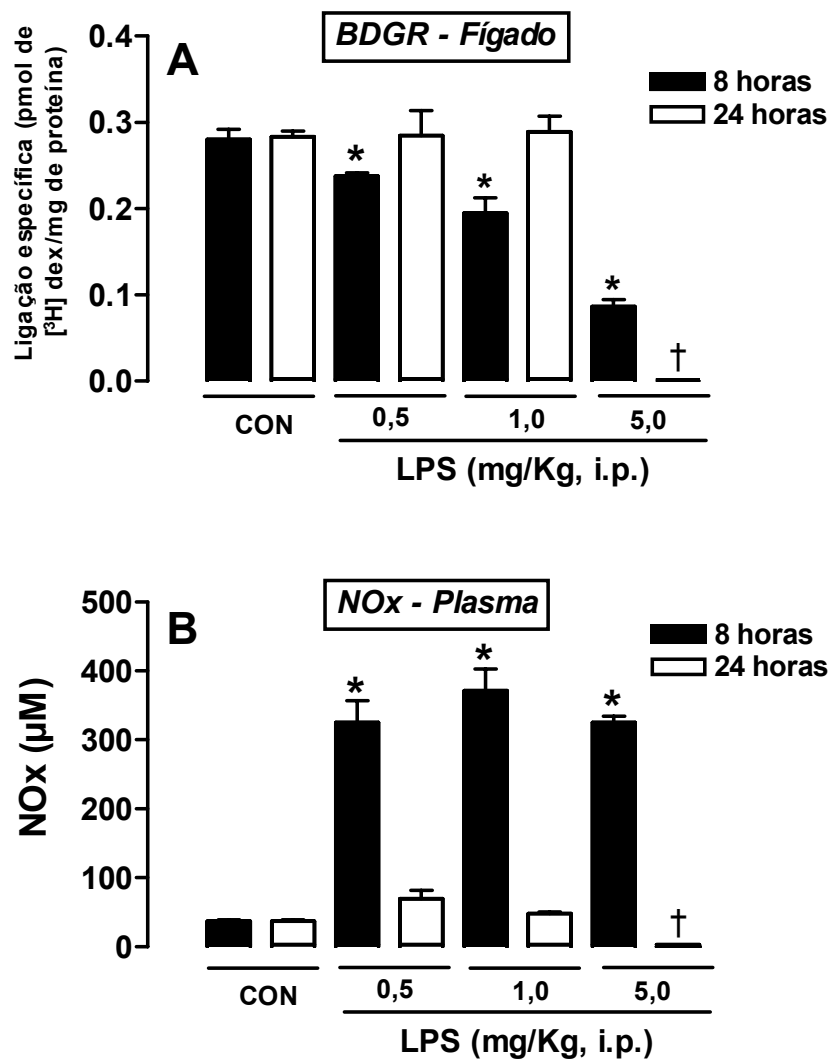
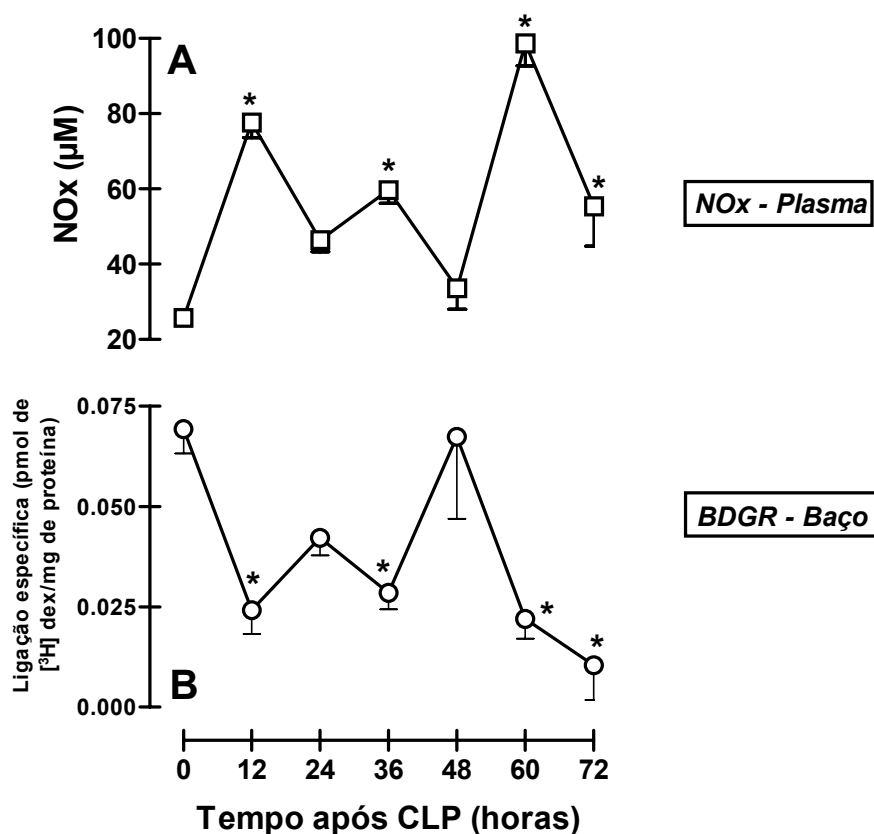


Figura 5: Curvas dose-resposta e tempo-resposta da capacidade de ligação do receptor de glicocorticoide (GR - Painel A) e dos níveis de nitrito + nitrato (NOx – Painel B) em animais endotoxêmicos. Ratos receberam a injeção de diferentes doses de lipopolissacarídeo (LPS) ou salina tamponada com fosfatos (grupo CON , 1 ml/kg, i.p.) e nos tempos 8 e 24 horas após, foram sacrificados para coleta de amostras de sangue e tecidos. A capacidade de ligação da $[^3\text{H}]$ dexametasona ao GR (BDGR) foi avaliado no fígado através do “ensaio de troca” (descrito no item 3.4.1 da seção Material e Métodos) e os níveis plasmáticos de NOx foram determinados pela redução enzimática de nitrato, através da incubação de amostras de plasma com a enzima nitrato redutase expressa em *E.coli* (item 3.4.4 da mesma seção). Cada barra representa a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando os grupos experimentais com o grupo CON, usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Dunnett’s. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON ($p < 0,05$). † Dosagens não realizadas devido à morte prévia dos animais



Variação da resposta

Comparações (em número de vezes)	Tempo (horas)					
	12	24	36	48	60	72
NOx em relação ao tempo zero	↑ 3,0	↑ 1,8	↑ 2,3	↑ 1,3	↑ 3,8	↑ 2,2
NOx em relação ao tempo anterior	↑ 3,0	↓ 1,7	↑ 1,3	↓ 1,8	↑ 2,9	↓ 1,8
BDGR em relação ao tempo zero	↓ 2,9	↓ 1,6	↓ 2,5	↓ 1,0	↓ 3,0	↓ 6,9
BDGR em relação ao grupo anterior	↓ 2,9	↑ 1,8	↓ 1,5	↑ 2,4	↓ 3,0	↓ 2,2

Figura 6: Curva tempo - resposta da capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (BDGR - Painei B) e dos níveis de nitrito + nitrato (NOx – Painei A) em animais sépticos. Ratos foram submetidos à ligadura e perfuração do ceco (CLP 40 furos). Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. A cada 12 horas, durante 3 dias, um grupo de animais foi sacrificado para coleta de amostras de sangue e tecidos. A capacidade de ligação da [³H]-dexametasona ao GR e os níveis de NOx foram determinados no baço e o plasma dos animais (respectivamente) nos diferentes tempos. Cada ponto da curva representa a média ± EPM de 4-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando os grupos experimentais com o tempo zero, usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito a correção por Dunnett's. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo do tempo zero (*p* < 0,05). A Tabela apresenta as variações do BDGR e dos níveis de NOx ao longo do tempo. (↑) representa aumento e (↓) diminuição da resposta (em número de vezes). As comparações feitas estão indicadas na tabela.

4.1.4 Efeito do SNAP sobre a capacidade de ligação e funcionalidade do GR

O efeito do NO sobre a capacidade de ligação de GR também foi testada em animais normais. Assim, ratos receberam SNAP nas doses de 3 e 6 mg/Kg. A capacidade de ligação do GR foi avaliada no pulmão e no baço 2, 8 e 24 horas após a injeção do doador de NO (**Figura 7**). A dose de 3 mg/kg de SNAP reduziu a capacidade de ligação do GR no pulmão em 62, 72 e 36% nos tempos 2, 8 e 24 horas (respectivamente). No baço, esta mesma dose causou redução na capacidade de ligação do GR apenas na oitava hora (43%). No tempo 24 h os valores encontrados no baço dos animais deste grupo foram semelhantes ao do grupo controle (grupo CON $0,067 \pm 0,003$ e tempo 24 h $0,062 \pm 0,01$ pmol de [3 H]-dexametasona/mg de proteína). A dose maior de SNAP (6 mg/Kg) também reduziu a capacidade de ligação do GR no pulmão em todos os tempos avaliados (75, 66 e 66% nos tempos 2, 8 e 24h respectivamente). No entanto no baço, esta mesma dose causou redução significativa da capacidade de ligação do GR (36%) já na segunda hora, após o tratamento com o doador de NO. No tempo 8 h a capacidade de ligação do GR no baço também estava diminuída em relação ao grupo CON (28% de redução), porém 24 horas após o tratamento com SNAP (6 mg/Kg), não houve diferença significativa entre este grupo e o grupo CON (**Figura 7B**).

Da mesma forma que no pulmão e no baço, o tratamento de animais com SNAP (3 mg/Kg, s.c.) causou redução na capacidade de ligação do GR no fígado, 8h após a injeção do doador de NO. No entanto, o tratamento de animais com o composto NAP (na mesma dose e no mesmo tempo) não causou redução na capacidade de ligação do GR (**Figura 8**), sugerindo que este efeito sobre o GR foi causado pela liberação de NO do composto SNAP.

O efeito do NO sobre a funcionalidade do GR foi avaliada pela dosagem da enzima TAT no fígado de animais (**Figura 9**). O doador de NO (SNAP 3 mg/Kg, s.c.) administrado 4 horas antes do tratamento com dexametasona (2 mg/Kg, s.c.) preveniu parcialmente o aumento da atividade da TAT, determinada 12 horas após a injeção do corticóide (grupos: CON $2,9 \pm 0,7$, DEX $8,7 \pm 0,9$ e SNAP+DEX $5,4 \pm 0,3$ unidades). No grupo que recebeu somente a injeção do doador de NO, os valores da atividade da TAT (grupo SNAP $3,1 \pm 0,4$ unidades) foram semelhantes aos valores encontrados para o grupo CON.

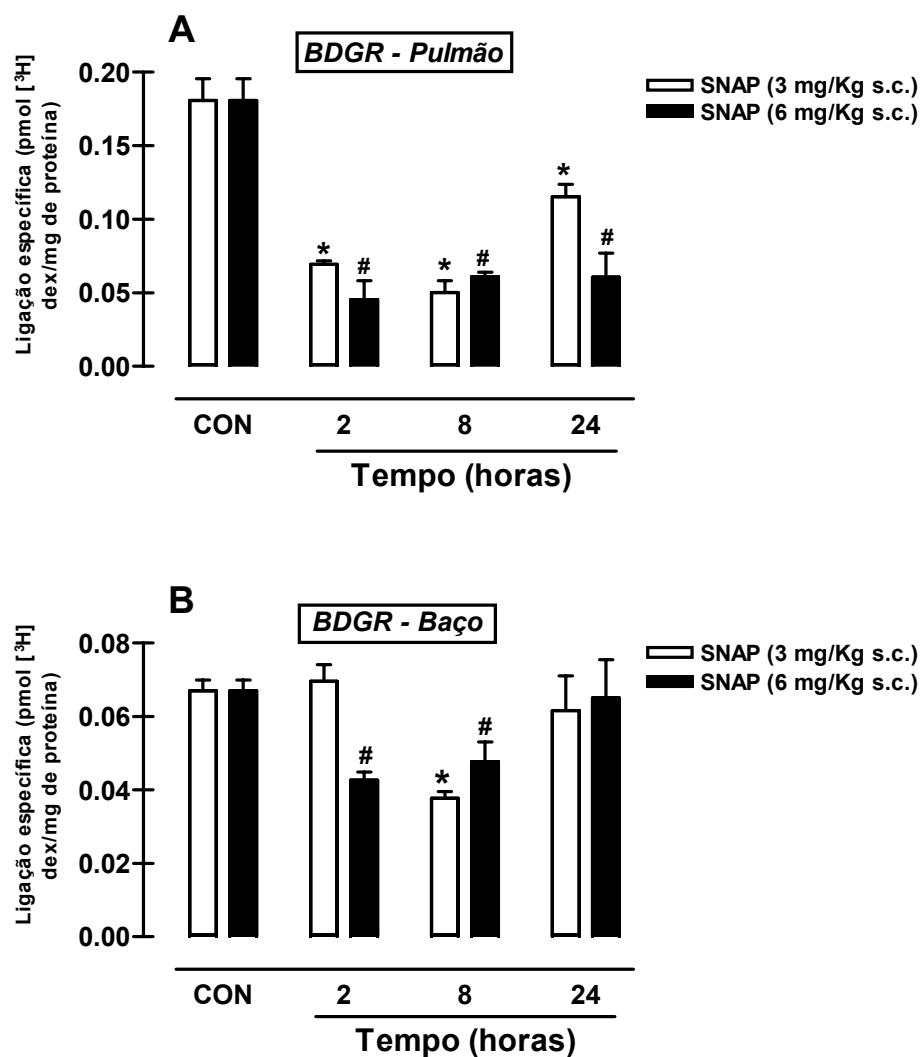


Figura 7: Curva dose- e tempo-resposta da capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (GR) no pulmão (Painel A) e no baço (Painel B) em animais normais. Ratos receberam a injeção de diferentes doses do doador de óxido nítrico (S-nitrosoacetil-DL-penicilamina, SNAP) ou salina tamponada com fosfatos (grupo CON, 1 ml/kg, s.c.). Duas, oito e vinte e quatro horas após, foram sacrificados para coleta de amostras de tecidos. A capacidade de ligação da $[^3\text{H}]$ -dexametasona ao GR (BDGR) foi avaliada no pulmão e no baço através do “ensaio de troca” (descrito no item 3.4.1 da seção Materiais e Métodos). Cada barra representa a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando os grupos experimentais nos diferentes tempos com o grupo CON, usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito a correção por Dunnett’s. *Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON (barras brancas) e # grupos que diferem estatisticamente do grupo CON (barras pretas) ($p < 0,05$).

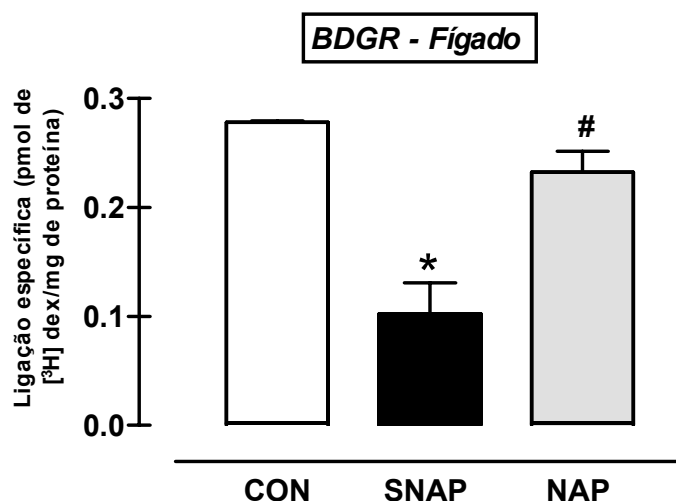
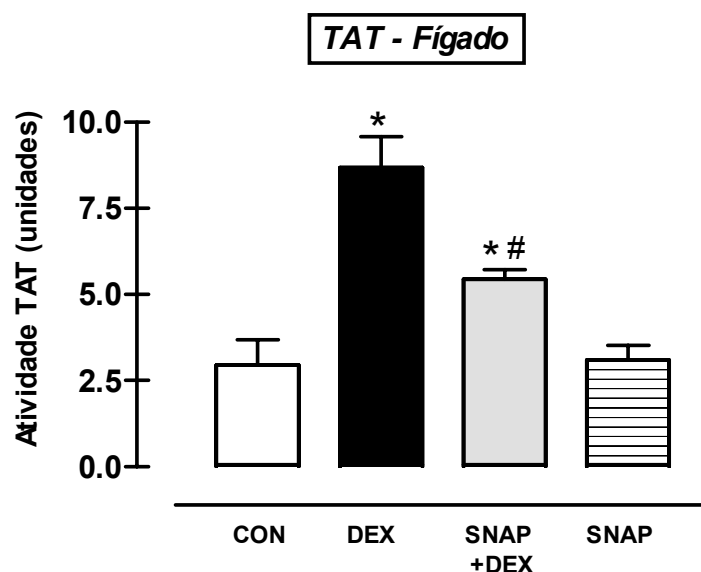


Figura 8: Efeito do composto acetil-DL-penicilamina (NAP) sobre a capacidade de ligação do corticóide a seu receptor no fígado de ratos normais. Ratos receberam a injeção do doador de óxido nítrico (S-nitroso-acetil-DL-penicilamina SNAP) e/ou do composto NAP (ambos na dose 3 mg/Kg, s.c.). Oito horas após, os animais foram sacrificados para coleta do fígado. A capacidade de ligação da [3H]-dexametasona ao GR (BDGR) foi avaliada através do “ensaio de troca” (descrito no item 3.4.1 da seção Material e Métodos). Cada barra representa a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito a correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # do grupo SNAP ($p < 0,05$).



GRUPO	TEMPO (horas)		
	-4	0	+12
CON	PBS	PBS	
DEX	PBS	DEX	†
SNAP+DEX	SNAP	DEX	
SNAP	SNAP	PBS	

Figura 9: Efeito do SNAP na indução corticóide-dependente da atividade da enzima tirosina amino transferase (TAT). Ratos receberam injeção de dexametasona (grupo DEX, 2mg/Kg, s.c.) e 12 horas após foram sacrificados para coleta do fígado. O doador de óxido nítrico (S-nitroso-DL-acetilpenicilamina, [SNAP], 3 mg/Kg, s.c.) foi administrado 4 horas antes da injeção de dexametasona (Grupo SNAP+DEX). O grupo SNAP recebeu somente a injeção do doador e 16 horas após foi realizada a dosagem da atividade da enzima TAT (ver protocolo experimental abaixo da figura). Cada barra representa a média \pm EPM de 4-7 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito a correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # do grupo DEX ($p < 0,05$) † Este símbolo representa sacrifício dos animais.

4.1.5 Efeito do L-NAME na capacidade de ligação do GR e produção de NOx em animais endotoxêmicos

O efeito do NO sobre a capacidade de ligação da [³H]-dexametasona ao GR foi testada em animais endotoxêmicos, através do tratamento com o inibidor não seletivo da NOS (L-NAME 10 mg/Kg, s.c.) durante o período de desenvolvimento do quadro endotóxico, ou seja, 1 hora antes e 3 horas após a injeção de LPS (5 mg/Kg, i.p.). Este tratamento preveniu a redução da capacidade de ligação do GR no pulmão e no baço dos animais endotoxêmicos (grupo L-NAME+LPS **Figura 10**, painéis A e B, respectivamente). Além disso, este tratamento também preveniu (ainda que parcialmente) o aparecimento do NOx no plasma destes mesmos animais (grupos: CON $29,3 \pm 3,5$; LPS $255,5 \pm 15,8$ e L-NAME+LPS $139,9 \pm 40,2$, **Figura 10 C**). Em conjunto, estes dados mostrados na **Figura 10**, confirmam a relação de dependência de efeito (aumento de NO *versus* diminuição da capacidade de ligação do GR e vice-versa) para animais endotoxêmicos, semelhante ao que foi sugerido para animais normais (**Figuras 5 e 7**) e sépticos pelo CLP (**Figura 6**).

