

Karin Scheschowitsch

UMA NOVA VIA DE TRANSLOCAÇÃO NUCLEAR DE
RECEPTOR DE GLICOCORTICOIDE INDEPENDENTE DE
LIGANTE

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

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy
Coorientador: Prof. Dr. José Eduardo
da Silva Santos

Florianópolis
2015

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

Scheschowitsch, Karin

Uma nova via de translocação nuclear de receptor de glicocorticoide independente de ligante / Karin Scheschowitsch ; orientador, Jamil Assreuy ; coorientador, José Eduardo da Silva Santos. - Florianópolis, SC, 2015.
135 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Receptores de glicocorticoides. 3. Óxido nítrico. I. Assreuy, Jamil. II. da Silva Santos, José Eduardo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. IV. Título.

Aos meus pais, Anita e Erich, pelo amor incondicional e pelo incentivo constante.

Ao meu pai, por ter sobrevivido à sepse nos anos 80 e eu estar aqui hoje.

À família de Iolanda Gepkens, mãe adotiva dos meus 3 irmãos de coração, que faleceu em função de uma sepse grave poucos anos após eles terem sido adotados.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me guiado, dado saúde, coragem e por ter colocado as pessoas certas na hora certa em minha vida.

Ao meu orientador e pai científico, Prof. Dr. Jamil Assreuy, por toda a confiança em mim depositada, pelos valiosos ensinamentos repassados, pelo apoio, compreensão e amizade. Muito obrigada!

Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos, por toda a ajuda prestada e pelas ótimas conversas científicas que me instigaram a pensar e foram fundamentais para minha formação.

À Dra. Anna Kleyman por ter me recebido e supervisionado durante o período de doutorado sanduíche na Alemanha, por toda ajuda prestada e ensinamentos repassados.

À Profa. Dra. Christina Barja-Fidalgo por ter me recebido em seu laboratório, por toda ajuda prestada e pelas valiosas sugestões.

Ao meu grande companheiro, Georges Lemos, pelo apoio, amizade, dedicação, compreensão e companheirismo mesmo à distância. Nem tudo foram flores, mas nos momentos mais difíceis que passei, foi você quem segurou minha mão, me ajudou a levantar e me incentivou a continuar em busca dos meus sonhos e me tornar uma pessoa melhor. Muito obrigada!

Aos meus pais, Erich e Anita Scheschowitsch, pelo amor incondicional, por sempre terem me apoiado, mesmo quando não me compreendiam, por sempre terem me incentivado a correr atrás dos meus sonhos e compreenderem a ausência física de uma família espalhada pelo mundo. Vocês são meus grandes exemplos de perseverança, coragem e humildade. Me orgulho muito de vocês!

Às minhas irmãs, Adriana e Andrea, pela amizade, pelas longas conversas e bons conselhos, e por terem trazido mais alegrias e felicidade para nossa família com a chegada de 4 pequenos anjinhos. Ver o sorriso e sentir seus abraços carinhosos sempre renovaram minhas forças.

Ao meu irmão, Alex, pela amizade e por me fazer perceber o quanto nossos exemplos e atitudes valem mais do que palavras. Agradeço por ter me dado mais 3 irmãos de coração.

À grande amiga e colaboradora, Regina de Sordi, por quem tenho grande admiração, por tudo o que me ensinou, tanto dentro quanto fora do laboratório ao longo destes anos. Sua presença e sua ajuda tornaram meu dia-a-dia muito mais divertido e produtivo.

À Adriane Madeira, pela amizade, por toda a ajuda prestada e ensinamentos repassados. Sua perseverança e bom humor em meio às adversidades se tornaram um grande exemplo para mim.

À Patrícia Benedet, pela amizade e ajuda experimental fundamental prestada em momentos críticos.

Ao João Alfredo de Moraes pelos valiosos ensinamentos, pelo esforço na realização de alguns experimentos cruciais e pela amizade que surgiu a partir desta colaboração.

Ao Geisson, pela amizade, pelos ensinamentos e ótimas conversas científicas sobre a nossa querida “neuronal”.

Aos demais amigos e colegas do NOLAB por toda a ajuda prestada e por tornarem o dia-a-dia do laboratório mais divertido: Verônica, Dani, Geisson, Sandra, Daniel, Bete, Gustavo, Sílvia, Ana Fávero, Ronald, Edir, Clarissa e Thiele.

Aos alunos de iniciação científica, Guilherme, Mariana e Laís, pela ajuda experimental durante o tempo em que trabalhamos juntos e pelos ensinamentos que esta experiência me proporcionou.

Aos colaboradores diretos deste trabalho, João, Regina, Anna, Shamci, Profa. Dra. Christina e Prof. Dr. José Eduardo, que foram fundamentais não somente para a realização de diversos experimentos, como para a interpretação e discussão desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Markus Gräler, seus alunos e técnicos do “Center for Sepsis Control and Care” que me acolheram em seu grupo de trabalho, pelo carinho, por toda a ajuda prestada e por terem sido sempre solícitos e atenciosos comigo.

Aos funcionários dos Laboratórios Multiusuários (LAMEBs I e II), em especial à Chirle, Demétrio, Bibiana e Vanessa, e às técnicas do Laboratório Central de Microscopia (LCME) Eliana e Renata pela ajuda prestada.

À Profa. Dra. Rosa Maria Ribeiro do Valle Nicolau e o Prof. Dr. Giles Rae, que acompanharam minha caminhada neste departamento desde meu período de iniciação científica voluntária e serão sempre lembrados com muito carinho e admiração por tudo que aprendi com eles.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a minha formação, e contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Aos demais colegas e professores do Departamento de Farmacologia pela ajuda que recebi sempre que solicitei, pelas amizades e pelo bom convívio.

A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia pela ajuda prestada, em especial ao Rafael, à Sheila e ao Pedro que sempre foram muito solícitos e faziam tudo o que estava ao seu alcance para nos ajudarem.

Às agências de fomento CNPq, CAPES, FAPESC e CSCC pelo apoio financeiro imprescindível para a realização deste trabalho.

Sempre acreditei que deveríamos ser fortes, custe o que custasse. Mas ao longo dos anos a vida quis me ensinar algumas lições.

Aprendi que...

Mesmo não tendo tempo, temos que nos tirar um tempo. Caso contrário, mesmo parecendo fortes, nosso corpo nos faz lembrar o quanto somos frágeis e nos obriga a parar. Não há dinheiro no mundo que compre saúde quando essa nos falta.

Que buscar um diálogo sincero é melhor do que deixar um silêncio ensurdecedor corroer a alma.

Devemos sempre seguir nossa consciência e nosso coração, pois independente do que se faça, haverá pessoas que compreenderão e apoiarão, e pessoas que farão questão de não compreender nada.

Quando se trabalha com amor e dedicação sempre se colherá bons frutos.

Não devemos fazer planos em demasia. Devemos estar sempre atentos às oportunidades e ter coragem de agarrá-las, pois tudo acontece por alguma razão.

Assim como a vida e a ciência vivem em constante transformação, nós também devemos sentir, mudar, inovar, arriscar e saber ponderar, pois o sentido e a felicidade da vida estão nestas pequenas atitudes vividas no dia-a-dia.

Se tudo o que aprendi até hoje permanecerá assim? Não sei! Só sei que quando se está disposto a aprender, sempre se pode descobrir algo novo, e tudo mudar de novo!

Karin Scheschowitsch

RESUMO

O mecanismo pelo qual a disfunção vascular séptica é iniciada, e como baixas concentrações de óxido nítrico (NO) podem estar relacionadas às vias de sinalização dos receptores de glicocorticoides (GR), são pouco entendidas. Os objetivos desse trabalho foram avaliar como a produção inicial de NO, induzida por lipopolissacarídeo (LPS), pode interferir na ativação de células musculares lisas obtidas de aorta de ratos (A7r5) e na distribuição celular dos GR. Células A7r5 estimuladas com LPS e Interferon- γ (IFN) apresentaram um rápido (em minutos) aumento na produção de NO e ânion superóxido, formando peroxinitrito, e posterior ativação do NF-kB, expressão da NOS-2 e acúmulo de nitrito no sobrenadante celular. A inibição da NO sintase (NOS) e NADPH oxidase (NOX), ou o sequestro do NO e do ânion superóxido, diminuíram todos estes eventos. O silenciamento das enzimas envolvidas demonstrou que apenas a ativação das isoformas NOS-1 e NOX-1 são importantes para a expressão da NOS-2 nas células A7r5. O pré-tratamento de ratos adrenalectomizados (ADX) com 7-nitroindazol (7-NI), antes do desafio com LPS reduziu os níveis plasmáticos de IL-6 e de NOx, diminuiu a translocação nuclear de GR e reduziu a mortalidade induzida por LPS em 65%. Observou-se que a translocação nuclear de GR mediada pelo pulso de NO e peroxinitrito depende da integridade do domínio de dimerização do GR, pois não foi observada translocação de GR em fibroblastos de camundongos deficientes na dimerização de GR (GR^{dim/dim}), bem como o pré-tratamento com 7-NI não preveniu a mortalidade destes camundongos quando desafiados com LPS. Dessa forma, concluímos que a rápida formação de NO, ânion superóxido e peroxinitrito, derivados da atividade da NOS-1 e da NOX-1, respectivamente, atuam como agentes sinalizadores para a expressão da NOS-2 através da ativação de NF-kB, sendo importantes para o início da disfunção vascular séptica. Além disso, demonstramos de forma inédita que este pulso de espécies reativas participa de uma nova via de translocação nuclear de GR induzida por LPS/IFN, na ausência de corticoides. Esta nova via pode ser importante para ajudar a entender as causas da falha dos glicocorticoides em conter a inflamação em fases avançadas da sepse. **Palavras-chave:** células musculares lisas vasculares, óxido nítrico, óxido nítrico sintases, peroxinitrito, receptores de glicocorticoides, translocação nuclear.

ABSTRACT

The mechanism whereby the vascular dysfunction is initiated, and how low concentrations of nitric oxide (NO) are related to glucocorticoid receptors (GR) signaling pathways are poorly understood. The objectives of this study were to understand how an initial NO release induced by lipopolysaccharide (LPS) could interfere with the activation of smooth muscle cells from rat aorta (A7r5) and cellular distribution of GR. A7r5 cells stimulated with LPS and interferon- γ (IFN) showed a rapid (within minutes) increase in NO and superoxide production, forming peroxynitrite with subsequent NF-kB activation, NOS-2 expression and nitrite accumulation in cell supernatant. The inhibition of NO synthase (NOS) and NADPH oxidase (NOX) or the scavenging of NO and superoxide anion, decreased all these events. The silencing of involved enzymes showed that only the activation of NOS-1 and NOX-1 isoforms are important for the expression of NOS-2 in A7r5 cells. Pretreatment of adrenalectomized (ADX) rats with 7-nitroindazole (7-NI) before LPS challenge, reduced the plasma levels of IL-6 and NOx, decreased nuclear translocation of GR and reduced mortality induced by LPS in 65%. It was observed that the nuclear translocation of GR mediated by the NO and peroxynitrite pulse depends on the integrity of the dimerization domain of the receptor, once GR translocation in fibroblasts obtained from GR dimerization deficient mice (GR^{dim/dim}) was not observed. Also, pretreatment with 7-NI did not prevent the death of these mice when they were challenged with LPS. Thus, we conclude that rapid formation of NO, superoxide and peroxynitrite derived from the activity of NOS-1 and NOX-1, respectively, act as signaling agents for the expression of NOS-2 through the activation of NF-kB, being important for the initiation of septic vascular dysfunction. Furthermore, we demonstrated for the first time that this pulse of reactive species participate in a new route of GR nuclear translocation induced by LPS/IFN, in the absence of steroids. This new pathway may be important to help understand the causes of glucocorticoids failure to contain inflammation in advanced stages of sepsis.

Keywords: glucocorticoid receptors, nitric oxide, nitric oxide synthase, nuclear translocation, peroxynitrite, vascular smooth muscle cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura e domínios do receptor de glicocorticoide (GR).	41
Figura 2. Resumo esquemático dos mecanismos de ações genômicas do GR.....	43
Figura 3: Dosagem de corticosterona plasmática de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI.	65
Figura 4: Curva de sobrevivência após o desafio com LPS em ratos sham e ADX pré-tratados ou não com 7-NI.	66
Figura 5: Efeito da administração de dexametasona antes e após o desafio com LPS em ratos ADX.....	67
Figura 6: Dosagem de nitrato + nitrito (NOx) plasmático de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI.....	68
Figura 7: Dosagem da citocina IL-6 no plasma de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI.	69
Figura 8: Avaliação temporal da glicemia de ratos sham e ADX desafiados com LPS.	70
Figura 9: Avaliação temporal da glicemia de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI.....	71
Figura 10: Avaliação por imunofluorescência da distribuição celular do receptor de glicocorticoide (GR) em cortes transversais de aorta de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI.....	73
Figura 11: Avaliação por imunofluorescência da distribuição celular do GR em células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN na ausência ou na presença de 7-NI, na ausência de corticoides.....	75
Figura 12: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em células musculares lisas A7r5 incubadas com os doadores SIN-1 e GTN ou LPS/IFN.....	77

Figura 13: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para NF-κB em células musculares lisas A7r5 incubadas com SIN-1 ou LPS/IFN.....	78
Figura 14: Quantificação da imunofluorescência para GR ou NF-κB, em células musculares lisas A7r5 incubadas com SIN-1, GTN ou LPS/IFN.....	79
Figura 15: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em de fibroblastos de camundongos WT e GR ^{dim/dim} incubados com LPS/IFN na ausência ou na presença de 7-NI, na ausência de corticoides.	81
Figura 16: Quantificação do ensaio de imunofluorescência para GR em fibroblastos de camundongos WT e GR ^{dim/dim} incubados com LPS/IFN na ausência ou na presença de 7-NI, na ausência de corticoides.....	82
Figura 17: Comparação da intensidade de fluorescência nuclear basal de GR em fibroblastos de camundongos WT e GR ^{dim/dim} na ausência de corticoides..	83
Figura 18: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em células musculares lisas A7r5 incubadas com LPS/IFN ou RU-486.	84
Figura 19: Quantificação do ensaio de imunofluorescência para GR em células musculares lisas A7r5 incubadas com LPS/IFN ou RU-486.	85
Figura 20: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em de fibroblastos de camundongos WT e GR ^{dim/dim} incubados com LPS/IFN ou dexametasona.....	86
Figura 21: Dosagem da concentração de nitrito no sobrenadante de fibroblastos de camundongos WT e GR ^{dim/dim} desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI.	87

Figura 22: Dosagem da citocina IL-6 no sobrenadante de fibroblastos de camundongos WT e GR ^{dim/dim} desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI.	88
Figura 23: Curva de sobrevivência após o desafio com LPS em camundongos WT e GR ^{dim/dim} pré-tratados ou não com 7-NI.....	89
Figura 24: Dosagem da citocina IL-6 no plasma camundongos WT e GR ^{dim/dim} desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI.	90
Figura 25: Avaliação temporal do peso, da temperatura corporal e da glicemia de camundongos WT e GR ^{dim/dim} desafiados com LPS.	92
Figura 26: Avaliação temporal do peso, da temperatura corporal e da glicemia de camundongos WT e GR ^{dim/dim} desafiados com LPS, na presença ou ausência de 7-NI.	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Divisão de grupos e respectivos protocolos de tratamento em ratos ADX e sham.	57
--	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Estimulação de células com LPS/IFN levam a um pulso de NO, ânion superóxido e peroxinitrito, que modulam a ativação da via do NF- κ B e, conseqüentemente, a expressão de NOS-2.....	63
Esquema 2: Papel do pulso de NO e de peroxinitrito sobre o início da resposta inflamatória e sobre a via de sinalização dos GR.	112

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADX	Adrenalectomizados
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AP-1	Proteína ativadora 1
CARS	Síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
COX	Ciclooxigenase
CRH	Hormônio corticotrófico
DBD	Sítio de ligação ao DNA
DUSP	Fosfatase de especificidade dual
FKBP51	Proteína ligadora da FK506 de 51 kDa
FKBP52	Proteína ligadora da FK506 de 52 kDa
GCs	Glicocorticoides
GR ^{dim}	Mutação que impede a dimerização do GR
GREs	Elementos responsivos aos glicocorticoides
GR	Receptores de glicocorticoides
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAT	Histona acetiltransferase
HDAC	Histona desacetilase
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HSP	Proteínas de choque térmico
IFN	Interferon-gamma
IL-6	Interleucina 6
JNK	Cinase c-Jun N-terminal

LBD	Domínio de ligação do ligante
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPKs	Proteínas cinases ativadas por mitógeno
NF-κB	Fator de transcrição nuclear kappa B
nGREs	Elementos negativos responsivos aos GCs
NLS	Sequência de localização nuclear
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintases
NOX	NADPH oxidases
NOx	Nitrato + nitrito
O ₂ •-	Ânion superóxido
OH•	Radical hidroxil
ONOO-	Peroxinitrito
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
sGC	Guanilato ciclase solúvel
SIRS	Síndrome inflamatória sistêmica
SOD	Superóxido dismutase
Src	Tirosina cinase coativadora de receptores esteroides
TLR	Receptores do tipo <i>Toll-like</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	25
2.	OBJETIVOS	27
2.3	Objetivo Geral.....	27
2.4	Objetivos específicos	27
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	29
3.1	Aspectos gerais da resposta inflamatória na sepse.....	29
3.2	Espécies reativas de oxigênio	31
3.3	Espécies reativas de nitrogênio	32
3.4	Aspectos gerais sobre os glicocorticoides.....	34
3.5	Aspectos gerais e recentes sobre os receptores de glicocorticoides	37
3.6	Modelos de animais transgênicos para o GR.....	39
3.7	Mecanismos de ação mediados pelo GR.....	41
3.7.1	Mecanismos de ação genômico – Transativação e Transrepressão.....	42
3.7.2	Mecanismo de ação não-genômico.....	46
3.7.3	Mecanismo de ação por isoformas translacionais e modificações pós-translacionais	48
3.7.4	Novas vias de sinalização do GR.....	50
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	51
4.1	Materiais	51
4.2	Procedimentos experimentais <i>in vivo</i>	52
4.2.1	Animais.....	52
4.2.2	Adrenalectomia.....	53
4.2.3	Coleta de sangue para obtenção de plasma e coleta de aorta torácica de ratos	53

4.2.4	Coleta de sangue para obtenção de plasma de camundongos.....	54
4.2.5	Coleta de sangue para dosagem da glicemia em ratos e camundongos	54
4.2.6	Dosagem de corticosterona e citocinas no plasma.....	54
4.2.7	Dosagem de nitrato e nitrito (NOx) no plasma de ratos	55
4.2.8	Imunofluorescência para GR em aorta de ratos.....	55
4.3	Protocolos experimentais.....	56
4.3.1	Curva de sobrevivência no modelo de endotoxemia	56
4.3.2	Avaliação dos parâmetros metabólicos e inflamatórios	57
4.4	Procedimentos experimentais <i>in vitro</i>	58
4.4.1	Cultura celular	58
4.4.2	Avaliação da ativação celular por acúmulo de nitrito.....	58
4.4.3	Imunofluorescência em células	59
4.5	Análise estatística	61
5.	RESULTADOS	62
5.1	Dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona após a administração de LPS em ratos sham e ADX, pré-tratados ou não com 7-NI	64
5.2	Efeito do pré e do pós-tratamento com 7-NI sobre a sobrevivência de ratos ADX desafiados com LPS.....	65
5.3	Efeito do pré e do pós-tratamento com dexametasona na sobrevivência de ratos ADX desafiados com LPS, em diferentes horários.	66
5.4	Efeito da inibição do pulso de NO e de peroxinitrito sobre parâmetros inflamatórios em ratos ADX desafiados com LPS.....	67
5.5	Efeito da adrenalectomia e do 7-NI sobre a glicemia de ratos desafiados com LPS.....	69

5.6	Translocação nuclear de GR induzida por LPS e efeito do 7-NI	72
5.7	Efeito da estimulação com LPS/IFN e do 7-NI sobre a distribuição celular do GR em células musculares lisas estimuladas com LPS/IFN, na ausência de corticoides.....	74
5.8	Efeito do GTN e do SIN-1 sobre a distribuição celular do GR e do NF-κB em células musculares lisas.....	76
5.9	Efeito da mutação GR ^{dim/dim} e do 7-NI sobre o mecanismo de translocação nuclear de GR induzida por LPS/IFN, na ausência de corticoides	80
5.10	Comparação entre a translocação nuclear de GR induzida por LPS/IFN, na ausência de corticoides, e a translocação nuclear de GR induzida por ligantes	83
5.11	Efeito do 7-NI sobre a ativação de fibroblastos WT e GR ^{dim/dim} estimulados com LPS/IFN	86
5.12	Efeito do 7-NI sobre a concentração de IL-6 em de fibroblastos WT e GR ^{dim/dim} estimulados com LPS/IFN	88
5.13	Efeito da inibição do pulso de NO e de peroxinitrito sobre a sobrevivência de camundongos WT e GR ^{dim/dim} desafiados com LPS ..	89
5.14	Efeito do 7-NI sobre a concentração plasmática de IL-6 em camundongos WT e GR ^{dim/dim} desafiados com LPS.....	90
5.15	Efeito do LPS e do 7-NI sobre parâmetros metabólicos em camundongos WT e GR ^{dim/dim} desafiados com LPS.....	91
6.	DISCUSSÃO	95
7.	CONCLUSÕES	114
8.	REFERÊNCIAS.....	115
9.	ANEXO 1	135

1. INTRODUÇÃO

Nosso laboratório vem estudando há muitos anos a participação das óxido nítrico sintases (NOS) na disfunção cardiovascular que ocorre na sepse. O trabalho de Duma e colaboradores (2005) demonstrou que o pré-tratamento com inibidores não seletivos das NOS, antes da indução do modelo de endotoxemia ou de sepse por ligação e perfuração do ceco (CLP), diminuiu os parâmetros inflamatórios decorrentes destes estímulos. Além disso, observaram que o pré-tratamento com inibidores seletivos para NOS-1 impedem a rápida diminuição da pressão arterial logo após a injeção de LPS (Duma et al., 2005). Com base nestes dados foi sugerido que a NOS-1 presente na musculatura esquelética teria um papel fundamental na iniciação da resposta inflamatória (Duma et al., 2011). No entanto, os mecanismos pelos quais o NO, oriundo da NOS-1, regularia o desenvolvimento da resposta inflamatória não foram investigados.

O fato da inibição da NOS-1 impedir a redução inicial na pressão arterial após a injeção de LPS nos levou a pensar que esse efeito talvez não fosse dependente apenas da NOS-1 presente na musculatura esquelética. A atividade das células musculares lisas afeta diretamente a regulação da pressão arterial, e durante a evolução da sepse, os quadros de hipotensão e hiporeatividade se agravam e continuam desafiando a medicina.

Com base nestas informações, a primeira hipótese formulada foi de que: 1) agentes pró-inflamatórios levariam à rápida ativação das NOS constitutivas presentes nas células musculares lisas, 2) o NO, oriundo das NOS constitutivas, seria importante para induzir a expressão de proteínas pró-inflamatórias, como a NOS-2, e 3) a indução de vias pró-inflamatórias nas células musculares lisas levariam à disfunção de seus mecanismos contráteis, contribuindo para a hipotensão e hiporeatividade durante o agravamento da sepse. Esta hipótese foi integralmente comprovada no artigo publicado que faz parte desta tese.

Ainda no trabalho de Duma e colaboradores de 2005, observou-se que, quando um doador de NO era administrado antes da injeção de dexametasona que, por sua vez, precedia a indução de sepse pelo modelo de CLP, a proteção contra a resposta inflamatória da sepse conferida pela administração prévia de dexametasona era abolida. Dados da literatura

(Galigniana et al., 1999) demonstram que elevadas concentrações de NO diminuem a capacidade de ligação da dexametasona ao GR. No trabalho de Duma e colaboradores (2005), foi demonstrado que diferentes concentrações de NO têm diferentes efeitos sobre o GR, em que pequenas concentrações de NO aumentam a capacidade de ligação do GR à ligantes.

Ao observarmos que: 1) o pulso de NO e peroxinitrito induzido por LPS/IFN foi capaz de estimular a via de sinalização do NF- κ B, 2) GR podem controlar a ativação do NF- κ B através de uma interação direta, do tipo proteína-proteína, e 3) pequenas concentrações de NO podem aumentar a capacidade de ligação do GR, levantamos uma hipótese de trabalho que foi explorada nesta tese. Nessa hipótese, o pulso de NO e peroxinitrito induzido por LPS/IFN poderia interferir com a via de sinalização do GR, induzindo sua translocação para o núcleo na ausência de ligante, juntamente com o NF- κ B. Nesse caso, parte dos GR migrariam para o núcleo a fim de controlar alostericamente a ativação do NF- κ B. Ainda, esses receptores poderiam ficar numa conformação de maior afinidade para o ligante nos momentos iniciais da inflamação (como citado), prontos para receberem o ligante e deflagrarem seus mecanismos de ação anti-inflamatória quando ocorresse a elevação da concentração de corticoides na corrente sanguínea. Esse poderia ser um mecanismo pelo qual vias anti-inflamatórias seriam ativadas, a fim de limitar o processo inflamatório.

2. OBJETIVOS

2.3 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito da produção inicial de NO e de peroxinitrito induzido por LPS/IFN sobre a ativação de células musculares lisas, bem como, avaliar como o pulso inicial de NO e de peroxinitrito induzido por LPS/IFN afeta a sinalização e a distribuição celular do GR.

2.4 Objetivos específicos

- a) Avaliar se a rápida formação de NO e de peroxinitrito após a estimulação de células musculares lisas (células da linhagem A7r5) com LPS/IFN é essencial para a ativação celular.
- b) Avaliar a participação das NOS constitutivas e da NOX-1 na formação do pulso de espécies reativas.
- c) Avaliar a relevância biológica da via de sinalização induzida pelo pulso de NO e de peroxinitrito *in vivo* em ratos adrenalectomizados (ADX).
- d) Identificar a distribuição celular do GR em aortas de ratos ADX desafiados com LPS.
- e) Avaliar o efeito do LPS/IFN e do 7-NI sobre a distribuição celular do GR em células musculares lisas A7r5, na ausência de corticoides.
- f) Avaliar o efeito de um doador de NO (GTN) e de um doador de peroxinitrito (SIN-1) sobre a distribuição celular do GR em células musculares lisas A7r5.
- g) Avaliar o efeito da mutação GR^{dim/dim} e do 7-NI sobre o mecanismo de translocação nuclear de GR induzida pelo LPS/IFN, na ausência de corticoides, em fibroblastos imortalizados obtidos de animais tipo selvagem (WT, do inglês *Wild type*) e GR^{dim/dim}.
- h) Comparar a translocação nuclear do GR induzida por LPS/IFN com a translocação nuclear do GR induzida por ligante em células musculares lisas e fibroblastos WT e GR^{dim/dim}.
- i) Avaliar o efeito do 7-NI sobre a ativação celular e secreção da citocina IL-6 em fibroblastos WT e GR^{dim/dim} estimulados com LPS/IFN.

- j) Avaliar o efeito do 7-NI sobre mortalidade, secreção da citocina IL-6 e parâmetros metabólicos em camundongos WT e GR^{dim/dim} desafiados com LPS.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Aspectos gerais da resposta inflamatória na sepse

O termo sepse foi instituído por Hipócrates no século IV a.C. para definir o processo de decomposição de matéria orgânica. Desde o final do século XIX, este termo tem sido usado na medicina para definir um estado grave de toxicidade sistêmica associada à uma infecção (Pettigrew, 2014). Há uma grande heterogeneidade dentre os estímulos e agentes que podem levar à sepse. Este fato dificulta tanto o diagnóstico precoce da sepse quanto a adoção de tratamentos adequados, e por esta razão, continua gerando discussões no meio científico acerca de uma melhor definição para esta síndrome inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *Systemic Inflammatory Response Syndrome*) e seu tratamento (revisado em Pettigrew, 2014; Yende et al., 2014; Shankar-Hari et al., 2015). Atualmente, um conceito também aceito é de que a sepse é uma condição em que o paciente apresenta anormalidades contínuas na função de diversos órgãos (Vincent et al., 2013). De acordo com esta definição, a disfunção cardiovascular está bem estabelecida e aumenta de forma progressiva conforme a gravidade do quadro do paciente. A disfunção cardiovascular é caracterizada pela hipotensão e pela hiporeatividade à vasoconstritores (Matsuda and Hattori, 2007; Fernandes and Assreuy, 2008; Levy et al., 2010) e está intimamente relacionada com o mau prognóstico dos pacientes, que pode chegar até 50 a 70% de mortalidade (Angus et al., 2006; Mayr et al., 2013).

Sabe-se que na presença de infecção, como ocorre em grande parte dos casos de sepse, ou na presença de danos teciduais, diversos processos imunológicos são ativados no organismo na tentativa de remover o patógeno do hospedeiro e/ou reparar os danos teciduais por ele causados. A fisiopatologia da sepse e do choque séptico envolve a ativação de diferentes mecanismos, incluindo a liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias, a ativação de leucócitos e células endoteliais, bem como a ativação das cascatas do sistema complemento e de coagulação e a ativação de reflexos neuroendócrinos (revisado em Cohen, 2002; Deutschman and Tracey, 2014; Cohen et al., 2015).

Todos os eventos descritos acima fazem parte da resposta inflamatória que ocorre no hospedeiro. Embora esta seja essencial para controlar a infecção associada ao quadro séptico, uma resposta imune

exacerbada ou mal regulada pode ser a causa da sepse em muitos pacientes, ocasionando graves prejuízos ao paciente pela produção descontrolada de mediadores, podendo levar ao óbito (Cohen, 2002; Tsiotou et al., 2005). Os principais agentes responsáveis por desencadear o processo inflamatório na sepse, quando causada por bactérias, são o LPS, os peptídeoglicanos, o ácido lipoteicoico e a flagelina, também conhecidos coletivamente como PAMPs (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*). O mecanismo de ação do LPS, que é um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, é um dos mais estudados. O LPS é reconhecido pelas células do hospedeiro principalmente pela sua ligação aos TLR-4. Após esta ligação, ocorre uma cascata de sinalização que ativa diferentes cinases e culmina na translocação nuclear e ativação do NF- κ B (revisado em Rothwarf and Karin, 1999; Yoshimura et al., 2007; Ghosh and Hayden, 2008; Baker et al., 2011; Hayden and Ghosh, 2011).

Como consequência da ativação das vias inflamatórias, como a do NF- κ B pelos PAMPs, ocorre a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais que participam do recrutamento de leucócitos aos tecidos. Além disso, ocorre também o aumento da expressão da NOS-2, levando à liberação de elevadas concentrações de NO, que aumentam o relaxamento do músculo liso vascular contribuindo para a hipotensão na sepse (Spink et al., 1995; Cohen et al., 1998; Fernandes and Assreuy, 2008). O peroxinitrito, as citocinas pró-inflamatórias (como TNF- α , IL-1 β , IL-6) e os metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e os leucotrienos são também importantes mediadores da fisiopatologia da sepse (Cohen, 2002; Rudiger et al., 2008; Szabó and Módis, 2010; Liaudet et al., 2013; Deutschman and Tracey, 2014). A expressão destes mediadores na SIRS está associada ao desenvolvimento de uma resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, do inglês, *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*). O balanço e a intensidade de cada uma destas respostas influenciam diretamente a sobrevida do paciente séptico. Dessa maneira, o combate ao patógeno pelo processo inflamatório deve ser cuidadosamente regulado para não prejudicar o hospedeiro. Porém, uma das principais características da sepse é a resposta inflamatória excessiva, na qual o tratamento com uma das classes mais potentes de anti-inflamatórios, os glicocorticoides (GCs), ainda é controverso (Annane et al., 2009; Sprung et al., 2011).

