

PATRÍCIA DE OLIVEIRA BENEDET

**ÓXIDO NÍTRICO E ALTERAÇÕES NA REATIVIDADE
VASCULAR: ENVOLVIMENTO DE NITROSOTIÓIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis

2013

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

Benedet, Patrícia de Oliveira
Óxido nítrico e alterações na reatividade vascular:
envolvimento de nitrosotióis / Patrícia de Oliveira Benedet
; orientador, Jamil Assreuy - Florianópolis, SC, 2013.
98 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. nitrosilação. 3. sepse. 4. óxido
nítrico. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
III. Título.

Patrícia de Oliveira Benedet

**ÓXIDO NÍTRICO E ALTERAÇÕES NA REATIVIDADE
VASCULAR: ENVOLVIMENTO DE NITROSOTIÓIS**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do
Título de “Mestre em Farmacologia” e aprovada em sua forma
final pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.
Florianópolis, 14 de Fevereiro de 2013.

Prof^a. Dr^a. Thereza Christina Monteiro de Lima
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jamil Assreuy
(UFSC)

Dr. Marcelo Nicolás Muscará
(USP)

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
(UFSC)

A Deus que me inspirou a ter paciência e ânimo em todos os momentos.

A minha mãe Nadir que com todas as dificuldades físicas sempre esteve presente me apoiando. Ao meu pai Lúcio “Lucinho loirinho” exemplo de otimismo e alegria. A minha irmã Carla que oportunizou minha formação.

Aos meus amores, Ríca, Brisa e Guria pelo companheirismo incondicional

*“E aqueles que foram vistos dançando
foram julgados loucos por aqueles
que não podiam ouvir a música.”*

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me inspirado o discernimento e o bom ânimo. Aos anjos que colocou em meu caminho em forma de amigos. E pelas provas e desafios que lapidaram meu espírito.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy pelo privilégio do convívio durante estes anos. Pela oportunidade oferecida e por me proporcionar ensinamentos valiosos. Agradeço profundamente pela amizade e a confiança depositada.

Ao Professor Dr. Marcelo Nicolás Muscará, ao Professor Dr. José Eduardo da Silva-Santos e à Professora Dra. Aurea Elizabeth Linder por aceitarem participar como membros da comissão examinadora de defesa desta dissertação de Mestrado.

Ao Gustavo Ramos pela parceria, pela ajuda imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho e principalmente pelo o exemplo de genialidade.

À Silvia Dal Bó pelo incentivo e apoio científico.

Ao Edir Rezende pela paciência e destreza nos ensinamentos de PA. Pela amizade, alegria e simplicidade que me fizeram recordar da minha Bahia!

À Ana Maria Favero pelo valioso auxílio nos experimentos de CLP como também pelo apoio fornecido.

As meninas do NOLAB, Muryel Carvalho Gonçalves, Regina de Sordi, Adriane Madeira, Elisabete Regina Bóf e Karin Scheschowitsch, pela amizade e auxílios valiosos.

Ao Ronald Paiva (Querida Draga) pela ajuda indispensável no delineamento do protocolo anestésico.

A todos os professores do Curso de Pós Graduação em Farmacologia da UFSC, pelos ricos ensinamentos transmitidos durante esse período. Principalmente a Prof. Dr. Eduardo da

Silva Santos por disponibilizar equipamentos importantes para a realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia por ter cedido os anestésicos utilizados neste trabalho.

Aos meus amigos e aos colegas da pós-graduação pela troca de conhecimento e amizade. Em especial a Amanda Leitolis pelo precioso convívio e amizade incondicional. Pela parceria e auxílios profissionais e pessoais.

Ao quarteto fantástico (Natayme Tartaglia, Cintia Vila Nova Santana e Jamile Fernandes) pela amizade e compreensão da minha ausência. Sempre estiveram me incentivando e torcendo pelo meu sucesso.

A minha querida amiga-irmã Brani pelo apoio, cumplicidade e principalmente por ter me acolhido nos momentos cruciais e inúmeras vezes ter me socorrido.

À minha família pelo amor, confiança, dedicação e investimentos necessários para o meu desenvolvimento.

Ao Ricardo Boeira (Rica) pelo amor, dedicação, incentivo, companheirismo e paciência. Pelo respeito e lealdade desenvolvidos nestes anos. Obrigada amor!

Aos meus bebês, Brisa e Guria, que trouxeram o alívio e alegria

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro, importante para o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A produção excessiva de óxido nítrico (NO) durante a sepse está relacionada com a disfunção vascular caracterizada por hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores. NO reage rapidamente com resíduos de tiol (-SH) levando à formação de nitrosotióis (R-SNO). Não obstante a sua natureza reversível, a formação de R-SNO em proteínas pode resultar em efeitos duradouros para a sua função. Outra característica importante dos R-SNO é que eles podem transferir NO na presença de tióis livres (mas não com a eficácia de 100%) através da reação conhecida como transnitrosilação. Um modelo já descrito pelo nosso laboratório para estudos de S-nitrosilação e disfunção vascular consiste na infusão de doadores de NO que induzem uma redução substancial da função vasoconstritora de forma semelhante ao que ocorre no quadro da sepse. No que se refere ao mecanismo, doadores de NO transferem parte do seu conteúdo de NO para resíduos de tióis de proteínas endógenas. Considerando todas estas informações, neste trabalho investigamos a participação do NO e R-SNO sobre a hiporreatividade vascular à fenilefrina em animais infundidos com nitroprussiato de sódio (SNP) e animais sépticos. Nossos resultados mostram que animais infundidos com SNP apresentam redução substancial e persistente da resposta contrátil à fenilefrina, apesar da pressão arterial média estar dentro de valores normais. Observou-se também que a administração de L-cisteína induz a hipotensão em animais infundidos com SNP. Esta hipotensão é decorrente, pelo menos em parte, da ativação da guanilato ciclase solúvel. Adicionalmente, injeções sucessivas de L-cisteína atenuam a hiporreatividade à fenilefrina. A oxidação prévia de tióis com DTNB previne e reverte a diminuição da resposta pressórica à fenilefrina em animais infundidos com SNP. A oxidação de tióis com DTNB é revertida por DTT restituindo o estado hiporreativo resultante da infusão com SNP. Em animais sépticos, o DTNB também preveniu a hiporreatividade à fenilefrina. Levando em consideração que DTNB não atravessa a membrana plasmática, é provável que os resultados do efeito da oxidação de resíduos de tiol sejam em proteínas localizadas na face externa da

membrana. Nossos resultados mostram que a S-nitrosilação de resíduos de tiol e a formação consequente de R-SNO tem papel fundamental na função vascular, contribuindo para a hiporreatividade a vasconstritores. Por conseguinte, a interferência em R-SNO formados na sepse pode ter impacto substancial na melhora da disfunção cardiovascular desta condição.

Palavras-chave: nitrosilação, sepse, óxido nítrico.

ABSTRACT

The excessive production of nitric oxide (NO) during sepsis is related to vascular dysfunction characterized by hypotension and hyporesponsiveness to vasoconstrictors. NO reacts fast to thiol (-SH) residues leading to the formation of nitrosothiols (R-SNO). Notwithstanding its reversible nature, formation of R-SNO in proteins may cause long-lasting consequences to their function. Another important characteristic of R-SNO is that they can exchange (but not with 100% efficacy) NO when in the presence of free thiols by a reaction known as transnitrosylation. A model has been described by our laboratory for studies of vascular dysfunction similar to those that takes place in sepsis. The model consists of the infusion of NO donors leading to a substantial reduction of vasoconstrictor functionality, similarly to what occurs in the context of sepsis. As for the mechanism, we suggest that the infused NO donor will transfer to thiol residues in endogenous proteins. Considering all this information we have investigated the role of NO and R-SNO on vascular hyporeactivity to phenylephrine in rats infused with sodium nitroprusside (SNP) and in septic animals. Our results show that animals infused with SNP show a substantial and persistent reduction in the contractile response to phenylephrine, despite the blood pressure being within normal values. We also observed that administration of L-cysteine induces hypotension in animals infused with SNP. This hypotension is due, at least in part, to the activation of soluble guanylatecyclase. Successive injections of L-cysteine attenuate the hyporeactivity to phenylephrine in SNP infused rats. Previous oxidation of thiols with DTNB prevents and post-infusion reverts the hyporeactivity to phenylephrine in SNP infused animals. The relevance of the availability of reduced thiols was shown by the demonstration that reduction of DTNB oxidized thiols with DTT promptly recovered the hyporeactivity to phenylephrine caused by SNP infusion. In septic animals, DTNB also prevented the hyporeactivity to vasoconstrictors. Taking into account that DTNB does not cross the plasma membrane, it is likely that its effect results from the oxidation of thiol residues in proteins located at the external face of the membrane. Our results show that possibly S-nitrosylation of thiol residues in proteins and the consequent

formation of R-SNO have a critical role in the vascular function, contributing to the hyporeactivity to vasoconstrictors. Therefore, interference with R-SNO formed in sepsis may have a substantial impact on improving cardiovascular dysfunction in this condition.

Key-words: nitrosylation, sepsis, nitric oxide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Sinalização da contração alfa-adrenérgica e relaxamento nitrérgico.....	36
Figura 2	Bioquímica do NO.....	42
Figura 3	Formação de S-nitrosotióis.....	45
Figura 4	Registro típico da pressão arterial média de uma rata anestesiada mostrando a redução da resposta pressórica da fenilefrina após a infusão de SNP.....	52
Figura 5	Efeito da infusão de SNP na pressão arterial basal e na resposta pressórica induzida pela fenilefrina.....	63
Figura 6	Efeito da L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	64
Figura 7	Efeito da inibição da guanilato ciclase sobre o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	65
Figura 8	Efeito da inibição da enzima cistationina- γ -liase no efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	66
Figura 9	Efeito da administração repetida de L-cisteína sobre a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP.....	67

Figura 10	Efeito do DTNB, DTT e da associação DTNB + DTT sobre a hipotensão induzida pela L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	69
Figura 11	Efeito do DTNB, DTT e da associação DTNB + DTT sobre a hipotensão induzida pela fenilefrina em animais infundidos com SNP.....	71
Figura 12	Efeito do DTNB na hiporreatividade à fenilefrina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	73

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1:	Protocolo utilizado para os experimentos dos itens 3.3.6 a 3.3.9.....	57
Esquema 2:	Protocolo utilizado para os experimentos dos itens 3.3.6 e 3.3.7.....	57
Esquema 3:	Protocolo utilizado para os experimentos dos itens 3.3.10 a 3.3.11.....	58

LISTA DE ABREVIATÖES

ADP -	Difosfato de adenosina
ANOVA -	Análise de variância
ATP -	Trifosfato de adenosina
AMPc -	Monofosfato cíclico de adenosina
BKCa -	Canais de K+sensíveis ao Ca ²⁺ de alta condutância
Ca ²⁺	Íons cálcio
Ca ²⁺ ATPase -	Proteína transmembrana
CAM -	Calmodulina
CARS -	Síndrome da Resposta Inflamatória Compensatória
CLP -	Ligadura e perfuração do ceco
GMPc -	Monofosfato cíclico de guanosina
DAG -	Diacilglicerol
DTNB -	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
DTT -	Ditiotreitol
EDRF -	Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: <i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)

EPM -	Erro padrão da média
GCs -	Guanilato ciclase solúvel
GMPc -	Monofosfato cíclico de 3'-5'-guanosina
GTP -	Trifosfato de guanosina
GSNO -	S-nitrosoglutationa
IFN -	Interferon γ
IL -	Interleucina 1, 6, 8, 10, 12, 1 β
i.m. -	Intramuscular
IP ₃ -	Trifosfato de inositol
i.p. -	Intraperitoneal
i.v. -	Intravenosa
L-NAME -	N-nitro-L-arginina metil éster
LPS -	Lipopolissacarídeo bacteriano
mmHg -	milímetros de mercúrio
MLC -	Miosina de cadeia leve
NADPH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO -	Óxido nítrico

NO^- -	Ânion nitroxil
NO^+ -	Cátion nitrosônio
NO_2^- -	Íon Nitrito
NO_3^- -	Íon Nitrato
N_2O_3 -	Trióxido de dinitrogênio
NO_2 -	Dióxido de nitrogênio
NOS -	Óxido nítrico sintase
NOS-1 -	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS-2 -	Óxido nítrico sintase induzida
NOS-3 -	Óxido nítrico sintase endotelial
O_2 -	Oxigênio molecular
O_2^- -	Ânion superóxido
ONOO^- -	Ânion peroxinitrito
ONOOH -	Ácido peroxinitroso
PAG -	D,L-propargilglicina
PAM -	Pressão arterial média
PBS -	Salina tamponada com fosfato

PKA -	Proteína quinase dependente de AMPc
PKC -	Proteína quinase C
PKG -	Proteína quinase dependente de GMPc
PLA -	Fosfolipase A
PLC -	Fosfolipase C
RSNO -	S-nitrosotiól
RSH -	TioL
SNAP -	S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
SNP -	Nitroprussiato de sódio
s.c. -	Subcutâneo
TNF α -	Fator de Necrose Tumoral alfa

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	32
1.1	Sepse – Definição e epidemiologia	32
1.1.2	Fisiopatologia da sepse: sistema cardiovascular	32
1.2	Regulação do Tônus vascular	34
1.3	Óxido Nítrico: de gás poluente à mediador celular.....	37
1.3.1	Biossíntese e participação biológica do NO	38
1.3.2	Bioquímica do NO.....	40
1.3.3	Síntese de S-nitrosotióis.....	42
2.	OBJETIVOS	47
2.1	OBJETIVOS GERAIS	48
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	49
3.1	Animais	50
3.2	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	50
3.2.1	Avaliação da pressão arterial em ratos	50

3.2.2	Infusão do doador de NO	51
3.2.3	Modelo de sepse experimental: ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	51
3.3.	PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS	51
3.3.1	Caracterização temporal do efeito do nitroprussiato de sódio (SNP)	52
3.3.2	Efeito da L-cisteína em animais infundidos com SNP	52
3.3.3	Efeito inibitório da guanilato ciclase sobre o relaxamento vascular mediado pela L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	53
3.3.4	Avaliação da participação da cistationina-γ-liase sobre o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	54
3.3.5	Reversão da hiporreatividade à fenilefrina por injeções sucessivas de L-cisteína em animais infundidos com SNP	54
3.3.6	Avaliação do efeito do DTNB sobre a ação da L-cisteína em animais infundidos com SNP	54
3.3.7	Efeito do DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) sobre a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP.....	55

3.3.8	Ação do ditiotreitól (DTT) sobre a hipotensão induzida pela L-cisteína em animais infundidos com SNP	56
3.3.9	Ação do DTT sobre a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP	56
3.3.10	Efeito do DTT sobre o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP e tratados com DTNB	57
3.3.11	Efeito do DTT sobre o efeito vasoconstritor da fenilefrina em animais infundidos com SNP e tratados com DTNB..	58
3.3.12	Avaliação do efeito do DTNB sobre a resposta pressórica induzida pela fenilefrina em animais submetidos à CLP.....	59
3.4	Compostos	59
3.5	Análise estatística	59
4	RESULTADOS	61
4.1	Caracterização temporal do efeito da infusão com nitroprussiato de sódio sobre os parâmetros vasculares	62
4.2	Estudo do efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	64
4.3	Envolvimento da guanilato ciclase solúvel no efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP	64

4.4	Estudo do papel da cistationina- γ -liases obre o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP	65
4.5	Redução da hiporreatividade à fenilefrina pela administração repetida de L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	66
4.6	Estudo do efeito do DTNB, do DTT e da sua associação na hipotensão causada pela L-cisteína em animais infundidos com SNP.....	67
4.7	Estudo do efeito do DTNB, do DTT e da sua associação na hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP.....	69
4.8	Efeito do DTNB sobre a hiporreatividade vascular de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	72
5.	DISCUSSÃO	74
6.	CONCLUSÕES	83
7.	REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

1.1 Sepse – Definição e epidemiologia

A sepse é considerada uma das maiores causas de morte em pacientes internados em unidades de terapia intensiva, exibindo alta morbidade e mortalidade, apesar dos tratamentos vigentes (ANGUS et al. 2001; NDUKA e PARRILLO, 2011).