A incubação de sobrenadantes de homogenizados do fígado de ratos normais com L-NAME ou com sua forma dextrógira (D-NAME), ambos nas concentrações 4, 40 e 400 μ M (**Figura 11**), não modificou a capacidade de ligação do GR em nenhum dos órgãos avaliados. O tratamento de animais normais com L-NAME não causou alteração na capacidade de ligação do GR.

Outra maneira utilizada para avaliar a interferência do NO na capacidade de ligação do GR em animais endotoxêmicos foi a incubação de sobrenadante de homogeneizados do pulmão de animais endotoxêmicos (LPS 5 mg/Kg, i.p., 8 horas

após) e de animais tratados com PBS, com doses crescentes de DTT (**Figura 12**). A dose de 1 mM de DTT elevou a capacidade de ligação da [³H]-dexametasona ao valor máximo, no grupo PBS, mas não no grupo LPS (grupo PBS: CON 729,4 ± 59,3 e DTT 1 mM 1087,5 ± 12,5 cpm; grupo LPS: CON 360,7 ± 63,9 e DTT 1 mM 562,5 ± 32,5 cpm). Apenas doses maiores de DTT (3 e 10 mM) elevaram a capacidade de ligação da [³H] dexametasona do grupo LPS ao valor máximo (grupo LPS: DTT 3 mM 1078,5 ± 87,5 e DTT 10 mM 911,5 ± 93,5 cpm). Além disso, estas mesmas doses não interferiram com a capacidade de ligação da [³H]-dexametasona do grupo PBS quando comparado com a dose de 1 mM de DTT, sugerindo que no grupo LPS o número de sítios de ligação oxidados e/ou nitrosilados era maior, quando comparado ao grupo que recebeu somente PBS.

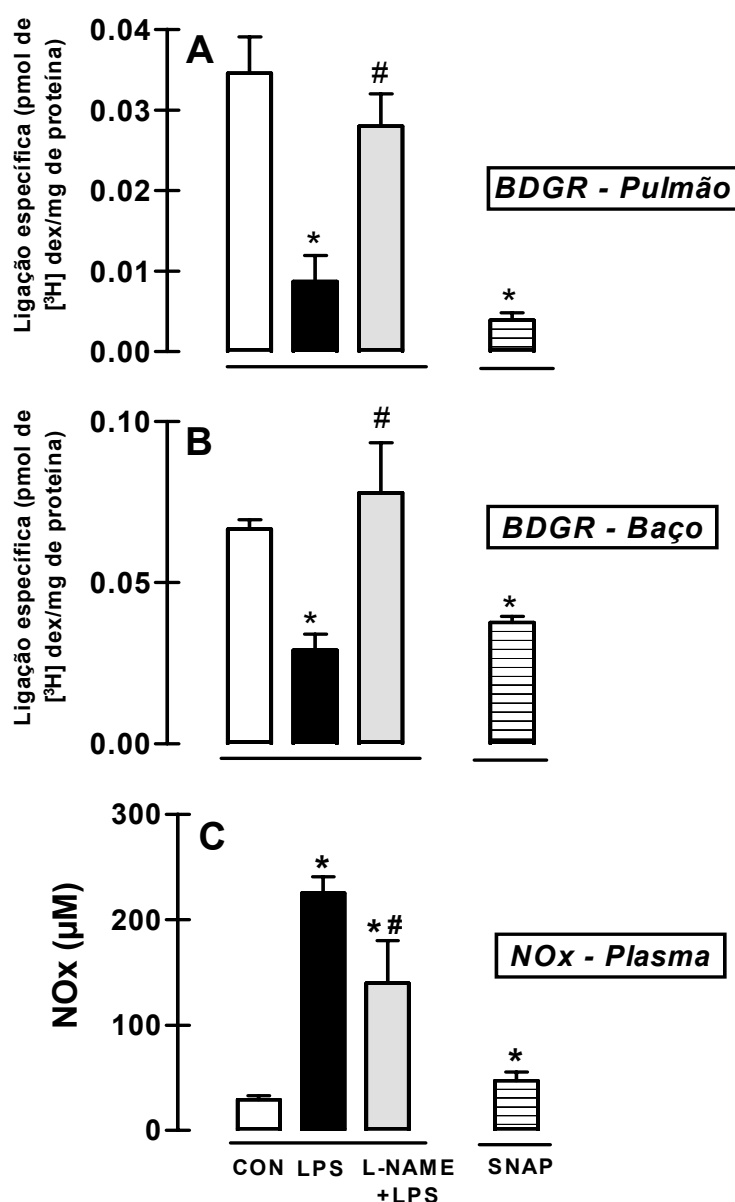


Figura 10: Efeito do inibidor da enzima óxido nítrico sintase em animais endotoxêmicos e do doador de óxido nítrico (S-nitroso-acetil-DL-penicilamina, SNAP) em animais normais sobre a capacidade de ligação do corticóide a seu receptor (Painéis A e B) e sobre a produção de nitrito + nitrato (Painel C). Ratos receberam injeção de lipopolissacarídeo (grupo LPS, 5 mg/Kg, i.p.) ou salina tamponada com fosfatos (grupo CON, 1 ml/Kg, i.p.) e oito horas após foram sacrificados para coleta de amostras de sangue e tecidos. O grupo L-NAME+LPS recebeu duas injeções de L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME, 10 mg/Kg, s.c.), 1 hora antes e três horas após a injeção de LPS. Ratos normais do grupo SNAP receberam apenas uma injeção do doador de óxido nítrico (3 mg/Kg, s.c.) e oito horas após foram sacrificados. Cada barra representa a média ± EPM de 4-7 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # grupos que diferem significativamente do grupo LPS ($p < 0,05$).

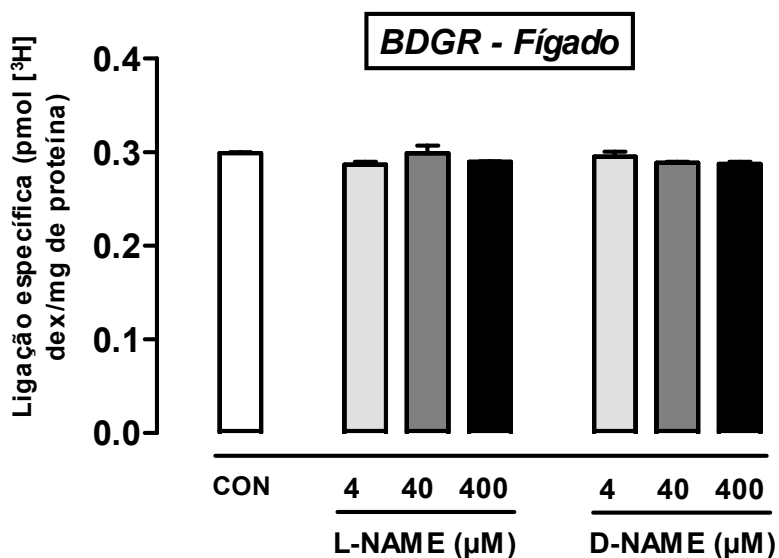


Figura 11: Efeito dos compostos L-NAME e D-NAME sobre a capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (GR) do fígado de animais normais. Sobrenadante de homogeneizados de fígado de animais normais foram incubados com L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME) ou D-nitro-arginina-metil-éster (D-NAME). O ensaio da capacidade de ligação da ^{3}H -dexametasona ao GR (BDGR) foi feito na presença destes compostos (ambos nas concentrações 4, 40 e 400 μM) durante 24 horas a 0°C . Após o período de incubação a capacidade de ligação do GR foi medida em um contador de cintilação líquida. Nenhuma diferença significativa foi encontrada na análise estatística feita entre os grupos dos compostos em relação ao grupo CON (ANOVA de uma via seguida do teste t sujeito à correção por Dunnett's).

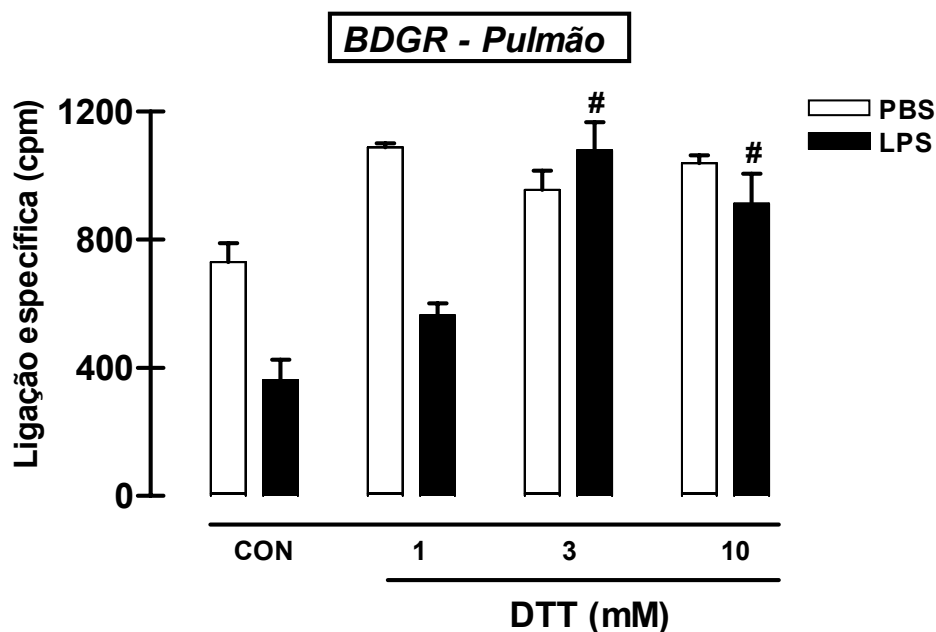


Figura 12: Efeito do ditioneitol (DTT) sobre capacidade de ligação do receptor de glicocorticóide (GR) do pulmão de ratos normais. Sobrenadante de homogeneizados de pulmão de animais normais foram incubados com concentrações crescentes de DTT (1, 3 e 10 mM) durante 1 hora a 0° C. Após este período de incubação, a [³H]-dexametasona foi adicionada aos tubos de ensaio e vinte e quatro horas após, a capacidade de ligação do GR (BDGR) foi quantificada em um contador de cintilação líquida. Cada barra representa a média ± EPM de 3 experimentos. A análise estatística foi feita comparando os grupos experimentais incubados com diferentes doses de DTT com o grupo CON, usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Dunnett's. # Grupos que diferem estatisticamente do respectivo grupo CON ($p < 0,05$).

4.1.6 Efeito do SNAP sobre a ação da dexametasona nos modelos LPS e CLP

A administração de SNAP 2 horas antes da injeção da dexametasona em animais endotoxêmicos (LPS) e/ou sépticos (CLP) teve como finalidade a inibição da capacidade de ligação do GR e conseqüentemente, inibição da funcionalidade do receptor avaliada durante o desenvolvimento da inflamação sistêmica (ver protocolos anexados às **Figuras 13 e 16**). Esta estratégia farmacológica mostrou-se eficaz em todos os parâmetros de funcionalidade do GR analisados (mostrado pelo conjunto de **Figuras 13 – 16**).

As **Figuras 13 e 14** mostram que o efeito produzido pelo tratamento com LPS (5 mg/Kg, i.p.) sobre os níveis plasmáticos de NOx (aumento de 33x) e sobre a atividade da enzima NOS (aumento de 40x no pulmão, aumento de 17x no baço e aumento de 2x na musculatura esquelética) foi prevenido pela injeção prévia de dexametasona (grupo DEX+LPS das **Figuras 13 e 14**). Porém, quando o doador de NO foi injetado 2 horas antes do tratamento com corticóide (grupo SNAP+DEX+LPS), o efeito da dexametasona sobre a ativação da NOS e produção de NOx em animais endotoxêmicos foi perdido (**Figuras 13 e 14**, última barra).

A **Figura 15** ilustra um perfil semelhante de resposta em relação a redução do peso relativo do baço de animais endotoxêmicos. Neste caso, a injeção prévia do doador de NO (grupo SNAP+DEX+LPS) preveniu a redução do peso relativo do baço causado pelo tratamento com dexametasona (grupo DEX+LPS redução de 2x em relação ao grupo LPS). Estes resultados (em conjunto com os dados das **Figuras 13 e 14**) sugerem que o NO liberado pelo SNAP interfere em alguns dos

efeitos imunossupressores e anti-inflamatórios do GR durante o desenvolvimento da endotoxemia .

A interferência do NO sobre a funcionalidade do GR também foi avaliada no modelo CLP (**Figura 16**). O tratamento com SNAP (3 mg/Kg, s.c.), 2 horas antes da injeção de dexametasona (0,2 mg/Kg, s.c.) em ratos posteriormente submetidos ao CLP, causou a morte de todos os animais até o quarto dia após a cirurgia. Além disso, a sobrevida média deste grupo foi próxima ao do grupo CLP (SNAP+DEX+CLP 2,5 e CLP 2,25 dias). O grupo que recebeu dexametasona antes do CLP (grupo DEX+CLP) apresentou uma sobrevida média maior que os demais grupos (4 dias). Além disso, a curva de sobrevivência deste grupo difere estatisticamente das curvas dos grupos SNAP+DEX+CLP e CLP ($n= 6$; $p< 0,05$, Teste de Logrank).

GRUPO	TEMPO (horas)					+8
	-14	-12	-3	-1	0	
CONTROLE	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	
DEX	PBS	DEX	PBS	DEX	PBS	
LPS	PBS	PBS	PBS	PBS	LPS	†
DEX+LPS	PBS	DEX	PBS	DEX	LPS	
SNAP+DEX+LPS	SNAP	DEX	SNAP	DEX	LPS	

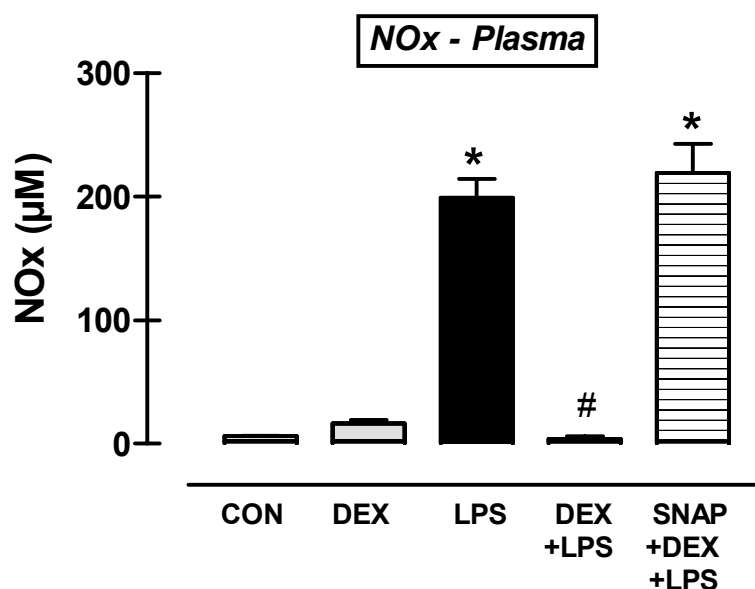


Figura 13: Efeito do S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) sobre a redução dos níveis de nitrito + nitrato (NOx) causada por dexametasona. A composição dos grupos experimentais, bem como a escala temporal utilizada nos diversos tratamentos é dada na tabela acima. O momento da injeção de lipopolissacarídeo (LPS) é considerado como tempo zero. As doses dos demais compostos utilizados são: salina tamponada com fosfatos (PBS 1 ml/Kg, i.p.); LPS (5 mg/Kg, i.p.); dexametasona (DEX 2 mg/Kg, s.c.) e SNAP (3 mg/Kg, s.c.). Cada barra representa a média \pm EPM de 4-7 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # grupos que diferem significativamente do grupo LPS ($p < 0,05$). † Este símbolo representa o sacrifício dos animais.

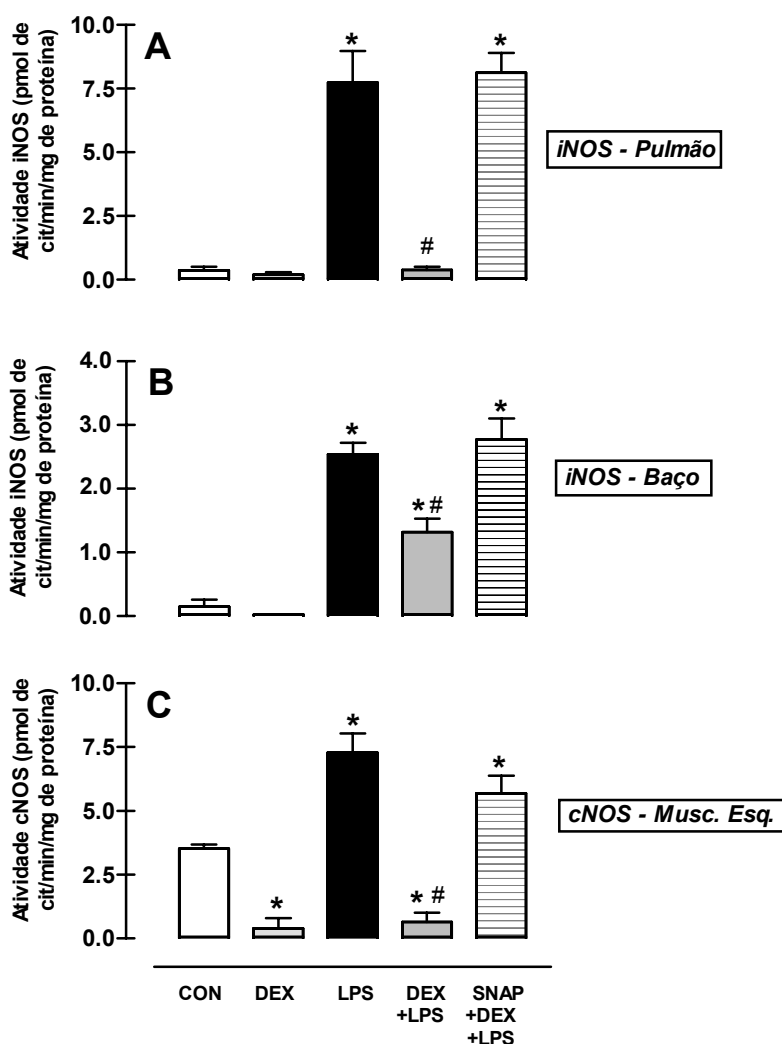


Figura 14: Efeito do S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) sobre a inibição da indução de isoformas das enzimas óxido nítrico sintases (NOS) causada por dexametasona. Painéis A e B: atividade da enzima NOS induzida no pulmão e no baço, respectivamente. Painel C: atividade da enzima NOS constitutiva no músculo esquelético (quadríceps femoral) de ratos. A composição dos grupos experimentais, bem como a escala temporal utilizada nos diversos tratamentos é dada na tabela da página anterior. O momento da injeção de lipopolissacarídeo (LPS) é considerado como tempo zero. As doses dos demais compostos utilizados são: salina tamponada com fosfatos (PBS 1 ml/Kg, i.p.); LPS (5 mg/Kg, i.p.); dexametasona (DEX 2 mg/Kg, s.c.) e SNAP (3 mg/Kg, s.c.). Cada barra representa a média \pm EPM de 4-7 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # grupos que diferem significativamente do grupo LPS ($p < 0,05$).