3.2 Espécies reativas de oxigênio

As ROS podem ser geradas a partir de várias reações intracelulares, como, por exemplo, pelo transporte de elétrons na mitocôndria, pela atividade das NOX, das lipoxigenases (LOX) e ciclooxigenases (COX) que produzem superóxido durante sua atividade. Dentre as ROS, destacam-se o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxil (OH^{\bullet}). Em condições fisiológicas, as ROS geradas pela cadeia respiratória e outras enzimas atuam como segundos mensageiros, participando da homeostase dos tecidos. O aumento da produção de ROS é importante para combater patógenos invasores. Na presença da enzima mieloperoxidase e de uma fonte de íons cloreto o peróxido de hidrogênio é convertido em um potente microbicida, o ácido hipocloroso (Dröge, 2002; Lambeth, 2004). Enzimas antioxidantes atuam constantemente na neutralização destas ROS, como é o caso da superóxido dismutase (SOD) que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio (Lambeth, 2004). No entanto, quando as concentrações de ROS atingem concentrações elevadas e as enzimas antioxidantes não são capazes de neutralizar eficientemente estas espécies, se instala um processo chamado de estresse oxidativo. Durante condições de estresse oxidativo, as ROS reagem com inúmeras proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos causando danos muitas vezes irreversíveis às células pelo seu efeito citotóxico (revisado em Lambeth, 2004; Gloire et al., 2006; Morgan and Liu, 2011).

A neutralização das ROS é um processo finamente regulado, sendo demonstrado que baixas concentrações de ROS induzem a ativação de um fator de transcrição (Nrf2) que aumenta a produção de enzimas antioxidantes. Porém, quando ocorre um aumento da concentração intracelular de ROS para um nível intermediário, estas participam da sinalização para indução da resposta inflamatória através da ativação dos fatores NF- κ B e AP-1 (revisado em Dröge, 2002; Gloire et al., 2006; Morgan and Liu, 2011). Em condições de estresse oxidativo, em que as concentrações de ROS se encontram muito elevadas, ocorre um efeito citotóxico, o qual é evidenciado pela interrupção da cadeia respiratória e indução de mecanismos de apoptose e necrose. O estudo e a compreensão das ações sinalizadoras das ROS em cascatas intracelulares são bastante complexos. Esta complexidade se dá em virtude das ações das ROS variarem consideravelmente conforme o contexto, o tipo celular, a

quantidade e a distribuição celular onde as ROS são geradas (Dröge, 2002; Morgan and Liu, 2011).

Um exemplo desta complexidade pode ser observado na ação das ROS sobre a via do NF- κ B. As primeiras demonstrações de que as ROS participam da ativação do NF- κ B pelo LPS foram obtidas através do pré-tratamento de macrófagos com antioxidantes antes da estimulação com LPS (Asehnoune et al., 2004; Ryan and Smith, 2004). No mesmo ano, foi demonstrado que a produção de ROS após estimulação com LPS decorre da interação direta da enzima NOX-4 com o TLR-4 em macrófagos (Park et al., 2004) e em células endoteliais (Park et al., 2006). Foi demonstrado que outros estudos que as ROS podem induzir ou inibir a atividade do NF- κ B no citoplasma e no núcleo, dependendo do contexto e da célula (Gloire et al., 2006; Loukili et al., 2010; Morgan and Liu, 2011) apesar da hipótese mais aceita ser de que as ROS ativam o NF- κ B no citoplasma e inibem sua atividade no núcleo (Kabe et al., 2004; Mankan et al., 2009; Morgan and Liu, 2011).

3.3 Espécies reativas de nitrogênio

As espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *Reactive Nitrogen Species*) incluem o NO, o dióxido de nitrogênio (\bullet NO₂), o trióxido de di-nitrogênio (N₂O₃) e o peroxinitrito (ONOO⁻) e são formadas a partir da atividade das NOS e da reação do NO com o oxigênio molecular e demais ROS (Pacher et al., 2007; Liaudet et al., 2009).

O NO, uma das menores e mais simples moléculas sintetizadas no organismo, é um importante modulador endógeno que desempenha inúmeras funções biológicas (Moncada and Higgs, 2006). Endogenamente, este gás de curto tempo de meia vida é sintetizado pelas NOS, através da conversão da L-arginina em L-citrulina. As três principais isoformas das NOS são: NOS-1 ou nNOS (identificada primeiramente em neurônios), a NOS-2 ou iNOS (identificada em macrófagos) e a NOS-3 ou eNOS (identificada em células endoteliais) (Moncada and Higgs, 2006; Pacher et al., 2007).

Todas as NOS são heme proteínas que são ativas na forma de homodímeros e apresentam grande semelhança estrutural, dificultando o desenvolvimento de inibidores sintéticos seletivos (Alderton et al., 2001; Li and Poulos, 2005). As isoformas NOS-1 e NOS-3 são constitutivas na maioria das células e respondem fisiologicamente à ativação de

receptores e estímulos físicos, sendo ativadas pela cálcio-calmodulina ou por fosforilação. Uma vez ativadas, liberam pequenas quantidades de NO (na faixa de nM) por curtos períodos de tempo (segundos a minutos). A isoforma NOS-2, em geral, necessita ter sua expressão induzida por estímulos pró-inflamatórios (PAMPs). Uma vez expressa, a NOS-2 é ativada independentemente da cálcio-calmodulina e produz elevadas concentrações de NO (na faixa de μM) durante longos períodos (Alderton et al., 2001). Porém, em algumas situações a expressão das isoformas constitutivas também pode ser induzida, como ocorre em condições de hipóxia tecidual prolongada (Semenza, 2005) e na sepse (Nardi et al., 2014).

A fosforilação do resíduo de serina Ser1179 da NOS-3 pela Akt resulta no aumento da produção de NO, enquanto a fosforilação da Ser847 da NOS-1 por cinases dependentes de calmodulina leva à diminuição de sua atividade (Takata et al., 2011). Além da fosforilação, a interação com outras proteínas também exerce regulação da atividade das NOS, como ocorre com a HSP-90, que atua como um modulador alostérico da enzima. A interação das NOS constitutivas com as HSPs-90 aumenta a atividade das enzimas (Alderton et al., 2001), e a nitrosilação da HSP-90 pelo NO produzido por estas enzimas atua num mecanismo de retroalimentação negativa da atividade das NOS constitutivas (Martínez-Ruiz et al., 2005). Concentrações elevadas de NO também atuam como mecanismo de retroalimentação negativa, inibindo diretamente a atividade da NOS-2 (Assreuy et al., 1993) ou diminuindo a atividade do NF- κ B, o que diminui a expressão da NOS-2 (Matthews et al., 1996).

Além de estimular a guanilato ciclase solúvel (sGC), o NO é capaz de reagir com grupamentos sulfidrila (-SH) de resíduos de cisteína presentes em inúmeras proteínas, dando origem aos S-nitrosotióis. Os nitrosotióis se tornam reservas bioativas de NO plasmático e tecidual, uma vez que o NO pode ser transferido de um nitrosotiol para outros tióis vicinais, como a glutatona reduzida (GSH), causando modificações pós-translacionais que modulam a função de várias proteínas (revisado em Stamler et al., 2001; Hess et al., 2005). Canais de K^+ dependentes de cálcio na musculatura lisa vascular (Bolotina et al., 1994), NF- κ B (Matthews et al., 1996; Chattopadhyay et al., 2010) e GR (Galigniana et al., 1999) são alguns exemplos de proteínas que sofrem alteração da funcionalidade devido à nitrosilação de sulfidrilas (revisado em Stamler et al., 2001; Hess et al., 2005).

O peroxinitrito é gerado a partir da reação espontânea do NO com o ânion superóxido, quando estes são formados vicinalmente. A reação do NO com o ânion superóxido ocorre até 8 vezes mais rápido que a reação de decomposição do superóxido pela SOD, possibilitando a formação de grandes quantidades de peroxinitrito até que o ânion superóxido seja neutralizado. O peroxinitrito tem uma meia-vida de 10 ms e atravessa facilmente as membranas biológicas, podendo se difundir por até 2 células adjacentes ao local de sua produção. Por esta característica e por ser uma RNS mais reativa que o NO, o peroxinitrito é considerada uma molécula com potente ação oxidante e nitrante de proteínas e lipídios (Pacher et al., 2007; Szabó et al., 2007; Liaudet et al., 2009).

Em condições fisiológicas a formação de peroxinitrito é baixa devido à neutralização do ânion superóxido pela SOD e à produção de concentrações basais de NO. Contudo, durante processos inflamatórios ocorre um aumento substancial na produção tanto de ROS quanto de NO em quase todos os tipos celulares, o que culmina na produção de grandes quantidades de peroxinitrito (Pacher et al., 2007; Szabó et al., 2007; Liaudet et al., 2009). Uma vez formado, o peroxinitrito pode nitrar resíduos de tirosina, por um mecanismo que retira um átomo de hidrogênio da tirosina e forma um radical tirosil, o qual reage com o $\cdot\text{NO}_2$. Esta reação não é reversível e por isso a formação de 3-nitrotirosina é considerada um dos principais biomarcadores de estresse nitrosativo. A função e estrutura de diversas proteínas é alterada pela nitração de seus resíduos de tirosina. A nitração também altera a atividade catalítica de enzimas, interfere na organização do citoesqueleto e prejudica a transdução de sinais intracelulares (Pacher et al., 2007; Szabó et al., 2007; Morgan and Liu, 2011).

3.4 Aspectos gerais sobre os glicocorticoides

A descoberta dos corticosteroides deu-se a partir das observações feitas pelo médico Thomas Addison em 1849 e pelo fisiologista Charles-Édouard Brown-Séquard em 1856. Addison havia observado que pacientes com lesões nas glândulas adrenais apresentavam um mau prognóstico e iam a óbito. Ao remover as glândulas adrenais de animais, Brown-Séquard também observou que esses animais não sobreviviam, concluindo que a morte resultava da falta de substâncias vitais produzidas pelas glândulas e liberadas na corrente sanguínea (Erhuma, 2012). Atualmente, sabe-se que Brown-Séquard estava se referindo aos

corticoides (GCs e mineralocorticoides) e catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) sintetizadas pelas adrenais.

Enquanto as catecolaminas são sintetizadas na medula da adrenal sob estimulação do sistema nervoso autônomo simpático, os corticosteroides são liberados pelo córtex da glândula sob situações de estresse fisiológico, como o choque séptico e/ou ambiental através da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). A estimulação do hipotálamo leva à liberação do hormônio corticotrófico (CRH), o qual estimula a liberação na corrente sanguínea do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela adenohipófise. O ACTH é agonista do receptor MC2R presente no córtex da adrenal, induzindo a síntese e liberação dos corticosteroides na corrente sanguínea (Venkataraman et al., 2007; Oakley and Cidlowski, 2013b). Atualmente, sabe-se que receptores do tipo *Toll-like*, ativados por mediadores inflamatórios, tais como o LPS e o ácido lipoteicoico, estão presentes na pituitária e no córtex da glândula adrenal. A presença desses receptores no eixo HHA parece participar do mecanismo de retroalimentação negativa, auxiliando a secreção de glicocorticoides para limitar o efeito destrutivo do processo inflamatório (Venkataraman et al., 2007).

Uma vez liberados na corrente sanguínea, cerca de 90% dos GCs (cortisol no ser humano e corticosterona nos roedores) são captados por globulinas transportadoras de corticosteroides e carregados até seus inúmeros sítios de ação, onde são fixados nos tecidos alvo ou degradados dentro de uma ou duas horas. Os GCs difundem-se rapidamente da circulação para órgãos, tecidos e células devido à sua natureza lipofílica e hidrofóbica, fazendo-se presentes em todos os sistemas do organismo, bem como em quase todas as funções fisiológicas, celulares e moleculares (Duma et al., 2006). Dentre suas ações fisiológicas mais notáveis estão o aumento da gliconeogênese e imunossupressão, as quais são respostas deflagradas pelo organismo frente aos desequilíbrios de homeostase mais comuns, hipoglicemia e a inflamação, respectivamente. Percebe-se, portanto, que esses hormônios possuem atribuições importantes no organismo, e suas ações podem ser consideradas parte de uma resposta adaptativa desenvolvida para manter a homeostase do organismo durante situações de estresse (Wilckens, 1995; Franchimont et al., 2002; Barnes, 2011).

Os GCs foram e ainda são considerados os anti-inflamatórios mais eficazes existentes. Por esta razão, também estão entre as classes de medicamentos mais prescritas em todo mundo, disponíveis em diferentes formulações e formas farmacêuticas (Duma et al., 2006; De Bosscher and Haegeman, 2009a). A descoberta da ação anti-inflamatória dos GCs se deu em setembro de 1948, quando o médico Philip Hench, em colaboração com o cientista Edward Kendall, tratou uma jovem paciente com um quadro grave de artrite reumatoide com um composto (cortisona) isolado por Kendall. Após quatro dias de tratamento, a paciente havia conseguido voltar a andar normalmente. Essa descoberta lhes rendeu o Prêmio Nobel de Medicina em 1950, juntamente com Tadeus Reichstein, que independentemente também isolou a cortisona (Heitzer et al., 2007; Erhuma, 2012). De maneira geral, os GCs diminuem a inflamação e as reações alérgicas por: 1) diminuírem a permeabilidade vascular e formação de edema; 2) diminuírem a deposição de fibrina; 3) diminuírem a expressão de moléculas de adesão e inúmeras proteínas pró-inflamatórias, como prostaglandinas, COX-2, NOS-2 e inúmeras citocinas, com conseqüente menor migração de leucócitos para o sítio inflamatório e 4) pela diminuição da degranulação e liberação de mediadores inflamatórios pelos granulócitos (Smoak and Cidlowski, 2004; Erhuma, 2012).

Apesar do amplo uso terapêutico dos GCs como anti-inflamatórios, antialérgicos, imunossuppressores, e mais recentemente como coadjuvantes no tratamento de cânceres de origem hematológica pela indução de apoptose, esses medicamentos geram inúmeros efeitos colaterais quando utilizados por longos períodos e em doses elevadas (Ortsäter et al., 2008; Ayroldi and Riccardi, 2009; Beck et al., 2011). Como os efeitos colaterais dessa classe de medicamentos possuem relevância clínica (como por exemplo causando redução da massa muscular, resistência à insulina, deposição abdominal de gordura, osteoporose e resistência à ação dos GCs), podendo diminuir a adesão ao tratamento, um dos grandes desafios da atualidade é desenvolver GCs e/ou compostos sintéticos que promovam com eficiência o efeito terapêutico desejado, gerando mínimos efeitos colaterais (Duma et al., 2006; Löwenberg et al., 2008; De Bosscher and Haegeman, 2009a). Para isso, é necessário buscar uma melhor compreensão dos mecanismos e vias de sinalização envolvendo os receptores de GCs, pois os mecanismos de ação genômica dos GR podem causar efeitos colaterais (Duma et al., 2006; Beck et al., 2011; Vandevyver et al., 2013). Nesse sentido, a

clonagem do receptor em 1985 (Hollenberg et al., 1985) abriu caminho para um grande salto no conhecimento acerca desse assunto nas duas últimas décadas, como será apresentado a seguir.

3.5 Aspectos gerais e recentes sobre os receptores de glicocorticoides

As ações dos GCs se dão através da ativação de receptores de GCs (GR ou NR3C1). Esses receptores são expressos em todos os tipos celulares e são fatores de transcrição ativados por ligantes, pertencentes à superfamília de receptores nucleares, que incluem os receptores para GCs, mineralocorticoides, progesterona, androgênios, estrogênios, hormônios da tireoide, vitamina D e ácido retinoico (Smoak and Cidlowski, 2004; Heitzer et al., 2007; Beck et al., 2011).

Existem duas principais isoformas de GR, GR α e GR β , que são gerados pelo *splicing* alternativo de um único gene e diferem apenas em sua região C-terminal. O GR α totaliza 777 aminoácidos e é o alvo de ligação dos GCs, levando à ativação de genes responsivos aos GCs. Já a isoforma β , que não é capaz de se ligar aos GCs, totaliza 742 aminoácidos e é encontrada principalmente no núcleo. Apesar da relevância biológica do GR β ainda não estar clara, acredita-se que o mesmo atue como regulador negativo da isoforma GR α , pois, apesar da isoforma β não induzir transcrição de genes, ela é capaz de se ligar em regiões responsivas aos GCs (GREs, do inglês *Glucocorticoid Response Elements*) e regular a sensibilidade das células à ação dos GCs (Smoak and Cidlowski, 2004; Barnes, 2006; Revollo and Cidlowski, 2009). Recentemente foi demonstrado que o GR β desempenha atividade transcricional intrínseca em genes que não são regulados pelos GCs (Kino et al., 2009).

Na ausência de ligantes, os receptores são encontrados predominantemente no citoplasma, sob a forma de complexos com diversas proteínas acessórias (hsp90, hsp70, hsp56, p23 e imunofilinas). Esse complexo guia a conformação do GR, de maneira dependente de ATP, para mantê-lo num estado conformacional de alta afinidade de ligação aos GCs (Adcock, 2000; Vandevyver et al., 2012b; Kirschke et al., 2014). No entanto, a distribuição celular dos receptores pode ser também nuclear, uma vez que esses receptores transitam ativamente entre o citoplasma e o núcleo, dependente de um equilíbrio entre as taxas de

importação e exportação nuclear do receptor (Savory et al., 1999; Beck et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que o aumento na sua densidade pode afetar a localização e a conformação do receptor, promovendo uma dimerização independente de ligante. A dimerização prévia facilita a posterior ligação dos GCs e indução do mecanismo de ação dependente de dimerização (Robertson et al., 2013b).

Durante muitas décadas, assumiu-se que a translocação nuclear do GR ocorria apenas após a dimerização do receptor no citoplasma, por um sistema de difusão. Nesse modelo clássico, quando um agonista ou antagonista se liga ao domínio de ligação do ligante (LBD, do inglês *Ligand Binding Domain*) do receptor, ocorre uma alteração conformacional que expõe a sequência de localização nuclear (NLS, do inglês *Nuclear Localization Signal*) e causa a dissociação do GR com as proteínas acessórias, para posterior formação de dímeros de GR. Ao expor o NLS, o receptor complexado com seu ligante é translocado para o núcleo através dos poros da membrana nuclear, tendo seu sítio de ligação ao DNA (DBD, do inglês *DNA Binding Domain*) exposto para poder interagir com o DNA (Sanchez, 1992; Savory et al., 1999; Oakley and Cidlowski, 2013b; Robertson et al., 2013a). Evidências experimentais mostraram que a cinética de translocação do GR para o núcleo varia conforme o ligante, e que o GR possui mais de um NLS e que o NLS exposto parece ditar a localização nuclear do receptor em condições fisiológicas altamente específicas (Savory et al., 1999; Davies et al., 2002; Galigniana et al., 2004). Através destas evidências foi possível entender um pouco melhor a função das imunofilinas no complexo de proteínas acessórias do GR, propondo um novo modelo de translocação nuclear do GR.

Nesse novo modelo, quando um agonista ou antagonista se liga ao LBD do receptor, ocorre uma alteração conformacional que expõe o NLS, sinalizando para que a imunofilina FKBP51 (do inglês, *FK506-binding protein 51*) seja trocada pela imunofilina FKBP52. Uma vez que a FKBP52 (do inglês, *FK506-binding protein 52*) é ligada ao complexo, ela interage com a proteína carreadora, a dineína, que transporta o complexo todo através do citoesqueleto até o poro nuclear sem a formação prévia de dímeros de GR. Acredita-se também, que a presença da FKBP52 auxilie na interação do complexo com o poro nuclear, facilitando a entrada deste no núcleo bem como a exportação para o citoplasma do restante do complexo (Davies et al., 2002; Storer et al., 2011; Vandevyver

et al., 2012b). O transporte do complexo do GR pelo poro nuclear para dentro do núcleo ocorre através da associação com outras proteínas acessórias que ficam na região perinuclear, chamadas de importinas. Atualmente, sabe-se que diferentes importinas são recrutadas pelos diferentes NLS e estão associadas com a diferença na cinética de translocação nuclear do GR induzida por diferentes estímulos (Ito et al., 2006a; Echeverría et al., 2009; Galigniana et al., 2010; Hakim et al., 2013).

3.6 Modelos de animais transgênicos para o GR

A clonagem do GR em 1985 foi um marco no estudo acerca desses receptores (Hollenberg et al., 1985). A clonagem de animais e células com depleção total, parcial ou com diferentes mutações do GR tem permitido avaliar seu papel em diferentes tecidos e células, bem como a função de cada estrutura no receptor. Dessa forma, observou-se que os GR são essenciais à vida, pois a depleção total do GR de camundongos (GR^{null}) resulta em graves anormalidades no desenvolvimento dos pulmões, e morte logo após o nascimento (Cole et al., 1995). Já animais modificados para expressar quantidades muito elevadas do GR são resistentes ao choque séptico, provavelmente, pelo melhor controle da resposta inflamatória (Reichardt et al., 2000). Para impedir a expressão do GR apenas em determinados tecidos e órgãos, fez-se uso de técnicas de engenharia genética. Como exemplo do conhecimento adquirido pela depleção parcial do GR, descobriu-se que: i) GR hepáticos são responsáveis pela gliconeogênese e pela produção do fator de crescimento do tipo insulina (IGF)-1 responsável pelo crescimento pós-nascimento (Opherk et al., 2004; Tronche et al., 2004); ii) camundongos deficientes em GR no SNC exibem alterações no eixo HHA e desenvolvem inúmeras anormalidades comportamentais (Boyle et al., 2006); iii) camundongos com deleção do GR em macrófagos (Bhattacharyya et al., 2007) ou em células endoteliais são mais sensíveis a estímulos pró-inflamatórios (Goodwin et al., 2013).

Até 2011, pelo menos 250 diferentes mutações no GR já haviam sido testadas experimentalmente, contribuindo com o avanço do entendimento sobre os mecanismos utilizados pelos GR. Através de mutações nos dois “dedos” de zinco presentes no DBD (Figura 1A) foi confirmado que os mesmos são cruciais para a ligação do GR ao DNA (Limbourg and Liao, 2003; Beck et al., 2011). Criou-se então, uma nova mutação em um dos

domínios de dimerização do receptor (Figura 1B), que consiste na troca de um aminoácido localizado no DBD (região D loop) (Figura 1A) e gera o impedimento da ligação do receptor ao DNA *in vitro* (Heck et al., 1994). Com base nessa mutação, outro grupo criou animais transgênicos deficientes na dimerização do GR (GR^{dim/dim}). Diferentemente dos animais com deleção total do GR, os animais GR^{dim/dim} são viáveis, mesmo apresentando importantes alterações em funções fisiológicas mediadas pelos GR (Reichardt et al., 1998). Através de experimentos utilizando animais GR^{dim/dim}, cujos GR não são capazes de induzir a expressão de genes dependentes da ligação à GREs pela incapacidade de se ligarem ao DNA, foi evidenciada a importância do mecanismo de transativação para o efeito anti-inflamatório do GR (Adcock et al., 2006; Vandevyver et al., 2013). Dessa forma, animais GR^{dim/dim} são muito mais sensíveis à inflamação do que animais do tipo selvagem (Kleiman et al., 2012).

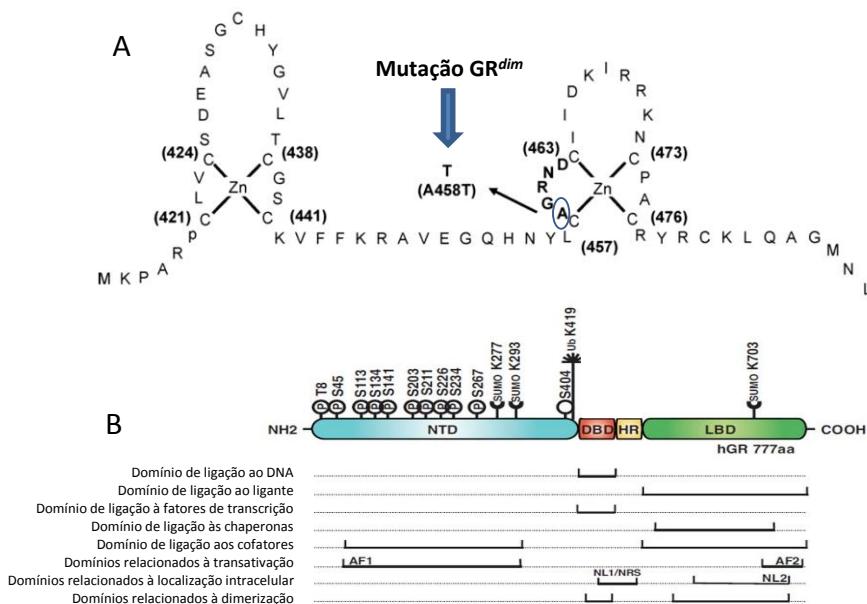


Figura 1. Estrutura e domínios do receptor de glicocorticoide (GR). (A) A figura aumentada mostra o domínio de ligação ao DNA com a sequência de aminoácidos (abreviados por letras) dos dois dedos de zinco e o “loop” de dimerização (em negrito). É mostrada a mutação de A por T na posição 458, que causa a deficiência na dimerização do GR. (B) O esquema mostra a estrutura do GR com seus diferentes domínios e os respectivos sítios de modificações pós-translacionais. A função dos domínios e subdomínios está indicada abaixo do esquema. Abreviações: NTD, domínio N-terminal; P, fosforilação; SUMO, SUMOilação; DBD, domínio de ligação ao DNA; Ub, ubiquitinação; HR, região dobradiça; LBD, domínio de ligação do ligante; AF, função de ativação; NLS, sequência de localização nuclear. Adaptado de Beck *et al.*, 2011. (Beck *et al.*, 2011).

3.7 Mecanismos de ação mediados pelo GR

Após a difusão dos GCs para o meio intracelular, ocorre a interação com seus receptores (os GR). Essa interação desencadeia uma variedade de respostas a nível celular que culminam em alterações no metabolismo de carboidratos, proteínas, lipídios, na função do sistema imune, no tônus vascular e nas funções do SNC, entre outros (Adcock, 2000; Revollo and Cidlowski, 2009). Tem sido demonstrando nos últimos anos que os

mecanismos pelos quais o complexo GC-GR pode promover seus efeitos, dependem do tecido, do tipo celular, da condição em que o organismo se encontra e das modificações pós-translacionais que recairão sobre o GR. Essa diversidade se dá pelo fato dos GR serem expressos em todas as células do organismo, exceto hemácias, e por serem regulados por diversos mecanismos. Estes mecanismos podem alterar sua distribuição celular, sua interação com outras proteínas, sua capacidade de ligação aos GCs, sua sensibilidade aos GCs, sua degradação e, conseqüentemente, sua densidade intracelular (Adcock, 2000; Adcock et al., 2006; Duma et al., 2006). A seguir serão discutidos esses mecanismos, incluindo as descobertas mais recentes acerca do assunto.

3.7.1 Mecanismos de ação genômico – Transativação e Transrepressão

O mecanismo clássico de ação genômica dos GR, assim como o de outros fatores de transcrição, promove a transcrição de genes através de remodelação da cromatina e recrutamento de RNA polimerase para o GRE em questão, podendo, no entanto, também impedir a transcrição de outros genes. Esses dois mecanismos são chamados de transativação e transrepressão, respectivamente. Ambos necessitam que algum tipo de ligante forme um complexo com o receptor, e que o mesmo seja translocado para o núcleo. Após a chegada do complexo GC-GR no núcleo, este pode interagir diretamente ou indiretamente com os GREs ou com os elementos negativos responsivos aos GC (nGREs, do inglês *negative Glucocorticoid Responsive Elements*) (Figura 3) (Beck et al., 2011). Estima-se que haja entre 2.000 e 30.000 sítios de ligação para o complexo GC-GR dispersos pela cromatina de cada célula (Adcock, 2000). No entanto, a disponibilidade desses sítios de ligação depende do estado em que se encontra a cromatina, sendo específico para cada tecido e tipo celular. Além disso, alguns GREs são ocupados pelos GR com concentrações reduzidas de GCs, enquanto outros requerem doses elevadas de GCs para que ocorra a ligação dos GR. Portanto, a acessibilidade à cromatina e sensibilidade diferenciada dos GREs ajuda a explicar porque os GCs desencadeiam determinados efeitos em um tecido, e outros totalmente diferentes em outros tecidos (Oakley and Cidlowski, 2013a).

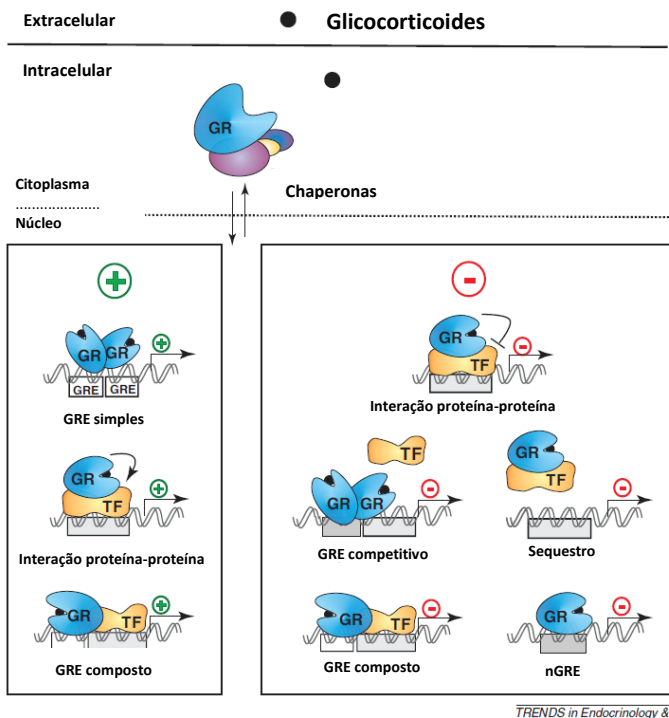


Figura 2. Resumo esquemático dos mecanismos de ações genômicas do GR. O GR é encontrado no citoplasma complexado com proteínas acessórias que mascaram a NLS do receptor e o mantém num estado de alta afinidade pelo ligante, o GC. Os GCs atravessam livremente a membrana plasmática e se ligam ao GR no citoplasma. Após essa ligação o GR muda sua conformação, expondo a NLS, sendo translocado para o núcleo. Entretanto, o GR ligado ou não ligado pode transitar livremente entre o citoplasma e o núcleo. No núcleo, o GR ligado pode exercer efeitos positivos e negativos sobre a transcrição gênica por diferentes mecanismos, como mostrado. O mecanismo clássico de transativação do GR envolve a ligação de homodímeros de GR a uma sequência palindrômica de elementos responsivos aos GCs (GREs), enquanto o mecanismo de transrepressão mais comum é através da interação proteína-proteína do GR com fatores de transcrição já ligados ao DNA, como NF- κ B ou AP-1. No entanto, o GR também pode ativar e reprimir promotores de genes por outros mecanismos. Abreviações: TF, fatores de transcrição. Adaptado de Beck et al., 2011 (Beck et al., 2011).

O mecanismo mais clássico de transativação ocorre pela formação de homodímeros de GR. Atualmente, o modelo mais aceito é de que a formação dos dímeros ocorra após a ligação do GR ao GRE. Após a

ligação do receptor ao DNA e da formação dos dímeros, as mudanças conformacionais que ocorrem nessa situação recrutam cofatores, como histonas acetil transferases (HAT, do inglês *histone acetyl transferase*), que alteram o estado da cromatina e facilitam a transcrição gênica (Barnes, 2006). A sequência do gene em questão parece ser importante na indução da formação do dímero de GR, e também no recrutamento de diferentes cofatores para interação com este complexo (Gronemeyer and Bourguet, 2009). Através de experimentos com células obtidas de animais $GR^{dim/dim}$, observou-se que nem todos os promotores ativados por GCs eram inibidos nestas células, indicando que haviam mecanismos adicionais de transativação (Rogatsky et al., 2003). Descobriu-se então que monômeros de GR podem atuar de forma sinérgica com outros fatores de transcrição através da ligação com GREs compostos, aumentando a transcrição gênica do outro fator, como é o caso da colaboração do GR com a expressão de proliferina pelo fator de transcrição ativador de proteína-1 (AP-1) e do promotor do gene do receptor TLR-2 (Kassel and Herrlich, 2007; De Bosscher and Haegeman, 2009b). A transativação pode ainda se dar através da interação proteína-proteína de uma molécula do receptor com outro fator de transcrição, como as STAT-5, 3 e 6 (do inglês *Signal Transduction and Transcription proteins*), atuando como um cofator positivo do outro fator de transcrição (Revollo and Cidlowski, 2009; Beck et al., 2011; Oakley and Cidlowski, 2013a). Os genes das enzimas hepáticas (tirosina aminotransferase e alanina aminotransferase) envolvidas na gliconeogênese e das proteínas anti-inflamatórias/imunossupressoras como a anexina-1, a fosfatase de especificidade dual (DUSP-1 ou MKP-1), a I κ B e a interleucina (IL)-10, são alguns exemplos de genes regulados pelo mecanismo de transativação do GR (Ayroldi and Riccardi, 2009; Revollo and Cidlowski, 2009; Vandevyver et al., 2012a).