Esta síndrome clínica é resultante da resposta inflamatória sistêmica do hospedeiro associada a infecção, evoluindo nos casos desfavoráveis para o choque séptico e culminando com a disfunção de múltiplos órgãos e morte (WENZEL, 2002; RANGEL-FAUSTO et al., 2005). Embora a ativação do sistema imune durante uma invasão microbiana seja geralmente protetora, na sepse esta resposta geralmente é excessiva ou mal regulada resultando no excesso de inflamação ou imunossupressão, coagulação e fluxo sanguíneo alterado e disfunção da microcirculação conduzindo às lesões de órgãos e morte celular (COHEN, 2002; HOLLENBERG et al., 2004; NDUKA e PARRILLO, 2011).

A sepse grave e o choque séptico estão associados a taxas de mortalidade de 40 a 60% e podem ser causados por diversos microrganismos como bactérias Gram-negativas e Gram-positivas ou fungos e vírus (ANGUS et al. 2001). Nos Estados Unidos (EUA) são aproximadamente 750.000 casos de sepse por ano (ANGUS et al., 2001). A estimativa para 2020 é de mais de 1 milhão de casos de sepse por ano nos EUA (O'BRIEN et al., 2007). No Brasil estudos revelam que a cada dia, aproximadamente 57 de cada 1000 pacientes das Unidades de Terapia Intensivas desenvolvam sepse. O estudo BASES (do inglês, *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) demonstrou ainda que a sepse é a doença geradora de maiores custos aos setores públicos e privados do país (SILVA et al., 2004).

1.1.2 Fisiopatologia da sepse: sistema cardiovascular

Em resposta ao patógeno e às endotoxinas isoladas, citocinas pró-inflamatórias (como por exemplo, TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e IFN- γ) são liberadas na circulação sanguínea

levando à ativação de células como neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais. Componentes anti-inflamatórios também são liberados produzindo citocinas específicas como a IL-1-RA, IL-10 e IL-13 (LEVI et al., 2003). Aliado a isso, ocorre ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas como complemento, coagulação e sistema fibrinolítico. Admite-se que a excessiva ativação do sistema complemento estimule a destruição tecidual na sepse e a ativação do sistema de coagulação (via intrínseca e extrínseca) acarrete depósitos intravasculares de fibrina, trombose, coagulação intravascular disseminada (CID), e diminuição dos níveis de anti-trombina e proteínas C e S (ARRIETA et al., 2000).

O choque séptico é considerado um agravamento do quadro de sepse, e está presente em 25% dos casos de sepse (SANDS et al., 1997). O choque séptico está associado com uma marcante hipoperfusão e/ou disfunção orgânica e diminuição da atividade mitocondrial, resultando em prejuízo da extração de oxigênio. A produção desregulada de mediadores lipídicos como eicosanóides e fatores de ativação plaquetária, bem como radicais de oxigênio e nitrogênio, promovem um estado hiper-inflamatório conduzindo o paciente à vasodilatação profunda, aumento da permeabilidade vascular, hipotensão, choque, falência múltipla de órgãos e morte (BEISHUIZEN et al., 1999; CINEL & OPAL, 2009; NDUKA & PARRILLO, 2011). Neste estágio ocorre defeito distributivo e perda absoluta de volume para o espaço intersticial decorrente da permeabilidade microvascular aumentada (MARTIN et al., 1999). A disfunção cardiovascular é caracterizada por disfunção endotelial, débito cardíaco elevado e diminuição da resistência periférica, devido à dilatação excessiva dos vasos de resistência sistêmica que cursa com hipotensão refratária a expansão volêmica adequada e hiporreatividade a vasopressores tais como catecolaminas, vasopressina, angiotensina II e serotonina (QUEZADO et al. 1992; RANGEL-FAUSTO et al., 2005).

Estudos apontam que a hipotensão, hiporreatividade vascular e as alterações cardiovasculares que ocorrem no choque séptico podem estar relacionadas, pelo menos em parte, com a produção exacerbada de óxido nítrico (NO) (MONCADA et al., 1991; VINCENT et al., 2000; FERNANDES et al., 2009). As primeiras evidências de que o NO teria um envolvimento na sepse vieram com a observação de níveis elevados de nitrato e

nitrito em pacientes sépticos (OCHOA et al., 1991), além do aumento na expressão de NOS-2 observada em vários tipos celulares, como células endoteliais, células de Kupffer, hepatócitos, células da musculatura lisa vascular, células renais, condrócitos, miócitos e fibroblastos (MONCADA et al., 1991). Esta expressão acentuada de NOS-2 e produção excessiva de NO é responsável em parte pela hiporreatividade na sepse (SZABO et al., 1993). Adicionado a isso, alterações da fisiologia normal encontradas na sepse, como a hipotensão, é atenuada com o uso de inibidores das NOS, confirmando a relevância do NO derivado da NOS-2 no choque séptico (KILBOURN et al., 1990; WU et al., 1996). Adicionalmente, Szabo e colaboradores em 1994 observaram que o uso de inibidores da NOS-2 diminui a hipotensão e a hiporreatividade à vasoconstritor e aumenta a sobrevivência de roedores endotoxêmicos. Keaney e colaboradores (1994) observaram que animais endotoxêmicos tratados com azul de metileno, um inibidor não seletivo da guanilato ciclase solúvel, diminui a hipotensão e a hiporreatividade à vasoconstritores. Resultados prévios de nosso laboratório demonstraram que inibidores da GCs são eficazes em diminuir a hipotensão e a hiporreatividade vascular somente quando administrados nos períodos mais tardios, quando a expressão da GCs é mais elevada (FERNANDES et al., 2009). Por sua vez, os canais de potássio estão envolvidos nos efeitos do NO, nos períodos iniciais e tardios da sepse, e sua ativação excessiva contribui para o prejuízo da contratilidade vascular (DA SILVA-SANTOS et al., 2002; SORDI et al., 2010). DA SILVA-SANTOS e colaboradores (2009) observaram ainda que a produção de GMPc mediada pelo NO, inibe a via Rho-A/Rho-quinase, dificultando a fosforilação da miosina fosfatase e reduzindo a contratilidade vascular.

1.2 Regulação do Tônus vascular

A manutenção fisiológica da pressão arterial depende do balanço harmonioso entre os mecanismos vasoconstritores e vasodilatadores que regulam o tônus vascular (DHALLA et al., 2000).

Em condições fisiológicas, a contração da musculatura vascular pode ser regulada por alterações no potencial de repouso da membrana, induzindo a abertura de canais de cálcio

voltagem-dependente e influxo de cálcio extracelular da célula muscular lisa ou por ativação de receptores específicos da membrana celular através de ligantes tais como catecolaminas, angiotensina II e endotelina I (OGUT et al., 2003).

A ligação de fenilefrina à receptores α -adrenérgicos (receptor acoplado à proteína G) resulta na ativação da fosfolipase C e conseqüentemente, na formação de inositol (1,4,5) trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 se liga à receptores do retículo sarcoplasmático resultando na liberação de cálcio para o citosol. Uma vez no citoplasma celular, o cálcio se liga à calmodulina levando à mudança conformacional desta proteína e formando o complexo Ca^{2+} - calmodulina (Ca-CaM), permitindo a ligação subseqüente com a MLC quinase e a fosforilação da miosina de cadeia leve (MLC; MLC do inglês, *myosin light chain*). A fosforilação da MLC permite a interação actina-miosina, resultando assim na contração muscular (SOMLYO & SOMLYO, 2000; HILGERS & WEBB, 2005). A figura 1 demonstra as principais vias de sinalização da contração alfa-adrenérgica e relaxamento nitrérgico.

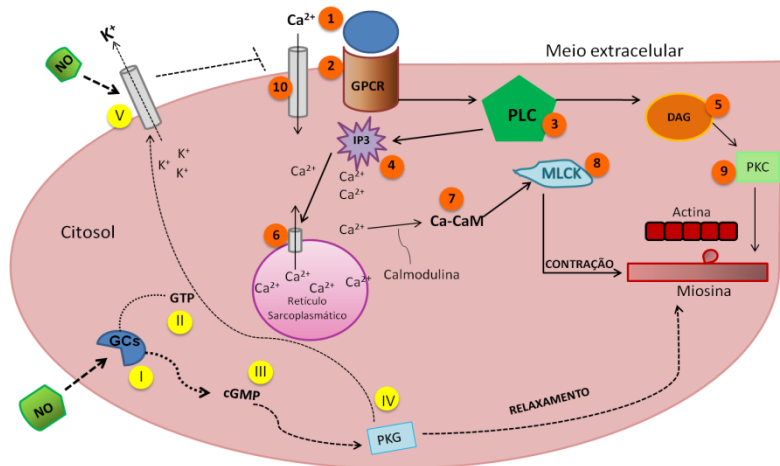


Figura 1: Sinalização da contração alfa-adrenérgica e relaxamento nitrérgico A resposta contrátil é iniciada por um rápido aumento de cálcio intracelular, seguido por interação Ca^{2+} e calmodulina e posterior fosforilação da cadeia leve da miosina pela MLCK. O relaxamento vascular mediado pelo NO pode ser via sGC e/ou canais de potássio. Setas contínuas representam vias de contração da célula muscular lisa e setas pontilhadas as vias de relaxamento. 1- ligante do receptor α -adrenérgico (ex: fenilefrina); 2 - receptor acoplado à proteína G (GPCR); 3 - fosfolipase C; 4 - inositol (1,4,5) trifosfato; 5 - diacilglicerol; 6 –canal de cálcio; 7 - complexo Ca-calmodulina; 8 - quinase de cadeia leve de miosina; 9 - proteína quinase C; 10 - canal de cálcio voltagem-dependente; I – guanilato ciclase solúvel; II - trifosfato de guanosina; III - monofosfato de guanosina cíclico; IV – proteína quinase G; V – canal de potássio.

Por outro lado, o relaxamento ocorre em consequência da diminuição do Ca^{2+} intracelular, reduzindo a fosforilação da miosina cadeia leve de miosina (MLC) pela miosina fosfatase. Diversos vasodilatadores agem sobre os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) e de guanosina 3', 5' – monofosfato cíclico (GMPC) os quais ativam respectivamente a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase G (PKG). A PKA e a PKG fosforilam e inativam a MLCK, favorecendo a perda do tônus muscular. Além dos estímulos químicos, existe ainda um importante estímulo físico, o *shear stress*, ou estresse de

cisalhamento, que corresponde à força que o fluxo sanguíneo exerce nas células endoteliais e que gera a síntese e liberação de mediadores relaxantes vasculares (MATLUNG et al., 2009). O endotélio relaxa a musculatura lisa vascular por meio de três mediadores principais: o NO (FURCHGOTT, 1983; HUTCHINSON et al., 1987; IGNARRO et al., 1987; PALMER et al., 1987), a prostaciclina (PGI₂; MONCADA et al., 1976) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF; FELETOU & VANHOUTTE, 1988).

O NO é um dos mediadores mais importantes secretados pelo endotélio e promove relaxamento do músculo liso vascular por dois mecanismos, primeiramente ativando a guanilato ciclase solúvel (GCs) e aumentando a produção de GMPc na célula que posteriormente ativará a proteína quinase G (PKG). A PKG, por sua vez, gera relaxamento por reduzir a concentração de cálcio intracelular, ou por defosforilar a cadeia leve de miosina, o que pode ocorrer por ativação de fosfatases ou pela manutenção da MLCK em uma forma fosforilada que não é passível de ativação pelo complexo cálcio-calmodulina (BEAVO E BRUNTON, 2002). As vias de relaxamento do músculo liso vascular mediado pelo NO podem ser observadas na Figura 1.

A segunda via de relaxamento causada pelo NO ocorre através da abertura de canais de potássio no músculo liso vascular. A abertura de canais de potássio reduz o potencial de membrana e hiperpolariza a célula levando ao fechamento dos canais de cálcio, resultando na redução do cálcio intracelular e na vasodilatação (Bolotina et al., 1994).

1.3 Óxido Nítrico: de gás poluente à mediador celular

O NO é uma das mais simples moléculas produzidas pela natureza por ser composta apenas por um átomo de nitrogênio e um de oxigênio. Até a década de 80, o NO era conhecido somente como um gás incolor comumente formado na atmosfera durante tempestades e membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (JAMES, 1995).

As primeiras evidências da importância biológica do NO foi a observação de concentrações elevadas de NO₃⁻ encontrado

em crianças com diarreia aguda de etiologias diversas (HEGESH e SHILOAH, 1982). Além disso, Stuehr e colaboradores (1985) demonstraram que a produção de NO_3^- e NO_2^- por macrófagos de rato *in vitro*, em resposta ao lipolissacarídeo de *Escherichia coli*, estabeleceram, de forma definitiva, uma associação entre a presença de macrófagos, a resposta imune e a síntese de NO_3^- . No mesmo período, Furchgott e Zawadzki (1980) mostraram a importância do NO na vasculatura ao demonstrar que a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, era inteiramente dependente da presença do endotélio intacto e envolvia a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, o qual chamaram de fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF do inglês, *Endothelium-derived Relaxing Factor*). Em 1987 foi demonstrado por Palmer, Ferridge e Moncada que esse fator de relaxamento derivado do endotélio era um radical livre, o óxido nítrico.

Alguns anos antes, Katsuki e Schultz mostraram ainda que o uso de nitratos orgânicos e de nitroglicerina no tratamento da *angina pectoris*, da insuficiência cardíaca congestiva, da hipertensão pulmonar e de outras complicações vasculares pela medicina chinesa, induziam um aumento dos níveis de GMPc dependente da dose e que estes compostos eram, a princípio, inativos, mas sua metabolização resultava na produção de NO sendo este, uma molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores (IGNARRO et al., 1988).

A partir deste período de descobertas a relevância do NO para o sistema biológico ficou estabelecida e, novos estudos continuam a acrescentar todos os dias novas particularidades a esta molécula simples, surpreendendo constantemente a comunidade científica.

1.3.1 Biossíntese e participação biológica do NO

O NO é sintetizado por uma família de enzimas denominadas NO sintases (NOS) a partir da oxidação do nitrogênio guanidino terminal do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO (MONCADA, et al., 1991; NAPOLI et al. 2006). Há três isoformas de NOS, as constitutivas 1 e 3 (neuronal e endotelial, respectivamente) e a induzível (2).

As NOS diferenciam-se de acordo com o padrão de expressão e níveis de produção de NO, além das respostas

mediadas nos diversos tipos celulares. As isoformas constitutivas dependem de concentrações micromolares de cálcio (0,1 a 1 μM) e de calmodulina para sua ativação. A isoforma NOS-2, diferentemente das NOS-1 e da NOS-3, requer concentração de cálcio equivalente ao nível basal intracelular (100 nM), sendo assim classificada como independente de cálcio. Uma diferença relevante entre as três isoformas estaria relacionada à atividade catalítica. As isoformas NOS-1 e NOS-3 produzem e liberam NO de maneira pulsátil em concentrações nanomolares por pouco tempo (segundos a minutos). Entretanto, a NOS-2 produz e libera NO continuamente em concentrações micromolares durante longos períodos de tempo (ALDERTON et al., 2001).

A NOS-3 está presente em diferentes tecidos, como no endotélio vascular, hipocampo cerebral, fígado, pulmão, trato gastrointestinal, órgãos reprodutores, cardiomiócitos, megacariócitos e plaquetas (RANDRIAMBOAVONJY & FLEMING, 2005). Esta isoforma participa da regulação de diversos eventos fisiológicos como o tônus vascular, a pressão arterial, a agregação plaquetária e a adesão de leucócitos (MONCADA, et al., 1991).