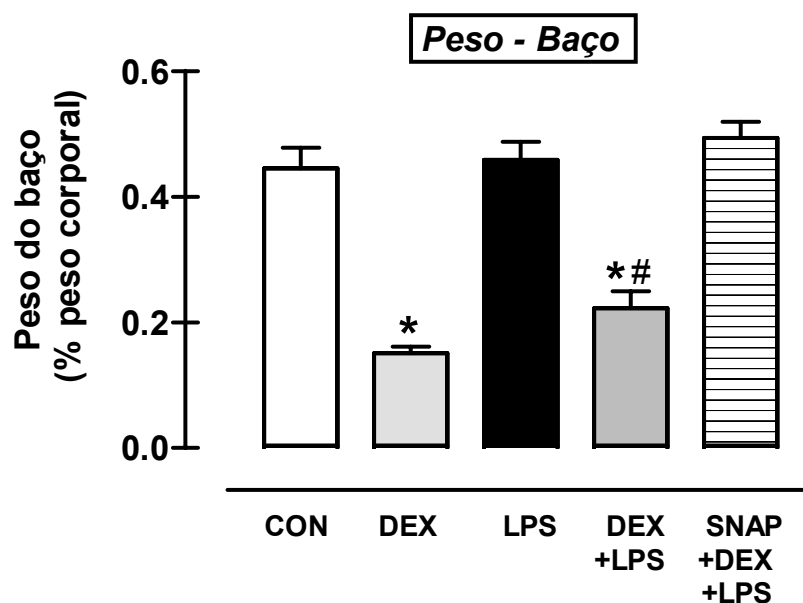
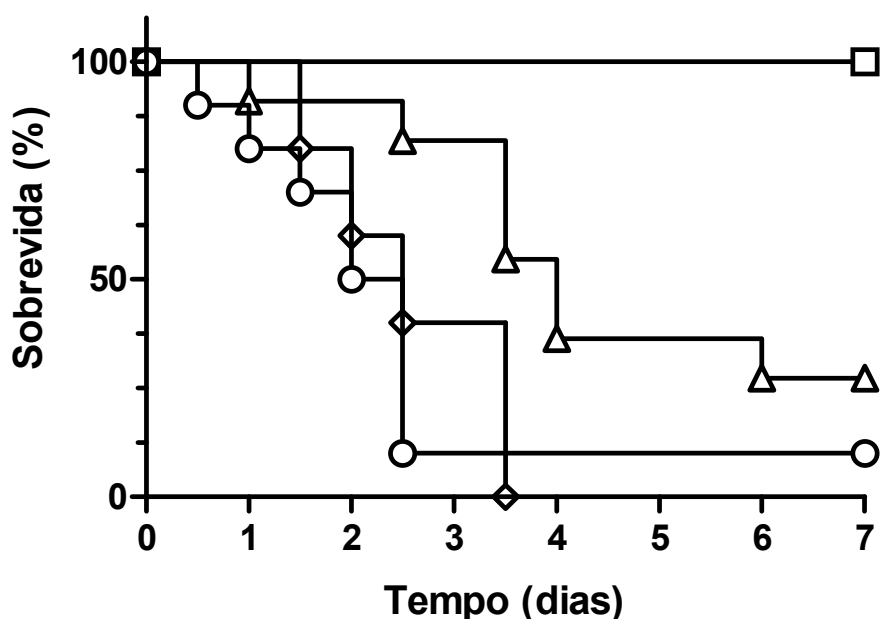


Figura 15: Efeito do S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) sobre a diminuição do peso do baço causada por dexametasona. A composição dos grupos experimentais, bem como a escala temporal utilizada nos diversos tratamentos é dada na tabela da **Figura 13**. O momento da injeção de lipopolissacarídeo (LPS) é considerado como tempo zero. As doses dos demais compostos utilizados são: salina tamponada com fosfatos (PBS 1 ml/Kg, i.p.); LPS (5 mg/Kg, i.p.); dexametasona (DEX 2 mg/Kg, s.c.) e SNAP (3 mg/Kg, s.c.). Cada barra representa a média \pm EPM de 4-7 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # grupos que diferem significativamente do grupo LPS ($p < 0,05$).



GRUPO	SOBREVIDA MÉDIA (dias)
—□— SHAM	indeterminado
—△— DEXA+CLP	4
—○— CLP	2,25
—◇— SNAP+DEXA+CLP	2,5

GRUPO	TEMPO			
	-3h	-1h	0	7d
SHAM	PBS	PBS	PBS	
DEX+CLP	PBS	DEX	CLP	👁
CLP	PBS	PBS	CLP	
SNAP+DEX+CLP	SNAP	DEX	CLP	

Figura 16: Efeito do S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP) sobre o aumento da sobrevivência de animais sépticos causada por dexametasona. A composição dos grupos experimentais, bem como a escala temporal utilizada nos diversos tratamentos é dada na tabela acima. O momento da ligadura e perfuração do ceco (CLP 40 furos) é considerado como tempo zero. As doses dos demais compostos utilizados são: salina tamponada com fosfatos (PBS 1 ml/Kg, i.p.); dexametasona (DEX 0,2 mg/Kg, s.c.) e SNAP (3 mg/Kg, s.c.). Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. A curva de sobrevivência foi construída pela observação dos animais a cada 12 horas, durante 7 dias. O grupo CLP difere estatisticamente do grupo SHAM e do grupo DEX+CLP (n= 4-6 animais; p< 0,05, Teste de Logrank). A sobrevivência média dos grupos DEX+CLP, CLP e SNAP+DEX+CLP foi calculada e está indicada na legenda desta figura. 👁 Este símbolo representa observação dos animais.

PARTE II

4.2 Envolvimento do NO na iniciação da resposta inflamatória sistêmica: participação da enzima NOS neuronal

4.2.1 Efeito do L-NAME e da AG na atividade/expressão da iNOS, produção de NOx e atividade da MPO de ratos tratados com LPS

A administração de LPS em ratos estimula o desenvolvimento de várias respostas inflamatórias, dentre elas ocorre a ativação e o aumento da expressão da enzima iNOS, elevação dos níveis plasmáticos de NOx e aumento da atividade da enzima MPO no pulmão. Além destes, outros importantes eventos fazem parte do conjunto de reações que formam a resposta inflamatória sistêmica.

As **Figuras 17-19** referem-se às respostas inflamatórias (acima listadas), avaliadas oito horas após a injeção de LPS (5 mg/kg, i.p.). A injeção da endotoxina aumentou a expressão da iNOS no pulmão e no baço (**Figura 18 C**), elevou a atividade desta enzima nestes mesmos órgãos (pulmão 3 e baço 2,5 vezes, **Figura 17**) e fez aparecer valores altos de NOx no plasma dos animais (**Figura 18**). Além disso, o tratamento com a endotoxina elevou a atividade da enzima MPO no pulmão de animais em mais de 20 vezes (**Figura 19**).

A avaliação do efeito do NO (liberado minutos após a injeção de LPS) sobre o desenvolvimento destas reações inflamatórias foi feita pelo tratamento de animais com o inibidor não seletivo da enzima NOS (L-NAME 10 mg/Kg, i.p.), injetado 1 hora antes do LPS. Este tratamento, impediu parcialmente a elevação de todos os

parâmetros inflamatórios avaliados, com exceção da atividade da iNOS no baço, onde este inibidor não foi efetivo em impedir a ativação desta enzima (**Figura 17C**).

Além do L-NAME, outro inibidor da NOS também foi utilizado. A aminoguanidina (considerada um inibidor mais seletivo para isoforma induzida) foi injetada na dose 10 mg/Kg, 1 hora antes do LPS, e interessantemente, também modificou a resposta inflamatória estimulada pela endotoxina. Este inibidor impediu totalmente a elevação da expressão e da atividade da iNOS no pulmão e no baço (**Figura 17 B e D**, respectivamente). No entanto, assim como o L-NAME, a AG impediu apenas parcialmente a elevação dos níveis plasmáticos de NOx e a elevação da atividade da enzima MPO no pulmão (**Figuras 18 B e 19 B**, respectivamente).

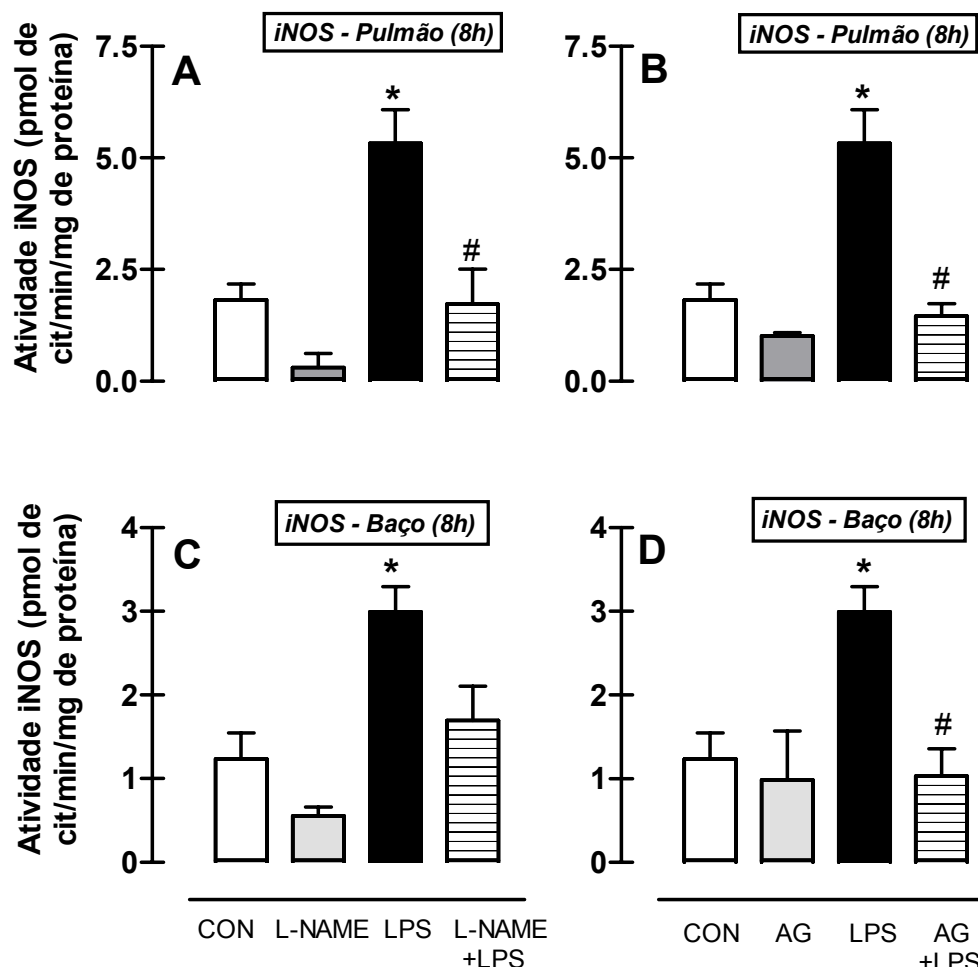


Figura 17: Efeito do L-NAME e da aminoguanidina na atividade da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) de ratos tratados com LPS. Painéis A e B: atividade da iNOS no pulmão. Painéis C e D: atividade da iNOS no baço. Ratos receberam a injeção de lipopolissacarídeo (grupo LPS na dose 5 mg/Kg, i.p.) e oito horas após, os animais foram sacrificados e amostras de pulmão e baço coletadas. Um grupo de animais (L-NAME+LPS) recebeu a injeção de L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME na dose 10 mg/Kg, i.p.- painéis da esquerda) e outro grupo (grupo AG+LPS) recebeu aminoguanidina (AG 10 mg/Kg, i.p. – painéis da direita), ambos 1 hora antes da injeção de LPS. A atividade da enzima iNOS foi medida através da conversão de ³H-L-arginina em ³H-L-citrulina (descrito no item 3.4.2). Cada barra representa a média ± EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # do grupo LPS (*p* < 0,05).

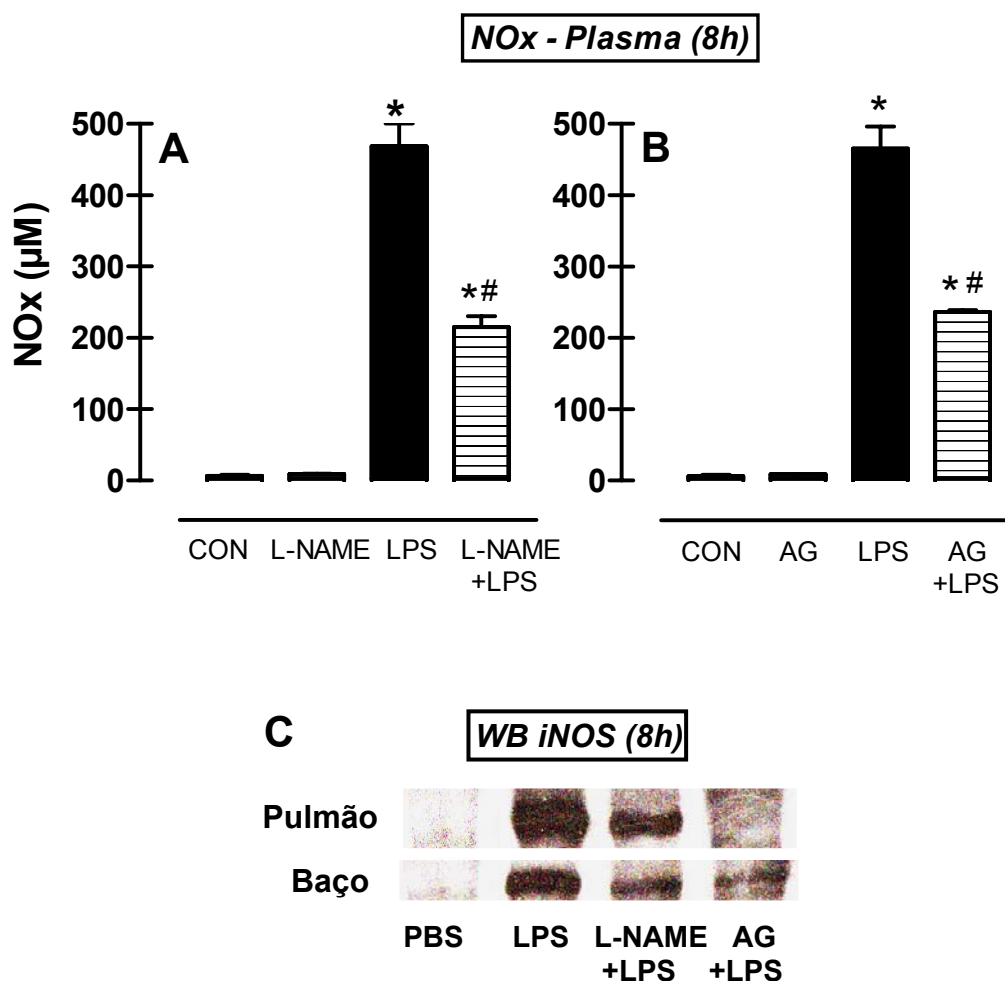


Figura 18 Efeito do L-NAME e da aminoguanidina na expressão da iNOS e produção de NOx de ratos tratados com LPS. Painéis A e B: níveis plasmáticos de nitrito+nitrato (NOx). Painel C: expressão de iNOS (WB iNOS) no pulmão e no baço. Ratos receberam a injeção de lipopolissacarídeo (grupo LPS na dose 5 mg/Kg, i.p.) e oito horas após, os animais foram sacrificados e amostras de sangue e tecidos coletadas. Um grupo de animais (L-NAME+LPS – painel A) recebeu a injeção de L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME na dose 10 mg/Kg, i.p.) e outro grupo (grupo AG+LPS – painel B) recebeu aminoguanidina (AG 10 mg/Kg, i.p.), ambos 1 hora antes da injeção de LPS. A concentração de NOx foi determinada pela redução enzimática de nitrato, através da incubação de amostras de soro com a enzima nitrato redutase expressa em *E.coli* (item 3.4.4). Cada barra representa a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # do grupo LPS ($p < 0,05$). O resultado da expressão da iNOS é representativo de 3 experimentos que obtiveram resultados semelhantes.

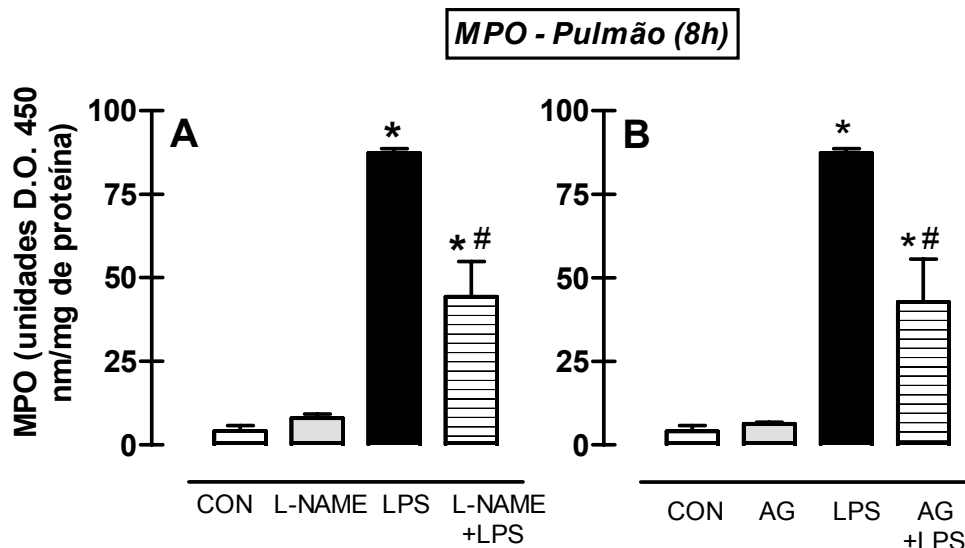


Figura 19: Efeito do L-NAME e da aminoguanidina na atividade da mieloperoxidase de ratos tratados com LPS. Ratos receberam a injeção de lipopolissacarídeo (grupo LPS na dose 5 mg/Kg, i.p.) e oito horas após, os animais foram sacrificados e amostras do pulmão coletadas. Um grupo de animais (L-NAME+LPS – painel A) recebeu a injeção de L-nitro-arginina-metil-éster (L-NAME na dose 10 mg/Kg, i.p.) e outro grupo (grupo AG+LPS – painel B) recebeu aminoguanidina (AG 10 mg/Kg, i.p.), ambos 1 hora antes da injeção de LPS. A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foi medida conforme descrito no item 3.4.6. Cada barra representa a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON e # do grupo LPS ($p < 0,05$).

4.2.2 Efeito da AG e do 7-NI sobre a queda da PAM e produção de NOx

2 horas após LPS

A injeção de LPS (10 mg/Kg) pela via intraperitoneal causou queda de $11,3 \pm 0,8$ mmHg na PAM de ratos, 15 minutos após o tratamento com a endotoxina (**Figura 20**, quadrados abertos). A queda foi progressiva até 75 minutos após LPS ($23,2 \pm 6,0$ mmHg). Após este período, a PAM dos animais aumentou e no tempo 120 minutos não mais diferiu estatisticamente dos valores da PAM registrados no tempo zero. A dosagem de NOx, feita nas amostras de sangue e tecidos coletados após o período de registro da PAM, ou seja, 2 horas após a injeção de LPS, mostrou que ocorre um aumento de 1,8 vezes nos níveis de NOx dosados em sobrenadantes de homogeneizados de músculo esquelético de rato (**Figura 21**). Porém os níveis de NOx dosados no plasma e em sobrenadantes de homogeneizados de pulmão, destes mesmos animais (grupo LPS), não diferiram estatisticamente dos valores encontrados no grupo que recebeu somente PBS (grupo CON).

A participação da enzima nNOS na produção imediata de NO foi avaliada pelo tratamento de ratos com os inibidores da NOS (AG 20 mg/Kg e/ou 7-NI 0,2 mg/Kg, ambos pela via intraperitoneal), injetados 1 hora antes do LPS. Durante todo o período de avaliação da PAM (registrados a cada 15 minutos durante 2 horas) a injeção prévia dos inibidores (AG e 7-NI - **Figuras 20 A e B**, respectivamente) impediu a queda da PAM pela injeção da endotoxina. Além disso, a utilização destes inibidores também impediu o aumento dos níveis de NOx no músculo esquelético destes mesmos animais, dosados 2 horas após a injeção de LPS.