O mecanismo de transrepressão pode ocorrer por diversas maneiras, podendo ser deflagrado tanto por monômeros, quanto homodímeros de GR e, principalmente, através da interação proteína-proteína com outros fatores de transcrição. Na forma de monômeros, o GR pode interagir diretamente com um ponto crítico do fator de transcrição antes que este se ligue ao seu elemento responsivo no DNA. Neste caso, melhor descrito para o fator de transcrição nuclear NF- κ B, essa interação pode se dar tanto no citoplasma, quanto no núcleo, impedindo desde a sua ativação e translocação nuclear, até a sua capacidade de ligação ao DNA (Doucas et al., 2000; Revollo and

Cidlowski, 2009). Pode ainda ocorrer a transrepressão indireta dos GCs, através do aumento da expressão da proteína GILZ (do inglês *glucocorticoid-induced leucine zipper*). Essa proteína pode interagir com proteínas de membrana associadas à ativação de diversas cinases, com a subunidade p65 do NF- κ B e com as subunidades c-Fos e c-Jun do fator AP-1, prejudicando a ativação de todas essas vias (Vandevyver et al., 2013). O mecanismo de inibição dos fatores de transcrição pela interação proteína-proteína foi comprovado em pacientes asmáticos que faziam uso de doses elevadas de GCs e que obtiveram melhora da resposta inflamatória não associada à diminuição da ligação do NF- κ B ao DNA (HART et al., 2000).

Outra maneira pelas quais monômeros do GR podem reprimir a transcrição gênica, é através da ligação entre o GR e fatores de transcrição após a associação dos fatores ao DNA, podendo ser uma ligação direta ou dependente da presença de co-repressores (Almawi and Melemedjian, 2002). Esse mecanismo foi descrito para importantes fatores de transcrição, como NF- κ B, AP-1, Smad3 (do inglês *Mothers against decapentaplegic homolog 3*) e MSK1 (do inglês *nuclear kinase mitogen- and stress-activated protein kinase-1*), diminuindo a ativação desses fatores, os quais têm sua atividade transcricional aumentada durante processos inflamatórios (Adcock et al., 2006; Duma et al., 2006; De Bosscher and Haegeman, 2009b). O GR também pode impedir o recrutamento de alguns cofatores necessários para a transcrição gênica dos outros fatores de transcrição. O impedimento do recrutamento de cofatores como as HAT (Adcock et al., 2006; Revollo and Cidlowski, 2009) e da MSK1, ou o recrutamento de cofatores que reprimem a transcrição gênica, como as histonas desacetilases (HDAC, do inglês *Histone deacetylase*), facilitam a interação destas proteínas com os fatores de transcrição em questão (Ito et al., 2006b; De Bosscher and Haegeman, 2009b).

A ligação do GR ao DNA também pode reprimir a expressão de genes através da interação com os nGREs. No entanto, apesar dos nGREs estarem presentes em cerca de mil genes ortólogos entre humanos e camundongos, não se sabe muito a respeito de como, exatamente, ocorre a transrepressão mediada por essas sequências, e se ela depende da ação monomérica ou dimérica dos GR. Como os nGREs são normalmente encontrados próximos a elementos responsivos ao DNA de outros fatores de transcrição, como NF- κ B, a ligação do GR ao nGRE pode impedir

alostericamente a ligação de outros fatores ao DNA, além de promover o recrutamento de co-repressores para o local (Revollo and Cidlowski, 2009; Surjit et al., 2011). Esse mecanismo também é sugerido para explicar alguns efeitos colaterais do uso de GCs. Como exemplo, o gene do receptor de insulina no fígado e da insulina no pâncreas, contêm um nGRE, e ao terem GR ligados a esse nGRE, a transcrição gênica e respectiva expressão do receptor de insulina no fígado e da insulina no pâncreas são diminuídas, contribuindo para a resistência à ação da insulina mediada pelos GCs (Surjit et al., 2011).

Recentemente, Surjit e colaboradores (2011) propuseram um novo modelo de transrepressão mediado através da ligação do GR a um nGRE “simples”. Nesse modelo, a mutação GR^{dim} e o tratamento com o antagonista RU486 impedem a transrepressão mediada por nGREs, enquanto os outros mecanismos de transrepressão não são afetados (Surjit et al., 2011). Esse modelo foi aprimorado pouco tempo depois por Hudson e colaboradores (2013), onde foi demonstrado que dois monômeros de GR se ligam aos nGREs com polaridades invertidas ao que se ligariam aos GREs, e adquirem uma mudança conformacional única, que juntamente com o recrutamento de co-repressores garantem a presença de única de monômeros de GR na ligação aos nGREs (Hudson et al., 2013).

Da mesma forma que monômeros de GR podem atuar em GREs compostos para aumentar a atividade transcricional de um fator de transcrição, podem também diminuir a atividade transcricional de outros fatores em outras condições. Ainda, quando o GR forma dímeros em GREs que também são elementos responsivos para outros fatores de transcrição, ocorre transrepressão por competição do sítio de ligação no DNA (Revollo and Cidlowski, 2009; Beck et al., 2011).

3.7.2 Mecanismo de ação não-genômico

Embora os principais efeitos dos GCs sejam mediados por mecanismos de ação genômicos, inúmeras evidências têm sugerido que os GR também podem atuar por mecanismo de ação não-genômico, que gera rápidas respostas celulares dentro de poucos segundos ou minutos e não requer mudanças na expressão gênica. Esse mecanismo de ação inicial, até o momento, não exclui a ocorrência dos demais mecanismos já comentados, e adiciona mais um grau de complexidade e diversidade para as ações dos GCs (Oakley and Cidlowski, 2013a).

Diversos mecanismos parecem estar envolvidos com a ação não-genômica dos GR, mas que em última análise parecem todos atuar negativamente sobre a atividade de diversas cinases, como a fosfatidilinositol-3-cinase (PI3K), proteína cinase B (Akt), tirosina cinase coativadora de receptores esteroides (Src), proteínas cinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e cinase regulada por sinal extracelular ERK (Venkataraman et al., 2007; Löwenberg et al., 2008; De Bosscher and Haegeman, 2009b). Após a descoberta de GR situados na membrana plasmática (mGR), percebeu-se que muitas das ações não genômicas dos GR se dão através da ativação desses receptores de membrana. Os mGR possuem algumas propriedades distintas dos GR citoplasmáticos, e estão provavelmente relacionados a vias de sinalização intracelulares mediadas por receptores acoplados à proteína G e cinases, podendo estes receptores se tornarem um novo alvo para o desenvolvimento de novos fármacos. Vale ressaltar que além das ações não genômicas mediadas pelos GR, doses elevadas de GCs podem atuar de maneira independente de GR e aumentando segundos mensageiros, como inositol-3-fosfato (IP3), monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e íon cálcio (Norman et al., 2004; Stahn et al., 2007; Löwenberg et al., 2008; De Bosscher and Haegeman, 2009b).

O mecanismo de ação não-genômico parece ter uma maior relevância no sistema vascular, além do combate à inflamação (Limbourg and Liao, 2003; Revollo and Cidlowski, 2009). No sistema vascular ocorre a interação proteína-proteína entre o GR ativado por ligante e a subunidade regulatória (p85 α) da PI3K de células endoteliais, juntamente com a ativação da proteína cinase Akt, a qual fosforila e ativa a NOS-3. Esse mecanismo é sugerido para a obtenção do rápido e transiente efeito protetor cardiovascular de doses elevadas de GCs. Esse efeito é almejado em alguns casos de emergência clínica, como no infarto e na isquemia do miocárdio para obter uma rápida diminuição da resistência periférica e pressão arterial acompanhada de um aumento do fluxo sanguíneo coronário e cerebral, minutos após a administração dos GCs (Limbourg and Liao, 2003). No entanto, os efeitos não-genômicos também parecem variar de acordo com o tecido, pois é sugerido que a rápida vasoconstrição e alteração no fluxo sanguíneo nos brônquios, poucos segundos a minutos após a inalação de GCs em crises asmáticas seja mediada por uma ação não-genômica (Adcock et al., 2006). Ainda, foi demonstrado que a estimulação de células endoteliais com dexametasona estimula rapidamente a ação da ERK e a cinase c-Jun N-terminal (JNK) MAPK,

esta pela indução de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando à ativação de fatores de transcrição como AP-1 (De Bosscher and Haegeman, 2009b).

Outra ação não-genômica bastante notável envolve a redução da produção do ácido araquidônico (AA) pela inibição da via de sinalização do fator de crescimento epidérmico (EGF, do inglês *Epidermal Growth Factor*). Esse mecanismo ocorre pela liberação da tirosina cinase Src do complexo de proteínas acessórias no momento em que o agonista se liga ao receptor, levando à fosforilação da anexina 1. A anexina fosforilada remove uma proteína adaptadora do receptor de EGF ativo, diminuindo a atividade citoplasmática da fosfolipase A₂ (cPLA₂), e, conseqüentemente, a produção de AA. Na clínica, observou-se que a administração de GCs em pacientes com artrite reumatoide diminui rapidamente o recrutamento de leucócitos para as articulações inflamadas (Limbourg and Liao, 2003; Revollo and Cidlowski, 2009). Já ativação de mGR parece utilizar a Src e ativação de MAPK para a rápida fosforilação da conexina-43 e regulação das junções comunicantes intercelulares (*gap junctions*) (Samarasinghe et al., 2011; Oakley and Cidlowski, 2013a). A ativação de mGR também participa da indução de apoptose de células mononucleares por um mecanismo ainda desconhecido (Stahn et al., 2007).

3.7.3 Mecanismo de ação por isoformas translacionais e modificações pós-translacionais

Um quarto mecanismo de ação ocorre pela transcrição de até 8 isoformas translacionais que podem ser transcritas pelo RNA mensageiro a partir de sítios alternativos de iniciação da transcrição gênica (promotores) do GR α . O GR α , com 777 aminoácidos, compõe a isoforma GR α -A e as outras 7 isoformas são chamadas de GR α -B, -C1, -C2, -C3, -D1, -D2, e-D3, em ordem decrescente de número de aminoácidos. Todas as isoformas possuem DBD e LBD idênticos, exibindo apenas a porção N-terminal truncada quando compara ao GR α -A. No caso extremo do receptor GR α -D3 a porção N-terminal é praticamente inexistente (Duma et al., 2006; Revollo and Cidlowski, 2009).

Apesar da afinidade de ligação pelo ligante ser muito similar em todas as isoformas, elas geram diferentes padrões de expressão gênica. Foi demonstrado que a isoforma GR α -C3 é mais eficiente em induzir genes pró-apoptóticos em linhagens de células de osteosarcoma que a

isoforma clássica GR α -A. As isoformas GR α -D1, GR α -D2 e GR α -D3 não são capazes de induzir a mesma resposta transcricional que a isoforma GR α -A. Pelo menos em parte, os mecanismos moleculares envolvidos nessas diferenças poderiam estar relacionados à capacidade de recrutamento de cofatores e à distribuição celular das isoformas, pois a isoforma GR α -D reside principalmente no núcleo, independente da presença de ligante. Como o nível de expressão dessas diferentes isoformas varia conforme o tecido, ainda não se sabe exatamente qual o impacto fisiológico e quais fatores são determinantes para a expressão de cada isoforma (Duma et al., 2006; Revollo and Cidlowski, 2009; Oakley and Cidlowski, 2013a).

Por ser um fator de transcrição, o GR tem sua atividade transcricional controlada por diversos mecanismos. Além da localização e interações moleculares no meio intracelular, o GR pode sofrer diferentes modificações pós-translacionais que, direta ou indiretamente, afetam a sua funcionalidade. As modificações mais estudadas até o momento (fosforilação, ubiquitinação e SUMOilação), podem ocorrer em diferentes sítios do GR (Figura 1A). A fosforilação do GR ocorre em resíduos específicos de serina localizados na porção N-terminal do receptor de acordo com a atividade de diferentes cinases, e na maior parte dos casos diminui a sensibilidade os receptores aos GCs. Como a grande diferença entre as isoformas de GR é o tamanho da porção N-terminal, esse fato acarreta numa maior diversidade de efeitos do GR e sensibilidade aos GCs, uma vez que nem todas as isoformas podem ser reguladas igualmente pela fosforilação de resíduos de serina, pela ausência destes resíduos em alguns casos. A ubiquitinação está relacionada com a degradação dos receptores por proteassoma que ocorre normalmente após a administração de agonistas. Essa modificação diminui a densidade e disponibilidade intracelular do GR e também está relacionada com a resistência à ação dos GCs. Ao contrário da ubiquitinação, a SUMOilação parece estar relacionada com a estabilização, localização e atividade transcricional do GR, aumentando normalmente sua atividade transcricional (Duma et al., 2006; Anbalagan et al., 2012; Oakley and Cidlowski, 2013a). Outras duas modificações pós-translacionais de GR demonstradas são a nitrosilação de resíduos de cisteína e nitração de resíduos de tirosina. A nitrosilação do GR parece estar relacionada com a diminuição da capacidade de ligação do GR e resistência à ação dos GCs (Galigniana et al., 1999; Duma et al., 2004; Colussi et al., 2008; Malhotra et al., 2011), enquanto a nitração parece

favorecer a translocação nuclear e atividade do receptor (Paul-Clark et al., 2003).

3.7.4 Novas vias de sinalização do GR

Na busca por ligantes de GR que sejam capazes de dissociar o mecanismo de transativação do mecanismo de transrepressão, visando a ampliação do efeito terapêutico com menos efeitos colaterais, foram desenvolvidos alguns compostos que parecem ter essa capacidade (Löwenberg et al., 2008; Vandevyver et al., 2013). O composto mais famoso é o Composto A, o qual é um ligante não esteroide, análogo estável do precursor hidroxifenil aziridina, derivado de um arbusto da Namíbia (*Salsola tuberculatiformis* Botshantzev). Foi demonstrado que o Composto A se liga seletivamente ao GR, e com alta afinidade, induzindo a translocação nuclear do receptor. No entanto, a via de sinalização desencadeada por esse composto ativa somente mecanismos de transrepressão por interação proteína-proteína com o NF- κ B (De Bosscher et al., 2005; Löwenberg et al., 2008; Gossye et al., 2010) e/ou ativação de nGREs (Hudson et al., 2013). Além disso, foi demonstrado que o Composto A impede a dimerização de GR e não causa, portanto, o efeito colateral de hiperglicemia, entre outros dependentes da dimerização do GR (De Bosscher et al., 2005; Hudson et al., 2013). Sugere-se que a via de sinalização induzida pelo Composto A envolva a indução de uma alteração conformacional do receptor diferente da que ocorre pela ligação de esteroides. Esse estado conformacional também parece não induzir a fosforilação do GR, uma modificação pós-translacional importante para o mecanismo de transativação e de sinalização para a degradação por proteassomas. Como a diminuição da quantidade de receptores está relacionada com a resistência aos GCs, a ação anti-inflamatória do Composto A é mantida mesmo após longos períodos de administração (Gossye et al., 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

As substâncias utilizadas neste estudo foram: lipopolissacarídeo bacteriano de *E. coli* sorotipo 0111:B4 (LPS), 7-nitroindazol (7-NI), iodônio de difenila (DPI), MitoTEMPO, propilenoglicol superóxido dismutase (PEG-SOD), ferroprotoporfirina IX – heme, dexametasona, RU-486, Hepes, glutamina, estreptomicina, penicilina, Hoechst 33342, albumina bovina fração V (BSA), tripsina, meio de montagem aquoso Gel-Mount®, sal balanceado de Hank's modificado (em g/L: fosfato de potássio 0.06, cloreto de potássio 0.4, fosfato de sódio dibásico heptahidratado 0.09, cloreto de sódio 8.0, D-glicose 1.0, vermelho de fenol 0.011, bicarbonato de sódio 0.35), fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), coquetel de inibidores de proteases (fluoreto de 4-(2-aminoetil)benzenosulfonil, pepstatina A, bestatina, leupeptina e aprotinina), anticorpo primário anti- β -actina conjugado com peroxidase, anticorpos primários anti-NOS-2 e anti-NOX-1 e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA); Interferon- γ recombinante de rato (IFN), IFN recombinante de camundongo e kit de ELISA para IL-6 adquiridos da PeproTech EC (Londres, UK); sal monopotássico 2-(4-carboxifenil)-4,5-diidro-4,4,5,5-tetrametil-1-imidazolil-1-oxi-3-óxido (c-PTIO) e cloreto de 5-amino-3-(4-morfolinil)-1,2,3-óxidiazólio (SIN-1) obtidos da Tocris (Michigan, EUA); FeTTPs adquirido da Calbiochem (Califórnia, EUA); trinitrato de glicerila (GTN), heparina sódica, lidocaína e isoflurano adquiridos da Cristália Produtos Farmacêuticos (São Paulo, BR); meio de cultura Minimal Essential Medium modificado por Dulbecco (DMEM), meio de cultura Opti-MEM, soro fetal bovino (SFB) e penicilina-estreptomicina adquiridos da GIBCO/Invitrogen Corporation (Nova Iorque, EUA); anticorpos primários anti-GR α/β , anti-NOS-1, anti-NOS-3 e anti- β -tubulina adquiridos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, EUA); anticorpos primários anti-NF-kB e anti-3-nitrotirosina obtidos da Millipore (Bedford, EUA); anticorpo primário anti-GR α adquirido da Abcam (Cambridge, UK); anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase adquirido da GE Healthcare (Pittsburgh, EUA); anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase adquirido Cell Signaling Technology (Danvers, EUA); anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488, anti-IgG de coelho conjugado com Cy5,

anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 633, sonda fluorescente DAF-FM DA, sonda fluorescente CM-H₂DCF-DA, Lipofectamina® 2000, RNA de interferência Silencer® pré-desenhados contra NOS-1, NOS-3, NOX-1 e controle adquiridos da Life Technologies Corporation (Nova Iorque, EUA); kit de quimiluminescência - ECL, padrão de peso molecular, membrana de nitrocelulose obtidos da Amersham (Aylesbury, UK); kit de quimiluminescência SuperSignal® obtido da Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, EUA); filme radiográfico 18x24 obtido da Trade-Medical Comércio de Materiais Hospitalares (São José, BR); Tissue Tek O.C.T. adquirido da Sakura Finetek Inc. (Torrance, EUA); kit de ELISA para corticosterona adquirido da IBL International GmbH (Hamburg, Alemanha); kit de ELISA para IL-6 adquirido da BD Biosciences Pharmingen (San Diego, EUA); ketamina e xilazina adquiridos da Vetbrands (São Paulo, BR); (DMSO), NaCl, KCl, CaCl₂.2H₂O, MgSO₄.7H₂O, KH₂PO₄, NaHCO₃ e demais sais de pureza absoluta obtidos da Merck (São Paulo, BR). O restante dos reagentes foi adquirido de companhias com comprovada certificação de qualidade.

4.2 Procedimentos experimentais *in vivo*

4.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas de 3 meses de idade, pesando entre 180 – 230 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), camundongos FVB/N WT e camundongos transgênicos GR^{dim/dim} machos e fêmeas de 3 meses de idade, pesando entre 20 – 25 g. Os camundongos transgênicos foram gerados por Reichardt et al. (1998) e cruzados entre si para gerar animais homocigotos GR^{dim/dim} e foram fornecidos pelo Biotério Central do “Center for Sepsis Control and Care” da Universitätsklinikum Jena, na Alemanha.

Todos os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (22 ± 2°C) e ciclo claro / escuro (12 / 12 h; luzes acesas às 07:00 horas) controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento, ou seja, não houve jejum. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o número PP00790 e estão de acordo com as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de

Experimentação Animal (CONCEA), bem como, estavam de acordo com as exigências do órgão regulamentador “Thüringer Landesamt für Lebensmittelsicherheit und Verbraucherschutz” (TLLV Thüringen; Erfurt, Alemanha).

4.2.2 Adrenalectomia

Ratos fêmeas receberam injeção de xilazina (5 mg/kg; i.p.) como medicação pré-anestésica e logo após foram anestesiados em um sistema fechado de isoflurano (5% para indução e 2% para manutenção anestésica). Após serem anestesiados, os animais tiveram os pelos da região lombar tricotomizados e receberam injeções locais subcutâneas de lidocaína 1% no local da incisão. A incisão resultou em uma abertura longitudinal de aproximadamente 2 cm na musculatura lombar permitindo o acesso à glândula suprarrenal, inserida na gordura perirrenal, próxima ao polo superior do rim.

A retirada das glândulas foi realizada com cuidado para evitar a ruptura das mesmas e das vísceras abdominais. Finalmente, foi realizada a sutura da incisão no músculo e na pele, e os animais foram colocados em caixas com maravalha em decúbito ventral, sob aquecimento até completa recuperação anestésica. Logo após o procedimento cirúrgico a água dos ratos adrenalectomizados (ADX) foi substituída por solução salina 0,9% para reposição de eletrólitos e manutenção dos níveis de sódio corporais contendo 200 mg/L de paracetamol como medicação analgésica pós-operatória. Os animais falso-operados receberam apenas água filtrada contendo paracetamol.

4.2.3 Coleta de sangue para obtenção de plasma e coleta de aorta torácica de ratos

Para coleta de sangue, os ratos foram anestesiados com uma mistura de ketamina e xilazina (90 e 15 mg/kg; i.p.; respectivamente) e realizada uma pequena abertura da cavidade torácica. Aproximadamente 4 mL de sangue foram coletados por punção cardíaca em tubo contendo heparina (5 UI /mL de sangue) e mantidos a 4°C. A obtenção do plasma foi realizada através da centrifugação dos tubos, a 4°C, por 8 minutos a 1200 g.

Após a coleta de sangue foi realizada a perfusão tecidual com salina 0,9% e posterior coleta da aorta torácica. A aorta foi mantida em PBS

gelado, dissecada delicadamente e dividida em dois segmentos. Esses segmentos foram cuidadosamente acondicionados em Tissue-Tek O.C.T. e congelados em seguida. Os blocos contendo os segmentos de aorta foram mantidos a -80°C até o momento da utilização.

4.2.4 Coleta de sangue para obtenção de plasma de camundongos

Para a coleta de sangue dos camundongos, os mesmos foram imobilizados num contensor próprio e tiveram a ponta da cauda delicadamente cortada com uma tesoura cirúrgica, sem chegar às vértebras. A cauda dos animais foi delicadamente ordenhada até a obtenção de aproximadamente 0,2 mL de sangue em um tubo contendo heparina (5 UI/mL de sangue). Os tubos foram mantidos a 4°C até serem centrifugados. A obtenção do plasma foi realizada através da centrifugação, a 4°C , por 8 minutos a 1200 g.

4.2.5 Coleta de sangue para dosagem da glicemia em ratos e camundongos

A obtenção de uma gota de sangue para dosagem da glicemia se deu através de um pequeno corte na ponta da cauda de ratos e camundongos, como descrito acima. A medida da glicemia foi realizada através de tiras reagentes do sistema Accu-Chek Performa (Roche Diagnóstica Brasil Ltda, São Paulo, BR), possibilitando o resultado imediato da glicemia em mg/dL.

4.2.6 Dosagem de corticosterona e citocinas no plasma

A dosagem de corticosterona no plasma de ratos foi realizada através de um kit de ELISA (do inglês, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; IBL International GmbH, Hamburg, Germany), seguindo-se as recomendações e instruções do fabricante. A dosagem da citocina pró-inflamatória IL-6 nas amostras de plasma de ratos e camundongos, e do sobrenadante das culturas celulares foi realizada através de kits de ELISA (PeproTech Inc, New Jersey, USA e BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA), seguindo-se as recomendações e instruções de cada fabricante.

4.2.7 Dosagem de nitrato e nitrito (NOx) no plasma de ratos

Os níveis plasmáticos dos metabólitos do NO foram dosados após a redução enzimática do nitrato a nitrito, pela enzima nitrato redutase expressa em *E. coli* cultivada em meio anaeróbico (Granger et al., 1990). Antes de ser realizada a conversão do nitrato a nitrito, as amostras de plasma foram desproteinizadas pela adição de 10% de sulfato de zinco (2%) e incubação em banho de gelo por 1 hora. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 4°C por 20 minutos a 10.000 g e o sobrenadante utilizado para realização da conversão do nitrato em nitrito.

Para a conversão, 100 µL das amostras desproteinizadas foram pipetadas em uma placa de 96 poços e adicionados 20 µL de tampão fosfato de sódio (0,5 M, pH 7,2), 20 µL de tampão formiato de amônio (2,4 M, pH 7,2) e 10 µL de uma suspensão de *E. coli* (cultivada em anaerobiose) em cada poço. Essa mistura foi incubada a 37°C por 3 horas. Após a conversão, a placa foi centrifugada para remoção das bactérias, e 100 µL do sobrenadante foram misturados a 100 µL do reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico e 0,1% de alfa-naftilenodiamina em água de Milli-Q) em uma placa de 96 poços, produzindo uma reação colorimétrica cuja intensidade é diretamente proporcional à concentração de nitrito na amostra.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada em 540 nm em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Curvas-padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente para possibilitar o cálculo da concentração de NOx nas amostras. Como nestas condições a conversão de nitrato para nitrito foi sempre maior que 95%, não foram realizadas correções dos resultados, os quais foram expressos como µM de NOx.

4.2.8 Imunofluorescência para GR em aorta de ratos

Os segmentos já congelados de aorta coletados 30 minutos após o desafio com LPS foram inseridos num criostato (Leica CM 1850, UV Biosystems, Leica, Wetzlar, Alemanha) para obtenção de cortes transversais de 5 µm de espessura (n = 3 por grupo). Os cortes foram colocados sobre lâminas previamente gelatinizadas e fixados com acetona p.a. por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, os cortes foram permeabilizados com PBS-Tween-20 0,5% durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após a permeabilização, as lâminas foram lavadas

3 vezes com PBS-Tween-20 0,1%, sob agitação por 5 minutos a cada lavagem. Na sequência foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos durante 1 hora com soro fetal bovino a 5%, à temperatura ambiente. Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas durante a noite com o anticorpo policlonal produzido em coelhos anti-GR α (1:100) a temperatura ambiente. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes, conforme mencionado anteriormente, e incubadas durante 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (1:500). Uma solução de 2,5 mg/mL de Hoechst 33342 foi incubada junto com o anticorpo secundário para marcação do núcleo em azul. Cortes incubados somente com o anticorpo primário, ou somente com o anticorpo secundário, foram utilizados para o controle de especificidade dos anticorpos. Após a marcação com o anticorpo secundário, as lâminas foram lavadas e montadas com lamínulas utilizando o utilizando meio de montagem aquoso Gel MountTM. As lâminas foram mantidas em ambiente escuro e úmido a 4°C até o momento da microscopia.

A microscopia de fluorescência foi realizada no microscópio de fluorescência ApoTome2 (Zeiss, Jena, Alemanha), com a objetiva de 40x. A aquisição das imagens foi realizada através do software AxioVision (Zeiss, Jena, Alemanha). Para facilitar a visualização da fluorescência no presente trabalho, todas as imagens tiveram seu brilho aumentado em 20% através da ferramenta disponível no software Microsoft Word®.

4.3 Protocolos experimentais

4.3.1 Curva de sobrevivência no modelo de endotoxemia

Avaliou-se o efeito do pré-tratamento com um inibidor seletivo para a NOS-1 sobre a sobrevivência de ratos ADX e de camundongos deficientes na dimerização de GR (GR^{dim/dim}) desafiados com LPS. O LPS foi diluído em PBS estéril (em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5 e NaH₂PO₄ 10,8; pH 7,4). O composto 7-nitroindazol (7-NI) foi preparado a partir de um estoque em DMSO e as diluições sucessivas feitas em PBS. A concentração final de DMSO foi de 2%. A dexametasona (DEXA) foi preparada a partir de um estoque em etanol p.a. e as diluições sucessivas feitas em PBS. A concentração final de etanol foi de 2%.

A dose de LPS utilizada nos experimentos com ratos falso-operados (sham) e ADX foi de 1 mg/kg, um décimo da dose usualmente utilizada

para indução do choque endotoxêmico em ratos. Essa dose foi determinada em função da sensibilidade dos ratos ADX à estímulos inflamatórios. Ratos ADX e sham foram divididos em diferentes grupos (n = 5 a 8 animais/grupo) e receberam os tratamentos (i.p.) descritos na Tabela 1:

Tabela 1: Divisão de grupos e respectivos protocolos de tratamento em ratos ADX e sham.

Sem pré-tratamentos	Pré-tratamento 1 hora antes do desafio	Tratamento 1 hora após o desafio	Tratamento 3 horas após o desafio
LPS 1 mg/kg	7-NI 0,2 mg/kg + LPS 1 mg/kg	LPS 1 mg/kg + 7-NI 0,2 mg/kg	LPS 1 mg/kg + DEXA 2 mg/kg
7-NI 0,2 mg/kg	DEX 2 mg/kg + LPS 1 mg/kg	LPS 1 mg/kg + DEXA 2 mg/kg	

Os camundongos WT e GR^{dim/dim} foram divididos em 2 grupos (n = 4 a 7) e receberam os seguintes tratamentos: LPS 10 mg/kg ou 7-NI 7,5 mg/kg + LPS 10 mg/kg.

O tempo de sobrevivência dos ratos foi monitorado de hora em hora por até 10 horas após a injeção de LPS. Já o tempo de sobrevivência dos camundongos foi avaliado em 6, 12, 24 e 48 horas após a injeção de LPS.

4.3.2 Avaliação dos parâmetros metabólicos e inflamatórios

Avaliou-se o efeito agudo do pré-tratamento com 7-NI sobre os parâmetros metabólicos (glicemia e corticosterona) e inflamatórios (NOx e citocina IL-6) de ratos ADX e falso operados, 30 minutos após a injeção de LPS ou veículo (PBS). Nos camundongos WT e GR^{dim/dim} desafiados com LPS, a glicemia foi medida no tempo zero e a cada 12 horas até 48 horas após o desafio com LPS. Os níveis de citocina IL-6 nos camundongos foram dosados no tempo zero e em 6 horas após o desafio com LPS.

4.4 Procedimentos experimentais *in vitro*

4.4.1 Cultura celular

Foram utilizadas três linhagens de células: uma linhagem de músculo liso vascular obtida de aortas torácicas de embriões de ratos, uma linhagem de fibroblastos embrionários obtidos de animais GR^{dim/dim} e outra linhagem de fibroblastos embrionários obtidos de animais WT. A linhagem de células musculares lisas A7r5 (ATCC CRL-1444), foi adquirida no banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Os fibroblastos embrionários foram gerados por Reichardt et al. (1998) e gentilmente fornecidas ao “Center for Sepsis Control and Care” pelo Professor Dr. Ian Tückermann. Todas as células foram cultivadas em placas de Petri descartáveis, próprias para cultura, contendo meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 10 mM de HEPES; pH 7,4 (doravante chamado apenas de DMEM completo) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas até a 10^a passagem e os repiques realizados a cada 2–3 dias, tempo aproximado para as células tornarem-se confluentes.

Para a realização dos repiques todo meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas com 6 mL de PBS estéril pré-aquecido. Após a remoção do PBS, cada placa recebeu 1 mL de solução de tripsina (0,25% v/v) /EDTA (0,03% v/v) pré-aquecida a 37°C para a digestão enzimática e remoção das células. A suspensão de células foi transferida para um tubo cônico contendo 4 mL de DMEM completo e centrifugadas por 10 minutos à temperatura ambiente (250 g). O sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspenso em 1 mL de DMEM completo para contagem do número de células e preparação dos demais protocolos experimentais. Em alguns experimentos as células tiveram o meio DMEM completo substituído por meio DMEM sem soro ou com soro passado em carvão ativado para remoção dos corticosteroides.