A NOS-1 é encontrada no sistema nervoso central e periférico, células do músculo esquelético, miocárdio e do plexo mioentérico. Esta enzima está intrinsecamente relacionada com a plasticidade sináptica, liberação de neurotransmissores, regulação de genes, neurorecaptação e desenvolvimento neuronal (DAWSON & DAWSON et al., 1998).

Estímulos como por exemplo, a exposição celular à citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IFN- γ e TNF- α), bactérias (gram-negativas e gram-positivas) e produtos bacterianos (endotoxinas) induzem a NOS-2 a sintetizar NO (VANNI et al., 2007). A NOS-2 pode ser induzida em neutrófilos, fibroblastos, endotélio vascular, células do músculo liso, epitélio tubular renal, miócitos, hepatócitos, neurônios e astrócitos, macrófagos e plaquetas. Em condições fisiológicas, a NOS-2 encontra-se também expressa constitutivamente em alguns locais, incluindo o epitélio respiratório e no útero grávido. A produção excessiva de NO pela NOS-2 está relacionada com algumas patologias, tais como a artrite reumatóide, miocardite, colite, glomerulonefrite, choque séptico e doenças neurodegenerativas (HECKER et al., 1999).

O NO produzido pelas NOS participa como mensageiro importante de vários sistemas biológicos. Além de causar importante vasodilatação e manutenção do tônus vascular, inibe a adesão plaquetária e conseqüentemente, a ativação e agregação das plaquetas. No SNC age como neuromediador em muitas funções fisiológicas, incluindo a formação de memória, modulação da nocicepção, controle do sono, termorregulação e, sua liberação excessiva está relacionada com muitas doenças degenerativas e isquemia cerebral (CALABRESE et al., 2007). O NO também é produzido durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune, pela NOS-2, em quantidades significativas, contribuindo para a citotoxicidade contra células tumorais, bactérias, vírus e outros microrganismos (IGNARRO et al., 1988; HIBBS, 1997).

1.3.2 Bioquímica do NO

De natureza inorgânica, o NO é considerado uma das menores moléculas capaz de atuar como segundo mensageiro em processos biológicos, atuando de forma independente de transportadores específicos e tampouco de canais de passagem intracelulares (IGNARRO, 1989). O NO possui um elétron não emparelhado, o que confere caráter radicalar (meia-vida de 5 a 10 s *in vitro*) (IGNARRO, 1990).

O NO apresenta variações no número de elétrons nos orbitais atômicos, determinando a existência de diferentes formas redox como NO[•] (radical monóxido de nitrogênio), o NO⁺ (cátion nitrosônio) e o NO⁻ (ânion nitroxil), com diferentes propriedades químicas e distintos alvos moleculares (STAMLER et al., 1992).

Por ser um radical livre e relativamente reativo, pode reagir com outros radicais, formando espécies tão ou mais biologicamente ativas do que a molécula original (BRUCKDORFER, 2005). Assim sendo, o NO pode reagir com outras moléculas como o oxigênio molecular (O₂) formando dióxido de nitrogênio (NO₂). Uma vez produzido, o NO₂ pode reagir com outra molécula de NO e produzir trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) ou com o próprio NO₂, gerando tetróxido de dinitrogênio (N₂O₄). Este por sua vez pode ser transferido para uma variedade de nucleófilos presentes em biomoléculas (hidroxilas, aminas ou tióis), levando à formação de nitrito, N-nitrosaminas e S-nitrosotióis, respectivamente (WINK et al.,

1993). O NO pode ainda reagir com ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) gerado pelas NADPH oxidases, formando o ânion peroxinitrito ($ONO_2^{\cdot-}$). O peroxinitrito ($ONO_2^{\cdot-}$) por sua vez, é protonado rapidamente, formando o ácido peroxinitroso ($HONO_2$). Devido a sua instabilidade, o ácido peroxinitroso se decompõe rapidamente produzindo dióxido de nitrogênio, radical hidroxila e íons nitrato. A produção de peroxinitrito, ácido peroxinitroso e seus produtos de decomposição ($\cdot OH$ e NO_2) podem ser extremamente danosas às biomoléculas, estando associadas a danos teciduais (além de crescimento, migração, proliferação celular e rearranjo de citoesqueleto), assim como responsáveis por causar modificação oxidativa em radicais sulfidrilas de moléculas protéicas e não protéicas (RADI et al., 1991). As reações do $NO\cdot$ com metais de transição são rápidas, uma vez que existe doação de densidade eletrônica da molécula para o metal e/ou vice-versa, consistindo um processo chamado de retro-doação. Esta reação forma complexos nitrosil-metálicos como ocorre na hemoglobina, mioglobina e citocromo oxidase, as quais contêm ferro no grupo heme. O NO^+ pode ainda nitrosilar substratos protéicos, levando a modificação pós-traducional de proteínas (STAMLER et al., 1992). Abaixo, a Figura 2 mostra as principais reações do NO.

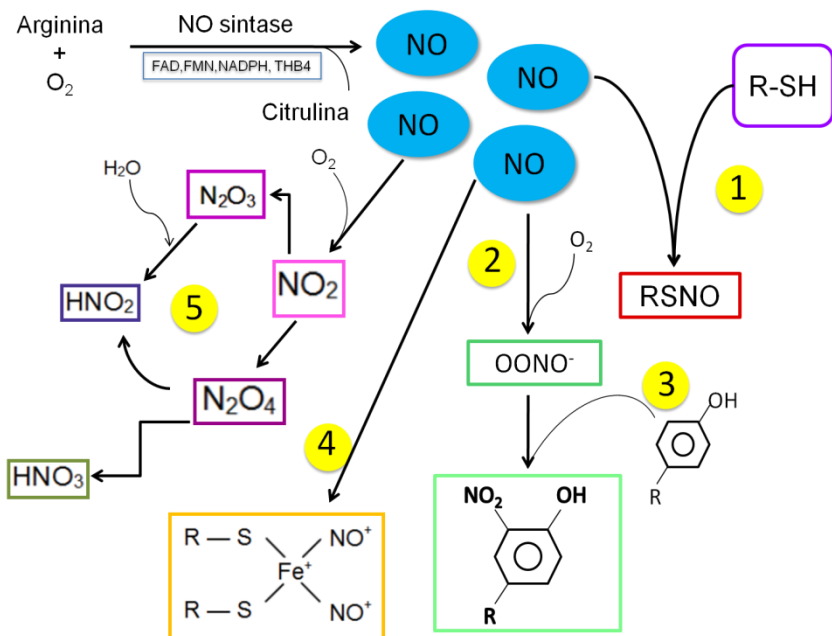


Figura 2: Bioquímica do NO. (1) Nitrosilação de tióis e formação de S-nitrosotióis. (2) Produção de peroxinitrito. (3) Nitração de grupamentos fenólicos. (4) Formação de complexos nitrosil-metálicos. (5) Reação de oxidação e formação de ácido nítrico e nitroso.

1.3.3 Síntese de S-nitrosotióis

Em células, os principais alvos de espécies reativas derivadas do NO são proteínas e resíduos de aminoácidos que contém cisteína e tirosina (STAMLER et al., 1992). Estudos mostram que o NO^+ pode nitrosilar proteínas que apresentam sulfidrilas livres ($-SH$) formando interações covalentes pós-traducionais, relativamente estáveis. Esta reação resulta em derivados contendo NO, os S-nitrosotióis ($R-SNO$) (STAMLER et al., 1992; ZANG et al., 2005).

Endogenamente, a concentração de S-nitrosotióis pode variar de nM a μM . Por serem mais estáveis, os S-nitrosotióis preservam a bioatividade e aumentam o tempo de meia-vida do NO, sendo que alguns nitrosotióis podem apresentar meia-vida

de minutos, horas ou até mesmo dias nos sistemas biológicos (STAMLER et al., 1992; JIA et al., 1998; GASTON, 1999).

A S-nitrosilação pode ser induzida exogenamente através de doadores de NO ou gerada endogenamente através do NO sintetizado pelas NOS. Além disso, para que esta reação ocorra é necessário que o NO esteja em quantidades suficientes para interagir com oxigênio molecular (O_2) formando a espécie nitrosante (N_2O_3) a qual reage em meio aquoso com R-SH formando R-SNO, os nitrosotióis (FEELISCH et al., 2002).

Embora muitos tipos celulares expressem NOS e a maioria das proteínas endógenas possuam resíduos de cisteína, a nitrosilação não ocorre em todos os tióis livres. Um exemplo típico é o canal de cálcio sensível a rianodina, presente em células musculares, que possui 50 tióis livres em sua estrutura, mas somente um destes grupamentos sofre S-nitrosilação (EU et al., 2000). Portanto, para que a reação se processe, características específicas devem existir, tais como grau de ionização do tiol (nucleofilicidade) e compartimentalização hidrofóbica.

A proximidade com resíduos de aminoácidos básicos (arginina, histidina e lisina) e aminoácidos ácidos (aspartato e glutamato) como também a coordenação e interações eletrostáticas com aminoácidos aromáticos de cadeias laterais são fatores dominantes que promovem a ionização de tióis (para revisão ver HESS et al., 2005). Além disso, Nudler e colaboradores (2000) demonstraram que ambientes de alta hidrofobicidade dentro de proteínas, promovem S-nitrosilação de resíduos de cisteína, por concentrar mais NO e oxigênio molecular de natureza lipofílica, o que permite a formação de espécies nitrosantes eficazes (N_2O_3), precisamente no local de um tiol hidrofóbico. Esta compartimentalização hidrofóbica pode surgir a partir de estrutura terciária de proteínas e/ou interações proteína-proteína (NEDOSPASOV et al., 2000).

Estudos anteriores mostram que algumas enzimas podem clivar S-nitrosotióis *in vitro*, entre elas a xantina oxidase, tioredoxina redutase, gama-glutamil transpeptidase e glutatona redutase. Há evidências que estas enzimas regulam o R-SNO também em níveis celulares. Estas enzimas contribuem para limitar a ação de S-nitrosotióis, gerenciando os recursos de NO, como também protegem a célula de uma nitrosilação

desregulada (para revisão ver GASTON et al., 2003 e BENHAR et al., 2009).

A S-nitrosilação também pode ocorrer através da transnitrosilação quando tióis de baixo peso molecular captam o NO a partir de S-nitrosoproteínas ou de outros R-SNO de baixo peso molecular, ocasionando a transferência de NO entre resíduos de cisteína. Esta transferência de um grupamento nitroso, adquirido por uma molécula após a nitrosilação, ocorre através de um ataque nucleofílico do ânion tiolato no nitrogênio do S-nitrosotiol resultando em um composto intermediário (dissulfeto de nitrosil) que decai para tiolato e nitrosotiol (ARNELLE E STAMLER, 1995). Para melhor compreensão, a Figura 3 resume as principais vias de formação de S-nitrosotióis.

A transnitrosilação é de grande importância biológica, pois além de participar de vários eventos relacionados à regulação celular, nitrosotióis de baixo peso molecular como a nitrosoglutationa podem funcionar como uma reserva de NO/nitrosotióis da qual as células lançam mão quando convém (para revisão ver GASTON et al., 2003).

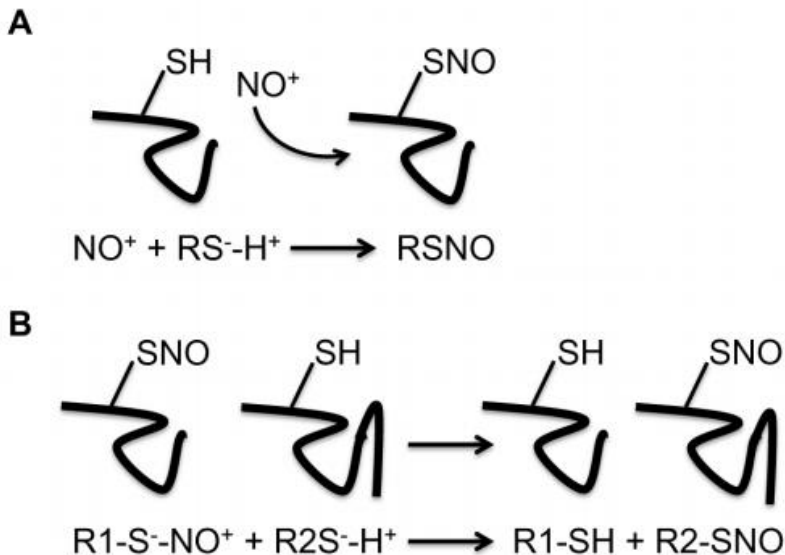


Figura 3: Formação de S-nitrosotióis. A. O cátion nitrosônio atua em sulfidrilas livres na presença de elétrons aceptores formando S-nitrosotióis. B. A nitrosilação pode ocorrer através da transnitrosilação na qual o NO de um S-nitrosotiól é transferido para outra proteína com sulfidrilas livres (adaptado de Smith e Marletta, 2012).

Além de implicar na formação de reservatórios de NO, a S-nitrosilação pode levar a modificações da função proteica. Esta modificação ainda conta com o critério da reversibilidade, o qual é essencial para muitos eventos de sinalização celular (STAMLER, 1994).

Os R-SNOs são encontrados em diferentes tipos de amostras biológicas, como tecido vascular, plaquetas, neutrófilos e macrófagos. Estudos descrevem que S-nitrosotióis participam da regulação fisiológica, como na regulação da atividade de enzimas metabólicas, oxidoredutases, proteases, proteínas quinases e fosfatases. Também participam da regulação de proteínas respiratórias, receptores de membrana, transportadores e componentes estruturais do citoesqueleto, na transcrição de fatores e de elementos regulatórios (incluindo proteína G) (STAMLER et al., 2001).

Entretanto, a formação excessiva de R-SNO, tanto local como sistemicamente, tem sido mostrada em pacientes com doenças autoimunes e inflamatórias. Foi demonstrado que a nitrosilação excessiva da hemoglobina no grupamento heme em ratos sépticos contribuiu para a hipoperfusão e hipotensão sistêmica (WESTENBERGER et al., 1990). Por sua vez, Jourdain e colaboradores (2000) mostraram que os níveis de SNO-albumina (albumina nitrosilada) triplicou em ratos endotoxêmicos. Liu e colaboradores (2004) demonstraram que tanto camundongos endotoxêmicos como sépticos e com deleção gênica para a enzima S-nitrosoglutationa redutase, apresentam maior lesão hepática e hipotensão decorrente da incapacidade em reduzir a concentração intracelular de S-nitrosotióis. Por outro lado, receptores CD40 de macrófagos inativos de murinos e monócitos humanos estariam constitutivamente nitrosilados, mas passariam para o estado desnitrosilado quando estimulados com LPS *in vitro* ou durante o quadro séptico, sendo que esta desnitrosilação do receptor levaria ao comprometimento de sua função durante a resposta inflamatória sistêmica (GODOY et al., 2010).

Baseado nestes fatos, percebemos a dificuldade em compreender a química do NO sobre os sistemas biológicos e quando extrapolamos o entendimento da sua relevância na sepse a situação torna-se mais complexa. De acordo com a literatura a S-nitrosilação de resíduos de cisteína possui reversibilidade e especificidade e alterações neste sistema podem promover disfunções fisiológicas (FOSTER et al., 2003). Desse modo nos perguntamos se a S-nitrosilação de proteínas pode estar interferindo nos mecanismos da contratilidade vascular levando a hiporreatividade à vasoconstritores. Considerando que estudar o papel da nitrosilação usando o NO endógeno poderia tornar difícil a interpretação dos resultados, optamos por gerar R-SNO a partir da infusão de um doador de NO, o nitroprussiato de sódio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a participação do NO nas alterações prolongadas da reatividade vascular à fenilefrina e verificar o envolvimento de S-nitrosotiois neste processo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Pesquisar o efeito da L-cisteína em animais infundidos com SNP;
- ✓ Estudar os mecanismos envolvidos no efeito hipotensor mediado pela L-cisteína;
- ✓ Verificar o efeito da L-cisteína sobre a diminuição da reatividade pressórica à fenilefrina em animais infundidos com SNP;
- ✓ Investigar o efeito do DTNB e DTT sobre a hipotensão promovida pela L-cisteína e a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP;
- ✓ Estudar o efeito do DNTB em animais sépticos submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP).

