



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

Daniele Hummel Moreira

**Avaliação do efeito do tempol sobre a resposta pressórica da noradrenalina  
durante o choque séptico: participação na S-nitrosilação**

Florianópolis  
2024

Daniele Hummel Moreira

**Avaliação do efeito do tempol sobre a resposta pressórica da noradrenalina  
durante o choque séptico: participação na S-nitrosilação**

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

Orientador: Prof. Lucas Cezar Pinheiro, Dr.

Florianópolis

2024

Hummel Moreira, Daniele

Avaliação do efeito do tempol sobre a resposta pressórica da noradrenalina durante o choque séptico : participação na S-nitrosilação /Daniele Hummel Moreira ; orientador, Lucas Cezar Pinheiro, 2024.

78 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Óxido Nítrico. 3. Choque Séptico. 4. S-nitrosilação. 5. Tempol. I. Cezar Pinheiro, Lucas . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Daniele Hummel Moreira

**Avaliação do efeito do tempol sobre a resposta pressórica da noradrenalina durante o choque séptico: participação na S-nitrosilação**

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 3 de julho de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Daniel Fernandes, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Jamil Assreuy Filho, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a  
assinatura digital

Prof. Lucas Cezar Pinheiro, Dr.  
Orientador

Florianópolis, 2024.

Dedico este trabalho a todas as pessoas que possibilitaram a sua realização,  
seja por suporte técnico, financeiro ou emocional.

## **AGRADECIMENTOS**

Inicialmente gostaria de agradecer a todos os professores da educação pública que tanto me ensinaram e geraram oportunidades que antes eu não pensava ser capaz de alcançá-las. Agradeço a todos os cidadãos, que financiaram a minha formação desde a infância até este momento. Aos professores do ensino superior que a anos enfrentam situações precárias de trabalho e que mesmo assim seguem acreditando no desenvolvimento dos seus alunos e da ciência para a obtenção de uma sociedade mais igualitária.

Gostaria de agradecer aos técnicos administrativos, funcionários e terceirizados que possibilitam o funcionamento da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) que tornou viável a realização deste mestrado, através do seu financiamento.

Agradeço a todos os laboratórios, professores e pós-graduandos que compartilharam sua estrutura e conhecimento para a realização deste trabalho. Ao programa de pós-graduação em Farmacologia, por ter me acolhido e permitido o meu desenvolvimento. Sou grata ao meu orientador Prof. Dr. Lucas Cezar Pinheiro por ter me aceitado, guiado e estimulado a ampliar os meus conhecimentos em diversas áreas, além é claro de ter me apoiado.

Agradeço aos professores e colegas de laboratório, pelos diferentes momentos em que me ajudaram. E como não falar dos animais que estiveram envolvidos nesse projeto, eles possibilitaram a obtenção de novos conhecimentos e o avanço da ciência, o meu muito obrigada.

Agradeço a minha família, os Hummel, os Moreira e os Pacheco, que mais recente me acolheram com tanto carinho. Falando em família, agradeço ao meu namorado Rafael Pacheco Cardoso por ter acreditado e me incentivado desde o início a ingressar ao mestrado. Preciso mencionar também, o carinho e a companhia da Cindy e do Hashi.

*Soy lo que me enseñó mi padre  
El que no quiere a su patria, no quiere a su madre*

*Soy América Latina*

*Um pueblo sin piernas, pero que camina, ¡oye!*

(Eduardo C. Martínez, Rafael Arcaute e René P. Joglar, 2011)

## RESUMO

A sepse é uma síndrome que acomete milhões de pessoas todos os anos, na qual ocorre uma resposta exagerada do organismo a uma infecção. O agravamento da sepse origina o choque séptico, caracterizado por hipotensão e hiporresponsividade vascular a agentes vasopressores. Estudos anteriores sugerem a participação da S-nitrosilação proteica na manutenção da hipotensão em animais sépticos. A S-nitrosilação geralmente resulta em perda da função de receptores e proteínas de sinalização, relacionados à resposta aos vasoconstritores. A utilização de agentes denitrosilantes parece ser uma opção plausível para reverter este problema. O tempol é um antioxidante cíclico e acreditamos que ele tenha ação denitrosilante. Neste trabalho foram utilizados camundongos C57BL/6j com a sepse induzida por ligadura com punção de ceco (CLP). Os animais foram divididos em três grupos: Controle, CLP e CLP + Tempol. Os dados hemodinâmicos dos animais foram avaliados após 10 h do procedimento cirúrgico, com os animais acordados. O grupo CLP + Tempol recebia o tempol intravenoso e após 2 h eram feitas as curvas de dose-resposta com noradrenalina. Então, os animais eram eutanasiados e as seguintes amostras colhidas: aorta, coração, fígado e sangue. A partir destas amostras foram realizadas análises, como a nitrosilação total, a nitrosilação das proteínas quinase A (PKA) e C (PKC), avaliações de dano tecidual e de estresse oxidativo. Ao avaliar a pressão arterial sistólica dos diferentes grupos, o grupo CLP + Tempol apresentou maior elevação pressórica, até mesmo quando comparado com o grupo Controle. Foi possível verificar que em diferentes tecidos a S-nitrosilação foi maior no grupo CLP. Corroborando achados de outros trabalhos, onde mostraram a participação da nitrosilação na fisiopatologia da sepse. Além disso, sugerindo o envolvimento da S-nitrosilação na hiporresponsividade vascular, que foi revertida com a utilização do tempol. Alguns tecidos apresentaram maior nitrosilação no grupo CLP, como também menor expressão de PKC deste mesmo grupo. Nas avaliações de estresse oxidativo o grupo CLP + Tempol apresentou um efeito antioxidante, reduzindo o dano por estresse oxidativo. Estes resultados sugerem que o tempol atue como denitrosilante e que a redução da nitrosilação proteica restaura a resposta a noradrenalina, com aparente envolvimento da nitrosilação da PKA e PKC. No entanto, ainda é necessário avaliar de maneira mais detalhada o efeito da reversão da nitrosilação na sepse.

**Palavras-chave:** óxido nítrico; choque séptico; tempol; S-nitrosilação.



## ABSTRACT

Sepsis is a syndrome that affects millions of people every year, in which occurs an exaggerated response of the body to an infection. The worsening of sepsis leads to septic shock, characterized by hypotension and vessel hyperresponsiveness of vasopressors agents. Previous studies indicate the participation of protein S-nitrosylation in the maintenance of hypotension in septic animals. S-nitrosylation usually results in the loss of receptors functions and signaling proteins which are related to vasoconstrictors response. The utilization of denitrosylant agents seems like a plausible option to revert this problem. The tempol is a cyclic antioxidant and we believe that it has a denitrosylant action. In this work were used C57BL/6j mice with induced sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). The animals were divided in three groups: Control, CLP and CLP + Tempol. The hemodynamic data of the animals was evaluated in awake animals 10 h after the sepsis induction. The CLP + Tempol group received the intravenous tempol and after 2 h a dose-response curve to norepinephrine was performed. Then, the animals were euthanized, and samples were collected: aorta, heart, liver and blood. Analyzes were carried out from these samples, such as total nitrosylation, protein kinase A (PKA) and C (PKC) nitrosylation, tissues dysfunction and oxidative stress. In the systolic blood pressure evaluation, it was possible to obtain expressive values of increase in the pressure of the CLP + Tempol, these higher than the Control group. That S-nitrosylation was higher in various tissues of the CLP group, supporting other studies that have shown the involvement of nitrosylation in sepsis pathophysiology. Furthermore, implying the involvement of S-nitrosylation in hyporesponsiveness, which was reversed with the use of tempol. Some tissues present improved nitrosylation in the CLP group, as well as lower PKC expression in the same group. In the oxidative stress evaluations, the CLP + Tempol group exhibited an antioxidant effect, decreasing the oxidative stress damage. This result suggests that the tempol behaves like a denitrosylant and the reduction of the protein nitrosylation restores the norepinephrine response, with possible participation of the PKA and PKC nitrosylation. However, it is still required to evaluate in a more detailed way the effect of the reversal of nitrosylation in sepsis.

**Keywords:** nitric oxide; septic shock; tempol; S-nitrosylation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias de síntese do NO e seus metabólitos.....	19
Figura 2 - Ação da noradrenalina em receptores $\beta$ 1-adrenérgica via PKA.....	22
Figura 3 – Ação da noradrenalina em receptores $\alpha$ 1-adrenérgica via PKC.....	23
Figura 4 - Concentrações de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> no interior da célula frente ao eustresse e ao distresse oxidativo.....	25
Figura 5 - Mecanismo de ação do tempol e da SOD.....	26
Figura 6 - Linha do tempo da avaliação do impacto da S-nitrosilação e do estresse oxidativo no choque séptico.....	30
Figura 7 - Linha do tempo da avaliação da hiporresponsividade vascular decorrente do choque séptico.....	31
Figura 8 - Cirurgia de canulação de artéria e veia femoral.....	33
Figura 9 - Ligadura de ceco com punção.....	34
Figura 10 - Avaliação da pressão arterial.....	35
Figura 11 – Nitrosilação total.....	38
Figura 12 – Quantificação de PKA, PKC e GAPDH.....	39
Figura 13 - Curva de dose-resposta de noradrenalina.....	46
Figura 14 - Variação na pressão arterial sistólica basal.....	47
Figura 15 - Variação na frequência cardíaca.....	48
Figura 16 - Nitrosilação total na aorta.....	49
Figura 17 - Nitrosilação total no coração.....	50
Figura 18 - Nitrosilação total no fígado.....	51
Figura 19 - Nitrosilação total em eritrócitos.....	52
Figura 20 - Nitrosilação total em plasma.....	53

Figura 21 - Comparativo entre nitrosilação total e $\Delta$ PAS de acordo com o tecido na dose de 20 $\mu$ g/kg NE.....	54
Figura 22 - Nitrosilação de PKC, GAPDH e Expressão de PKC na aorta.....	55
Figura 23 - Nitrosilação de PKC, GAPDH e Expressão de PKC e PKA no coração.....	56
Figura 24 - Nitrosilação de PKA, GAPDH e Expressão de PKA no fígado.....	57
Figura 25 - Dosagem de glicose e lactato plasmático.....	58
Figura 26 - Avaliações de estresse oxidativo do coração.....	59
Figura 27 - Avaliações de estresse oxidativo do fígado.....	60
Figura 28 - Avaliações de estresse oxidativo dos eritrócitos.....	61

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Isoformas das óxido nítrico sintases e principais características.....	18
Quadro 2 - $\Delta$ PAS durante a curva de dose-resposta.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenilato Ciclase
AMPc	Monofosfato Cíclico de Adenosina
ATP	Adenosina Trifosfato
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CaD	Proteína de Ligação da Actina
CaM	Calmodulina
CaP	Calponina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CLP	Ligadura Cecal com Punção
DAG	Diacilglicerol
DAN	2,3-diaminoftaleno
Deoxi-Hb	Deoxihemoglobina
Deoxi-Mb	Deoximioglobina
DTNB	5,5'-dithiobis
ECL	Quimiluminescência Aprimorada
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
eNOS/NOS 3	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
EPM	Erro Padrão da Média
FC	Frequência Cardíaca
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato Desidrogenase
GDP	Guanosina Difosfato
GRS	Glutationa Redutase
GSH	Glutationa Reduzida
GSSG	Glutationa Oxidada
GTP	Guanosina Trifosfato
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HEPES	Agente Tampão de Ácido Sulfônico Zwitteriônico
HRP	Peroxidase de Rábano
iNOS/NOS 2	Óxido Nítrico Sintase Induzível
IP	Intraperitoneal
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,2,4 Trifosfato
IV	Intravenosa
LAFEX	Laboratório de Farmacologia Experimental
LAMEB	Laboratório de Multiusuário de Estudos em Biologia
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MDA	Malondialdeído
MEK	MAPK quinase
MLC	Miosina de Cadeia Leve
MLCK	Miosina Quinase de Cadeia Leve
NADPH	Fosfato Dinucleotídeo de Nicotinamida e Adenina
NE	Noradrenalina
NITROX	Laboratório de Nitrosilação e Estresse Oxidativo
nNOS/NOS 1	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NO	Óxido Nítrico
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrito

NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrato
NOS	Óxido Nítrico Sintases
NP 40	Detergente CAS 9016-45-9
NRF2	Fator Nuclear Eritroide 2 Relacionado ao Fator 2
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Peroxinitrito
Oxi-Hb	Oxi-Hemoglobina
PA	Pressão Arterial
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidilinositol 4,5 Bifosfato
PKA	Proteína Quinase A
PKC	Proteína Quinase C
PLCβ	Fosfolipase Cβ
Raf	Fibrossarcoma Rapidamente Acelerado
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
SC	Subcutânea
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
SHR	Ratos Espontaneamente Hipertensos
SNO-RAC	S-nitrosilação e Denitrosilação por Captura Assistida em Resina
SOD	Superóxido Dismutase
SOFA	Sequential Organ Failure Assessment Score
SR	Retículo Sarcoplasmático
TBA	Ácido Tiobarbitúrico
TBARS	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico
TBS	Solução Salina de Tris Tamponada
TCA	Ácido Tricloroacético
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
URL	Unidade Relativa de Luz
XOR	Xantina Oxidase

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	28
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
4.1	ABORDAGEM EXPERIMENTAL.....	29
<b>4.1.1</b>	<b>Avaliação do impacto da S-nitrosilação e do estresse oxidativo no choque séptico</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Avaliação da hiporresponsividade vascular decorrente do choque séptico</b> .....	<b>30</b>
4.2	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS .....	31
<b>4.2.1</b>	<b>Canulação de artéria e veia femoral</b> .....	<b>32</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Indução de sepse</b> .....	<b>33</b>
4.3	AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL.....	34
4.4	PONTOS FINAIS HUMANITÁRIOS.....	35
4.5	EUTANÁSIA .....	35
4.6	AVALIAÇÕES DAS AMOSTRAS .....	36
<b>4.6.1</b>	<b>Isolamento de proteínas nitrosiladas</b> .....	<b>36</b>
4.6.1.1	Quantificação de nitrosilação total .....	37
<b>4.6.2</b>	<b>Quantificação de proteínas específicas</b> .....	<b>38</b>
<b>4.6.3</b>	<b>Disfunção tecidual</b> .....	<b>40</b>
<b>4.6.4</b>	<b>Marcadores de estresse oxidativo</b> .....	<b>40</b>
4.6.4.1	Quantificação da concentração de proteínas .....	40
4.6.4.2	Atividade das NADPH oxidases .....	41
4.6.4.3	Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS) .....	41
4.6.4.4	Glutathiona reduzida e oxidada .....	42
4.6.4.5	Atividade da xantina oxidase .....	43
4.6.4.6	Peróxido de hidrogênio.....	43
4.6.4.7	Nitrito .....	43
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44

<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
5.1	PRESSÃO ARTERIAL.....	45
5.2	NITROSILAÇÃO TOTAL .....	48
<b>5.2.1</b>	<b>Nitrosilação de proteínas de interesse no choque séptico</b> .....	<b>55</b>
5.3	DISFUNÇÃO TECIDUAL.....	57
5.4	ESTRESSE OXIDATIVO .....	58
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>63</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>70</b>



## 1 INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome caracterizada por uma resposta inflamatória exacerbada do organismo à infecção, que gera lesões em diferentes órgãos [1]. O agravamento no quadro da sepse leva ao choque séptico, no qual ocorre hiporreatividade vascular e hipotensão persistente, entre outros fatores, o que resulta no aumento da mortalidade [2]. Anualmente 31,5 milhões de pessoas desenvolvem sepse no mundo, 19,4 milhões evoluem para choque séptico e dessas 5,3 milhões vem a óbito [3], [1]. No Brasil o período médio que um paciente com sepse permanece internado é de 10 dias, desses pacientes cerca de 44% vêm a óbito por complicações no quadro [4].

O diagnóstico da sepse é complexo e sua evolução envolve diferentes tecidos e sistemas, como o parênquima de órgãos, o sistema imune, as células da micróglia, os neurônios o endotélio da microcirculação e a cascata de coagulação [1]. A sepse pode ser identificada através do SOFA (*Sequential [Sepsis-Related] Organ Failure Assessment Score*), que compreende a avaliação de parâmetros, como: pressão parcial de oxigênio, fração inspirada de oxigênio, plaquetas, bilirrubina, pressão arterial média, doses administradas de catecolaminas na última hora, escala de coma *Glasgow*, creatinina e volume de urina [5]. Quando o paciente soma 2 pontos ou mais nesses parâmetros é classificado como paciente séptico.

O choque séptico está associado à necessidade da utilização de infusão com catecolaminas, no entanto, sem grande aumento da pressão arterial, com esta permanecendo próxima a 65 mmHg. Outro indício do choque séptico é quando o nível de lactato sérico está acima de 18 mg/dL (2 mmol/L) [5]. O quanto antes a sepse for diagnosticada e o tratamento iniciado, menores as sequelas e menores a chance de evoluir para o choque séptico [6]. No tratamento da sepse se fornecem condições de suporte a vida buscando a restauração da perfusão tecidual, para estabilizar o paciente e favorecendo a oxigenação, para reestabelecer as funções orgânicas [6].

Durante a sepse ocorre a bacteremia e a endotoxemia, ambas resultam na produção exacerbada de óxido nítrico (NO) [7]. O óxido nítrico é sintetizado por enzimas conhecidas como as óxido nítrico sintases (NOS). As NOS catalisam a síntese de óxido nítrico (Figura 1) através da oxidação da L-arginina em L-citrulina [8]. Existem três isoformas dessas enzimas, sendo elas: óxido nítrico sintase neuronal

(nNOS) ou NOS 1, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) ou NOS2 e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) ou NOS 3 [7], [9].

A nomenclatura utilizada para as óxido nítrico sintases foi relacionada com a sua localização quando foram descobertas, mas hoje se sabe que elas estão presentes em diferentes tecidos, adotando-se a nomenclatura acompanhada da numeração [2], [9], [10], [11]. As principais diferenças entre essas enzimas estão nas localizações, expressão e dependência ou não de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) para a sua ativação, conforme o Quadro 1, abaixo:

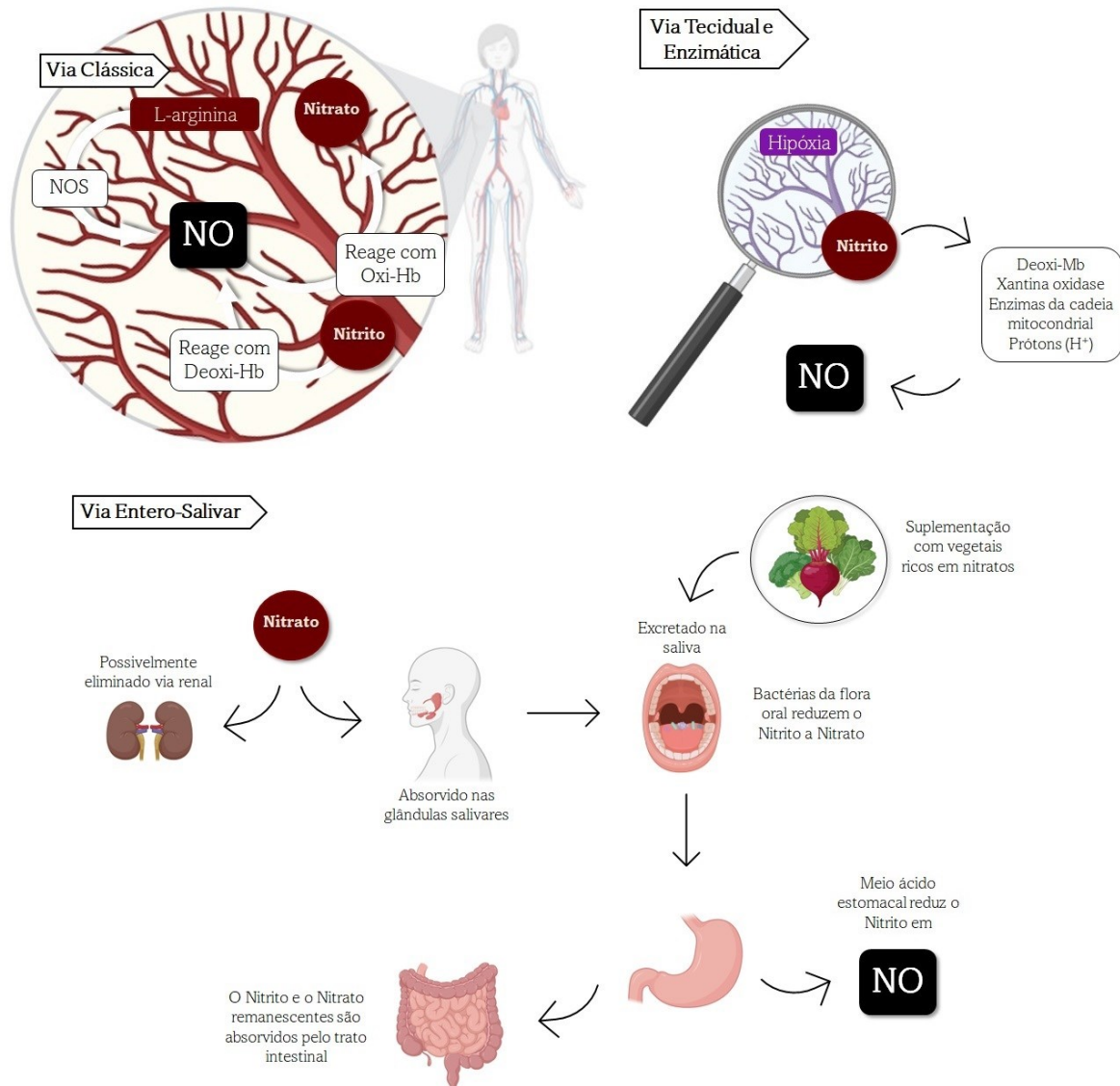
Quadro 1 - Isoformas das óxido nítrico sintases e principais características

<b>Isoformas</b>	<b>Localização</b>	<b>Expressão</b>	<b>Dependência de <math>\text{Ca}^{2+}</math></b>
<b>nNOS/NOS 1</b>	Tecido neuronal, musculatura lisa vascular	Constitutiva	Dependente
<b>iNOS/NOS 2</b>	Macrófagos, hepatócitos, células da musculatura lisa, células da glia, astrócitos, neurônios e cardiomiócitos	Induzível	Independente
<b>eNOS/NOS 3</b>	Predominantemente no tecido endotelial	Constitutiva	Dependente

Fonte: Elaborada pela autora [2], [9], [12].