4.4.2 Avaliação da ativação celular por acúmulo de nitrito

Para avaliar se as células respondem à estimulação com LPS (1 µg/mL) e IFN-γ (200 U/mL) - LPS/IFN, foi utilizado como indicador a síntese de NO, medida de forma indireta através da quantificação do acúmulo de nitrito presente no sobrenadante da cultura celular em 24 ou 48 horas após a estimulação. De modo geral, as células foram plaqueadas

(4.10^4 células/poço) em placas de 96 poços e mantidas durante a noite em DMEM completo para adesão das células à placa de cultura. No dia seguinte, as células foram incubadas por 30 minutos com veículo ou o inibidor 7-NI (200 μ M) antes de serem estimuladas com LPS/IFN. Nas células A7r5, a mistura de LPS/IFN foi incubada por apenas 12 horas. Após esse tempo, todos os compostos foram lavados, e os poços preenchidos apenas com DMEM completo por mais 12 ou 36 horas. Nos fibroblastos, a incubação dos compostos e da mistura de LPS/IFN se deu por 24 horas.

Ao término dos tempos de incubação, foi realizada a coleta de 0,1 mL de sobrenadante. Em seguida, foi realizada a reação de Griess como descrito na Seção 4.2.7. Após estabilização da reação colorimétrica efetuou-se a leitura da placa em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça) em 540 nm. Uma curva padrão de nitrito foi preparada, em triplicata, e lida simultaneamente ao experimento. Os valores de absorvância do experimento foram interpolados com os valores da curva padrão no programa GraphPad Prism®, obtendo-se desta maneira as quantidades de nitrito produzidas pelas células durante o experimento em μ M. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média.

Esse protocolo foi realizado paralelamente aos outros experimentos desse trabalho como controle interno, utilizado como um indicativo funcional e indireto de que as células da mesma passagem e do mesmo experimento foram ativadas pelo estímulo. Esses experimentos foram realizados em triplicata.

4.4.3 Imunofluorescência em células

As células foram plaqueadas (8.10^4 células/poço) sobre lamínulas de vidro de 12 mm de diâmetro, previamente recobertas com gelatina estéril 0,5% durante 1 hora a 37°C e dispostas em placas de 12 poços. No dia seguinte, o meio das células musculares lisas A7r5 foi retirado e as células incubadas por 2 horas com meio DMEM sem soro antes da realização dos experimentos. Os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM passado em carvão ativado para remoção dos corticoides. Após adesão das células, as mesmas foram incubadas por 30 minutos com veículo ou com 7-NI (200 μ M) antes de serem estimuladas com LPS/IFN. As células musculares A7r5 também foram incubadas com um doador de NO (GTN;

10 μM), um doador de peroxinitrito (SIN-1, 100 μM) ou um antagonista do GR (RU-486; 1 μM). Fibroblastos WT e GR^{dim/dim} receberam também o tratamento com DEXA (1 μM) por 1 hora. A estimulação com LPS/IFN ou incubação com os outros compostos foi mantida por 1 ou 4 horas, conforme o experimento e o tipo celular.

Após os períodos de incubação, os poços foram lavados 2 vezes com solução de Hanks estéril e as células fixadas durante 5 minutos com metanol p.a. a 4°C. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes com PBS sob agitação durante 5 minutos, sendo este procedimento adotado para as demais lavagens. As células foram permeabilizadas com uma solução de PBS-Tween-20 0,3% durante 20 minutos. Um novo ciclo de lavagem foi realizado, utilizando-se a partir desta etapa a solução de PBS-Tween-20 0,1% para as lavagens. Sítios inespecíficos foram bloqueados durante 1 hora com 5% de soro fetal bovino diluído em PBS-Tween-20 0,1%. Após o bloqueio, as lamínulas foram cuidadosamente colocadas com as células voltadas para baixo, sobre 10 μL de anticorpo primário produzido em coelho anti-GR (1:200). Em alguns experimentos, foi realizada uma dupla marcação para GR e NF- κB , onde 10 μL de anticorpo primário produzido em camundongo anti-NF- κB -p65 (1:100) foram adicionados à solução do anticorpo anti-GR. Os anticorpos primários foram incubados durante a noite em ambiente úmido e a temperatura ambiente.

Na manhã seguinte, as células foram lavadas com PBS-Tween-20 0,1%, e incubadas com 10 μL do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Alexa Fluor 488 (1:500) ou 10 μL do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com Cy5 (1:400) durante 1 hora a temperatura ambiente. Nos experimentos de dupla marcação, além do anticorpo anti-coelho conjugado com Alexa Fluor 488, foram adicionados à mistura 10 μL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 633 (1:500). Uma solução de 2,5 mg/mL Hoechst 33342 foi utilizada para marcar o núcleo das células em azul. Após a marcação com o anticorpo secundário, as lamínulas foram lavadas com PBS-Tween-20 0,1% e montadas sobre lâminas de vidro, utilizando-se como meio de montagem o meio aquoso Gel Mount® ou Fluoromount®.

As lâminas foram acondicionadas em ambiente escuro e úmido, e mantidas a 4°C até o momento da microscopia. A microscopia de

fluorescência das células musculares lisas foi realizada no microscópio confocal Leica® DMI6000 B (Leica, Wetzlar, Alemanha), com a objetiva de 63x em óleo de imersão. A aquisição e análise dessas imagens foram realizadas através do software LAS AF Lite® (Leica, Wetzlar, Alemanha) e os resultados expressos como relação de intensidade de fluorescência nuclear, em porcentagem. A microscopia de fluorescência dos fibroblastos foi realizada no microscópio confocal Zeiss LSM 510 (Zeiss, Jena, Alemanha), com a objetiva de 63x em óleo de imersão. A aquisição e análise dessas imagens foram realizadas através do software Zen 2012 Black® (Zeiss, Jena, Alemanha). Os resultados foram expressos em unidades arbitrárias ou como relação de intensidade de fluorescência nuclear comparada ao grupo controle (veículo), em porcentagem. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Foram utilizados lasers de diodo, argônio e He-Ne para os respectivos comprimentos de onda 405, 488 e 633 nm. Para facilitar a visualização da fluorescência no presente trabalho, todas as imagens tiveram seu brilho aumentado em 20% através da ferramenta disponível no software Microsoft Word®.

4.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos de maneira singular para cada protocolo experimental, e as análises estatísticas realizadas de acordo com a necessidade e pertinência. As curvas de sobrevivência foram analisadas pelo teste de log-rank e as diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

Os demais resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média e a estatística realizada pelo teste t para comparação entre dois grupos e análise de variância (ANOVA), de uma ou duas vias, de medidas repetidas ou não, seguido do pós-teste de Bonferroni para comparação entre múltiplos grupos. Quando necessário, os valores foram transformados em logaritmos para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância, os quais foram comprovados através dos testes de Kolmogorov-Smirnov e de Bartlett, respectivamente. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, sendo todos os testes estatísticos realizados com o software GraphPad Prism® (San Diego, CA, USA).

5. RESULTADOS

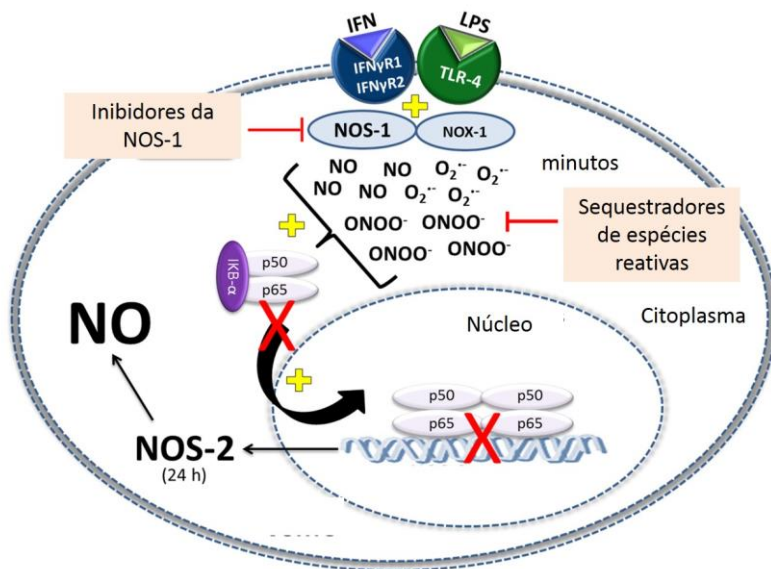
A disfunção vascular séptica é caracterizada por hipotensão e hiporeatividade à vasoconstritores. Sabe-se que o NO, as espécies reativas de oxigênio e o peroxinitrito participam da fisiopatologia dessa condição. No entanto, o mecanismo pelo qual a disfunção vascular é iniciada, é pouco compreendido.

Dados da literatura e de estudos anteriores do nosso grupo haviam sugerido que o NO oriundo da ativação da NOS-1, presente na musculatura esquelética, teria um papel fundamental na iniciação da resposta inflamatória (Duma et al., 2011). Porém, como a inibição da NOS-1 impedia a queda inicial na pressão arterial após a injeção de LPS, nos levou a pensar que esse efeito pudesse estar relacionado com a atividade das células musculares lisas. Com base nisso, foi criada a hipótese de que as NOS constitutivas e a formação de peroxinitrito poderiam desempenhar um papel importante no desenvolvimento da disfunção vascular séptica.

Para testar esta hipótese, foram utilizadas diferentes ferramentas farmacológicas em células musculares lisas A7r5 e cortes de aorta de rato estimuladas com LPS/IFN. As células e os cortes de aorta foram tiveram a síntese de NO e de peroxinitrito monitoradas através do uso de sondas fluorescentes após o estímulo. Tanto a estimulação das células em cultura, quanto a estimulação dos cortes de aorta *ex vivo* com LPS/IFN, levou a uma rápida (dentro de minutos) produção de NO e ânion superóxido, favorecendo a formação de peroxinitrito, evento que foi caracterizado como um pulso de NO e de peroxinitrito.

Quando a formação do pulso foi inibida pelo pré-tratamento com inibidores de NOS ou NADPH oxidases (NOX), a translocação nuclear de NF- κ B, expressão de NOS-2 e consequente elevação na produção de NO foram significativamente atenuadas nas células musculares lisas. Embora essas células expressem as duas isoformas de NOS constitutivas, o silenciamento dos genes das respectivas enzimas revelou que apenas o NO oriundo da NOS-1, e consequente formação de peroxinitrito, atuam na sinalização para expressão da NOS-2. Resultados semelhantes foram obtidos quando a enzima NOX-1, uma possível fonte de superóxido para a formação de peroxinitrito, foi silenciada.

Demonstramos nesse trabalho (Anexo I e disponível na íntegra em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661815001693>), que a estimulação de células musculares lisas por agentes pró-inflamatórios, como a mistura de LPS/IFN, levam à uma rápida síntese de NO oriundo da NOS-1 e de superóxido oriundo da NOX-1 para formação de peroxinitrito; e que estas espécies reativas atuam como agentes sinalizadores para a expressão de NOS-2 através da ativação do fator de transcrição NF- κ B. Como elevadas concentrações de NO e de peroxinitrito estão implicados na fisiopatologia da disfunção vascular séptica, nossas descobertas sugerem um papel crítico da ativação da NOS-1 e NOX-1 no início da disfunção vascular que ocorre na sepse. O esquema mostra um resumo dos achados apresentados no Anexo I.



Esquema 1: Estimulação de células com LPS/IFN levam a um pulso de NO, ânion superóxido e peroxinitrito, que modulam a ativação da via do NF- κ B e, consequentemente, a expressão de NOS-2 (adaptado de Scheschowitsch et al., 2015).

Tendo em vista que a ativação do NF- κ B pode ser controlada através de uma interação direta do tipo proteína-proteína com o GR, surgiu a hipótese de que esse pulso induzido por LPS/IFN poderia afetar a sinalização e distribuição celular do GR.

Nessa hipótese, o pulso inicial induzido por LPS/IFN poderia interferir com a via de sinalização do GR, induzindo sua translocação para o núcleo mesmo na ausência de ligante, juntamente com o NF- κ B, como havia sido demonstrado durante a primeira etapa do nosso trabalho. Nesse caso, parte do GR migraria para o núcleo a fim de controlar alostericamente a ativação do NF- κ B. Conforme demonstrado por Duma e colaboradores (2005), pequenas concentrações de NO aumentam a capacidade de ligação do GR à ligantes. Assim, na nossa hipótese o GR translocado por essa via alternativa adquiriria uma conformação de maior afinidade para o ligante nos momentos iniciais da inflamação, prontos para deflagrarem seus mecanismos de ação anti-inflamatória ao interagirem com o ligante. Esse poderia ser um mecanismo pelo qual vias pró e anti-inflamatórias seriam ativadas simultaneamente, a fim de limitar o processo inflamatório.

Na sequência, estão os resultados obtidos para verificar se a hipótese teria base ou não.

5.1 Dosagem das concentrações plasmáticas de corticosterona após a administração de LPS em ratos sham e ADX, pré-tratados ou não com 7-NI

A fim de avaliar os efeitos agudos da administração de LPS na presença ou na ausência do inibidor da NOS-1, sem a influência de corticoides endógenos, foi utilizada a técnica cirúrgica de adrenalectomia. Para verificar se a cirurgia, de fato, reduziu as concentrações de corticosterona, 7 dias após o procedimento cirúrgico, foi realizada a dosagem de corticosterona no plasma. Como pode ser observado na Figura 3, a concentração de corticosterona no plasma de ratos ADX ficou abaixo do limite de detecção da metodologia utilizada (1,7 ng/mL) em todos os grupos. Ratos sham tratados apenas com 7-NI apresentaram concentração de corticosterona semelhante ao grupo controle, que só recebeu veículo (Figura 3). A administração de 1 mg/kg de LPS em ratos sham causou um aumento significativo na concentração plasmática de corticosterona. O pré-tratamento com 7-NI, antes do desafio com LPS, impediu a elevação da concentração plasmática de corticosterona (Figura 3).

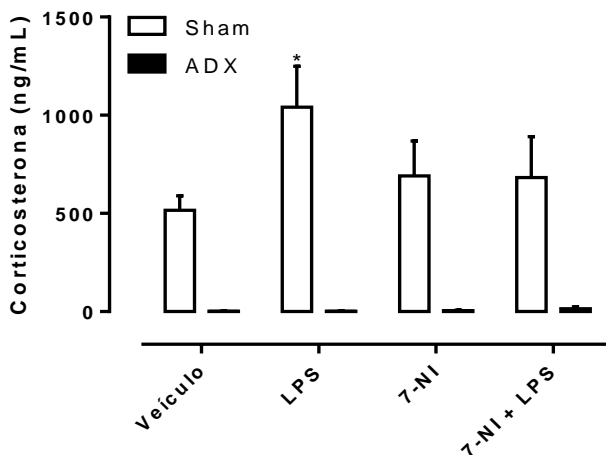


Figura 3: Dosagem de corticosterona plasmática de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI. Ratos sham e ADX foram pré-tratados 1 hora antes do estímulo com veículo ou 7-NI (0,2 mg/kg) e desafiados com LPS (1 mg/kg). Trinta minutos após o desafio, os animais foram eutanaziados e as amostras de plasma ensaiadas para a dosagem de corticosterona por ELISA. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n= 7). Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na Seção 4.7 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. * $p < 0,05$, em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

5.2 Efeito do pré e do pós-tratamento com 7-NI sobre a sobrevivência de ratos ADX desafiados com LPS

Para avaliar a relevância biológica da inibição do pulso de NO e de peroxinitrito na indução do processo inflamatório foram utilizados ratos ADX, que não são capazes de controlar adequadamente o processo inflamatório em função dos baixos níveis de corticoides endógenos. O grupo de ratos ADX desafiado com LPS se mostrou extremamente sensível, apresentando uma taxa de sobrevivência de apenas 30% em 5 horas, com mortalidade total em 8 horas (Figura 4). Surpreendentemente, a inibição da formação do pulso de NO e de peroxinitrito pelo pré-tratamento com 7-NI aumentou a taxa de sobrevivência dos ratos ADX desafiados com LPS em 65%. No entanto, quando o inibidor da NOS-1 foi administrado 1 hora *após* o desafio com LPS, a melhora na taxa de

sobrevida foi de cerca de 40%, não sendo observada diferença significativa com relação ao grupo LPS (Figura 4). Na mesma Figura ainda é possível observar que a dose de 1 mg/kg de LPS não foi suficiente para causar a morte de nenhum animal falso operado, mesmo na ausência do inibidor de NOS-1.

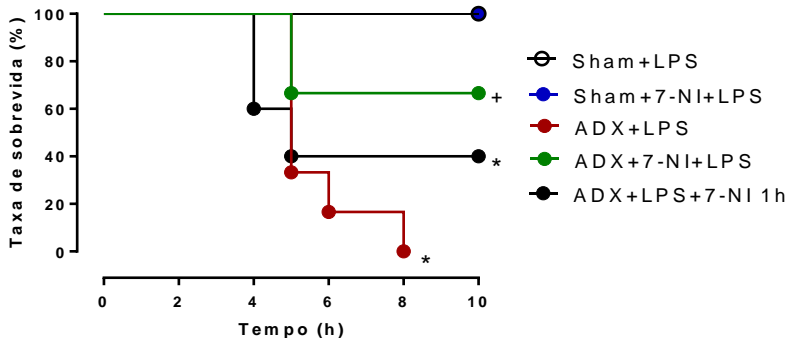


Figura 4: Curva de sobrevivência após o desafio com LPS em ratos sham e ADX pré-tratados ou não com 7-NI. Ratos sham e ADX foram pré-tratados 1 hora antes do desafio com veículo ou 7-NI (0,2 mg/kg) e então desafiados com LPS (1 mg/kg). Um grupo de animais ADX recebeu 7-NI 1 hora após o desafio com LPS (círculo preto). Os resultados foram expressos como taxa de sobrevivência e são representativos de três experimentos diferentes (n= 5 a 6 animais/grupo). A análise estatística utilizada foi o teste de log rank. *p < 0,05 em relação ao grupo controle (Sham+LPS) e +p < 0,05 em relação ao grupo ADX+LPS.

5.3 Efeito do pré e do pós-tratamento com dexametasona na sobrevivência de ratos ADX desafiados com LPS, em diferentes horários.

Demonstramos que o pré-tratamento com 7-NI, 1 hora antes da administração de LPS, foi capaz de prevenir significativamente a mortalidade dos ratos ADX e que o pós-tratamento não teve a mesma eficácia. Em função dessa diferença e dos dados prévios da literatura, comparamos o efeito da dexametasona, administrada em diferentes momentos, sobre a taxa de sobrevivência de ratos ADX desafiados com LPS. Como pode ser observado na Figura 5, quando os animais foram pré-tratados 1 hora antes do desafio com LPS com dexametasona, ou quando a mesma foi administrada 1 hora após o desafio com LPS, ocorreu a

prevenção completa da mortalidade dos ratos ADX desafiados com LPS (Figura 5). Porém, ao tratar os animais com dexametasona 3 horas após o desafio com LPS, não foi possível observar prevenção significativa da mortalidade destes animais, quando comparada à mortalidade do grupo LPS (Figura 5).

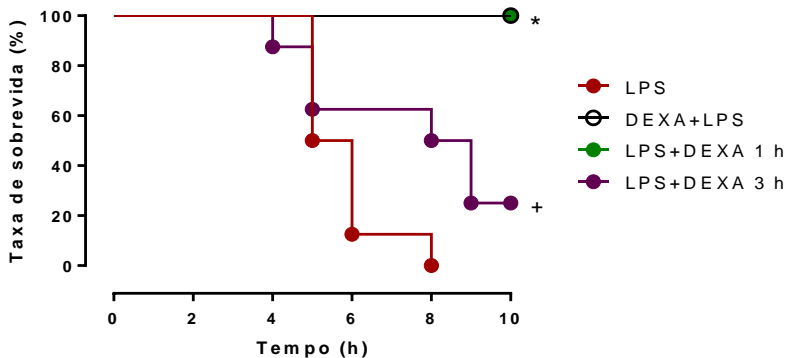


Figura 5: Efeito da administração de dexametasona antes e após o desafio com LPS em ratos ADX. Ratos ADX foram pré-tratados 1 hora antes do desafio com veículo ou DEXA (2 mg/kg) e desafiados com LPS (1 mg/kg). Outros dois grupos de animais ADX receberam DEXA 1 hora ou 3 horas após o desafio com LPS. Os resultados foram expressos como taxa de sobrevivida e são representativos de dois experimentos diferentes (n= 5 a 6 animais/grupo). A análise estatística utilizada foi o teste de log rank. *p < 0,05 em relação ao grupo LPS e +p < 0,05 em relação aos grupos DEXA+LPS e LPS+DEXA 1 h.

5.4 Efeito da inibição do pulso de NO e de peroxinitrito sobre parâmetros inflamatórios em ratos ADX desafiados com LPS

Para avaliar se a diminuição da mortalidade dos ratos ADX pré-tratados com 7-NI e desafiados com LPS estaria relacionada com uma menor indução da resposta inflamatória, como observado na primeira etapa desse trabalho, realizamos a dosagem dos níveis plasmáticos de NOx e citocina IL-6 30 minutos após a administração do LPS.

Como observado na Figura 6, a dose de LPS utilizada não foi suficiente para aumentar os níveis de NOx em animais sham. No entanto, essa dose de LPS foi capaz de aumentar aguda e significativamente os níveis plasmáticos de NOx em animais ADX. A inibição da formação do

pulso de NO e de peroxinitrito pelo 7-NI impediu, de forma significativa, o aumento dos níveis plasmáticos de NOx, quando comparado com o grupo LPS (Figura 6). Quanto à concentração plasmática de IL-6, 30 minutos após a administração de LPS, observou-se que em animais ADX houve um aumento significativo da concentração plasmática dessa citocina (Figura 7). O pré-tratamento com 7-NI bloqueou totalmente o aumento na concentração de IL-6 causado pelo LPS em animais ADX (Figura 7).

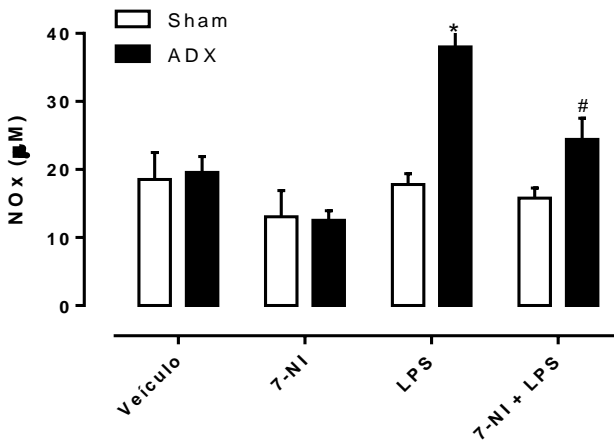


Figura 6: Dosagem de nitrato + nitrito (NOx) plasmático de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI. Ratos sham e ADX foram pré-tratados 1 hora antes do desafio com veículo ou 7-NI (0,2 mg/kg) e desafiados com LPS (1 mg/kg). Trinta minutos após o desafio, os animais foram eutanaziados e as amostras de plasma processadas para a quantificação de NOx pelo método de Griess. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n= 7). A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 em relação ao respectivo grupo controle (veículo) e #p < 0,05 em relação ao respectivo grupo LPS.

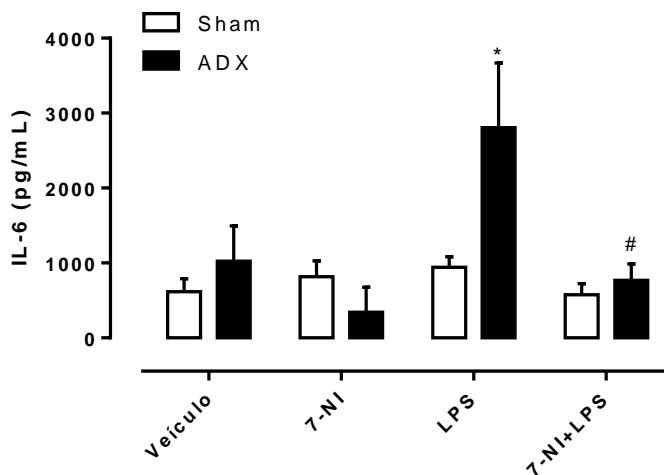


Figura 7: Dosagem da citocina IL-6 no plasma de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI. Ratos sham e ADX foram pré-tratados por 1 hora com veículo ou 7-NI (0,2 mg/kg) e desafiados com LPS (1 mg/kg). Trinta minutos após o desafio, os animais foram eutanaziados e as amostras de plasma ensaiadas para a dosagem de IL-6 por ELISA. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n=7). Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na Seção 4.5 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (veículo) e # $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo LPS.

5.5 Efeito da adrenalectomia e do 7-NI sobre a glicemia de ratos desafiados com LPS

Os GCs possuem inúmeras funções no metabolismo, sendo uma delas, a indução da gliconeogênese para disponibilizar glicose aos tecidos, principalmente para o cérebro. Ratos sham desafiados com LPS não apresentaram diferenças na concentração plasmática de glicose nas primeiras duas horas. Na terceira hora estes animais apresentaram uma redução local na glicemia, retornando aos valores basais após 6 horas. Nos ratos ADX desafiados com LPS foi observada, a partir da segunda hora, uma diminuição progressiva da glicemia até o óbito (Figura 8). Em animais sham, o pré-tratamento com 7-NI induziu a elevação da glicemia nos primeiros 30 minutos e não alterou o efeito do LPS sobre a glicemia

nos outros tempos avaliados (Figura 9A). O pré-tratamento com 7-NI também não alterou o efeito do LPS sobre a glicemia de animais ADX, até a sexta hora, momento em que foi observado um pequeno aumento da glicemia nos animais pré-tratados (Figura 9B).

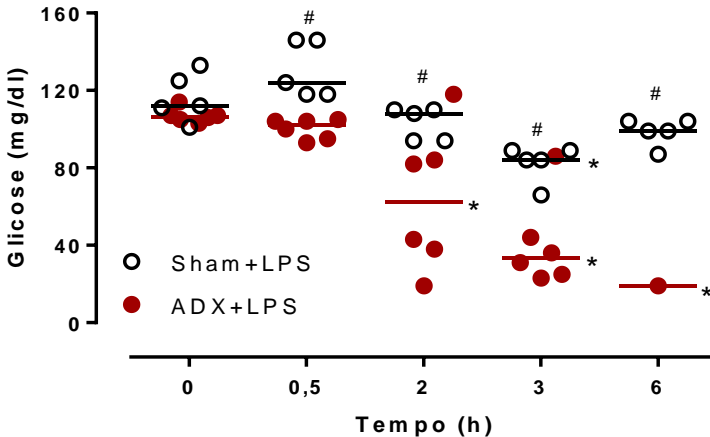


Figura 8: Avaliação temporal da glicemia de ratos sham e ADX desafiados com LPS. Ratos sham e ADX foram desafiados com LPS (1 mg/kg). Nos tempos indicados (30 minutos, 2, 3 e 6 horas), foi realizada a coleta de uma gota de sangue e imediata leitura da glicemia através de tira apropriada no aparelho Accu-Chek Performa (n= 5 a 6 animais por grupo). Os resultados estão expressos pela mediana de todas as leituras e a análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 em relação à primeira leitura (tempo zero) e #p < 0,05 em relação ao grupo ADX+LPS do tempo correspondente.

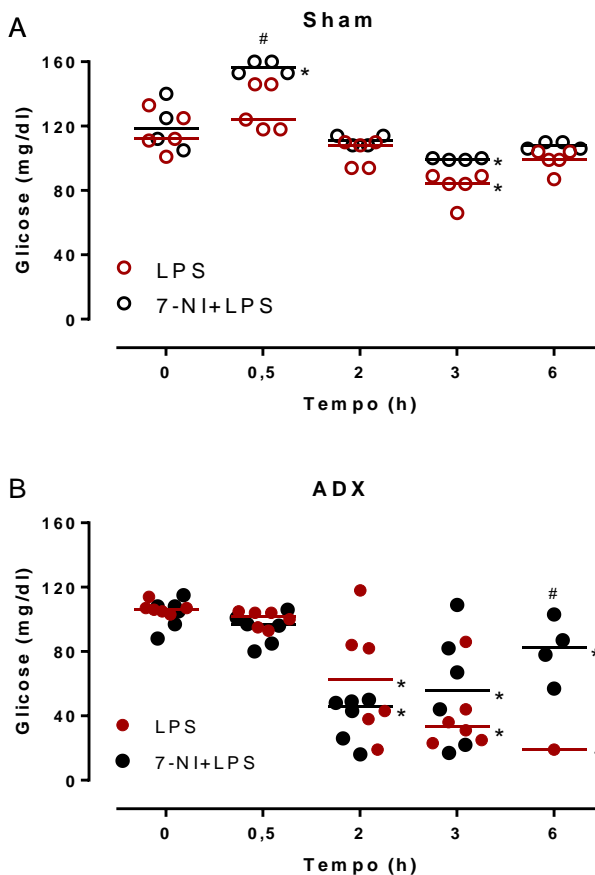


Figura 9: Avaliação temporal da glicemia de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI. Ratos sham (Painel A) e ADX (Painel B) foram pré-tratados 1 hora antes do desafio com veículo ou 7-NI (0,2 mg/kg) e desafiados com LPS (1 mg/kg). Nos tempos indicados (30 minutos, 2, 3 e 6 horas) foi realizada a coleta de uma gota de sangue e imediata leitura da glicemia através de tira apropriada no aparelho Accu-Chek Performa (n= 5 a 6 animais por grupo). Os resultados estão expressos pela mediana de todas as leituras e a análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 em relação à primeira leitura (tempo zero) e #p < 0,05 em relação ao grupo LPS do tempo correspondente.

5.6 Translocação nuclear de GR induzida por LPS e efeito do 7-NI

A fim de avaliar se a administração de LPS poderia afetar de forma aguda a distribuição celular do GR, foi realizado o ensaio de imunofluorescência para GR em anéis de aorta de ratos sham e ADX, 30 minutos após a estimulação com LPS. Na Figura 10 pode ser observado que há uma maior sobreposição da marcação para GR, em verde, com a marcação dos núcleos, em azul, nas células de aortas obtidas de ratos sham desafiados com LPS, quando comparado às células de aortas de ratos sham tratados apenas com veículo. Na mesma Figura, é possível observar um efeito semelhante da administração de LPS sobre a distribuição celular de GR em ratos ADX. Tanto em ratos sham, quanto em ratos ADX, o pré-tratamento com 7-NI preveniu o efeito do LPS sobre a distribuição celular de GR (Figura 10).

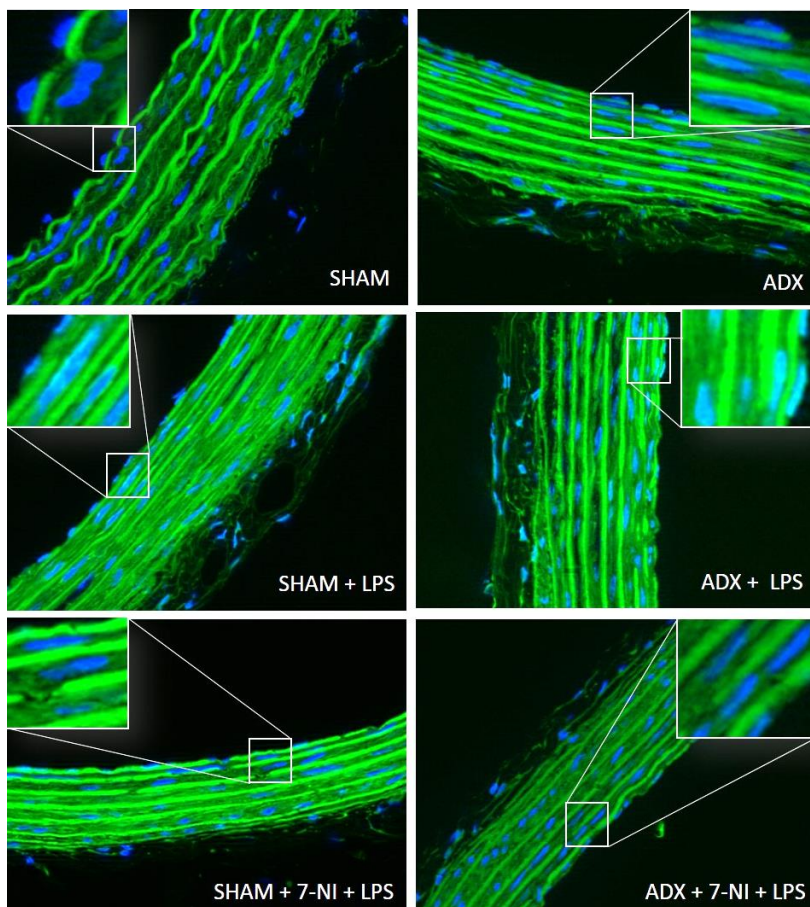


Figura 10: Avaliação por imunofluorescência da distribuição celular do receptor de glicocorticoide (GR) em cortes transversais de aorta de ratos sham e ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI. Ratos sham e ADX foram pré-tratados 1 hora antes do desafio com veículo ou 7-NI (0,2 mg/kg) e desafiados com LPS (1 mg/kg). Trinta minutos após o desafio, os animais foram eutanaziados e as aortas coletadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR. Os cortes foram avaliados em microscópio de fluorescência pré-confocal (ApoTome II, Zeiss) com os filtros adequados para excitação do Alexa Fluor 488 e do Hoechst 33342, utilizados para marcação do GR (em verde) e do núcleo (em azul), respectivamente. As imagens são representativas de um experimento (n = 3 animais /grupo). As imagens foram adquiridas com objetiva de 63x.