3. MATERIAIS 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 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. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC (CEUA/UFSC) sob o protocolo PP00631.

3.2 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.2.1 Avaliação da pressão arterial em ratos

Neste estudo, utilizamos o modelo de medida direta da pressão arterial de animais anestesiados com cetamina/xilazina (90/15 mg/kg), injetada pela via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35 e 36 °C). Em seguida, a veia femoral esquerda foi dissecada para a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50). Este acesso venoso destinou-se a administração de drogas. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina sódica, diluída em 100 µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS), segundo a formulação de Dulbecco (composta por, em mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.5 KH_2PO_4 , e 8.1 NaHPO_4 , pH 7.4), foi injetada para prevenir a formação de coágulo e a obstrução das cânulas. Para facilitar a respiração espontânea, os animais foram submetidos à traqueostomia. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com o auxílio de uma linha de sutura, o fluxo sanguíneo foi interrompido na altura da extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizou-se uma tesoura oftálmica, para realizar um pequeno corte na região medial da porção da artéria carótida clampeada, o qual serviu para a inserção de um catéter de

polietileno heparinizado, que foi firmemente amarrado à artéria e conectado a um transdutor de pressão (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, USA) interligado a um equipamento de análise de pressão arterial ADInstruments (Austrália). A reatividade vascular foi avaliada através da injeção de três doses crescentes de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg; i.v.). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minutos) foram registrados por um software de integração Chart versão 7 (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia).

3.2.2 Infusão do doador de NO

Primeiramente, foi administrado xilazina (2 mg/kg; i.p.) e após 5 minutos os animais foram anestesiados com isoflurano (5% - indução; 1% - manutenção). Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito lateral sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura 35-36 °C) e posteriormente, foi inserido um cateter de polietileno heparinizado (24 G) na veia caudal e conectado a uma bomba de infusão (Insight, Ribeirão Preto, BR) para infusão contínua de veículo (PBS, 25 µL/min) ou de doador de NO (nitroprussiato de sódio; SNP) na velocidade de 250 nmol/kg/min. A taxa de infusão foi de 25 µL/min e a duração de 30 min.

3.2.3 Modelo de sepse experimental: ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (90/15 mg/kg, i.p.), seguindo-se uma laparotomia com incisão de aproximadamente 1 cm e subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco, abaixo da válvula íleocecal. Para indução da septicemia, foi realizada uma perfuração transfixante no ceco dos animais com agulha 14G, seguida de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Após a sutura, os animais receberam 10 mL de PBS s.c. aquecida (~36 °C) para reposição fluídica e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (60 a 120 minutos; RITTIRSCH et al., 2008).

3.3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Caracterização temporal do efeito do nitroprussiato de sódio (SNP)

O protocolo utilizado para avaliação temporal do efeito do SNP sobre a reatividade vascular induzida pela fenilefrina foi similar ao descrito por Da Silva-Santos e Assreuy (1999). O grupo experimental controle recebeu infusão de PBS (25 μ L/min) enquanto outro recebeu a infusão intravenosa de SNP (250 nmol/kg/min; i.v.). A pressão arterial basal foi mensurada antes, durante, 3, 6 e 12 horas após a infusão. O registro típico mostrado na Figura 4 mostra os efeitos observados durante a infusão de SNP. A reatividade vascular foi avaliada através das respostas a doses crescentes de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg; i.v.) de forma não acumulativa, injetada após o retorno da PAM basal aos níveis normais ou 3, 6 e 12 horas após o término da infusão.

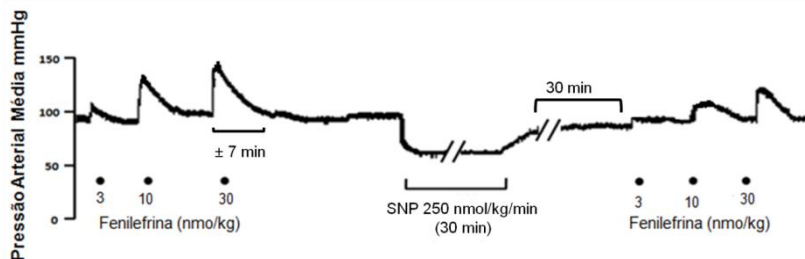


Figura 4: Registro típico da pressão arterial média de um rato anestesiado mostrando a redução da resposta pressórica à fenilefrina após a infusão de SNP. Depois de obtida a primeira curva dose-resposta para fenilefrina foi realizada a infusão de SNP por um período de 30 minutos. Após o término da infusão, um intervalo de 30 minutos foi respeitado para o retorno da PAM para os níveis basais e nova curva para fenilefrina foi obtida.

3.3.2 Efeito da L-cisteína em animais infundidos com SNP

Estudos anteriores mostram que tióis de baixo peso molecular podem retirar o NO de S-nitrosoproteínas através da transferência de NO entre resíduos de cisteína em um processo chamado transnitrosilação (ARNELLE E STAMLER, 1995).

Assim, este conjunto de experimentos visou os seguintes objetivos: i) investigar a ação da L-cisteína na mobilização de NO a partir de nitrosotíóis; ii) avaliar o relaxamento vascular mediado pela L-cisteína e iii) correlacionar o relaxamento vascular induzido pela L-cisteína com a hiporreatividade à fenilefrina produzida pelo SNP. Para isto, dois grupos experimentais foram utilizados. No primeiro, os animais foram infundidos com SNP e no segundo grupo, animais que não passaram por nenhum procedimento constituindo o grupo controle. Experimentos preliminares mostraram que não havia diferença nas respostas obtidas em animais infundidos com PBS e as de animais virgens (*naïve*). Portanto e por uma questão de facilidade, no restante dos experimentos os animais chamados de controle são animais virgens. Transcorridos seis horas após o término da infusão, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial. Foram utilizadas doses crescentes de L-cisteína (0,056; 0,56; 5,6; 56 $\mu\text{mol/kg}$; i.v.) e as respostas vasodilatadoras foram avaliadas.

3.3.3 Efeito inibitório da guanilato ciclase sobre o relaxamento vascular mediado pela L-cisteína em animais infundidos com SNP

Para investigar a participação da guanilato ciclase solúvel no efeito hipotensor induzido pela L-cisteína, seis horas após o término da infusão com SNP, os animais foram preparados para o registro direto da pressão arterial média. Respeitado o período de estabilização, foi administrada inicialmente PBS (1 ml/kg;i.v.) e trinta minutos depois, a L-cisteína (5,6 $\mu\text{mol/Kg}$; i.v.). Após um novo período de estabilização, foi administrado azul de metileno (15 $\mu\text{mol/Kg}$; i.v.) e trinta minutos após, a resposta para L-cisteína (5,6 $\mu\text{mol/Kg}$; i.v.) foi novamente avaliada. O grupo controle foi submetido a um protocolo similar, excetuando-se a infusão prévia com doador de NO.

3.3.4 Avaliação da participação da cistationina- γ -liase sobre o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP

A L-cisteína é substrato para a enzima cistationina- γ -liase (CSE) na produção endógena do gás sulfeto de hidrogênio (H_2S), que possui papel relevante no relaxamento vascular (QUAYLE,1997). Para verificarmos se o relaxamento vascular mediado pela L-cisteína seria devido à produção de H_2S , os animais foram infundidos com SNP. Cinco horas após a infusão, os animais foram tratados com D, L-propargilglicina (0,3 mmol/kg,s.c.; um inibidor seletivo da CSE) (ZHANG *et al.*, 2006). Uma hora depois, foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial. Respeitado o período de estabilização, foi administrada L-cisteína (5,6 μ mol/Kg;i.v.) e avaliado o efeito pressórico.

3.3.5 Reversão da hiporreatividade à fenilefrina por injeções sucessivas de L-cisteína em animais infundidos com SNP

Com o intuito de mobilizar e eventualmente esgotar os estoques de NO do tecido vascular, e conseqüentemente diminuir ou reverter a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP, foram feitas repetidas injeções de L-cisteína. Um grupo experimental infundido com SNP recebeu três injeções de L-cisteína (168 μ mol/kg cada uma; s.c.), a primeira administrada uma hora, a segunda três horas e a última, cinco horas após a infusão de SNP. Na sexta hora após a infusão com SNP, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial. Seguido o período de estabilização, curvas dose-resposta para fenilefrina foram obtidas.

3.3.6 Avaliação do efeito do DTNB sobre a ação da L-cisteína em animais infundidos com SNP

Para investigar a possível interferência de um agente oxidante de sulfidrilas (DTNB) sobre a hipotensão induzida pela L-cisteína, um grupo de animais foi tratado com DTNB (63

$\mu\text{mol/Kg}$; s.c.) ou veículo (bicarbonato de sódio, 5%; s.c.) trinta minutos antes do início da infusão de SNP (ver Esquema 1). Outro grupo, os animais foram tratados com DTNB ($63 \mu\text{mol/Kg}$; s.c.) e após trinta minutos foram submetidos à infusão de PBS ($25 \mu\text{L/min}$). Seis horas após o término da infusão, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial.

Em outro experimento, após seis horas do término da infusão de SNP, os animais foram preparados para o registro direto da pressão arterial. Respeitado o período de estabilização, foi administrado o DTNB ($63 \mu\text{mol/Kg}$; i.v.) ou veículo (bicarbonato de sódio, 5%; i.v.) e após quinze minutos, a L-cisteína (Esquema 2). Os animais controle receberam apenas L-cisteína ($5,6 \mu\text{mol/Kg}$; i.v.) durante a medida direta da pressão arterial.

3.3.7 Efeito do DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico) sobre a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP

Com o objetivo de verificar o efeito do agente oxidante de sulfidrilas (DTNB) na hiporreatividade à fenilefrina induzida pela infusão com SNP, foram realizados os ensaios a seguir. Um grupo experimental foi tratado com DTNB ($63 \mu\text{mol/Kg}$; s.c.) ou veículo (bicarbonato de sódio, 5%; s.c.) trinta minutos antes da infusão de SNP (ver Esquema 1). Animais controles foram tratados com DTNB ($63 \mu\text{mol/Kg}$; s.c.) e após trinta minutos submetidos à infusão de PBS ($25 \mu\text{L/min}$). Seis horas após o término da infusão, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial e curvas dose-resposta para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg ; i.v.) foram registradas.

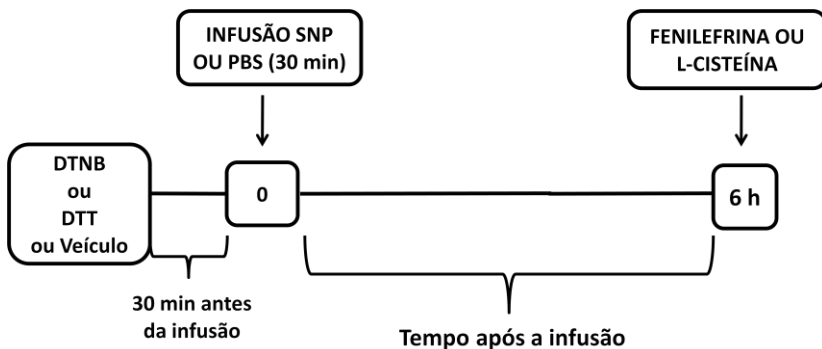
Em outro ensaio, os animais receberam inicialmente a infusão de SNP e após seis horas, foram preparados para o registro direto da pressão arterial. Respeitado o período de estabilização, foi administrado DTNB ($63 \mu\text{mol/Kg}$; i.v.) ou veículo (bicarbonato de sódio, 5%; i.v.) e seguido quinze minutos, curvas dose-resposta para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg ; i.v.) foram obtidas (Esquema 2).

3.3.8 Ação do ditiotreitol (DTT) sobre a hipotensão induzida pela L-cisteína em animais infundidos com SNP

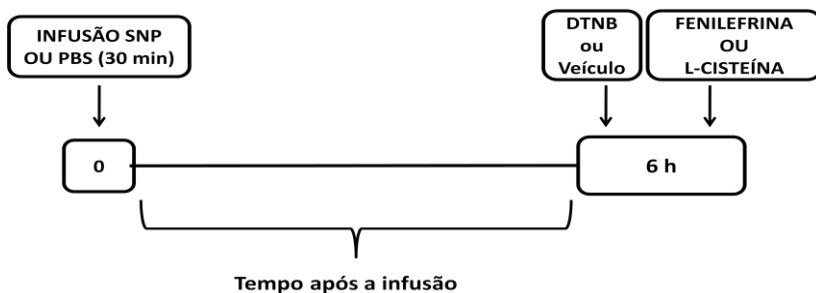
Para examinar o efeito de um agente redutor sobre a hipotensão induzida pela L-cisteína, os animais foram tratados com DTT (112 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) ou PBS (1 ml/kg; i.v.) e após trinta minutos deu-se início à infusão de SNP ou PBS (25 $\mu\text{L/min}$). Transcorrido um período de seis horas após o final da infusão do doador de óxido nítrico, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média e, em seguida, foi estudado o efeito da L-cisteína (5,6 $\mu\text{mol/kg}$; i.v.) (ver Esquema 1). Os animais controle receberam apenas L-cisteína (5,6 $\mu\text{mol/kg}$; i.v.) durante a medida direta da pressão arterial.

3.3.9 Ação do DTT sobre a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP

O próximo bloco de ensaios visou avaliar o efeito do DTT sobre a hiporreatividade à fenilefrina induzida pela infusão de SNP. Para isto, os animais foram tratados trinta minutos antes com DTT (112 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) ou PBS (1 ml/kg; s.c.) e posteriormente submetidos à infusão de SNP ou PBS. Seis horas após o término da infusão, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média (Esquema 1). Após o período de estabilização, curvas dose-resposta para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg; i.v.) foram obtidas.



Esquema 1: Protocolo utilizado para os experimentos dos itens 3.3.6 a 3.3.9



Esquema 2: Protocolo utilizado para os experimentos dos itens 3.3.6 e 3.3.7

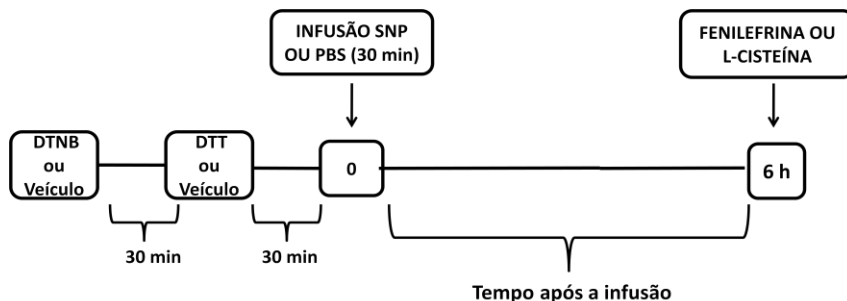
3.3.10 Efeito do DTT sobre o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP e tratados com DTNB

Animais foram tratados inicialmente com DTNB (63 $\mu\text{mol/Kg}$), e trinta minutos depois com DTT (112 $\mu\text{mol/kg}$). Trinta minutos após a injeção de DTT, os animais foram infundidos com SNP ou PBS. Decorridos seis horas do final da infusão, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média. Seguido o período de estabilização, foi

administrado L-cisteína (5,6 $\mu\text{mol/kg}$; i.v.) (ver Esquema 3). Animais controle receberam apenas L-cisteína durante a medida direta da pressão arterial.

