

PATRÍCIA DE OLIVEIRA BENEDET

**S-NITROSILAÇÃO DE PROTEÍNAS NA SEPSE: PROPOSTA DE  
UM NOVO ALVO TERAPÊUTICO**

Tese defendida no Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmacologia.

**Orientador:** Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis  
2017

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

Benedet, Patricia

S-NITROSILAÇÃO DE PROTEÍNAS NA SEPSE : PROPOSTA  
DE UM NOVO ALVO TERAPÊUTICO / Patricia Benedet ;  
orientador, Jamil Assreuy, 2017.  
122 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de  
Pós-Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.


1. Farmacologia. 2. Sepsis. 3. Disfunção  
Cardiovascular. 4. Desnitrosilação de Proteínas. 5.  
DTNB. I. Assreuy, Jamil. II. Universidade Federal  
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia. III. Título.

"S-nitrosilação de proteínas na sepse: proposta de um novo alvo terapêutico"

Por

**Patrícia de Oliveira Benedet**


Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (14/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



---

Prof(a). Dr(a). Jamil Assereuy Filho  
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



---

Dr(a) Jamil Assereuy Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)  
Orientador(a)



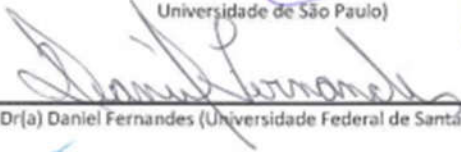
---

Dr(a) Fernando de Queiroz Cunha (Universidade de São Paulo)



---

Dr(a) Francisco R. M. Laurindo (Instituto do Coração (InCor) - Fac. Medicina da  
Universidade de São Paulo)



---

Dr(a) Daniel Fernandes (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) Aurea Elizabeth Linder (Universidade Federal de Santa Catarina)



---

Dr(a) José Eduardo da Silva Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 30 de março de 2017.

*Dedico este trabalho à minha mãe,  
vítima de sepse no ano passado*

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy por todos estes anos de orientação, confiança, convívio e principalmente pelos ensinamentos valiosos.

Ao meu marido Ricardo Boeira (Rica) pelo amor e apoio incondicional que suavizaram minha caminhada. Agradeço também pelos ensinamentos constantes de humildade e gentileza.

Aos meus bebês (Brisa e Guria) que sempre foram meu alívio e alegria diários.

Aos meus pais, Lúcio Benedet e Maria Nadir de Oliveira pelo apoio e dedicação. Por terem me ajudado a conquistar meus sonhos em meio a tantas privações.

Ao quarteto fantástico (Natayme Tartaglia, Cinthia Vila Nova Santana e Jamile Fernandes) pela amizade e incentivo.

À Flora Lucena Sant'ana e à Clarissa Germano Barp pela amizade e parceria, pela paciência (hahaha), apoio e é claro pelos momentos de descontração valiosos. Vocês suavizaram meus dias de Farmaco!

À Amanda Leitolis (Amandika) pela amizade incondicional. Pelos exemplos de doçura e simplicidade.

Ao Prof. Dr. Hernán Francisco Terenzi e à Dra. Angela Menegatti pela ajuda imprescindível nos experimentos de *Biotin Switch* e pela ótima convivência e ensinamentos.

À Muryel Carvalho Gonçalves e Verônica Horewicz pelo auxílio nos experimentos de órgão isolado e *Western Blot*.

Ao Professor Dr. José Eduardo da Silva-Santos pelo empréstimo de equipamentos utilizados em alguns experimentos.

À Adriane Madeira pelo apoio técnico e amizade.

Aos colegas (atuais e antigos) do Laboratório de Farmacologia do Óxido Nítrico pelo aprendizado constante.

A todos os professores e colegas do Departamento de Farmacologia

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, especialmente ao Pedro Paulo de Souza.

A todos os funcionários do LAMEB e do LCME, especialmente à Eliana Medeiros.

Aos Professores Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Dr. Francisco Rafael Martins Laurindo, Dra. Áurea Elizabeth Linder, Dr. José Eduardo da Silva Santos, Dr. Daniel Fernandes e Dr Pádua Carobrez por terem aceitado avaliar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”.*  
*Albert Einstein*





## RESUMO

A sepse continua sendo a principal causa de mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTI). Embora progressos significativos na compreensão da sua fisiopatologia tenham sido conquistados, a capacidade de intervir e alterar a trajetória da doença tem sido apenas parcialmente bem sucedida. A produção exacerbada de óxido nítrico (NO) durante a sepse tem sido relatada como um dos principais contribuintes para a disfunção cardiovascular sepse. Um dos mecanismos pelos quais o NO exerce alguns de seus efeitos é através da reação com grupos tiol de resíduos de cisteína (sulfidrila) em um processo chamado S-nitrosilação, produzindo S-nitrosotiois. Níveis aumentados de proteínas nitrosiladas participam na patogênese do choque séptico. O objetivo do presente estudo foi mostrar que a desnitrosilação de proteínas pode contribuir para a melhora dos parâmetros hemodinâmicos e para a maior sobrevivência de animais sépticos. Ratas *Wistar* foram tratadas com DTNB (ácido 5,5-ditiobis(2-nitrobenzóico, um agente oxidante de grupamentos sulfidríla) 30 min antes, 4 h ou 12 h após a indução da sepse (ligadura e punção cecal; CLP). Vinte e quatro horas após a cirurgia foi obtidos os seguintes dados: reatividade à fenilefrina em anéis de aorta isolada, pressão arterial média, resposta pressórica à fenilefrina, marcadores bioquímicos de disfunção de órgãos, parâmetros glicêmicos e hematológicos, perfil de sobrevivência e S-nitrosilação de proteínas da aorta, particularmente, de canais de potássio sensíveis ao cálcio. A sepse causou diminuição substancial na pressão arterial média e na resposta vascular à fenilefrina, aumento da frequência cardíaca, aumento nos níveis plasmáticos de marcadores de disfunção de órgãos, hipoglicemia, alterações hematológicas, mortalidade de 60% e aumento de S-nitrosilação de proteínas na aorta. O tratamento com DTNB 12 h após a indução da sepse melhorou a pressão arterial média, a frequência cardíaca, reverteu a perda de resposta dos anéis da aorta e da pressão arterial ao vasoconstritor, reduziu o dano de órgãos, melhorou a glicemia e parâmetros hematológicos, resultando no aumento da sobrevivência de animais sépticos. Além disso, causou uma redução substancial de proteínas nitrosiladas na aorta, nomeadamente canais de potássio dependentes de cálcio. Nossos resultados mostram que a S-nitrosilação de proteínas contribui para a disfunção cardiovascular e para o dano de órgãos induzida pela sepse. Contudo, a contribuição chave do presente trabalho é mostrar que a desnitrosilação de proteínas induzida por

DTNB melhora a condição do hospedeiro mesmo depois que todas as respostas fisiológicas alteradas pela sepse estarem em pleno curso.

**Palavras-chave:** Choque séptico; óxido nítrico; desnitrosilação de proteínas; DTNB; disfunção cardiovascular.

## ABSTRACT

Sepsis remains the leading cause of death in Intensive Care Units (ICUs). Although significant progress in understanding its pathophysiology has been achieved, the ability to intervene and change the course of the disease has been only partially successful. Nitric oxide (NO) overproduction during sepsis has been reported as one of the main contributors to the sepsis cardiovascular dysfunction. One of the mechanisms whereby NO exerts some of its effects is the reaction with thiol groups of cysteine residues (sulphydryls) in a process called S-nitrosylation, producing S-nitrosothiols. It has been reported that increased levels of S-nitrosylated proteins contribute to the pathogenesis of septic shock. The aim of the present study was to show that the denitrosylation of proteins contribute to the improvement in hemodynamic parameters and to the higher survival of septic animals. To better understand the role of protein S-nitrosylation/denitrosylation in sepsis, we used DTNB [5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid)], an oxidizing agent of sulphhydryl groups. Female Wistar rats were treated with DTNB 30 min before or 4 and 12 h after sepsis induction. Twenty-four hours after surgery the following data was obtained: aorta response to phenylephrine, mean arterial pressure, vascular reactivity to phenylephrine, biochemical markers of organ damage, glycaemic and hematological parameters, survival and aorta protein nitrosylation profile, among them, calcium-dependent potassium channels. Sepsis caused substantial decreases in blood pressure and in the response of aorta rings and of blood pressure to phenylephrine, as well as increased plasma levels of organ damage markers, heart rate, hypoglycaemia and haematological changes, mortality of 60% and S-nitrosylation of aorta proteins. Treatment with DTNB 12 h after sepsis induction improved mean arterial pressure, heart rate, reversed the loss of response of aorta rings and blood pressure to vasoconstrictors, reduced organ damage, improved hypoglycaemia and hematological parameters, decreased protein nitrosylation and increased survival to 80%. Our results show that S-nitrosylation of protein contributes to cardiovascular dysfunction and to organic injury induced by sepsis. However, the key finding of the present report is that DTNB-induced protein denitrosylation improves the host condition even after all physiological responses deranged by sepsis are in full course.