Fisiologicamente o óxido nítrico age em diversos sistemas, como: no controle do tônus vascular [13], [14], na inibição da agregação plaquetária [14], [15] e na adesão de neutrófilos no tecido endotelial [14], [16], diminui a atividade glicolítica relacionada com a lesão de reperfusão e na neurotoxicidade, inibe a respiração mitocondrial [14], [17] e está envolvido nos sistemas reprodutivos feminino e masculino [14].

Figura 1 - Vias de síntese do NO e seus metabólitos



Descreve a via clássica de síntese do óxido nítrico (NO), através da L-arginina com a ação das NOS. Elencando seus metabólitos: o nitrato ( $NO_3^-$ ) e o nitrito ( $NO_2^-$ ), como também, suas participações nas vias entero-salivar e tecidual na síntese do NO. Após descreve a oxidação do nitrato, que podendo ser eliminado pelos rins ou ser absorvido pelas glândulas salivares e excretado na saliva. Além disso, o nitrato pode ser suplementado por uma dieta de vegetais ricos em nitratos. Em meio ácido parte do nitrato é reduzido em nitrito, podendo ser convertido em NO ou ser absorvido no intestino como nitrato e nitrito. Em casos de hipóxia tecidual o  $NO_2^-$  é convertido em NO, por vias enzimáticas e não enzimáticas. Fonte: Referência [18]. Ícones disponíveis em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

No sistema imune auxilia no controle de agentes patogênicos e em reações citotóxicas, atua também como neurotransmissor e modula a inflamação em diferentes sistemas [19]. Em resposta a sepse os metabólitos do NO sintetizado pela NOS 2, são utilizados no combate de diferentes patógenos, sendo os principais: o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o superóxido ( $O_2^-$ ) e o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) [20]. A NOS 2 é a

principal óxido nítrico sintase envolvida na sepse, pois é capaz de sintetizar de 500 a 1000 vezes mais NO por minuto quando comparada com as NOS 1 e NOS 3, estando fortemente associada a situações em que grandes quantidades de óxido nítrico são sintetizadas resultando em toxicidade [21].

O óxido nítrico é uma molécula instável, pouco lipofílica e possui um elétron desparelhado, sua meia vida nos tecidos biológicos é de 3 a 5 segundos convertendo-se nos metabólitos nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) [11]. O nitrato e o nitrito são estáveis por mais tempo, por este motivo quando se busca quantificar o óxido nítrico de forma indireta se quantificam os seus metabólitos [11]. Quando a concentração de oxigênio nos tecidos baixa o NO é formado através dos seus metabólitos, por vias teciduais e enzimáticas como: através da deoximioglobina, da xantina oxidase (XOR), de enzimas da cadeia mitocondrial e de prótons. Esses mecanismos são importantes em diferentes sistemas biológicos [18], [8], [22] (Figura 1).

Um ambiente com excesso de NO, resulta no aumento da S-nitrosilação de proteínas. A S-nitrosilação das proteínas durante a sepse é um exemplo de ação indesejada do NO, e acontece quando há grande concentração de óxido nítrico permitindo a formação dos seus intermediários, como o trióxido de dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) e o nitrosônio ( $\text{NO}^+$ ) que podem formar os nitrosotióis [23]. E ao se ligarem ao grupamento tiol livre das cisteínas presentes nas proteínas formam a S-nitrosilação [24]. Durante a endotoxemia na sepse, ocorre o aumento na concentração de proteínas S-nitrosiladas em diferentes amostras, como plasma, eritrócitos, fígado, pulmão, coração, rins e cérebro. Ademais, foi constatado que locais onde tinham menor concentração de ascorbato eram os mais afetados com a S-nitrosilação [20].

A S-nitrosilação interfere na atividade original da proteína a qual se ligou, como também em segundos mensageiros desta proteína, podendo conferir novas ações ou inibindo a ativação de vias [25]. Na sepse a S-nitrosilação está elevada no plasma e nos eritrócitos [25], estudos anteriores demonstraram que o aumento de proteínas s-nitrosiladas nos vasos está associado a hiporresponsividade vascular a agentes vasopressores [26], [27].

As espécies nitrosiladas em condições fisiológicas podem ser reguladas por diversas enzimas, entre elas a s-nitrosoglutatona (GSNO) redutase. A GSNO redutase é uma enzima que atua fazendo denitrosilação de proteínas, auxiliando a regular o tônus vascular e a contratilidade cardíaca, com conhecida interação com o receptor  $\beta$ -adrenérgico demonstrando, portanto, importante participação na

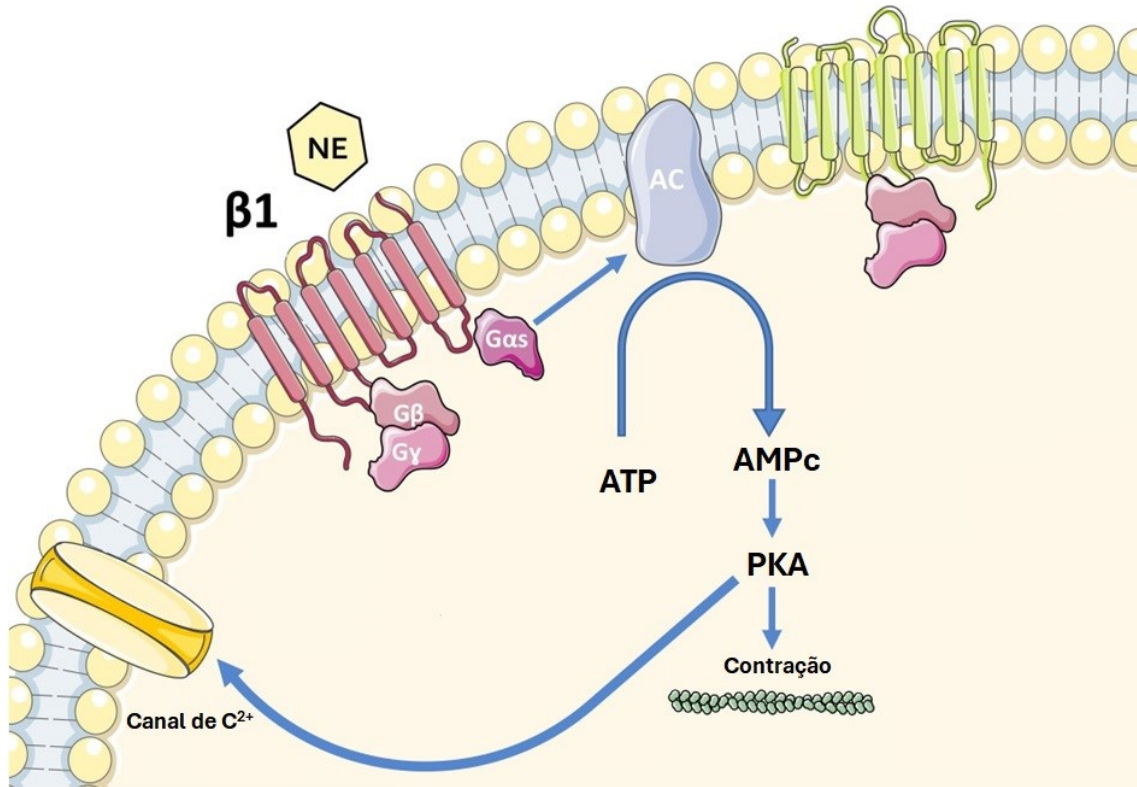
manutenção da função cardiovascular [28]. Além do conhecido aumento da produção de óxido nítrico na sepse [20], um estudo feito com modelo de sepse em animais nocaute para a GSNO redutase, resultou em maior dano tecidual e mortalidade, associados a níveis elevados de proteínas nitrosiladas [29], [30].

A nitrosilação de receptores transmembrana e enzimas intracelulares podem diminuir a resposta à vasoconstritores [31]. Já foi demonstrado que a S-nitrosilação dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgico e  $\beta$ 1-adrenérgico resulta na redução da resposta aos agonistas [27], [32]. A diminuição na resposta aos agonistas pode ocorrer também pela ação da  $\beta$ -arrestina que leva a internalização dos receptores de membrana ou pela dessensibilização dos receptores [27]. A  $\beta$ -arrestina modula a interação de outras proteínas, como é o caso dos receptores acoplados à proteína G [32].

A S-nitrosilação dos receptores  $\alpha$ 1-adrenérgicos e  $\beta$ 1-adrenérgicos é de grande interesse, por serem receptores do agente vasopressor mais utilizado durante o choque séptico, a noradrenalina (NE) [33]. Além disso é importante verificar se as vias que os fármacos ativam estão funcionais, como são os casos das proteínas quinase A (PKA) e quinase C (PKC), que também podem estar nitrosiladas e isso resultará na inativação e na ausência de resposta frente a utilização de NE [34].

A PKA é uma proteína intracelular, que participa na via da noradrenalina (Figura 2). Quando a noradrenalina se liga ao receptor  $\beta$ 1-adrenérgico a subunidade  $G_{\alpha s}$  ativa a adenilato ciclase (AC), que ativa o monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) com a adenosina trifosfato (ATP). O AMPC ativa a PKA, que abre os canais de cálcio ( $Ca^{2+}$ ) que contribui na contração muscular cardíaca, por exemplo [35].

Figura 2 - Ação da noradrenalina em receptores  $\beta$ 1-adrenérgica via PKA



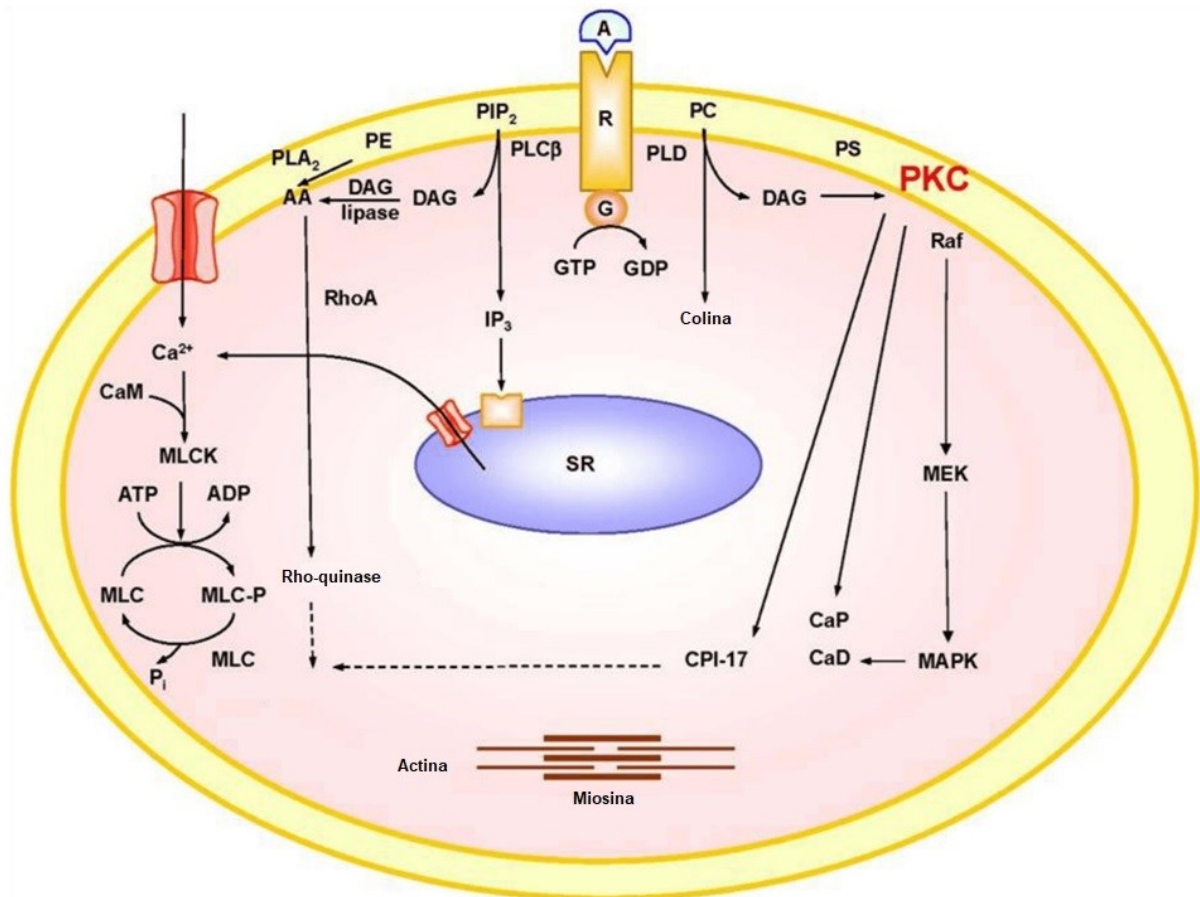
Via de contração da musculatura via PKA e seus mediadores. Fonte: Referência [35] (adaptada), (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/deed.en>).

A PKC é uma proteína intracelular, que está envolvida na via da noradrenalina (Figura 3). Quando a noradrenalina se liga ao receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico ativa a subunidade  $\alpha$  e é ativada pela conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina difosfato (GDP), a fosfolipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) estimula a clivagem do fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP $_2$ ) na membrana plasmática, aumentando a síntese de diacilglicerol (DAG) e de inositol 1,2,4 trisfosfato (IP $_3$ ). O IP $_3$  se liga ao canal de cálcio do retículo sarcoplasmático (SR), fazendo com que ocorra liberação de cálcio para o interior da célula [36].

O influxo de cálcio também é estimulado pela noradrenalina. O cálcio se liga a calmodulina (CAM), ativando a enzima miosina quinase de cadeia leve (MLCK) que leva a fosforilação da miosina de cadeia leve (MLC), dando início a contração da musculatura lisa vascular. O DAG ativa a PKC, que inibe a MLC fosfatase, fazendo com que a sensibilidade ao  $Ca^{2+}$  do miofilamento aumente. A PKC fosforila a calponina (CaP), fazendo com que mais actina se ligue a miosina. Além disso a PKC pode ativar uma cascata de proteína quinase que envolve o fibrossarcoma rapidamente acelerado

(Raf), a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a MAPK quinase (MEK), que leva a fosforilação da proteína de ligação da actina (CaD). Essas vias ativadas pela PKC, resultam na contração da musculatura lisa vascular [36].

Figura 3 – Ação da noradrenalina em receptores  $\alpha$ 1-adrenérgica via PKC



Vias de contração da musculatura lisa vascular via PKC e seus mediadores. Fonte: Referência [37] (adaptada), (<https://www.mdpi.com/openaccess>).

A enzima GAPDH é utilizada como padrão de normalização para a quantificação de proteínas, como a PKA e a PKC, devido a sua presença em diferentes células [38]. A GAPDH participa da glicólise anaeróbica, na síntese de ATP e piruvato, sendo de grande importância no metabolismo celular. Além disso, participa da proliferação celular, tumorigenese, estresse oxidativo, envelhecimento celular e apoptose [39]. A GAPDH é também, um marcador de estresse oxidativo, pois quando nitrosilada sofre translocação para o núcleo celular resultando em citotoxicidade e sinalizando para a apoptose [40].

Além da nitrosilação de proteínas específicas há indícios de que a utilização de agentes antioxidantes e com possível ação denitrosilante podem reduzir os danos aos órgãos, aos vasos e até mesmo restaurar a microcirculação, levando a uma melhora na resposta cardiovascular dos pacientes [41], [42], [43]. Em um estudo feito com a utilização do ascorbato, em pacientes com sepse, ele foi capaz de limitar a disfunção endotelial, possibilitando a perfusão tecidual, reduzindo a hipóxia e danos em órgãos decorrentes da irrigação comprometida [42].

No entanto não foi avaliado o efeito denitrosilante do ascorbato sobre os tecidos. Neste estudo o efeito benéfico foi creditado ao efeito antioxidante da molécula e a participação do ascorbato como cofator na síntese de sinalizadores celulares. Apenas um trabalho na literatura mostra com clareza a participação do processo de denitrosilação sobre a melhora da sepse e resposta a vasoconstritores [44]. Assim é fundamental avançarmos no entendimento da participação da S-nitrosilação na sepse, bem como a reversão da mesma e os impactos sobre os desfechos da doença.

Complementarmente a nitrosilação, na sepse ocorre grande síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) [45]. Fisiologicamente o metabolismo celular gera ROS, que desempenham atividades relevantes. As ROS são moduladas principalmente por antioxidantes e pela ação de algumas enzimas. De modo geral, essa interação das ROS que tende ao equilíbrio se denomina eustresse oxidativo. Quando ocorre um desbalanço e a concentração de espécies reativas está elevada, ocasionando danos, esta situação se denomina distresse oxidativo (Figura 4) [46], [47].



Figura 4 - Concentrações de  $H_2O_2$  no interior da célula frente ao eustresse e ao distresse oxidativo

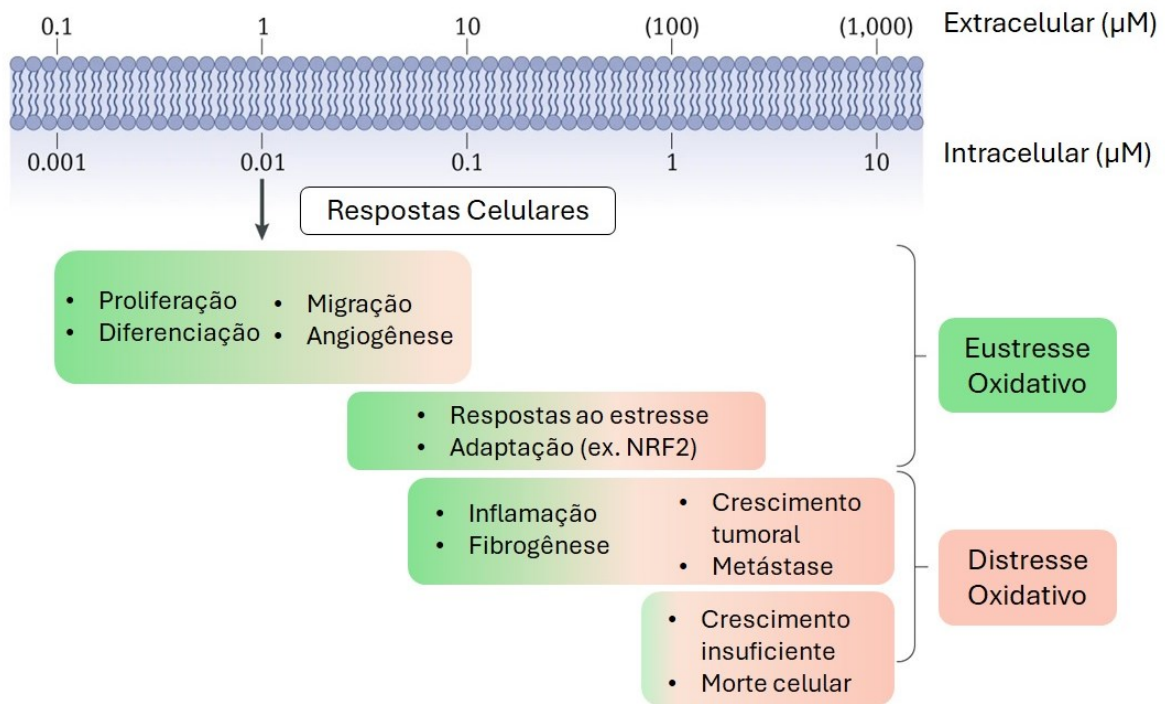


Figura representa uma membrana celular com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio no interior da célula e suas respostas, da menor para maior partindo da esquerda para a direita. Concentrações entre 0,1 e 0,1  $\mu M$  geram em sua maioria respostas benéficas, em situações fisiológicas (eustresse oxidativo). Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2 (NRF2). De 1 a 10  $\mu M$  a maioria das respostas geram danos, podendo resultar na morte celular (distresse oxidativo). Fonte: Referência [47], (Adaptada), (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

As principais ROS presentes no organismo são: o peróxido de hidrogênio, o óxido nítrico, o superóxido, o radical hidroxila e o peroxinitrito. Dentre os antioxidantes endógenos, o principal é a glutatona e as enzimas NADPH oxidases, xantina oxirredutase e superóxido dismutase [48]. Para verificar o estresse oxidativo pode-se dosar as ROS, seus metabólitos, os antioxidantes, algumas moléculas e a atividades enzimáticas. Devido a relevância das ROS durante a sepse [49], foram realizadas avaliações para mensurar o estresse oxidativo em diferentes tecidos.

Neste estudo avaliamos a capacidade denitrosilante do tempol, um antioxidante cíclico, que até o momento não possui qualquer referência à possível capacidade de destruir nitrosilação. Esta droga já vem sendo utilizada em modelos de hipertensão, é considerado um mimético da enzima superóxido dismutase (SOD),

importante componente na proteção antioxidante do organismo (Figura 5). A SOD converte moléculas de superóxido em moléculas de oxigênio e peróxido de hidrogênio, que são moléculas menos reativas [50].