5.7 Efeito da estimulação com LPS/IFN e do 7-NI sobre a distribuição celular do GR em células musculares lisas estimuladas com LPS/IFN, na ausência de corticoides

Com base nos resultados demonstrados *in vivo*, e com o objetivo de testar nossa hipótese de que o pulso de NO e de peroxinitrito poderiam afetar diretamente a sinalização do GR na ausência de ligante, avaliamos a distribuição celular do GR, antes e após 1 hora de estimulação com LPS/IFN, na presença ou na ausência de 7-NI. No Painele A da Figura 11, são mostradas imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN na ausência de corticoides. Como pode ser observado nessas imagens, e na relação de intensidade de fluorescência nuclear calculada em relação ao grupo controle (veículo), a estimulação com LPS/IFN induziu a translocação nuclear de GR (Figura 11B). O pré-tratamento 30 minutos antes com 7-NI impediu significativamente a translocação do receptor para o núcleo após a estimulação com LPS/IFN. No entanto, a incubação das células apenas com 7-NI por 90 minutos, período total em que o inibidor ficou incubado nos grupos estimulados com LPS/IFN, também levou à um aumento da translocação nuclear de GR (Figura 11).

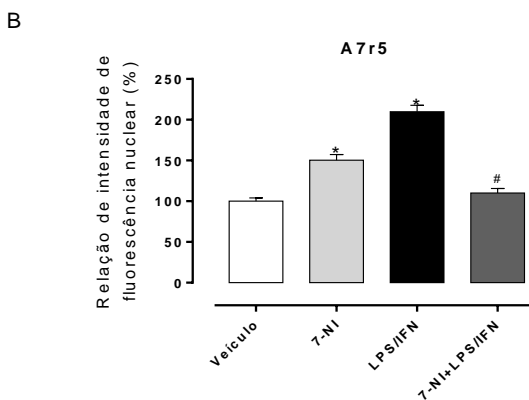
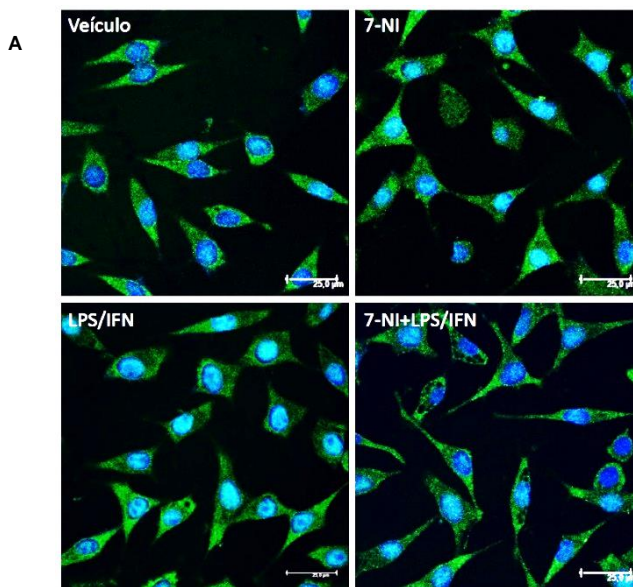


Figura 11: Avaliação por imunofluorescência da distribuição celular do GR em células musculares lisas A7r5 estimuladas com LPS/IFN na ausência ou na presença de 7-NI, na ausência de corticoides. Células musculares lisas A7r5 foram cultivadas em meio DMEM completo e 2 horas antes de iniciar o experimento o meio de cultura foi trocado por meio DMEM sem soro. As células foram pré-tratadas 30 minutos antes com veículo ou 7-NI (200 μ M) e desafiadas com LPS/IFN. Uma hora após a estimulação as células foram fixadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR. As lâminas contendo as células foram avaliadas em

microscópio de fluorescência confocal (DMI6000 B, Leica) com os lasers adequados para excitação do Alexa Fluor 488 e do Hoechst 33342, utilizados para marcação do GR (em verde) e do núcleo (em azul), respectivamente. **Painel A:** Imagens representativas de 3 experimentos independentes são mostradas. **Painel B:** Apresenta a relação de intensidade de fluorescência nuclear ao grupo controle (veículo) calculada através da quantificação da intensidade de fluorescência nuclear realizada através do software LAS AF Lite®. A análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (veículo) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

5.8 Efeito do GTN e do SIN-1 sobre a distribuição celular do GR e do NF- κ B em células musculares lisas

A fim de entender melhor o papel do NO e do peroxinitrito, isoladamente, sobre a indução da translocação nuclear de GR as células musculares lisas A7r5 foram incubadas por 1 ou 4 horas com um doador de NO, o GTN, ou com um doador de peroxinitrito, o SIN-1. Células estimuladas pelo mesmo período com LPS/IFN foram utilizadas como controle interno do experimento. Após a incubação dos compostos, as células foram preparadas para a técnica de imunofluorescência, a intensidade de fluorescência nuclear foi mensurada e realizado cálculo da relação de intensidade de fluorescência nuclear com o grupo controle. A incubação por 1 hora com GTN e SIN-1 não induziu translocação nuclear de GR (Figura 12 e Figura 14A). Mesmo após 4 horas de incubação com GTN não foi possível observar um aumento do conteúdo nuclear de GR, porém a incubação prolongada com SIN-1 aumentou significativamente o conteúdo nuclear do receptor de forma significante (Figura 12 e Figura 12B).

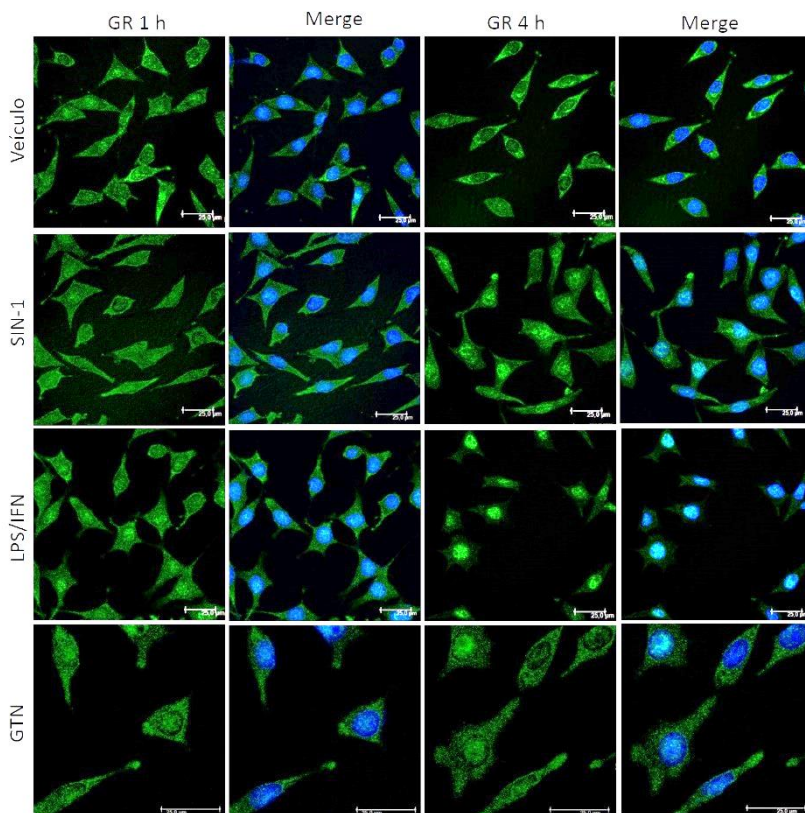


Figura 12: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em células musculares lisas A7r5 incubadas com os doadores SIN-1 e GTN ou LPS/IFN. Células musculares lisas A7r5 foram cultivadas em meio DMEM completo e 2 horas antes de iniciar o experimento o meio de cultura foi trocado por meio DMEM sem soro. As células foram incubadas com um doador de peroxinitrito (SIN-1, 100 μ M), um doador de NO (GTN, 10 μ M) ou desafiadas com LPS/IFN. Uma ou 4 horas após a estimulação com LPS/IFN ou incubação com os doadores, as células foram fixadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR e/ou NF- κ B. As lâminas contendo as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência confocal (DMI6000 B, Leica) com os lasers adequados para excitação do Alexa Fluor 488 e do Hoechst 33342, utilizados para marcação do GR (em verde) e do núcleo (em azul), respectivamente. Imagens representativas de 5 experimentos independentes são mostradas.

Exceto para a incubação com GTN, foram realizadas duplas marcações para GR e NF- κ B a fim de comparar a cinética de translocação dos mesmos, e avaliar a possibilidade de translocação simultânea. Foi observado que a incubação por 1 hora com SIN-1 também não alterou o conteúdo nuclear de NF- κ B (Figura 13 e Figura 14C). Porém, a incubação com SIN-1 por 4 horas aumentou significativamente o conteúdo nuclear desse fator de transcrição, exibindo efeito semelhante ao que foi observado para o GR (Figura 13 e Figura 14D).

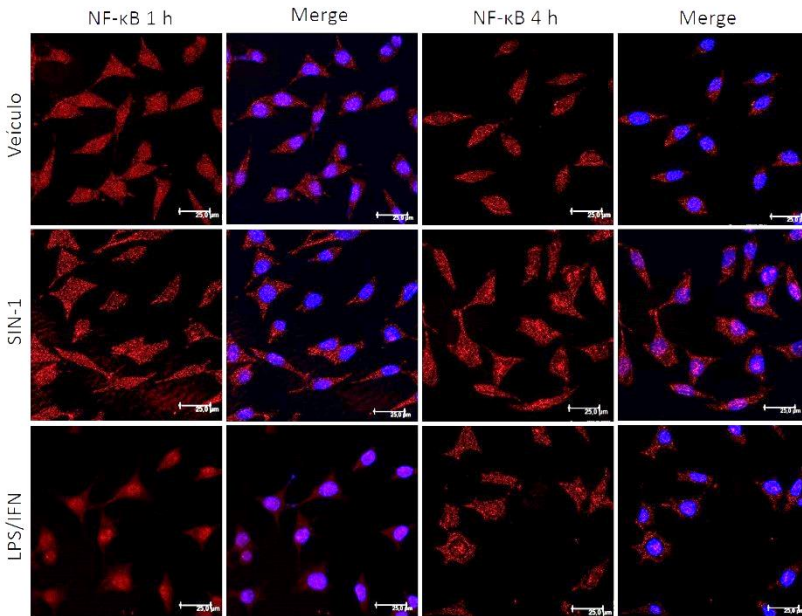


Figura 13: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para NF- κ B em células musculares lisas A7r5 incubadas com SIN-1 ou LPS/IFN. Células musculares lisas A7r5 foram cultivadas em meio DMEM completo e 2 horas antes de iniciar o experimento o meio de cultura foi trocado por meio DMEM sem soro. As células foram incubadas com um doador de peroxinitrito (SIN-1, 100 μ M) ou desafiadas com LPS/IFN. Uma ou 4 horas após a estimulação com LPS/IFN ou incubação com o doador, as células foram fixadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR e/ou NF- κ B. As lâminas contendo as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência confocal (DMI6000 B, Leica) com os lasers adequados para excitação do Alexa Fluor 633 e do Hoechst 33342, utilizados para marcação do NF- κ B (em vermelho) e do núcleo (em azul), respectivamente. Imagens representativas de 5 experimentos independentes são mostradas.

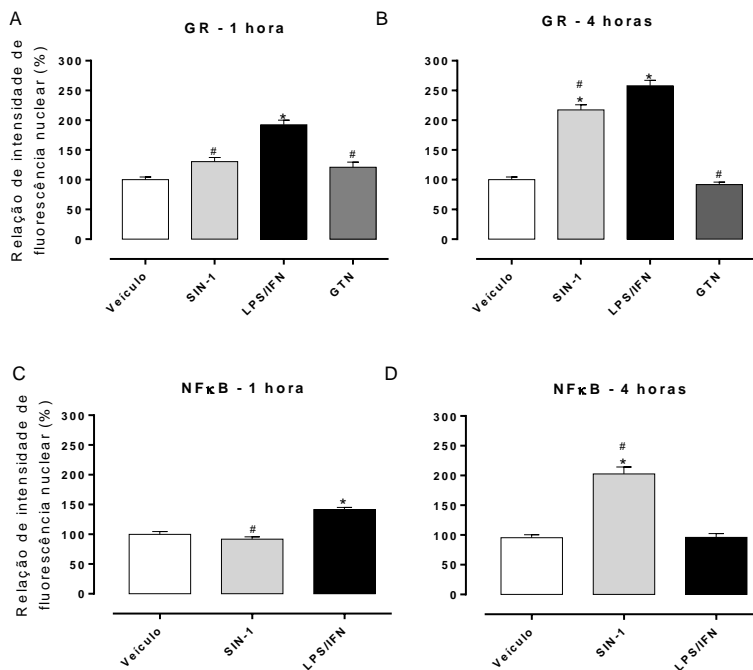


Figura 14: Quantificação da imunofluorescência para GR ou NF-κB, em células musculares lisas A7r5 incubadas com SIN-1, GTN ou LPS/IFN. As células musculares lisas A7r5 foram incubadas com SIN-1, GTN ou LPS/IFN conforme descrito nas Figuras 12 e 13. A quantificação da imunofluorescência para GR e/ou NF-κB foi representada como a relação de intensidade de fluorescência nuclear ao grupo controle (veículo). O cálculo dessa relação foi realizado através da quantificação da intensidade de fluorescência nuclear de pelo menos 10 núcleos por campo, através do software LAS AF Lite®. **Painéis A e B:** Relação da intensidade de fluorescência nuclear para GR 1 e 4 horas após a incubação dos compostos, respectivamente. **Painéis C e D:** Relação da intensidade de fluorescência nuclear para NF-κB 1 e 4 horas após a incubação dos compostos, respectivamente. A análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (veículo) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

5.9 Efeito da mutação GR^{dim/dim} e do 7-NI sobre o mecanismo de translocação nuclear de GR induzida por LPS/IFN, na ausência de corticoides

Como os resultados anteriores demonstraram que o pré-tratamento com 7-NI i) foi capaz de melhorar a taxa de sobrevivência e os parâmetros inflamatórios dos animais ADX e ii) diminuiu a translocação nuclear de GR nas células A7r5, decidimos avaliar se a mutação GR^{dim/dim} poderia interferir com a translocação nuclear de GR induzida pelo pulso de NO e de peroxinitrito.

Primeiramente, avaliamos se a estimulação de fibroblastos embrionários obtidos de camundongos WT com LPS/IFN, e a inibição do pulso de NO e de peroxinitrito, na ausência de corticoides, teriam os mesmos efeitos sobre a translocação nuclear de GR observados nas células musculares lisas A7r5, obtidas de ratos. Como pode ser observado nas imagens representativas da imunofluorescência para GR (Figura 15), a estimulação com LPS/IFN induziu a translocação nuclear de GR nos fibroblastos WT e o pré-tratamento com 7-NI também impediu essa translocação. Ainda, observou-se que a incubação das células apenas com 7-NI, por 90 minutos, induziu a translocação nuclear de GR em uma proporção semelhante com a translocação induzida por LPS/IFN, como demonstrado pelo cálculo da relação de intensidade de fluorescência nuclear (Figura 16A).

Uma vez demonstrado que a via de indução da translocação nuclear de GR induzida por LPS/IFN, na ausência de corticoides, não era um fenômeno restrito apenas às células musculares lisas, avaliamos se a mutação GR^{dim/dim} afetaria a via de indução da translocação nuclear induzida por LPS/IFN. Como pode ser observado nas imagens representativas da imunofluorescência para GR (Figura 15), os fibroblastos GR^{dim/dim} tratados apenas com veículo apresentam uma maior quantidade de GR no núcleo. A intensidade de fluorescência nuclear exibida pelas células GR^{dim/dim} tratadas com veículo, é cerca de 40 % maior que a quantidade de GR nuclear encontrado nas células WT (Figura 17). Nos fibroblastos GR^{dim/dim} a estimulação com LPS/IFN não alterou a quantidade de GR nuclear, enquanto a incubação somente com 7-NI, e o pré-tratamento nas células estimuladas, induziu um aumento da translocação nuclear de GR (Figura 15 e Figura 16B).

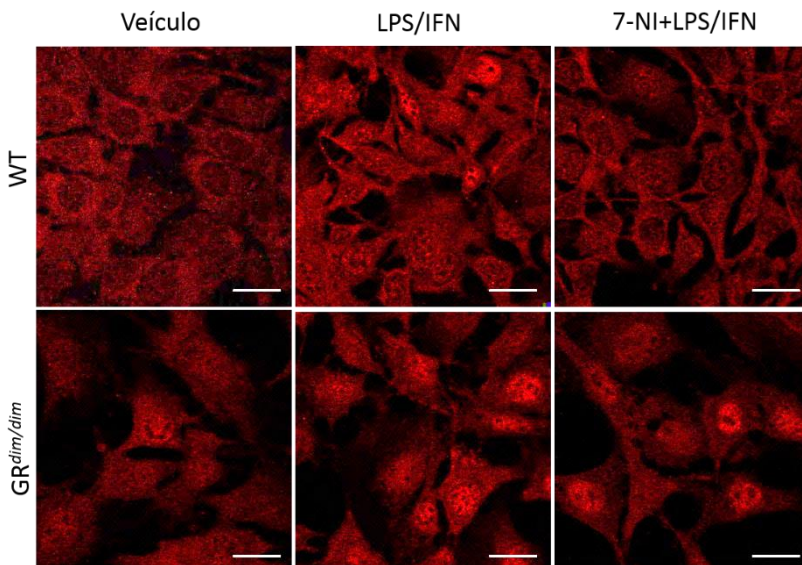


Figura 15: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em de fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} incubados com LPS/IFN na ausência ou na presença de 7-NI, na ausência de corticoides. Fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} foram cultivados em meio DMEM com soro depletado de corticoides pela incubação com carvão ativado e pré-tratados com veículo ou 7-NI (200 μ M) por 30 minutos. Após este período as células foram desafiadas com LPS/IFN por 1 hora. Após este período, as células foram fixadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR. As lâminas contendo as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência confocal (Zeiss LSM 510, Zeiss) com o laser adequado para excitação do Cy5, utilizado para marcação do GR (em vermelho). Imagens representativas da marcação para GR de 2 experimentos independentes são mostradas. As barras brancas representam 20 μ m.

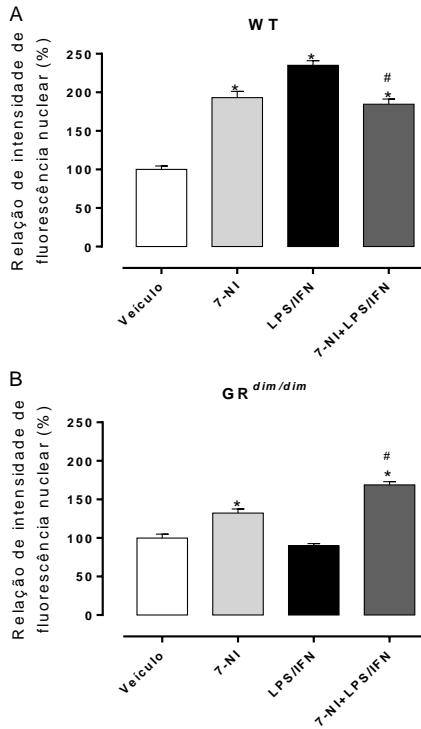


Figura 16: Quantificação do ensaio de imunofluorescência para GR em fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} incubados com LPS/IFN na ausência ou na presença de 7-NI, na ausência de corticoides. Fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} foram cultivados em meio DMEM com soro depletado de corticoides pela incubação com carvão ativado e pré-tratados com veículo ou 7-NI (200 μ M) por 30 minutos e desafiados com LPS/IFN por 1 hora. Após este período, as células foram fixadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR. A quantificação da imunofluorescência foi representada como a relação de intensidade de fluorescência nuclear ao grupo controle (veículo). O cálculo dessa relação foi realizado através da quantificação da intensidade de fluorescência nuclear de pelo menos 10 núcleos por campo, de 2 experimentos independentes, através do software Zen 2012 Black®. **Painel A:** Quantificação da imunofluorescência para GR em fibroblastos WT. **Painel B:** Quantificação da imunofluorescência para GR em fibroblastos GR^{dim/dim}. A análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (veículo) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

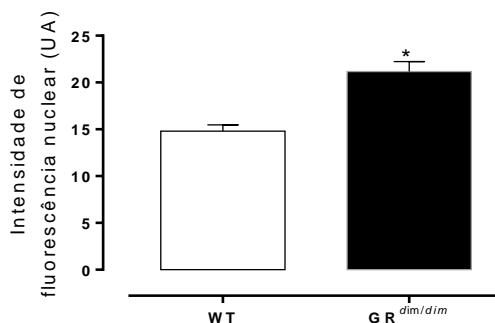


Figura 17: Comparação da intensidade de fluorescência nuclear basal de GR em fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} na ausência de corticoides. Fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} cultivados em meio DMEM passado em carvão ativado foram fixados e processados para o ensaio de imunofluorescência para GR. A intensidade de fluorescência nuclear de pelo menos 10 núcleos por campo, de 2 experimentos independentes, foi quantificada através do software Zen 2012 Black®. A análise estatística foi realizada através do teste *t*. **p* < 0,05 em relação aos fibroblastos WT.

5.10 Comparação entre a translocação nuclear de GR induzida por LPS/IFN, na ausência de corticoides, e a translocação nuclear de GR induzida por ligantes

Apesar da estimulação com LPS/IFN induzir a translocação nuclear de GR por um mecanismo dependente de um pulso inicial de NO e de peroxinitrito, mesmo na ausência de ligante, foi possível observar a presença de GR no citoplasma das células (Figura 12 e Figura 18). Ao incubarmos as células musculares lisas A7r5 1 hora antes do desafio com um composto antagonista do GR, o RU-486, foi observada intensa translocação nuclear do GR (Figuras 18 e Figura 19). Em fibroblastos WT e GR^{dim/dim} a incubação por 1 hora com um ligante agonista do GR, a dexametasona, também induziu intensa translocação nuclear de GR dependente de ligante (Figura 20). Observou-se ainda, que a mutação GR^{dim/dim} afeta o mecanismo de translocação induzido por LPS/IFN, mas não altera a translocação nuclear de GR induzida por ligante (Figura 20).

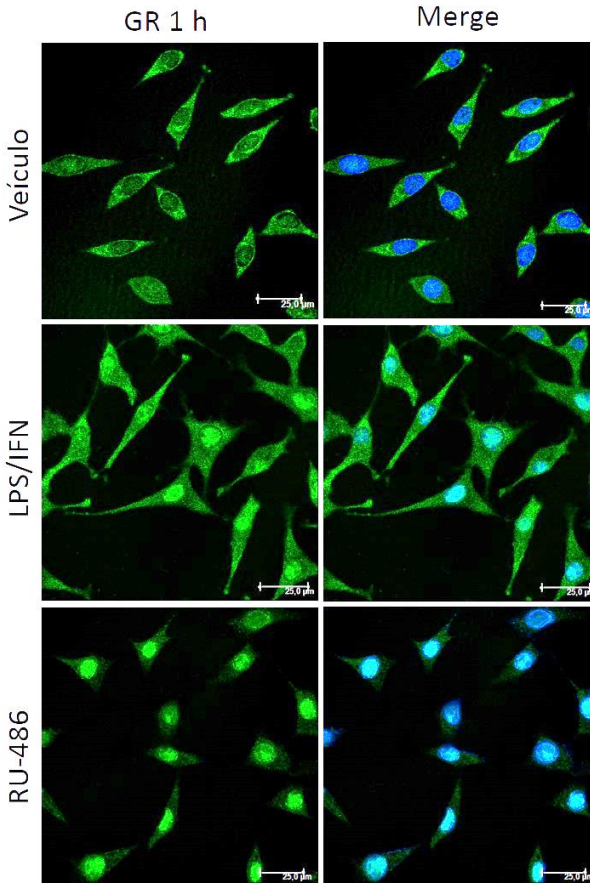


Figura 18: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em células musculares lisas A7r5 incubadas com LPS/IFN ou RU-486. Células musculares lisas A7r5 foram incubadas com LPS/IFN ou com um antagonista do GR (RU-486) por 1 hora. Após este período, as células foram fixadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR. As lâminas contendo as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência confocal (DMI6000 B, Leica) com os lasers adequados para excitação do Alexa Fluor 488 e do Hoechst 33342, utilizados para marcação do GR (em verde) e do núcleo (em azul), respectivamente. Imagens representativas de 2 experimentos independentes são mostradas.

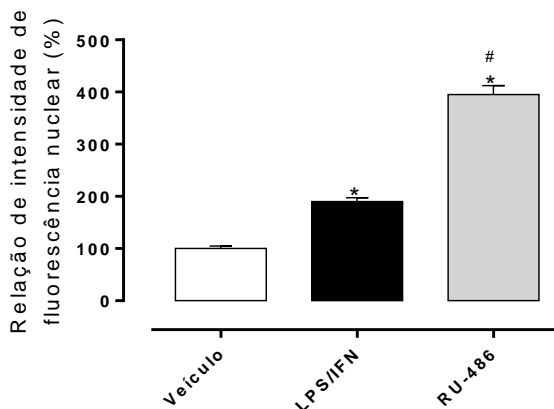


Figura 19: Quantificação do ensaio de imunofluorescência para GR em células musculares lisas A7r5 incubadas com LPS/IFN ou RU-486. Células musculares lisas A7r5 foram incubadas com LPS/IFN ou com um antagonista do GR (RU-486) por 1 hora. Após este período, as células foram fixadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR. A quantificação da imunofluorescência foi representada como a relação de intensidade de fluorescência nuclear ao grupo controle (veículo). O cálculo dessa relação foi realizado através da quantificação da intensidade de fluorescência nuclear de pelo menos 10 núcleos por campo, através do software LAS AF Lite®. A análise estatística foi realizada através do teste de ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (veículo) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS/IFN.

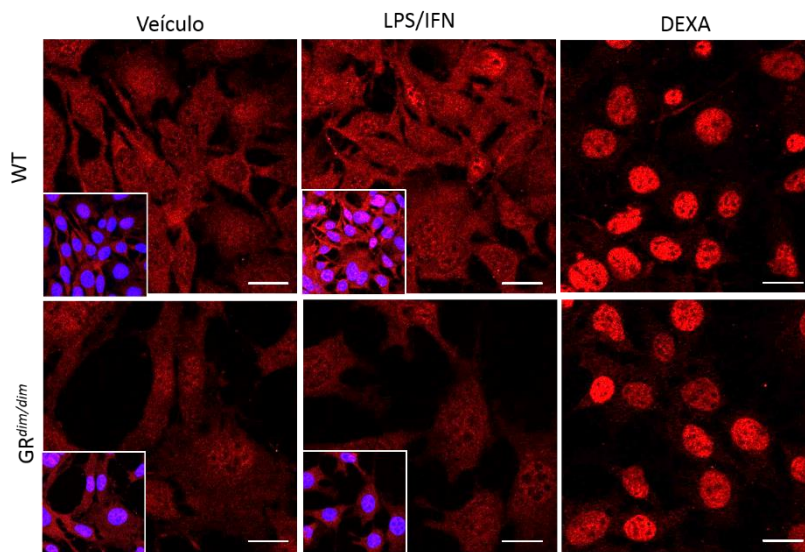


Figura 20: Imagens representativas do ensaio de imunofluorescência para GR em de fibroblastos de camundongos WT e $GR^{dim/dim}$ incubados com LPS/IFN ou dexametasona. Fibroblastos de camundongos WT e $GR^{dim/dim}$ cultivados em meio DMEM passado em carvão ativado foram incubados com LPS/IFN ou um agonista do GR (DEXA) por 1 hora. Após este período, as células foram fixadas e processadas para o ensaio de imunofluorescência para GR. As lâminas contendo as células foram avaliadas em microscópio de fluorescência confocal (Zeiss LSM 510, Zeiss) com os lasers adequados para excitação do Cy5 e do Hoechst 33342, utilizados para marcação do GR (em vermelho) e do núcleo (em azul), respectivamente. Imagens representativas de 2 experimentos independentes são mostradas. As barras brancas representam 20 μ m.

5.11 Efeito do 7-NI sobre a ativação de fibroblastos WT e $GR^{dim/dim}$ estimulados com LPS/IFN

A fim de buscar entender a razão de por que a inibição do pulso inicial de NO e de peroxinitrito ter efeitos diferentes em animais WT e animais deficientes na dimerização do GR, utilizamos fibroblastos embrionários $GR^{dim/dim}$. Para avaliar se fibroblastos respondiam de maneira semelhante às células musculares lisas frente à estimulação com LPS/IFN, foi realizada a coleta de sobrenadante da cultura celular para dosagem da concentração de nitrito 24 horas após a estimulação, na presença ou na ausência de 7-NI. Como pode ser observado na Figura 21, tanto os fibroblastos WT, quanto os $GR^{dim/dim}$ produziram elevadas

concentrações de nitrito após 24 horas de incubação com LPS/IFN. Nos grupos pré-tratados por 30 minutos com 7-NI antes da estimulação com LPS/IFN, houve um menor acúmulo da concentração de nitrito no sobrenadante da cultura celular em 24 horas. É importante mencionar que, ao contrário do protocolo utilizado nas células musculares lisas da linhagem A7r5, a ativação dos fibroblastos só foi detectada pela técnica de Griess quando a incubação do estímulo (LPS/IFN) foi contínua (dados não mostrados). Dessa forma, o 7-NI utilizado no pré-tratamento permaneceu incubado nas células até o momento da coleta do sobrenadante.

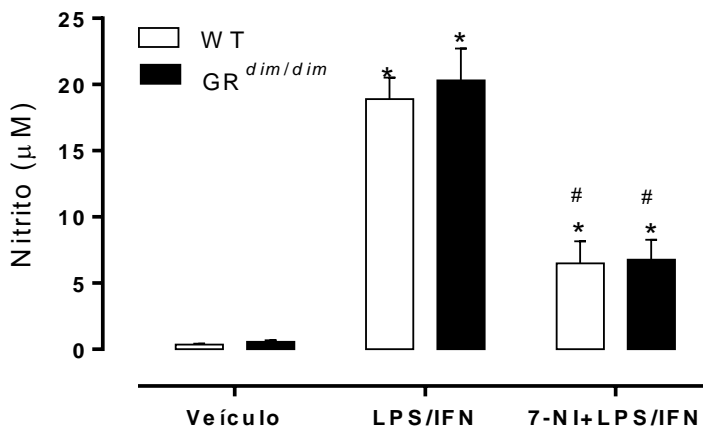


Figura 21: Dosagem da concentração de nitrito no sobrenadante de fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI. Fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} foram pré-tratados por 1 hora com 7-NI (200 µM) antes de serem estimulados com LPS/IFN. Vinte e quatro horas após a estimulação o sobrenadante das células foi coletado e a quantificação da concentração de nitrito realizada através da reação de Griess. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 4 experimentos realizados em triplicatas. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 em relação ao respectivo grupo controle (veículo) e #p < 0,05 em relação ao respectivo grupo LPS/IFN.