**Keywords:** septic shock; nitric oxide; protein denitrosylation; DTNB; cardiovascular dysfunction.



## LISTA DE FIGURA

Figura 1: Efeito do DTNB na resposta à fenilefrina de anéis de aorta de ratas sépticas.....	102
Figura 2: Efeito do DTNB sobre parâmetros cardiovasculares de animais de ratas sépticas.....	105
Figura 3: Efeito do DTNB sobre parâmetros cardiovasculares de animais de ratas sépticas.....	106
Figura 4: Efeito do DTNB sobre a pressão arterial e na resposta à fenilefrina de ratas sépticas.....	107
Figura 5: Efeito do DTNB sobre os marcadores bioquímicos de dano/disfunção de órgãos em ratas sépticas.....	110
Figura 6: Efeito do DTNB sobre os níveis de glicose sanguínea de ratas sépticas.....	112
Figura 7: Efeito do DTNB sobre hematócrito, hemoglobina e o número de plaquetas sanguíneas de animais sépticos.....	114
Figura 8: Efeito do DTNB sobre o leucograma de animais sépticos.....	113
Figura 9: Efeito de DTNB na sobrevivência de animais sépticos .....	117
Figura 10: Efeito do DTNB sobre a concentração de nitrito + nitrato (NOx) plasmáticos de animais sépticos.....	119
Figura 11: Efeito do DTNB sobre a S-nitrosilação de proteínas em aortas de animais sépticos.....	120
Figura 12: Detecção de SNO e BK <sub>Ca</sub> por imunofluorescência em anéis de aorta torácica de ratas.....	123
Figura 13: Expressão do BK <sub>Ca</sub> em aorta de animais sépticos .....	126



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Definições de síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse, sepse grave e choque séptico.....	24
Tabela 2: Escore da avaliação sequencial de insuficiência de órgãos (SOFA).....	28





## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Primeiras definições de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, sepse grave e choque.....	23
Esquema 2: O Terceiro Consenso Internacional para definições de Sepse e choque séptico.....	29
Esquema 3: Visão geral e simplificada da fisiopatologia sepse.....	37
Esquema 4: Os efeitos pleiotrópicos de diferentes concentrações do NO que contribuem para distintas propriedades e sinalizações.....	49
Esquema 5: Formação de S-nitrosotióis.....	60
Esquema 6: Representação esquemática do ensaio de <i>Biotin Switch</i> .....	86
Esquema 7: Protocolo experimental I, II e III. Efeito do DTNB sobre os parâmetros cardiovasculares de animais sépticos.....	96
Esquema 8: Protocolo experimental. Efeito do DTNB sobre a sobrevivência de animais sépticos.....	97
Esquema 9: Protocolo utilizado para os experimentos dos itens 5.3.4. e 5.3.5.....	99
Esquema 10: Protocolo utilizado para o experimento do item 5.3.5. ....	99



## LISTA DE ABREVIÇÕES

ANOVA	Análise de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
AMP	Monofosfato cíclico de adenosina
BSA	Albumina Sérica
BK <sub>Ca</sub>	Canais de K <sup>+</sup> sensíveis ao Ca <sup>2+</sup>
Ca <sup>2+</sup>	Íons cálcio
CARS	Síndrome da Resposta Inflamatória Compensatória
CEUA	Comitê de ética para uso de animais
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
GMPc	Monofosfato cíclico de guanosina
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
GC <sub>S</sub>	Guanilato ciclase solúvel
GMP	Monofosfato cíclico de 3'-5'-guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
GSNO	S-nitrosoglutationa
GSNOR	S- nitrosoglutationa redutase
IFN	Interferon $\gamma$
IL	Interleucina 1, 6, 8, 10, 12, 1 $\beta$
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenosa
KCl	Cloreto de potássio
L-NAME	N-nitro-L-arginina metil éster
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
mm Hg	milímetros de mercúrio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor do tipo NOD
NO	Óxido nítrico
NO <sup>-</sup>	Ânion nitroxil
NO <sup>+</sup>	Cátion nitrosônio
NO <sup>2-</sup>	Íon Nitrito
N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Trióxido de dinitrogênio
NO <sub>2</sub>	Dióxido de nitrogênio
NOD	Domínio de oligomerização ligado ao nucleotídeo
NOS	Óxido nítrico sintase

NOS-1	Óxido nítrico sintase tipo I
NOS-2	Óxido nítrico sintase tipo II
NOS-3	Óxido nítrico sintase tipo III
O <sub>2</sub>	Oxigênio molecular
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	Ânion peroxinitrito
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrão de reconhecimento associado à patógenos
PBS	Salina tamponada com fosfato
PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMPc
PRR	Receptores de reconhecimento de padrão
ROS	Espécie reativa de oxigênio
SERCA	Bomba de cálcio do retículo endoplasmático
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNO	S-nitrosotiol
SH	Sulfidrila livre/Tiol
s.c.	Subcutâneo
TBS-T	Salina tamponada com Tris e Tween 20
TLR	Receptores do tipo toll
TNF $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
UTI	Unidade de terapia intensiva

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	23
1.1.	Sepse .....	23
1.1.1.	Conceito .....	23
1.1.2.	Epidemiologia .....	28
1.1.3.	Fisiopatologia da sepse.....	30
1.1.4.	Disfunção cardiovascular na sepse.....	33
1.2.	Óxido nítrico .....	35
1.2.1.	S-nitrosilação de proteínas .....	38
1.2.2.	S-nitrosilação de proteínas: mecanismos e especificidade.....	42
1.2.3.	Desnitrosilação de proteínas.....	44
1.2.4.	A S-nitrosilação de proteínas na sepse .....	45
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA DO TRABALHO</b> .....	47
<b>3.</b>	<b>HIPÓTESE DO TRABALHO</b> .....	48
<b>4.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	49
4.1.	Objetivos gerais.....	49
4.1.1.	Objetivos específicos.....	49
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	50
5.1.	Animais .....	50
5.2.	Procedimentos experimentais.....	50
5.2.1.	Modelo de sepse experimental: ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	50
5.2.2.	Anéis de aorta torácica isolada.....	51
5.2.3.	Avaliação da pressão arterial média (pam) .....	51
5.2.4.	Coleta de sangue e aorta.....	52
5.2.5.	Dosagem de nitrito e nitrato (NOX).....	53
5.2.6.	Dosagem da glicemia e análises hematológicas .....	53
5.2.7.	Dosagens bioquímicas.....	53
5.2.7.	Lactato.....	53
5.2.7.2.	Aspartato transaminase (AST) .....	54
5.2.7.3.	Alanina transaminase (ALT).....	54
5.2.7.4.	Ureia.....	55
5.2.7.5.	Creatinina .....	55
5.2.7.6.	Creatina cinase fração MB (CK-MB).....	55
5.2.8.	Ensaio de biotilação para detecção de proteínas nitrosiladas ( <i>biotin switch</i> ).....	56
5.2.9.	Imunofluorescência .....	58
5.2.10.	Imunoeletoforese – <i>western blotting</i> .....	58
5.2.10.1.	Preparo das amostras e dosagem de proteínas.....	58
5.2.10.2.	Separação de proteínas e imunodeteção .....	59