Figura 5 - Mecanismo de ação do tempol e da SOD

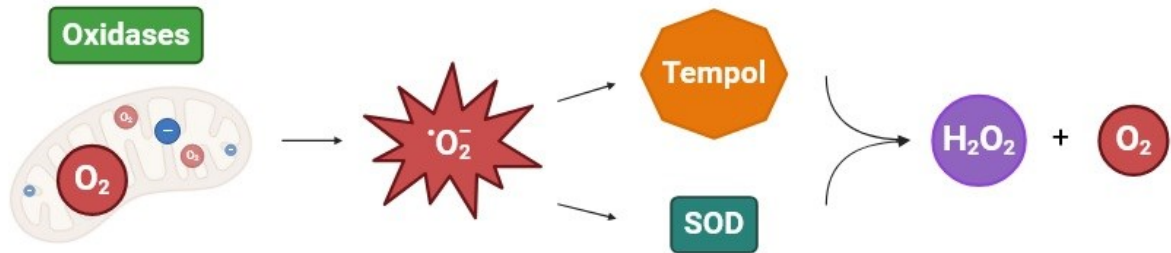


Imagem descreve a formação de superóxido pelas enzimas oxidases. E mostra o mecanismo de ação do tempol e da SOD, convertendo o superóxido em uma molécula de peróxido de hidrogênio e oxigênio. Fonte: Referência [48]. Ícones disponíveis em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

## 2 HIPÓTESE

O tempol melhora a resposta vasopressora da noradrenalina durante o choque séptico devido a redução da nitrosilação proteica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do tempol na resposta pressórica a noradrenalina, bem como se este efeito é decorrente da reversão da S-nitrosilação proteica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a pressão arterial de animais sépticos, tratados com o tempol;

Avaliar se o tempol melhora a resposta vasopressora em curvas dose resposta a noradrenalina em animais sépticos;

Avaliar o grau de S-nitrosilação total na aorta, fígado e coração;

Avaliar a nitrosilação das proteínas quinase A (PKA) C (PKC) e GAPDH;

Verificar a existência de correlação entre a piora dos parâmetros hemodinâmicos, com o aumento da S-nitrosilação e do estresse oxidativo;

Avaliar se o tempol é capaz de reverter a S-nitrosilação total e específica. E se essa reversão pode ser associada a melhora dos parâmetros hemodinâmicos durante o choque séptico;

Avaliar o efeito do tempol sobre os parâmetros de estresse oxidativo em animais sépticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL

Este estudo foi realizado em sua maioria no Laboratório de Nitrosilação e Estresse Oxidativo (NITROX), com algumas parcerias como é o caso do Laboratório de Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB). Foram utilizados 69 camundongos C57BL/6j, machos, pesando aproximadamente 30 g, com 6 meses de idade. Foram utilizados os animais de acordo com o peso, pois quando os animais eram mais leves aumentava o grau de dificuldade da cirurgia de canulação de artéria e veia femoral, como também a mortalidade.

A realização deste trabalho passou pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) e foi aprovado, com o número de projeto 5871200522. Os animais utilizados foram fornecidos pelo Laboratório de Farmacologia Experimental (LAFEX), onde eram submetidos a regimes de luz e escuro de 12 h cada, iniciando às 07:00 h, a temperatura de  $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , com livre acesso a água e a alimento. Foram agrupados de 2 - 4 animais por caixa e durante o período que estiveram sob meus cuidados receberam enriquecimento ambiental.

#### 4.1.1 Avaliação do impacto da S-nitrosilação e do estresse oxidativo no choque séptico

O objetivo desta abordagem era avaliar a nitrosilação vascular e o estresse oxidativo provenientes da sepse, bem como o efeito do tratamento com tempol (Figura 7). Os animais foram divididos nos grupos: Controle n = 15; CLP n = 15; CLP + Tempol n = 15 (200 mg/kg, intravenoso (IV)). Após 10 horas da canulação dos animais e indução de sepse, o tratamento foi administrado. Os parâmetros hemodinâmicos foram avaliados antes do tratamento e ao final de duas horas.

Após as avaliações, os animais foram eutanasiados e foram colhidas amostras de aorta, coração, fígado e sangue. Devido à complexidade do procedimento cirúrgico de canulação e principalmente devido a mortalidade da sepse, foi observada uma mortalidade de 25%.

Figura 6 - Linha do tempo da avaliação do impacto da S-nitrosilação e do estresse oxidativo no choque séptico



Os camundongos C57BL/6j foram submetidos a canulação de artéria e veia femoral, seguida de ligadura de ceco com perfuração (CLP); decorridas 10 h foi aferida a pressão arterial (PA) e administrado o tratamento com tempol intravenoso (IV); após 2 h a pressão arterial foi aferida e procedeu-se com a eutanásia e colheita de amostras. Fonte: Imagem elaborada pela autora. Ícone disponível em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

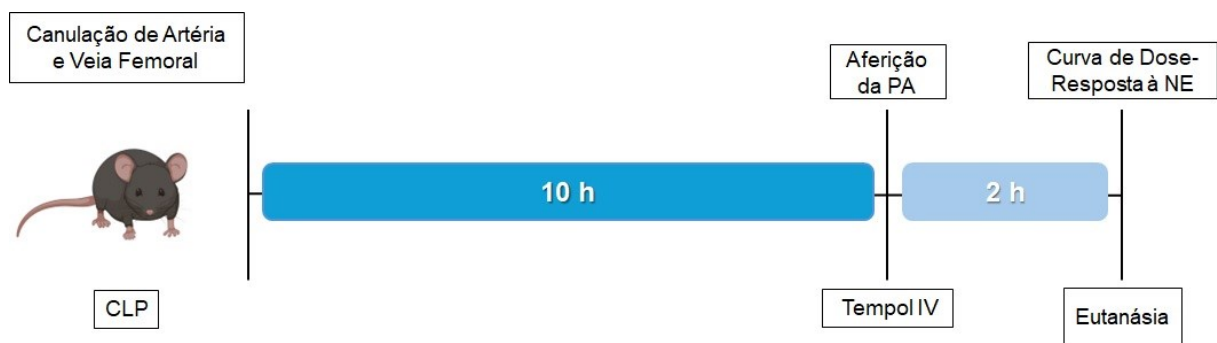
#### 4.1.2 Avaliação da hiporresponsividade vascular decorrente do choque séptico

Pretendia-se avaliar se o tratamento com tempol seria capaz de reverter a hiporresponsividade vascular. E se esta ação era decorrente de um mecanismo de ação denitrosilante (Figura 7). Para tal, os animais foram divididos nos grupos: Controle n = 8; CLP n = 8; CLP + Tempol n = 8. Os animais tiveram a artéria e a veia femoral canuladas, bem como a indução de sepse. Após 10 horas, os animais foram tratados e 2 horas após o tratamento os animais foram desafiados com uma curva dose-resposta à noradrenalina (5; 10; 20; 40; 80 µg/kg IV).

Ao término da curva de dose-resposta os animais foram eutanasiados e coletadas amostras conforme descrito no item 4.1.1. Quando comparada com a abordagem experimental que avaliou a S-nitrosilação e o estresse oxidativo, o número

de animais por grupo foi reduzido. Pois durante a avaliação da hiporresponsividade vascular, não foi possível obter os dados hemodinâmicos de todos os animais que passaram pela canulação. Porém as amostras foram colhidas e realizadas as análises, resultando em um 'n' maior nessas avaliações (item 4.1.1). Devido à complexidade do procedimento cirúrgico de canulação e principalmente devido a mortalidade da sepse, foi observada uma mortalidade de 25%.

Figura 7 - Linha do tempo da avaliação da hiporresponsividade vascular decorrente do choque séptico



Os camundongos C57BL/6j foram submetidos a canulação de artéria e veia femoral, seguida de ligadura de ceco com perfuração (CLP); decorridas 10 h foi aferida a pressão arterial (PA) e administrado o tratamento com tempol intravenoso (IV); após 2 h os animais foram desafiados com a curva de dose-resposta à noradrenalina (NE); procedeu-se com a eutanásia e colheita de amostras. Fonte: Imagem elaborada pela autora. Ícone disponível em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

## 4.2 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

Os animais que foram submetidos a canulação de artéria e veia femoral, posteriormente a CLP sendo, portanto, anestesiados somente uma vez. Como protocolo anestésico utilizamos 100 mg/kg de cetamina e 10 mg/kg de xilazina via intraperitoneal (IP) [51], [52]. Como analgésico transcirúrgico foi utilizado o tramadol 20 mg/kg via (IP) [53], aproximadamente 30 minutos antes do início da cirurgia.

#### 4.2.1 Canulação de artéria e veia femoral

A partir do momento em que o animal estivesse em plano anestésico eles eram posicionados em decúbito dorsal, submetidos a tricotomia na região inguinal direita era realizada a remoção dos pelos soltos e antissepsia com gaze embebida em álcool 70%. Prosseguindo com a incisão de pele e dissecação do tecido adiposo e muscular adjacentes ao foco cirúrgico. Ao visualizar o nervo, a artéria e a veia femoral era aplicada a geleia de cloridrato de lidocaína a 2% (20 mg/g), para ação anestésica no foco da cirurgia como também para evitar a vasoconstrição e facilitar a introdução das cânulas na artéria e na veia femoral direita [54].

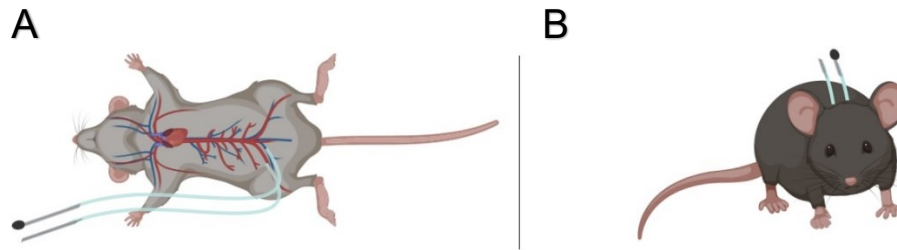
Era realizada a separação do nervo, a artéria e a veia femoral eram levemente suspensas para a passagem de 6 cm fio POLYCOT® 4-0 e realizada uma ligadura na extremidade distal, após era realizada a incisão a 90° na porção central da veia femoral e introduzida a cânula de Micro-Renathane® 0,025" x 0,012" (heparinizada com heparina sódica 5.000 U.I./mL e tampada com um alfinete partido ao meio sendo a extremidade com a cabeça do alfinete a tampa desta cânula) após era feita a fixação da cânula com outra ligadura, mas na extremidade proximal [55].

Neste momento era feita a separação entre a veia e a artéria femoral, cuidando para não remover a cânula da veia, ao separar a artéria ela era suspensa para passar o fio por baixo fazendo uma laçada no fio sem ocluir o fluxo sanguíneo, as extremidades desse fio era fixada com uma pinça bulldog posicionada em uma posição que o seu peso ocluísse o fluxo sanguíneo, era feita uma incisão a 90°C na porção central da artéria femoral, introduzida a cânula (heparinizada e tampada com a outra extremidade do alfinete) ao aliviar a oclusão da artéria feita com o fio e a pinça bulldog. A fixação da cânula era feita com o fio na extremidade proximal que estava fazendo a oclusão do fluxo se sangue, após era feita a fixação na porção distal da cânula com o fio que fixou a veia anteriormente (Figura 8) [55].

Após, com o auxílio de um trocater as cânulas eram passadas pelo tecido subcutâneo por trás do membro pélvico direito até serem exteriorizadas na região entre as escápulas e fixadas. O local da incisão de pele era suturado com fio de seda 3-0 e a ferida limpa com solução fisiológica a 0,9% [55].



Figura 8 - Cirurgia de canulação de artéria e veia femoral

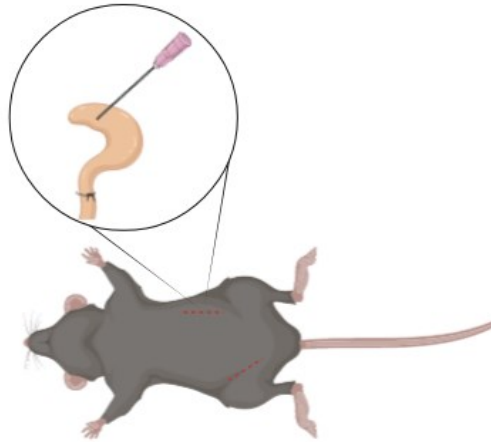


A – Local onde as cânulas são inseridas a cânula com a tampa com a parte superior do alfinete está na veia femoral e a outra tampa na cânula da artéria femoral; B – O animal com as cânulas exteriorizadas na região entre as escápulas, após despertar da anestesia. Fonte: Imagens elaboradas pela autora. Ícones disponíveis em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

#### 4.2.2 Indução de sepse

A indução de sepse era feita através do método CLP por meio de laparotomia longitudinal com uma incisão de pele na região abdominal mesogástrica esquerda, após uma incisão na musculatura abdominal, o ceco era exteriorizado e feita uma ligadura com POLYCOT® 4-0 na região adjacente a porção ileocecal. Procedeu-se com uma dupla perfuração na parede do ceco com uma agulha 40 x 1,20 mm 18 G (Figura 9), e o ceco era pressionado para que extravasasse conteúdo fecal. O ceco era posicionado novamente em sua posição anatômica, era feita a sutura da musculatura com fio de seda 3-0, sutura da pele e a limpeza da ferida com solução fisiológica a 0,9% [51].

Figura 9 - Ligadura de ceco com punção



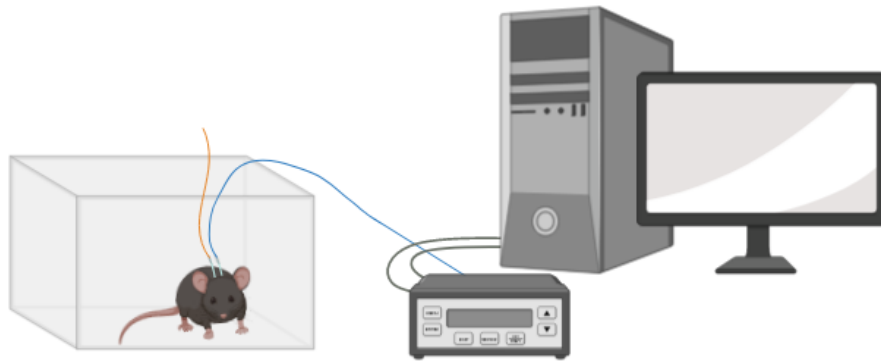
Incisão longitudinal na região epigástrica esquerda para a exteriorização do ceco. Na direita a indicação do local onde foi feita a canulação da artéria e veia femoral. Fonte: Imagem elaborada pela autora. Ícones disponíveis em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Para auxiliar na recuperação volêmica e térmica os animais recebiam 1 mL de solução fisiológica a 0,9% a 37°C por via subcutânea (SC). Os animais no pós-cirúrgico eram colocados em caixas individualmente. As caixas com os animais permaneciam sobre tapete aquecido até que os camundongos começassem a deambular, indicando recuperação anestésica [51]. Posteriormente, os animais eram alocados no biotério, até o momento da avaliação de pressão arterial.

#### 4.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL

A avaliação da pressão arterial foi feita com os animais acordados (Figura 10), conectando a cânula da artéria ao transdutor de pressão, ligado no sistema de aquisição de dados do modelo *PowerLab 4/30 ML866* (AD INSTRUMENTS, Australia) [56].

Figura 10 - Avaliação da pressão arterial



Caixa com camundongo no interior, acordado com a cânula em laranja conectada na veia e a cânula em azul da artéria conectada ao aparelho de aquisição de dados, que está conectado ao computador. Fonte: Imagem elaborada pela autora. Ícones disponíveis em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

Os animais do grupo controle e CLP foram submetidos a curva de dose-resposta à noradrenalina através da cânula da veia quando foram conectados ao sistema de aquisição de dados. Os animais CLP + Tempol recebiam tempol através da cânula da veia, decorridas 2 h procedeu-se com a curva de dose-resposta à noradrenalina através da mesma cânula.

#### 4.4 PONTOS FINAIS HUMANITÁRIOS

Como pontos finais humanitários foram estabelecidos sofrimento severo, temperatura inferior a 32°C, coma ou convulsão. Estes animais eram eutanasiados com sobredose anestésica de cetamina e xilazina, conforme descrito no item 4.5 e foram contabilizados na taxa de mortalidade.

#### 4.5 EUTANÁSIA

A eutanásia dos animais foi feita com o método de sobredose anestésica com a associação de 300 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina via IP. Nesse momento

foram colhidas as amostras de fígado, coração, aorta e sangue. As amostras foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL âmbar e mantidas a – 80°C, até a realização das avaliações.

## 4.6 AVALIAÇÕES DAS AMOSTRAS

Os métodos utilizados e uma breve explicação do objetivo de cada análise serão descritos da seguinte ordem: isolamento de proteínas (item 4.6.1), nitrosilação total (item 4.6.1.1), quantificação de proteínas através de anticorpo (item 4.6.2), dano tecidual (item **Erro! Fonte de referência não encontrada.**) e marcadores de estresse oxidativo (item 4.6.4).

### 4.6.1 Isolamento de proteínas nitrosiladas

As proteínas s-nitrosiladas foram separadas das demais proteínas, para viabilizar as análises de nitrosilação total e posteriormente quantificar proteínas específicas. Para isso, foi utilizado o método de captura de proteína em resina (SNO-RAC) [57], [58] que será descrito a seguir.

As proteínas do tecido foram homogeneizadas em tampão HEPES modificado (25 mM HEPES, 50 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 1% NP40 e 0,1% SDS pH 7,4) com inibidor de protease S8820 (SIGMAFAST™, Sigma). Foram utilizados 500 µL de tampão, para aproximadamente 50 mg de tecido, na proporção de 1:10 sendo 1 de inibidor de protease e 10 de tampão, permanecendo no gelo as amostras e o que foi homogeneizado. A amostra foi centrifugada a 10.000 g por 10 minutos a 4°C. Após será utilizado o sobrenadante, o volume varia, pois a proteína de cada amostra é quantificada e é utilizado o suficiente para que o SNO-RAC contenha 4 mg de proteína. Ao sobrenadante foi adicionado 1,6 mL de tampão de bloqueio (100 mM HEPES, 1 mM EDTA e 0,1 mM neocuproina, pH 8,1 adicionado 2,5% SDS e 20 mM

metilmetanotiosulfonato) com as amostras em banho a 50 °C por 20 minutos sob agitação a cada 5 minutos. Esse processo bloqueia os grupos tióis livres.

Foram adicionados 6 mL de acetona resfriada (-20°C), com incubação por 20 minutos a -20 °C para que ocorresse a precipitação das proteínas. As amostras foram centrifugadas a 2.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado quatro vezes com acetona 70% em água destilada. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensão em 0,5 mL de tampão HEN 1 x (100 mM HEPES, 1 mM EDTA e 0,1 mM neocuproina, pH 8,1 adicionado de 1% de SDS). Foram retirados 50 µL, que corresponde a proteína total, o *input*. O volume restante da amostra foi incubado com 20 mM de ascorbato e 40 µL de tiopropil-sefarose 6B por 12 horas sob rotação e refrigeração.

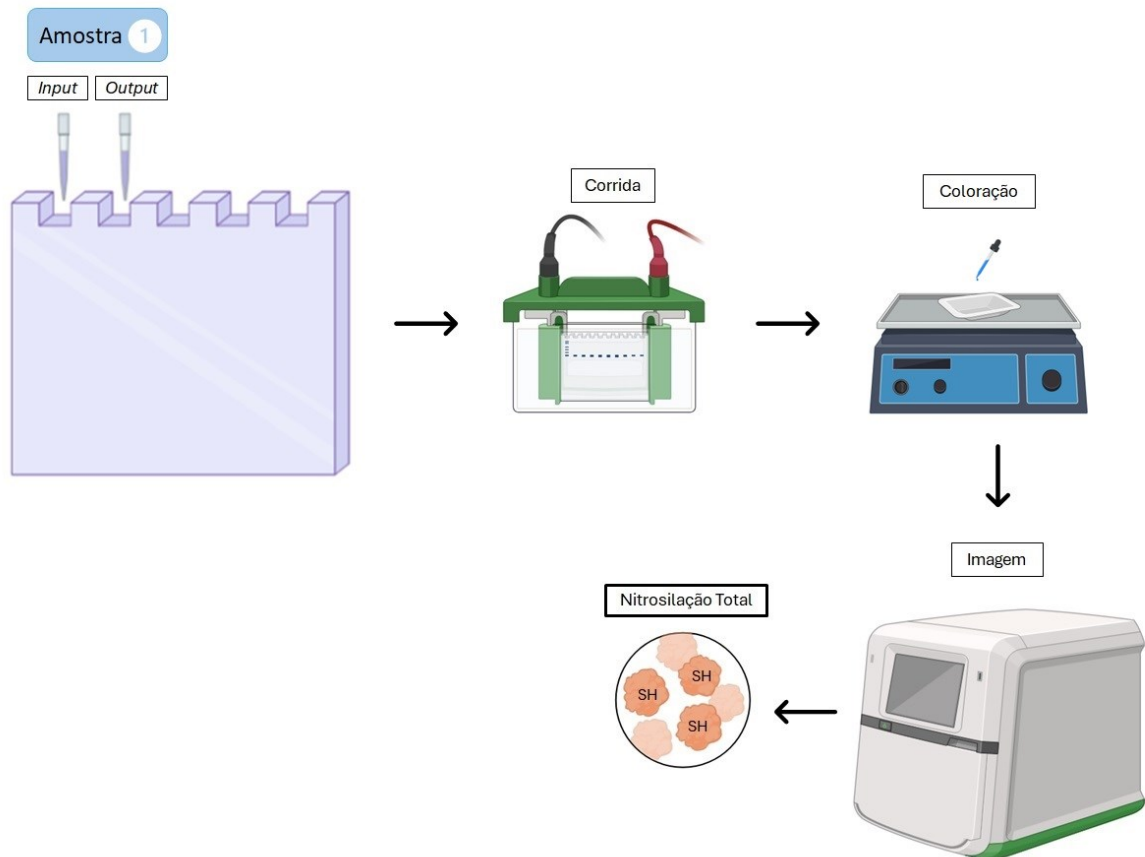
Após, a amostra foi centrifugada a 1.000 g por 1 minuto a 4 °C, o complexo precipitado resultante da resina ligada nas proteínas nitrosiladas. O precipitado foi lavado 4 vezes com tampão HEN 1 x adicionado 1% de SDS e 5 vezes com tampão HEN1/10 adicionado 1% de SDS. Entre lavagens a amostra foi centrifugada a 1.000 g por 1 minuto a 4 °C. Após foi adicionado 0,5 mL de tampão HEN1/10 com 2% de 2-mercaptoetanol por 1 hora a temperatura ambiente, este processo libera as proteínas da tiopropil-sefarose 6B. A amostra foi centrifugada a 1.000 g por 1 minuto a 4°C e foi recolhido o sobrenadante que continham as proteínas nitrosiladas, o *output*.

Durante a realização do SNO-RAC alguns cuidados são essenciais, para que se preserve a ligação do óxido nítrico ao grupo tiol da proteína, como a proteção das amostras de radiação ultravioleta e a utilização de EDTA como quelante de metais.