5.12 Efeito do 7-NI sobre a concentração de IL-6 em de fibroblastos WT e GR^{dim/dim} estimulados com LPS/IFN

A fim de avaliar um parâmetro inflamatório não responsivo ao 7-NI, foi avaliado o seu efeito sobre a expressão da citocina IL-6 em fibroblastos embrionários imortalizados, obtidos de camundongos WT e GR^{dim/dim}, estimulados com LPS/IFN. Como pode ser observado na Figura 22, não houve diferença na produção e concentração de IL-6 entre os fibroblastos WT e GR^{dim/dim} ao final de 24 horas de estimulação com LPS/IFN. Somente os fibroblastos WT pré-tratados com 7-NI apresentaram uma discreta diminuição na concentração de IL-6 (Figura 22).

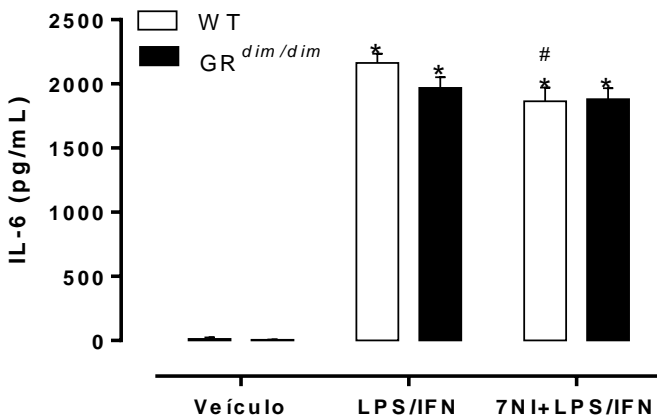


Figura 22: Dosagem da citocina IL-6 no sobrenadante de fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI. Fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} foram pré-tratados por 1 hora com 7-NI (200 μ M) antes de serem estimulados com LPS/IFN. Vinte e quatro horas após a estimulação o sobrenadante das células foi coletado e ensaiado para a dosagem de IL-6 por ELISA. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 3 experimentos realizados em triplicatas ou quadruplicatas. Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na Seção 4.5 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo controle (veículo) e # $p < 0,05$ em relação ao respectivo grupo LPS/IFN.

5.13 Efeito da inibição do pulso de NO e de peroxinitrito sobre a sobrevivência de camundongos WT e $GR^{dim/dim}$ desafiados com LPS

O GR pode atuar na forma de monômeros ou de dímeros por diferentes mecanismos de ação, como abordado na Introdução desse trabalho. Para avaliar se os efeitos do LPS e do pulso de NO e peroxinitrito observados sobre a via de sinalização do GR afetariam os receptores na forma de monômeros ou dímeros, utilizamos camundongos transgênicos deficientes na dimerização do GR ($GR^{dim/dim}$) para comparar os efeitos observados animais ADX. Como pode ser observado na Figura 23, camundongos $GR^{dim/dim}$ desafiados com 10 mg/kg de LPS são muito mais sensíveis que animais WT, apresentando 100% de mortalidade em 24 horas após o desafio. Nestes animais, o pré-tratamento por 1 hora com 7-NI não melhorou a taxa de sobrevivida dos animais desafiados com LPS (Figura 23). Na mesma Figura é possível observar que animais WT desafiados com essa dose de LPS, pré-tratados ou não com 7-NI, apresentaram taxa de sobrevivida de 100% ao final de 48 horas.

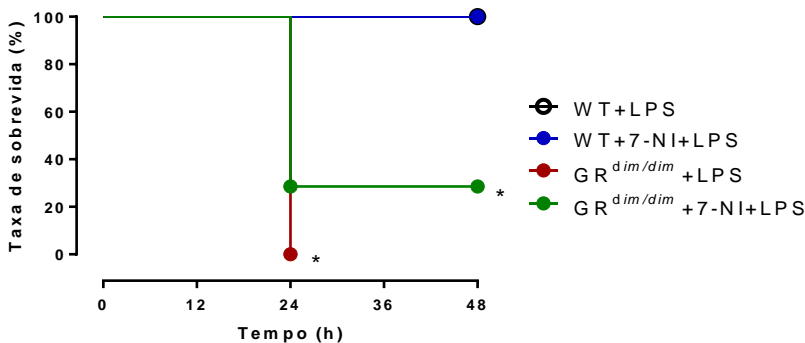


Figura 23: Curva de sobrevivida após o desafio com LPS em camundongos WT e $GR^{dim/dim}$ pré-tratados ou não com 7-NI. Camundongos WT e $GR^{dim/dim}$ pré-tratados por 1 hora com 7-NI (7,5 mg/kg) foram desafiados com LPS (10 mg/kg). Os resultados foram expressos como taxa de sobrevivida e são representativos de um experimento (n=4 a 7 animais/grupo). A análise estatística utilizada foi o teste de log rank. *p < 0,05 em relação ao grupo controle (WT+LPS).

5.14 Efeito do 7-NI sobre a concentração plasmática de IL-6 em camundongos WT e GR^{dim/dim} desafiados com LPS

Para avaliar se a inibição do pulso de NO e de peroxinitrito poderiam interferir com algum parâmetro inflamatório, mesmo sem aumentar a taxa de sobrevivência dos camundongos GR^{dim/dim}, foi avaliada a concentração plasmática de IL-6, 6 horas após o desafio com LPS. Como pode ser observado na Figura 24, animais GR^{dim/dim} apresentaram maior concentração plasmática de IL-6 que animais WT após o desafio com LPS. No que diz respeito ao efeito da inibição do pulso de NO e de peroxinitrito pelo 7-NI sobre a concentração plasmática de IL-6, foi observado que somente em animais WT a inibição do pulso impediu o aumento da concentração plasmática dessa citocina (Figura 24).

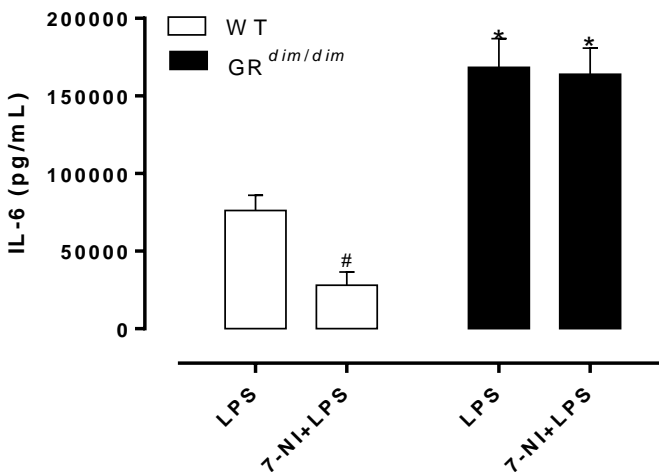


Figura 24: Dosagem da citocina IL-6 no plasma camundongos WT e GR^{dim/dim} desafiados com LPS, pré-tratados ou não com 7-NI. Camundongos WT e GR^{dim/dim} pré-tratados por 1 hora com 7-NI (7,5 mg/kg) foram desafiados com LPS (10 mg/kg). Seis horas após o desafio foram obtidas amostras de plasma que foram ensaiadas para a dosagem de IL-6 por ELISA. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média (n=4 a 7 animais por grupo). Para a análise estatística, os valores foram transformados como descrito na Seção 4.5 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. A análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 em relação ao grupo LPS dos animais WT e #p < 0,05 em relação ao respectivo grupo LPS.

5.15 Efeito do LPS e do 7-NI sobre parâmetros metabólicos em camundongos WT e GR^{dim/dim} desafiados com LPS

Os parâmetros metabólicos de peso, temperatura e glicemia foram avaliados, antes e após o desafio com LPS, na presença ou ausência de pré-tratamento com 7-NI. No Painel A da Figura 25, a variação de peso corporal dos camundongos WT e GR^{dim/dim}, antes e após o desafio com LPS, é mostrada. Observou-se que, apesar de possuírem a mesma idade, os camundongos GR^{dim/dim} apresentaram redução significativa de peso em relação aos camundongos WT. Após o desafio com LPS, tanto os camundongos WT, quanto os camundongos GR^{dim/dim} tiveram uma perda progressiva e significativa de peso ao longo do tempo.

Com relação à temperatura corpórea, ambos os grupos apresentaram uma diminuição nas primeiras horas após o desafio com LPS, sendo de aproximadamente 3°C para os camundongos WT e de 6°C para os camundongos GR^{dim/dim}. A partir de 24 horas após o desafio com LPS os camundongos WT recuperaram sua temperatura corporal, enquanto os camundongos GR^{dim/dim} foram todos a óbito em 24 horas (Figura 25B).

As alterações observadas na glicemia dos camundongos desafiados com LPS foram drásticas em ambos os grupos. Tanto os camundongos WT quanto os camundongos GR^{dim/dim} apresentaram uma redução brusca e progressiva da glicemia nas primeiras 12 horas pós-desafio com LPS, não havendo diferença significativa entre os dois grupos de animais em cada tempo avaliado (Figura 25C). A glicemia dos camundongos WT permaneceu reduzida, mas estável, nas 24 horas subsequentes, apresentando melhora em 48 horas. Contudo, os camundongos GR^{dim/dim} não foram capazes de recuperar seus níveis glicêmicos após o desafio com LPS, sendo observada a queda progressiva da glicemia até o óbito em 24 horas.

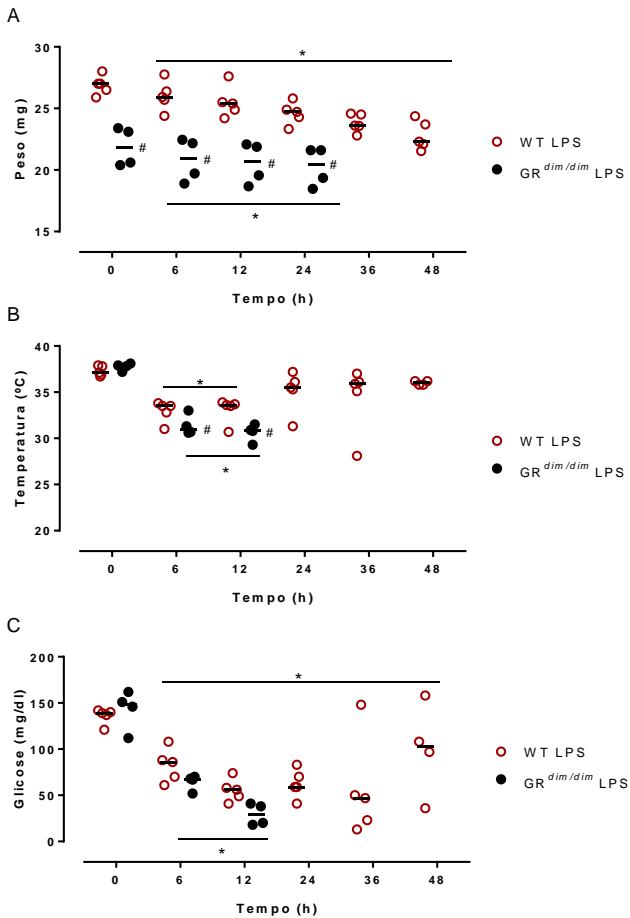


Figura 25: Avaliação temporal do peso corpóreo, da temperatura corporal e da glicemia de camundongos WT e GR^{dim/dim} desafiados com LPS. Camundongos WT e GR^{dim/dim} foram desafiados com LPS (10 mg/kg) e nos tempos indicados, tiveram o peso e a temperatura corporal avaliados. Nestes mesmos tempos foi realizada a coleta de uma gota de sangue e medida a glicemia através de uma tira apropriada do equipamento Accu-Chek Performa. (n=4 a 7 animais por grupo). Os resultados estão expressos pela mediana de todas as leituras e a análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, *p < 0,05 em relação à primeira leitura (tempo zero) e #p < 0,05 em relação ao grupo GR^{dim/dim} LPS do tempo correspondente.

A inibição do pulso de NO e de peroxinitrito pelo pré-tratamento com 7-NI levou redução de peso mais acentuada nos camundongos WT desafiados com LPS, como pode ser observado no Painele A da Figura 26. Também na Figura 26 é possível observar que o pré-tratamento com 7-NI não interferiu na perda de peso dos camundongos GR^{dim/dim} (Painele B), bem como, não interferiu na queda da temperatura corpórea tanto de camundongos WT (Painele C), quanto de camundongos GR^{dim/dim} (Painele D) desafiados com LPS. Ainda, observou-se que a glicemia de camundongos WT (Painele E) e de camundongos GR^{dim/dim} (Painele F) desafiados com LPS não foi alterada pelo pré-tratamento com 7-NI.

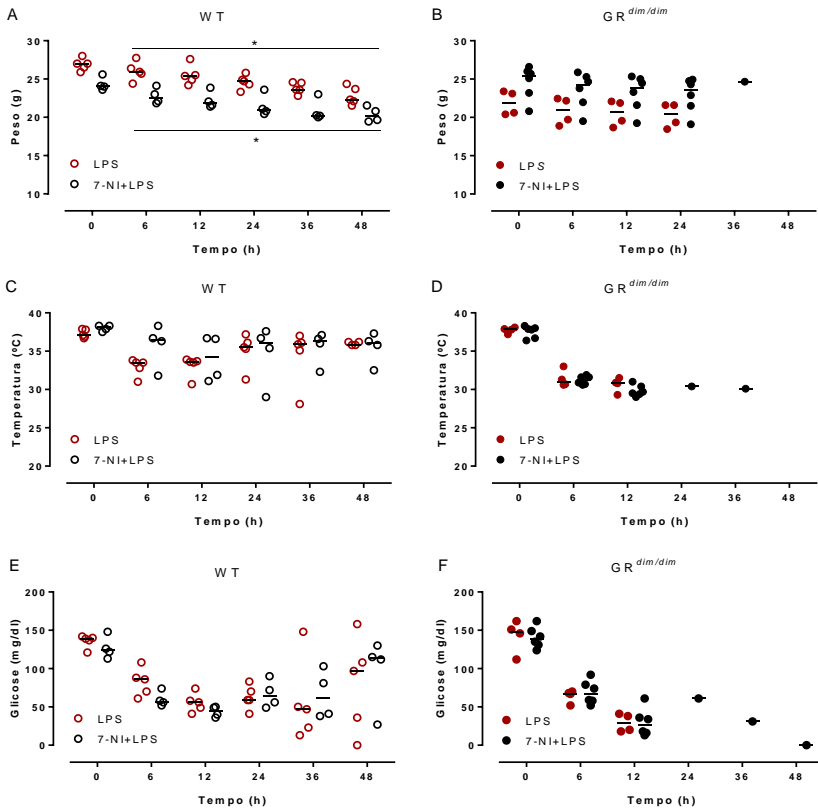


Figura 26: Avaliação temporal do peso, da temperatura corporal e da glicemia de camundongos WT e $GR^{dim/dim}$ desafiados com LPS, na presença ou ausência de 7-NI. Camundongos WT e $GR^{dim/dim}$ pré-tratados por 1 hora com 7-NI (7,5 mg/kg) foram desafiados com LPS (10 mg/kg) e nos tempos indicados, tiveram o peso e a temperatura corporal avaliados. Nestes mesmos tempos foi realizada a coleta de uma gota de sangue e medida a glicemia através de uma tira apropriada do equipamento Accu-Chek Performa. (n=4 a 7 animais por grupo). Os resultados estão expressos pela mediana de todas as leituras e a análise estatística foi realizada pelo teste de ANOVA de duas vias de medidas repetidas, seguido pelo pós-teste de Bonferroni, * $p < 0,05$ em relação ao grupo LPS de cada tempo correspondente.

6. DISCUSSÃO

Sintomas clássicos da sepse grave e do choque séptico, como a hipotensão refratária à reposição volêmica e hiporeatividade à vasoconstritores, respectivamente, continuam desafiando intensivistas. Os tratamentos destes sintomas seguem protocolos gerenciados de sepse recomendados por instituições como o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) (Dellinger et al., 2013). Percebe-se que estes tratamentos são todos sintomáticos e nenhum atua diretamente no restabelecimento da atividade de receptores ou vias de sinalização que possam estar prejudicadas pela fisiopatologia da sepse. Por isso, entender quais e como os mecanismos moleculares e bioquímicos levam à disfunção cardiovascular na sepse, e principalmente, identificar possíveis alvos terapêuticos que possam resgatar a função dessas vias ou receptores, tem sido objeto de estudo de inúmeros pesquisadores há muitos anos.

Alguns trabalhos da literatura, incluindo dados do nosso laboratório, têm mostrado que no modelo de endotoxemia, a injeção de LPS induz uma rápida (em minutos) queda da pressão arterial (Wright et al., 1992; Duma et al., 2011). Foi demonstrado que este efeito sobre a pressão arterial, e também o desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica, são dependentes da liberação inicial de NO, uma vez que o tratamento com inibidores das NOS bloqueou estes efeitos do LPS (Szabó et al., 1993; Duma et al., 2011). Porém, os mecanismos pelos quais ocorrem estes efeitos não foram investigados.

Dessa forma, começamos nosso estudo avaliando os possíveis mecanismos pelos quais o LPS poderia afetar diretamente as células musculares lisas, cujos mecanismos contráteis são determinantes para manutenção da pressão arterial normal.

Utilizamos uma linhagem de células musculares lisas de aorta de rato, A7r5, e um modelo de estimulação *in vitro*. Conforme dados da literatura, é sabido que a indução da expressão NOS-2 requer diferentes estímulos em diferentes tipos celulares (revisado em Hecker, Cattaruzza, & Wagner, 1999). Verificamos que as células da linhagem A7r5 responderam bem à estimulação com 1 µg/mL de LPS e 200 U/mL de IFN, produzindo elevadas concentrações de nitrito após longos períodos de incubação, sendo adotado como padrão de estímulo celular nesse trabalho.

Embora soubéssemos que as células A7r5 são capazes de expressar a NOS-2 quando estimuladas com LPS/IFN, essa isoforma não é expressa constitutivamente em células musculares lisas e possui um perfil de expressão lento, quando comparado com macrófagos (revisado em Hecker et al., 1999). No entanto, células musculares lisas expressam constitutivamente as isoformas NOS-1 e NOS-3, as quais produzem quantidades menores de NO que a NOS-2 (McAndrew et al., 1997). Portanto, para avaliar o efeito agudo da estimulação com LPS/IFN sobre a via do NO foi necessário utilizar um método sensível o suficiente para detecção de quantidades muito pequenas de NO, qual seja com uso de sondas fluorescentes (Gomes et al., 2006).

Observamos que a estimulação das células A7r5 com LPS/IFN induziu um rápido aumento na síntese de NO já nos primeiros 5 minutos de estimulação, bem como, induziu a rápida formação de peroxinitrito. A afirmação de que houve formação de peroxinitrito após a estimulação com LPS/IFN é baseada nas seguintes evidências: 1) o fato de ter sido observado um aumento significativo na fluorescência da sonda CM-H₂DCF DA, a qual é oxidada por potentes agentes oxidantes derivados da decomposição do peroxinitrito (Kalyanaraman et al., 2012; Forman et al., 2015); 2) na presença de compostos que diminuíam a produção ou a disponibilidade do NO e do ânion superóxido, a intensidade de fluorescência da sonda CM-H₂DCF DA diminuiu significativamente após estimulação com LPS/IFN; 3) ter sido observado um aumento significativo da marcação para 3-nitrotirosina nas células estimuladas com LPS/IFN e 4) a marcação para 3-nitrotirosina ter sido significativamente diminuída na presença de um inibidor de NOS e na presença de um sequestrador de NO. Estas evidências sugerem que o aumento de fluorescência da sonda CM-H₂DCF DA observada em fatias de aorta estimuladas com LPS/IFN também seja devido à formação de peroxinitrito. Como as fatias de aorta de animais *naïve* estimuladas com LPS/IFN também responderam gerando um pulso de NO, esta liberação de espécies reativas parece estar diretamente envolvida com a hipotensão observada em animais minutos após uma injeção de LPS (Wright et al., 1992; Szabó et al., 1993; Duma et al., 2011).

Como mencionado, a formação de peroxinitrito também depende de outro precursor, o ânion superóxido. Corroborando com outros estudos (Asehnoune et al., 2004; Gloire et al., 2006; Brown and Griendling, 2009; Moraes et al., 2012), nossos resultados indicam que a ativação das NOX

é uma provável fonte de ânion superóxido e outras espécies reativas de oxigênio. Assim, os nossos resultados mostram que a estimulação de células musculares lisas A7r5 e de fatias de aorta com LPS/IFN induz uma rápida formação de NO e de ânion superóxido, levando à formação de peroxinitrito.

Sabe-se de longa data que toxinas como o LPS e diversas citocinas como IFN, IL-1 β e TNF- α são estímulos pró-inflamatórios e induzem, dentre muitas proteínas, a expressão da NOS-2 em vários tipos celulares, incluindo células musculares lisas (Hecker et al., 1999; Yang et al., 2005; Vargas et al., 2015). Embora estes estímulos sejam capazes de induzir a expressão de NOS-2 em inúmeros tipos celulares, cada tipo celular necessita de uma combinação diferente de estímulos e possui um perfil único de ativação (revisado em Hecker et al., 1999; Zhang, Snead, & Catravas, 2001). Nesse trabalho, onde LPS/IFN foi utilizado como estímulo padrão, obtivemos um exemplo de como a resposta frente a esse estímulo varia conforme a célula. Mostramos aqui que, para induzir a expressão de NOS-2 nas células musculares lisas A7r5, bastava que o estímulo permanecesse por pelo menos 12 horas, podendo então ser removido sem interferir na expressão posterior da enzima e na produção de nitrito nos tempos avaliados. No entanto, quando este mesmo protocolo foi realizado em fibroblastos de camundongos WT e GR^{dim/dim} utilizados na segunda parte desse trabalho, observou-se que as células não tinham sido ativadas. Porém, quando o estímulo permaneceu por 24 horas incubado com os fibroblastos, observou-se a ativação dos mesmos através do indicativo indireto da expressão da NOS-2, que é o acúmulo de elevadas concentrações de nitrito no sobrenadante da cultura celular.

A observação de que nas células musculares lisas a expressão da NOS-2 ocorria mesmo após a remoção do estímulo, sugere que uma vez que o gatilho (um pulso de NO e de peroxinitrito) é disparado, eventos como a expressão da NOS-2 ocorrerão independente da presença do estímulo. Dados da literatura corroboram com esta ideia, pois sugerem que o controle da atividade da NOS-2 ocorra principalmente a nível de transcrição do DNA, não sendo possível regular sua atividade após ter sido expressa, exceto por desestabilização da proteína (Morris et al., 1994).

A importância do pulso inicial de NO e de peroxinitrito como agentes sinalizadores da expressão da NOS-2 é suportada pela

demonstração de que o pré-tratamento com um inibidor de NOS ou com um sequestrador de NO, bem como com inibidores ou sequestradores de ânion superóxido, diminuíram significativamente a expressão da NOS-2 e o acúmulo de nitrito em células estimuladas. A incubação com um catalisador da decomposição de peroxinitrito também diminuiu o acúmulo de nitrito no sobrenadante das células em 48 horas, confirmando a participação dessa espécie reativa na ativação de células musculares lisas. Estes resultados estão de acordo com os dados obtidos por Duma e colaboradores, onde o pré-tratamento com um inibidor de NOS-1 reduziu a expressão de NOS-2 e a mortalidade de animais endotoxêmicos e sépticos (Duma et al., 2011). Além disso, os resultados do presente trabalho acrescentam uma importante peça neste quebra-cabeças, demonstrando que as células musculares lisas podem responder diretamente à estímulos como o LPS e o IFN, produzindo um pulso de espécies reativas de nitrogênio. Esse pulso contribui para o relaxamento dessas células e, ao mesmo tempo, induz um fenótipo inflamatório que implicará no prejuízo dos mecanismos contráteis dessas células musculares, contribuindo para o desenvolvimento da disfunção cardiovascular séptica.

Com relação aos mecanismos envolvidos na regulação da expressão da NOS-2, sabe-se que a ativação do fator de transcrição NF- κ B é uma via bem estabelecida (revisado em Hecker et al., 1999 e Pautz et al., 2010). Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são capazes de induzir a translocação nuclear e a ativação do NF- κ B em diferentes contextos (Connelly et al., 2001; Gloire et al., 2006; Morgan and Liu, 2011) e, conseqüentemente, induzir a expressão de várias proteínas, tanto pró quanto anti-inflamatórias (Baeuerle, 1998; Rothwarf and Karin, 1999; Karin and Delhase, 2000; Hayden and Ghosh, 2008; Pautz et al., 2010). Embora outros estudos tenham mostrado que o NO e espécies de oxigênio são importantes indutores da ativação do NF- κ B por si só (Umansky et al., 1998; Gloire et al., 2006), a formação concomitante de peroxinitrito não havia sido avaliada.

Nesse trabalho, demonstramos que o pré-tratamento com um inibidor de NOS ou com um sequestrador de NO diminuiu significativamente a translocação e ativação do NF- κ B em células musculares lisas levando, conseqüentemente, à menor expressão de NOS-2 observada com estes pré-tratamentos. No entanto, como o pré-tratamento com um catalisador da decomposição de peroxinitrito também diminuiu o acúmulo de nitrito,

um indicador da expressão de NOS-2, a hipótese de que o peroxinitrito sozinho, na ausência de outros sinais, seria capaz de induzir a ativação de células musculares lisas foi avaliada. As células incubadas somente com um doador de peroxinitrito (SIN-1) apresentaram marcação positiva para 3-nitrotirosina (confirmando a formação de peroxinitrito). Entretanto, apesar do SIN-1 induzir a translocação de NF- κ B, não houve indução da expressão de NOS-2 (resultados não mostrados). Este dado, aparentemente contraditório, será retomado ao longo da Discussão. Contudo, a participação do peroxinitrito na indução da expressão da NOS-2 ficou novamente evidenciada quando células A7r5 submetidas ao silenciamento das enzimas NOS-1 (fonte de NO) ou NOX-1 (possível fonte de ânion superóxido) e estimuladas com LPS/IFN, apresentaram reduzida expressão de NOS-2 e acúmulo de nitrito. Esses dados sugerem que talvez o peroxinitrito devesse ser gerado em um compartimento intracelular específico e/ou que necessitaria de um segundo sinal, como o de uma citocina, para induzir a ativação do NF- κ B, como demonstrado em outra situação (Janssen-Heininger et al., 1999).

Para tentar simular uma produção intracelular de peroxinitrito e avaliar a possível importância da compartimentalização da produção desta espécie, baixas concentrações de um doador de NO (GTN) e um indutor de produção de superóxido (grupo heme) foram incubados simultaneamente em células A7r5 por 18 horas. Após este período os compostos foram lavados e as células incubadas por mais 30 horas apenas com meio de cultura, para evitar a interferência direta do NO oriundo do doador na dosagem de nitrito. Este protocolo de incubação simultânea de baixas concentrações destes compostos resultou na ativação das células A7r5, uma vez que níveis elevados de nitrito foram encontrados ao final das 48 horas de experimento. Como a incubação de cada composto (GTN ou heme) isoladamente por 18 horas não foi capaz de aumentar a concentração de nitrito ao final de 48 horas, demonstramos que a formação intracelular de peroxinitrito é essencial para a indução da expressão de NOS-2 em células musculares lisas.

Connelly e colaboradores mostraram que o NO oriundo da ativação da NOS-3 induzia a translocação nuclear de NF- κ B e é importante para indução da expressão de proteínas pró-inflamatórias em macrófagos derivados da medula óssea (Connelly, Jacobs, Palacios-Callender, Moncada, & Hobbs, 2003) e em células endoteliais (Connelly, Madhani, & Hobbs, 2005). Em 2008, Wu e colaboradores demonstraram que a

ativação de enzimas NOX também são importantes para a expressão de NOS-2 em células endoteliais microvasculares (Wu et al., 2008). Com base em nossos resultados e nestes estudos, é possível sugerir que apesar da fonte de NO que desencadeia vias inflamatórias poder ser diferente em diferentes tipos celulares, a contribuição do pulso de NO para a formação de baixas concentrações de peroxinitrito parece ser um passo importante para induzir e manter a inflamação vascular. Hattori e colaboradores (2004) sugeriram que o peroxinitrito seja importante para a estabilização da ativação e amplificação de sinal do NF- κ B (Hattori et al., 2004) e nossos dados suportam essa ideia pelo fato de 1) a marcação para 3-nitrotirosina estar fortemente aumentada no núcleo de células ativadas 2 horas após o estímulo e 2) pela evidência indireta de indução da expressão da NOS-2 após estimulação com baixas concentrações de heme e GTN.

Nossos resultados também estabelecem uma ligação entre a ativação de receptores TLR4 e IFNGR1 com a ativação das NOS constitutivas em células musculares lisas, uma vez que ambas as isoformas (NOS-1 e NOS-3) foram ativadas pela estimulação com LPS/IFN (evidenciado nos experimentos com as sondas fluorescentes em células A7r5 silenciadas) (Scheschowitsch et al., 2015). Apesar de nosso estudo não ter abordado a maneira pela qual ocorre a estimulação das NOS constitutivas nesse contexto, ficou evidente que somente o NO oriundo da NOS-1 parece ser eficaz para a formação de peroxinitrito e sinalização da ativação celular nas células musculares lisas.

As possibilidades mais prováveis que poderiam explicar este fato seriam a diferente compartimentalização destas duas isoformas e/ou a diferença na quantidade de NO produzida por cada isoforma. A NOS-3 encontra-se ligada à caveolina-1 nas cavéolas da membrana plasmática em estado inativo. Ao ser liberada da caveolina-1, a NOS-3 pode ser fosforilada ou interagir com a cálcio-calmodulina para ser ativada (Förstermann and Sessa, 2012). Já a isoforma NOS-1 pode ser encontrada em forma solúvel e particulada no citoplasma, no núcleo, no retículo sarcoplasmático e nas mitocôndrias (Zhou and Zhu, 2009). Além disso, apesar de ambas serem isoformas constitutivas, a quantidade de NO produzida pela NOS-1 é cerca de 10 vezes maior que a quantidade produzida pela NOS-3 (McAndrew et al., 1997). A reação do NO e do ânion superóxido para a formação de peroxinitrito é extremamente rápida, mas, devido à natureza reativa de ambos os precursores, a sua produção simultânea deve ocorrer em estreita proximidade para que haja formação

do peroxinitrito. Finalmente, o NO apresenta elevada solubilidade em lipídios e como a NOS-3 está presente na membrana plasmática, além de produzir uma menor quantidade de NO, esse NO ainda pode se difundir na membrana, ficando longe da fonte de ânion superóxido que é ativada pelo LPS/IFN. Por outro lado, o NO produzido pela NOS-1 pode estar na concentração correta e/ou no compartimento correto para interagir com o ânion superóxido para formar peroxinitrito. Um trabalho recente, publicado menos de um mês após a publicação do nosso trabalho, demonstrou a presença de NOS-1 no núcleo de macrófagos derivados da medula óssea e concluiu que a presença dessa enzima no núcleo é fundamental para ativação do NF- κ B (Baig et al., 2015).

Além desta observação e de também mostrar a importância do NO derivado da NOS-1 para o desenvolvimento da sepse e da ativação de macrófagos, o trabalho de Baig e colaboradores investigou o mecanismo pelo qual o NO derivado da NOS-1 atua sobre a via do NF- κ B. Este trabalho demonstrou que a proteína supressora da sinalização de citocinas 1 (SOCS-1, do inglês *suppressor of cytokine signaling-1*), a qual se liga diretamente à subunidade p65 do NF- κ B para indução da degradação da subunidade, possui um nível basal de S-nitrosilação. Após a estimulação dos macrófagos com LPS o nível de S-nitrosilação desta proteína é significativamente aumentado pela ação do NO da NOS-1. Uma vez que a SOCS-1 se encontra altamente nitrosilada, ela deixa de interagir diretamente com a p65 do NF- κ B, deixando-o livre para indução da transcrição gênica (Baig et al., 2015). Considerando que 1) este estudo foi realizado em macrófagos derivados de medula óssea de camundongos e em células HEK293, 2) que os achados com relação à importância da NOS-1 para a indução da resposta inflamatória foram semelhantes aos achados do nosso estudo realizado em células musculares lisas, temos evidência bastante concreta que o mecanismo proposto por nós é robusto e parece ocorrer em diferentes tipos celulares.