5.3.	Protocolos experimentais .....	60
5.3.1.	<i>Avaliação dos efeitos do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) na reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta.</i> .....	60
5.3.2.	<i>Avaliação da ação do dtnb sobre os parâmetros cardiovasculares de animais sépticos</i> .....	61
5.3.3.	<i>Avaliação do efeito do DTNB sobre os parâmetros hemodinâmicos, hematológicos e metabólicos de animais sépticos.....</i>	63
5.3.4.	<i>Avaliação do efeito do DTNB sobre a sobrevida de animais submetidos ao clp.....</i>	63
5.3.5.	<i>Efeito do DTNB sobre a s-nitrosilação de proteínas em aortas torácicas de ratas sépticas</i> .....	64
5.4.	Análise estatística.....	65
5.5.	Compostos e reagentes.....	65
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	66
6.1.	Efeito do DTNB sobre a reatividade à fenilefrina em anéis de aorta.....	66
6.2.	Efeito do DTNB sobre parâmetros cardiovasculares .....	68
6.3.	Efeito do DTNB sobre o dano a órgãos .....	72
6.4.	Efeito do DTNB sobre a glicemia .....	74
6.5.	Efeito do DTNB sobre as alterações hematológicas .....	75
6.6.	Efeito do DTNB sobre a sobrevida .....	78
6.7.	Efeito do DTNB sobre a produção de NO .....	79
6.8.	Efeito do DTNB sobre a S-nitrosilação de proteínas em aortas..	80
6.9.	Efeito do DTNB e do l-name sobre s-nitrosilação do BK <sub>CA</sub> em aorta torácica.....	82
6.10.	Avaliação do conteúdo proteico de canal de potássio sensível ao cálcio.....	85
<b>7.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	87
<b>8.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	100
<b>9.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	101

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1.Sepse**

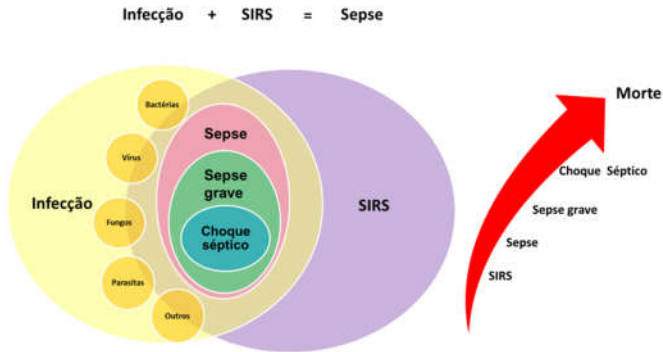
#### **1.1.1. Conceito**

A origem da palavra sepsé é documentada pelos gregos há 2700 anos e significava decomposição/putrefação de matéria orgânica animal ou vegetal. Pode-se encontrar citações nos poemas de Homero (700 a.C.) e também nas descrições de Hipócrates que a designou como perigoso, odorífero comprometimento biológico que poderia ocorrer no organismo. Séculos mais tarde, Schottmueller observou que a liberação de agentes patogênicos na corrente sanguínea era responsável pela presença de sinais e sintomas sistêmicos (revisado em GEROULANOS e DOUKA, 2006; NAMAS et al., 2012).

Embora a humanidade tenha o conhecimento da sepsé há séculos, ainda há uma grande dificuldade em fazer um diagnóstico rápido e de encontrar uma abordagem terapêutica eficaz.

As definições de sepsé continuam praticamente inalteradas há mais de duas décadas. As primeiras definições padronizadas para identificação da sepsé no paciente ocorreram na Conferência de Consenso em 1991. Conforme esta Conferência, a sepsé é uma síndrome que resulta da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) do hospedeiro frente a uma infecção (BONE et al., 1992). À medida que a gravidade clínica do paciente séptico evolui para um quadro inflamatório associado à hipotensão arterial, hipoperfusão tecidual e disfunção orgânica, a sepsé é definida como sepsé severa.

No momento em que a hipotensão é refratária à terapia volêmica e à administração de vasopressores, o choque séptico está estabelecido, podendo culminar nos casos desfavoráveis com a disfunção de múltiplos órgãos e morte (Esquema 1; BONE et al., 1992; DELANO E WARD, 2016).



**Esquema 1: Primeiras definições da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS), sepse, sepse grave e choque séptico.**

Na definição mais antiga, a sepse era resultado de uma resposta inflamatória sistêmica associada à infecção bacteriana, viral ou fúngica. De acordo com a antiga definição, os sinais e sintomas clínicos do paciente podem agravar, evoluindo assim para sepse grave, choque séptico e morte. Adaptado de Bone et al., 1992; Delano e Ward, 2016.

No ano de 2001, uma segunda conferência foi realizada com intuito de melhorar a especificidade das definições acrescentando sinais e sintomas comumente encontrados em pacientes sépticos. Apesar de ter acrescentado alguns critérios, a definição da primeira conferência ainda continuou sendo a mais utilizada. Para maiores detalhes, estas definições estão ilustradas na Tabela 1.



**Tabela 1: Definições de síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse, sepse grave e choque séptico.**

---

***Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)***

Presença de pelo menos 2 dos seguintes achados:

- a) Temperatura central  $> 38,3^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$ ;
- b) Frequência cardíaca  $> 90$  bpm;
- c) Frequência respiratória  $> 20$  rpm ou  $\text{PaCO}_2 < 32$  mm Hg ou necessidade de ventilação mecânica;
- d) Leucócitos totais  $> 12.000/\text{mm}^3$  ou  $< 4.000/\text{mm}^3$  ou presença de  $> 10\%$  de formas jovens.

---

***Sepse***

SIRS acompanhada de processo infeccioso confirmado ou suspeito, sem necessidade da identificação do agente infeccioso.

Em caso de cultura negativa:

- a) Edema significativo ou balanço de fluido positivo (20 mL/kg após 20 horas);
- b) Hiperglicemia com ausência de diabetes (glicose plasmática  $> 120$  mg/dl);
- c) Marcadores inflamatórios: procalcitonina ou proteína C reativa, ambos  $> 2$  desvios padrões além dos valores normais;
- d) Saturação venosa de  $\text{O}_2$  ( $\text{SVO}_2$ )  $> 70\%$
- e) Frequência cardíaca  $> 90$  bpm

---

***Sepse grave***

a) Presença dos critérios de sepse associada à disfunção orgânica, hipoperfusão e hipotensão.

b) Hipoperfusão e anormalidades da perfusão podem incluir, mas não estão limitadas a:

- a) Hipotensão arterial (pressão sistólica  $< 90$  mm Hg, pressão arterial média  $< 70$  mm Hg);
- b) Hipoxemia;
- c) Hiperlactatemia (lactato  $> 2$  mmol/L);
- d) Oligúria;
- e) Trombocitopenia e coagulação anormal (tempo de ativação parcial de tromboplastina  $> 1$  minuto);
- f) Alteração aguda do estado mental.

---

***Choque séptico***

Estado de falência circulatória aguda caracterizada pela persistência de hipotensão arterial apesar de adequada reposição volêmica e terapia com vasopressores

Modificado de Dellinger et al., 2013.

Essas definições, entretanto, foram alvo de críticas devido ao foco excessivo na inflamação e pela demasiada sensibilidade e falta de especificidade dos critérios da SIRS. Isto se deve porque frequentemente a difícil diferenciação entre SRIS e sepse, pois nem sempre é clara a presença da infecção. Além disso, pacientes imunossuprimidos podem apresentar disfunção orgânica e mesmo choque séptico, sem a presença de SIRS.

Devido a estas lacunas, recentemente foi organizada uma nova revisão desses conceitos pela *European Society of Intensive Care Medicine* e *Society of Critical Care Medicine* durante os anos de 2014 e 2015 (SINGER et al., 2016). Segundo esta revisão, durante a sepse ocorre a ativação precoce tanto de respostas pró- como anti-inflamatórias, e também alterações importantes em vias não imunológicas, tais como cardiovascular, neuronal, autonômica, hormonal, bioenergética, metabólica e de coagulação, sendo que todas elas compartilham significância prognóstica.

De acordo ainda com o 3º Consenso Internacional para definição da sepse (também conhecido como Sepse 3.0), o uso atual de dois ou mais critérios de SIRS para identificar a sepse foi considerado como inútil. Isto é baseado no fato de que os critérios de SIRS estão presentes em muitos pacientes hospitalizados, incluindo aqueles que nunca desenvolveram infecção. Por outro lado, alguns pacientes com infecção e falência de órgãos não possuem o mínimo exigido de dois critérios de SIRS para cumprir a definição de sepse. Portanto, para atual definição, a sepse deve ser definida como uma resposta desregulada do hospedeiro frente a um processo infeccioso associado à disfunção orgânica.

Portanto, para a nova definição, a sepse indica uma fisiopatologia mais complexa do que a infecção associada a uma resposta inflamatória sistêmica. Como resultado desta nova terminologia a definição de sepse grave se tornou desnecessária.

A gravidade da disfunção de órgãos pode ser avaliada por um aumento da pontuação de dois pontos ou mais na Avaliação Sequencial de Insuficiência de Órgãos (SOFA; do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*). O SOFA quantifica anormalidades de acordo com achados clínicos, dados laboratoriais ou intervenções terapêuticas. A Tabela 2 mostra com maiores detalhes o escore de avaliação da disfunção de órgãos baseado no SOFA.