#### 4.6.1.1 Quantificação de nitrosilação total

Através do SNO-RAC são geradas duas frações o *input* com proteína total e o *output* com as proteínas nitrosiladas. Através dessa relação é possível determinar a porcentagem do tecido avaliado que está nitrosilada (Figura 11). Foram aplicados em gel 5% SDS combinado com gel 10% SDS. Interrompendo a corrida imediatamente quando as amostras entraram no gel a 10%, posteriormente os géis foram corados com azul de comassie 0,05% e a diferença entre as proteínas nitrosiladas foi quantificada por densitometria usando *Image Lab Software* (BIO-RAD, USA).

Figura 11 – Nitrosilação total



Ilustra a maneira como cada amostra foi pipetada no gel, com *input* e *output* respectivamente. Seguido de corrida, coloração do gel, obtenção da imagem e a quantificação da nitrosilação total. Fonte: Imagem elaborada pela autora. Ícones disponíveis em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

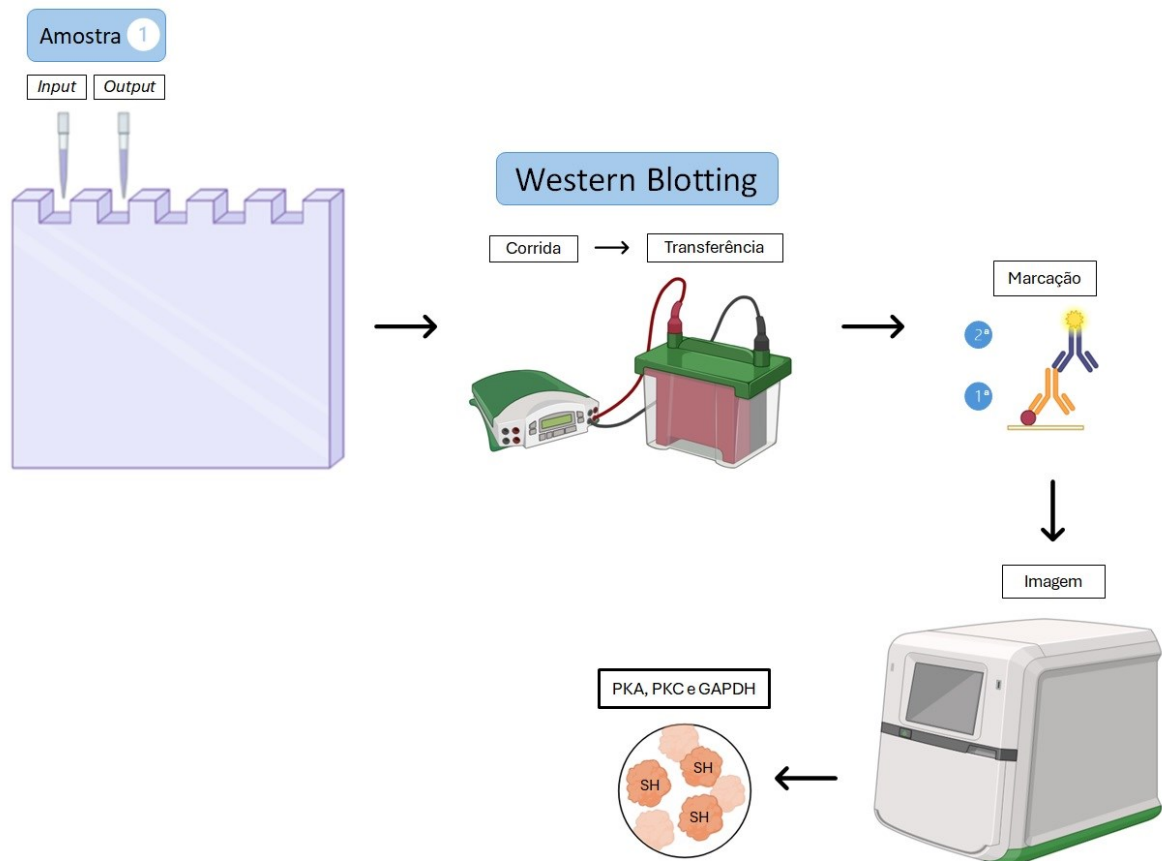
#### 4.6.2 Quantificação de proteínas específicas

Foram feitas as quantificações de proteínas específicas envolvidas no controle da manutenção da pressão arterial, como as proteínas quinase A (PKA), C (PKC). A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) também foi quantificada, para a normalização das demais proteínas e como marcador de dano celular durante a S-nitrosilação [38].

A expressão das proteínas PKA, PKC e GAPDH (Figura 12) foram avaliadas conforme descrito a seguir: as amostras que passaram pela precipitação de s-nitrosotióis foi adicionado laemili 5x. Ao quantificar as proteínas nitrosiladas, o *input* e o *output* foram adicionados paralelamente no gel. Após, as proteínas foram separadas

na corrida com SDS-PAGE em gel 10% de poliacrilamida. Ao finalizar, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (GE Healthcare, Madison, WI, USA) [59].

Figura 12 – Quantificação de PKA, PKC e GAPDH



Ilustra a maneira como cada amostra foi pipetada no gel, com *input* e *output* respectivamente. Seguido de corrida, transferência, marcação, obtenção da imagem e a quantificação de PKA, PKC e GAPDH nitrosiladas. Fonte: Imagem elaborada pela autora. Ícones disponíveis em [BioRender.com](https://www.biorender.com).

A membrana foi bloqueada com albumina 3% e incubada por 12 horas com o anticorpo referente, PKA (Abcam, ab94612), PKC (Santa Cruz, SC-937) e GAPDH (Abcam, ab8245). A membrana foi incubada *overnight* com o anticorpo primário, após remover o anticorpo a membrana foi lavada com TBS-T. O anticorpo secundário foi colocado sobre a membrana por 1 hora, marcada com peroxidase de rábano (HRP) e revelada com kit de quimiluminescência por quimiluminescência aprimorada (ECL)

(GE Healthcare). As imagens geradas foram captadas com foto documentador e quantificadas por densitometria óptica. Foram comparadas as quantificações do total da proteína específica do *input* e do *output*, permitindo diferenciar a proporção de nitrosilação de cada uma das proteínas [59].

#### **4.6.3 Disfunção tecidual**

A fim de avaliar disfunção tecidual, foi quantificada a glicose sérica [60] e a concentração circulante de lactato. Foram utilizados os kits do Labtest®, para a glicose o (GLICOSE PAP LIQUIFORM 84-1/500) e para lactato o (LACTATO ENZIMÁTICO 138-1/50).

#### **4.6.4 Marcadores de estresse oxidativo**

##### **4.6.4.1 Quantificação da concentração de proteínas**

Foi utilizada o procedimento de descrito por Bradford para dosar proteínas na amostra, o valor da concentração de proteínas foi utilizado para normalizar os resultados das demais análises. As amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos e foi feita uma diluição com o sobrenadante de acordo com o tipo de amostra que pode ser de 1:25, 1:50 e 1:100. As amostras diluídas e o reagente Bradford foram pipetadas em uma microplaca de 96 poços transparente. A leitura foi realizada na multileitora de placas *Infinite M200* (TECAN, Suíça) com absorbância de 595 nm [61].



#### 4.6.4.2 Atividade das NADPH oxidases

As NADPH oxidases compõem uma família de enzimas, que são responsáveis pela maior produção de ROS em células eucariotas. Sintetizam superóxido ( $O_2^-$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) [62]. No controle de infecções, como é o caso da sepse, possuem papel fundamental no controle de patógenos. No entanto, nem sempre é possível manter a homeostase e quando há uma produção excessiva de ROS acabam resultando em danos nos diferentes tecidos [45].

A avaliação da atividade das NADPH oxidases busca verificar se os animais sépticos possuem uma atividade aumentada, conforme consta na literatura [63], [64], [45]. E verificar se o tratamento com o tempol é capaz de modular a atividade dessas enzimas.

Para verificar atividade das NADPH oxidases foi utilizada a lucigenina como sonda para marcar as moléculas de superóxido, com fluorescência verde azulada. A solução com lucigenina foi feita na concentração de 2 mM por poço, em tampão fosfato (50 mM fosfato monopotássico, 1 mM ácido egtázico e 150 mM sacarose) com pH 7,4. A amostra e a solução de lucigenina foram plaqueadas em uma microplaca de 96 poços branca, que foi protegida da luz. A leitura foi realizada na multileitora de placas *Infinite M200* (TECAN, Suíça), inicialmente a temperatura do equipamento foi ajustada para 37°C e para a obtenção do branco foi feita a luminescência pontual. Após, foi adicionada a NADPH 2mM na placa e foi feita a luminescência cinética, por 30 ciclos de 30 segundos a 37 °C [65].

#### 4.6.4.3 Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS)

Os produtos resultantes da peroxidação lipídica, são utilizados como marcadores de dano celular. Uma vez que compõe as membranas celulares, quando sua concentração está elevada é indicativo de apoptose. Além disso, a sua elevação no soro está relacionada com uma maior pontuação no *SOFA* e com o aumento do lactato [66].

A quantificação da peroxidação lipídica foi feita através das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo o malondialdeído (MDA) a principal espécie reativa. Foram utilizadas soluções de dodecil sulfato de sódio (SDS) 8,1 %, tampão de ácido acético e ácido tio barbitúrico (TBA) 0,6 % e a amostra. Após pipetagem dos respectivos volumes em micro tubos, permaneceram em banho maria a 95°C por 1 hora. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g. Foram pipetados em uma microplaca de 96 poços preta: água ultrapura, amostra, SDS 8,1 %, tampão de ácido acético e TBA 0,6 %. A leitura foi realizada na multileitora de placas *Infinite M200* (TECAN, Suíça), por fluorescência, na excitação de 515 nm e na emissão de 553 nm [67].

#### 4.6.4.4 Glutathiona reduzida e oxidada

A glutathiona é um antioxidante endógeno, que está presente em todas as células e é altamente solúvel. Ela atua protegendo as células contra diversos danos, como por exemplo a peroxidação lipídica. Além de ser cofator para diversas enzimas, como é o caso da glutathiona peroxidase [46]. Na sepse possui importante participação na redução da hiporesponsividade vascular e na disfunção endotelial [64]. A relação entre glutathiona reduzida (GSH) e a glutathiona oxidada (GSSG) é uma avaliação do estresse oxidativo fundamental [46]. Pois quando a glutathiona é oxidada em GSSG deixa de ser ativa. Tornando a célula mais exposta a dano oxidativo, o que por sua vez aumenta a demanda pela síntese de novas moléculas de GSH [68].

Para o GSH foi preparada uma solução de 1:1 de amostra e de ácido tricloroacético (TCA) a 10 % em tubos 1,5 mL. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10.000 g, o sobrenadante foi pipetado em uma microplaca de 96 poços transparente: amostra + TCA 10%, solução salina de tris tamponada (TBS) a 1 M e o reagente de 5,5'-Dithiobis (DTNB) a 10 mM. A leitura foi realizada na multileitora de placas *Infinite M200* (TECAN, Suíça), com absorvância de 412 nm [69].

Para o GSSG, foi utilizada a mesma placa onde foi realizada a quantificação de GSH. Adicionado aos poços que continham amostras a glutathiona redutase (GSR) a 0,1 U por poço, em solução de NADPH a 2 mM. A placa foi incubada por 30 minutos

a 30°C e a leitura foi realizada na multileitora de placas *Infinite M200* (TECAN, Suíça), com absorvância de 412 nm [69].

#### 4.6.4.5 Atividade da xantina oxidase

A XOR é uma enzima que sintetiza espécies reativas de oxigênio, participando na conversão de proteínas em ácido úrico, converte o  $O_2^-$  em  $H_2O_2$  e faz a redução do  $NO_2^-$  em NO. É expressa em diversos tecidos frente situações em que a pressão de oxigênio é reduzida, como também quando há aumento na concentração de mediadores inflamatórios, como o  $TNF\alpha$ , IL-1 $\beta$  e INF $\gamma$  [70]. Para a avaliação da atividade da enzima XOR foi utilizado o kit *Invitrogen<sup>TM</sup>* (A22182) nos diferentes grupos, conforme instruções do fabricante Fischer scientific.

#### 4.6.4.6 Peróxido de hidrogênio

O peróxido de hidrogênio é um marcador de estresse oxidativo, podendo ser sintetizado pela SOD, pela XOR e pelas NADPH oxidases [46]. Para a avaliação do peróxido de hidrogênio foi utilizado o kit *Invitrogen<sup>TM</sup>* (A22188) nos diferentes grupos, conforme instruções do fabricante Fischer scientific.

#### 4.6.4.7 Nitrito

O nitrito é um metabólito e um biomarcador do NO, sendo uma forma importante de reserva de óxido nítrico nos vasos e nos tecidos. Quando o pH baixa ou ocorre hipóxia o  $NO_2^-$  é reduzido a NO, para que ocorra vasodilatação e a concentração de oxigênio local seja reestabelecida, possuindo ação citoprotetora [71]. Outra maneira indireta de quantificar o NO é através da concentração de  $NO_3^-$ , porém

como ele sofre influência da dieta (Figura 1), não é tão específico como o nitrito para avaliar o sistema cardiovascular [11], [18].

A quantificação do nitrito foi feita através do uso de 2,3-diaminofaleno (DAN). Foram pipetadas em uma microplaca de 96 poços preta: a amostra, solução de DAN a 158  $\mu\text{M}$  com HCl a 0,62 M e HCl a 1,5 M. A placa foi protegida da luz e incubada a 30 °C por 5 minutos. Após, foi pipetado na placa o nitrito de sódio a 3 M. A leitura é realizada na multileitora de placas *Infinite M200* (TECAN, Suíça), por fluorescência, com excitação de 365 nm e emissão de 410 nm [72].

#### 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi realizado o teste de normalidade de Shapiro-Wilk, para verificar se os dados possuíam distribuição normal. Caso os dados não possuísem distribuição normal eram transformados em Log 10, para normalizar a distribuição dos dados.

Nas avaliações de pressão arterial, como no caso da curva de dose resposta foi realizada a ANOVA de uma via com medidas repetidas e teste de post hoc de Dunnett, foi considerada como diferença significativa valores de  $P \leq 0,05$ .

No caso das análises de nitrosilação total, nitrosilação específica, dano tecidual e estresse oxidativo foi realizada a ANOVA de uma via com teste de post hoc de Dunnett, foi considerada como diferença significativa valores de  $P \leq 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados partindo das avaliações realizadas com os animais para as análises feitas com as amostras colhidas. Iniciaremos, portanto, pelas avaliações de pressão arterial, S-nitrosilação total, disfunção tecidual e por fim o estresse oxidativo.

### 5.1 PRESSÃO ARTERIAL

Os dados relacionados abaixo, foram obtidos através da avaliação dos parâmetros hemodinâmicos que constam no item 4.3.

Podemos verificar que os animais CLP apresentam pronunciada hiporresponsividade à noradrenalina quando comparados ao grupo controle (Figura 13A e B), característica dos animais em choque séptico. Ao verificar o grupo CLP + Tempol é possível perceber que a hiporresponsividade foi revertida na sua totalidade, resultando no aumento expressivo da pressão arterial sistólica, com valores superiores até mesmo quando comparado ao grupo controle (Figura 13A e C).

Quadro 2 –  $\Delta$  PAS durante a curva de dose-resposta

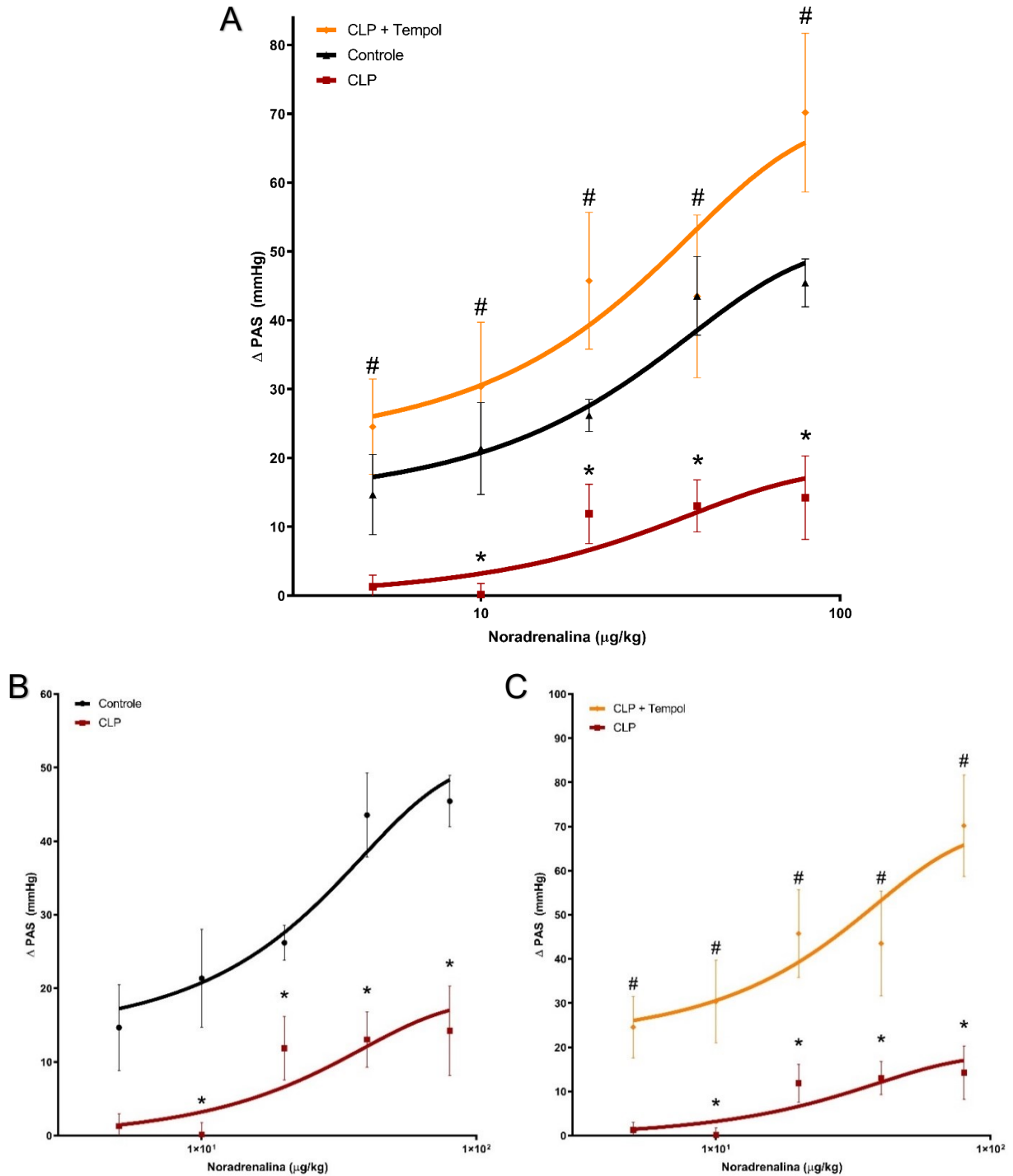
	Doses de Noradrenalina ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				
	5	10	20	40	80
<b>Controle</b>	15 $\pm$ 6	21 $\pm$ 7	26 $\pm$ 2	44 $\pm$ 6	45 $\pm$ 3
<b>CLP</b>	1 $\pm$ 2	0* $\pm$ 2	18* $\pm$ 4	18* $\pm$ 4	21* $\pm$ 7
<b>CLP + Tempol</b>	31# $\pm$ 7	40# $\pm$ 10	58# $\pm$ 10	55# $\pm$ 13	79# $\pm$ 8

Aumento da pressão arterial sistólica (mmHg) nos diferentes grupos, de acordo com a dose de noradrenalina. Os resultados com média  $\pm$  EPM, \* P  $\leq$  0,05 comparado ao controle e # P  $\leq$  0,05 comparado ao CLP. Fonte: Elaborada pela autora.

No Quadro 2 é possível visualizar os valores da variação na pressão arterial sistólica de acordo com as diferentes doses de noradrenalina utilizadas na curva de dose-resposta, evidenciando as diferenças na resposta pressórica quando comparados o grupo Controle, CLP e CLP + Tempol. O grupo CLP apresenta pequena

resposta pressórica nos primeiros pontos da curva e nos três últimos pontos ocorre resposta, porém com valores bem abaixo dos demais grupos.

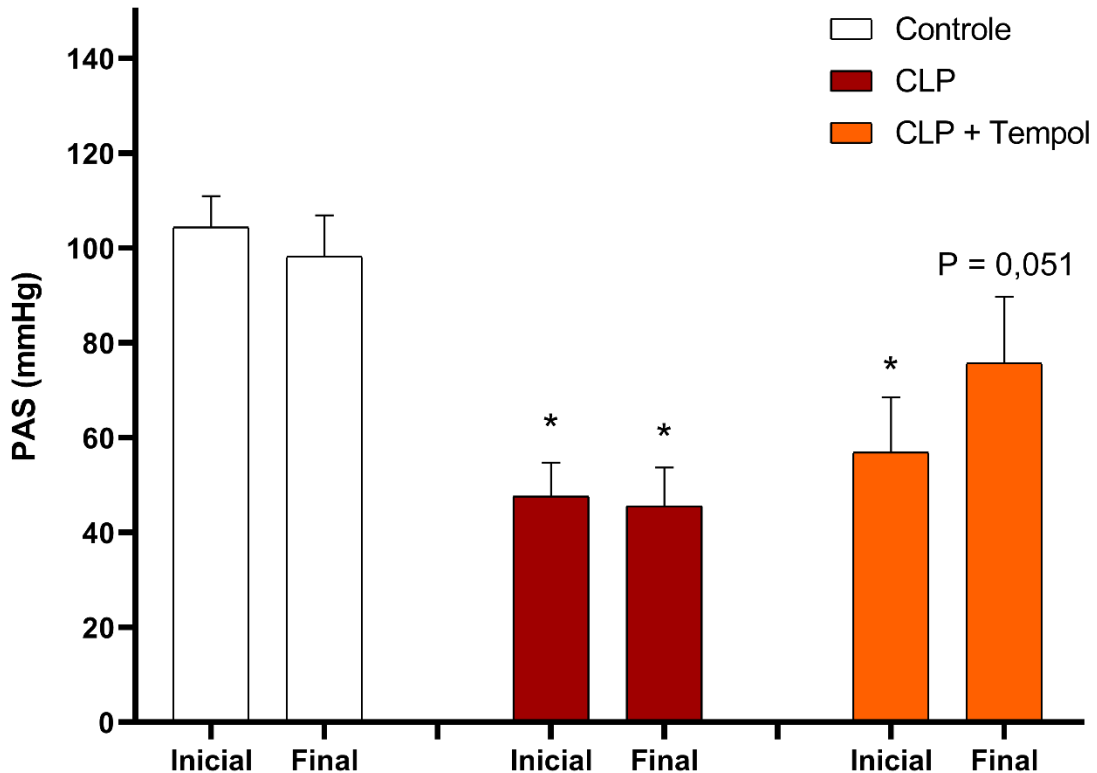
Figura 13 - Curva de dose-resposta de noradrenalina



A – Aumento na pressão arterial sistólica ( $\Delta$  PAS) à noradrenalina nas doses de 5; 10; 20; 40; 80 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ); B – Curva de dose-resposta a noradrenalina; C - Curva de dose-resposta a noradrenalina sépticos. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM). Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* Dunnett ( $n = 5 - 8$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle e #  $P \leq 0,05$  comparado ao CLP.