3.3.11 Efeito do DTT sobre o efeito vasoconstritor da fenilefrina em animais infundidos com SNP e tratados com DTNB

Como objetivo de verificar a ação do DTT sobre o efeito oxidante do DTNB na alteração da resposta vasoconstritora induzida pela fenilefrina causada pela infusão com SNP, os animais foram tratados com DTNB (63 $\mu\text{mol/Kg}$; s.c.) e trinta minutos depois com DTT (112 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.). Transcorridos novamente o período de trinta minutos, iniciou-se a infusão de SNP ou PBS (25 $\mu\text{L/min}$). Seis horas após, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média. Foram então obtidas curvas dose-resposta para fenilefrina (3 10 e 30 nmol/Kg; i.v.) (Esquema 3). Animais controle foram submetidos somente a curvas dose-resposta para fenilefrina.



Esquema 3: Protocolo utilizado para os experimentos dos itens 3.3.10 a 3.3.11

3.3.12 Avaliação do efeito do DTNB sobre a resposta pressórica induzida pela fenilefrina em animais submetidos à CLP

Os animais receberam DTNB (63 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) ou veículo 30 minutos antes do procedimento cirúrgico para estabelecimento do quadro séptico e após 8 horas os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média. Foram então obtidas curvas dose-resposta para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg ; i.v.).

Em outro ensaio, os animais receberam o tratamento com DTNB 30 minutos antes e 4 horas após o CLP. Oito horas após a cirurgia, curvas dose-resposta para fenilefrina foram obtidas durante a medida direta da pressão arterial. Animais controle não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico.

3.4 Compostos

Neste estudo, foram utilizados os seguintes compostos: cloridrato de L-fenilefrina, DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico), L-cisteína, DTT (ditiotreitól), PAG (D,L-propargilglicina) (Sigma Chemical Company, USA); nitroprussiato de sódio (SNP), bicarbonato de sódio (NaHCO_3), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), fosfato de potássio (KH_2PO_4), fosfato de sódio (NaHPO_4), (Merck, Brasil); heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP); cetamina (Dopalen™; Agribrands do Brasil Ltda., Brasil), cloridrato de xilazina (Anasedan; Vetbrands do Brasil Ltda., Brasil) e isoflurano (Isoflurine; Cristália do Brasil Ltda., Brasil) foram fornecidas pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC. Todos os compostos foram diluídos para uso em PBS estéril, exceto DTNB que foi preparado em solução de bicarbonato de sódio a 5%.

3.5 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de 5 a 7 animais por grupo. A análise

estatística foi feita utilizando-se o teste de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os testes estatísticos foram feitos com o programa GraphPad Prism 5 (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização temporal do efeito da infusão com nitroprussiato de sódio sobre os parâmetros vasculares

A infusão de SNP reduziu a PAM dos animais em torno de 30%. A velocidade de infusão foi adequada para que este fosse o menor valor da PAM para evitar danos perfusionais aos órgãos (controle $92 \pm 6,5$ mmHg *versus* SNP $61 \pm 3,4$ mmHg; Figura 5A). O efeito hipotensor do SNP começou imediatamente após o início da infusão. Após a conclusão da infusão, os valores da PAM retornaram para os níveis normais em até trinta minutos e se mantiveram normais em todos os tempos avaliados (96 ± 6 mmHg; 3 horas e $87 \pm 4,3$ mmHg; 6 horas após a infusão).

Os resultados apresentados na Figura 5B corroboram com os resultados obtidos anteriormente por Silva-Santos e Assrey (1999), nos quais a infusão de SNP reduziu significativamente a resposta pressórica para a fenilefrina trinta minutos, 3 e 6 horas após a infusão. O prejuízo na resposta pressórica da fenilefrina foi, em média, na ordem de 40%. Como não houve diferenças na pressão arterial média e na reatividade vascular ao vasoconstritor entre os grupos de animais virgens (*naïve*) e o grupo infundido com PBS e, por uma questão de facilidade, nos estudos subsequentes os grupos controle foram constituídos por animais virgens.

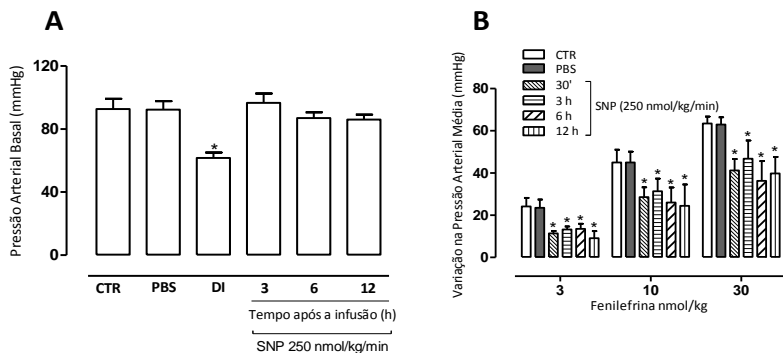


Figura 5: Efeito duradouro da infusão de SNP na pressão arterial basal e na resposta pressórica induzida pela fenilefrina. No Painel 5A mostra a pressão arterial média (PAM) de ratas anestesiadas aferida antes, durante (DI) e 3, 6 e 12 horas após o término da infusão de SNP (250 nmol/kg/min). O grupo PBS foi infundido a 25 μ L/min e o grupo controle foi constituído por animais virgens (*naïve*). O Painel 5B mostra curvas dose-resposta para a fenilefrina obtidas 30 minutos, 3, 6 e 12 horas após o término da infusão de SNP e em animais controle (*naïve*) e em animais infundidos com PBS. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 a 6 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo Controle. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *t* de Bonferroni.

4.2 Estudo do efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP

A Figura 6 mostra o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos seis horas antes com SNP. No grupo que recebeu infusão de SNP a L-cisteína produziu hipotensão, quando comparado ao grupo. A hipotensão induzida pela L-cisteína nos animais infundidos com SNP não se mostrou ser dose-dependente.

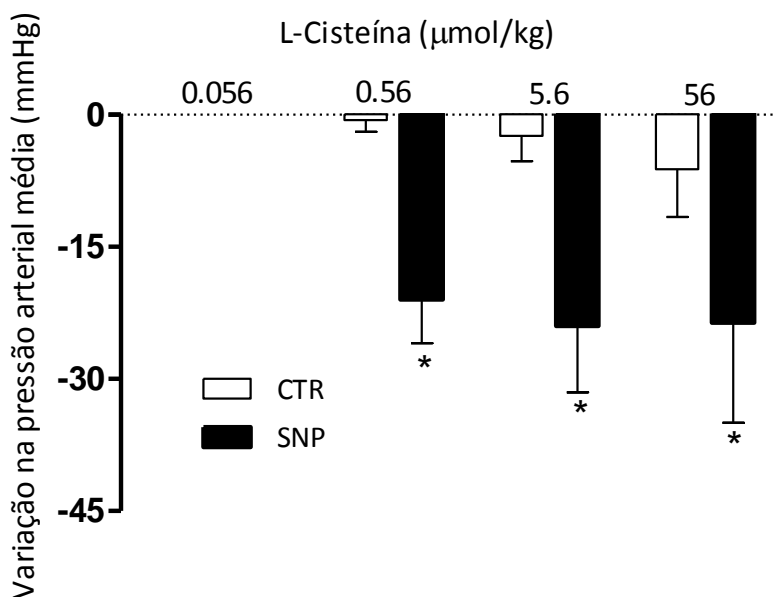


Figura 6: Efeito da L-cisteína em animais infundidos com SNP. Os animais receberam infusão de SNP (250 nmol/kg/min; i.v.; barras fechadas) e após 6 h foram preparados para o registro da pressão arterial e injetadas doses crescentes de L-cisteína. Os animais do grupo controle (barras abertas) receberam apenas doses crescentes de L-cisteína. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 a 7 animais. * $p < 0,05$, ANOVA de 1 via seguida pelo teste t de Bonferroni.

4.3 Envolvimento da guanilato ciclase solúvel no efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP

Como mostrado previamente, a L-cisteína causou hipotensão nos animais infundidos com SNP. Nesta etapa, visamos avaliar se a guanilato ciclase solúvel poderia estar mediando a dilatação vascular induzida pela L-cisteína. Conforme mostrado na Figura 7 animais infundidos com SNP e tratados com o inibidor da guanilato ciclase solúvel (azul de metileno), verificou-se uma redução substancial (cerca de 62%) no efeito hipotensor induzido pela L-cisteína.

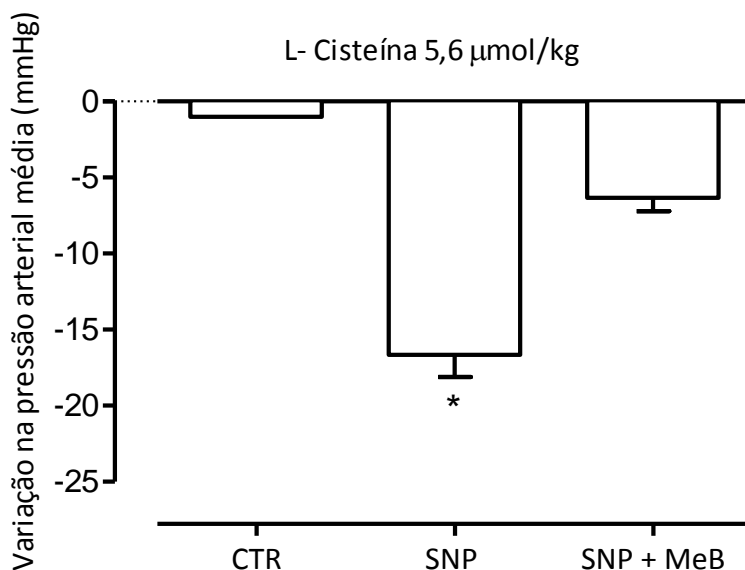


Figura 7: Efeito da inibição da guanilato ciclase sobre o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP. Os animais receberam infusão de SNP (250 nmol/kg/min; i.v.) e 6 horas após o seu término foram preparados para registro da pressão arterial. A barra CTR representa o efeito de L-cisteína (5,6 µmol/kg) em animais controle, a barra SNP o efeito da L-cisteína no grupo infundido com SNP e a barra SNP + MeB representa o grupo tratado com azul de metileno (15 µmol/kg; i.v) 30 minutos antes da administração da L-cisteína. Os resultados representam a média ± EPM de 4 a 5 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguida pelo teste *t* de Bonferroni.

4.4 Estudo do papel da cistationina-γ-liases obre o efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP

Como é mostrado na Figura 8, o tratamento com o inibidor da cistationina- γ -liase, a DL-propargilglicina (PAG), não alterou a resposta vasodilatadora induzida pela L-cisteína em animais previamente infundidos com SNP.

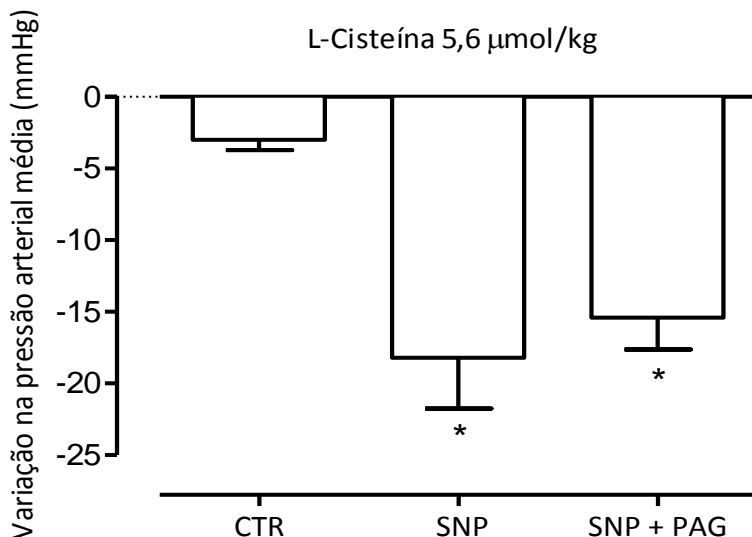


Figura 8: Efeito da inibição da enzima cistationina- γ -liase no efeito hipotensor da L-cisteína em animais infundidos com SNP. Os animais receberam infusão de SNP (250 nmol/kg/min; i.v.) e decorridas 5 horas, foram tratados com DL-propargilglicina (PAG; um inibidor seletivo da cistationina- γ -liase; 0,3 mmol/kg; s.c.). A barra CTR representa o efeito de L-cisteína (5,6 µmol/kg) em animais controle, a barra SNP o efeito da L-cisteína no grupo infundido com SNP e a barra SNP + PAG o efeito do tratamento com DL-propargilglicina (0,3 nmol/kg, i.v.) em animais infundidos com SNP. Os resultados representam a média \pm EPM de 4 a 5 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; ANOVA de uma via seguida pelo teste t de Bonferroni.

4.5 Redução da hiporreatividade à fenilefrina pela administração repetida de L-cisteína em animais infundidos com SNP

A Figura 9 mostra que a administração repetida de L-cisteína melhorou significativamente a resposta vascular

pressora para fenilefrina em torno de 37% e 31% (doses 3 e 10 nmol/kg, respectivamente) nos animais infundidos com SNP.

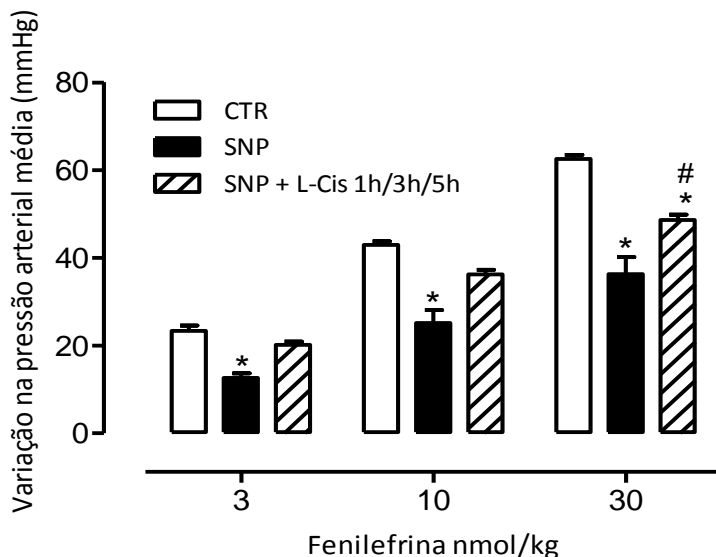


Figura 9: Efeito da administração repetida de L-cisteína sobre a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP. Após a infusão com SNP, os animais receberam L-cisteína (168 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) 1, 3 e 5 horas após o término da infusão. Na sexta hora após o término da infusão, foram feitas curvas dose-resposta para fenilefrina. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 a 6 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$ em relação ao grupo SNP; ANOVA de duas vias seguido pelo teste t de Bonferroni.

4.6 Estudo do efeito do DTNB, do DTT e da sua associação na hipotensão causada pela L-cisteína em animais infundidos com SNP

A Figura 10 mostra que o tratamento com DTNB (63 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.) 30 minutos antes do início da infusão de SNP diminuiu em torno de 74% o efeito hipotensor da L-cisteína (5,6

$\mu\text{mol /kg}$; i.v.), quando comparado ao grupo tratado apenas com veículo e exposto ao SNP. Quando alteramos o momento do tratamento com DTNB ($63 \mu\text{mol/kg}$) para 6 horas após o término da infusão, a hipotensão induzida pela L-cisteína também foi substancialmente reduzida (cerca de 75%). No entanto o pré-tratamento com DTT ($112 \mu\text{mol/Kg}$; s.c.) 30 min antes do início da infusão de SNP não reverteu o relaxamento vascular causado pela L-cisteína. Nesta mesma Figura podemos verificar que o efeito inibitório do DTNB na hipotensão causada pela L-cisteína em animais infundidos com SNP foi totalmente bloqueado pelo tratamento com DTT, mantendo o relaxamento causado pela L-cisteína.

Finalmente, a Figura 10B mostra que nem DTNB, nem DTT e nem a associação dos dois compostos afetaram a pressão arterial normal dos animais como também não modificaram a ausência de resposta à L-cisteína em animais infundidos apenas com PBS.