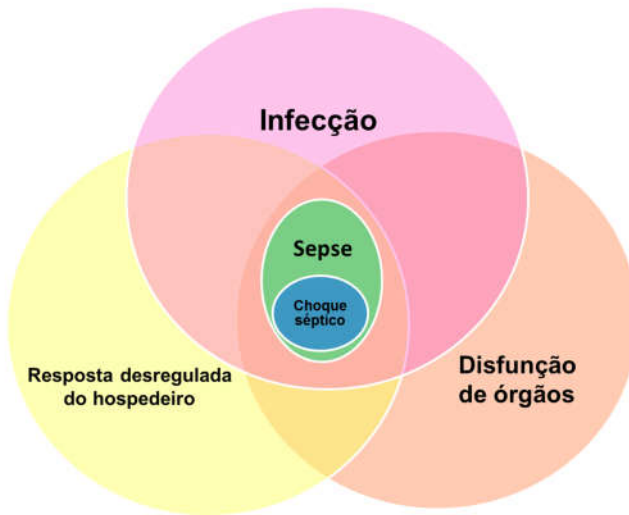
**Tabela 2: Escore da avaliação sequencial de insuficiência de órgãos (SOFA).**

<i>Sistema</i>	<i>Escore</i>				
	0	1	2	3	4
<b>Respiratório</b> PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub>	≥ 400	< 400	≤ 300	≤ 200 com suporte respiratório	≤ 100 com suporte respiratório
<b>Coagulação</b> Plaquetas (×10 <sup>3</sup> /μL)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
<b>Cardiovascular</b>	PAM ≥ 70 mm Hg	PAM < 70 mm Hg	Dopamina < 5 ou dobutamina (qualquer dose)*	Dopamina 5.1-15 ou adrenalina ≤ 0.1 ou noradrenalina ≤ 0.1*	Dopamina >15 ou adrenalina ≤ 0.1 ou noradrenalina > 0.1*
<b>Sistema Nervoso Central</b> (escore da escala de coma de Glasgow) <sup>#</sup>	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Renal</b> Creatinina mg/dL	<1.2	1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5.0
Diurese (mL/dia)				< 500	< 200
<b>Hepático</b> Bilirrubina mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0

O diagnóstico clínico de disfunção orgânica se baseia na variação de dois ou mais pontos no escore. Abreviaturas: FIO<sub>2</sub>, fração de oxigênio inspirado; PAM, pressão arterial média; PaO<sub>2</sub>, pressão parcial de oxigênio. \*As doses de catecolaminas são dadas em μg/kg/min durante pelo menos 1 hora. <sup>#</sup> Escore de escala de Glasgow Coma de 3 a 15; maior pontuação indica melhor função neurológica. Adaptado de Singer et al., 2016.

O choque séptico é definido como um subconjunto de sepse em que anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas profundas estão associadas ao maior risco de mortalidade. Neste estágio da sepse, a disfunção de órgãos estaria acompanhada por hipotensão persistente (≤ 65 mm Hg) refratária à terapia com vasopressores e com nível de lactato sérico > 2 mmol/L (18

mg/dL), apesar de reanimação volêmica adequada (Esquema 2; DELANO e WARD, 2016.)



**Esquema 2: O Terceiro Consenso Internacional para definições de Sepse e choque séptico.** Para a nova definição os critérios SIRS possuem especificidade e sensibilidade inadequadas para definir e diagnosticar a sepse. De acordo com os novos critérios a sepse não segue sempre uma progressão contínua e linear a partir de SIRS, passando pela sepse grave e choque séptico. Foi retirado o termo "sepse grave" por achar redundante e desnecessário. Em vez disso, o relatório recomenda que a sepse seja definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, causada por uma resposta do hospedeiro desregulada a uma infecção. Adaptado de Delano e Ward, 2016.

### 1.1.2.Epidemiologia

Houve progressos significativos na compreensão da sepse, porém a capacidade de intervir e alterar a trajetória da doença tem sido apenas parcialmente bem-sucedida. Como resultado, a incidência da sepse ainda é alarmante, apesar da mortalidade ter diminuído em alguns países como a Austrália e Nova Zelândia (KAUKONEN et al., 2014).

O aumento da incidência se deve ao aumento da população idosa, ao crescente número de pacientes imunossuprimidos, ao aumento de pacientes com enfermidades graves, ao crescimento

da resistência bacteriana e ao aumento no número de procedimentos invasivos (ANGUS et al., 2001; RANGEL-FRAUSTO, 2005; HOTCHKISS et al., 2016).

A sepse é considerada a mais importante causa de morbidade em unidades de terapia intensiva (UTI). Dados epidemiológicos estimaram cerca de 31,5 milhões de novos casos anuais de sepse e com mortalidade de 5,3 milhões por ano no mundo (FLEISCHMANN et al., 2016). Nos Estados Unidos (EUA) foi identificado um aumento de casos de sepse severa de 415 mil casos no ano 2003 para 700 mil casos em 2007 (LAGU et al., 2012). Infelizmente no Brasil são limitados os dados epidemiológicos de maior abrangência, mas estima-se que há cerca de 400.000 casos anuais de sepse. De acordo com o estudo BASES (do Inglês, *Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) aproximadamente a cada 1000 pacientes das unidades de terapia intensiva (UTIs) brasileiras 57 apresentam sepse por dia (SILVA et al., 2004).

Um estudo ainda não publicado do Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS) observou que cerca de 230 UTIs brasileiras apresentaram em apenas um dia 30% dos leitos ocupados com pacientes com sepse severa ou choque séptico (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA/INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE SEPSE, 2015). Além disso, um estudo conduzido pelo ILAS demonstrou que há diferença quanto ao seguimento dos pacientes em hospitais públicos e privados (CONDE et al., 2013). Conforme este estudo, a letalidade hospitalar decorrente da sepse é maior em instituições públicas (58,5%) em relação às instituições privadas (27,5%) e esta diferença na mortalidade estaria relacionada com o mais frequente reconhecimento tardio da sepse em instituições públicas.

É importante ressaltar que os dados epidemiológicos podem estar sendo subestimados. Em muitos casos, especialmente em pacientes com doenças crônicas, como câncer, insuficiência cardíaca congestiva e obstrutiva crônica, doença pulmonar, o registro oficial da morte frequentemente relata a doença subjacente em vez da causa imediata de morte (sepse), o que pode estar contribuindo para o aumento de subnotificações dos casos de sepse no Brasil e no mundo (MCPHERSON et al., 2013; HOTCHKISS et al., 2016).

### 1.1.3. Fisiopatologia da Sepses

A sepsis é geralmente iniciada pelo reconhecimento simultâneo de múltiplos produtos microbianos derivados de infecção e sinais endógenos do hospedeiro (HOTCHKISS et al., 2016).

A ligação de componentes de vírus, de fungos ou de bactérias como lipopolissacarídeo (LPS), peptidoglicanos, ácido lipoteicóico e flagelina, comumente chamados de PAMPs (PAMPs do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) aos Receptores de Reconhecimento de Padrão (PRR's do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) induz a ativação de um complexo sistema de sinalização intracelular e leva à expressão de várias classes de genes envolvidos na inflamação, imunidade adaptativa e metabolismo celular (CINEL e OPAL, 2009; REINHART et al., 2012).

Pelo menos quatro famílias de PRRs são reconhecidas: a do tipo Toll (TLR, do inglês *TollLike Receptors*); as proteínas de repetição ricas em leucina com domínio de oligomerização de nucleótidos (NOD do inglês, *Nucleotide-binding Oligomerization Domain*); a dos receptores tipo RIG-1 (RIG do inglês, *retinoic acid-inducible gene*) que atuam no reconhecimento do RNA viral; os receptores de lectina tipo C (CLR do inglês, *C-type lectin receptor*) presentes na superfície de células fagocíticas e atuantes no englobamento de patógenos (CINEL e OPAL, 2009).

Os sinais inflamatórios são traduzidos por uma série de moléculas adaptadoras que se ligam aos PRRs e proteínas cinases e fosfatases que participam da propagação do sinal no citoplasma, resultando na ativação de vários fatores de transcrição. Esses fatores incluem o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), a proteína ativadora-1 (AP-1 do inglês, *Activator protein 1*), proteína de resposta de crescimento precoce 1 (EGR-1 do inglês, *Early growth response protein 1*), e os Sinais Transdutores e Ativadores da Transcrição 1 (STAT1 do inglês, *Signal transducer and activator of transcription 1*) (HOTCHKISS et al., 2016).