Estes dados (**Figuras 20 e 21**) em conjunto com os dados apresentados na **Figuras 17-19**, sugerem que a nNOS de músculo esquelético (quadríceps femoral) também é responsável pela produção imediata de NO e a conseqüente hipotensão gerada após a injeção de LPS e que o bloqueio destes eventos pelo uso de inibidores da NOS constitutiva tem repercussões importantes no desenvolvimento da inflamação sistêmica no modelo de endotoxemia.

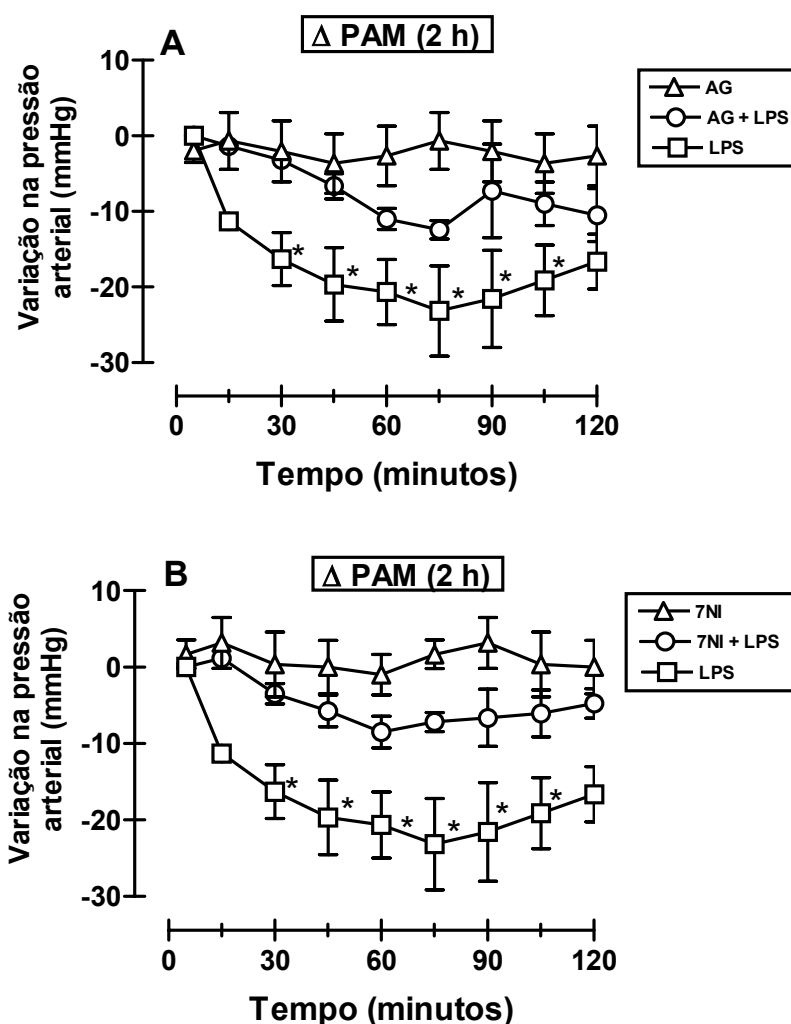


Figura 20: Efeito da aminoguanidina e do 7-nitroindazol sobre a queda da PAM causada por LPS. Ratos endotoxêmicos foram pré-tratados com inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS): aminoguanidina (AG - 20 mg/Kg, i.p. – painel A) e/ou 7-nitroindazol (7-NI - 0,2 mg/Kg, i.p.- painel B). Quinze minutos após o tratamento, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial. No momento correspondente à 1 hora após a injeção dos inibidores da NOS, os animais foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS 10 mg/kg i.p.). O registro da pressão arterial média (PAM) foi feito a cada 15 minutos, durante 2 horas, após a injeção da endotoxina bacteriana. Os resultados representam a média \pm EPM de 4-7 experimentos. A análise estatística foi feita comparando a variação da PAM registrada nos diferentes tempos com o tempo zero do mesmo grupo experimental, usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Dunnett's. * Grupos que diferem estatisticamente do tempo zero ($p < 0,05$). Os grupos de animais normais e endotóxicos (tratados com dimetilsulfóxido - DMSO 2%) foram omitidos da figura para melhor visualização dos resultados e não diferem estatisticamente do grupo de animais que recebeu somente PBS.

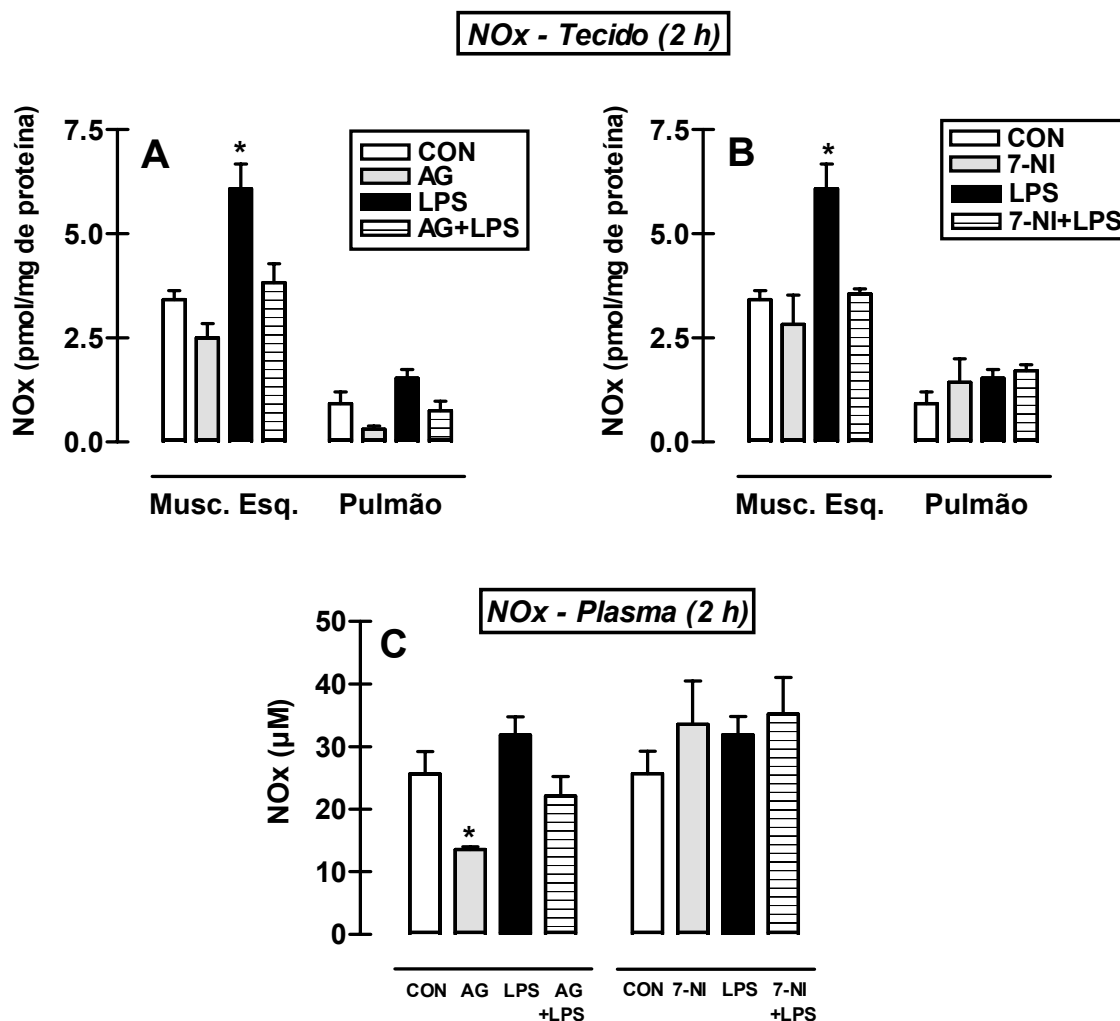


Figura 21: Efeito da aminoguanidina e do 7-nitroindazol sobre a produção de NOx no início da resposta inflamatória. Painéis A e B: dosagem de nitrito+nitrato (NOx) em sobrenadantes de homogeneizados de músculo esquelético (quadríceps femoral) e pulmão. Painel C: dosagem de NOx plasmático. Ratos endotoxêmicos foram pré-tratados com inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS): aminoguanidina (AG - 20 mg/Kg, i.p. – painel A) e/ou 7-nitroindazol (7-NI - 0,2 mg/Kg, i.p. – painel B). No momento correspondente à 1 hora após a injeção dos inibidores da NOS, os animais foram tratados com lipopolissacarídeo (LPS 10 mg/kg i.p.) e duas horas após, os animais foram sacrificados para coleta de sangue e tecidos. A concentração de NOx foi determinada pela redução enzimática de nitrato, através da incubação de amostras de soro com a enzima nitrato redutase expressa em *E.coli* (item 3.4.4). Cada barra representa a média \pm EPM de 4-7 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo CON ($p < 0,05$).

4.2.3 Efeito da AG e do 7-NI sobre alguns parâmetros inflamatórios e cardiovasculares no modelo CLP

O bloqueio da produção imediata de NO pelo uso de inibidores da nNOS também interfere no desenvolvimento do quadro de septicemia de animais submetidos ao CLP. A **Tabela 2** mostra o efeito da AG (10 mg/Kg, i.p.) e/ou do 7-NI (0,1 mg/Kg, i.p.), ambos injetados 1 hora antes da ligadura e perfuração do ceco, sobre alguns parâmetros inflamatórios, avaliados 36 horas após a cirurgia. No grupo que não recebeu tratamento algum, mas que são submetidos ao CLP (grupo CLP), os animais perderam $12,4 \pm 0,7\%$ do peso corporal total, ocorreu leucopenia (redução de 26,2% no número de leucócitos totais) e a atividade das enzimas MPO e NOS total (pulmão) e NOS constitutiva (musculatura esquelética) aumentou (3,2; 2,2 e 2,9 vezes, respectivamente, em relação ao grupo SHAM). Além disso, ocorre elevação dos níveis de NOx (2,8 vezes) no plasma e queda de $32,1 \pm 2,1$ mm de Hg da PAM destes animais. O tratamento prévio com os inibidores da NOS (grupos AG+CLP e 7-NI+CLP) preveniu totalmente todos os eventos causados pela ligadura e perfuração do ceco (acima descritos, grupo CLP), com exceção de apenas um parâmetro: o tratamento com o inibidor da nNOS, 1 hora antes do CLP, preveniu apenas parcialmente a elevação da atividade da enzima MPO, quando comparado aos grupos SHAM e CLP (grupos: SHAM $49,4 \pm 4,2$; CLP $158,0 \pm 13,8$ e 7-NI+CLP $103,0 \pm 11,1$ unidades D.O. 450 nm/mg de proteína).

Além da interferência sobre a resposta inflamatória desenvolvida durante a septicemia, os inibidores da NOS também modificaram padrões de respostas cardiovasculares de animais submetidos ao CLP. A **Figura 22** mostra o registro típico da PAM de animais sépticos 12 e 36 horas após a cirurgia, representativo da média da PAM de 5 a 7 animais por grupo. Trinta e seis horas após o CLP ocorre

queda da PAM (**Tabela 2**, última linha e registro típico, comparar linha basal dos grupos SHAM e CLP 36h) e hiporresponsividade à fenilefrina (**Figura 23**, barras pretas). Houve cerca de 50% de inibição da resposta vasoconstritora à fenilefrina em todas as doses utilizadas (3, 10 e 30 nmol/Kg).

O tratamento prévio com inibidores da NOS (1 hora antes, numa única dose: AG 10 e 7-NI 0,1 mg/Kg, i.p.) preveniu totalmente a queda da PAM (**Tabela 2**, última linha) e a hiporresponsividade à fenilefrina (**Figura 23 A e B**, grupos AG+CLP e 7-NI+CLP, respectivamente), avaliados 36 horas após o CLP.

Além dos efeitos sobre as respostas inflamatória e cardiovascular, a injeção prévia de inibidores da cNOS também interfere na curva de sobrevida de animais sépticos. A construção da curva foi feita pela observação dos animais em intervalos de 12 horas, durante sete dias. A sobrevida média dos animais submetidos somente à ligadura e perfuração do ceco foi de apenas 3,5 dias (**Figuras 24 e 25**, grupo CLP, círculos abertos). No entanto, quando os animais foram tratados com os inibidores da NOS (1 hora antes da cirurgia), a sobrevida média aumentou (grupos: AG+CLP 5,5 e 7-NI+CLP 5,0 dias). Interessantemente, somente a partir do quarto dia, os animais que receberam a injeção dos inibidores começaram a morrer. Aliado a isso, a queda da curva que descreve a sobrevida nestes grupos é mais abrupta quando comparada à curva do grupo CLP. Os grupos AG+CLP e 7-NI+CLP não diferem estatisticamente do grupo CLP ($n= 6$; $p < 0,05$; Teste de Logrank).

O conjunto de dados mostrados na **Tabela 2** e **Figuras 22 – 25** sugere que o tratamento com uma única dose de inibidores da NOS, além de prevenir o desenvolvimento de respostas inflamatórias e cardiovasculares clássicas, (descritas para animais sépticos no tempo 36 h) garante a sobrevida de todos os animais até 72 horas após o CLP.

PARÂMETROS (36 horas)	GRUPOS					
	SHAM	AG +SHAM	7-NI +SHAM	CLP	AG +CLP	7-NI +CLP
Diminuição do Peso Corporal Total (%)	2,3 ± 0,6	2,6 ± 2,6	3,1 ± 0,6	12,4 ± 0,7 *	5,2 ± 0,8 #	4,3 ± 0,8 #
Leucócitos Totais (células/mm³x10³)	38,8 ± 4,2	30,4 ± 3,0	40,8 ± 1,5	10,2 ± 1,8 *	30,7 ± 6,0 #	28,2 ± 8,7 #
MPO (unidades D.O. 450 nm/ mg de proteína)	49,4 ± 4,2	48,6 ± 8,1	63,8 ± 3,0	158,0 ± 13,8 *	65,0 ± 11,7 #	103,0 ± 11,0 # *
NOx plasmático (µM)	17,4 ± 1,0	15,5 ± 0,1	22,9 ± 1,9	48,6 ± 3,7 *	26,8 ± 4,2 #	27,6 ± 2,1 #
Atividade NOS total – Pulmão (pmol de cit/min/mg de proteína)	1,3 ± 0,3	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,02	2,8 ± 0,2 *	1,4 ± 0,3 #	1,1 ± 0,2 #
Atividade NOS Ca²⁺-dep. – Musc. Esq. (pmol de cit/min/mg de proteína)	1,4 ± 0,2	1,5 ± 1,0	1,3 ± 0,8	4,1 ± 0,5 *	1,9 ± 0,2 #	1,6 ± 0,3 #
PAM (mmHg)	94 ± 4,6	91,3 ± 0,9	105,0 ± 11,8	61,9 ± 2,5 *	83,8 ± 3,3 #	85,5 ± 3,1 #

Tabela 2: Efeito da aminoguanidina e do 7-nitroindazol sobre alguns parâmetros inflamatórios. Ratos sépticos (CLP) ou falso-operados (SHAM) foram pré - tratados com inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS): aminoguanidina (AG - 10 mg/Kg, i.p.) e/ou 7-nitroindazol (7-NI - 0,1 mg/Kg, i.p.). No momento correspondente à 1 hora após a injeção dos inibidores da NOS, os animais foram submetidos à ligadura e perfuração do ceco (CLP 40 furos) e 36 horas após, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média (PAM). Após o registro da PAM os animais foram sacrificados para coleta de sangue e tecidos. Os parâmetros inflamatórios dosados com as amostras coletadas estão descritos na seção materiais e métodos. Cada valor representa a média ± EPM de 4-10 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo falso-operado (SHAM) e # do grupo CLP (p< 0,05).

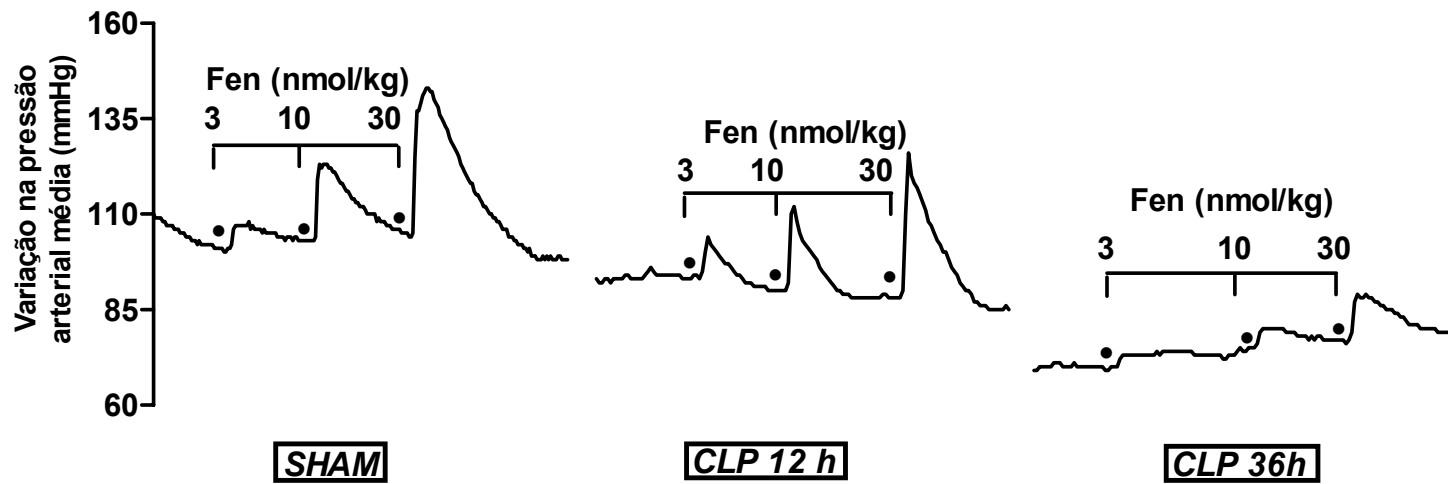


Figura 22: Registro típico da pressão arterial média de ratos anestesiados em sepse. Ratos foram submetidos à ligadura e perfuração do ceco (CLP 40 furos) e nos tempos 12 e 36 horas após, os animais preparados para o registro da pressão arterial média (PAM). Em seguida os efeitos vasoconstritores para a fenilefrina (Fen nas doses de 3, 10 e 30 nmol/Kg, i.v.) foram avaliados.