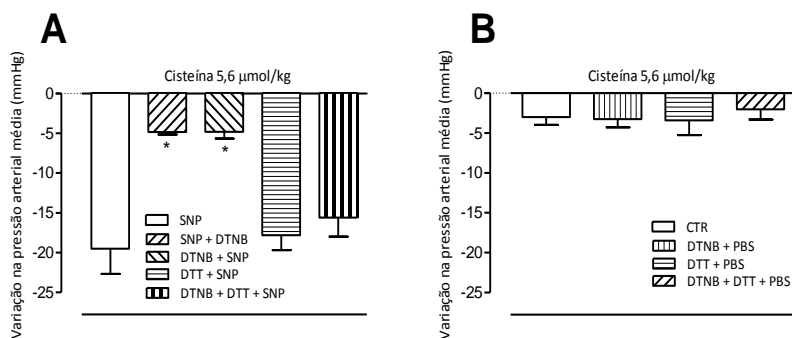


Figura 10: Efeito do DTNB, DTT e da associação DTNB + DTT sobre a hipotensão induzida pela L-cisteína em animais infundidos com SNP. No Painel A, um grupo de animais foi injetado DTNB (63 μmol/kg; s.c.), outro DTT (112 μmol/kg) e no último grupo recebeu DTNB + DTT. Todos os tratamentos foram feitos 30 min antes do início da infusão de SNP. Outro grupo (SNP + DTNB) recebeu DTNB 6 horas após o término da infusão de SNP. Seis horas após o término da infusão, todos os animais foram instrumentados e injetados com L-cisteína (5.6 μmol/kg; i.v.). No Painel B: grupos de animais receberam os mesmos compostos e mesmas doses, mas infundidos apenas com PBS, sendo que 6 horas depois, foram instrumentados e injetados L-cisteína. Os resultados representam a média ± EPM de 5 a 6 ratas por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo SNP; ANOVA de 2 vias seguido pelo teste t de Bonferroni.

4.7 Estudo do efeito do DTNB, do DTT e da sua associação na hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP

A Figura 11 mostra que o tratamento com DTNB 30 minutos antes ou 6 horas depois (Painel A) da infusão de SNP preveniu ou reverteu totalmente a perda da resposta pressórica à fenilefrina causada pela infusão de SNP. O DTT não altera a perda da resposta vascular α -adrenérgica causada pelo doador de NO. No entanto, o DTT inibiu o efeito restaurador do DTNB (Painel A). O Painel B mostra que os grupos que receberam os mesmos compostos nas mesmas doses, mas infundidos apenas com PBS mantiveram sua resposta à fenilefrina igual à dos controles. Em contrapartida, quando os animais foram tratados

com DTNB e posteriormente com DTT observamos uma diminuição na resposta pressórica à fenilefrina nas doses 10 e 30 nmol/kg (Painel B).

Finalmente, a Figura 11C mostra que nem DTNB muito menos o DTT e nem a sua associação afetaram a pressão arterial normal dos animais controle.

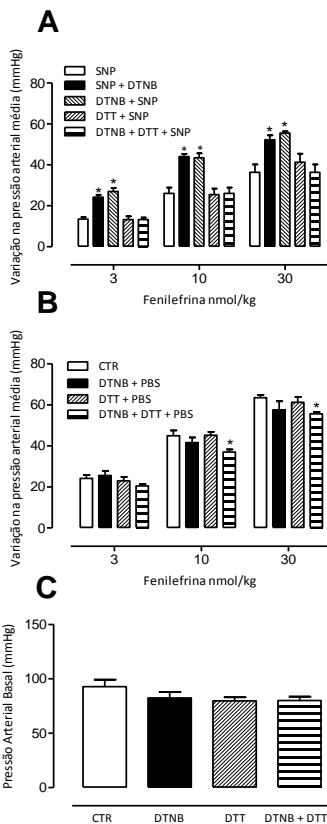


Figura 11: Efeito do DTNB, DTT e da associação DTNB + DTT sobre a hiporreatividade vascular à fenilefrina em animais infundidos com SNP. Painel A: um grupo de animais foi injetado com DTNB (63 $\mu\text{mol/kg}$; s.c.), outro com DTT (112 $\mu\text{mol/kg}$) e no último grupo recebeu DTNB + DTT. Todos os tratamentos foram feitos 30 min antes do início da infusão de SNP. Outro grupo (SNP + DTNB) recebeu DTNB 6 horas após o término da infusão de SNP. Seis horas depois do término da infusão, todos os animais foram instrumentados e injetados com doses crescentes de fenilefrina. Painel B: grupos de animais receberam os mesmos compostos nas mesmas doses, mas foram infundidos apenas com PBS. O Painel C mostra os valores da pressão arterial basal de grupos de animais infundidos com PBS e injetados com os compostos em estudo. Os resultados representam a média \pm EPM de 5 a 6 animais por grupo. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle; ANOVA de duas vias seguida pelo teste de t de Bonferroni.

4.8 Efeito do DTNB sobre a hiporreatividade vascular de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Na Figura 12 estão mostrados os resultados obtidos de experimentos conduzidos em animais sépticos. Os animais submetidos ao modelo de CLP apresentaram prejuízo acentuado na resposta vasoconstritora à fenilefrina no tempo de 8 horas após o procedimento cirúrgico, reproduzindo assim uma das características importantes do choque séptico em humanos. O tratamento com DTNB (63 $\mu\text{mol/kg}$) 30 minutos antes do procedimento cirúrgico preveniu totalmente a resposta vasoconstritora à fenilefrina na dose 3 nmol/kg e parcialmente nas doses 10 e 30 nmol/kg . Por outro lado, o tratamento com DTNB 30 minutos e 4 horas após a CLP aboliu a hiporreatividade às menores doses de fenilefrina.

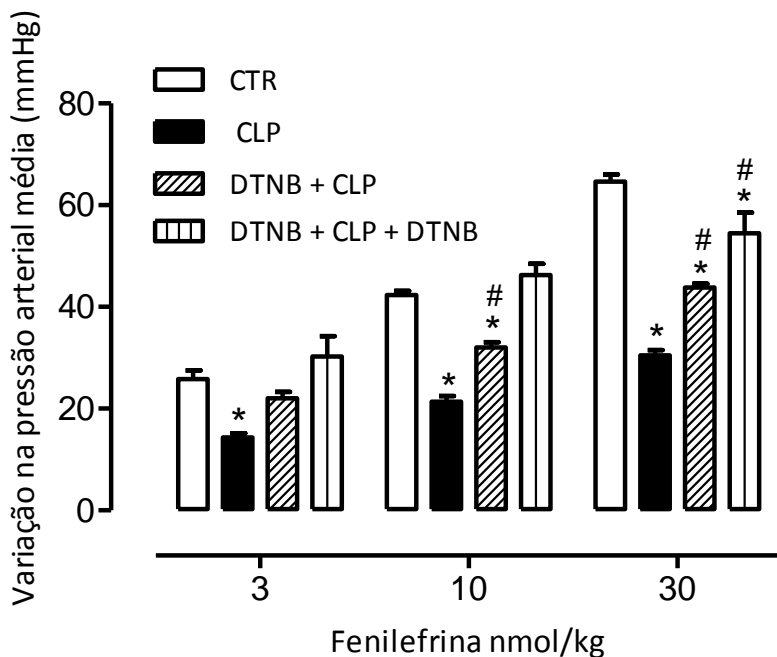


Figura 12: Efeito do DTNB na hiporreatividade à fenilefrina em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco. Os animais submetidos ao CLP receberam uma injeção de veículo ou DTNB (63 $\mu\text{mol/kg}$) 30 minutos antes do procedimento cirúrgico (grupo DTNB + CLP). O grupo DTNB + CLP + DTNB recebeu duas injeções de veículo ou DTNB 30 minutos antes e 4 horas após o CLP. Oito horas após o procedimento cirúrgico os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média. Em seguida, foi construída uma curva de fenilefrina. Os valores representam a média \pm EPM de 4 a 6 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo CTR, # $p < 0,05$, em relação ao grupo CLP (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni).

5. DISCUSSÃO

Hoje, um dos maiores desafios para a medicina e ciência contemporânea é alcançar melhorias promissoras nos altos e inaceitáveis índices de morbidade e mortalidade da sepse. Diante deste panorama crítico, o desenvolvimento de estratégias novas e mais eficazes que melhorem o estado clínico do paciente é crucialmente dependente da compreensão dos mecanismos que caracterizam esta patologia.

No estágio mais agressivo da sepse, alterações hemodinâmicas, cardiovasculares e irregularidades graves na distribuição do fluxo sanguíneo estão presentes (COHEN, 2004). Um dos mediadores que protagonizam o desenvolvimento clínico da sepse é o óxido nítrico (LIU et al., 1996; SCOTT et al., 2002). Sua produção excessiva pelo organismo induz alterações profundas no funcionamento normal da vasculatura e dos órgãos, levando a hipotensão, aumento da permeabilidade vascular (GOLDBLUM et al., 1993), hiporreatividade a vasoconstritores (FLEMING et al., 1991; SILVA-SANTOS et al., 2002), falência múltipla de órgãos e morte (ANGUS et al., 2001).

Doadores de NO podem ser utilizados como ferramenta para o estudo da atividade biológica do NO (FEELISCH, 1998; IGNARRO et al., 2002). Estudos prévios demonstraram que a hiporreatividade vascular de longa duração à vasoconstritores pode ser induzida com doadores de óxido nítrico tanto *in vitro* como *in vivo*. Kanagy e colaboradores (1996) observaram que a incubação, por 2 a 4 horas, de SNAP em aortas de ratos resultou na diminuição da resposta máxima para fenilefrina. Experimentos conduzidos em animais mostraram que a infusão prévia de SNAP e SNP reduziu o efeito pressórico à fenilefrina e angiotensina II, causando hiporreatividade persistente por até 24 horas após a infusão (SILVA-SANTOS & ASSREUY, 1999). E ainda, a incubação de doadores de NO (SNP e SNAP) durante 30 min, induziu hiporreatividade α -adrenérgica de longa duração para fenilefrina, em anéis de aorta de rato (TERLUK et al., 2000). Ghisdal e colaboradores (2000) reportaram, que a contração induzida pela noradrenalina em artérias mesentéricas de ratos é atenuada com a incubação com SNAP sendo que esta hiporreatividade está relacionada com a diminuição da síntese de IP_3 .

Em nossos estudos utilizamos o nitroprussiato de sódio (SNP) como doador de NO. O mecanismo de liberação do NO através SNP é pouco compreendido. Porém, sabe-se que sua

decomposição é espontânea quando em pH fisiológico. Em sistemas biológicos a liberação de NO do SNP pode depender ou não de ação enzimática, requerendo a presença de tecido vascular e agentes redutores. Sua decomposição é acompanhada pela liberação de cianeto, substância tóxica para as células. No entanto, como em pequenas doses o SNP é um excelente vasodilatador, as quantidades liberadas de cianeto nestas concentrações não são significativamente nocivas. Além disso, após a interrupção da infusão este subproduto é prontamente metabolizado (para revisão ver WANG et al., 2002).

Neste trabalho podemos destacar primeiramente que animais infundidos com SNP apresentaram: i) efeito hipotensor durante a infusão de SNP, o qual foi totalmente revertido cerca de 10 min após o término deste; ii), a resposta vascular a fenilefrina permaneceu diminuída após o restabelecimento da PAM aos parâmetros normais; iii) a hiporreatividade ao vasoconstritor induzido pelo SNP persistiu por 6 horas, apesar da meia vida do NO no sistema biológico ser relativamente baixa (5 a 10 segundos) (MONCADA et al., 1991). Estes resultados corroboram com estudos prévios realizados por Silva-Santos e Assreuy (1999), demonstrando que animais infundidos com SNP apresentam acentuada e persistente hiporreatividade à vasoconstritores.

Uma possível explicação para o efeito duradouro do NO sobre a vasculatura seria a formação de S-nitrosotióis através da nitrosilação de sulfidrilas de tíois protéicos. Askew e colaboradores (1995) observaram que a exposição do tecido vascular à doadores de NO poderia formar S-nitrosotióis. Esta nitrosilação estaria relacionada com a diminuição da resposta a vasoconstritores (SILVA-SANTOS et al., 1999; ALENCAR et al., 2003a e 2003b; CHOI et al., 2011). Neste sentido, investigamos se a infusão de SNP poderia ter produzido S-nitrosotióis endógenos resultando na diminuição da resposta ao vasoconstritor. Para isto, utilizamos a L-cisteína, como ferramenta para mobilizar e sequestrar o NO de S-nitrosotióis.

Estudos mostram que tíois de baixo peso molecular como a L-cisteína (WANSTALL et al ., 2001) e N-acetilcisteína (MULLER et al., 1996; MULLER et al., 1998), são capazes de deslocar o NO de S-nitrosotióis em um processo chamado transnitrosilação. De fato, ao administrarmos L-cisteína seis horas após a infusão de SNP ocorreu uma marcante hipotensão

nos animais durante o registro de pressão arterial. Estes resultados sugerem a presença de S-nitrosotióis no tecido vascular por período prolongado e que, na presença de um tiol livre (L-cisteína), ocorre a desestabilização da ligação R-SNO em proteínas e a consequente liberação do NO destes reservatórios. Como a eficiência da transnitrosilação não é completa, a parcela do NO que não se ligou eficientemente ao tiol livre ativa vias de relaxamento provocando a hipotensão (ZAMORA & FEELISCH, 1994; WANSTALL et al., 2001). Curiosamente, observamos que na sexta hora após a infusão de SNP, os animais estavam hiporreativos à fenilefrina e demonstraram resposta hipotensora mediada pela L-cisteína. Este conjunto de resultados sugere que há relação causal entre o efeito de hiporreatividade ao vasoconstritor e a hipotensão induzida pelo tiol em animais infundidos com SNP. Podemos observar ainda uma pequena hipotensão nos animais controles induzida pelo tiol livre, sugerindo talvez uma possível mobilização de NO de S-nitrosotióis constitutivos pré-formados enzimaticamente, ou ainda, por efeito inespecífico da L-cisteína.

Na sequência, o mecanismo envolvido no relaxamento vascular induzido pela L-cisteína em animais infundidos com SNP foi investigado. Um dos mecanismos pelo qual o NO induz o relaxamento da musculatura vascular lisa depende da ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs) com consequente formação de GMPc (RAPOPORT et al., 1987) e fosforilação de proteínas quinases (ROBERTSON et al., 1993). Existe evidência que a ativação da sGC é proporcional ao aumento da concentração de nitrosotióis em tecidos (LIEBERMAN et al., 1991). Deste modo, ao tratarmos os animais com o azul de metileno (um inibidor não seletivo da GCs), verificamos que a hipotensão induzida pela L-cisteína foi inibida em cerca de 62%. Portanto, o relaxamento induzido pela L-cisteína se deve em parte à ativação da GCs. Contudo, não podemos descartar a participação de outros mecanismos hipotensores, tais como a abertura de canais de K^+ neste processo. Dados anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que a hiporreatividade à fenilefrina verificada 24 horas após administração de doadores de NO em ratos está associada à ativação de canais de K^+ (SILVA-SANTOS E ASSREUY, 1999). Terluk e colaboradores (2000) verificaram a participação da guanilato ciclase solúvel e dos canais de K^+ , principalmente dos canais BKCa na hiporreatividade à fenilefrina produzida pelo NO.

Terluk e Assreuy (2005) verificaram também que o relaxamento mediado pela L-cisteína, em anéis de aorta pré-incubados com o SNAP, depende da ativação da guanilato ciclase solúvel e da abertura de canais de K⁺.