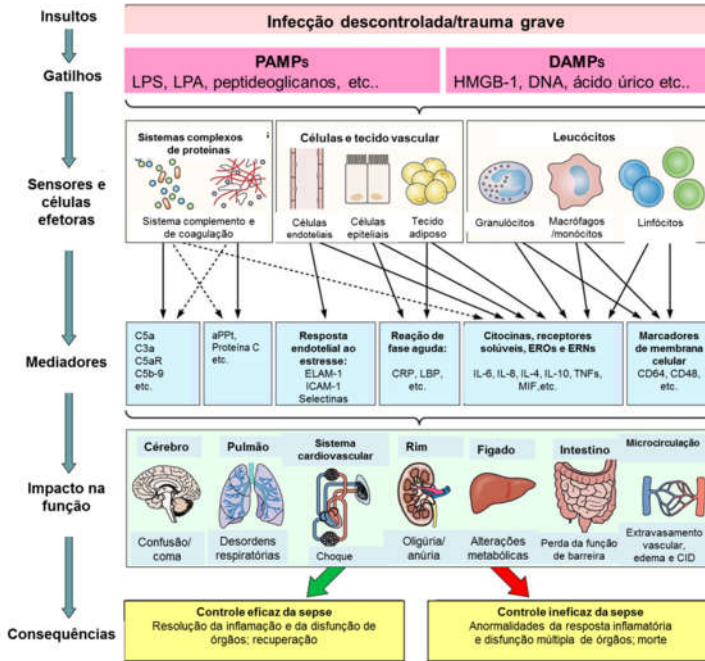
Após o estímulo inicial, há a ativação e recrutamento de leucócitos aos tecidos. Neutrófilos e macrófagos produzem e respondem à citocinas, quimiocinas, produtos de ativação do sistema complemento, óxido nítrico (NO), e outros mediadores. Este processo pró-inflamatório por sua vez provoca a liberação de poderosos mediadores secundários como fatores lipídicos e

espécies reativas de oxigênio e nitrogênio que amplificam o processo inflamatório (para revisão ver CINEL e OPAL, 2009; NDUKA, e PARRILLO, 2011).

O processo infeccioso e a inflamação acentuada resultam na síntese e excreção de moléculas liberadas por células submetidas ao estresse e necrose chamados de padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMPs do inglês, *Damage-Associated Molecular Pattern*). Os DAMPs estimulam células inflamatórias próximas a produzir mais mediadores inflamatórios, levando a uma maior liberação de DAMPs, promovendo muitas vezes, a automanutenção da inflamação mesmo após o patógeno ter sido removido (NANAS et al., 2012; HOTCHKISS et al., 2016).

Durante a sepse ocorre também produção de mediadores anti-inflamatórios, caracterizada por uma resposta anti-inflamatória compensatória (CARS, do inglês, *Compensatory Anti-inflammatory Response Syndrome*). Os principais mediadores anti-inflamatórios liberados na sepse são: a citocina IL-10, o antagonista do receptor de IL-1 (IL-1Ra) e o TGF- $\beta$ . Apesar de estes mediadores contrabalançarem as ações dos agentes pró-inflamatórios, inibindo sua síntese, sua liberação ou antagonizando seus efeitos, estas influências anti-inflamatórias são insuficientes para suprimir a automanutenção da inflamação, ou são produzidos em demasia e levam a um estado imunossuprimido (NANAS et al., 2012).

Simultaneamente, a ativação destes receptores imunes, ativação do complemento, síntese de NO e de outros mediadores inflamatórios têm um efeito profundo na coagulação e no endotélio vascular, levando ao aumento da expressão de selectinas e moléculas de adesão, à coagulação intravascular disseminada (CID), ao aumento da permeabilidade vascular e à vasodilatação. Esta disfunção, principalmente microcirculatória, contribui para o colapso do sistema cardiovascular e conseqüentemente para a fraca perfusão tecidual (Esquema 3; para revisão ver REINHART et al., 2012).



**Esquema 3: Visão geral e simplificada da fisiopatologia sepse.** Um insulto desencadeia a liberação de PAMPs (padrões moleculares associados ao patógeno) e/ou DAMPs (padrões moleculares associados ao dano), que são detectados pelo sistema do complemento, pelos PRRs (receptores de reconhecimento de padrões) e outros. Estes sensores podem funcionar como efetores para modular a resposta imune através de vários mediadores ou biomarcadores pró-anti-inflamatórios diferentes. Como resultado, a agressão pode ser resolvida ou não, e a função do órgão pode ser temporariamente ou permanentemente prejudicada. Abreviaturas: LPS, lipopolissacarídeo; LTA, ácido lipoteicoico; HMGB1, proteína B1 do grupo de alta mobilidade; C5a e C3a, componentes 5a e 3a do sistema complemento; C5aR, proteína receptora C5a; C5b-9, complexo de complemento terminal; aPPT, tempo de tromboplastina parcial ativada; ELAM-1, molécula de adesão leucocitária endotelial 1; ICAM-1, molécula de adesão intercelular 1; CRP, proteína C reativa; LBP, proteína ligadora de LPS; EROs, espécie reativas de oxigênio; ERNs, espécies reativas de nitrogênio; IL-6, interleucina-6; IL-8, interleucina-8; IL-4, interleucina-4; IL-10, interleucina-10; MIF, fator inibidor da migração de macrófagos; TNFs, fator de necrose tumoral solúvel; CD64 e CD48, *cluster* de diferenciação 64 e 48; CID, coagulação intravascular disseminada. Modificado de Reinhart et al., 2012.



### **1.1.4. Disfunção cardiovascular na sepse**

Durante a sepse ocorrem alterações profundas da homeostase cardiovascular sendo caracterizada por uma combinação de hipovolemia, diminuição do tônus vascular e depressão miocárdica. Como resultado, a perfusão tecidual e a oxigenação celular são gravemente perturbadas, o que resulta em lesões celulares, disfunção de múltiplos órgãos e morte (revisado em FERNANDES e ASSREUY, 2008; SHARAWY, 2014).

A produção desregulada de mediadores lipídicos como eicosanóides e fatores de ativação plaquetária, bem como radicais de oxigênio e nitrogênio conduz à vasodilatação, disfunção vascular (revisado em FERNANDES e ASSREUY, 2008; KIMMOUN et al., 2013; SHARAWY, 2014), aumento da permeabilidade vascular e hipovolemia (revisado em HOLLENBERG et al., 2007; OPAL e VAN DER POLL, 2015). Acredita-se que a redução da resistência vascular periférica seja um fator-chave responsável pela morte de pacientes com choque séptico (GROENEVELD et al., 1986). A diminuição da resistência vascular periférica promove uma progressiva hipotensão arterial, que durante o choque é refratária à expansão volêmica adequada e apresenta uma menor sensibilidade aos agentes vasopressores, tais como catecolaminas, vasopressina, angiotensina II e serotonina (revisado em LEVY et al., 2010).

A progressão da hipotensão arterial resulta no aumento do débito cardíaco que, associado ao processo inflamatório, pode contribuir para o dano do miocárdio e comprometimento da sua função, o que resulta na redução da contração e do relaxamento cardíaco (ROSSI et al., 2007; POELAERT et al., 2010).

O NO é um dos principais responsáveis pela disfunção cardiovascular durante a sepse. Trabalhos mostraram que a produção excessiva de NO na sepse induz a importantes alterações hemodinâmicas, como a hipotensão arterial grave, a hiporreatividade a vasoconstritores (SZABO et al., 1993; MACMICKING et al., 1995; GUNNETT et al., 1998; GOCAN et al., 2000; FERNANDES et al., 2009; NARDI et al., 2014), ao aumento da permeabilidade vascular (HOLLENBERG et al., 2007) e alterações no funcionamento cardíaco (ROSSI et al., 2007).

As primeiras evidências de que o NO teria um envolvimento na sepse vieram com a observação de níveis elevados de nitrato e nitrito em pacientes sépticos (OCHOA et al., 1991). No mesmo período, foi observado que o LPS induz o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS-2) em vários tipos celulares, como células endoteliais, hepatócitos, células da musculatura lisa vascular, células renais, miócitos e fibroblastos (MONCADA et al., 1991). Além da NOS-2, estudos mostraram que o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (NOS-1, NARDI et al., 2014) e da enzima óxido nítrico sintase endotelial (NOS-3, ARAÚJO et al., 2012) durante a sepse, contribuem para a manutenção de níveis aumentados de NO em tempos tardios, quando a NOS-2 não está sendo mais expressa. Adicionado a isso, foi observado que a inibição não seletiva das NOS (KILBOURN et al., 1990; SZABO et al., 1993), como também a inibição seletiva das NOS-2 (O'BRIEN et al., 2001), diminuiu a hipotensão e a hiporreatividade à vasoconstritores (WU et al., 1995).