Os valores de pressão arterial sistólica basal (Figura 14) dos diferentes grupos avaliados, sendo possível perceber que nos grupos CLP Inicial, CLP Final e CLP + Tempol Inicial foram menores em relação ao Controle Inicial e Final.

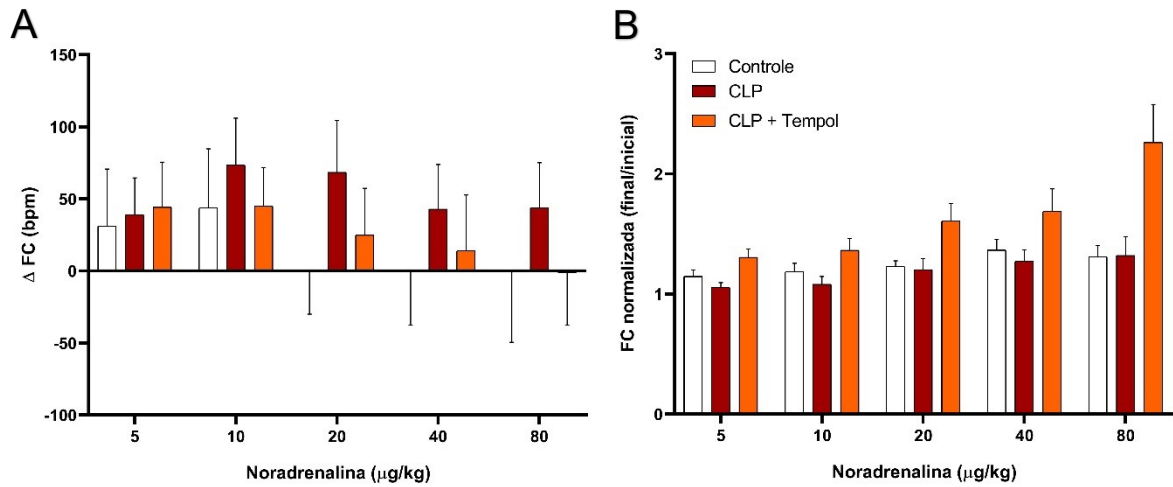
Figura 14 - Variação na pressão arterial sistólica basal



Pressão arterial sistólica inicial e duas horas após o tratamento. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* *Dunnett* (n = 5 - 8), \* P  $\leq$  0,05 comparado ao controle.

Existe uma tendência de que a frequência cardíaca seja superior nos animais dos grupos CLP e CLP + Tempol, quando comparados com o controle (Figura 15A e B).

Figura 15 - Variação na frequência cardíaca



Variação da frequência cardíaca após infusão de noradrenalina. A – Valores de variação na frequência cardíaca ( $\Delta$  FC); B – Valores relativos de variação na FC. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* *Dunnnett* ( $n = 6 - 8$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

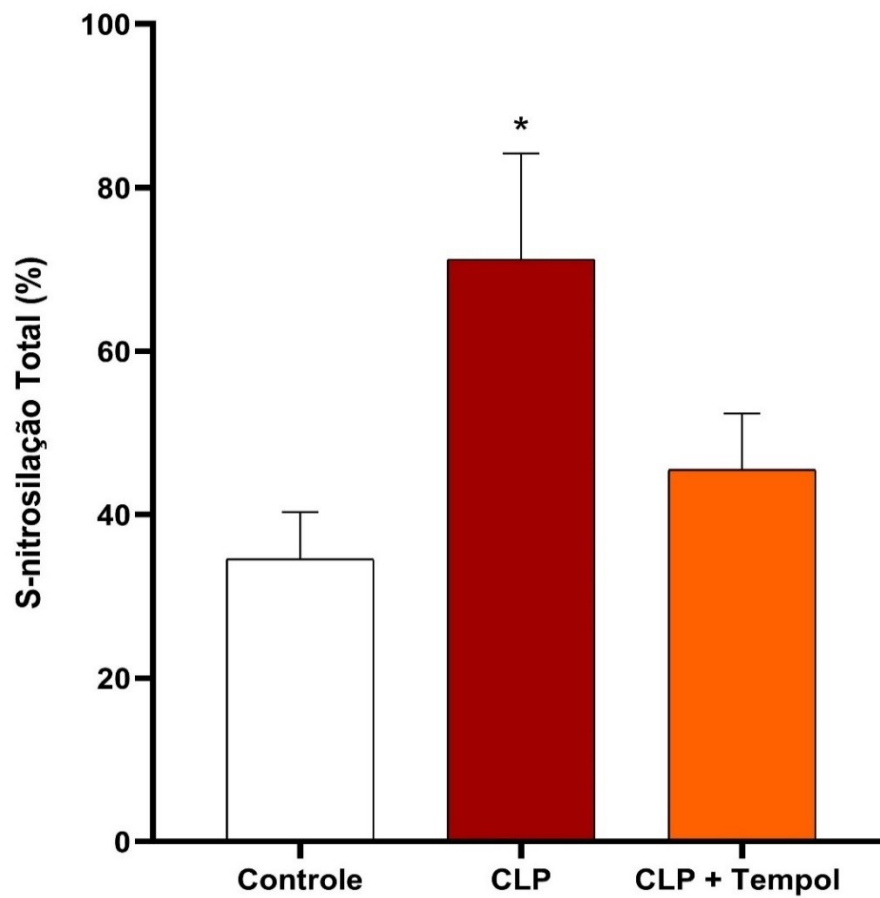
## 5.2 NITROSILAÇÃO TOTAL

Os dados de nitrosilação total foram quantificados através das metodologias citadas nos itens 4.6.1 e 4.6.1.1.



É possível perceber que a porcentagem de proteínas nitrosiladas na aorta (Figura 16) foi superior no grupo CLP, quando comparado com o grupo controle. O grupo CLP + Tempol não apresenta significativo aumento da nitrosilação proteica na aorta.

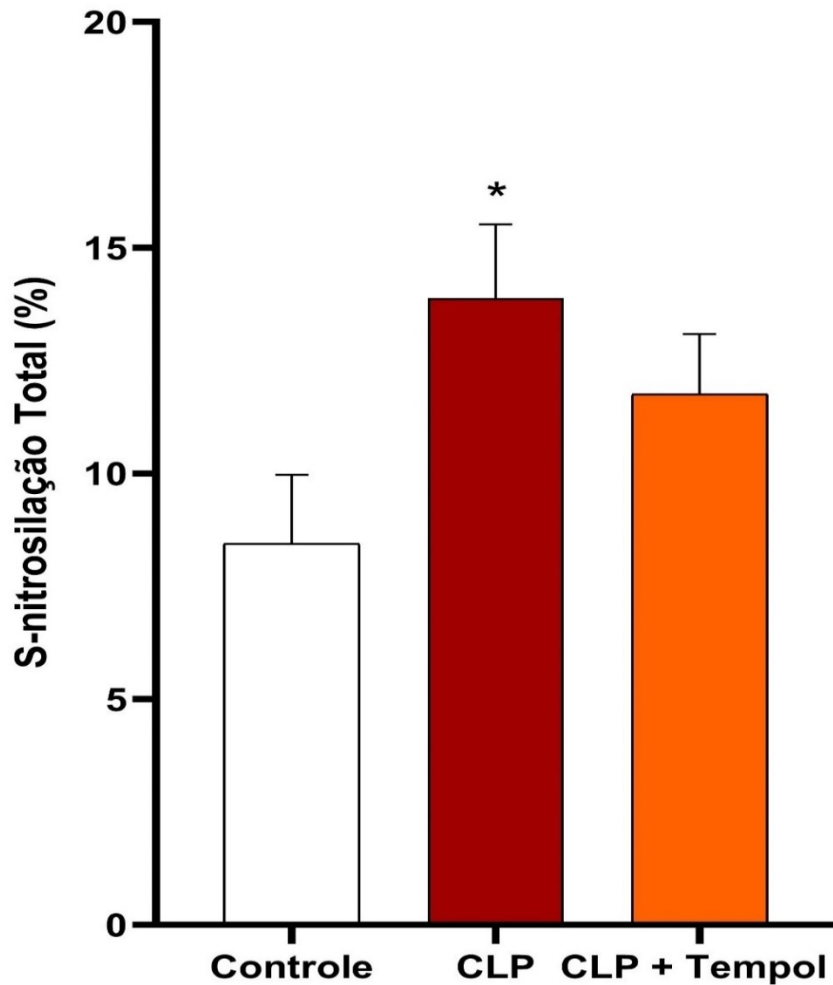
Figura 16 - Nitrosilação total na aorta



Nitrosilação total. ANOVA com teste de *post-hoc* Dunnett (n = 4 - 5). Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM, \* P  $\leq$  0,05 comparado ao controle.

A nitrosilação total cardíaca (Figura 17) foi superior no grupo CLP, quando comparado ao controle. O grupo CLP + Tempol não apresentou aumento ou redução significativa da nitrosilação quando comparado ao grupo controle ou CLP.

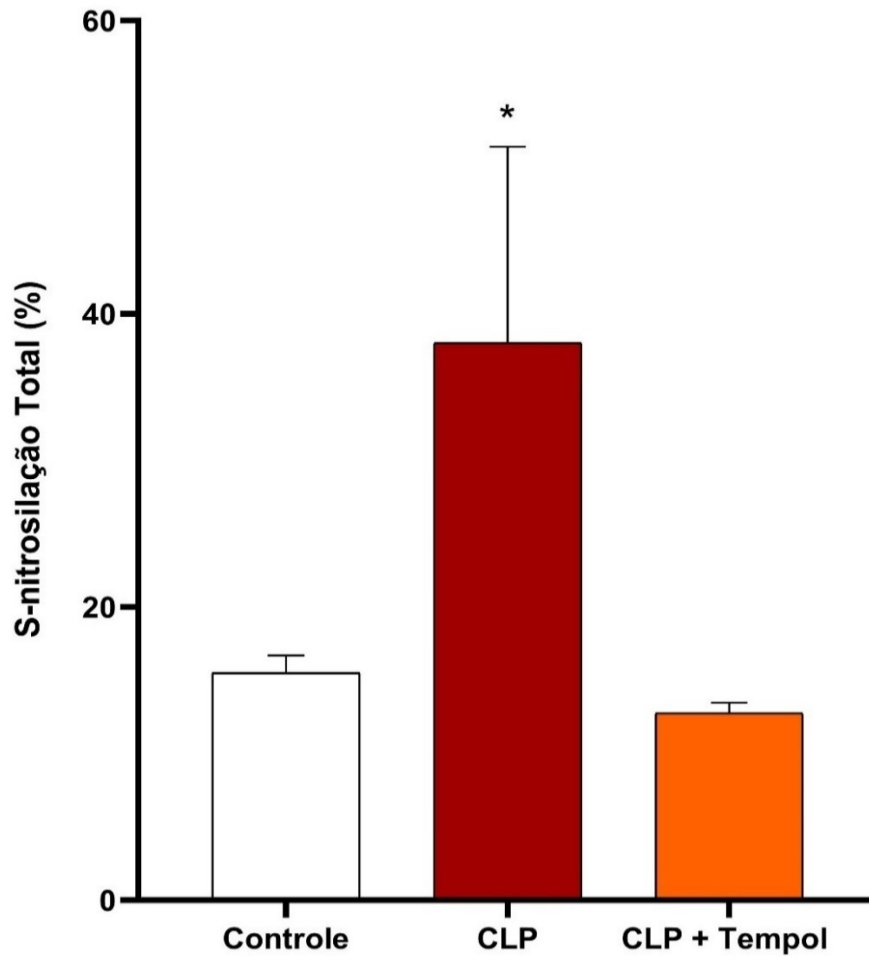
Figura 17 - Nitrosilação total no coração



Nitrosilação total. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* Dunnett ( $n = 4 - 5$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

A nitrosilação total no fígado (Figura 18) foi maior no grupo CLP, ao comparar com o controle. O grupo CLP + Tempol não apresenta significativo aumento da nitrosilação proteica no fígado. Sugerindo um efeito denitrosilante do tempol neste tecido.

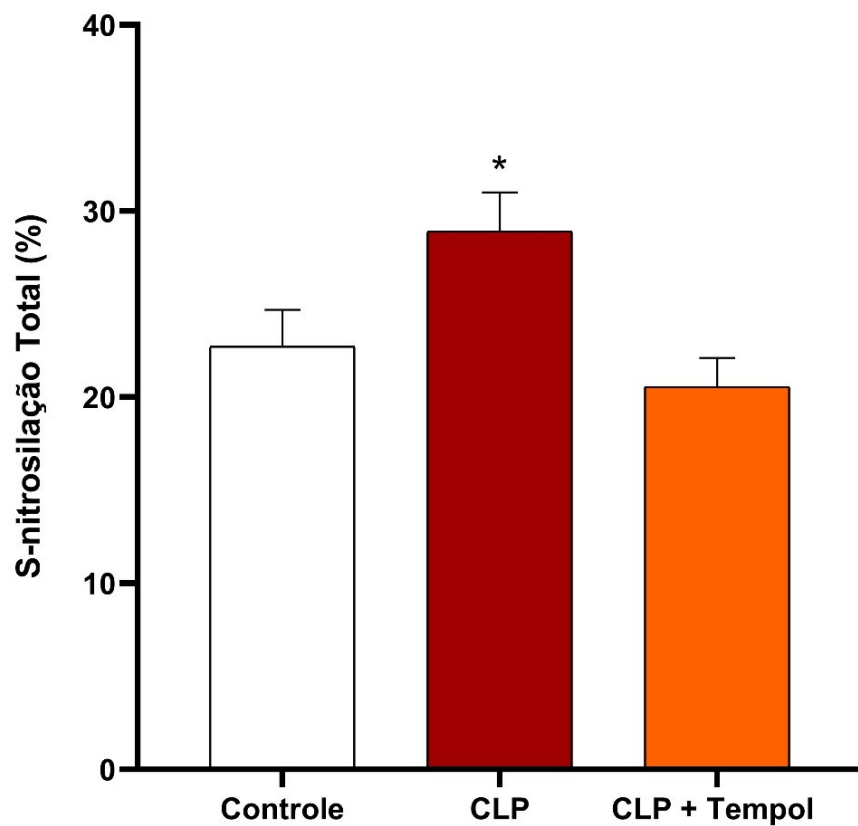
Figura 18 - Nitrosilação total no fígado



Nitrosilação total. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* *Dunnnett* ( $n = 5 - 8$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

Os eritrócitos (Figura 19) apresentaram a nitrosilação total do grupo CLP elevada em relação ao grupo controle. O grupo CLP + Tempol não apresentou aumento significativo da nitrosilação proteica nos eritrócitos. Sugerindo um efeito denitrosilante nestas células.

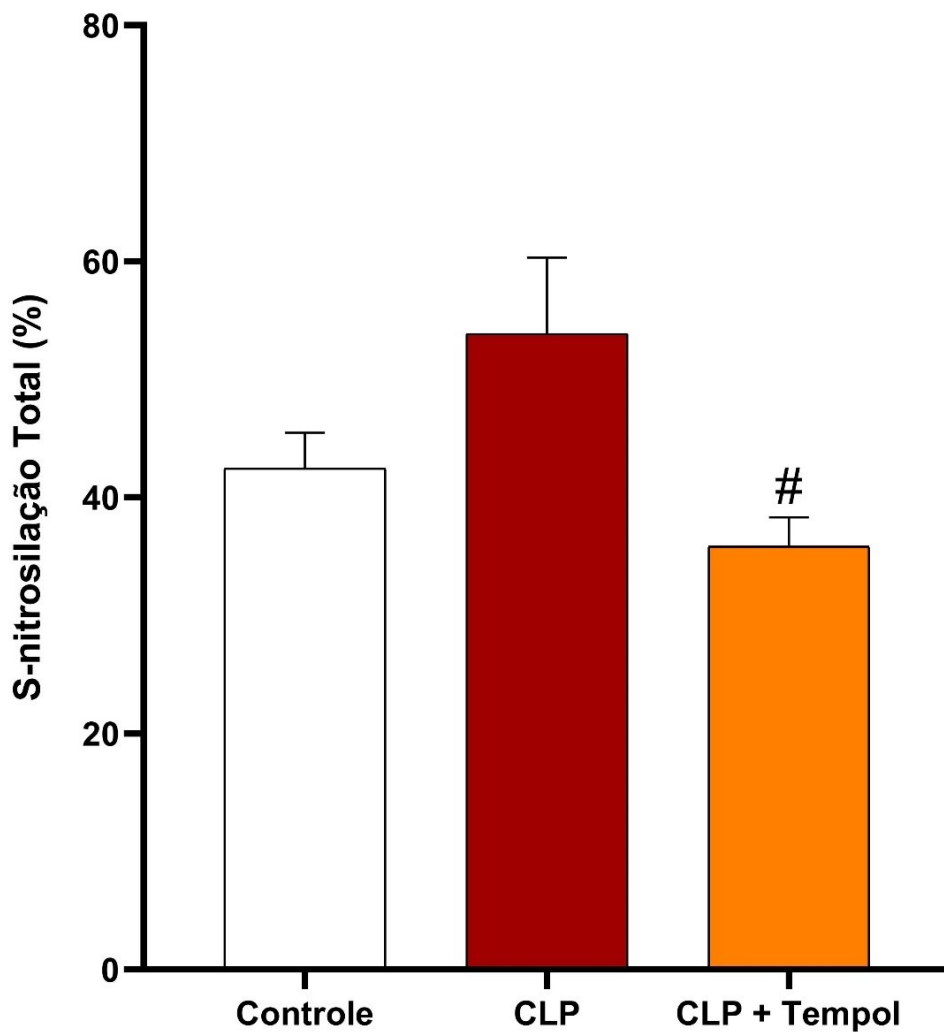
Figura 19 - Nitrosilação total em eritrócitos



Nitrosilação total. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* Dunnett ( $n = 8 - 12$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

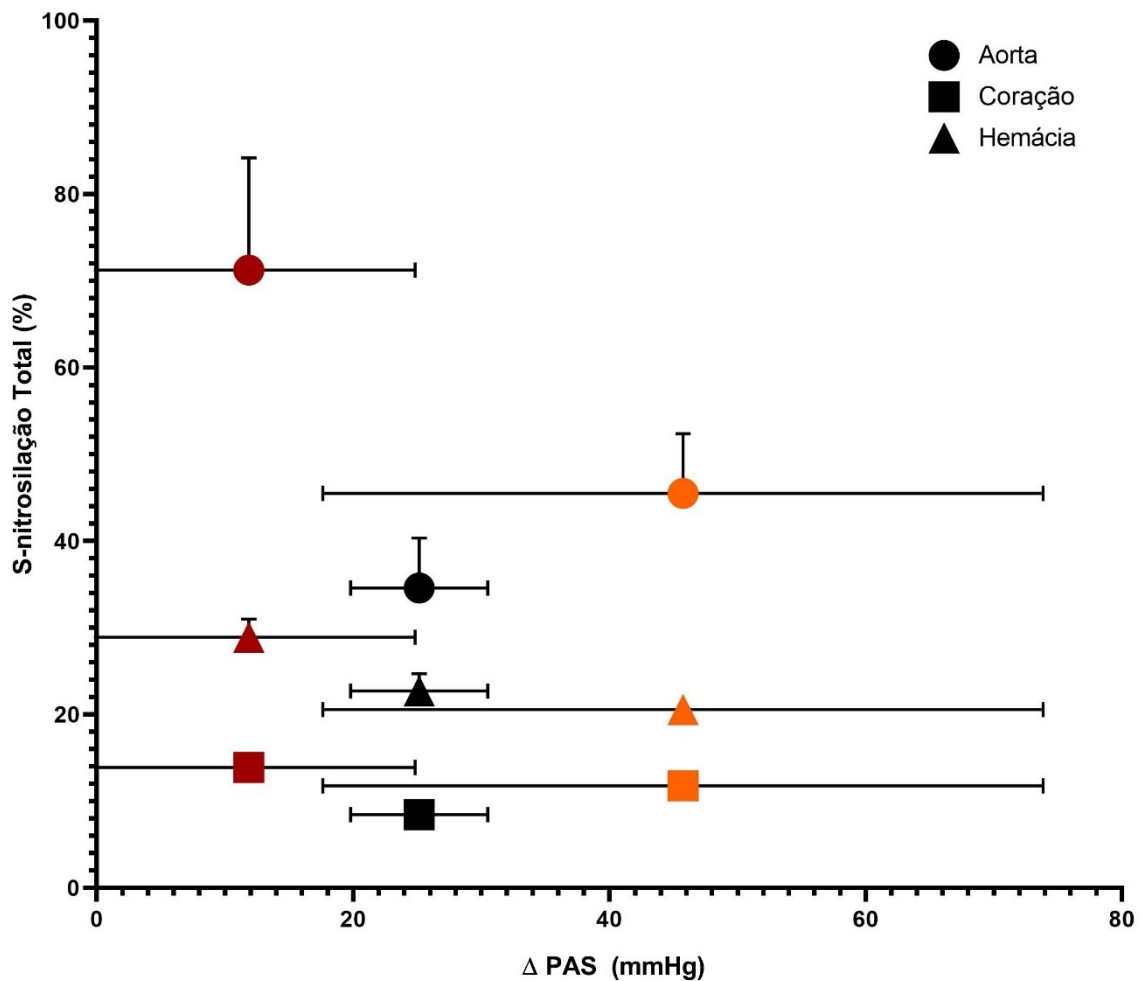
A nitrosilação em plasma (Figura 20) apresentou diferença significativa quando comparado o grupo CLP + Tempol com o grupo CLP, sendo a nitrosilação total menor no CLP + Tempol. Entretanto, não foi observado aumento significativo da nitrosilação no grupo CLP. Muito provavelmente devido à grande variabilidade na nitrosilação neste grupo.