Estudos mostraram que a L-cisteína é um substrato para enzima cistationina γ liase (CSE) na síntese de sulfeto de hidrogênio, que em tecidos vasculares tem como efeito predominante o relaxamento. O mecanismo pelo qual o H₂S induz relaxamento vascular ainda não está bem compreendido, entretanto estudos sugerem que este efeito deva ser mediado pela abertura de canais de potássio ATP-dependentes (QUAYLE, 1997). Zhao e colaboradores (2001) observaram ainda que a síntese de H₂S em tecidos vasculares é potencializada pelo NO. Entretanto, a despeito da importância do H₂S na regulação do tônus vascular, nossos resultados mostraram que a CSE não está envolvida no efeito hipotensor mediado pela L-cisteína e, portanto, apenas o NO participa deste processo.

Assim sendo, de acordo com os nossos resultados podemos sugerir que S-nitrosotíóis provavelmente participam da hiporreatividade a fenilefrina e que a L-cisteína gera a liberação de NO de S-nitrosotíóis. Estes resultados corroboram dados da literatura que demonstram que a hiporreatividade vascular a vasoconstritores e o relaxamento mediado por tíóis estão relacionados com S-nitrosilação de resíduos de cisteína e mobilização de NO (ALENCAR et al., 2003a).

Estimulados por estas evidências, levantamos a possibilidade de que administrações repetidas de L-cisteína poderiam esgotar ou ao menos diminuir os estoques de R-SNO e conseqüentemente melhorar a resposta ao vasoconstritor nos animais infundidos com SNP. Esta hipótese mostrou-se correta, uma vez que a administração de várias doses de L-cisteína foi capaz de reverter, pelo menos em parte, a hiporreatividade vascular mediada pela infusão de um doador de NO. Estes resultados sugerem que a infusão de SNP leva à formação de S-nitrosotíóis no tecido vascular, além disso, a L-cisteína foi capaz de mobilizar e liberar o NO destes reservatórios, melhorando a resposta pressórica à fenilefrina. Semelhante a este resultado, Terluk e Assreuy (2005) demonstraram que a L-cisteína foi capaz de reverter a hiporreatividade vascular à fenilefrina em vasos pré-incubados com SNAP. No nosso trabalho foi primeiramente investigada a eficácia de doses menores de L-cisteína (56

$\mu\text{mol/kg}$) e a utilização de apenas uma ou duas injeções de L-cisteína (168 $\mu\text{mol/kg}$). Entretanto, não houve melhora significativa na resposta α -adrenérgica dos animais infundidos com SNP (dados não mostrados). Mesmo que nossos resultados apontem para uma possível participação de S-nitrosotióis na hiporreatividade vascular, métodos mais apurados para detectar e quantificar estes reservatórios deverão ser utilizados para uma demonstração inequívoca do papel da nitrosilação na hiporreatividade vascular.

Estudos mostram que S-nitrosotióis podem sofrer decomposição não-enzimática com consequente liberação de NO. Exposição ao calor, luz, agentes redutores e oxidantes, bem como alterações no pH são fatores que pré-dispõe à liberação de NO por decomposição de S-nitrosotióis (EU et al., 2000; STAMLER & TOONE, 2002). Assim, a simples alteração no ambiente redox pode levar à desnitrilação de proteínas. Estudos apontam que o estado redox de grupamentos sulfidrilas de resíduos de cisteína é um importante mecanismo de controle da atividade de canais iônicos (LIU E GUTTERMAN, 2002), sendo passíveis de modulação através do uso de agentes oxidantes e redutores de sulfidrilas. Foi observado em cultura de neurônios hipocámpais, que o uso de DTNB, um agente oxidante de sulfidrilas, induz o aumento de Ca^{2+} intracelular (LONG et al., 2009). Cai & Sauve (1997) mostram que o DTNB reduz a atividade dos canais de K^+ sensíveis ao Ca^{2+} , o qual é parcialmente revertido com DTT e GSH, agentes redutores de sulfidrilas.

De acordo com a literatura o DTNB é um agente oxidante de grupamentos sulfidrilas que não atravessa membranas celulares e ao reagir com tíois livres forma dissulfeto e um composto amarelo (5-tio-2-nitrobenzóico ou TNB) (ELLMAN, 1959; ZOCCARATO et al., 1999). O DTT é um agente redutor de tíois que, como o DTNB, não permeia as membranas celulares (LAL et al., 1996). Deste modo, investigamos a ação do agente oxidante, o DTNB, sobre a hipotensão induzida pela L-cisteína em animais infundidos com SNP. Nossos resultados mostraram que o DTNB, além de prevenir o efeito hipotensor induzido pela L-cisteína, também inibiu sua ação. E mais, ao observamos a ação do DTNB sobre a resposta α -adrenérgica dos animais infundidos com SNP, constatamos que a hiporreatividade vascular não foi apenas prevenida, como também revertida.

Estes resultados corroboram com dados de Terluk e Assrey (2005) que demonstraram que o DTNB previne e reverte a hiporreatividade à fenilefrina induzida pelo SNAP tanto *in vitro* como *in vivo*. É importante ressaltar que, cerca de 15 minutos após o tratamento com DNTB foi verificada uma alteração na coloração da urina dos animais para um amarelo mais intenso. Esta coloração da urina indica possivelmente a presença do ânion tiolato (TNB), metabólito resultante da reação de redução do DTNB com tióis (dados não mostrados).

Em contrapartida o DTT não alterou a resposta hipotensora à L-cisteína, nem a hiporreatividade vascular à fenilefrina em animais infundidos com SNP, apesar de estudos apontarem que o DTT desestabiliza S-nitrosotióis (GOW et al., 2002). Nossos resultados demonstram que o DTT reverteu o efeito do DTNB em bloquear o relaxamento vascular induzido pela L-cisteína, como também inibiu a prevenção da efetividade do vasoconstritor. Podemos inferir portanto, que o NO nitrosilou sulfidrilas livres da face externa da membrana celular importantes para a sinalização α -adrenérgica interferindo assim no mecanismo contrátil celular e a alteração redox de grupamentos sulfidrilas preveni e reverte a hiporreatividade ao vasoconstritor. Devemos ressaltar que tanto o DTNB como o DTT não alteram a PAM como também não a resposta pressórica α -adrenérgica dos animais controles, indicando que estes compostos não interferem na regulação da pressão arterial e nem na ligação da fenilefrina ao receptor α -adrenérgico. Em compensação, ao utilizarmos os dois agentes quase simultaneamente em animais infundidos apenas com PBS, observamos uma alteração na resposta ao vasoconstritor, mas não na PAM.

Em síntese nossos resultados sugerem que: i) a ação oxidante do DTNB em grupamento sulfidrilas inibe e reverte o efeito hipotensor induzido pela L-cisteína em animais infundidos com SNP; ii) a modulação redox de grupamentos sulfidrilas previne e reverte a formação de S-nitrosotióis; iii) devido ao fato do DTNB não atravessar membranas celulares, o NO liberado do SNP provavelmente nitrosilou grupamentos sulfidrilas de proteínas da face externa da membrana celular, importantes para o mecanismo contrátil; iv) o DTNB não altera o tônus vascular como também não altera a resposta contrátil para a fenilefrina de animais controles.

Finalmente, nos perguntamos se o DTNB poderia alterar a resposta vasoconstritora à fenilefrina prejudicada em um modelo experimental de sepse, no caso o CLP. Dados do nosso laboratório mostraram que o DTNB melhorou a reatividade vascular à fenilefrina em vasos de animais tratados com LPS e diminuiu em 50% a mortalidade de animais tratados com *Escherichia coli* (TERLUK E ASSREUY, 2005).

Considera-se que a sepse induzida por CLP, utilizado neste trabalho, configura o modelo que mais se aproxima das características observadas na sepse humana. Esta técnica envolve laparotomia e perfuração do ceco, gerando extravasamento do conteúdo cecal no peritônio com consequente infecção polimicrobiana (BURAS et al., 2005). No modelo de CLP ocorrem profundas alterações hemodinâmicas, tais como, a hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores. Estes efeitos são acompanhados de altos níveis plasmáticos de metabólitos de NO, expressão de NOS-2 e aumento da expressão de GCs (KADOI & GOTO, 2004; FERNANDES et al., 2009; SORDI et al., 2010).

Nosso trabalho demonstra que animais submetidos ao CLP apresentaram hiporreatividade à fenilefrina 8 horas após o procedimento cirúrgico, reproduzindo esta característica marcante do choque séptico humano. Nestes experimentos, tratamos os animais com DTNB 30 minutos antes do CLP. Embora tenha ocorrido melhora parcial na resposta pressórica à fenilefrina nestes animais, surpreendentemente, quando tratamos os animais com DTNB 30 minutos antes e 4 horas após o CLP a resposta vasoconstritora à fenilefrina foi ainda melhor. Estes achados sugerem que a excessiva produção de NO durante o choque séptico em animais submetidos ao CLP pode nitrosilar proteínas extracelulares essenciais para a resposta alfa-adrenérgica. Além disso, o DTNB interfere no estado redox de grupamento sulfidrilas, impedindo e desestabilizando a formação de S-nitrosotióis. A literatura aponta que S-nitrosilação é um dos aspectos determinantes da sepse. Estudos mostram que a expressão aumentada de NOS-2 coincide com o aumento de proteínas nitrosiladas (EU et al., 2000; MARSHALL AND STAMLER, 2002; FOSTER et al., 2003). Ratos endotoxêmicos e pacientes sépticos apresentam altos níveis de S-nitrosohemoglobina (JOURD'HEUIL et al., 2000). LIU e colaboradores (2004) demonstraram que S-nitrosotióis

contribuem para patogêneses da sepse de ratos endotoxêmicos e na sepse induzida pelo CLP. A S-nitrosilação modula a ativação de canais iônicos, modificando a condutividade de íons (Liu e Gutterman, 2002). Dados do nosso laboratório sugerem ainda que a atividade oxidante do DTNB inibe o relaxamento determinado pela ativação dos BKCa em aortas incubadas com SNAP (TERLUK e ASSREUY, 2005). Portanto, a S-nitrosilação de proteínas pode alterar o funcionamento contrátil vascular como também o NO liberado pelos S-nitrosotióis poderia manter o estado hipotenso e hiporreativo à vasoconstritores nos períodos tardios quando a expressão da NOS-2 está diminuída.

Portanto, nossos resultados indicam que a interferência na nitrosilação de proteínas-chave pode ser um adjuvante eficaz no tratamento da sepse porém estudos pré-clínicos complementares são imprescindíveis. Contudo o ponto central deste trabalho é trazer uma reflexão para o papel do S-nitrosotióis na sepse. Sabe-se que o NO neste contexto é um dos componentes que muito contribui para o desenvolvimento desta patologia severa. Contudo olhar mais crítico sobre a função da nitrosilação na sepse pode futuramente abrir novas oportunidades terapêuticas para a redução do prognóstico alarmante desta doença.

6. CONCLUSÕES

Em síntese os principais achados das nossas investigações foram:

✓ Animais infundidos com SNP apresentaram redução acentuada e persistente da resposta contrátil à fenilefrina em todos os tempos avaliados, apesar da PAM apresentar-se dentro dos parâmetros normais;

✓ A hipotensão induzida pela L-cisteína e a hiporreatividade vascular à fenilefrina em animais infundidos com SNP são eventos relacionados com a S-nitrosilação de resíduos de cisteína e a mobilização de NO de S-nitrosotióis;

✓ Injeções sucessivas de L-cisteína em animais infundidos atenuaram a hiporreatividade à fenilefrina, possivelmente pela diminuição de NO dos S-nitrosotióis;

✓ O relaxamento vascular mediado pela L-cisteína, em animais infundidos com SNP depende da ativação da guanilato ciclase solúvel;

✓ O DTNB preveniu e reverteu a hipotensão induzida pela L-cisteína, como também a hiporreatividade à fenilefrina em animais infundidos com SNP. Sendo que o efeito oxidante do DTNB sobre a reatividade vascular foi revertido pelo DTT;

✓ O DTNB melhorou a resposta α -adrenérgica de animais submetidos ao CLP, revertendo totalmente a hiporreatividade vascular.

7. REFERÊNCIAS

ALENCAR, J.L.; LOBYSHEVA, I.; GEFFARD, M.; SARR, M.; SCHOTT, C.; SCHINI-KERTH, V.B.; NEPVEU, F.; STOCLET, J.C.; MULLER, B. Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. **Mol. Pharmacol.**, 63: 1148-1158, 2003a.

ALENCAR, J.L.; LOBYSHEVA, I.; CHALUPSKY, K.; GEFFARD, M.; NEPVEU, F.; STOCLET, J.C.; MULLER, B. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 307, 152-159, 2003b.

ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; CAVAILLON, J.M. Septic shock. **Lancet**, 365:63–78, 2005.

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. **Crit Care Med.**, 29:1303-1311, 2001.

ARRIETA, O.; RODRIGUEZ-REYNA, T.S.; SOTELO, J. Pharmacological treatment of septic shock. **Exp. Opin. Ther. Patents.**, 10: 601-622, 2000.

ARNELLE, D.R.; STAMLER, J.S. NO⁺, NO[•], and NO-donation by S-nitrosothiols: implications for regulation of physiological functions by S-nitrosylation and acceleration of disulfide formation. **Arch. Biochem. Biophys.**, 318: 279-285, 1995.

BEAVO, J.A.; BRUNTON, L. L. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. **Nat Rev Mol Cell Biol.**, 3(9):710-8; 2002.

BEISHUIZEN, A; VERMES, I.; HAANEN, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. **Adv. Clin. Chem.**, 33: 55-131, 1999.

BENEDICT, C.R.; ROSE, J.A. Arterial norepinephrine changes in patients with septic shock. **Circ Shock** 38:165–172, 1992.

BENHAR, M.; FORRESTER, M. T.; STAMLER, J. S. Protein denitrosylation: enzymatic mechanisms and cellular functions. **Nature**, 10: 721-732, 2009.

BROILLET, MC. S-nitrosylation of proteins. **Cell Mol. Life Sci.**, 55: 1036-1042, 1999.

BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine** 26: 3-31, 2005.

BURAS, J.A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov.**, 4(10):854-65; 2005.

CAI, S; SAUVE, R. Effects of thiol-modifying agents on a K(Ca²⁺) channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. **J. Membr. Biol.**, 158: 147-158, 1997.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D. A.; STELLA, A. M. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. **Nat. Rev. Neurosci.**, 8: 766-755, 2007.

CHEN, S.J.; WU, C.C.; YEN, M.H. Alterations of ex vivo vascular reactivity in intraperitoneal sepsis. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 24: 786-793, 1994.

CHOI, H. M.S.; TOSTES, R. C.; WEBB, R.C. S-Nitrosylation inhibits protein kinase C-mediated contraction in mouse aorta. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 57(1): 65–71, 2011.

CINEL, I.; OPAL, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: A primer. **Crit Care Med.**, 37 (1): 291-304, 2009.

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

DA SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 290: 380-387, 1999.

DA SILVA-SANTOS J.E.; TERLUK, M.R.; ASSREUY, J. Differential involvement of guanylatecyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. **Shock**.17:70-76, 2002.

DA SILVA-SANTOS, J.E.; CHIAO, C.W.; LEITE, R.; WEBB, R.C. The Rho-A/Rho-kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms during endotoxaemia in small mesenteric arteries. **Crit Care Med.**, 37: 1716-1723, 2009.

DAWSON, T.M.; SASAKI, M.; GONZALEZ-ZULUETA, M.; DAWSON, V.L. Regulation of neuronal nitric oxide synthase and identification of novel nitric oxide signaling pathways. **Prog Brain Res.**, 118:3-11, 1998.

DERUBERTIS, F. R.; CRAVEN, P. A. Calcium-independent modulation of cyclic GMP and activation of guanylatecyclase by nitrosamines. **Science**, 193:897-899, 1976.

DHALLA, N.S.; TEMSAH, R.M.; NETTICADAN, T. Role of oxidative stress in cardiovascular diseases. **J. Hypertens**, 18: 655-673, 2000.