Além da participação do NO produzido pelas NOS para o agravamento do quadro séptico, foi observado que animais endotoxêmicos tratados com azul de metileno, um inibidor não seletivo da guanilato ciclase solúvel (GCs), tem diminuição da hipotensão e da hiporreatividade a vasoconstritores (KEANEY et al., 1994). Posteriormente foi demonstrado que durante a sepse ocorre o aumento da expressão da GCs e consequente produção de GMPc, nas fases tardias. Consequentemente, a melhora da função cardiovascular associada à administração de inibidores da GCs é observada nos períodos mais tardios, quando a expressão da GCs está aumentada (FERNANDES et al., 2009).

Além da participação da GCs, os canais de potássio também estão envolvidos nos efeitos do NO, tanto nos períodos iniciais como tardios da sepse. Da Silva-Santos e colaboradores (2002) observaram que o prejuízo da contratilidade vascular em animais endotoxêmicos está relacionado com a ativação excessiva dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP), uma vez que a glibenclâmida e o tetraetilamônio (TEA) restauraram a reatividade vascular a vasoconstritores. Somando-se a isso, Sordi e colaboradores (2010) mostraram que o TEA, além de melhorar a função cardiovascular e a disfunção orgânica, contribui para a diminuição da expressão da NOS-2 em ratos sépticos. Esta

importante relação do NO e canais de potássio foi observada igualmente em outros trabalhos, os quais demonstraram que o aumento da produção de NO durante a sepse é responsável pelo aumento da expressão de KATP (CZAIKA et al., 2000; COLLIN et al., 2011).

## 1.2. Óxido Nítrico

O NO é uma molécula estruturalmente simples que endogenamente exerce funções de efetor e de segundo mensageiro.

Este gás é sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS). Há três isoformas, NOS-1, NOS-2 e a NOS-3. Todas as três enzimas são cataliticamente ativas quando dimerizadas e requerem além de L-arginina e oxigênio molecular, alguns cofatores como nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), monucleotídeo de flavina (FMN) e tetrahidrobiopterina (THB4) (para revisão ver ALDERTON, 2001; FÖRSTERMANN e SESSA, 2012).

Foi reportado inicialmente que a NOS-1 e a NOS-3 são constitutivamente expressas, produzindo NO em resposta ao influxo de cálcio extracelular. A NOS-2, por outro lado, é induzida em resposta ao estresse celular tais como estímulos inflamatórios, presença de endotoxinas bacterianas e hipóxia, mesmo com níveis basais de cálcio intracelular (para revisão ver TSUTSUI et al., 2015). Estudos revelaram, no entanto, que a expressão das NOS-1 e NOS-3 também está sujeita à regulação transcricional (ARAÚJO et al., 2012; NARDI et al., 2014), e que a NOS-2 igualmente é expressa sob condições fisiológicas (PARK et al., 1996). Uma diferença relevante entre as três isoformas está relacionada à sua atividade catalítica. As isoformas NOS-1 e NOS-3 produzem NO de maneira pulsátil e geram concentrações nanomolar e por pouco tempo (segundos a minutos). Em contrapartida, a NOS-2 produz NO de modo contínuo e geram concentrações micromolar durante longos períodos de tempo (para revisão ver ALDERTON, 2001; TSUTSUI et al., 2015).

O NO produzido pelas NOS participa de muitos processos biológicos como vasodilatação e manutenção do tônus vascular (PALMER et al., 1987), inibição da adesão e agregação plaquetária (MELLION et al., 1981), neurobiologia da memória (HÖLSCHER e ROSE, 1992) e modulação da nocicepção (HALEY et al., 1992). O NO também é produzido durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune, contribuindo para a citotoxicidade contra células tumorais, bactérias, vírus e outros micro-organismos (para revisão ver STUEHR e MARLETTA, 1985; SCOTT et al., 2001). Entretanto, a liberação excessiva do NO, bem como a diminuição da sua biodisponibilidade está relacionada não somente com a sepse, mas também com outras patologias como neurodegeneração (NAKAMURA et al., 2007), diabetes (KANEKI et al., 2007), câncer (AMBS et al., 1998) e hipertensão (TSCHUDI et al., 1996).

Uma das maneiras pelas quais o NO exerce suas funções é através da ativação da GCs e abertura de canais de potássio. A interação do NO com a GCs resulta na síntese de GMPc que, por sua vez, irá estimular a proteína quinase dependente de GMPc (PKG), dando início à uma das cascatas de fosforilação proteica (RAPOPORT e MURAD, 1993). O NO também induz a abertura dos canais de potássio por meio da fosforilação mediada pela PKG (HIRSCH e SCHLATTER, 1995) ou através da S-nitrosilação dos resíduos de cisteína presentes nestes canais (BOLOTINA et al., 1994). Neste caso, a abertura dos canais de potássio e a consequente hiperpolarização celular induz o fechamento dos canais de cálcio e a redução da concentração intracelular de cálcio.

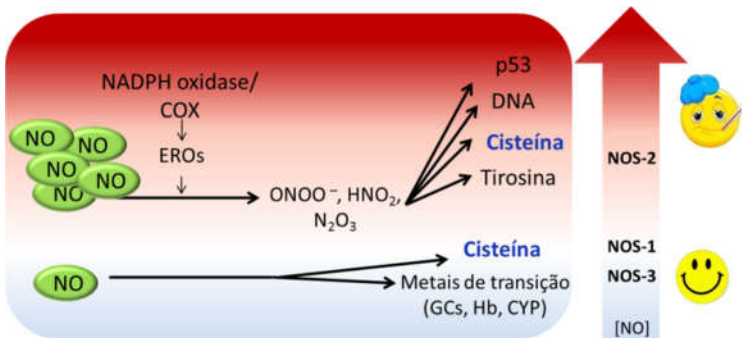
Diferentes concentrações de NO podem afetar distintas vias de sinalização e, muitas vezes de maneira antagônica (Esquema 4). Por exemplo, concentrações na faixa picomolar e nanomolar de NO já são suficientes para ativar a GCs, promover reações antioxidantes e nitrosilar resíduos de cisteína. Neste caso, baixas concentrações de NO estão relacionadas com a sinalização fisiológica, tais como, regulação do tônus vascular, neurotransmissão e com efeitos anti-apoptóticos. Por outro lado, níveis intermediários e altos, de NO podem resultar em hipotensão arterial, neurodegeneração, inflamação e apoptose. Neste caso, o NO pode afetar não apenas o DNA celular, como

também atingir de maneira desregulada alvos proteicos (para revisão ver THOMAS et al., 2015).

Parte da alta diversidade e complexidade dos efeitos do NO estão relacionados à sua natureza química. O NO possui um elétron não emparelhado, o que lhe confere caráter radicalar. Possui tempo de meia-vida *in vitro* em torno de 100 ms e *in vivo* de 6 s. Especula-se que esta discrepância do tempo de meia-vida estaria relacionada, em parte, com a formação *in vivo* de reservatórios moleculares de NO, o que evitaria a sua inativação (BRADLEY et al., 2013).

Além disso, o NO apresenta variações no número de elétrons nos orbitais atômicos, determinando a existência de diferentes formas redox como NO• (radical monóxido de nitrogênio), o NO<sup>+</sup> (cátion nitrosônio) e o NO<sup>-</sup> (ânion nitroxil), com diferentes propriedades químicas e distintos alvos moleculares.

Por ser um radical livre, o NO pode reagir com outros radicais e moléculas, formando espécies tão ou mais biologicamente ativas que a molécula original. Desta forma, o NO pode reagir com outras moléculas, como o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>), formando dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) e trióxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Estes por sua vez, podem ser transferidos para uma variedade de nucleófilos presentes em biomoléculas tais como aminas e tiois, levando à formação de N-nitrosaminas e S-nitrosotiois, respectivamente (LIM et al., 2008; THOMAS et al., 2015). Outra via importante é a formação de complexos nitrosil-metálicos, a partir da reação direta do NO com metais de transição como ocorre com a hemoglobina, GCs e citocromo oxidase, os quais contêm ferro no grupamento heme. O NO pode ainda reagir com ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), gerado pelas NADPH oxidases, formando o ânion peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>). O ONOO<sup>-</sup> por sua vez, pode produzir o radical hidroxila (OH•), NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrito) e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrato) e ainda, promover a nitração de proteínas (LIM et al., 2008). Alternativamente, o nitrito pode ser protonado em pH baixo (< 3) e formar novamente o NO (MCKNIGHT et al., 1997; THOMAS et al., 2015) ou ser convertido enzimaticamente através da mieloperoxidase e lactoperoxidase, para formar N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, o qual pode por sua vez, promover a S-nitrosilação de proteínas (COSBY et al., 2003; STAMLER et al., 1992).