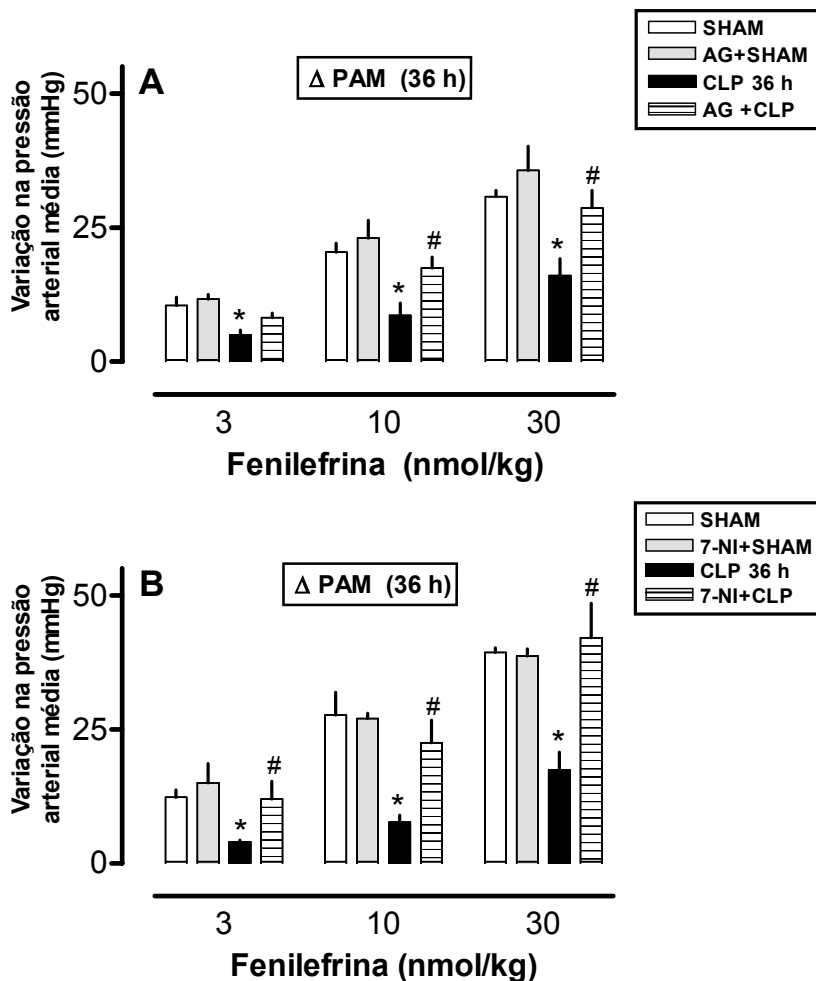


Figura 23: Efeito da aminoguanidina e do 7-nitroindazol sobre a resposta vasoconstritora à fenilefrina de ratos sépticos. Ratos sépticos ou falso-operados foram pré-tratados com inibidores da enzima óxido nítrico sintase (NOS): aminoguanidina (AG - 10 mg/Kg, i.p. -painel A) e/ou 7-nitroindazol (7-NI - 0,1 mg/Kg, i.p.- painel B). No momento correspondente à 1 hora após a injeção dos inibidores da NOS, os animais foram submetidos à ligadura e perfuração do ceco (CLP 40 furos) e 36 horas após, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média (PAM). Em seguida os efeitos vasoconstritores para a fenilefrina (nas doses de 3, 10 e 30 nmol/Kg, i.v.) foram avaliados. Cada barra representa a média \pm EPM de 4-10 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo falso-operado (SHAM) e # do grupo CLP ($p < 0,05$). Os grupos de animais normais, falso-operados e sépticos pelo CLP (tratados com dimetilsulfóxido - DMSO 2%) foram omitidos da figura para melhor visualização dos resultados e não diferem estatisticamente do grupo SHAM.

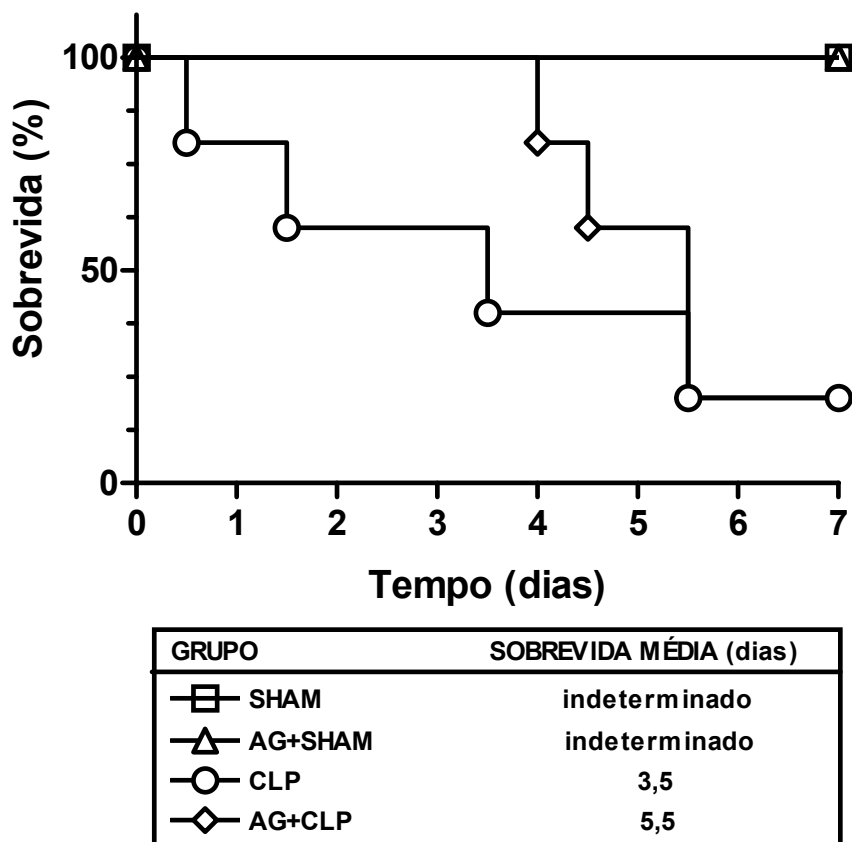


Figura 24: Efeito da aminoguanidina na curva de sobrevivência de animais sépticos. O inibidor da enzima óxido nítrico sintase aminoguanidina (AG 10 mg/kg, i.p.) foi injetado 1 hora antes da ligadura e perfuração do ceco de animais (modelo CLP 40 furos). Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. A curva de sobrevivência foi construída pela observação dos animais a cada 12 horas, durante 7 dias. O grupo CLP difere estatisticamente apenas do grupo SHAM (n= 4-6 animais; $p < 0,05$ Teste de Logrank). A sobrevivência média dos grupos AG+CLP e CLP foi calculada e está indicada na legenda desta figura.

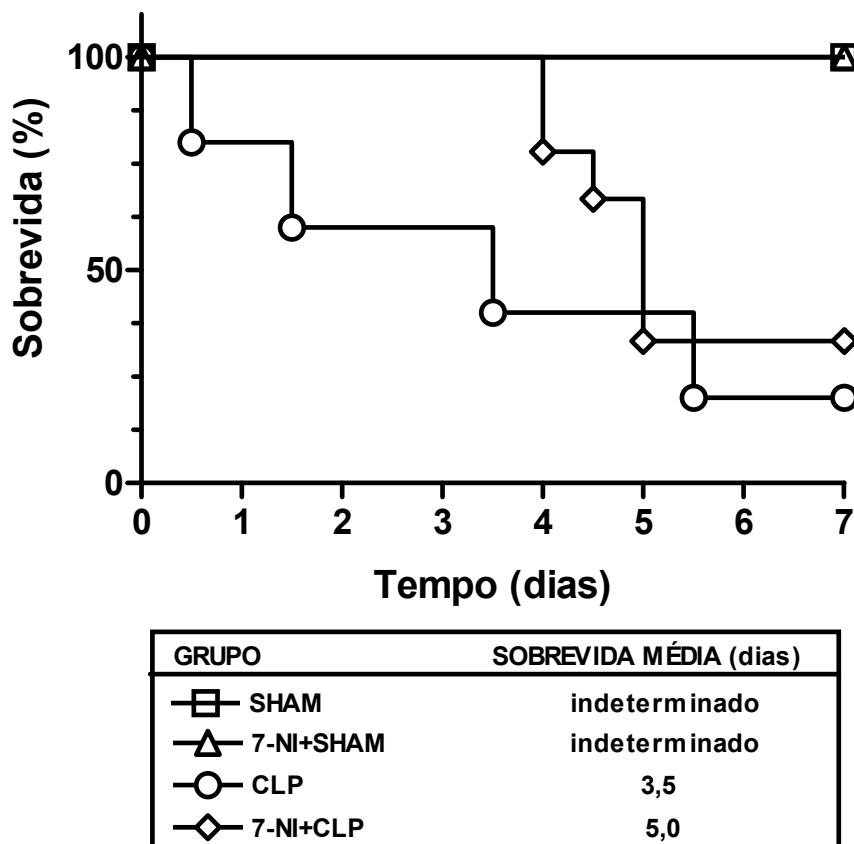


Figura 25: Efeito do 7-nitroindazol na curva de sobrevivência de animais sépticos. O inibidor da enzima óxido nítrico sintase 7-nitroindazol (7-NI 0,1 mg/kg, i.p.) foi injetado 1 hora antes da ligadura e perfuração do ceco de animais (CLP 40 furos). Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. A curva de sobrevivência foi construída pela observação dos animais a cada 12 horas, durante 7 dias. O grupo CLP difere estatisticamente apenas do grupo SHAM (n= 4-6 animais; $p < 0,05$, Teste de Logrank). A sobrevivência média dos grupos 7-NI+CLP e CLP foi calculada e está indicada na legenda desta figura.

4.2.4 Efeito do 7-NI sobre o crescimento de bactérias de lavado peritoneal 36 e 72 horas após CLP

A interferência da produção imediata de NO pela enzima nNOS sobre o crescimento de bactérias no lavado peritoneal de animais sépticos foi avaliada 36 e 72 horas após o CLP.

Ocorreu um aumento em torno de 8 vezes no crescimento de bactérias no lavado peritoneal de animais, 36 horas após a ligadura e perfuração do ceco (grupos: Sham $0,1 \pm 0,04$ e CLP $0,76 \pm 0,13$ unidades D.O. 630 nm – **Figura 26 A**). No entanto, 72 horas após o CLP, a turbidez formada pelo crescimento de bactérias do lavado peritoneal dos animais deste grupo é menor, porém não difere estatisticamente dos valores determinados no lavado peritoneal de animais sham-operados (grupos: Sham $0,112 \pm 0,02$, CLP $0,227 \pm 0,07$ – **Figura 26 B**).

Se por um lado, o tratamento de animais com o inibidor seletivo da nNOS (7-NI 0,1 mg/Kg, i.p.), injetado 1 hora antes do procedimento cirúrgico, previne o aumento do crescimento de bactérias, quando avaliado 36 horas após o CLP, por outro, o mesmo tratamento foi incapaz de causar este efeito, quando avaliado 72 horas após o início do estímulo inflamatório (**Figura 26**). Aliado a isso, no tempo 72 h, o tratamento com 7-NI, elevou em 5,2 vezes a turbidez causada pelo crescimento de bactérias do lavado peritoneal quando comparados ao grupo sham, e 2,6 vezes quando comparado ao grupo CLP.

A dosagem da atividade da enzima MPO (pulmão) e dos níveis plasmáticos de NOx revelou um perfil de resposta semelhante ao obtido pela análise do crescimento de bactérias do lavado peritoneal destes mesmos animais (**Tabela 3**). Trinta e seis horas após o CLP, a atividade da MPO e o níveis de NOx aumentaram (6,9 e 3,6 vezes, respectivamente). O tratamento prévio com 7-NI preveniu totalmente o aumento destes dois parâmetros no tempo 36 h.

A atividade da enzima MPO e os níveis plasmáticos de NOx, 72 horas após o CLP aumentaram cerca de 2x, porém não diferiram estatisticamente dos valores encontrados para o grupo SHAM (exemplo , NOx 72 h , grupos: SHAM $25,2 \pm 3,3$ e CLP $55,4 \pm 10,6$ μM).

Além disso, o tratamento prévio com 7-NI, não só não preveniu o aumento da atividade da MPO e níveis plasmáticos de NOx quando comparados ao grupo CLP, como aumentou em 3,3 e 5,3 vezes os valores de MPO e NOx, respectivamente, quando comparados ao grupo SHAM.

Estes dados (**Figura 26** e **Tabela 3**) sugerem que a supressão da produção imediata de NO pela nNOS, através do tratamento com 7-NI, controla o crescimento de bactérias e a resposta inflamatória até 36 horas após o CLP, pois 72 horas após o início do estímulo inflamatório (momento que antecede a queda abrupta da curva de sobrevivência de animais do grupo 7-NI+CLP, **Figura 25**), a resposta inflamatória e o número de bactérias nestes animais está aumentada em relação ao grupo CLP.

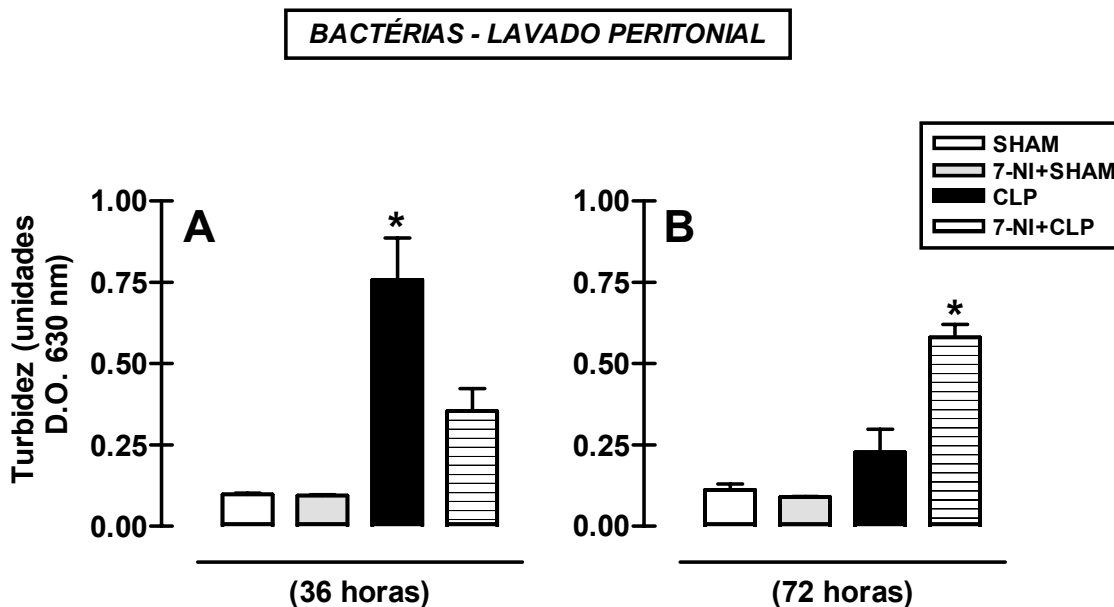


Figura 26: Efeito do 7-nitroindazol sobre o crescimento de bactérias de lavado peritoneal 36 e 72 horas após CLP. Animais foram tratados com o inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal 7-nitroindazol (7-NI 0,1 mg/Kg, i.p.), 1 hora antes da ligadura e perfuração do ceco (CLP 40 furos). Nos tempos 36 (Painel A) e 72 horas (Painel B) após o início da cirurgia, os animais foram sacrificados para coleta do lavado peritoneal. O crescimento bacteriano foi determinado no lavado peritoneal (conforme descrito no item 3.5.2). Cada barra representa a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo falso-operado (SHAM) ($p < 0,05$).

GRUPOS	PARÂMETROS			
	MPO (unidades D.O. 450 nm/mg de proteína)		NOx plasmático (μ M)	
	36 horas	72 horas	36 horas	72 horas
SHAM	32,9 \pm 11,0	47,9 \pm 2,3	21,9 \pm 4,7	25,2 \pm 3,3
7-NI + SHAM	67,9 \pm 1,8	75,2 \pm 12,1	28,9 \pm 5,2	43,3 \pm 10,1
CLP	225,7 \pm 20,0 *	92,5 \pm 16,6	79,5 \pm 6,6 *	55,4 \pm 10,6
7-NI + CLP	105,0 \pm 21,8 #	158,7 \pm 12,2 # *	46,6 \pm 5,0 #	134,1 \pm 32,2 # *

Tabela 3: Efeito do 7-nitroindazol sobre os níveis plasmáticos de NOx e sobre a atividade da MPO no pulmão de ratos 36 e 72 horas após CLP. Animais foram tratados com o inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) 7-nitroindazol (7-NI 0,1 mg/Kg, i.p.), 1 hora antes da ligadura e perfuração do ceco (CLP 40 furos). Nos tempos 36 e 72 horas após o início da cirurgia, os animais foram sacrificados para coleta de sangue e do pulmão. Os níveis de nitrito+nitrato (NOx) e a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) foram determinados conforme descrito na seção material e métodos. Cada valor representa a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais (para cada tempo), usando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste *t* sujeito à correção por Bonferroni. * Grupos que diferem estatisticamente do grupo falso-operado (SHAM) e # do grupo CLP ($p < 0,05$).

4.2.5 Efeito do SNAP e do LPS sobre a capacidade de ligação do GR avaliado 2 horas após o tratamento dos animais

O período até 2 horas após o início de um estímulo inflamatório parece ser crítico para o desenvolvimento de algumas das reações que formam a resposta inflamatória sistêmica (conforme mostrado na parte II dos resultados desta Tese – **Figuras 17-26 e Tabelas 2 e 3**). O mecanismo pelo qual a produção imediata de NO pelas enzimas NOS constitutivas interfere/controla as reações anteriormente mostradas não foi abordado neste estudo.

No entanto, os resultados referentes à primeira parte desta tese (**Figuras 1-16 e Tabela 1**), sugerindo uma interação NO e GR durante quadros de endotoxemia, como um possível mecanismo de controle da resposta inflamatória sistêmica (horas após o início do estímulo inflamatório), permitem a extrapolação deste fenômeno (interação NO/GR) como um mecanismo de controle, também presente no início da resposta inflamatória. Assim, 2 horas após a injeção de LPS (10 mg/Kg, i.p.) e/ou do doador de NO (SNAP 0,3 mg/Kg, i.p.) avaliou-se a capacidade de ligação do GR no fígado dos animais (**Figura 27**).

Ao contrário do que foi mostrado na primeira parte de resultados desta tese, a injeção de LPS e/ou de SNAP aumentou a capacidade de ligação do GR (1,2 e 1,5 vezes em relação ao grupo que CON, respectivamente) quando avaliados 2 horas após os tratamentos. Estes dados em conjunto com as demais figuras e tabelas descritas anteriormente sugerem que existe uma

interação entre NO e GR em momentos distintos da reação inflamatória sistêmica. O NO (via interação com GR) parece ser importante tanto no início da resposta inflamatória, como em momentos onde as reações inflamatórias e/ou cardiovasculares decorrentes da infecção, tornam-se evidentes e muitas vezes definitivas para a sobrevivência do hospedeiro.

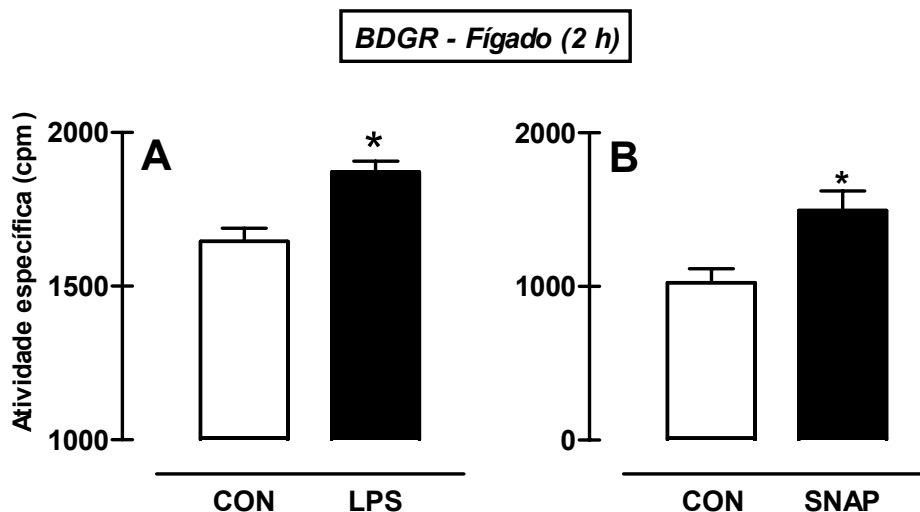


Figura 27: Efeito do SNAP e do LPS sobre a capacidade de ligação do GR. Animais foram tratados com S-nitroso-acetil-DL-penicilamina (SNAP 0,3 mg/Kg, s.c.) ou lipopolissacarídeo (LPS 10 mg/Kg, i.p.). Duas horas após, os animais foram sacrificados para coleta do fígado. A capacidade de ligação da [³H]-dexametasona ao GR (BDGR) foi avaliada no fígado através do “ensaio de troca” (descrito no item 3.4.1 da seção materiais e métodos). Cada barra representa a média ± EPM de 3-6 animais por grupo. A análise estatística foi feita comparando os dois grupos experimentais pelo teste *t* de Student de amostras não-pareadas * Grupos que diferem estatisticamente (*p* < 0,05) do grupo CON.