ELLMAN, GL. Tissue sulfhydryl groups. **Arch. Biochem. Biophys.**, 82: 70,1959.

EU, J. P., SUN, J., XU, L., STAMLER, J. S. & MEISSNER, G. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O₂ sensor and NO signaling functions. **Cell**, 102:499–509, 2000.

FELETOU, M.; VANHOUTTE, P. M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle.**Br J Pharmacol**, 93(3): 515-524, 1988.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacology**, 35:113-122, 1998.

FEELISCH, M.; RASSAF, T.; MNAIMNEH, S.; SINGH, N.; BRYAN, N.S.; JOURD'HEUIL, D.; KELM, M. Concomitant S-

N-, and heme-nitros(yl)ation in biological tissues and fluids: implications for the fate of NO in vivo. **FASEB, J.**, 16(13):1775-85, 2002.

FERNANDES, D.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw edema: involvement of soluble guanylatecyclase and potassium channels. **Inflamm. Res.**, 51: 377-384, 2002.

FERNANDES D.; DA SILVA-SANTOS J.E.; DUMA, D. VILLELA, C.G.; BARJA-FIDALGO C, ASSREUY, J. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylatecyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Mol Pharmacol.** 69: 983-990, 2006.

FERNANDES D, SORDI R, PACHECO LK, NARDI GM, HECKERT BT, VILLELA CG, LOBO AR, BARJA-FIDALGO C AND ASSREUY J: Late, but not early, inhibition of soluble guanylatecyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **J PharmacolExpTher.** 328: 991-999, 2009.

FLEMING, I; JULOU-SCHAEFFER, G; GRAY, GA; PARRATT, JR; STOCLET; JC. Evidence that an L-arginine/nitric oxide dependent elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1047-1052, 1991.

FORSTERMANN, U., MUNZEL, T. Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace. **Circulation.**, 113: 1708–1714, 2006.

FOSTER, M.W.; MCMAHON, T.J.; STAMLER, J.S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends Mol. Med.**, 9:160-168, 2003.

FURCHGOTT, R. F. Introduction to EDRF research. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 22: (7), S1-2. 1993.

GASTON, B. Nitric oxide and thiol groups. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1411:323-333, 1999.

GASTON, B.M.; CARVER, J.; DOCTOR, A.; PALMER, L.A. S-nitrosylation signaling in cell biology. **Mol. Interv.**, 3: 253-263, 2003.

GHAFOURUFAR, P.; PARIHAR, M. S.; NAZAREWICS, R.; ZENEB, W. J. Detection Assays for Determination of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase Activity; Advantages and Limitations. **Methods Enzymol.**, 440: 317 – 34, 2008.

GODOY, L. C.; MORETTI, A. I.; JURADO, M. C.; OXER, D.; JANISZEWSKI, M.; CKLESS, K.; VELASCO, I. T.; LAURINDO, F. R.M.; SOUZA, H. P. Loss Of Cd40 Endogenous S-Nitrosylation During Inflammatory Response In Endotoxemic Mice and Patients With Sepsis. **Shock**, 33 (6): 626-633, 2010.

GHISDAL, P.; GOMEZ, J. P.; MOREL, N. Action of a NO donor on the excitation—contraction pathway activated by noradrenaline in rat superior mesenteric artery. **Journal of Physiology**, 522. (1): 8396, 2000.

GOLDBLUM, S.E.; DING, X.; CAMPBELL-WASHINGTON, J. TNF-alpha induces endothelial cell F-actin depolymerization, new actin synthesis, and barrier dysfunction. **Am J Physiol.**, 264: 894-905, 1993.

GOW, AJ; CHEN, Q; HESS, DT; DAY, BJ; ISCHIROPOULOS, H; STAMLER, JS. Basal and stimulated protein S-nitrosylation in multiple cell types and tissues. **J. Biol. Chem.**, 277:9637-9040, 2002.

HEGESH, E. e SHILOAH, J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. **Clin. Chim. Acta.**, 125: 107-42, 1982.

HESS, D.T.; MATSUMOTO, A; KIM, S.; MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. Protein s-nitrosylation: purview and parameters. **Nature**, 6:150-166, 2005.

HIBBS, J. B. Synthesis of nitric from L- Arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. **Res. Immunol.**, 142: 565, 1991.

HILGERS, R.H.P.; WEBB, A. R. C. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. **Experimental Biology and Medicine**, 230:829-835, 2005.

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.

HUTCHINSON, P. J.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur J Pharmacol.**, 141(3): 445-451, 1987.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 84(24): 9265-9269, 1987.

IGNARRO, L. J. Nitric oxide as a unique signaling molecule in the vascular system: a historical overview. **Journal of Physiology and pharmacology: na official journal of the Polish Physiological Society**, 53(4):503-514, 2002.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol.Rev.**, 59: 533-47, 1995.

JIA, L.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; STAMLER, S. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic of blood involved in vascular control. **Nature**, 380: 221-226, 1996.

JULOU-SCHAEFFER, G.; GRAY, G.A.; FLEMING, I.; SCHOTT, C.; PARRATT, J.R.; STOCLET, J.C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **Am. J. Physiol.**, 259:1038- 1043, 1990.

JOURD'HEUIL, D.; GRAY, L.; GRISHAM, M.B. S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 273: 22–26, 2000.

KADOI, Y.; GOTO, F. Selective inducible nitric oxide inhibition can restore hemodynamics, but does not improve neurological dysfunction in experimentally-induced septic shock in rats. **Anesth Analg.** 99: 212-220, 2004.

KANAGY, N.L.; CHARPIE, J.R.; DANANBERG, J.; WEBB, R.C. Decreased sensitivity to vasoconstrictors in aortic rings after acute exposure to nitric oxide. **Am J Physiol.**, 271:253–260, 1996.

KEANEY, J.F. JR; PUYANA, J.C.; FRANCIS, S.; LOSCALZO, J.F.; STAMLER, J.S.; LOSCALZO, J. Methylene blue reverses endotoxin-induced hypotension. **Circ. Res.**, 74, 1121-1125, 1994.

KILBOURN, R.G.; JUBRAN, A.; GROSS, S.S.; GRIFFITH, O.W.; LEVI, R.; ADAMS, J.; LODATO, R.F. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Biophys Res Commun.**172:1132-1138, 1990.

LAL, B.; GOLDSTEIN, G.; BRESSLER, J.P. Role of anion exchange and thiolgroups in the regulation of potassium efflux by lead in human erythrocytes. **J. Cell Physiol.**, 167:222-228, 1996.

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

LIEBERMAN, E.H; O'NEILL, S.; MENDELSON, M.E. S-nitrosocysteine inhibition of human platelet secretion is correlated with increases in platelet GMPc levels. **Circ. Res.**, 68: 1722-1728, 1991.

LIU, S.F.; ADCOCK, I.M.; OLD, R.W.; BARNES, P.J.; EVANS, T. W. Differential regulation of the constitutive and inducible nitric oxide synthase mRNA by lipopolysaccharide treatment in vivo in the rat. **Crit Care Med.**, 24:1219-1225, 1996.

LIU, L.; YAN, Y.; ZENG, M.; ZHANG, J.; HANES, M. A.; AHEARN, G.; MCMAHON, T.; DICKFELD, T. MARSHALL, H.; LORETTA, G.; STAMLER. J. S. Essential Roles of S-Nitrosothiolsin Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock. **Cell**, 116:617–628, 2004,

LIU, Y; GUTTERMAN, DD. Oxidative stress and potassium channel function. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, 29: 305-311, 2002.

LONG, L. H.; LIU, J.; LIU, R-L.; WANG, F.; ZHUANG-LI, H.; XIE, N.; FU, H.; CHEN, J-G. Differential Effects of Methionine and Cysteine Oxidation on $[Ca^{2+}]_i$ in Cultured Hippocampal Neurons. **Cell Mol Neurobiol.**, 29:7-15, 2009.

MARSHALL, H.E., AND STAMLER, J.S. Nitrosative stress-induced apoptosis through inhibition of NF-kappa B. **J. Biol. Chem.** 277: 34223-34228, 2002.

MARTIN, C. Viviani X., Arnaud S., Vialet R., Rougnon T. Effects of norepinephrine plus dobutamine or norepinephrine alone on left ventricular performance of septic shock patients. **Critical Care Medicine.**, 27 (9): 1708-1713, 1999.

MATLUNG, H. L., E. N. BAKKER, VANBAVEL, E. Shear stress, reactive oxygen species and arterial structure and function. **Antioxid Redox Signal**, 2. 2009.

MONCADA S, GRYGLEWSKI R, BUNTING S, VANE JR. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**. 263(5579):663-5, 1976.

MONCADA, S; PALMER, RMJ; HIGGS, AE. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, 43:109-142, 1991.

MULLER, B; KLESCHYOV, AL; STOCLET, JC. Evidence for N-acetylcysteine-sensitive nitric oxide storage as dinitrosyl-iron complexes in lipopolysaccharide-treated rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, 119:1281-1285, 1996.

MULLER, B; KLESCHYOV, AL; MALBLANC, S; STOCLET, JC. Nitric oxide-related cyclic GMP-independent relaxing effect of N-acetylcysteine in lipopolysaccharide-treated rat aorta. **Br. J. Pharmacol.**, 123:1221-1229, 1998.

NAPOLI, C.; DE NIGRIS, F.; WILLIAMS-IGNARRO, S., PIGNALOSA, O.; SICA, V.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. **Nitric Oxide**,15(4):265-79, 2006.

NDUKA, O. O.; PARRILLO, J. E.The Pathophysiology of Septic Shock. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, 23: 41-66, 2011.

NEDOSPASOV A, RAFIKOV R, BEDA N, NUDLER E. An autocatalytic mechanism of protein nitrosylation. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, 97:13543–8, 2000.

OCHOA, J.B.; UDEKWU A.O.; BILLIAR, T.R.; CURRAN, R.D.; CERRA, F.R.; SIMONS, R.L.; PEITZMAN, A.B. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Ann. Surg.**, 214(5): 621-626, 1991.

OGUT O, BROZOVICH FV. Regulation of force in vascular smooth muscle. **J Mol Cell Cardiol.**, 35:347–355, 2003.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327(6122): 524-526, 1987.

PARRATT, JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia.**J. Antimicrob. Chemother.**, 41: 31-39, 1998.

PAYA, D.; GRAY, G.A.; FLEMING, I.; STOCLET, J.C. Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by E. coli lipopolysaccharide in rats.**Circ. Shock.**, 41: 103-112, 1993

QUAYLE, J.M.; NELSON, M.T.; STANDEN, N.B. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle.**Physiol. Rev.**, 77:1165-1232, 1997.

QUEZADO Z.M.N.; NATANSON C. Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock. **Am J Kidney Dis** 20:214- 222, 1992.

RANGEL-FRAUSTO, M. S.; PITTET, D.; COSTIGAN, M. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. **The Journal of the American Medical Association**, 273: 117-123, 1995.

RAPOPORT, R.M. WALDMAN, S.A.; GINSBURG, R.; MOLINA, C.R. & MURAD, F. Effects of glyceryl trinitrate on endothelium-dependent independent relaxation and cyclic GMP levels in rat aorta and human coronary artery. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 10:82-89, 1987.

ROBERTSON, B. E.; SCHUBERT, R.; HESCHELER, J.; NELSON, M. T. cGMP-dependent protein kinase activates Ca²⁺ activated potassium channels in cerebral artery smooth muscle cells. **American Journal of Physiology**, 265:229-303, 1993.

SANDS, K.E.; BATES, D.W.; LANKEN, P.N.; GRAMAN, PS; HIBBERD, PL; KAHN, KL; PARSONNET, J; PANZER, R; ORAV, EJ; SNYDMAN, DR. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. **JAMA.**, 278: 234-240,1997.

SCOTT,J.A.; MEHTA, S.; DUGGAN, M.; BIHARI, A.; MCCORMACK, D.G. Functionlinhibition of constitutive nitric oxide synthase in a rat model of sepsis. **Am J Respir Crit Care Med.**, 165:1426-1432, 2002.

SMITH. B.C; MARLETTA, M. A. Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitric oxide signaling. **Current Opinion in Chemical Biology**, 16:498–506, 2012.

SOGO, N.; CAMPANELLA, C; WEBB, D.J.; MEGSON, I.L. S-nitrosothiols cause prolonged, nitric oxide-mediated relaxation in human saphenous vein and internal mammary artery: therapeutic potential in bypass surgery. **Br. J. Pharmacol.**, 131: 1236-1244, 2000.

SOMLYO AP, SOMLYO AV. Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **J Physiol** 522:177–185, 2000.

SORDI, R.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Differential involvement of potassium channel subtypes in early and late sepsis-induced hyporesponsiveness to vasoconstrictors. **J Cardiovasc Pharmacol.** 56(2):184-9, 2010.

SOTO, MA; GONZALEZ, C; LISSI, E; VERGARA, C; LATORRE, R. Ca(2+)-activated K⁺ channel inhibition by reactive oxygen species. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, 282: 461-471, 2002.

STAMLER, J.S; SINGEL, DJ; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science.**, 25: 1898-1902, 1992.

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

STAMLER, J. S.; LAMAS, S.; FANG, F. C. Nitrosylation: the prototypic redox-based signaling mechanism. **Cell**, 106:675–683, 2001.

STAMLER, J. S. & TOONE, E. J. The decomposition of thionitrites. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, 6:779–785, 2002.

STUEHR, D.J. e MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7738-42, 1985.

SZABO, C; MITCHELL, JA; THIEMERMANN, C; VANE, JR. Nitric oxide mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. **Br. J. Pharmacol.**, 108:786-792, 1993.

SZABO, C; THIEMERMANN, C; WU, CC; PERRETTI, M; VANE, JR. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.**, 91: 271-275, 1994.

TERLUK, M. R.; SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Involvement of soluble guanylatecyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to

phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 361:477-483, 2000.

TERLUK, M.R. Respostas vasculares mediadas pelo óxido nítrico: Efeitos de agentes oxidantes na hiporreatividade à fenilefrina e no relaxamento induzido por tióis. Tese de Doutorado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina). Florianópolis, 2005.

UMANS, J.G.; WYLAM, M.E.; SAMSEL, R.W.; EDWARDS J.; SCHUMACKER P.T. Effects of endotoxin in vivo on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta. **Am Rev Respir Dis.**, 148:1638–1645, 1993.

VICENT, J. L. Update on sepsis: pathophysiology and treatment. **Acta Clin Belg.** 55 (2): 79-87, 2000.

WANG, P. G.; XIAN, M.; TANG, X.; WU, Z.; WEN, Z.; CAI, T.; JANZUK, A.J. Nitric Oxide Donors: Chemical Activities and Biological Applications. **Chem. Rev.**, 102, 1091–1134, 2002.

WANSTALL, J. C.; JEERY, T. K.; GAMBINO, A.; LOVREN, F. TRIGGLE, C. R. Vascular smooth muscle relaxation mediated by nitric oxide donors: a comparison with acetylcholine, nitric oxide and nitroxyl ion. **Br J Pharmacol.**, 134(3):463-72, 2001.

WESTENBERGER, U.; THANNER.S.; RUF,H.H.; GERSONDE, K; SUTTER, G; TRENTZ, O. Formation of free radicals and nitric oxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. **Free Radic. Res. Commun.** 11:167–178, 1990.

WU CC, RUETTEN H, THIEMERMANN C. Comparison of the effects of aminoguanidine and N omega-nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 300:99-104, 1996.

ZOCCARATO, F; CAVALLINI, L; VALENTE, M; ALEXANDRE, A. Modulation of glutamate exocytosis by redox changes of

superficial thiol groups in rat cerebro cortical synaptosomes. **Neurosci. Lett.**, 274:107-110, 1999.

ZHAO, W.; ZHANG, J.; LU, Y.; WANG, R. The vasorelaxant effect of H₂S as a novel endogenous gaseous K(ATP) channel opener. **EMBO J.**, 20(21):6008-16, 2001.