Outro achado interessante do nosso estudo foi que a ativação de células musculares lisas com LPS/IFN, além de estimular a produção de NO a partir da NOS-1 e da NOS-3, também aumentou a expressão dessas isoformas em períodos tardios. Nosso grupo demonstrou recentemente que o aumento da expressão da NOS-1 em períodos tardios da sepse desempenha importante ação na hipotensão e na disfunção vascular observada nesta condição (Nardi et al., 2014), uma vez que o aumento da expressão da enzima é concomitante com o aumento da expressão de um

dos mais importantes alvos do NO em vasos, a sGC (Fernandes et al., 2009). O aumento da expressão das NOS constitutivas também tem sido demonstrado em vários tecidos de animais sépticos (Fernandes et al., 2009; Araújo et al., 2012).

Embora a maioria dos nossos resultados tenham sido obtidos num contexto *in vitro* com uma linhagem celular ou com cortes de aorta, não podíamos deixar de pensar num contexto maior. Já foi demonstrado que o bloqueio precoce da síntese de NO melhora a disfunção vascular induzida por LPS (Thiemermann and Vane, 1990). Seguindo a mesma linha de raciocínio, alguns autores especularam que a produção basal *versus* a produção induzida de NO pode ser crítica para a regulação da ativação do NF- κ B (bem como, para a reação inflamatória em si) (Persichini et al., 2006). Portanto, até o momento, nossos resultados indicavam que esse rápido pulso inicial de NO (da isoforma NOS-1) e de peroxinitrito poderiam atuar como importantes agentes sinalizadores e ativadores da resposta inflamatória vascular, implicando diretamente na origem da disfunção vascular na sepse.

Uma maneira que encontramos de avaliar a relevância biológica desse pulso de NO e de peroxinitrito para o desenvolvimento da resposta inflamatória como um todo, foi através da avaliação da taxa de sobrevivência e de parâmetros inflamatórios de animais ADX desafiados com LPS, pré-tratados ou não com um inibidor seletivo da NOS-1, o 7-NI. Animais ADX não possuem a proteção natural anti-inflamatória dos GCs endógenos e são muito mais sensíveis ao LPS que animais *naïve* (Perretti et al., 1989; Zhang et al., 2012). Apesar da produção de corticoides não ocorrer exclusivamente nas glândulas adrenais, os animais ADX utilizados neste estudo apresentaram concentrações plasmáticas não detectáveis de corticosterona, validando a metodologia para o objetivo proposto. Além disso, os ratos ADX se demonstraram muito mais sensíveis ao LPS e foram a óbito em poucas horas. A hipoglicemia acentuada e progressiva parece ter sido a causa mais provável do óbito nos ratos ADX, uma vez que a mobilização de glicose e o processo de gliconeogênese são diretamente regulados pelos GCs. A glicemia de animais sham pré-tratados com 7-NI se apresentou mais elevada que a dos animais não tratados, 30 minutos após o desafio com LPS. Porém, esse aumento inicial da glicemia não ocorreu nos animais ADX pré-tratados com 7-NI, sugerindo que este efeito do 7-NI dependa da presença dos hormônios produzidos pelas glândulas adrenais. Nos animais ADX

pré-tratados com 7-NI, observou-se uma queda mais acentuada da glicemia em 2 horas após o desafio e logo em seguida uma recuperação gradual dos níveis glicêmicos. Este efeito do 7-NI sobre a glicemia a partir da terceira hora parece ser um reflexo da recuperação dos animais frente ao estímulo agressor e não a causa da recuperação dos mesmos, baseado no que será exposto a seguir.

O pré-tratamento de ratos ADX com 7-NI antes do desafio com LPS preveniu a mortalidade e também preveniu o aumento da concentração dos parâmetros inflamatórios avaliados. Estes resultados corroboram com a ideia de que o pulso inicial de NO (da isoforma NOS-1) e de peroxinitrito são um dos principais “gatilhos” para indução da resposta inflamatória como um todo. A ideia de “gatilho” é corroborada pelo fato do tratamento com 7-NI 1 hora após o desafio com LPS não gerar o mesmo efeito protetor do pré-tratamento. Uma resposta inflamatória mais branda, como ocorreu nos animais pré-tratados com 7-NI, parecia ser um aspecto crucial para a diminuição da mortalidade induzida pelo choque endotoxêmico. Esta hipótese foi comprovada no recente trabalho de Baig e colaboradores (2015), que mostraram que dentre animais *knockout* para as 3 isoformas das NOS, somente animais *knockout* para a isoforma NOS-1, a qual é inibida pelo 7-NI, apresentaram menor mortalidade em dois modelos distintos de sepse (Baig et al., 2015). Kalil e colaboradores também demonstraram recentemente que, diferente do que se esperava, pacientes transplantados e imunodeprimidos em função do transplante apresentaram menor mortalidade 28 e 90 dias após o diagnóstico de sepse (Kalil et al., 2015). Apesar destes resultados terem sido obtidos em um contexto completamente diferente, a diminuição da mortalidade em pacientes sépticos transplantados foi atribuída a uma resposta inflamatória mais branda em função da imunossupressão presente nestes pacientes.

Uma das classes de medicamentos ainda hoje amplamente utilizados para indução e manutenção da imunossupressão necessária para transplantes (Söderlund and Rådegran, 2015) e doenças autoimunes (Spies et al., 2011), são os GCs. Portanto, pacientes transplantados normalmente fazem uso de GCs exógenos como a prednisolona (Söderlund and Rådegran, 2015). Os GCs foram e ainda são considerados os anti-inflamatórios mais eficazes existentes. Por esta razão, também estão entre as classes de medicamentos mais prescritas mundialmente,

disponíveis em diferentes formulações e formas farmacêuticas (Duma et al., 2006; De Bosscher and Haegeman, 2009b).

De modo geral, os efeitos mediados pelos GR dependem da ligação de um ligante agonista ao domínio de ligação do ligante. Em 1999, Galigniana e colaboradores demonstraram que a capacidade de ligação do GR é afetada negativamente por altas concentrações de NO (Galigniana et al., 1999). Em 2005, nosso grupo demonstrou que a capacidade de ligação do GR está diminuída em fases tardias da sepse experimental em ratos (Duma et al., 2004) e, apesar dos GCs serem potentes anti-inflamatórios, seu uso no tratamento da sepse ainda é controverso (Duma, 2005; Annane et al., 2009; Sligl et al., 2009; Sprung et al., 2011). Paradoxalmente, foi demonstrado nos últimos anos que GCs sintéticos que contêm NO em sua formulação apresentam melhor eficácia anti-inflamatória e geram menos efeitos colaterais (Paul-Clark et al., 2003). Dessa forma, devido aos diferentes efeitos do NO conforme a sua concentração, torna-se perceptível que a relação dos GCs e seus receptores com o NO é bastante complexa e que ainda há muito a ser descoberto.

No presente estudo, uma nova relação entre o NO e o GR foi demonstrada. Durante o desenvolvimento dos experimentos relativos à primeira hipótese e que originou o manuscrito anexo, a observação de que a inibição do pulso de NO e de peroxinitrito diminuía a translocação do NF- κ B para o núcleo levou à hipótese de que talvez o GR, que interage com o NF- κ B no citoplasma para impedir que o mesmo transloque para o núcleo, também pudesse ser afetado pelo pulso de NO e de peroxinitrito. Como demonstrado nos experimentos de imunofluorescência para GR em aorta de ratos sham e ADX e em células musculares lisas A7r5, observou-se que o desafio com LPS ou LPS/IFN, respectivamente, foi capaz de induzir a translocação nuclear de GR de forma rápida (30 e 60 minutos após a estimulação). A participação do pulso de NO e provavelmente de peroxinitrito, ficou evidente tanto *in vivo* quanto *in vitro*, uma vez que a translocação nuclear de GR se apresentou diminuída nas aortas dos animais pré-tratados com 7-NI e nas células A7r5. É importante ressaltar que a translocação nuclear do GR observada após a estimulação com LPS/IFN ocorreu independente da presença de um ligante. Até o presente momento, não há relatos na literatura da relação direta destas espécies reativas de nitrogênio com a indução da translocação nuclear de GR independente de ligante.

Um fato que nos chamou atenção foi que os grupos controles de células A7r5 tratadas apenas com 7-NI apresentaram níveis significativamente elevados do conteúdo nuclear de GR (Figura 11) e do NF- κ B (dados não mostrados). Estes dados sugerem que as concentrações basais de NO participam da estabilidade do complexo citoplasmático GR-NF- κ B. Em astrócitos, foi demonstrado que concentrações basais de NO derivado da NOS-1 participam da manutenção do NF- κ B inativo no citoplasma (Togashi et al., 1997). As funções da concentração basal intracelular de NO são provavelmente mediadas pela S-nitrosilação de resíduos de cisteína presentes em inúmeras proteínas, cuja função pode ser regulada pela S-nitrosilação destes resíduos (Hess et al., 2005). Dados recentes da literatura mostraram que a proteína SOCS-1, que está diretamente relacionada com o efeito do NO derivado da NOS-1 sobre a via de ativação do NF- κ B, possui níveis basais de S-nitrosilação (Baig et al., 2015). Dessa forma, é possível que a diminuição dessa nitrosilação basal da SOCS-1 pelo inibidor da NOS afete a sua ligação com a p65 do NF- κ B, permitindo com que este fator de transcrição seja translocado para o núcleo. Outra proteína cuja função na manutenção do complexo do GR no citoplasma está bem estabelecida, a HSP-90, também possui sítios de nitrosilação (Martínez-Ruiz et al., 2005; Mollapour and Neckers, 2012) podendo também sofrer interferência dos níveis basais de NO.

As ações isoladas do NO e do peroxinitrito na translocação nuclear do GR em células musculares lisas foi avaliado através da incubação das células com doadores de NO ou com peroxinitrito, respectivamente. A incubação com o doador de peroxinitrito, SIN-1, induziu a translocação nuclear de GR, enquanto a incubação apenas com GTN não induziu translocação nos tempos avaliados. Além de induzir a translocação nuclear do GR, a incubação com SIN-1 induziu a translocação nuclear simultânea do NF- κ B. No entanto, ao comparar a translocação nuclear do GR e do NF- κ B induzida por LPS/IFN com a translocação induzida pelo SIN-1 é possível perceber algumas diferenças. Primeiramente, a translocação do GR e do NF- κ B, 1 hora após a estimulação com LPS/IFN, foi mais intensa que a translocação induzida pelo SIN-1. Após 4 horas de estimulação, o conteúdo nuclear de NF- κ B estava reduzido nas células estimuladas com LPS/IFN, enquanto seu conteúdo continuou aumentado nas células incubadas com SIN-1. Estas diferenças sugerem que 1) a via de translocação do GR também parece ser melhor estimulada quando há a formação intracelular de peroxinitrito, 2) o mecanismo de translocação induzido pelo SIN-1 parece fazer com que o GR e o NF- κ B transloquem

juntos para o núcleo, 3) o mecanismo de translocação do NF- κ B induzido pela estimulação com LPS/IFN parece ser diferente do mecanismo induzido pelo SIN-1, pois em 4 horas o conteúdo de NF- κ B destes dois grupos é diferente, corroborando com o que foi sugerido anteriormente, de que o peroxinitrito seja importante para manter e estabilizar o NF- κ B e o GR no núcleo. Em um contexto *in vivo*, foi demonstrado que a inibição da produção de peroxinitrito no modelo de CLP em camundongos é capaz de restabelecer a migração de neutrófilos nestes animais e aumentar a taxa de sobrevivência dos mesmos (Torres-Dueñas et al., 2007).

Apesar da estimulação com LPS/IFN induzir a translocação nuclear simultânea de GR e NF- κ B (ao mesmo tempo, mas não necessariamente complexados ou co-localizados) em 1 hora, o conteúdo de GR no núcleo é maior do que o conteúdo intranuclear de NF- κ B após 4 horas de estimulação. A presença prolongada do GR no núcleo após a estimulação com LPS/IFN poderia estar desempenhando um papel anti-inflamatório por si só ou então, facilitar a ação dos GCs numa situação *in vivo*, onde ocorre um aumento da concentração plasmática de GCs após estímulos estressores. Porém, é importante lembrar que estes GR foram translocados para o núcleo *na ausência de ligante*. Um dado que suporta esta teoria, é o fato de que a isoforma translocada para o núcleo na aorta de animais ADX foi a isoforma GR α , a isoforma ativa do GR. Nos outros experimentos realizados, por uma questão de disponibilidade de reagentes, o anticorpo utilizado para detectar o GR foi um anticorpo não-seletivo, o qual detecta tanto a isoforma α quanto β do GR.

Ao ocorrer a ligação de um ligante à isoforma GR α , ocorre a formação de um complexo que é translocado para o núcleo e, na sequência, um dos vários mecanismos de ação do complexo GC-GR é desencadeado. Apesar de ser possível observar translocação nuclear de GR induzida por LPS/IFN, observou-se que esta translocação ocorre com uma cinética lenta e que 1 hora após a estimulação ainda há muitos receptores no citoplasma. No entanto, foi observado que a cinética de translocação nuclear de GR induzida por ligantes, sejam eles agonistas ou antagonistas clássicos, é muito mais rápida. Após 1 hora na presença destes ligantes praticamente todos os GR foram translocados para o núcleo. Esta diferença na cinética de translocação sugere que a estimulação com LPS/IFN gere a exposição de um NLS diferente do que é exposto após a ligação de um ligante. Ao expor diferentes NLS, diferentes importinas são recrutadas, o que estaria associado à diferença

na cinética de translocação nuclear do GR observada, como sugerido na literatura para outros estímulos (Ito et al., 2006a; Echeverría et al., 2009; Galigiana et al., 2010; Hakim et al., 2013)

O mecanismo de transativação, o qual já foi demonstrado ser também muito importante para a ação anti-inflamatória do GR (Adcock et al., 2006; Vandevyver et al., 2012a), depende da formação de homodímeros de GR normalmente desencadeado pela ligação de um agonista. Para investigar se a translocação do GR induzida pela estimulação com LPS/IFN dependem do DBD, foram utilizados fibroblastos embrionários de camundongos WT e GR^{dim/dim}. Primeiramente, investigamos se a estimulação com LPS/IFN foi capaz de induzir a translocação do GR, na ausência de ligantes, em outro tipo celular (no caso fibroblastos embrionários de camundongos WT), além das células A7r5. Após a validação desta possibilidade, observamos que além do conteúdo intranuclear basal de GR ser mais elevado nos fibroblastos GR^{dim/dim}, a estimulação com LPS/IFN não induziu a translocação nuclear do receptor, sugerindo que a translocação nuclear do GR induzida por LPS/IFN parece depender da integridade do DBD. O fato do conteúdo intranuclear de GR ser mais elevado em fibroblastos GR^{dim/dim} pode ser decorrente de uma alteração no equilíbrio entre as taxas de importação e exportação nuclear do receptor (Savory et al., 1999; Beck et al., 2011).

Com relação à participação do pulso de NO e de peroxinitrito, foi observado que em ambas as linhagens de fibroblastos a incubação apenas com 7-NI induziu a translocação nuclear de GR, mas em menor escala nas células GR^{dim/dim}, provavelmente pelo seu conteúdo basal de GR no núcleo ser maior. Estes dados corroboram com a ideia de que concentrações basais de NO desempenhem alguma função na estabilização do GR no citoplasma.

Em fibroblastos WT, a inibição do pulso com 7-NI preveniu parcialmente a translocação nuclear do GR, diminuiu o acúmulo de nitrito e diminuiu parcialmente a produção de IL-6, indicando que houve uma menor ativação destas células. Sabemos que existe um viés experimental na dosagem de nitrito em fibroblastos, pois nestas células o inibidor de NOS ficou em contato permanente com as células. Desta forma, a diminuição da concentração de nitrito nos grupos pré-tratados pode ser resultante de uma inibição não seletiva da NOS-2 pelo 7-NI e não uma diminuição da expressão da NOS-2 de fato. Porém, apesar deste

problema, o fato do pré-tratamento com 7-NI ter prevenido o aumento da expressão de IL-6, a qual depende da via do NF- κ B para ser expressa e não sofre interferência direta do 7-NI, sugere fortemente que um mecanismo semelhante ao demonstrado nas células A7r5 também ocorra nos fibroblastos WT. Supreendentemente, mesmo a estimulação com LPS/IFN não tendo induzido a translocação nuclear de GR em fibroblastos GR^{dim/dim}, quando estas células foram pré-incubadas com 7-NI, o efeito da inibição da concentração basal de NO foi ainda mais pronunciado. Até o momento não temos uma explicação plausível para este fenômeno. No entanto, observamos que nos fibroblastos GR^{dim/dim} o pré-tratamento com 7-NI não impediu o aumento da expressão de IL-6, e provavelmente, também não impediu a expressão da NOS-2 em 24 horas.

Os dados obtidos a partir de um experimento *in vivo* com animais GR^{dim/dim} confirmaram que a integridade do DBD do GR possui um papel fundamental para um controle adequado da resposta inflamatória e para o efeito protetor da inibição do NO derivado da NOS-1. No referido experimento foi observado que o pré-tratamento com 7-NI dos animais GR^{dim/dim} não aumentou a taxa de sobrevivência e também não preveniu o aumento da concentração plasmática de IL-6, ao contrário do que foi observado nos animais WT. Além disso, um dado importante foi obtido a partir da dosagem de IL-6 plasmática. Animais GR^{dim/dim} mostram uma concentração bastante elevada de IL-6 após serem desafiados com LPS, quando comparados aos animais WT. Esta diferença no grau de produção de IL-6 sugere que os GR íntegros que são translocados para o núcleo pela estimulação com LPS/IFN (como demonstrado nos fibroblastos), podem estar preparados para receberem o ligante num primeiro momento (efeito “*priming*”), facilitando a ação anti-inflamatória dos GCs endógenos que são liberados na corrente sanguínea após um estímulo estressor. O efeito protetor do pré-tratamento com 7-NI nos animais WT corrobora com os dados que já foram apresentados de que a inibição do NO derivado da NOS-1 diminui a ativação do NF- κ B e gera uma resposta inflamatória mais branda. Contudo, o fato deste efeito protetor não ter sido observado nos animais GR^{dim/dim} (deficientes na dimerização de GR junto ao DNA, mas com níveis normais de GCs endógenos), mas ter sido observado nos animais ADX (GR íntegros, mas sem GCs endógenos) e WT, demonstra claramente que o GR participa de alguma forma desta via protetora desencadeada pela inibição do NO derivado da NOS-1.

Com base no que foi exposto até o momento, sugerimos algumas hipóteses com relação à via do GR para serem exploradas no futuro. Inicialmente, sugerimos que as concentrações basais de NO contribuem para a manutenção da estabilidade do complexo citoplasmático do GR e do NF- κ B em condições fisiológicas. Quanto ao pulso de NO e de peroxinitrito induzido pela estimulação com LPS/IFN, a principal hipótese é de que o aumento da concentração intracelular destas espécies causaria uma desestabilização do complexo citoplasmático GR-NF- κ B e seus inúmeros cofatores, por um mecanismo diferente do mecanismo gerado pelas concentrações basais de NO, como discutido a seguir. Como foi demonstrado, o NO derivado da NOS-1 nitrosila a proteína SOCS-1 e facilita a ativação do NF- κ B (Baig et al., 2015). Ao mesmo tempo, o pulso de peroxinitrito nitraria resíduos de tirosina presentes no GR, induzindo sua translocação para o núcleo fazendo o “*priming*” de GR, como sugerido pelo mecanismo de ação de novos fármacos onde a nitração de alguns resíduos aumenta a capacidade de ligação aos ligantes (Paul-Clark et al., 2003). Possivelmente, esses resíduos de tirosina estão presentes no DBD ou então muito próximos deste sítio, uma vez que células que apresentam uma mutação no DBD não conseguem ter seus receptores translocados para o núcleo pela estimulação com LPS/IFN, na ausência de corticoides. Nas células com GR íntegros sua translocação para o núcleo, mesmo na ausência de corticoides, parece exercer um efeito intrínseco capaz de inibir parcialmente a transcrição gênica mediada pelo NF- κ B, tendo em vista a diferença na concentração plasmática de IL-6 em animais WT e GR^{dim/dim} após o desafio com LPS.

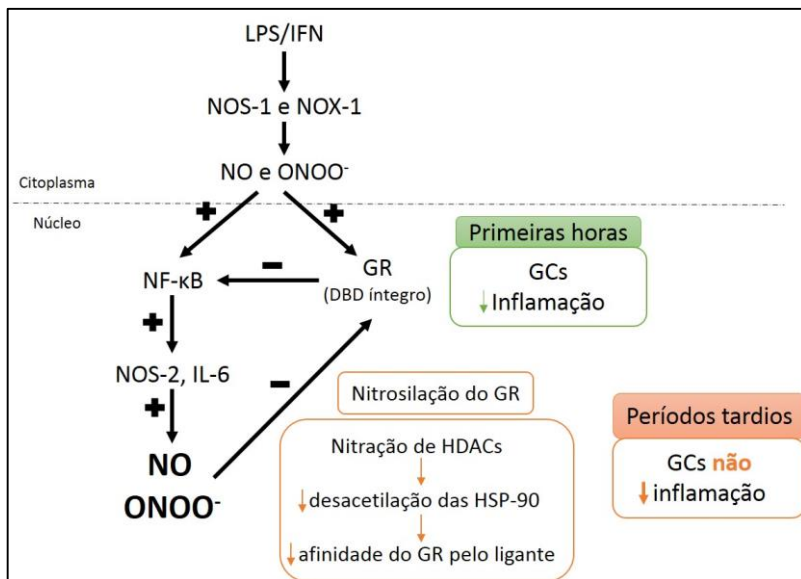
Nos animais ADX, apesar do efeito “*priming*” de GR ocorrer, como sugerido pelo conteúdo nuclear de GR na aorta destes animais, os mesmos acabam sendo muito mais sensíveis ao LPS por não haver GCs endógenos para ajudar no controle da reação inflamatória. Por fim, o elo de ligação entre o GR e o NF- κ B pode ocorrer através das HSP-90. Estas chaperonas atuam na estabilização e/ou ativação de pelo menos 200 proteínas intracelulares em condições normais (revisado em Wandinger et al., 2008; Li et al., 2012). A participação das HSP-90 na estabilização do complexo do GR no citoplasma está bem estabelecido (Kang et al., 1994; Rajapandi et al., 2000; Conway-Campbell et al., 2011; Galigniana et al., 2012) e, sabe-se atualmente, que estas proteínas também sofrem nitrosilação (Martínez-Ruiz et al., 2005; Li et al., 2012; Mollapour and Neckers, 2012) e que sua atividade também é regulada por outras modificações pós-translacionais, como acetilação e fosforilação (revisado em Aoyagi and

Archer, 2005; Mollapour and Neckers, 2012). Uma das proteínas que desacetila a HSP-90 para que esta possa se complexar com o GR e mantê-lo num estado de alta afinidade pelo ligante é a HDAC-6 (Aoyagi and Archer, 2005; Kovacs et al., 2005). Porém, já foi demonstrado que as histonas desacetilases podem ser inativadas pelo peroxinitrito através da nitração de resíduos de tirosina (Osoata et al., 2009; Barnes, 2010; Malhotra et al., 2011). Portanto, se as HSP-90 forem o elo de ligação do complexo do GR com o complexo do NF- κ B, o pulso de NO e de peroxinitrito gerado a partir da estimulação com LPS/IFN pode diminuir a atividade das HSP-90 e desencadear toda a sequência de eventos observadas neste trabalho.

Uma segunda via que poderia contribuir com a indução da translocação nuclear do GR pela estimulação com LPS/IFN seria o aumento de outros segundos mensageiros, como o AMPc. Foi demonstrado que o LPS e o IFN também induzem um aumento dos níveis de AMPc (Liu et al., 2004; Moon et al., 2011) e que agonistas β 2-adrenérgicos induzem a translocação do GR e ligação a um GRE de maneira independente de ligantes, através do aumento dos níveis de AMPc gerados pela ativação do receptor β 2 (Eickelberg et al., 1999; Vandevyver et al., 2012b). Considerando a evidência de que a translocação induzida por AMPc envolve a formação de dímeros e ligação do GR aos GREs, pode-se sugerir que essa via seja prejudicada pela mutação GR^{dim}.

A terceira hipótese sugerida envolve a interação proteína-proteína entre o GR e o NF- κ B e é sustentada pelo fato de existirem diferentes NLS que medeiam a translocação de GR por diferentes mecanismos de translocação (Savory et al., 1999). Nela, a translocação nuclear de GR induzida pela diminuição do NO basal envolveria NLS que não dependem da integridade do DBD do receptor. Essa via poderia envolver a translocação do GR interligado com o NF- κ B, translocando ambos para o núcleo, mas mantendo-os inativados na ausência de estímulos pró-inflamatórios ou de ligantes para o GR. No entanto, a translocação induzida pelo LPS/IFN dependeria da integridade do DBD e permitiria a dimerização dos GR e translocação concomitante do NF- κ B. Se a translocação induzida pelo LPS e/ou LPS/IFN favorecesse a formação de dímeros pela nitração de resíduos específicos, poderia gerar o efeito “*priming*”, como sugerido em outras situações (Paul-Clark et al., 2003; Robertson et al., 2013b). Isso ajudaria a explicar o menor nível sérico de

IL-6 nos animais WT desafiados com LPS. Como a ativação do NF- κ B é regulada por diversas vias de sinalização na presença de estímulos pró-inflamatórios, inclusive associação com o GR, a mutação *GR^{dim}* poderia prejudicar essa interação e facilitar a ativação do NF- κ B, contribuindo com o perfil inflamatório exacerbado observado. A participação do NO nessa via integrada de NF- κ B e GR parece favorecer a formação de peroxinitrito e depender da integridade do GR. É importante mencionar que os efeitos do NO dependem muito da sua concentração. Dessa forma, seus efeitos sobre os GR observados no início do processo inflamatório podem ser opostos aos efeitos observados em estados inflamatórios avançados (Galigniana et al., 1999; Duma et al., 2004; Colussi et al., 2008; Malhotra et al., 2011). Um resumo esquemático das hipóteses discutidas é mostrado no Esquema 1.



Esquema 2: Papel do pulso de NO e de peroxinitrito sobre o início da resposta inflamatória e sobre a via de sinalização dos GR. A estimulação *in vitro* de diferentes tipos celulares com LPS/IFN e o desafio de animais com LPS induzem a formação de um pulso de NO derivado da NOS-1 e a formação de peroxinitrito a partir da reação com ânion superóxido produzido pela NOX-1. Este pulso de espécies reativas induzem uma rápida translocação nuclear simultânea do GR e do NF-κB. O GR só é translocado por esta via se tiver seu domínio de ligação ao DNA íntegro, o qual parece ser importante para o mecanismo de transrepressão do NF-κB pelo GR através da interação proteína-proteína com o NF-κB. Uma vez que o GR é translocado, ele pode facilitar a ação de GCs endógenos para limitar a resposta inflamatória *in vivo*. Contudo, na sepse e em algumas inflamações crônicas, a ativação do NF-κB persiste e induz a expressão de proteínas como a NOS-2 e IL-6. As elevadas concentrações de NO produzidas pela NOS-2 em períodos tardios podem nitrosilar os GR e nitrar importantes cofatores, como as HDACs. As HDACs nitrosiladas perdem a capacidade de desacetilar as HSP-90, causando a diminuição da interação das HSP-90 com os GR, que por sua vez, também contribui para diminuir a afinidade do ligante pelo GR. Este mecanismo é sugerido para explicar como um pulso inicial de NO e de peroxinitrito podem estar relacionados com a falha na ação anti-inflamatória dos GCs na sepse. Siglas e abreviações: óxido nítrico (NO), peroxinitrito (ONOO⁻), óxido nítrico sintase 1 (NOS-1), óxido nítrico sintase 2 (NOS-2), NADPH oxidase 1 (NOX-1), glicocorticoides (GCs), receptores de GCs (GR), domínio de ligação ao DNA (DBD), histona desacetilases (HDACs),

proteína de choque térmico 90 (HSP-90), fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B).

Apesar do presente trabalho ser o primeiro a mostrar que o LPS, junto com IFN, é capaz de induzir a translocação do GR independente de ligante, e o envolvimento de um pulso de NO e de peroxinitrito nessa via, outros dois trabalhos publicados recentemente mostraram que a translocação de GR independente de ligante pode ocorrer também com outros estímulos pró-inflamatórios. Em 2011 foi demonstrado que as concentrações de IL-6 e IL-8 reduziram por um mecanismo de transrepressão dependente de GR mesmo na ausência de ligantes durante a estimulação de células epiteliais e COS-1 com TNF- α (Verhoog et al., 2011). Em 2013, foi demonstrado que a estimulação de células musculares lisas vasculares com a citocina IL-13 ou uma combinação de IL-1 β e TNF- α resulta na translocação nuclear do GR, porém sem se observar a ativação do GR quando estimulado por esta via. Nesse trabalho, ainda foi demonstrado que apesar da translocação induzida por IL-13, regulada por ativação de MAPK e fosforilação de resíduos de serina específicos do receptor não ativar o GR por si só, essa translocação potencializa o efeito da dexametasona (Hu et al., 2013). Além da translocação induzida por agentes pró-inflamatórios, foi demonstrado que outros compostos como o arsenito de sódio e o dinitrofenol (Sanchez, 1992) e condições como a elevação de pH, de temperatura e da tensão de cisalhamento na parede dos vasos, podem provocar a dissociação do complexo citoplasmático do GR e induzir a translocação nuclear do receptor e ligação ao DNA de maneira independente de ligante, sem ter sido comprovado para todas essas situações se essa ligação gera algum efeito biológico ou não (Sanchez, 1992; Prima et al., 2000; Ji, 2003; Vandevyver et al., 2012b). Até o momento, as evidências sugerem que essas novas vias de sinalização afetam ou ativam, um ou mais mecanismos de ação mediados pelo GR, sendo possível, no entanto, que cada uma dessas situações promova a translocação do GR por diferentes vias de sinalização.

7. CONCLUSÕES

O avanço do conhecimento sobre os GR nos últimos 20 anos tem evidenciado o quão complexa é a regulação da atividade desses receptores. O presente trabalho demonstrou uma nova via de sinalização da translocação nuclear do GR induzida por LPS/IFN dependente de um pulso de NO e de peroxinitrito em células musculares lisas. Essa via promove a translocação nuclear do GR, de maneira independente de ligante, em células musculares lisas e fibroblastos WT sem nenhuma mutação. A translocação nuclear do GR induzida pelo LPS/IFN logo no início da resposta inflamatória, favorece a ação dos GCs endógenos para frear o desenvolvimento da resposta inflamatória. Além do efeito sobre os GR, esse trabalho demonstrou que a rápida produção de NO pela NOS-1 e formação de peroxinitrito após estimulação com LPS/IFN são importantes para o desenvolvimento da resposta inflamatória. Em células musculares lisas foi demonstrado que este pulso controla diretamente a expressão da NOS-2 através da modulação da translocação nuclear do NF- κ B. A efeito do pulso de NO e de peroxinitrito em células musculares lisas pode ser um importante mecanismo para o desenvolvimento da disfunção vascular na sepse. Já o efeito inicial sobre a via do GR, apesar de poder ser benéfica no início da resposta inflamatória, levam indiretamente à diminuição da funcionalidade dos GR em períodos tardios, podendo este mecanismo ser um fator importante para ajudar a entender porque os GCs falham em conter a inflamação em fases avançadas da sepse.

8. REFERÊNCIAS

Adcock, I.M. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm. Pharmacol. Ther.* 13: 115–26.

Adcock, I.M., Caramori, G., and Ito, K. (2006). New insights into the molecular mechanisms of corticosteroids actions. *Curr. Drug Targets* 7: 649–60.

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

Almawi, W.Y., and Melemedjian, O.K. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid antiproliferative effects: antagonism of transcription factor activity by glucocorticoid receptor. *J. Leukoc. Biol.* 71: 9–15.

Anbalagan, M., Huderson, B., Murphy, L., and Rowan, B.G. (2012). Post-translational modifications of nuclear receptors and human disease. *Nucl. Recept. Signal.* 10: e001.

Angus, D.C., Pereira, C.A.P., and Silva, E. (2006). Epidemiology of severe sepsis around the world. *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets* 6: 207–212.

Annane, D., Bellissant, E., Bollaert, P.-E., Briegel, J., Confalonieri, M., Gaudio, R. De, et al. (2009). Corticosteroids in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock in Adults. *JAMA* 301: 2362.

Aoyagi, S., and Archer, T.K. (2005). Modulating molecular chaperone Hsp90 functions through reversible acetylation. *Trends Cell Biol.* 15: 565–567.