V – DISCUSSÃO

A sepse era anteriormente definida como uma doença decorrente apenas de uma reação exacerbada do sistema imune frente a uma infecção sistêmica. No entanto, nos últimos anos, este conceito simplista vem sendo definitivamente abandonado (para revisão ver Weigand, 2004). Um artigo publicado por Roger Bone em 1996 (Bone, 1996) discute bem este ponto, com base em um dos princípios matemáticos formulados por Sir Isaac Newton em 1687: “Para cada ação há sempre uma reação igual e oposta”. Este é considerado como um dos princípios fundamentais da ciência.

Como inicialmente a sepse era considerada apenas uma resposta inflamatória exacerbada, vários ensaios clínicos utilizando diferentes terapias foram realizados na tentativa de conter a resposta inflamatória. No entanto, nenhum dos tratamentos foi eficaz em diminuir a mortalidade causada pela sepse. À medida que os mediadores anti-inflamatórios foram sendo identificados e com base nos resultados negativos dos ensaios clínicos, vários grupos de pesquisadores começaram a estudar a ocorrência de reações compensatórias à inflamação, durante os quadros de sepse, cuja finalidade era o restabelecimento da homeostasia. Assim, esta *reação* gerada em resposta ao ato de inflamar passou a ser considerada como um fenômeno pertencente à fisiopatologia da sepse (Bone, 1996).

Apesar da identificação destas diferentes fases (pró e anti-inflamatórias) nos quadros de sepse, a seqüência temporal de ocorrência destes eventos

ainda não está definida. Alguns estudos sugerem que a fase pró-inflamatória pode ser seguida pelas reações anti-inflamatórias, porém segundo a hipótese de Rivera-Chavez e colaboradores, ambas as fases podem estar ocorrendo simultaneamente após o início do estímulo inflamatório (Weigand, 2004).

Os resultados mostrados no presente estudo sugerem que o NO pode ser mais um mediador envolvido nos mecanismos que controlam o conjunto de reações que formam a resposta inflamatória sistêmica. Através da interação com receptores de glicocorticóides, o NO parece participar tanto do controle das reações pró-inflamatórias, como no controle das reações anti-inflamatórias (ambos em estágios iniciais da sepse). A isoforma neuronal da enzima NOS parece participar do controle das reações inflamatórias através da produção de uma certa quantidade de NO, e que é liberado minutos após a administração de um estímulo inflamatório. Outro achado fundamental deste trabalho é que a inibição da capacidade de ligação do GR pelo NO poderia estar contribuindo para a piora do quadro.

Os resultados apresentados na primeira parte desta tese mostram que o NO produzido pela enzima iNOS, durante os quadros de endotoxemia, causa inibição da capacidade de ligação e da funcionalidade do GR.

A perda das ações dos glicocorticóides em animais endotoxêmicos já havia sido descrita em 1977 por Berry e colaboradores (Berry *et al.*, 1977). Neste trabalho, os autores sugeriram que um mediador solúvel, “fator antagonista de glicocorticóides”, liberado de macrófagos seria o fator

responsável, após a injeção de LPS, pela inibição da síntese das enzimas hepáticas triptofano oxigenase e fosfoenolpiruvato quinase (etapas limitantes da via da gliconeogênese) e cuja expressão depende da efetividade de glicocorticóides. Inúmeros ensaios clínicos (realizados nas décadas de 70 e 80) mostraram que a utilização de altas doses de glicocorticóides como um possível tratamento da sepse, não melhoraram a sobrevivência dos pacientes. Naquela época a sepse era considerada uma resposta inflamatória exacerbada e o uso de anti-inflamatórios parecia ser um tratamento promissor. No entanto, como no estudo feito por Berry e colaboradores, os corticóides pareciam não funcionar em quadros de reação inflamatória sistêmica. Desta forma, o tratamento da sepse com altas doses de glicocorticóides foi abandonado (Balk, 2003).

O mecanismo pelo qual os corticóides perdem algumas de suas ações e conseqüentemente não aumentavam a sobrevivência de pacientes sépticos começou a ser elucidado em 1983 por Stith e colaboradores (Stith *et al.*, 1983). Naquele trabalho, os autores mostraram que a capacidade de ligação do GR era diminuída de forma tempo- e dose-dependente pela injeção de endotoxina bacteriana em animais de experimentação. Como até então o NO ainda não havia sido descoberto, os autores dos trabalhos citados acima não puderam perceber a relação de dependência de efeito que existe entre a elevação da produção de NO e a inibição da capacidade de ligação do GR (e a conseqüente inibição da atividade dos glicocorticóides), mostrado no presente estudo através dos modelos experimentais de sepse.

Em 1999 Galigniana, Piwien-Pilipuk e Assreuy (Galigniana *et al.*, 1999) mostraram que um doador de óxido nítrico era capaz de causar inibição da capacidade de ligação do GR em fibroblastos L929 de camundongos. A partir desses dados, os autores sugeriram que o óxido nítrico produzido em grandes quantidades durante o choque séptico poderia ser o mediador da inibição da capacidade de ligação do GR, e que este seria o motivo pelo qual a utilização destes agentes anti-inflamatórios não seriam eficazes no tratamento da síndrome séptica.

A demonstração definitiva do que foi sugerido por estes autores foi realizada no presente estudo (parte dele publicado em Duma *et al.*, 2004). Para tal, utilizamos dois modelos experimentais de sepse (LPS e CLP).

Em relação ao LPS, a dose de 5 mg/Kg foi escolhida para representar um quadro severo de sepse (morte de 100% dos animais em 24 horas) e para garantir a inibição máxima da capacidade de ligação do GR. Testamos também o dobro da dose, ou seja, 10 mg/kg que também causou inibição máxima do GR, mas que causava alta mortalidade nas primeiras 8 horas após a injeção desta dose de endotoxina. A dose de 1 mg/kg de LPS não causou inibição da ligação do GR no fígado de animais e, por isso, optamos por utilizar a dose de 5 mg/Kg.

A injeção de LPS conduz a uma resposta explosiva por parte do hospedeiro no que se refere às respostas inflamatórias. Por exemplo, o parâmetro NOx plasmático chega à elevar-se 10 vezes acima do valor dos

animais controles. Por outro lado, no modelo CLP a resposta sistêmica instala-se mais vagarosamente, simulando melhor o que se observa na sepse humana. Por exemplo, os níveis máximos de NOx não ultrapassam 3-4 vezes o valor dos animais normais. Além de instalar-se mais lentamente, a sepse induzida pelo modelo CLP foi utilizado também por tratar-se de um modelo de infecção sistêmica por bactérias pertencentes à flora intestinal do próprio animal de experimentação. Portanto, as alterações inflamatórias e cardiovasculares observadas neste modelo se aproximam muito mais da sintomatologia desenvolvida por pacientes sépticos. Atualmente, o modelo CLP é considerado o melhor modelo para o estudo do choque séptico.

Nos dois modelos de sepse utilizados, ocorre a indução da enzima iNOS. Em modelos experimentais de administração de LPS ocorre a indução da atividade desta enzima em muitos tecidos e órgãos (Knowles *et al.*, 1990; Salter *et al.*, 1991; Cunha *et al.*, 1994; e nossos próprios resultados). Este processo inicia-se após a administração da endotoxina, atingindo pico máximo de atividade enzimática entre 6 e 12 horas (Knowles *et al.*, 1990; Salter *et al.*, 1991; Cunha *et al.*, 1994). A indução da iNOS também ocorre no modelo CLP e em vários outros modelos que simulam, em maior ou menor grau, o quadro de septicemia humana.

Embora tenha sido pensada inicialmente como uma resposta estereotipada e máxima em resposta ao LPS, a indução da iNOS mostrou-se ser controlada e não-caótica. Por exemplo, a indução da iNOS parecer ser citocina- e órgão-dependentes. A indução de iNOS ocorre de forma

diferenciada em diversos tecidos do camundongo e deve-se à dependência diferencial de TNF- α e IL-1 β . Assim, a indução desta enzima em determinados órgãos parece ser estritamente dependente destas citocinas, enquanto que em outros órgãos outras citocinas devam ser mais importantes (Cunha *et al.*, 1994). Além disso, Rees *et al.* (1995) demonstraram que o tratamento de camundongos com a bactéria *C. parvum* causou a indução da expressão de NOS inicialmente em macrófagos e no fígado, seguida pela indução da expressão no baço, no coração e na aorta ao longo de vários dias (30 no total). Os autores deste trabalho sugeriram que a liberação seqüenciada de citocinas causou indução de iNOS escalonada no tempo. Com base neste dois trabalhos é possível supor que os diferentes níveis de NOS encontrados em nossos resultados nos vários órgãos de rato, após o tratamento com LPS e no modelo CLP, devam-se a uma expressão diferencial qualitativa e temporal destas enzimas.

Nossos resultados mostram a relação de dependência de efeito que existe entre a produção de NO e a capacidade de ligação do GR. É possível perceber, nos dois modelos de sepse, que o momento onde ocorre inibição máxima da capacidade de ligação do GR, coincide com aquele onde ocorre máxima produção de NO. Apesar da produção de NO_x detectada no plasma dos animais, ter aumentado igualmente para todas as doses de LPS, os resultados mostram que nos órgãos onde houve aumento na atividade da iNOS, a capacidade de ligação do GR estava diminuída. O mesmo grau de elevação do NO_x plasmático, observado em nossos resultados (para todas as

doses de LPS) é justificado pela produção dos metabólitos do NO por várias células e tecidos do rato.

No modelo CLP, a relação de dependência de efeito (NO X GR) pode ser observada entre a produção de NOx plasmático e a capacidade de ligação do GR (dosada no baço dos animais sépticos). Por ser um modelo de instalação mais lenta de sepse, a proporção de iNOS (e conseqüentemente sua atividade), é menor no modelo CLP quando comparado ao modelo LPS. Acreditamos que no modelo CLP a capacidade máxima de produção de metabólitos do NO por vários órgãos e tecidos do rato não foi atingida, o que permitiu a visualização das oscilações de NOx *versus* capacidade de ligação do GR ao longo do tempo.

Além da indução da atividade da enzima iNOS ser diferencial, os resultados mostram que a inibição da capacidade de ligação do GR também difere entre órgãos. O receptor de glicocorticóide do pulmão parece ser mais sensível à inibição por NO, quando comparado ao GR do baço (ambos de animais normais que foram tratados com SNAP). Talvez capacidades antioxidantes dos diferentes tecidos sejam responsáveis por conferir maior ou menor proteção aos GR, dependendo do órgão, da oxidação/nitrosilação provocada pelo NO.

Por ser um ensaio realizado essencialmente *in vitro*, foi necessário verificar se a inibição da capacidade de ligação do GR por SNAP não era apenas um artefato bioquímico. Assim, a utilização do composto NAP, como

controle da liberação de NO pelo SNAP, e a inibição da indução da enzima TAT pelo mesmo doador de NO, mostra que a inibição da capacidade de ligação e funcionalidade do GR por NO realmente acontece em animais normais.

Uma vez mostrado em animais normais, restava saber se a interação GR/NO também existia em animais endotoxêmicos. Para isso, a estratégia farmacológica utilizada foi a inibição da produção de NO pela iNOS, através da utilização de um inibidor não específico da NOS, durante o desenvolvimento da endotoxemia. O tratamento com L-NAME confirmou a existência da interação NO/GR em diferentes órgãos durante o quadro endotóxico, pois preveniu a inibição da capacidade de ligação do GR causada pela injeção de LPS. O efeito do L-NAME sobre a capacidade de ligação do GR (como mais um possível artefato bioquímico) foi descartado pelo tratamento de animais normais com o inibidor da NOS e pela incubação de sobrenadantes de homogenato de fígado com L-NAME e sua forma dextrógira (D-NAME). Nos dois experimentos, a capacidade de ligação do GR não foi alterada pela ação direta do L-NAME.

Da mesma forma que foi feito para animais normais, a funcionalidade do GR foi avaliada em animais endotoxêmicos, para garantir que a inibição da capacidade de ligação do GR realmente acontecia. A injeção prévia do doador de NO impediu a ação da dexametasona em vários órgãos de animais endotoxêmicos. É possível observar que o efeito do SNAP sobre a ação anti-inflamatória da dexametasona (inibição da indução de iNOS, neste estudo) foi diferente nos órgãos avaliados, o que confirma que tanto a indução de iNOS

como a inibição da capacidade de ligação do GR, podem estar ocorrendo de maneira escalonada no tempo.

Interessante também é a presença deste fenômeno (inibição da ação da dexametasona por NO) na musculatura esquelética de ratos. Estes dados mostram que a indução da nNOS (uma enzima cálcio-dependente e constitutiva) parece ser um evento importante para a resposta inflamatória sistêmica. A revisão escrita por Stamler e Meissner (2001) descreve amplamente a importância fisiológica da produção de NO pela isoforma neuronal (presente no músculo esquelético em ratos e em seres humanos). Além disso, a proporção de massa deste tecido em ratos e seres humanos é bastante alta quando comparada a outros tecidos (representando cerca de 40% do peso corporal total) (Huether *et al.* 2000). Assim, é possível sugerir que a quantidade de NO produzida pela musculatura esquelética deva ser importante nos processos inflamatórios, uma vez que, aliado ao que foi exposto acima, a atividade da nNOS tanto no modelo LPS como no modelo CLP é maior quando comparada à atividade de outras NOS, avaliadas em diferentes órgãos.

O SNAP também anulou outra ação da dexametasona, qual seja seu efeito imunossupressor, avaliado através da determinação do peso do baço dos animais como medida indireta de apoptose de linfócitos. Tal efeito sugere que, ao inibir a capacidade de ligação do GR, o NO interfere não só com a resposta pró-inflamatória (indução da iNOS e produção de NOx) como também interfere em mecanismos responsáveis pela resolução da inflamação (apoptose de linfócitos).

Como descrito anteriormente, o NO é uma molécula com capacidade de reagir com vários alvos intracelulares, principalmente sulfidrilas de cisteínas (Fang, 1997). A interação entre o NO e sulfidrilas de cisteínas resulta na formação de S-nitrosotióis que, em algumas circunstâncias e através da formação de pontes dissulfeto entre duas sulfidrilas vicinais de S-nitrosotióis (Arnelle e Stamler, 1995), pode causar a mudança conformacional ou a adoção de uma conformação inativa de proteínas, que resulta no comprometimento de suas funções normais.

Apesar de não termos verificado se o número de sítios de ligação e a afinidade do GR foram alterados pelo LPS no presente estudo trabalho, podemos sugerir (com base nos resultados onde a capacidade de ligação do GR de animais sépticos foi restaurada pela incubação com DTT) que este fenômeno deve-se à regeneração de sulfidrilas críticas à conformação ótima de acoplamento ligante/receptor de glicocorticóide, anteriormente nitrosiladas pelo tratamento com LPS.

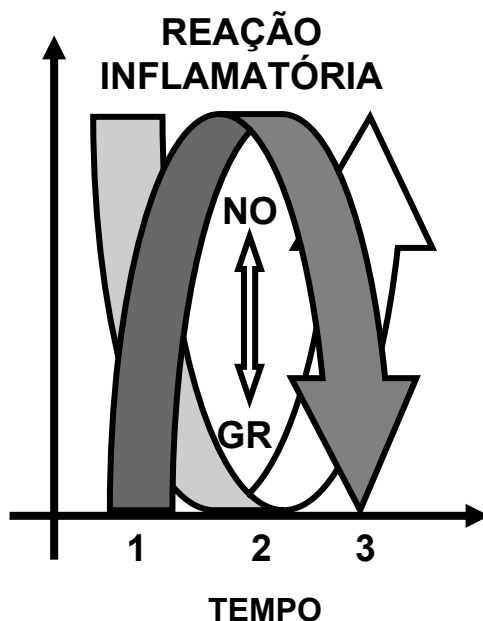
Neste estudo não abordamos também qual seria a relevância deste fenômeno (inibição de GR por NO) para o desenvolvimento da septicemia. Sabemos apenas que este fenômeno ocorre horas após o início da resposta inflamatória sistêmica. No entanto, se considerarmos que este evento esteja ocorrendo na forma de ondas, conforme nossos resultados sugerem, poderíamos imaginar o NO como mais um mediador responsável pelo controle da resposta inflamatória sistêmica, uma vez que este fenômeno se repete ao

longo do tempo. Além disso, poderíamos sugerir que a inibição do GR por NO controla tanto as ações pró-inflamatórias, como as ações anti-inflamatória vistas nos quadros de reação inflamatória sistêmica, e que estes eventos são interdependentes e devem estar ocorrendo simultaneamente. Assim, considerando que as reações pró- e anti-inflamatórias são iniciadas ao mesmo tempo, podemos sugerir que a inibição de ambas as fases (a fase pró-inflamatória inibida pela ação da resposta anti-inflamatória e a fase anti-inflamatória finalizada pela inibição do GR pelo NO da iNOS) também acontece ao mesmo tempo (ver **Esquema 1**).

Esta sugestão está de acordo com as considerações feitas por Bone (1996) a respeito da ativação de mecanismos anti-inflamatórios para o controle da resposta pró-inflamatória como um fenômeno presente na sepse, cujo objetivo é o restabelecimento da homeostasia do organismo.

Com base no que acabamos de sugerir e nas observações feitas por Bone (1996), poderíamos supor que as diferentes intervenções clínicas utilizadas para o tratamento da sepse não melhoraram de maneira expressiva a sobrevivência de pacientes sépticos, pois nenhuma delas (no esquema terapêutico em que foram utilizadas) conseguiu restaurar a homeostasia do organismo. Por exemplo, ao tentar tratar paciente sépticos com anticorpos para TNF- α , o deslocamento do equilíbrio em favor da resposta anti-inflamatória deve ter causado imunossupressão, que por sua vez pode ter facilitando o aparecimento de infecções secundárias. Este poderia ser considerado como

um dos fatores que impediu a melhora dos pacientes tratados com anticorpos para TNF- α . (Reinhart, *et al.*, 2001).



Esquema 1: Mecanismo hipotético proposto para o controle da resposta inflamatória sistêmica pelo NO através da inibição do GR. A seta cinza representa a produção de NO e a seta branca representa a capacidade de ligação do GR, ambos variando ao longo do tempo, após o início de uma reação inflamatória sistêmica. No tempo 1 a quantidade de NO produzida pelo organismo é baixa e a capacidade de ligação do GR é alta. Neste momento ocorre simultaneamente a ativação das fases pró- e anti-inflamatórias (por exemplo produção de citocinas IL-1, TNF- α e IL-10, respectivamente). No tempo 2 a quantidade de NO produzida pelo organismo é alta e a capacidade de ligação do GR é baixa. Neste momento ocorre simultaneamente a inibição das fases pró- e anti-inflamatórias (por exemplo, a produção de citocinas anti-inflamatórias controlam a resposta pró-inflamatória e o NO produzido pela enzima iNOS, causaria inibição o GR). No tempo 3 ocorre o restabelecimento da homeostasia (a quantidade de NO é baixa e a capacidade de ligação do GR alta).