**Esquema 4: Os efeitos pleitrópicos de diferentes concentrações do NO que contribuem para distintas propriedades e sinalizações.** Em condições fisiológicas a NOS-1 e a NOS-3 produzem concentrações pequenas de NO, suficiente para reagir com íons metais e proteínas com resíduos de cisteína. Por outro lado, em condições patológicas, concentrações intermediárias e elevadas de NO produzida pela NOS-2 podem promover dano ao DNA, ativar a p53 e alterar a estrutura e funcionamento de proteínas. Abreviaturas: EROs, espécies reativas de oxigênio; COX, ciclo-oxigenase; ONOO<sup>-</sup>, radical peroxinitrito; HNO<sub>2</sub>, ácido nitroso; N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, trióxido de dinitrogênio; GCs, guanilato ciclase solúvel; CYP, citocromo oxidase; Hb, Hemoglobina.

### 1.2.1. S-nitrosilação de proteínas

O envolvimento da S-nitrosilação de proteínas em diversos processos regulatórios tem despertado a atenção da comunidade científica nos últimos anos (LIU et al., 2004; CUTLER et al., 2012; QUEQUÉN et al., 2016).

Os primeiros indícios da participação da S-nitrosilação em processos biológicos surgiram através de investigações *in vitro* da ativação da GCs por compostos nitrosos (grupamentos que possuem NO ligado a um radical orgânico) e nitrosil-metálicos (IGNARRO et al., 1980). No entanto, somente em 1992 foram encontradas concentrações na ordem de micromolar de nitrosoalbumina (albumina nitrosilada) na circulação (STAMLER et al., 1992). No ano seguinte, foi descoberta a primeira evidência do envolvimento da S-nitrosilação na sinalização celular quando Stamler e Lipton observaram que a S-nitrosilação dos receptores

NMDA (receptor N-metil-D-aspartato de glutamato) regula sua atividade (LIPTON et al., 1993).

De maneira simplificada, podemos definir a S-nitrosilação como uma reação reversível entre o NO e a sulfidril (tiol) de um resíduo de cisteína, levando à formação de SNO (S-nitrosotiol) (Esquema 5A).

Já foram encontrados SNO em quase todos os tipos de amostras biológicas, como tecido vascular, plaquetas, macrófagos, rins, fígado, coração e cérebro (para revisão ver NAKAMURA et al., 2013). Além da sua ampla localização, a concentração endógena de SNO pode variar de nanomolar a micromolar. Os SNO podem ser encontrados com baixo peso molecular, tal como S-nitrosoglutationa (GSNO), S-nitrosocisteína (CisNO), e S-nitrosohomocisteína (HCisNO), além de proteínas nitrosiladas de alto peso molecular como a nitrosoalbumina e nitrosohemoglobina (hemoglobina nitrosilada) (HESS et al., 2005; Nakamura et al., 2013).

Por serem mais estáveis, os SNO preservam a bioatividade e aumentam o tempo de meia-vida do NO, sendo que alguns SNO podem apresentar meia-vida de minutos, horas ou até mesmo dias nos sistemas biológicos (STAMLER et al., 1992; HESS et al., 2005). Além de implicar na formação de reservatórios de NO, a S-nitrosilação pode levar a modificações da função proteica. Esta modificação ainda conta com o critério da reversibilidade, o qual é essencial para muitos eventos de sinalização celular (para revisão ver FOSTER et al., 2003; NAKAMURA et al., 2013).

Os SNO, depois de formados, podem ser complexados a albumina e/ou hemoglobina dos eritrócitos e desta maneira, transportados, podendo assim, atuar longe do sítio onde foram gerados (HESS et al., 2005).

A S-nitrosilação possui uma natureza dicotômica, reflexo do seu envolvimento tanto como um agente protetor e regulador fisiológico, quanto como um agente tóxico, promovendo ampla desorganização biológica. O equilíbrio/desequilíbrio da concentração de SNO pode determinar a saúde como também a doença (ANAND e STAMLER, 2012).

Tem sido mostrado que SNO podem ser encontrados em diferentes compartimentos celulares como na membrana celular, no retículo endoplasmático, no complexo de Golgi, na mitocôndria, no citosol e no núcleo. Além da sua ampla localização celular, a S-nitrosilação regula a atividade de enzimas

metabólicas, como as oxidoredutases, as cinases, as proteases e as fosfatases. Igualmente, regula proteínas da cadeia respiratória (receptores, canais iônicos e transportadores), citoesqueleto e componentes estruturais, chaperonas, fatores de transcrição (HIF-1 $\alpha$ , AP1, NF- $\kappa$ B, Hsp90) e proteínas G (HESS et al., 2005; ANAND e STAMLER, 2012).

A regulação da sinalização celular mediada pela S-nitrosilação foi encontrada em todos os sistemas fisiológicos. Um número crescente de trabalhos vem mostrando que o sistema cardiovascular é fortemente regulado pela S-nitrosilação. Um exemplo clássico é a regulação da via de sinalização  $\beta_2$ -adrenérgica através da S-nitrosilação da GRK2 (proteína cinase de receptores acoplados a proteína G) e da  $\beta$ -arrestina 2 cardíaca. Durante a estimulação  $\beta_2$ -adrenérgica ocorre o aumento da síntese de NO, mediada pela NOS-3, e consequente S-nitrosilação da GRK2. Com a S-nitrosilação, a capacidade da GRK-2 de fosforilar o receptor  $\beta_2$ -adrenérgico é inibida (WHALEN et al., 2007) bem como a ligação da  $\beta$ -arrestina com a clatrina é facilitada (OZAWA et al., 2008). Por conseguinte, a dessensibilização do receptor é inibida.

Foi identificado também, que a S-nitrosilação de canais de potássio sensíveis a cálcio (BK<sub>Ca</sub>) (BOLOTINA et al., 1994), sensíveis ao ATP (KATP) (KAWANO et al., 2009), de retificação interna (K<sub>iR</sub>) (GÓMEZ et al., 2009) e voltagem dependentes (K<sub>v</sub>) (ASADA et al., 2009), desempenha papel essencial na regulação da atividade destes canais, promovendo sua abertura e a extrusão de potássio para o meio extracelular.

A comunicação celular e a permeabilidade vascular também são reguladas por mecanismos de S-nitrosilação. Straub e colaboradores (2011) mostraram que a S-nitrosilação e a desnitrosilação da conexina 43, presente nas junções mioendoteliais, regula a comunicação entre as células endoteliais e células musculares lisas vasculares. Foi demonstrado que durante uma resposta inflamatória, a S-nitrosilação da  $\beta$ -catenina e da catenina p120 mediada pela NOS-3 induz a desorganização destas proteínas e aumenta, desta forma, a permeabilidade e o extravasamento vascular (THIBEAULT et al., 2010; MARÍN et al., 2012). Outras proteínas importantes para o funcionamento cardiovascular também são reguladas pela S-nitrosilação tais como: GCs, NOS-3, miosina, canais de cálcio tipo L, dinamina e



receptores de rianodina (cardíaco e vascular) (para revisão ver HALDAR e STAMLER, 2013).

Do mesmo modo, podemos encontrar o envolvimento da S-nitrosilação na regulação da imunidade inata e adquirida (MARSHALL et al., 2001; KELLEHER et al., 2007) no desenvolvimento (OKAMOTO E LIPTON, 2015) e na regulação do sistema nervoso (WANG et al., 2015), na indução da nocicepção (LU et al., 2011), na regulação do reparo do DNA (CHI-HUI et al., 2012), na função mitocondrial (SUN et al., 2007; CHOUCANI et al., 2010), como também na regulação da função hepática (RODRIGUEZ-ORTIGOSA et al., 2014).