Figura 20 - Nitrosilação total em plasma



Nitrosilação total. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* *Dunnett* ( $n = 8 - 10$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

Figura 21 - Comparativo entre nitrosilação total e  $\Delta$  PAS de acordo com o tecido na dose de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  NE



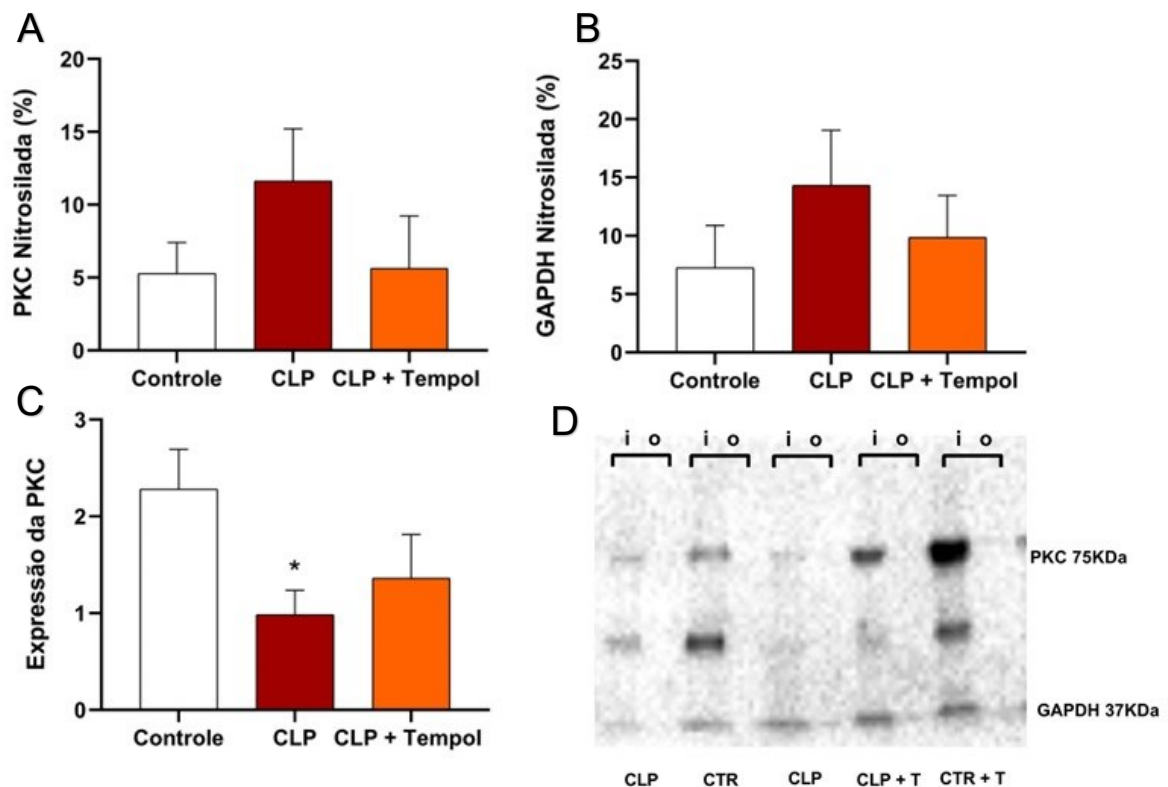
Comparativo de nitrosilação total (%) e  $\Delta$  PAS (mmHg) nos diferentes tecidos: aorta (círculo), coração (quadrado) e eritrócitos (triângulo). Em preto estão os animais controle, em vermelho os CLP e em laranja os CLP + Tempol (n = 5 – 10).

Na Figura 21 foi feito um comparativo entre a porcentagem das nitrosilações totais dos tecidos: aorta, coração e eritrócitos. Comparando com o valor da pressão arterial sistólica que cada grupo alcançou ao utilizar a dose de 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de noradrenalina. É possível perceber que em ordem decrescente o tecido que houve maior nitrosilação foram as aortas, posteriormente as hemácias e por fim o coração. O grupo CLP, foi o que apresentou menor aumento da PAS, seguido do grupo Controle e do grupo CLP + Tempol, sendo o que teve um maior aumento na PAS.

### 5.2.1 Nitrosilação de proteínas de interesse no choque séptico

As proteínas nitrosiladas foram quantificadas conforme descrição no item 4.6.2.

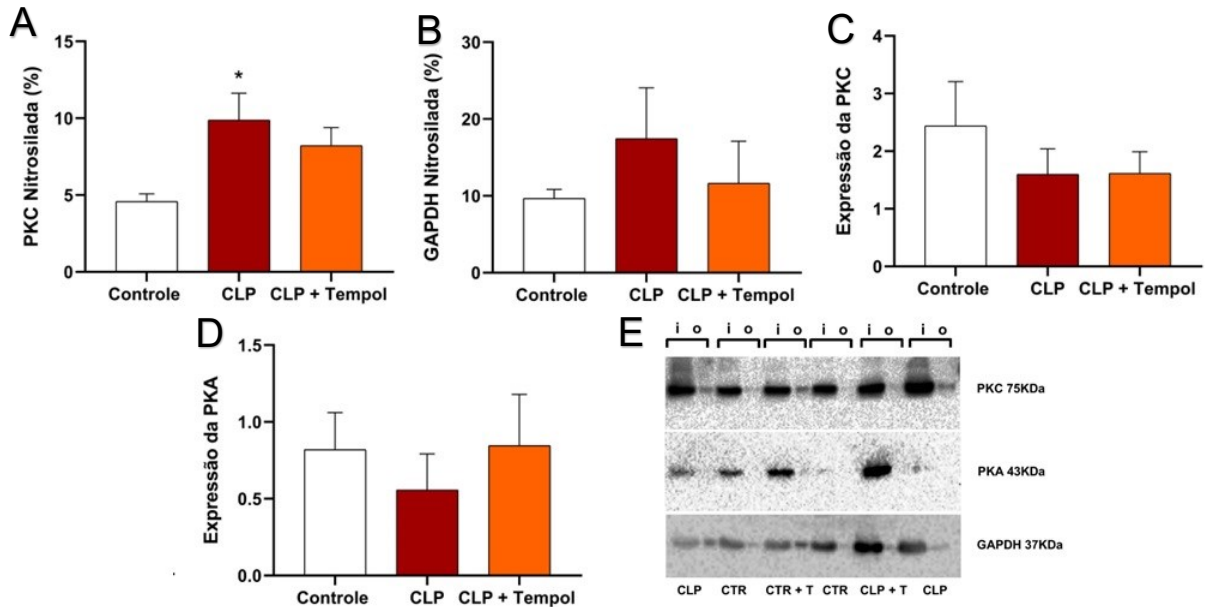
Figura 22 - Nitrosilação de PKC, GAPDH e Expressão de PKC na aorta



A – PKC nitrosilada; B – GAPDH nitrosilada; C – Expressão de PKC; D – Imagem representativa das membranas de porcentagem de nitrosilação de PKC e GAPDH. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* *Dunnnett* ( $n = 4$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

A nitrosilação de PKC (Figura 22A) e GAPDH (Figura 22B) na aorta não apresentaram diferença significativa entre os grupos. No entanto, é evidente a tendência de aumento na nitrosilação de PKC e GAPDH no grupo CLP e a reversão no grupo CLP + Tempol. Não demonstrando significância estatística, provavelmente devido ao reduzido 'n' deste experimento. A expressão da PKC (Figura 22C) foi menor no grupo CLP em relação ao controle.

Figura 23 - Nitrosilação de PKC, GAPDH e Expressão de PKC e PKA no coração

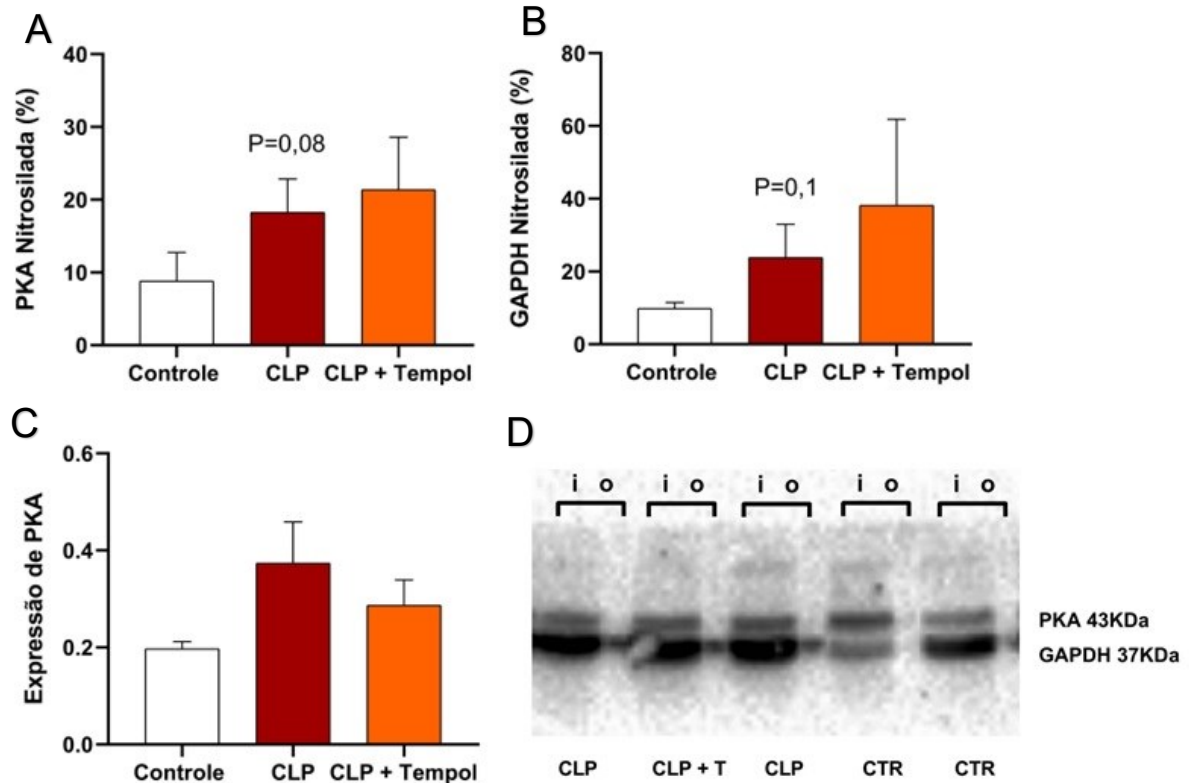


A – PKC nitrosilada; B – GAPDH nitrosilada; C – Expressão de PKC; D – Expressão de PKA; E – Imagem representativa das membranas de porcentagem de nitrosilação de PKC, PKA e GAPDH. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* Dunnett (n = 4 - 5), \* P  $\leq$  0,05 comparado ao controle.

No coração a PKC (Figura 23A) apresentou maior nitrosilação no grupo CLP, quando comparado com o controle. A nitrosilação da GAPDH não teve diferença estatística entre os grupos (Figura 23B). Apesar de apresentar uma tendência de aumento no grupo CLP, não foi significativo estatisticamente, provavelmente devido ao reduzido número de réplicas. A expressão da PKC (Figura 23C) e da PKA (Figura 23D) não apresentaram diferença significativa entre os grupos.



Figura 24 - Nitrosilação de PKA, GAPDH e Expressão de PKA no fígado



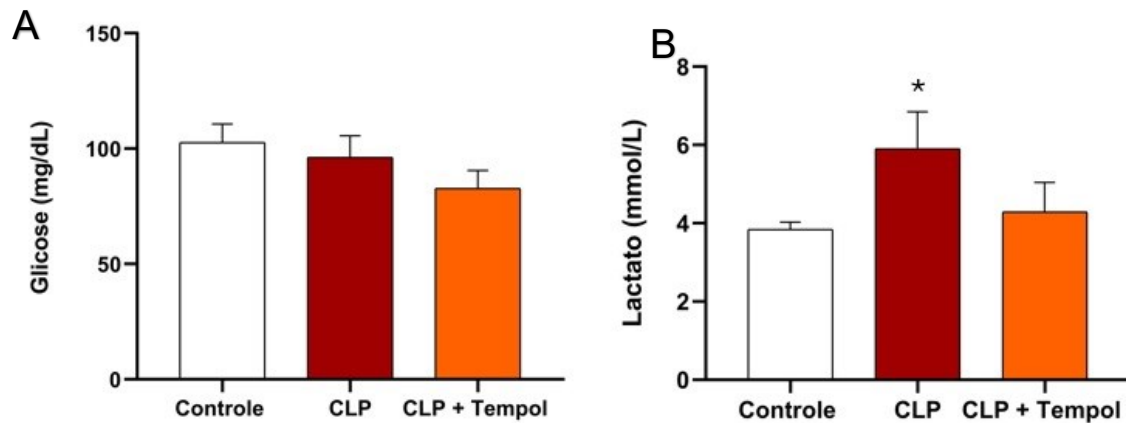
A – PKA nitrosilada; B – GAPDH nitrosilada; C – Expressão de PKA; D - Imagem representativa das membranas de porcentagem de nitrosilação de PKA e GAPDH. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* Dunnett ( $n = 4 - 5$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

A nitrosilação da PKA (Figura 24A) e da GAPDH (Figura 24B) no fígado apresentaram tendência de aumento no grupo CLP, sem qualquer efeito do tratamento com tempol. No entanto, vale destacar que não foram observadas diferenças significativas entre os grupos, como também foi o caso da expressão da PKA (Figura 24C).

### 5.3 DISFUNÇÃO TECIDUAL

As avaliações realizadas foram as dosagens de glicose e de lactato no plasma dos diferentes grupos, conforme o item 4.6.3. Os resultados obtidos foram:

Figura 25 - Dosagem de glicose e lactato plasmático



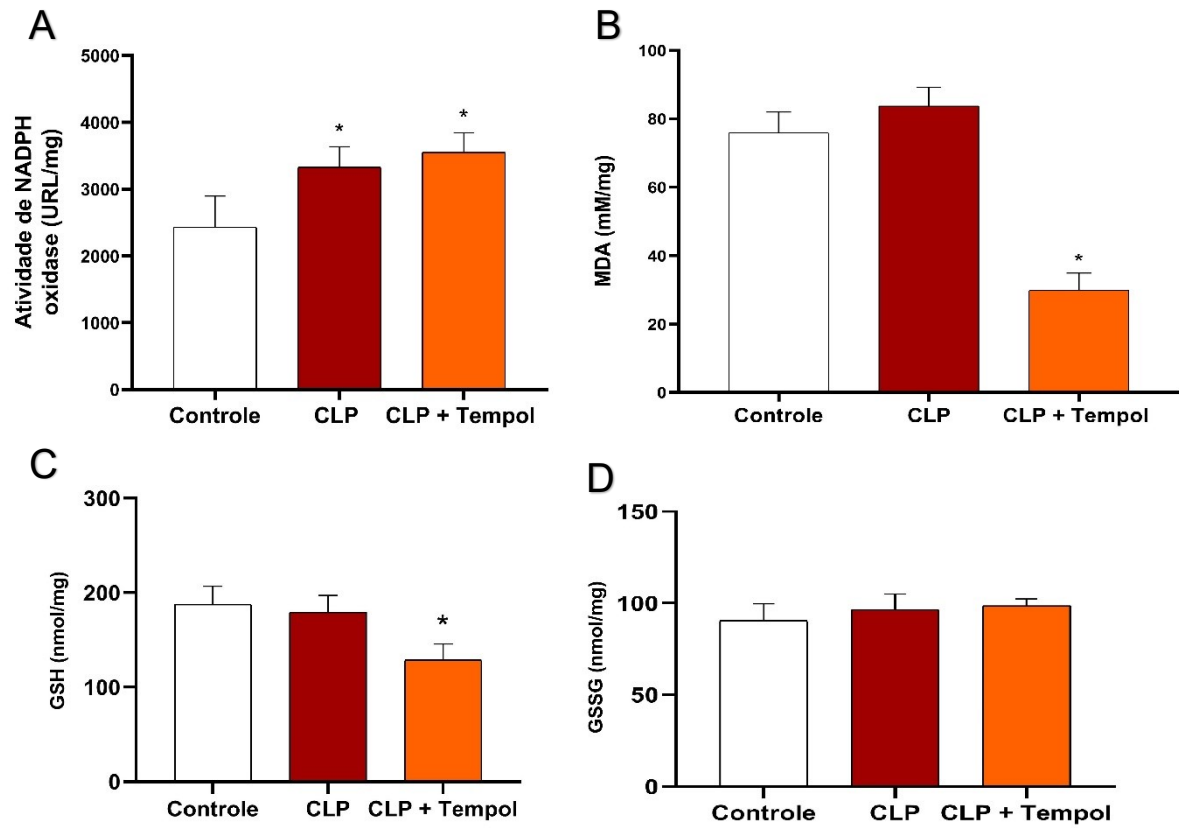
A - Dosagem de glicose; B - Dosagem de lactato. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* Dunnett ( $n = 5 - 10$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

Na dosagem plasmática de glicose (Figura 25A) não foi encontrada diferença significativa entre os grupos Controle, CLP e CLP + Tempol. Já na dosagem de lactato (Figura 25B) o grupo CLP apresentou maior concentração da lactato.

#### 5.4 ESTRESSE OXIDATIVO

As diferentes análises realizadas para verificar o status redox estão descritas detalhadamente no item 4.6.4. Os resultados obtidos foram:

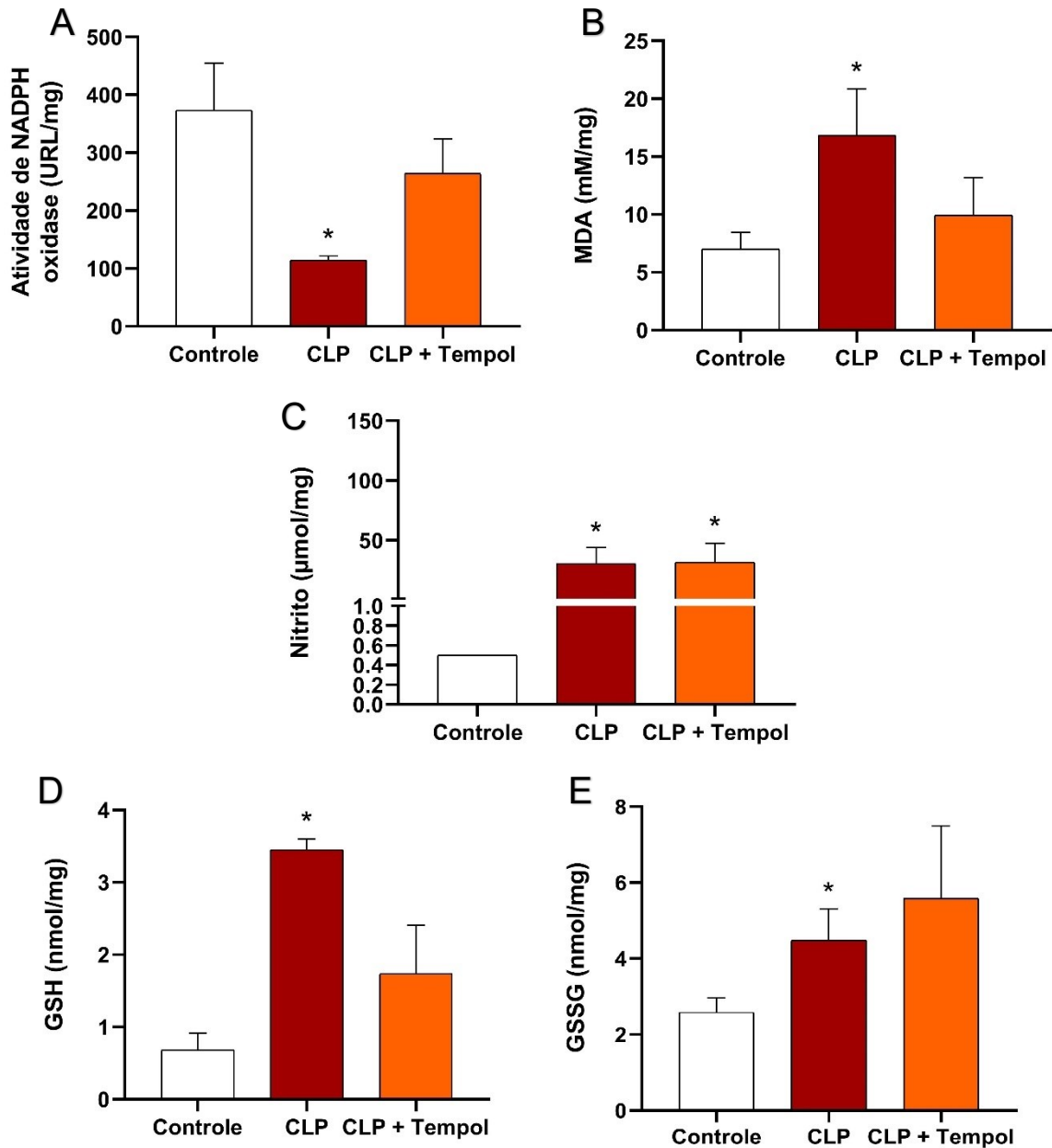
Figura 26 - Avaliações de estresse oxidativo do coração



A – Atividade das enzimas NADPH oxidases; B – Dosagem de MDA; C – Glutaciona reduzida; D – Glutaciona oxidada. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* *Dunnnett* ( $n = 10 - 15$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

No coração a atividade das enzimas NADPH oxidases (Figura 26A), foi aumentada nos grupos CLP e CLP + Tempol, quando comparados ao Controle. Na quantificação do MDA cardíaco (Figura 26B) é possível perceber que o dano celular foi reduzido no grupo CLP + Tempol, a níveis abaixo dos encontrados no grupo Controle. A glutaciona reduzida (Figura 26C) apresentou redução no grupo CLP + Tempol, em comparação com o grupo Controle, já a glutaciona oxidada (Figura 26D) não sofreu alteração significativa nos diferentes grupos.