Araújo, A. V, Ferezin, C.Z., Pereira, A.D.C., Rodrigues, G.J., Grando, M.D., Bonaventura, D., et al. (2012). Augmented nitric oxide production and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase during cecal ligation and perforation. *Nitric Oxide* 27: 59–66.

Asehnoune, K., Strassheim, D., Mitra, S., Kim, J.Y., and Abraham, E. (2004). Involvement of reactive oxygen species in Toll-like receptor 4-dependent activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* 172: 2522–9.

Assreuy, J., Cunha, F.Q., Liew, F.Y., and Moncada, S. (1993). Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide. *Br. J. Pharmacol.* *108*: 833–7.

Ayroldi, E., and Riccardi, C. (2009). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *FASEB J.* *23*: 3649–58.

Baeuerle, P.A. (1998). IkappaB-NF-kappaB structures: at the interface of inflammation control. *Cell* *95*: 729–31.

Baig, M.S., Zaichick, S. V., Mao, M., Abreu, a. L. de, Bakhshi, F.R., Hart, P.C., et al. (2015). NOS1-derived nitric oxide promotes NF- B transcriptional activity through inhibition of suppressor of cytokine signaling-1. *J. Exp. Med.*

Baker, R.G., Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). NF-κB, inflammation, and metabolic disease. *Cell Metab.* *13*: 11–22.

Barnes, P.J. (2006). Corticosteroid effects on cell signalling. *Eur. Respir. J. Off. J. Eur. Soc. Clin. Respir. Physiol.* *27*: 413–26.

Barnes, P.J. (2010). Mechanisms and resistance in glucocorticoid control of inflammation. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* *120*: 76–85.

Barnes, P.J. (2011). Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br. J. Pharmacol.* *163*: 29–43.

Beck, I.M., Bosscher, K. De, and Haegeman, G. (2011). Glucocorticoid receptor mutants: man-made tools for functional research. *Trends Endocrinol. Metab.* *22*: 295–310.

Bhattacharyya, S., Brown, D.E., Brewer, J. a, Vogt, S.K., and Muglia, L.J. (2007). Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood* *109*: 4313–9.

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

Bosscher, K. De, Berghe, W. Vanden, Beck, I.M.E., Molle, W. Van, Hennuyer, N., Hapgood, J., et al. (2005). A fully dissociated compound of plant origin for inflammatory gene repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 15827–32.

Bosscher, K. De, and Haegeman, G. (2009a). Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 23: 281–91.

Bosscher, K. De, and Haegeman, G. (2009b). Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* 23: 281–91.

Boyle, M.P., Kolber, B.J., Vogt, S.K., Wozniak, D.F., and Muglia, L.J. (2006). Forebrain glucocorticoid receptors modulate anxiety-associated locomotor activation and adrenal responsiveness. *J. Neurosci.* 26: 1971–8.

Brown, D.I., and Griendling, K.K. (2009). Nox proteins in signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* 47: 1239–53.

Chattopadhyay, M., Goswami, S., Rodes, D.B., Kodela, R., Velazquez, C. a, Boring, D., et al. (2010). NO-releasing NSAIDs suppress NF- κ B signaling in vitro and in vivo through S-nitrosylation. *Cancer Lett.* 298: 204–11.

Cohen, J. (2002). The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 420: 885–91.

Cohen, J., Evans, T.J., and Spink, J. (1998). Cytokine regulation of inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Prog Clin Biol Res* 397: 169–177.

Cohen, J., Vincent, J.-L., Adhikari, N.K.J., Machado, F.R., Angus, D.C., Calandra, T., et al. (2015). Sepsis: a roadmap for future research. *Lancet Infect. Dis.* 15: 581–614.

Cole, T.J., Blendy, J. a, Monaghan, a P., Krieglstein, K., Schmid, W., Aguzzi, a, et al. (1995). Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation. *Genes Dev.* 9: 1608–1621.

Colussi, C., Mozzetta, C., Gurtner, A., Illi, B., Rosati, J., Straino, S., et al. (2008). HDAC2 blockade by nitric oxide and histone deacetylase inhibitors reveals a common target in Duchenne muscular dystrophy treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*: 19183–7.

Connelly, L., Jacobs, A.T., Palacios-Callender, M., Moncada, S., and Hobbs, A.J. (2003). Macrophage endothelial nitric-oxide synthase autoregulates cellular activation and pro-inflammatory protein expression. *J. Biol. Chem.* *278*: 26480–7.

Connelly, L., Madhani, M., and Hobbs, A.J. (2005). Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. *J. Biol. Chem.* *280*: 10040–6.

Connelly, L., Palacios-Callender, M., Ameixa, C., Moncada, S., and Hobbs, a J. (2001). Biphasic regulation of NF-kappa B activity underlies the pro- and anti-inflammatory actions of nitric oxide. *J. Immunol.* *166*: 3873–81.

Conway-Campbell, B.L., George, C.L., Pooley, J.R., Knight, D.M., Norman, M.R., Hager, G.L., et al. (2011). The HSP90 molecular chaperone cycle regulates cyclical transcriptional dynamics of the glucocorticoid receptor and its coregulatory molecules CBP/p300 during ultradian ligand treatment. *Mol. Endocrinol.* *25*: 944–54.

Davies, T.H., Ning, Y.-M., and Sánchez, E.R. (2002). A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins. *J. Biol. Chem.* *277*: 4597–600.

Dellinger, R., Levy, M., and Rhodes, A. (2013). Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care ...* *41*: 580–637.

Deutschman, C.S., and Tracey, K.J. (2014). Sepsis: Current dogma and new perspectives. *Immunity* *40*: 463–475.

Doucas, V., Shi, Y., Miyamoto, S., West, a, Verma, I., and Evans, R.M. (2000). Cytoplasmic catalytic subunit of protein kinase A mediates cross-repression by NF-kappa B and the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *97*: 11893–8.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82: 47–95.

Duma, D. (2005). Óxido Nítrico E Glicocorticóides : Interação Na Sepse E Na Inflamação. Universidade Federal de Santa Catarina.

Duma, D., Fernandes, D., Bonini, M.G., Stadler, K., Mason, R.P., and Assreuy, J. (2011). NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. *Eur. J. Pharmacol.* 668: 285–92.

Duma, D., Jewell, C.M., and Cidlowski, J. a (2006). Multiple glucocorticoid receptor isoforms and mechanisms of post-translational modification. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 102: 11–21.

Duma, D., Silva-Santos, J.E., and Assreuy, J. (2004). Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide in endotoxemic rats. *Crit. Care Med.* 32: 2304–10.

Echeverría, P.C., Mazaira, G., Erlejman, A., Gomez-Sanchez, C., Piwien Pilipuk, G., and Galigniana, M.D. (2009). Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta. *Mol. Cell. Biol.* 29: 4788–97.

Eickelberg, O., Roth, M., Lörx, R., Bruce, V., Rüdiger, J., Johnson, M., et al. (1999). Ligand-independent activation of the glucocorticoid receptor by beta2-adrenergic receptor agonists in primary human lung fibroblasts and vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.* 274: 1005–1010.

Erhuma, A.M. (2012). Glucocorticoids: Biochemical Group That Play Key Role in Fetal Programming of Adult Disease. In *Glucocorticoids - New Recognition of Our Familiar Friend*, X. Qian, ed. (InTech),

Fernandes, D., and Assreuy, J. (2008). Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock 30 Suppl 1*: 10–3.

Fernandes, D., Sordi, R., Pacheco, L.K., Nardi, G.M., Heckert, B.T., Villela, C.G., et al. (2009). Late, but not early, inhibition of soluble

guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 328: 991–9.

Forman, H.J., Augusto, O., Brigelius-Flohe, R., Dennery, P. a., Kalyanaraman, B., Ischiropoulos, H., et al. (2015). Even free radicals should follow some rules: A Guide to free radical research terminology and methodology. *Free Radic. Biol. Med.* 78: 233–235.

Förstermann, U., and Sessa, W.C. (2012). Nitric oxide synthases: regulation and function. *Eur. Heart J.* 33: 829–37, 837a–837d.

Franchimont, D., Kino, T., Galon, J., Meduri, G.U., and Chrousos, G. (2002). Glucocorticoids and Inflammation Revisited: The State of the Art. *Neuroimmunomodulation* 10: 247–260.

Galigniana, M.D., Echeverría, P.C., Erlejman, A.G., and Piwien-Pilipuk, G. (2010). Role of molecular chaperones and TPR-domain proteins in the cytoplasmic transport of steroid receptors and their passage through the nuclear pore. *Nucleus* 1: 299–308.

Galigniana, M.D., Harrell, J.M., O’Hagen, H.M., Ljungman, M., and Pratt, W.B. (2004). Hsp90-binding immunophilins link p53 to dynein during p53 transport to the nucleus. *J. Biol. Chem.* 279: 22483–9.

Galigniana, M.D., Piwien-Pilipuk, G., and Assreuy, J. (1999). Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol. Pharmacol.* 55: 317–23.

Galigniana, N.M., Ballmer, L.T., Toneatto, J., Erlejman, A.G., Lagadari, M., and Galigniana, M.D. (2012). Regulation of the glucocorticoid response to stress-related disorders by the Hsp90-binding immunophilin FKBP51. *J. Neurochem.* 122: 4–18.

Ghosh, S., and Hayden, M.S. (2008). New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* 8: 837–48.

Gloire, G., Legrand-Poels, S., and Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem. Pharmacol.* 72: 1493–505.

Gomes, A., Fernandes, E., and Lima, J.L.F.C. (2006). Use of fluorescence probes for detection of reactive nitrogen species: a review. *J. Fluoresc.* 16: 119–39.

Goodwin, J.E., Feng, Y., Velazquez, H., and Sessa, W.C. (2013). Endothelial glucocorticoid receptor is required for protection against sepsis.

Gossye, V., Elewaut, D., Beneden, K. Van, Dewint, P., Haegeman, G., and Bosscher, K. De (2010). A plant-derived glucocorticoid receptor modulator attenuates inflammation without provoking ligand-induced resistance. *Ann. Rheum. Dis.* 69: 291–6.

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

Gronemeyer, H., and Bourguet, W. (2009). Allosteric effects govern nuclear receptor action: DNA appears as a player. *Sci. Signal.* 2: pe34.

Hakim, A., Barnes, P.J., Adcock, I.M., and Usmani, O.S. (2013). Importin-7 mediates glucocorticoid receptor nuclear import and is impaired by oxidative stress, leading to glucocorticoid insensitivity. *FASEB J.* 27: 4510–9.

Hattori, Y., Kasai, K., and Gross, S.S. (2004). NO suppresses while peroxynitrite sustains NF-kappaB: a paradigm to rationalize cytoprotective and cytotoxic actions attributed to NO. *Cardiovasc. Res.* 63: 31–40.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2008). Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell* 132: 344–62.

Hayden, M.S., and Ghosh, S. (2011). NF-κB in immunobiology. *Cell Res.* 21: 223–44.

Heck, S., Kullmann, M., Gast, A., Ponta, H., Rahmsdorf, H.J., Herrlich, P., et al. (1994). A distinct modulating domain in glucocorticoid receptor monomers in the repression of activity of the transcription factor AP-1. *EMBO J.* 13: 4087–4095.

Hecker, M., Cattaruzza, M., and Wagner, a H. (1999). Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. *Gen. Pharmacol.* 32: 9–16.

Heitzer, M.D., Wolf, I.M., Sanchez, E.R., Witchel, S.F., and DeFranco, D.B. (2007). Glucocorticoid receptor physiology. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8: 321–30.

Hess, D.T., Matsumoto, A., Kim, S.-O., Marshall, H.E., and Stamler, J.S. (2005). Protein S-nitrosylation: purview and parameters. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6: 150–66.

Hollenberg, S.M., Weinberger, C., Ong, E.S., Cerelli, G., Oro, A., Lebo, R., et al. (1985). Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature* 318: 635–41.

Hu, A., Josephson, M.B., Diener, B.L., Nino, G., Xu, S., Paranjape, C., et al. (2013). Pro-Asthmatic Cytokines Regulate Unliganded and Ligand-Dependent Glucocorticoid Receptor Signaling in Airway Smooth Muscle. *PLoS One* 8.:

Hudson, W.H., Youn, C., and Ortlund, E. a (2013). The structural basis of direct glucocorticoid-mediated transrepression. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20: 53–8.

Ito, K., Chung, K.F., and Adcock, I.M. (2006a). Update on glucocorticoid action and resistance. *J. Allergy Clin. Immunol.* 117: 522–43.

Ito, K., Yamamura, S., Essilfie-Quaye, S., Cosio, B., Ito, M., Barnes, P.J., et al. (2006b). Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J. Exp. Med.* 203: 7–13.

Janssen-Heininger, Y.M., Macara, I., and Mossman, B.T. (1999). Cooperativity between oxidants and tumor necrosis factor in the activation of nuclear factor (NF)-kappaB: requirement of Ras/mitogen-activated protein kinases in the activation of NF-kappaB by oxidants. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 20: 942–52.

Ji, J.Y. (2003). Shear Stress Causes Nuclear Localization of Endothelial Glucocorticoid Receptor and Expression From the GRE Promoter. *Circ. Res.* 92: 279–285.

Kabe, Y., Ando, K., Hirao, S., Yoshida, M., and Handa, H. (2004). Redox regulation of NF-kappaB activation: distinct redox regulation between the cytoplasm and the nucleus. *Antioxid. Redox Signal.* 7: 395–403.

Kalil, a. C., Syed, a., Rupp, M.E., Chambers, H., Vargas, L., Maskin, a., et al. (2015). Is Bacteremic Sepsis Associated With Higher Mortality in Transplant Recipients Than in Nontransplant Patients? A Matched Case-Control Propensity-Adjusted Study. *Clin. Infect. Dis.* 60: 216–222.

Kalyanaraman, B., Darley-Usmar, V., Davies, K.J. a, Dennery, P. a, Forman, H.J., Grisham, M.B., et al. (2012). Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic. Biol. Med.* 52: 1–6.

Kang, K.I.L., Devin, J., Cadepond, F., Jibard, N., Guiochon-mantelt, A., Baulieu, E., et al. (1994). In vivo functional protein-protein interaction : Nuclear targeted hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus. *91*: 340–344.

Karin, M., and Delhase, M. (2000). The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. *Semin. Immunol.* 12: 85–98.

Kassel, O., and Herrlich, P. (2007). Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: Molecular aspects. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275: 13–29.

Kino, T., Manoli, I., Kelkar, S., Wang, Y., Su, Y.A., and Chrousos, G.P. (2009). Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381: 671–5.

Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P.R., and Agard, D. a (2014). Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles. *Cell* 157: 1685–97.

Kleiman, A., Hübner, S., Rodriguez Parkitna, J.M., Neumann, A., Hofer, S., Weigand, M. a, et al. (2012). Glucocorticoid receptor dimerization is required for survival in septic shock via suppression of interleukin-1 in macrophages. *FASEB J.* 26: 722–9.

Kovacs, J.J., Murphy, P.J.M., Gaillard, S., Zhao, X., Wu, J.T., Nicchitta, C. V., et al. (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol. Cell* 18: 601–607.

Lambeth, J.D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4: 181–9.

Levy, B., Collin, S., Sennoun, N., Ducrocq, N., Kimmoun, a, Asfar, P., et al. (2010). Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. *Intensive Care Med.* 36: 2019–29.

Li, H., and Poulos, T.L. (2005). Structure-function studies on nitric oxide synthases. *J. Inorg. Biochem.* 99: 293–305.

Li, J., Soroka, J., and Buchner, J. (2012). The Hsp90 chaperone machinery: Conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823: 624–635.

Liaudet, L., Rosenblatt-Velin, N., and Pacher, P. (2013). Role of Peroxynitrite in the Cardiovascular Dysfunction of Septic Shock. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 11: 196–207.

Liaudet, L., Vassalli, G., and Pacher, P. (2009). Role of peroxynitrite in the redox regulation of cell signal transduction pathways. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 14: 4809–14.

Limbourg, F.P., and Liao, J.K. (2003). Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *J. Mol. Med. (Berl.)* 81: 168–74.

Liu, L., Wang, Y., Fan, Y., Li, C., and Chang, Z. (2004). IFN-gamma activates cAMP/PKA/CREB signaling pathway in murine peritoneal macrophages. *J. Interferon Cytokine Res.* 24: 334–42.

- Loukili, N., Rosenblatt-Velin, N., Rolli, J., Levrand, S., Feihl, F., Waeber, B., et al. (2010). Oxidants positively or negatively regulate nuclear factor kappaB in a context-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 285: 15746–52.
- Löwenberg, M., Stahn, C., Hommes, D.W., and Buttgereit, F. (2008). Novel insights into mechanisms of glucocorticoid action and the development of new glucocorticoid receptor ligands. *Steroids* 73: 1025–9.
- Malhotra, D., Thimmulappa, R.K., Mercado, N., Ito, K., Kombairaju, P., Kumar, S., et al. (2011). Denitrosylation of HDAC2 by targeting Nrf2 restores glucocorticosteroid sensitivity in macrophages from COPD patients. *J. Clin. Invest.* 121: 4289–302.
- Mankan, A.K., Lawless, M.W., Gray, S.G., Kelleher, D., and McManus, R. (2009). NF-kappaB regulation: the nuclear response. *J. Cell. Mol. Med.* 13: 631–43.
- Martínez-Ruiz, A., Villanueva, L., González de Orduña, C., López-Ferrer, D., Higuera, M.A., Tarín, C., et al. (2005). S-nitrosylation of Hsp90 promotes the inhibition of its ATPase and endothelial nitric oxide synthase regulatory activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 8525–8530.
- Matsuda, N., and Hattori, Y. (2007). Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. *J. Smooth Muscle Res.* 43: 117–37.
- Matthews, J.R., Botting, C.H., Panico, M., Morris, H.R., and Hay, R.T. (1996). Inhibition of NF-κB DNA binding by nitric oxide. *24: 2236–2242.*
- Mayr, F.B., Yende, S., and Angus, D.C. (2013). Epidemiology of severe sepsis. *Virulence* 5: 4–11.
- McAndrew, J., Patel, R.P., Jo, H., Cornwell, T., Lincoln, T., Moellering, D., et al. (1997). The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: Implications for disease. *Semin. Perinatol.* 21: 351–366.
- Mollapour, M., and Neckers, L. (2012). Post-translational modifications of Hsp90 and their contributions to chaperone regulation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823: 648–655.

Moncada, S., and Higgs, E. a (2006). The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol. 147 Suppl* : S193–201.

Moon, E.-Y., Lee, Y.-S., Choi, W.S., and Lee, M.-H. (2011). Toll-like receptor 4-mediated cAMP production up-regulates B-cell activating factor expression in Raw264.7 macrophages. *Exp. Cell Res. 317*: 2447–55.

Moraes, J. a, Barcellos-de-Souza, P., Rodrigues, G., Nascimento-Silva, V., Silva, S. V, Assreuy, J., et al. (2012). Heme modulates smooth muscle cell proliferation and migration via NADPH oxidase: a counter-regulatory role for heme oxygenase system. *Atherosclerosis 224*: 394–400.

Morgan, M.J., and Liu, Z. (2011). Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res. 21*: 103–15.

Morris, S.M., Billiar, R., and Sidney, M. (1994). New insights into the regulation nitric oxide synthesis of inducible.

Nardi, G.M., Scheschowitsch, K., Ammar, D., Oliveira, S.K. de, Arruda, T.B., and Assreuy, J. (2014). Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. *Crit. Care Med. 42*: e391–400.

Norman, A.W., Mizwicki, M.T., and Norman, D.P.G. (2004). Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat. Rev. Drug Discov. 3*: 27–41.

Oakley, R.H., and Cidlowski, J. a (2013a). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol. 132*: 1033–44.

Oakley, R.H., and Cidlowski, J. a. (2013b). The biology of the glucocorticoid receptor: New signaling mechanisms in health and disease. *J. Allergy Clin. Immunol. 132*: 1033–1044.

Opherk, C., Tronche, F., Kellendonk, C., Kohlmüller, D., Schulze, A., Schmid, W., et al. (2004). Inactivation of the glucocorticoid receptor in hepatocytes leads to fasting hypoglycemia and ameliorates hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Mol. Endocrinol. 18*: 1346–1353.

- Ortsäter, H., Sjöholm, Å., and Rafacho, A. (2008). Regulation of Glucocorticoid Receptor Signaling and the Diabetogenic Effects of Glucocorticoid Excess. In *State of the Art of Therapeutic Endocrinology*, pp 1–28.
- Osoata, G.O., Yamamura, S., Ito, M., Vuppusetty, C., Adcock, I.M., Barnes, P.J., et al. (2009). Nitration of distinct tyrosine residues causes inactivation of histone deacetylase 2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384: 366–71.
- Pacher, L., Beckman, J.S., and Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiol. Rev.* 87: 315–424.
- Park, H.S., Chun, J.N., Jung, H.Y., Choi, C., and Bae, Y.S. (2006). Role of NADPH oxidase 4 in lipopolysaccharide-induced proinflammatory responses by human aortic endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 72: 447–55.
- Park, H.S., Jung, H.Y., Park, E.Y., Kim, J., Lee, W.J., and Bae, Y.S. (2004). Cutting edge: direct interaction of TLR4 with NAD(P)H oxidase 4 isozyme is essential for lipopolysaccharide-induced production of reactive oxygen species and activation of NF-kappa B. *J. Immunol.* 173: 3589–93.
- Paul-Clark, M.J., Roviezzo, F., Flower, R.J., Cirino, G., Soldato, P. Del, Adcock, I.M., et al. (2003). Glucocorticoid receptor nitration leads to enhanced anti-inflammatory effects of novel steroid ligands. *J. Immunol.* 171: 3245–52.
- Pautz, A., Art, J., Hahn, S., Nowag, S., Voss, C., and Kleinert, H. (2010). Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Nitric Oxide* 23: 75–93.
- Perretti, M., Becherucci, C., Scapigliati, G., and Parente, L. (1989). The effect of adrenalectomy *vitro* and *in vivo*. 1137–1142.
- Persichini, T., Cantoni, O., Suzuki, H., and Colasanti, M. (2006). Cross-talk between constitutive and inducible NO synthase: an update. *Antioxid. Redox Signal.* 8: 949–54.
- Pettigrew, C. a. (2014). A defining time for sepsis. *Trends Mol. Med.* 20: 191.

Prima, V., Depoix, C., Masselot, B., Formstecher, P., and Lefebvre, P. (2000). Alteration of the glucocorticoid receptor subcellular localization by non steroidal compounds. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 72: 1–12.

Rajapandi, T., Greene, L.E., and Eisenberg, E. (2000). The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 275: 22597–604.

Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., et al. (1998). DNA Binding of the Glucocorticoid Receptor Is Not Essential for Survival. *Cell* 93: 531–541.

Reichardt, H.M., Umland, T., Bauer, A., Kretz, O., and Schütz, G. (2000). Mice with an increased glucocorticoid receptor gene dosage show enhanced resistance to stress and endotoxic shock. *Mol. Cell. Biol.* 20: 9009–17.

Revollo, J.R., and Cidlowski, J. a (2009). Mechanisms generating diversity in glucocorticoid receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1179: 167–78.

Robertson, S., Hapgood, J.P., and Louw, A. (2013a). Glucocorticoid receptor concentration and the ability to dimerize influence nuclear translocation and distribution. *Steroids* 78: 182–94.

Robertson, S., Rohwer, J.M., Hapgood, J.P., and Louw, A. (2013b). Impact of glucocorticoid receptor density on ligand-independent dimerization, cooperative ligand-binding and basal priming of transactivation: a cell culture model. *PLoS One* 8: e64831.

Rogatsky, I., Wang, J.-C., Derynck, M.K., Nonaka, D.F., Khodabakhsh, D.B., Haqq, C.M., et al. (2003). Target-specific utilization of transcriptional regulatory surfaces by the glucocorticoid receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 13845–13850.

Rothwarf, D.M., and Karin, M. (1999). The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci. STKE* 1999: RE1.

Rudiger, A., Stotz, M., and Singer, M. (2008). Cellular processes in sepsis. *Swiss Med. Wkly.* 138: 629–34.

Ryan, K., and Smith, M. (2004). Reactive oxygen and nitrogen species differentially regulate Toll-like receptor 4-mediated activation of NF- κ B and interleukin-8 expression. *Infect. ...* 72: 2123–2130.

Samarasinghe, R.A., Maio, R. Di, Volonte, D., Galbiati, F., Lewis, M., Romero, G., et al. (2011). Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 16657–62.

Sanchez, E.R. (1992). Heat shock induces translocation to the nucleus of the unliganded glucocorticoid receptor. *J. Biol. Chem.* 267: 17–20.

Savory, J.G., Hsu, B., Laquian, I.R., Giffin, W., Reich, T., Haché, R.J., et al. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *Mol. Cell. Biol.* 19: 1025–37.

Scheschowitsch, K., Moraes, J.A. De, Sordi, R., Barja-Fidalgo, C., and Assreuy, J. (2015). Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. *Pharmacol. Res.* 100: 73–84.

Semenza, G.L. (2005). New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis. *115*.

Shankar-Hari, M., Deutschman, C.S., and Singer, M. (2015). Do we need a new definition of sepsis? *Intensive Care Med.* 10–12.

Sligl, W.I., Milner, D. a, Sundar, S., Mphatswe, W., and Majumdar, S.R. (2009). Safety and efficacy of corticosteroids for the treatment of septic shock: A systematic review and meta-analysis. *Clin. Infect. Dis.* 49: 93–101.

Smoak, K. a, and Cidlowski, J. a (2004). Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech. Ageing Dev.* 125: 697–706.

Söderlund, C., and Rådegran, G. (2015). Immunosuppressive therapies after heart transplantation — The balance between under- and over-immunosuppression. *Transplant. Rev.* 29: 181–189.

Spies, C.M., Strehl, C., Goes, M.C. van der, Bijlsma, J.W.J., and Buttgerit, F. (2011). Glucocorticoids. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.* 25: 891–900.

Spink, J., Cohen, J., and Evans, T.J. (1995). The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. *J Biol Chem* 270: 29541–29547.

Sprung, C.L., Annane, D., Singer, M., Moreno, R., and Keh, D. (2011). Glucocorticoids in sepsis: dissecting facts from fiction. *Crit. Care* 15: 446.

Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D.W., and Buttgerit, F. (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Mol. Cell. Endocrinol.* 275: 71–8.

Stamler, J.S., Lamas, S., and Fang, F.C. (2001). Nitrosylation: The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell* 106: 675–683.

Storer, C.L., Dickey, C. a., Galigniana, M.D., Rein, T., and Cox, M.B. (2011). FKBP51 and FKBP52 in signaling and disease. *Trends Endocrinol. Metab.* 22: 481–490.

Surjit, M., Ganti, K.P., Mukherji, A., Ye, T., Hua, G., Metzger, D., et al. (2011). Widespread negative response elements mediate direct repression by agonist-liganded glucocorticoid receptor. *Cell* 145: 224–41.

Szabó, C., Ischiropoulos, H., and Radi, R. (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6: 662–80.

Szabó, C., Mitchell, J. a, Thiemermann, C., and Vane, J.R. (1993). Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. *Br. J. Pharmacol.* 108: 786–792.

Szabó, C., and Módis, K. (2010). Pathophysiological roles of peroxynitrite in circulatory shock. *Shock* 34 *Suppl 1*: 4–14.

Takata, T., Kimura, J., Tsuchiya, Y., Naito, Y., and Watanabe, Y. (2011). Calcium/calmodulin-dependent protein kinases as potential targets of nitric oxide. *Nitric Oxide* 25: 145–52.

Thiemermann, C., and Vane, J. (1990). Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. *Eur. J. Pharmacol.* *182*: 591–595.

Togashi, H., Sasaki, M., Frohman, E., Taira, E., Ratan, R.R., Dawson, T.M., et al. (1997). Neuronal (type I) nitric oxide synthase regulates nuclear factor kappaB activity and immunologic (type II) nitric oxide synthase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*: 2676–80.

Torres-Dueñas, D., Celes, M.R.N., Freitas, a, Alves-Filho, J.C., Spiller, F., Dal-Secco, D., et al. (2007). Peroxynitrite mediates the failure of neutrophil migration in severe polymicrobial sepsis in mice. *Br. J. Pharmacol.* *152*: 341–52.

Tronche, F., Opherk, C., Moriggl, R., Kellendonk, C., Reimann, A., Schwake, L., et al. (2004). Glucocorticoid receptor function in hepatocytes is essential to promote postnatal body growth. *Genes Dev.* *18*: 492–7.

Tsiotou, A.G., Sakorafas, G.H., Anagnostopoulos, G., and Bramis, J. (2005). Septic shock; current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med. Sci. Monit.* *11*: RA76–A85.

Umansky, V., Hehner, S.P., Dumont, a, Hofmann, T.G., Schirmmacher, V., Dröge, W., et al. (1998). Co-stimulatory effect of nitric oxide on endothelial NF-kappaB implies a physiological self-amplifying mechanism. *Eur. J. Immunol.* *28*: 2276–82.

Vandevyver, S., Dejager, L., Bogaert, T. Van, Kleyman, A., Liu, Y., Tuckermann, J., et al. (2012a). Glucocorticoid receptor dimerization induces MKP1 to protect against TNF-induced inflammation. *J. Clin. Invest.* *122*: 2130–40.

Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2012b). On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* *13*: 364–74.

Vandevyver, S., Dejager, L., Tuckermann, J., and Libert, C. (2013). New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* *154*: 993–1007.

- Vargas, V., Crestani, S., Sordi, R. De, Rezende, E., and Assreuy, J. (2015). FPR2 / ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. *Eur. J. Pharmacol.* 746: 267–273.
- Venkataraman, S., Munoz, R., Candido, C., and Witchel, S.F. (2007). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* 8: 365–73.
- Verhoog, N.J.D., Toit, A. Du, Avenant, C., and Hapgood, J.P. (2011). Glucocorticoid-independent repression of tumor necrosis factor (TNF) alpha-stimulated interleukin (IL)-6 expression by the glucocorticoid receptor: a potential mechanism for protection against an excessive inflammatory response. *J. Biol. Chem.* 286: 19297–310.
- Vincent, J.-L., Opal, S.M., Marshall, J.C., and Tracey, K.J. (2013). Sepsis definitions: time for change. *Lancet* 381: 774–5.
- Wandinger, S.K., Richter, K., and Buchner, J. (2008). The Hsp90 chaperone machinery. *J. Biol. Chem.* 283: 18473–18477.
- Wilckens, T. (1995). Glucocorticoids and immune function: physiological relevance and pathogenic potential of hormonal dysfunction. *Trends Pharmacol. Sci.* 16: 193–7.
- Wright, C.E., Rees, D.D., and Moncada, S. (1992). Protective and pathological roles of nitric oxide in endotoxin shock. *Cardiovasc. Res.* 26: 48–57.
- Wu, F., Tymi, K., and Wilson, J.X. (2008). iNOS expression requires NADPH oxidase-dependent redox signaling in microvascular endothelial cells. *J. Cell. Physiol.* 217: 207–14.
- Yang, X., Coriolan, D., Murthy, V., Schultz, K., Golenbock, D.T., Beasley, D., et al. (2005). Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells : role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *02111*: 1069–1076.
- Yende, S., Iwashyna, T.J., and Angus, D.C. (2014). Interplay between sepsis and chronic health. *Trends Mol. Med.* 20: 234–238.

Yoshimura, A., Naka, T., and Kubo, M. (2007). SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat. Rev. Immunol.* 7: 454–465.

Zhang, H., Snead, C., and Catravas, J.D. (2001). Nitric oxide differentially regulates induction of type II nitric oxide synthase in rat vascular smooth muscle cells versus macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 21: 529–535.

Zhang, H.-N., He, Y.-H., Zhang, G.-S., Luo, M.-S., Huang, Y., Wu, X., et al. (2012). Endogenous glucocorticoids inhibit myocardial inflammation induced by lipopolysaccharide: involvement of regulation of histone deacetylation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 60: 33–41.

Zhou, L., and Zhu, D.-Y. (2009). Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide* 20: 223–230.

9. ANEXO 1

Manuscrito:

Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells.

Karin Scheschowitsch, João Alfredo de Moraes, Regina Sordi, Christina Barja-Fidalgo, Jamil Assreuy

Pharmacological Research 100: 73–84, 2015

<http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2015.08.001>

Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1043661815001693>