Dentre as manobras terapêuticas atualmente empregadas na clínica para o tratamento da sepse, a administração de pequenas doses de glicocorticóides em pacientes sépticos (com comprovada insuficiência da adrenal), proposta por Ananne e colaboradores (para revisão ver Ananne *et al.*, 2002), é uma das terapias que causaram aumento significativo na sobrevivida

destes pacientes. A utilização de pequenas doses de glicocorticóides em pacientes com insuficiência da adrenal, ou seja, indivíduos com incapacidade de produzir glicocorticóides endógenos, pode estar contribuindo consideravelmente para a restauração da homeostasia e conseqüentemente, estabilizando o quadro de inflamação dos pacientes sépticos.

Portanto, os resultados apresentados na primeira parte desta tese sugerem que o NO participa no controle da resposta inflamatória sistêmica, horas após o estímulo inflamatório.

A participação do NO no controle da resposta inflamatória logo após o início do estímulo inflamatório foi demonstrada por Connelly e colaboradores (Connelly *et al.*, 2003). Neste trabalho os autores mostraram que macrófagos derivados da medula óssea de camundongos *knockout* para a enzima eNOS apresentam menor atividade do fator de transcrição NF-kB, expressam menos a enzima NOS induzida, e produzem quantidades menores de NO após a exposição ao LPS, quando comparados com células provenientes de animais normais. A partir destas observações, os autores sugeriram que a isoforma endotelial da enzima NOS expressa em macrófagos participaria na iniciação da resposta inflamatória.

De forma análoga ao raciocínio de Connelly *et al.*, (2003), verificamos se o NO poderia estar participando na iniciação da resposta inflamatória e conseqüentemente interferindo no desenvolvimento da reação inflamatória sistêmica nos modelos experimentais de sepse, uma vez que já havíamos

demonstrado que o NO produzido pela enzima iNOS (horas após o LPS) causava inibição da capacidade de ligação do GR.

Utilizamos um inibidor não-seletivo da NOS (L-NAME), o qual foi injetado 1 hora antes da endotoxina bacteriana, para que a liberação do NO pela enzima eNOS (em resposta ao LPS) fosse suprimida. Utilizamos também outro inibidor da NOS, a aminoguanidina (AG), considerado um inibidor mais seletivo para iNOS, para descartarmos a possibilidade de ação desta isoforma, uma vez que não existem inibidores seletivos para a isoforma endotelial. Vimos que a supressão da liberação inicial de NO pelos dois inibidores preveniu o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica no modelo de endotoxemia avaliado 8 horas após a injeção de LPS. No entanto, o que não esperávamos, e que nos despertou muito interesse, foi o fato da aminoguanidina ter causado o mesmo efeito do L-NAME.

Na revisão escrita por Alderton *et al.*, (2001), os autores argumentaram que o composto aminoguanidina não deveria ser considerado seletivo para a iNOS, uma vez que este inibidor é capaz de interagir com outras isoformas da NOS, inclusive a isoforma neuronal. Assim, considerando a alta quantidade de nNOS presente no músculo esquelético de animais normais (Stamler *et al.*, 2001; e nossos próprios resultados), e a elevada proporção deste tecido em ratos e humanos, investigamos a participação da nNOS no início da resposta inflamatória através da utilização de inibidor com seletividade preferencial para nNOS (7-nitroindazol) (Moore, P. K., *et al.*, 1993; Reiner., A. *et al.*, 1998)

Um efeito associado à liberação inicial de NO é a queda da pressão arterial, minutos após a injeção de LPS. Através do mesmo protocolo experimental utilizado para os dois outros inibidores da NOS, mostramos pela primeira vez a participação da isoforma neuronal da enzima NOS na queda transitória da pressão arterial, que ocorre durante as primeiras duas horas após a injeção de LPS. A liberação imediata de NO pela enzima nNOS foi confirmada pela quantificação de NOx no sobrenadante de homogenatos de músculo esquelético de ratos, dosados 2 horas após a injeção da endotoxina bacteriana. Estes dados são corroborados pela demonstração de que as enzimas nNOS (em maior grau) e eNOS são responsáveis pelo relaxamento vascular (via aumento da produção de GMPc) de fibras rápidas de musculatura esquelética pré-contraídas (Lau *et al.*, 2000).

O passo seguinte foi verificar se no modelo CLP o desenvolvimento da reação inflamatória sistêmica (36 horas após a cirurgia) também era afetado pela supressão da liberação de NO pela nNOS. A resposta inicial do NO sobre a queda da PAM e os níveis de NOx teciduais não puderam ser avaliados neste modelo, pois a resposta inflamatória gerada pelo CLP é de instalação mais lenta quando comparada ao modelo LPS. Esta também é a razão pela qual foi utilizada a dose de 10 mg/Kg de LPS. A dose de 5 mg/kg (apesar de alta) não causou aumento significativo nos níveis de NOx tecidual e queda expressiva na PAM (2 horas após a injeção da endotoxina), devido a baixa sensibilidade das técnicas de avaliação utilizadas. Diante do exposto, optamos por dobrar a dose dos inibidores da NOS para que mantivéssemos a mesma

relação de dose/efeito utilizada nos experimentos anteriores (no modelo de endotoxemia).

Observamos no modelo CLP que os vários parâmetros inflamatórios e cardiovasculares clássicos relacionados ao desenvolvimento da síndrome séptica foram prevenidos pelo tratamento com 7-NI. Além disso, os sinais clínicos de instalação de uma resposta inflamatória sistêmica (descritos anteriormente) também não apareceram até a trigésima sexta hora, nos animais tratados com o inibidor da nNOS.

A curva de sobrevivência dos animais sépticos tratados com os inibidores da nNOS, juntamente com a análise dos parâmetros inflamatórios e cardiovasculares de animais do mesmo grupo, sugere que a supressão da liberação de NO pela nNOS (nos instantes iniciais da resposta inflamatória), de alguma forma, suprime o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica até os dias 3/4 após a cirurgia.

No entanto, a partir deste ponto, os animais sépticos tratados com AG e 7-NI começaram a morrer em um intervalo de tempo muito pequeno, quando comparado a curva de sobrevivência de animais que foram submetidos somente a ligadura e perfuração do ceco. Além disso, notamos que os sinais clínicos como atonia muscular, tremores e diminuição da movimentação do animal apareceram a partir do terceiro dia, em intensidade maior quando comparados com os animais sobreviventes do grupo CLP.

Na busca por uma explicação razoável para o que poderia estar provocando a mortalidade tardia no quadro de sepse, e baseados nos trabalhos que se referiam à importância da produção de NO no início da resposta inflamatória (Connelly *et al.*, 2001, Connelly *et al.*, 2003, nossos próprios resultados), supusemos que a supressão do NO (liberado imediatamente após um estímulo inflamatório) por 7-NI estaria impedindo a ativação da reação inflamatória e que, conseqüentemente, as bactérias extravasadas do conteúdo intestinal pela perfuração do ceco, estariam proliferando livremente, sem a interferência de células fagocíticas. Assim, avaliamos o crescimento de bactérias do lavado peritoneal e dois parâmetros inflamatórios (MPO e NOx) nos tempos de 36 e 72 horas após o início da resposta inflamatória.

Ao contrário do que esperávamos, o crescimento de bactérias do lavado peritoneal de animais sépticos tratados com 7-NI foi menor (36 horas após o CLP) quando comparado ao grupo CLP. Entretanto, 72 horas após o CLP (momento que antecede a morte dos animais), o crescimento bacteriano do lavado peritoneal e a resposta inflamatória dos animais sépticos tratados com 7-NI estavam muito aumentadas em relação ao grupo CLP.

Lyte *et al.* (1997) mostraram que a destruição de neurônios noradrenérgicos de camundongos CF-1 pela administração de um agente tóxico e específico para esse tipo de neurônio (6-hidroxiopamina), aumenta a quantidade de bactérias no lúmen e na parede intestinal dos animais, sugerindo que a liberação de noradrenalina na circulação sanguínea (como

conseqüência da destruição dos neurônios noradrenérgicos) estimula o crescimento de bactérias dentro do sistema gastrointestinal em modelo experimental realizado *in vivo*.

Considerando o que foi sugerido acima, e que a quantidade de glicocorticóides e de catecolaminas aumentam consideravelmente, aparecendo na corrente sangüínea minutos após o início de um estímulo inflamatório (para revisão ver Cohen, 2002), poderíamos sugerir que o bloqueio da iniciação da resposta inflamatória no modelo CLP estaria impedindo o crescimento de bactérias no lavado peritonial (até 36 horas) e que o aumento da resposta inflamatória (72 horas após o CLP) poderia estar estimulando ainda mais o crescimento bacteriano. Acreditamos que esta poderia ser uma das razões pelas quais os animais que têm a produção imediata de NO pela nNOS suprimida pelo 7-NI desenvolvem um quadro tão severo, 72 horas após o estímulo inflamatório.

Assim, podemos concluir pelo conjunto de resultados apresentados na segunda parte desta tese que o NO liberado minutos após um estímulo inflamatório pela enzima nNOS participa do controle da iniciação da resposta inflamatória e que interfere no desenvolvimento dos eventos que formam o conjunto de reações da resposta inflamatória sistêmica.

Os trabalhos de Connelly e colaboradores (2001, 2003) descritos anteriormente, sugerem que o mecanismo pelo qual o NO produzido pela eNOS, estimula o desenvolvimento da resposta inflamatória (logo após um

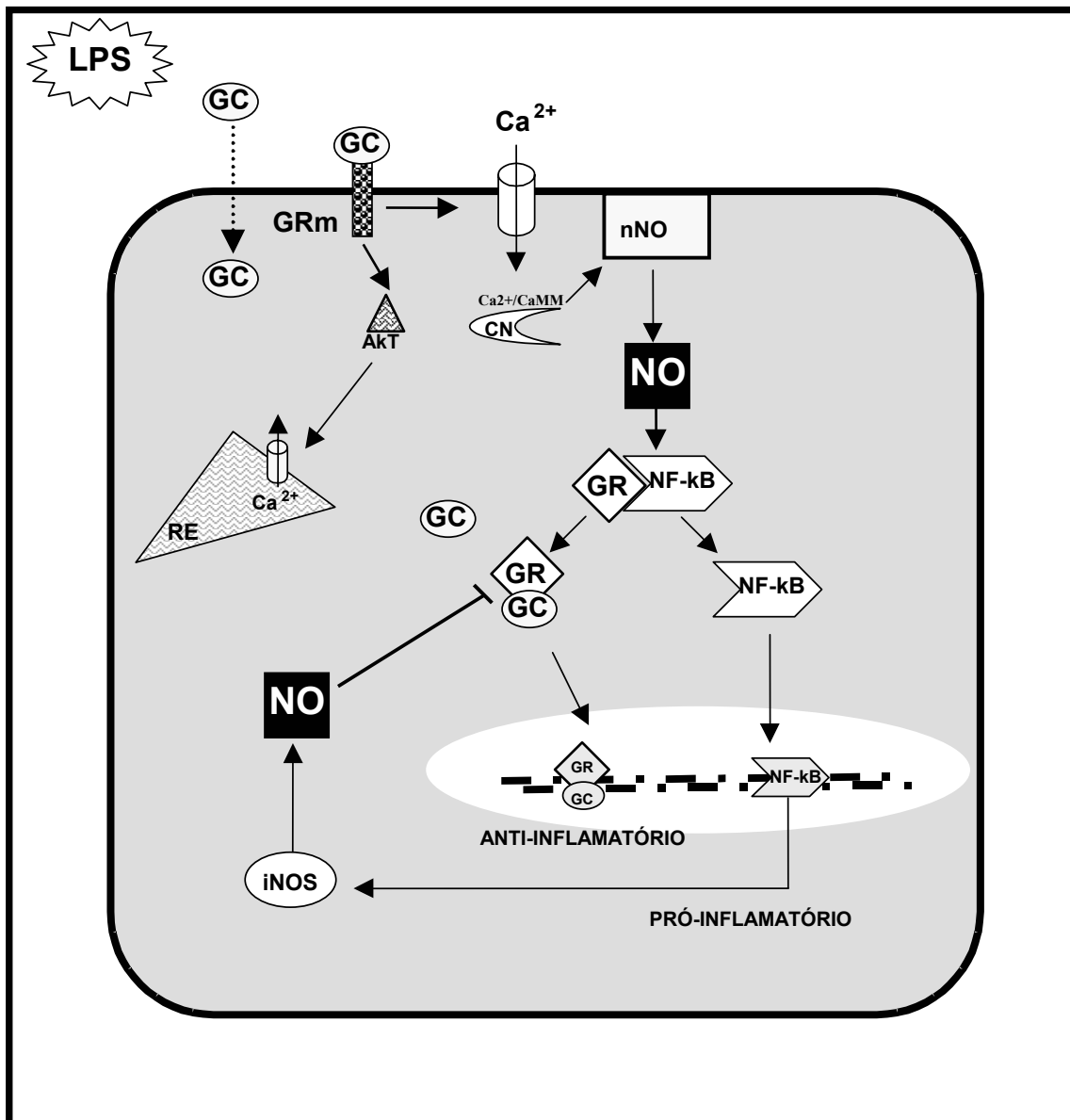
estímulo inflamatório), seja através da facilitação da degradação de I κ B- α pela interação direta do NO com esta proteína. Desta forma, a degradação da proteína inibitória do fator de transcrição kappa B, permitiria a translocação deste fator de transcrição para o núcleo dando início à transcrição de proteínas pró-inflamatórias.

Já está bem demonstrado que além do I κ B, os receptores de glicocorticóides também inibem a atividade do NF- κ B no citosol das células. Esta inibição ocorre através da interação proteína-proteína e vem sendo considerada como um antagonismo fisiológico recíproco (para revisão ver McKay & Cidlowski, 1999).

Além disso, Hafezi-Moghadam *et al.* (2002) mostraram que administração de altas doses de corticosteróides causava vasodilatação imediata em anéis de aorta de camundongos através da produção de NO pela ativação rápida, não-transcricional da enzima eNOS. No mesmo trabalho, os autores demonstraram ainda que o aumento da atividade da eNOS ocorria pela fosforilação desta enzima, decorrente da ativação das proteínas quinase Akt e 3-fosfatidilinositol, que por sua vez foram ativadas pelo efeito não-genômico dos corticosteróides.

Portanto com base no resultado que a injeção de LPS e de SNAP (em dose pequena) causou aumento da capacidade de ligação do GR e assumindo o que foi exposto acima pelos trabalhos citados, poderíamos sugerir que o NO liberado pela enzima nNOS, logo após um estímulo inflamatório (mostrado

neste estudo) estaria, de alguma forma, desestabilizando a interação GR-NF- κ B e com isso facilitando o desenvolvimento da resposta inflamatória.



Esquema 2: Mecanismo hipotético para o controle da iniciação da resposta inflamatória pelo NO. Abreviações: GC, glicocorticoide; GRm, receptor de glicocorticoide membranar; CN, calcineurina, CaM, calmodulina; nNOS, enzima óxido nítrico sintase neuronal; NO, óxido nítrico; NF- κ B, fator de transcrição kappa B; GR, receptor de glicocorticoide; iNOS, enzima óxido nítrico sintase induzida.

O Esquema 2 ilustra o possível mecanismo pelo qual o aumento da capacidade de ligação do GR por NO logo após um estímulo inflamatório

poderia estar coordenando o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica. Após um estímulo inflamatório (LPS ou CLP, por exemplo) vários eventos são desencadeados, dentre eles a liberação de vários mediadores inflamatórios como citocinas, PAF e prostaglandinas, entre outros. Simultaneamente ocorre a ativação do eixo HPA, com o conseqüente aumento na produção e liberação de glicocorticóides na corrente sanguínea. A difusão dos glicocorticóides pela membrana celular (devido à alta solubilidade) ativaria receptores de glicocorticóides membranares, levando ao aumento de cálcio intracelular. Como conseqüência disto, ocorreria a ativação da enzima calcineurina (uma fosfatase dependente de cálcio-calmodulina) e defosforilação da nNOS. Certamente este não é o único mecanismo pelo qual ocorre a ativação da nNOS. Outros eventos também devem ser responsáveis pela ativação desta enzima. O NO liberado em pequenas quantidades pela ativação das nNOS causaria a desestabilização do complexo GR-NF- κ B, ocasionando dois eventos de ocorrência simultânea: 1) ativação do NF- κ B e deslocamento deste fator de transcrição para o núcleo, levando à transcrição de proteínas pró-inflamatórias, e 2) transformação da estrutura protéica do GR para uma conformação ativa e de alta afinidade pelo ligante. O GC, continuando a se difundir pela membrana plasmática, encontrando o GR em sua forma ativa, favoreceria a formação do complexo ligante/receptor, que migraria para o núcleo e iniciaria a transcrição de proteínas anti-inflamatórias. Portanto, a ativação das respostas pró-inflamatória e anti-inflamatória ocorreriam ao mesmo tempo. Este mecanismo poderia explicar também como o NO estaria controlando a inflamação via ativação do NF- κ B, mencionada em vários trabalhos.

Os resultados apresentados na primeira parte desta tese, sugerindo que o NO produzido pela iNOS (horas após o início do estímulo inflamatório) causa inibição do GR juntamente com a sugestão feita pelo **Esquema 2** (acima descrito) permitem considerar que NO e receptor de glicocorticóide interagem em momentos distintos e críticos da resposta inflamatória (iniciação e término). Considerando que a dinâmica da resposta inflamatória ocorre na forma de ondas (conforme sugerido por Kumar *et al.*, 2004 e nossos próprios resultados) poderíamos sugerir que o controle da resposta inflamatória pelo NO, juntamente com outros mecanismos de controle, poderiam ser os responsáveis pela formação de cada onda da resposta inflamatória.

A elevada taxa de mortalidade da sepse por falência de múltiplos órgãos sugere que nestes pacientes, o organismo não foi capaz de restabelecer a homeostasia. Com base nisso, poderíamos supor que a falência de alguns órgãos e sistemas vistos nos estágios mais avançados de sepse se deve à perda do controle da resposta inflamatória (em algum momento durante o desenvolvimento da doença). Esta seria mais uma das conseqüências do “desgaste” celular gerado pela produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, reações pró-apoptóticas, necrose de tecidos pela baixa perfusão tecidual e extravasamento de proteases, que além de prejudicarem a comunicação intra e intercelular contribuem para falência de múltiplos órgãos.

A existência de “ondas” na resposta inflamatória da sepse permite considerar ainda uma nova oportunidade de tratamento desta síndrome. Cada pico inflamatório poderia ser considerado como uma janela terapêutica em

potencial. Como dito anteriormente, a grande maioria dos tratamentos utilizados na sepse pode estar favorecendo o deslocamento do equilíbrio interno para a fase pró ou anti-inflamatória, e por isso não funcionam. Assim, o uso de uma terapia combinada (por exemplo, antibióticos, anti-inflamatórios, agentes antioxidantes e vasopressores) aplicados na dose e no momento ideal, facilitaria o restabelecimento da homeostasia e conseqüentemente a recuperação do paciente. Alguns trabalhos já descrevem a existências destes picos inflamatórios em pacientes sépticos (Kumar *et al.*, 2004). No entanto, ainda é necessária a melhor caracterização destes ciclos através da identificação de biomarcadores fidedignos para a maioria dos pacientes.

A modelagem matemática das oscilações da resposta inflamatória (levando em consideração a variabilidade biológica do agente infeccioso e do hospedeiro) já está sendo feita por alguns pesquisadores (Kumar *et al.*, 2004). A conseqüente criação de *softwares* simulando a dinâmica da inflamação poderia auxiliar no tratamento da sepse e outras doenças inflamatórias, pois permitiria a antecipação da resposta do hospedeiro.