Figura 27 - Avaliações de estresse oxidativo do fígado

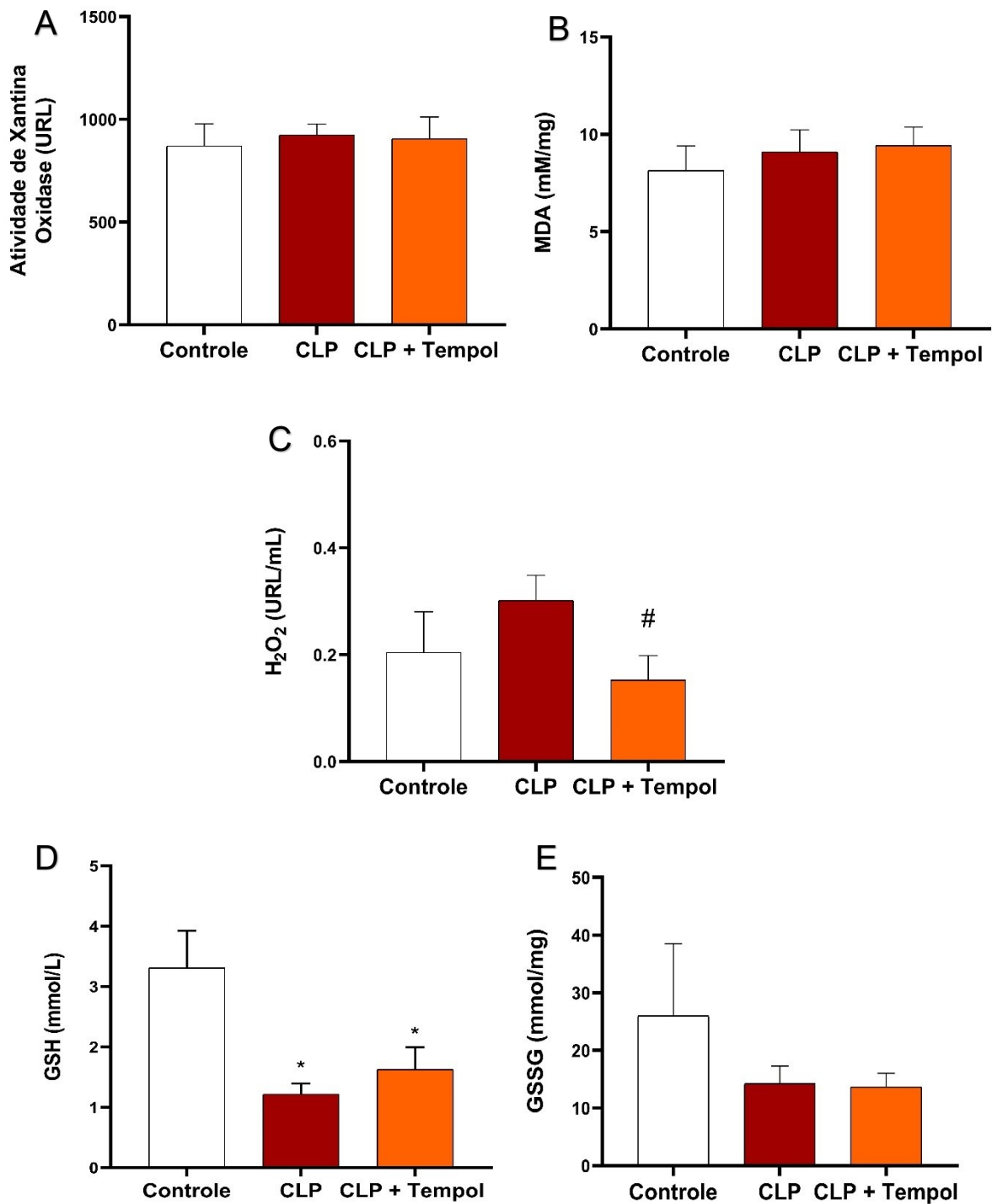


A – Atividade das enzimas NADPH oxidases; B – Dosagem de MDA; C – Dosagem de nitrito; D – Dosagem de GSH; E – Glutaciona oxidada. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* Dunnett ( $n = 2 - 6$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle.

No fígado, a atividade das enzimas NADPH oxidases (Figura 27A) foi menor no grupo CLP, podendo estar associada a uma questão temporal relacionada ao momento em que a análise foi realizada. O MDA (Figura 27B) teve maior concentração no grupo CLP, quando comparado com o controle. Ao avaliar o nitrito (Figura 27C) algumas amostras que estavam abaixo do limite de detecção da técnica ( $0,50 \mu\text{mol}$ ), então foram representadas graficamente com o menor valor de detecção. Ao

comparar o grupo CLP e o CLP + Tempol com o controle, ambos os grupos tiveram maiores concentrações de nitrito. A quantificação da glutaciona reduzida (Figura 27D) e oxidada (Figura 27E) foram superiores no grupo CLP, em relação ao controle.

Figura 28 - Avaliações de estresse oxidativo dos eritrócitos



A – Atividade da enzima xantina oxidase; B – Dosagem de MDA; C – Dosagem de peróxido de hidrogênio; D – Dosagem de GSH; E – Glutaciona oxidada. Os resultados estão apresentados com média  $\pm$  EPM. Foi utilizada a ANOVA com teste de *post-hoc* *Dunnnett* ( $n = 4 - 7$ ), \*  $P \leq 0,05$  comparado ao controle e #  $P \leq 0,05$  comparado ao CLP.

Nos eritrócitos a atividade da enzima XOR (Figura 28A) não teve diferença significativa entre os grupos. Em relação ao dano celular (Figura 28B), não houve diferença significativa entre os grupos na dosagem de MDA. Ao verificar a quantidade de peróxido de hidrogênio (Figura 28C) o grupo CLP + Tempol apresentou menor concentração em relação ao grupo CLP. Ao comparar as concentrações de glutathione (Figura 28D) houve uma redução nos grupos CLP e CLP + Tempol, quando comparados com o Controle, indicando um consumo maior deste antioxidante endógeno durante a sepse. Na glutathione oxidada (Figura 28E), não houve diferença significativa entre os grupos.

## 6 DISCUSSÃO

Os principais achados desta dissertação foram:

- a. A pressão arterial sistólica foi menor nos animais em choque séptico não tratados, quando comparados com os Controles;
- b. O grupo tratado com tempol apresentou reversão na hiporresponsividade vascular frente ao desafio da curva de dose-resposta à noradrenalina. Apresentando valores de elevação da pressão arterial sistólica expressivos, acima até mesmo do grupo Controle;
- c. O grupo tratado apresentou tendência no aumento da frequência cardíaca dos animais, porém sem diferença significativa diante dos demais grupos;
- d. A nitrosilação total foi superior no grupo não tratado (CLP), quando comparado ao Controle, em todos tecidos avaliados (aorta, coração, fígado e eritrócitos). No plasma, a nitrosilação total foi inferior no grupo tratado com tempol, quando comparado com o grupo não tratado;
- e. A expressão de PKC no grupo não tratado foi inferior ao grupo Controle, na aorta;
- f. A porcentagem de PKC nitrosilada no grupo não tratado foi superior ao grupo Controle, no coração;
- g. Os animais não tratados apresentaram maior concentração plasmática de lactato, quando comparados com os animais Controle;
- h. No coração: a síntese de ROS pela enzima NADPH oxidase foi aumentada nos animais em choque séptico, o tempol reduziu o dano celular no grupo tratado, como também a concentração de glutathiona neste mesmo grupo;
- i. No fígado: a síntese de ROS pela enzima NADPH oxidase foi reduzida no grupo não tratado, este mesmo grupo apresentou aumento no dano celular, aumento na concentração de GSH e GSSG, quando comparados com o Controle. A concentração de nitrito foi maior nos animais em choque séptico;

- j. Nos eritrócitos: os grupos com choque séptico apresentaram menor concentração de glutathiona, quando comparados com o Controle. O tempol foi capaz de reduzir a concentração de peróxido de hidrogênio, quando comparado o grupo tratado com o não tratado;
- k. O tempol demonstrou possuir efeito denitrosilante.

Ao longo dos anos o tempol foi testado em modelos animais no tratamento da hipertensão, reduzindo significativamente a pressão arterial [73], [74], [75], [76]. Inicialmente era utilizado por ser um mimético da enzima superóxido dismutase (SOD) [76], considerada importante componente na defesa antioxidante do organismo [77]. A SOD realiza a dismutação do  $O_2^-$ , em uma molécula de  $O_2$  e outra de peróxido de hidrogênio  $H_2O_2$ . O  $O_2^-$  é uma molécula altamente reativa, quando em excesso pode gerar danos em diferentes tecidos, sendo de grande importância a modulação realizada pela SOD no organismo [77]. Na hipertensão há grande quantidade de ROS, como é o caso do  $O_2^-$ , por este motivo a utilização de um mimético da SOD ser uma opção na abordagem terapêutica de modelos animais [50].

Conforme as pesquisas foram avançando, foi constatado que durante a hipertensão a biodisponibilidade do NO é menor. Esse processo impede que o NO aja na musculatura lisa endotelial, reduzindo a vasodilatação, que resulta em um aumento na pressão arterial [78]. Em um estudo foram utilizados ratos espontaneamente hipertensos (SHR) que receberam infusão de tempol, estes animais apresentaram diminuição de 32% na pressão arterial média. Quando foi associada a utilização de L-NAME, um inibidor das óxido nítrico sintases, a ação sobre a pressão do tempol foi reduzida. Indicando, portanto, que o tempol além de possuir ação sobre o superóxido aumenta também a biodisponibilidade de óxido nítrico [74].

Durante a sepse ocorre intensa produção de ROS, dentre elas o  $O_2^-$  e o NO possuem papel fundamental [79]. Foi então que o tempol começou a ser utilizado em modelos experimentais sépticos. O tempol possui características farmacológicas importantes quando comparado com a utilização da enzima SOD. Ele possui baixo peso molecular, é permeável a membranas biológicas podendo agir nos meios extra e intracelulares, é estável e mimetiza a ação da SOD [79]. Além disso, possui diversas vias de utilização: tópica, oral, subcutânea, intraperitoneal e intravenosa [50].

Neste trabalho foi utilizado o tempol por existirem indícios prévios do efeito denitrosilante desta droga. Conjuntamente, este trabalho visou entender melhor o



efeito da nitrosilação sobre a responsividade pressórica à noradrenalina em animais acordados, e as interações deste processo com as proteínas nitrosiladas. Existem alguns trabalhos com a utilização de agentes antioxidantes, como é o caso do ascorbato, durante a sepse. Em que obtiveram resultados promissores, com a redução do dano tecidual e endotelial, a restauração da microcirculação e a melhora na resposta cardiovascular [80].

No entanto, alguns destes antioxidantes utilizados previamente, como o ascorbato e o ácido lipoico, exibem capacidade denitrosilante. Porém, nenhum trabalho avaliou o efeito denitrosilante destes compostos na sepse, bem como suas implicações. O único trabalho com denitrosilante na sepse foi o que utilizou o DTNB [44], como não se tem a pretensão da utilização do DTNB na clínica, é necessário expandir os conhecimentos sobre drogas e compostos com potencial denitrosilante.

Conforme os dados encontrados na avaliação da pressão (Quadro 2) os animais CLP apresentaram pronunciada hipotensão e baixa responsividade a noradrenalina, como acontece durante o choque séptico [81]. Evidenciando uma das grandes problemáticas no tratamento da sepse, a dificuldade em elevar a pressão, o que gera danos em diferentes órgãos [81]. Na Figura 14 verificamos os valores absolutos de pressão arterial dos diferentes grupos, onde fica evidente que os animais CLP e CLP + Tempol apresentam PAS inferior aos animais Controle. É interessante observar que o tratamento com tempol tende, por si só, a aumentar a pressão arterial dos animais em choque séptico [82]. Os valores de pressão arterial sistólica basal (Figura 14) dos diferentes grupos avaliados, sendo possível perceber que nos grupos CLP Inicial, CLP Final e CLP + Tempol Inicial foram menores em relação ao Controle Inicial e Final.

Durante a curva de dose-resposta à noradrenalina os animais tratados com tempol apresentaram aumentos significativos na pressão arterial sistólica (Quadro 2), com valores acima do apresentado pelo grupo Controle. Indicando que além da hiporresponsividade vascular ter sido revertida, os animais responderam ao estímulo do vasopressor de maneira expressiva.

É possível perceber que a porcentagem de proteínas nitrosiladas na aorta (Figura 16) foi superior no grupo CLP, quando comparado com o grupo Controle. Corroborando com o que já é conhecido, durante a sepse ocorre intensa síntese de NO, o que resulta na nitrosilação de proteínas em diferentes órgãos [21]. Podendo também, estar relacionada com a ocorrência da hiporresponsividade vascular. Além

disso, evidenciando a relação entre o aumento no grau de nitrosilação e a diminuição da PAS, como também um efeito denitrosilante do tempol [27].

Conjuntamente, quando comparamos a nitrosilação total na aorta (Figura 16), no coração (Figura 17) e no fígado (Figura 18) A nitrosilação total no fígado (Figura 18) foi maior no grupo CLP, ao comparar com o controle. O grupo CLP + Tempol não apresenta significativo aumento da nitrosilação proteica no fígado. Sugerindo um efeito denitrosilante do tempol neste tecido.

Figura 18 Nos eritrócitos (Figura 19) a nitrosilação total do grupo CLP foi maior que do grupo Controle. Em todos os tecidos do grupo tratado com tempol, foi observada redução da nitrosilação proteica, quando comparado ao grupo Controle. Inclusive no plasma (Figura 20) o tempol foi capaz de reduzir o grau de nitrosilação, ao comparar com o grupo CLP, apesar deste não estar aumentando significativamente em relação ao Controle.

Na Figura 21 ao se relacionar o grau de nitrosilação dos diferentes tecidos com o  $\Delta$  PAS na dose de 20  $\mu$ g/kg de noradrenalina verificamos um comportamento similar nos diferentes tecidos do mesmo grupo. Embora haja diferenças no grau de nitrosilação entre os tecidos de um mesmo grupo, o aumento na pressão arterial sistólica pareceu uniforme. Além disso, podemos perceber que as aortas são mais nitrosiladas, após os eritrócitos e o tecido com menor nitrosilação foi o coração. Além disso evidencia o que havíamos visto nos outros gráficos de pressão, que o grupo CLP + Tempol tem um aumento maior na pressão, seguido do grupo Controle e com o menor aumento de pressão o grupo CLP. Retratando o potencial do tempol em restaurar a pressão arterial em modelos de sepse [50].

Ao quantificar a nitrosilação de proteínas específicas verificamos que a nitrosilação total dos tecidos tende a se refletir na nitrosilação de proteínas específicas. A PKC, proteína fundamental para a sinalização de vasoconstrição pela ativação do receptor  $\alpha$ 1-adrenérgico, teve significativo aumento de nitrosilação no coração e na aorta foi observada tendência de aumento. É importante destacar que a nitrosilação da PKC resulta na inibição desta enzima [34].

Por outro lado, o tratamento com tempol levou a redução na expressão da PKC, na aorta. Logo, podemos sugerir que o tratamento com tempol melhora a resposta vasoconstritora à noradrenalina devido a diminuição da nitrosilação tecidual,

tanto observada de forma total como de proteínas específicas, intimamente relacionadas ao controle da pressão arterial. Também corrobora os dados de tendência observados no aumento da nitrosilação de GAPDH nos tecidos avaliados, seguido uma possível redução no grupo tempol. Infelizmente devido ao número de replicantes reduzido, não observamos diferença significativa nestes grupos.

No que tange a expressão da PKC na aorta (Figura 22C) do grupo CLP está reduzida e no coração (Figura 23A) a nitrosilação da PKC foi maior no grupo CLP, quando comparados com o controle. Podemos relacionar a diminuição na expressão da PKC e o aumento no grau de nitrosilação desta mesma proteína em diferentes órgãos com a capacidade de resposta à noradrenalina diminuída. Conforme o que já foi relatado em aorta de camundongo, quando aumenta o nível de nitrosilação a PKC não responde ao estímulo do agonista, mesmo utilizado um ativador de PKC [34]. Além disso, a redução na expressão da PKC na aorta poderia estar relacionada também a redução na resposta à noradrenalina, sendo uma das limitações do trabalho.

Embora durante na sepse sejam esperadas alterações nos níveis séricos de glicose (Figura 25A) nas nossas amostras não foi possível identificar diferença significativa entre os grupos. Já o lactato (Figura 25B) [5], [60] no grupo CLP, estava aumentando, corroborando o que ocorre durante a sepse. Como a análise do lactato e da glicose foram feitas em somente um momento, em aproximadamente 12 h após a CLP, essa é uma limitação destas análises.

Nas avaliações de estresse oxidativo as enzimas NADPH oxidases foram avaliadas. Como elas são responsáveis por sintetizar as ROS, que possuem grande participação na sepse [45], espera-se que nos animais CLP [83] e CLP + Tempol a atividade da NADPH oxidase esteja aumentada, como foi o caso do coração (Figura 26A). Por outro lado, no fígado (Figura 27A) o grupo CLP apresentou atividade das NADPH oxidases reduzidas quando comparado com o controle. Como a amostra foi colhida em apenas um momento, pode ser que essa diminuição na atividade da NADPH oxidase hepática esteja relacionada a uma questão temporal.

No coração (Figura 26B) quantificação de malondialdeído o grupo CLP + Tempol apresentou redução na quantidade de MDA em relação ao Controle, o tempol foi capaz de reduzir o dano celular nesse órgão. No fígado (Figura 27B), teve aumento no grupo CLP indicando que houve maior dano celular neste tecido, conforme é relatado que ocorre durante a sepse [66].

Ao comparar a GSH (Figura 26C) e a GSSG (Figura 26D) cardíaca, verificamos que somente no GSH houve diferença significativa do grupo CLP + Tempol quando comparado com o Controle. Com uma redução na concentração de glutathiona, isto pode ser explicado devido ao tempol ser um nitróxido cíclico, podendo reagir com o grupo tiol presente na glutathiona promovendo a sua oxidação [84]. A partir desta hipótese seria esperado que a glutathiona oxidada (Figura 26D) também estivesse aumentada no grupo CLP + Tempol, porém nossos dados não apresentaram diferença significativa entre os grupos na GSSG cardíaca.

No fígado a GSH (Figura 27D) e a GSSG (Figura 27E) apresentaram em ambas o aumento na concentração nos grupos CLP. Na sepse o aumento das ROS, endotoxemia e dos mediadores inflamatórios aumentam a demanda de glutathiona, aumentando a concentração local de GSH e de GSSG [85]. Ao avaliar nos eritrócitos somente a GSH (Figura 28D) apresentou diferença significativa nos grupos CLP e CLP + Tempol, com a redução na concentração de glutathiona em relação ao Controle. Evidenciando uma capacidade menor de resposta dos eritrócitos a uma queda na concentração de GSH [86].

Quando quantificamos o nitrito no tecido hepático (Figura 27C), constatamos que os grupos CLP e CLP + Tempol apresentaram maiores concentrações de nitrito em relação ao Controle. O aumento do nitrito durante a sepse já foi descrito em outros estudos, uma vez que a patogênese da sepse cursa com intensa participação do NO [7].

Na atividade da enzima xantina oxidase (Figura 28A) realizada nos eritrócitos não foi encontrada diferença significativa entre os grupos, já na concentração de  $H_2O_2$  (Figura 28C) houve redução no grupo CLP + Tempol. Durante a sepse é esperado que as espécies reativas de oxigênio aumentem, como o  $H_2O_2$  é uma ROS, seria esperado um aumento [85]. Mas como não houve aumento da atividade da enzima XOR, não houve um aumento na produção de  $O_2^-$  e por consequência, não houve maior concentração de  $H_2O_2$  nos eritrócitos.

## 7 CONCLUSÃO

Com este trabalho foi possível obter dados que comprovem a ação do tempol na melhora da pressão arterial sistólica de animais sépticos, revertendo por completo a hiporresponsividade vascular restaurando a resposta hipertensiva da noradrenalina na PAS, resultando em valores de pressão acima dos encontrados para os animais controle. Verificamos também que a S-nitrosilação total está aumentada em animais sépticos e é relevante, pois aparentemente se relaciona com a resposta pressórica. O tratamento com tempol foi capaz de reduzir a nitrosilação, indicando que abordagens com agentes denitrosilantes podem ser benéficas, pelo menos no aspecto pressórico.

Ainda é necessária a realização de ensaios que possam elucidar o mecanismo de ação do tempol na melhora da pressão arterial durante a sepse e avaliar o mecanismo do seu efeito denitrosilante de proteínas. Já é um consenso que o tempol seja um antioxidante cíclico e mimetize a ação da SOD [50], porém ele pode possuir outras formas de ação, que associadas resultem na melhora da pressão arterial durante o choque.

Na avaliação da S-nitrosilação de proteínas de interesse durante a sepse foi verificada uma tendência nos diferentes tecidos de que o grupo CLP tenha uma porcentagem maior de nitrosilação de proteínas, enquanto o tempol tende a diminuir essa nitrosilação, porém não foram todas as análises que foram observadas diferenças estatisticamente significativas. Além disso, existe uma tendência de que a PKA e a PKC tenham sua expressão reduzida nos grupos CLP. Seria interessante associar as expressões dessas proteínas com as suas atividades, para avaliar o efeito da S-nitrosilação sobre a atividade proteica.

O trabalho possui ainda várias limitações. Para melhor entendimento destes processos é necessário aumentar o número de replicatas das análises de biologia molecular realizadas, em especial da nitrosilação proteica total e específica. Além disso, seria interessante realizar análises dos animais tratados com o tempol em diferentes protocolos, como ao avaliar os efeitos em fêmeas, ao avaliar a sobrevivência dos animais, como também os efeitos do tratamento no pós-sepse.

## REFERÊNCIAS

- [1] R. S. Hotchkiss, L. L. Moldawer, S. M. Opal, K. Reinhart, I. R. Turnbull, e J. L. Vincent, “Sepsis and septic shock”, 30 de junho de 2016, *Nature Publishing Group*. doi: 10.1038/nrdp.2016.45.
- [2] G. M. Nardi, K. Scheschowitsch, D. Ammar, S. K. De Oliveira, T. B. Arruda, e J. Assreuy, “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*, vol. 42, nº 6, 2014, doi: 10.1097/CCM.0000000000000301.
- [3] C. Fleischmann *et al.*, “Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis current estimates and limitations”, *Am J Respir Crit Care Med*, vol. 193, nº 3, p. 259–272, fev. 2016, doi: 10.1164/rccm.201504-0781OC.
- [4] A. M. C. Sogayar *et al.*, “A Multicentre, Prospective Study to Evaluate Costs of Septic Patients in Brazilian Intensive Care Units”, 2008.
- [5] M. Singer *et al.*, “The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)”, 23 de fevereiro de 2016, *American Medical Association*. doi: 10.1001/jama.2016.0287.
- [6] S. Medica e P. Alegre, “Sepse: uma visão atual Sepsis: current aspects”. Acessado: 5 de maio de 2024. [Online]. Disponível em: <https://revistaseletronicas.pucrs.br/index.php/scientiamedica/article/view/4716>
- [7] R. G. Knowles e S. Moncada, “Nitric oxide synthases in mammals”, *Biochemical Journal*, vol. 298, nº 2, p. 249–258, mar. 1994, doi: 10.1042/bj2980249.
- [8] C. Staerck *et al.*, “Microbial antioxidant defense enzymes”, 1º de setembro de 2017, *Academic Press*. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.015.
- [9] M. A. Cinelli, H. T. Do, G. P. Miley, e R. B. Silverman, “Inducible nitric oxide synthase: Regulation, structure, and inhibition”, 1º de janeiro de 2020, *John Wiley and Sons Inc*. doi: 10.1002/med.21599.
- [10] U. Förstermann e W. C. Sessa, “Nitric oxide synthases: Regulation and function”, abril de 2012. doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- [11] E. Goshi, G. Zhou, e Q. He, “Nitric oxide detection methods in vitro and in vivo”, 1º de dezembro de 2019, *Wolters Kluwer Medknow Publications*. doi: 10.4103/2045-9912.273957.

- [12] W. K. Alderton, C. E. Cooper, e R. G. Knowles, “Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition”, 2001.
- [13] D. Tousoulis, A.-M. Kampoli, C. Tentolouris, N. Papageorgiou, e C. Stefanadis, “The Role of Nitric Oxide on Endothelial Function”, 2012.
- [14] M. Rosselli, P. J. Keller, e R. K. Dubey, “Role of nitric oxide in the biology, physiology and pathophysiology of reproduction”, 1998.
- [15] E. Gkaliagkousi e A. Ferro, “Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function 2. Introduction-vascular biology of nitric oxide 2.1, The NOS family 2.1.1. Structure and function of NOS3 2.1.2. NOS3 activation 2.1.3. Regulation of NOS3 activity 3. Cardiovascular effects of NO 3.1. Vasodilator properties of NO 3.2”, 2011.
- [16] M. Chello, P. Mastroroberto, A. R. Marchese, G. Maltese, E. Santangelo, e B. Amantea, “Nitric Oxide Inhibits Neutrophil Adhesion during Experimental Extracorporeal Circulation”, *Anesthesiology*, vol. 89, n° 2, p. 443–448, ago. 1998, doi: 10.1097/00000542-199808000-00021.
- [17] A. Dyson *et al.*, “An integrated approach to assessing nitroso-redox balance in systemic inflammation”, *Free Radic Biol Med*, vol. 51, n° 6, p. 1137–1145, set. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.012.
- [18] S. Blot, “Antiseptic mouthwash, the nitrate–nitrite–nitric oxide pathway, and hospital mortality: a hypothesis generating review”, 1° de janeiro de 2021, *Springer Science and Business Media Deutschland GmbH*. doi: 10.1007/s00134-020-06276-z.
- [19] R. A. Robbins e M. B. Grisham, “Nitric oxide”, *Int J Biochem Cell Biol*, vol. 29, n° 6, p. 857–860, jun. 1997, doi: 10.1016/S1357-2725(96)00167-7.
- [20] A. Dyson *et al.*, “An integrated approach to assessing nitroso-redox balance in systemic inflammation”, *Free Radic Biol Med*, vol. 51, n° 6, p. 1137–1145, set. 2011, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.06.012.
- [21] R. J. Webber, R. M. Sweet, e D. S. Webber, “Inducible Nitric Oxide Synthase in Circulating Microvesicles: Discovery, Evolution, and Evidence as a Novel Biomarker and the Probable Causative Agent for Sepsis”, *J Appl Lab Med*, vol. 3, n° 4, p. 698–711, jan. 2019, doi: 10.1373/jalm.2018.026377.
- [22] H. Li, A. Samouilov, X. Liu, e J. L. Zweier, “Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrate reduction: Evaluation of its role

- in nitrite and nitric oxide generation in anoxic tissues”, *Biochemistry*, vol. 42, n° 4, p. 1150–1159, fev. 2003, doi: 10.1021/bi026385a.
- [23] N. Hogg, “Biological chemistry and clinical potential of S-nitrosothiols”, *Free Radic Biol Med*, vol. 28, n° 10, p. 1478–1486, maio 2000, doi: 10.1016/S0891-5849(00)00248-3.
- [24] K. A. Broniowska e N. Hogg, “The chemical biology of S-nitrosothiols”, 1º de outubro de 2012. doi: 10.1089/ars.2012.4590.
- [25] M. W. Foster, T. J. McMahon, e J. S. Stamler, “S-nitrosylation in health and disease”, 1º de abril de 2003, *Elsevier Ltd*. doi: 10.1016/S1471-4914(03)00028-5.
- [26] J. L. Alencar *et al.*, “Role of S-Nitrosation of Cysteine Residues in Long-Lasting Inhibitory Effect of Nitric Oxide on Arterial Tone”, *Mol Pharmacol*, vol. 63, n° 5, p. 1148–1158, maio 2003, doi: 10.1124/mol.63.5.1148.
- [27] E. Nozik-Grayck *et al.*, “S-nitrosoglutathione inhibits 1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery”, *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 290, p. 136–143, 2006, doi: 10.1152/ajplung.00230.2005.-Endogenous.
- [28] F. Beigi *et al.*, “Dynamic denitrosylation via S-nitrosoglutathione reductase regulates cardiovascular function”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 109, n° 11, p. 4314–4319, mar. 2012, doi: 10.1073/pnas.1113319109.
- [29] L. Liu *et al.*, “Essential Roles of S-Nitrosothiols in Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock”, *Cell*, vol. 116, n° 4, p. 617–628, fev. 2004, doi: 10.1016/S0092-8674(04)00131-X.
- [30] P. Y. Sips *et al.*, “Reduction of cardiomyocyte S-nitrosylation by S-nitrosoglutathione reductase protects against sepsis -induced myocardial depression”, *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, vol. 304, n° 8, p. H1134–H1146, abr. 2013, doi: 10.1152/ajpheart.00887.2012.
- [31] L. C. Pinheiro *et al.*, “Oral nitrite treatment increases S-nitrosylation of vascular protein kinase C and attenuates the responses to angiotensin II”, *Redox Biol*, vol. 38, jan. 2021, doi: 10.1016/j.redox.2020.101769.
- [32] K. Ozawa *et al.*, “S-Nitrosylation of  $\beta$ -Arrestin Regulates  $\beta$ -Adrenergic Receptor Trafficking”, *Mol Cell*, vol. 31, n° 3, p. 395–405, ago. 2008, doi: 10.1016/j.molcel.2008.05.024.



- [33] M. A. Ruslan, K. A. Baharuddin, N. M. Noor, M. B. Yazid, A. Y. M. Noh, e A. Rahman, "Norepinephrine in septic shock: A systematic review and meta-analysis", 1º de março de 2021, *eScholarship*. doi: 10.5811/WESTJEM.2020.10.47825.
- [34] H. Choi, R. C. Tostes, e R. C. Webb, "S-nitrosylation Inhibits Protein Kinase C-mediated Contraction in Mouse Aorta". [Online]. Disponível em: [www.jcvp.org](http://www.jcvp.org)
- [35] C. de Lucia, A. Eguchi, e W. J. Koch, "New insights in cardiac  $\beta$ -Adrenergic signaling during heart failure and aging", 10 de agosto de 2018, *Frontiers Media S.A.* doi: 10.3389/fphar.2018.00904.
- [36] M. A. Tayeh e M. A. Marletta, "Macrophage Oxidation of L-Arginine to Nitric Oxide, Nitrite, and Nitrate", *Journal of Biological Chemistry*, vol. 264, nº 33, p. 19654–19658, nov. 1989, doi: 10.1016/S0021-9258(19)47163-9.
- [37] R. A. Khalil, "Protein kinase C inhibitors as modulators of vascular function and their application in vascular disease", 21 de março de 2013, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ph6030407.
- [38] F. Adeola, "Normalization of Gene Expression by Quantitative RT-PCR in Human Cell Line: comparison of 12 Endogenous Reference Genes", *Ethiop J Health Sci*, vol. 28, nº 6, p. 741–748, nov. 2018, doi: 10.4314/ejhs.v28i6.9.
- [39] C. Nicholls, H. Li, e J. P. Liu, "GAPDH: A common enzyme with uncommon functions", agosto de 2012. doi: 10.1111/j.1440-1681.2011.05599.x.
- [40] E. V. Schmalhausen, M. V. Medvedeva, M. V. Serebryakova, V. V. Chagovets, e V. I. Muronetz, "Products of S-nitrosylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Relation between S-nitrosylation and oxidation", *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, vol. 1866, nº 1, jan. 2022, doi: 10.1016/j.bbagen.2021.130032.
- [41] A. A. Fowler *et al.*, "Phase I safety trial of intravenous ascorbic acid in patients with severe sepsis", *J Transl Med*, vol. 12, nº 1, jan. 2014, doi: 10.1186/1479-5876-12-32.
- [42] H. M. Oudemans-van Straaten, A. M. E. Spoelstra-de Man, e M. C. de Waard, "Vitamin C revisited", 6 de agosto de 2014, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1186/s13054-014-0460-x.
- [43] M. Zabet, M. Mohammadi, M. Ramezani, e H. Khalili, "Effect of high-dose Ascorbic acid on vasopressor's requirement in septic shock", *J Res Pharm Pract*, vol. 5, nº 2, p. 94, 2016, doi: 10.4103/2279-042x.179569.

- [44] P. O. Benedet, A. C. O. Menegatti, M. C. Gonçalves, H. Terenzi, e J. Assreuy, “The therapeutic value of protein (de)nitrosylation in experimental septic shock”, *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, vol. 1864, nº 1, p. 307–316, jan. 2018, doi: 10.1016/j.bbadis.2017.10.029.
- [45] K. Bedard e K.-H. Krause, “The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology”, 2007, doi: 10.1152/physrev.00044.2005.-For.
- [46] E. Birben, U. M. Sahiner, C. Sackesen, S. Erzurum, e O. Kalayci, “Oxidative stress and antioxidant defense”, 2012, *BioMed Central Ltd*. doi: 10.1097/WOX.0b013e3182439613.
- [47] H. Sies e D. P. Jones, “Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents”, 1º de julho de 2020, *Nature Research*. doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.
- [48] U. Simonsen, F. H. Christensen, e N. H. Buus, “The effect of tempol on endothelium-dependent vasodilatation and blood pressure”, maio de 2009. doi: 10.1016/j.pharmthera.2009.02.002.
- [49] S. Cuzzocrea, D. P. Riley, A. P. Caputi, e D. Salvemini, “Antioxidant therapy: a new pharmacological approach in shock, inflammation, and ischemia/reperfusion injury.”, *Pharmacol Rev*, vol. 53, nº 1, p. 135–59, mar. 2001, [Online]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11171943>
- [50] C. S. Wilcox, “Effects of tempol and redox-cycling nitroxides in models of oxidative stress.”, *Pharmacol Ther*, vol. 126, nº 2, p. 119–45, maio 2010, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.01.003.
- [51] C. F. Benjamim, S. H. Ferreira, e F. D. Q. Cunha, “Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis”, 2000. [Online]. Disponível em: <https://academic.oup.com/jid/article/182/1/214/878051>
- [52] UNIFESP e CEUA, “Guia anestesia e analgesia em animais de laboratório”, 2020. Acessado: 12 de maio de 2023. [Online]. Disponível em: [https://ceua.unifesp.br/images/documentos/CEUA/Guia\\_Anestesia\\_Analgesia\\_CEUA\\_UNIFESP\\_14072020\\_Final.pdf](https://ceua.unifesp.br/images/documentos/CEUA/Guia_Anestesia_Analgesia_CEUA_UNIFESP_14072020_Final.pdf)
- [53] D. I. Seabra, E. Pompeu, M. Luiza, e G. Valenti, “ANESTESIA E ANALGESIA DE ANIMAIS UTILIZADOS EM PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS”. [Online]. Disponível em: [www.bioterio.fm.usp.br](http://www.bioterio.fm.usp.br)

- [54] R. Karnina, S. K. Arif, M. Hatta, e A. Bukhari, “Molecular mechanisms of lidocaine”, 1º de setembro de 2021, *Elsevier Ltd.* doi: 10.1016/j.amsu.2021.102733.
- [55] D. D. Rees, J. E. Monkhouse, D. Cambridge, e S. Moncada, “Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse”, *Br J Pharmacol*, vol. 124, nº 3, p. 540–546, 1998, doi: 10.1038/sj.bjp.0701815.
- [56] L. C. Pinheiro, M. F. Montenegro, J. H. Amaral, G. C. Ferreira, A. M. Oliveira, e J. E. Tanus-Santos, “Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats”, *Free Radic Biol Med*, vol. 53, nº 4, p. 701–709, ago. 2012, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.06.001.
- [57] C. Figueiredo-Freitas *et al.*, “S-Nitrosylation of Sarcomeric Proteins Depresses Myofilament Ca<sup>2+</sup> Sensitivity in Intact Cardiomyocytes”, *Antioxid Redox Signal*, vol. 23, nº 13, p. 1017–1034, nov. 2015, doi: 10.1089/ars.2015.6275.
- [58] L. C. Pinheiro *et al.*, “Oral nitrite circumvents antiseptic mouthwash-induced disruption of enterosalivary circuit of nitrate and promotes nitrosation and blood pressure lowering effect”, *Free Radic Biol Med*, vol. 101, p. 226–235, dez. 2016, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.10.013.
- [59] L. M. Yung *et al.*, “Inhibition of renin-angiotensin system reverses endothelial dysfunction and oxidative stress in estrogen deficient rats”, *PLoS One*, vol. 6, nº 3, 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0017437.
- [60] M. M. Sulzbacher *et al.*, “Adapted Murine Sepsis Score: Improving the Research in Experimental Sepsis Mouse Model”, *Biomed Res Int*, vol. 2022, p. 1–9, jan. 2022, doi: 10.1155/2022/5700853.
- [61] E. Rizzi *et al.*, “Nitrite treatment downregulates vascular MMP-2 activity and inhibits vascular remodeling in hypertension independently of its antihypertensive effects”, *Free Radic Biol Med*, vol. 130, p. 234–243, jan. 2019, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.11.002.
- [62] A. Vermot, I. Petit-Härtlein, S. M. E. Smith, e F. Fieschi, “Nadph oxidases (Nox): An overview from discovery, molecular mechanisms to physiology and pathology”, *Antioxidants*, vol. 10, nº 6, jun. 2021, doi: 10.3390/antiox10060890.
- [63] M. Janiszewski, A. O. Do Carmo, M. A. Pedro, E. Silva, E. Knobel, e F. R. M. Laurindo, “Platelet-derived exosomes of septic individuals possess proapoptotic NAD(P)H oxidase activity: A novel vascular redox pathway”, *Crit Care Med*, vol. 32, nº 3, p. 818–825, mar. 2004, doi: 10.1097/01.CCM.0000114829.17746.19.

- [64] D. Salvemini e S. Cuzzocrea, “Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation”, *Free Radic Biol Med*, vol. 33, nº 9, p. 1173–1185, nov. 2002, doi: 10.1016/S0891-5849(02)00961-9.
- [65] M. Janiszewski, H. P. Souza, † Xiaoping Liu, M. A. Pedro, J. L. Zweier, e F. R. M. Laurindo, “Overestimation of NADH-driven vascular oxidase activity due to lucigenin artifacts”, 2002.
- [66] R. Muniz-Santos *et al.*, “Lipid oxidation dysregulation: an emerging player in the pathophysiology of sepsis”, *Front Immunol*, vol. 14, ago. 2023, doi: 10.3389/fimmu.2023.1224335.
- [67] M. F. Montenegro, L. R. Pessa, V. A. Gomes, Z. Desta, D. A. Flockhart, e J. E. Tanus-Santos, “Assessment of vascular effects of tamoxifen and its metabolites on the rat perfused hindquarter vascular bed”, *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, vol. 104, nº 5, p. 400–407, maio 2009, doi: 10.1111/j.1742-7843.2009.00377.x.
- [68] R. Masella, R. Di Benedetto, R. Vari, C. Filesi, e C. Giovannini, “Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes”, outubro de 2005. doi: 10.1016/j.jnutbio.2005.05.013.
- [69] M. A. Santos-Silva *et al.*, “The oxidative response of mouse hearts is modulated by genetic background”, *Arq Bras Cardiol*, vol. 100, nº 2, p. 157–163, fev. 2013, doi: 10.5935/abc.20130029.
- [70] N. Cantu-Medellin e E. E. Kelley, “Xanthine oxidoreductase-catalyzed reduction of nitrite to nitric oxide: Insights regarding where, when and how”, 2013, *Academic Press Inc.* doi: 10.1016/j.niox.2013.02.081.
- [71] A. Cauwels *et al.*, “Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase–dependent manner”, *Journal of Experimental Medicine*, vol. 206, nº 13, p. 2915–2924, dez. 2009, doi: 10.1084/jem.20091236.
- [72] A. K. Nussler, M. Glanemann, A. Schirmeier, L. Liu, e N. C. Nüssler, “Fluorometric measurement of nitrite/nitrate by 2,3-diaminonaphthalene”, *Nat Protoc*, vol. 1, nº 5, p. 2223–2226, dez. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.341.
- [73] C. G. Schnackenberg e C. S. Wilcox, “Two-Week Administration of Tempol Attenuates Both Hypertension and Renal Excretion of 8-Iso Prostaglandin F<sub>2</sub>”, 1998. [Online]. Disponível em: <http://www.hypertensionaha.org>

- [74] C. G. Schnackenberg, W. J. Welch, e C. S. Wilcox, "Normalization of Blood Pressure and Renal Vascular Resistance in SHR With a Membrane-Permeable Superoxide Dismutase Mimetic Role of Nitric Oxide", 2000. [Online]. Disponível em: <http://ahajournals.org>
- [75] L. A. Fortepiani, J. F. Reckelhoff, e J. F. Reckelhoff, "Treatment with tetrahydrobiopterin reduces blood pressure in male SHR by reducing testosterone synthesis", *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, vol. 288, p. 733–736, 2005, doi: 10.1152/ajpregu.00500.2004.-Treatment.
- [76] W. C. Dornas *et al.*, "Efficacy of the superoxide dismutasemimetic tempol in animal hypertensionmodels: A meta-analysis", 12 de janeiro de 2015, *Lippincott Williams and Wilkins*. doi: 10.1097/HJH.0000000000000422.
- [77] H. Younus, "Therapeutic potentials of superoxide dismutase.", *Int J Health Sci (Qassim)*, vol. 12, nº 3, p. 88–93, 2018, [Online]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29896077>
- [78] A. Nishiyama *et al.*, "Systemic and Regional Hemodynamic Responses to Tempol in Angiotensin II-Infused Hypertensive Rats", 2001. [Online]. Disponível em: <http://www.hypertensionaha.org>
- [79] W. J. Liaw *et al.*, "Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on intraperitoneal sepsis-induced organ injury in rats", *Shock*, vol. 23, nº 1, p. 88–96, jan. 2005, doi: 10.1097/01.shk.0000145937.70085.89.
- [80] X. Shi e H. Qiu, "Post-translational S-nitrosylation of proteins in regulating cardiac oxidative stress", 1º de novembro de 2020, *MDPI*. doi: 10.3390/antiox9111051.
- [81] M. Shankar-Hari e G. D. Rubenfeld, "Understanding Long-Term Outcomes Following Sepsis: Implications and Challenges", 1º de novembro de 2016, *Current Medicine Group LLC 1*. doi: 10.1007/s11908-016-0544-7.
- [82] C. Ince *et al.*, "The endothelium in sepsis", 1º de março de 2016, *Lippincott Williams and Wilkins*. doi: 10.1097/SHK.0000000000000473.
- [83] L. C. Joseph *et al.*, "Inhibition of NADPH oxidase 2 (NOX2) prevents sepsis-induced cardiomyopathy by improving calcium handling and mitochondrial function.", *JCI Insight*, vol. 2, nº 17, set. 2017, doi: 10.1172/jci.insight.94248.
- [84] S. Goldstein, A. Samuni, e G. Merenyi, "Kinetics of the reaction between nitroxide and thiyl radicals: Nitroxides as antioxidants in the presence of thiols",

*Journal of Physical Chemistry A*, vol. 112, n° 37, p. 8600–8605, set. 2008, doi: 10.1021/jp804743g.

- [85] I. Bavunoglu *et al.*, “Oxidative stress parameters and inflammatory and immune mediators as markers of the severity of sepsis”, *J Infect Dev Ctries*, vol. 10, n° 10, p. 1045–1052, out. 2016, doi: 10.3855/jidc.7585.
- [86] R. M. Bateman, M. D. Sharpe, M. Singer, e C. G. Ellis, “The effect of sepsis on the erythrocyte”, 8 de setembro de 2017, *MDPI AG*. doi: 10.3390/ijms18091932.