Nenhuma terapia proposta para o tratamento da sepse apresentou resultados satisfatórios, o que nos leva a crer que, por se tratar de uma resposta inflamatória complexa, o sucesso do tratamento desta síndrome, depende em muito, da melhor compreensão da resposta do hospedeiro ao agente infeccioso. O melhor entendimento da dinâmica que rege a resposta inflamatória sistêmica, certamente possibilitará intervenções clínicas e farmacológicas eficazes para o tratamento da sepse.

VI – CONCLUSÕES

Os resultados apresentados na primeira parte deste estudo sugerem que:

- o anti-inflamatório esteroideal (dexametasona) impede o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica (em animais endotoxêmicos) e aumenta a sobrevivência de animais sépticos pelo CLP somente se administrado previamente ao início do estímulo inflamatório;
- a perda da ação anti-inflamatória do corticóide se deve à diminuição da capacidade de ligação do GR após a injeção de LPS e após a ligadura e perfuração do ceco;
- o aumento da produção de óxido nítrico observado horas após o LPS e o CLP, sugere uma relação de dependência de efeito entre o aumento da produção de NO e a inibição do GR (e vice-versa) nos modelos de sepse estudados;
- o doador de NO inibe a capacidade de ligação do GR em animais normais e o inibidor da NOS previne a inibição do GR em animais endotoxêmicos;
- a inativação prévia do GR com SNAP, em animais desafiados com LPS, interfere em várias ações da dexametasona, tais como: reversão do efeito de inibição da indução de NOS e da redução dos níveis de NOx e inibição do efeito de apoptose de células linfóides;
- o óxido nítrico produzido em grandes quantidades pela enzima iNOS durante o desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica causa inibição da capacidade de ligação da dexametasona ao GR, e conseqüentemente inibição de suas ações, através da S-nitrosação de sulfidrilas críticas ao funcionamento do receptor.

Os resultados apresentados na segunda parte deste estudo sugerem que:

- a inibição da atividade da nNOS pelo 7-NI previne a hipotensão causada pelo LPS, no início da resposta inflamatória;
- a supressão desta produção precoce de NO interfere com o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica horas após o estímulo inflamatório;

- O NO produzido em uma reação inflamatória como a sepse inativa o GR conduzindo a importantes repercussões no desenvolvimento desta resposta;
- NO liberado nos primeiros momentos de uma resposta inflamatória parece ser elemento essencial para o desenvolvimento e perpetuação das mesmas, parecendo ainda haver o envolvimento de GR nesta ação (não demonstrado).

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, D. R.; Brochwicz-Lewinski, M.; Butler, A. R.. Nitric oxide: physiological roles, biosynthesis and medical uses. In: **Prog. Chem. Org. Nat. Prod.**, Eds.: Herz, W.; Falk, H.; Kirby, G. W. ; Moore, R. E. ; Tamm, C. H.. Springer-Verlag, New York, 1-186, 1999.

Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G.. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, 357: 593-615, 2001.

Angus, D. C.; Linde-Zwirble, W. T.; Lidicker, J., Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M. R.. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care sepsis [comment]. **Crit. Care Med.**, 29: 1303-1310, 2001.

Annane, D., Sebille, V., Charpentier, C., Bollaert, P. E.; Francois, B.; Korach, J. M.; Capellier, G.; Cohen, Y.; Azoulay, E.; Troche, G.; Chaumet-Riffaut, 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.

Annane, D.; Bellissant, E.; Cavaillon, J. Septic shock. **Lancet**, 365: 63-77, 2005.

Arnelle, D.; Stamler, J.S.. NO-, NO. and NO+ donation by S-nitrosothiols: Implications for regulation of physiological functions by S-nitrosothiols and acceleration of disulfide formation. **Arch. Biochem. Biophys.**, 318: 279-275, 1995.

Arriza, J. L.; Weinberger, C.; Cerelli, G.; Glaser, T. M.; Handelin, B. L.; Husman, D. E.; Evans, R. M.. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional relationship with the glucocorticoid receptor. **Science**, 237-: 268-275, 1987.

Balk, R. A.. Steroids in septic shock. Back from the death? **Chest**, 123: 490S – 499S, 2003.

Barnes, P. J.. Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. **Clin. Sci.**, 94: 557-572, 1998.

Beato, M.. Induction of transcription by steroid hormones. **Biochem. Biophys. Acta**, 910: 95-102, 1987.

Beishuizen, A; Vermes, I.; Haanen, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. **Adv. Clin. Chem.**, 33: 55-131,1999.

Benjamim, C. F.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q.. Role of nitric oxide in failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infect Dis.**, 182: 214-223, 2000.

Berry, L. J.. Bacterial toxins. **Crit. Ver. Toxicol.**, 5: 239-318, 1977.

Bolotina, V. M.; Najibe, S.; Palacino, J. J.; Pagano, J. P.; Cohen, R. A.. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368: 850-853, 1994.

Bone, C. B., Gram-negative sepsis. background, clinical features, and intervention. **Chest**, 100: 802-808, 1991.

Bone, R. C.; Balk, R. A.; Cerra, F. B.; Dellinger, R. P.; Fein, A. M.; Knauss, W. A.; Schein, R. M.; Sibbald, W. J.. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine. **Chest**, 101: 1644-1655, 1992.

Bone, R.. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. **Crit. Care Med.**, 24 (7): 1125-1128, 1996.

Borski, R. J.. Nongenomic membrane actions of glucocorticoids in vertebrates. **Trends Endocrinol. Metab.**, 11: 427-436, 2000.

Bredt, D. S.; Snyder, S. H.. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 87: 682-685, 1990.

Broillet, M.C.. S-Nitrosylation of proteins. **Cell. Mol. Life Sci.**, 55: 1036-1042, 1999.

Buttgereit, F., Scheffold, A.. Rapid glucocorticoid effects on immune cells. **Steroids**, 67: 529-534, 2002.

Caldenhoven, E.; Liden, J.; Wissink, S.; Van de Stolpe, A.; Raaijmakers, J.; Koederman, L.; Okret, S.; Gustafsson, J. A.; Van der Saag, P. T.. Negative cross-talk between RelA and the glucocorticoid receptor: a possible mechanism for antiinflammatory action of glucocorticoids. **Mol. Endocrinol.**, 9: 401-412, 1995.

Campbell D.; Stamler J. S.; Strauss H.; Redox modulation of L-type calcium channels in ferret ventricular myocytes - dual mechanism regulation by nitric oxide and S-nitrosothiols. **J. Gen. Physiol.**, 108: 277-293, 1996.

Chang, T. J.; Scher, B. M.; Waxman, S.; Scher, W.. Inhibition of mouse GATA-1 function by the glucocorticoid receptor: possible mechanism of the steroid inhibition of erythroleukemia cell differentiation. **Mol. Endocrinol.**, 7: 528-542, 1993.

Cohen, J.; Glauser, M. P.. Septic Shock: Treatment, **Lancet**, 338: 736-793, 1991.

Cohen, J.; The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, 420: 885-891, 2002.

Comtois, A. S.; Barreiro, E.; Huang, P.; Marette, A.; Perrault, M.; Hussain, S. N. A.. Lipopolysaccharide-induced diaphragmatic contractile dysfunction and sarcolemmal injury in mice lacking the neuronal nitric oxide synthase. **Am. J. Crit. Care. Med.**, 163: 977-982, 2001.

Connelly, L.; Jacobs, A. T.; Palacios-Callender, M.; Moncada, S.; Hobbs, A. J.. Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. **J. Biol. Chem.**, 278 (29): 26480-26487, 2003.

Connelly, L.; Palacios-Callender, M.; Ameixa, C.; Moncada, S.; Hobbs, A. J.. Biphasic regulation of NF- κ B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. **J. Immunol.**, 166: 3873-3881, 2001.

Cotton, F. A.; Wilkinson, G. "**Advanced Inorganic Chemistry.**" p. 331. Wiley, New York, 1989.

Cunha, F. Q.; Assreuy, J.; Moss, D. W.; Rees, D. D.; Leal, L. M. C.; Moncada, S.; Carrier, M.; O'Donnell, C. A.; Liew, F. Y.. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF- α and IL-1- β . **Immunology**, 81: 211-215, 1994.

Duma, D.; Silva-Santos, J. E.; Assreuy, J.. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats. **Crit. Care Med.**, 32: 2304 – 2310, 2004

Falkenstein, E.; Tillmann, H.; Christ, M.; Feuring, M.; Wehling, M.. Multiple actions of steroids hormones – a focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacol. Rev.**, 52: 513-555, 2000.

Fang, F. C.. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. **J. Clin. Invest.**, 99: 2818-2825, 1997

Funder, M.D. J.. Glucocorticoid and mineralocorticoid receptors: biology and clinical relevance. **Annu. Rev. Med.**, 48:231-240, 1997.

Galigniana, M. D.; Piwien-Pilipuk, G.; Assreuy, J.. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. **Mol. Pharmacol.**, 55: 317-3236, 1999.

Granger, D. L.; Hibbs, J. B. Jr.; Perfect, J. R.; Durack, D. T.. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. **J Clin Invest.**, 85: 264-273, 1990.

Greenberg, S. S.; Ouyang, J.; Zhao, X.; Giles, T. D.. Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. **Nitric Oxide**, 2: 203-212, 1998.

Guyton, A. C.; Hall, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 9.ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, pp - 871-878, 1996.

Hafezi-Moghadam, A.; Simoncini, T.; Yang, Z.; Limbourg, F. P.; Plumier, J.; Rebsamen, M.; Hsieh, C.; Chui, D.; Thomas, H. L.; Prorock, A. J.; Laubach, V. E.; Moskowitz, M. A.; French, B. A.; Ley, K.; Liao, J. K.. Acute cardiovascular effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase. **Nat. Med.**, 8: 473 – 479, 2002.

Hollenberg, S. M.; Weinberger, C.; Ong, E. S.; Cerelli, G.; Oro, A.; Lebo, R.; Thompson, E. B.; Rosenfeld, M. G.; Evans, R. M.. Primary structure and expression of functional human glucocorticoid receptor cDNA. **Nature**, 318: 635-641, 1985.

Hollenberg, S. M.; Ahrens, T. S.; Annane, D.; Astiz, M. E.; Chalfin, D. B.; Dasta, J. F.; Heard, S. O.; Martin, C.; Napolitano, L. M.; Susla, G. M.; Totaro, R.; Vincent, J. L.; Zanotti-Cavazzoni, S.. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. **Crit. Care Med.**, 32(9): 1928-1948, 2004.

Huang, Z. H.; Gao, H.; Xu, R. B.. Study on glucocorticoids receptors during intestinal ischemia shock and septic shock. **Cir. Shock**, 23: 27-36, 1987.

Huether, S. E.; McCance, K.L.. **Understanding pathophysiology**. Second Edition. St. Louis, MO, USA, 2000.

Hussain, S. N. A.; Giaid, A.; El Dawiri, Q.; Sakkal, D.; Hattori, R.; Guo, Y.. Expression of nitric oxide synthases and GTP cyclohydrolase I in the ventilatory and limb muscles during endotoxemia. **Am. J. Respi. Cell Mol. Biol.**, 17: 173-180, 1997.

Ignarro, L. J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 30: 535-560, 1990.

Imai, E.; Miner, J. N.; Mitchell, J. A.; Yamamoto, K. R.; Granner, D. K.. Glucocorticoid receptor-cAMP response element-binding protein interaction and the response of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene to glucocorticoids. **J. Biol. Chem.**, 268: 5353-5356, 1993.

Ince, C.; Sinnasappel, M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. **Crit. Care Med.**, 27: 1369-1377, 1999.

Ismaili, N.; Garabediann, M. J.. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, 1024: 86-101, 2004.

Jonat, C.; Rahmsdorf, H. J.; Park, K. K.; Cato, A. C.; Gebel, S.; Ponta, H., Herrlich, P.. Antitumor promotion and anti-inflammation: down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. **Cell**, 62: 1189-1204, 1990.

Kalami, M.; Hubbard, J. R.. Development of an exchange assay for cytosolic glucocorticoid receptors using the synergistic effects of molybdate plus dithiothreitol. **Endocrinology**, 113: 1161-1163, 1983.

Knowles, R. G.; Merrett, M.; Salter, M.; Moncada, S.. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. **Biochem. J.**, 270: 833-836, 1990.

Knowles, R. G.; Moncada, S. Nitric oxide is a signal in blood vessels, **Trends Biochem. Sci.**, 17: 399-402, 1992.

Kumar, R.; Clermont, G; Vodovotz, Y.; Chow, C. C.. The dynamics of acute inflammation. **J. Theor. Biol.**, 230: 145-155, 2003.

Kumar, R.; Thompson, E. B.. The structure of nuclear hormone receptors. **Steroids**, 64: 310-319, 1999.

Lau, K. S.; Grange, R. W.; Isotani, E.; Sarelius, I. H.; Kam, K. E.; Huang, P. L.; Stull, J. T.. nNOS and eNOS modulate cGMP formation and vascular response in contracting fast-twitch skeletal muscle. **Physiol. Genomics.**, 2: 21-27, 2000.

Levy, M.. The surviving sepsis campaign. 3rd **Lilly Critical Care - Global Medical Conference**, San Antonio, Texas, USA, 2003.

Li, F.; Xu, R. B.. Changes in canine leukocyte glucocorticoid receptors during endotoxin shock. **Circ. Shock**, 26: 99-105, 1988.

Li, Z.; Chapleau, M. W.; Bates, J. N.; Bielefeldt, K.; Lee, H. C.; Abboud, F. M.. Nitric oxide as an autocrine regulator of sodium currents in baroreceptor neurons. **Neuron**, 20: 1039-1049, 1998.

Lu, N. Z.; Cidlowski, J. A.. The origin and function of multiple human glucocorticoid receptor isoforms. **Ann N. Y. Acad. Sci.**, 1024: 102-123, 2004.

Lyte, M., Bailey, M. T.. Neuroendocrine - bacterial interactions in a neurotoxin-induced model of trauma. **J Surg Res.**, 70: 195 – 201, 1997.

Marshall, H. E.; Merchant, K.; Stamler, J. S.. Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. **FASEB J.**, 14: 1889-1900, 2000.

Martin, G. S.; Mannino, D. M.; Eaton, S.; Moss, M.. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N. Eng. J. Med.**, 348 : 1546-1554, 2003.

Mckay, L. I., Cidlowski, J. A.. Molecular control of immune/inflammatory Responses: interactions between nuclear factor- κ B and steroid receptor-signaling pathways. **Endocr Rev.**, 20 (4): 435 – 459, 1999.

Miller, W. L.; Blake Tyrrel, J.. The adrenal cortex. In: Felig, P., Baxter, J. D., Frohman, L. A. (Eds.), **Endocrinol. Metab.**, McGraw-Hill, New York, pp. 555-711, 1995.

Molijn, G. J.; Koper, J. W.; Van Uffelen, C. J.; De Jong, H.; Brinkmann, A. O; Bruining, Lamberts, S. W.. Temperature-induced down-regulation of the glucocorticoid receptor in the peripheral blood mononuclear leukocyte in patients with sepsis or septic shock, **Clin. Endocrinol.**, 43: 197-203, 1995.

Moncada, S.; Palmer, R. M.; Higgs, E. A. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43: 109-142, 1991.

Moore, P. K., Babbedge; R. C.; Wallace, P.; Gaffen, Z. A.; Hart, S. L.. 7-Nitroindazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **Br. J. Pharmacol.** 108 (2): 296-297, 1993.

Palmer, R. M. J.; Ashton, D. S., Moncada, S.. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, 333: 664-666, 1988.

Parrillo, J. E.; Parker, M. M.; Natanson, C.; Suffredini, A. F.; Danner, R. L.; Cunnion, R. E.; Ognibene, F. P.. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann. Intern. Med.** 113(3): 227-242, 1990.

Pugeaut, M.; Bonneton, A.; Perrot, D.; Rocle-Nicolas, B.; Lejeune, H.; Grenot, C.; Dechaud, H.; Brebant, C.; Motin, J.; Cuilleron, C. Y.. Decrease immunoreactivity and binding activity of corticosteroid-binding immunoglobulin in serum in septic shock. **Clin. Chem.**, 35: 1675-1679, 1989.

Rees, D. D.; Cunha, F. Q.; Assreuy, J.; Herman, A. G.; Moncada, S. Sequential induction of nitric oxide synthase by *Corynebacterium parvum* in different organs of the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 689-693, 1995.

Rees, D. D.; Cellek, S.; Palmer, R. M. J., Moncada, S.. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 173:541-547, 1990.

Rehman, K. K.; Ayesha, Q.; Khan, A .A.; Ahmed, N.; Habibullah, C. M.. Tyrosine aminotransferase and gamma-glutamyl transferase activity in human fetal hepatocyte primary cultures under proliferative conditions. **Cell Biochem. Funct.**, 22: 89-96, 2004.

Reiner, A. e Zagvazdin, Y.. On the selectivity of 7-nitroindazole as an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. **TIPS**, 19: 348-350, 1998.

Reinhart, K., Karzai, W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lesson learned. **Crit. Care Med.** 29 (7) S121-125, 2001.

Salter, M; Knowles, R. G.; Moncada, S.. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. **FEBS Lett.**, 291: 145-149, 1991.

Schüle, R.; Rangarajan, P.; Kliwer, S.; Ransone, L. J.; Bolado, J.; Yang, N.; Verma, I. M., Evans, R. M.. Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. **Cell**, 62: 1217-1226, 1990.

Sherwood, E. R.. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, 18 (3): 385-405, 2004

Simoncini, T.; Genazzani, A. R., Liao, J. K.. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. **Circulation**, 105: 1368-1373, 2002.

Smoak, K. A., Cidlowski, J. A.. Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. **Mech. Ageing Dev**, 125: 697-706, 2004.

Stamler, J. S.; Meissner, G.. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle, **Physiol. Rev.**, 81: 209-237, 2001.

Stamler, J.S.. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions with nitric oxide. **Cell**, 78: 931-936, 1994.

Stith, R. D., McCallum, R. E.. Down regulation of hepatic glucocorticoid receptors after endotoxin treatment. **Infect. Immun.**, 40 (2): 613- 621, 1983.

Suffradini, A. F.; Fromm, R. E.; Parker, M. M.; Breener, M.; Kovacs, J. A.; Wesley, R. A.; Parvilho, J. E. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. **N. Engl. J. Med.**, 321:280-287, 1989.

Titheradge, M. A.. Nitric oxide in septic shock, **Biochim. Biophys. Acta**, : 437-455, 1999.

Tsuneyoshi, I.; Kanmura, Y.; Yoshimura, N.. Nitric oxide as a mediator of reduced arterial responsiveness in septic patients. **Crit. Care Med.**, 24: 1083-1086, 1996.

United Nations. United nations Population Division. **World Population Prospects: The 2004 revision Population Database.** < [http:// www.un.org](http://www.un.org) > Acesso em: 13 maio 2005.

Weigand, M. A.. The systemic inflammatory response syndrome. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, 18 (3): 455-475, 2004.

Wheeler, A. P.; Bernard, G. R.. Treating patients with severe sepsis. **N. Eng. J. Med.**, 340: 207-214, 1999.

Wink, D. A.; Mitchell, J. B.. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Rad. Biol. Med.**, 25: 434-456, 1998.

World Health Organization. **World health Organization on Infectious Diseases.** < [http:// www.who.int/infectious-disease-report/2000/ch1.htm](http://www.who.int/infectious-disease-report/2000/ch1.htm) > Acesso em: 13 maio 2005.

Yamamoto, K. R.. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. **Ann. Rev. Genet.**, 19: 209-252, 1985.

Yang Yen, H. F.; Chambard, J. C.; Sun, Y. L.; Smeal, T.; Schmidt, T. J.; Drouin, J. Karin, M.. Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: mutual inhibition of DNA binding due direct protein-protein interaction. **Cell**, 62: 1205-1215, 1990.

Yukawa, H.; Shen, J.; Harada, N.; Cho-Tamaoka, H., Yamashita, T.. Acute effects of glucocorticoids on ATP-induced Ca^{2+} mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons. **Neuroscience**. 130: 485-496, 2005.