Alterações nos níveis de SNO endógenos podem provocar o mau funcionamento celular e, conseqüentemente, gerar doenças. Foi demonstrado, por exemplo, que o aumento de concentrações plasmáticas de SNO pode servir de prognóstico de disfunções cardiovasculares em pacientes com insuficiência renal (MASSY et al., 2004). Além disso, foi observado que a S-nitrosilação da troponina cardíaca pode contribuir para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva (CANTON et al., 2010). Por outro lado, a deficiência da NOS-1 em camundongos *knockout* diminui a S-nitrosilação do receptor de rianodina, do canal de cálcio tipo L e da  $Ca^{2+}$ -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) no coração. Em decorrência da falta de S-nitrosilação desses alvos, ocorre o aumento da contratilidade cardíaca e do potencial de ação da membrana dos cardiomiócitos, induzindo insuficiência e arritmia cardíacas (GONZALEZ et al., 2007; GONZALEZ et al., 2010).

Além de estar relacionado com o desenvolvimento de disfunções cardíacas, foi observado o envolvimento da S-nitrosilação em outras patologias tais como diabetes (CARVALHO-FILHO et al., 2005; PAULI et al., 2008), isquemia cerebral (GU et al., 2002; MIAO et al., 2015), doença de Parkinson (SUNICO et al., 2013), doença de Alzheimer (CHO et al., 2009), câncer (CALMELS et al., 1997; RAHMAN et al., 2010; GUAN et al., 2012) como também com a sepse (LIU et al., 2004).

### 1.2.2. S-nitrosilação de proteínas: Mecanismos e especificidade

Muitos mecanismos de S-nitrosilação vêm sendo propostos, incluindo:

a) Reação do  $\text{NO}^+$  com o grupamento tiol de um resíduo de cisteína (Esquema 5A). O estado redox  $\text{NO}^+$  pode ser gerado pela presença de íons metais, como também a partir de doadores de NO (LIM et al., 2008);

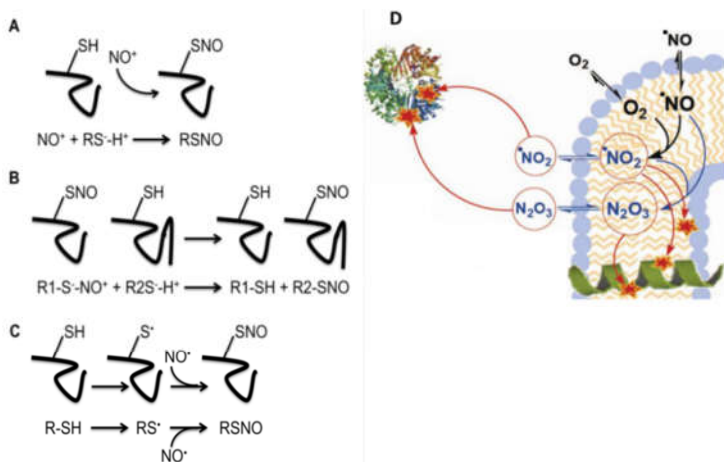
b) Reação de transnitrosilação (Esquema 5B). Ocorre quando tióis captam o NO a partir de S-nitrosoproteínas ou de outros SNO de baixo peso molecular, permitindo a transferência de NO entre resíduos de cisteína. Em seguida, o ânion tiolato promove um ataque nucleofílico no nitrogênio do S-nitrosotiol, resultando em um composto intermediário (dissulfeto de nitrosil) que decai para tiolato e nitrosotiol. Esta transferência de NO é determinada principalmente pela diferença redox entre a nitrosocisteína e a sua proteína vizinha que contém um tiol livre (SCHARFSTEIN et al., 1994; NAKAMURA e LIPTON, 2013). Isto sugere que além da produção de NO, a interação proteína-proteína pode favorecer a formação de nitrosoproteínas e regular, desse modo, vias SNO de sinalização celular;

c) Formação do radical tiil ou tiol ( $\text{RS}^{\bullet}$ ) (Esquema 5C). A associação física entre duas proteínas e radicais livres de oxigênio altera o estado redox de aminoácidos e, conseqüentemente facilita a formação de uma proteína reativa com radical tiil, a qual é mais suscetível a S-nitrosilação. Este radical por sua vez, se comporta como um nucleófilo e reage com  $\text{NO}^{\bullet}$  resultando a formação SNO (EVANGELISTA et al., 2013);

d) Formação da espécie nitrosilante  $\text{N}_2\text{O}_3$  (Esquema 5D). O  $\text{N}_2\text{O}_3$  age como um agente de transferência de  $\text{NO}^+$  para as sulfidrilas livres. Porém, para que haja a formação de  $\text{N}_2\text{O}_3$ , é necessário que o  $\text{NO}^{\bullet}$  esteja em quantidades suficientes para interagir com  $\text{O}_2$ . Entretanto, devido ao ambiente redutor celular e à cinética química, concentrações milimolar de NO são necessárias para produzir concentrações femtomolar de  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Conseqüentemente, a relevância biológica deste mecanismo pode

estar limitada a alguns microambientes celulares. O ambiente hidrofóbico das membranas celulares (membrana plasmática, membrana mitocondrial e nuclear) facilita a difusão de  $\text{NO}^{\bullet}$  e  $\text{O}_2$  e, por conseguinte resulta em maior taxa de reação, favorecendo a formação de  $\text{N}_2\text{O}_3$  (MÖLLER et al., 2007; LIM et al., 2008; SMITH e MARLETTA et al., 2012);

- e) Acidificação do nitrito (Esquema 5D). Em condições de baixo pH celular, o nitrito sofre protonação formando o agente nitrosilante  $\text{N}_2\text{O}_3$ . Esta reação pode ocorrer, por exemplo, durante condições de isquemia.



**Esquema 5: Formação de S-nitrosotióis.** **A.** O cation nitrosônio reage com as sulfidrilas livres na presença de elétrons aceptores formando S-nitrosotióis. **B.** A nitrosilação pode ocorrer através da transnitrosilação na qual o NO de um S-nitrosotiois é transferido para outra proteína com sulfidrilas livres. **C.** O radical tili ( $\text{RS}^{\bullet}$ ) reage com  $\text{NO}^{\bullet}$  e forma uma SNO. **D.** Em ambiente hidrofóbico das membranas celulares ocorre a reação entre  $\text{NO}^{\bullet}$  e  $\text{O}_2$  que leva a formação do  $\text{NO}_2$  e  $\text{N}_2\text{O}_3$  e a posterior S-nitrosilação de proteínas. O nitrito pode ainda ser protonado levando a formação de  $\text{N}_2\text{O}_3$  facilitando a S-nitrosilação (Adaptado de Möller et al., 2007; Evangelista et al., 2013).

Embora muitos tipos celulares expressem NOS e a maioria das proteínas endógenas possuam resíduos de cisteína, a S-nitrosilação não ocorre em todos os tíois livres. Um exemplo típico é o canal de cálcio sensível à rianodina, presente em células

musculares, que possui 50 tióis livres em sua estrutura, mas somente um deles sofre S-nitrosilação (EU et al., 2000). Portanto, para que a reação se processe, características específicas devem existir, tais como grau de ionização do tiol (nucleofilicidade) e compartimentalização hidrofóbica.

A proximidade com resíduos de aminoácidos básicos (arginina, histidina e lisina) e aminoácidos ácidos (aspartato e glutamato), como também a coordenação e interações eletrostáticas com aminoácidos com cadeias laterais aromáticas são fatores que promovem a ionização de tióis (STAMLER et al., 1997). Além disso, Nedospasov e colaboradores (2000) demonstraram que ambientes de alta hidrofobicidade dentro de proteínas promovem S-nitrosilação de resíduos de cisteína por concentrar mais NO e oxigênio molecular de natureza lipofílica, o que permite a formação de espécies nitrosantes eficazes ( $N_2O_3$ ), precisamente no local de um tiol hidrofóbico. Esta compartimentalização hidrofóbica pode surgir a partir de estrutura terciária de proteínas e/ou interações proteína-proteína.

Apesar de estas características bioquímicas serem importantes para a formação de SNO, elas podem ocorrer na maioria das proteínas *in vivo*, e, portanto, não podem ser completamente responsáveis pela S-nitrosilação. Marino e Gladyshev (2010) afirmaram que a proximidade com aminoácidos básicos e ácidos, bem como a hidrofobicidade não são suficientes para explicar a S-nitrosilação. Contudo, eles observaram que além da aproximação física com as NOS aminoácidos com cadeias laterais ácidas e básicas com distâncias pequenas entre si (cerca de 8 Å) facilitam a interação proteína-proteína promovendo a transnitrosilação.

### 1.2.3. Desnitrosilação de proteínas

Uma característica importante da S-nitrosilação de proteínas é o seu caráter reversível. É através desta característica que muitos mecanismos de sinalização celular são processados.

Em relação ao mecanismo, a desnitrosilação de proteínas pode ocorrer por duas maneiras distintas: por ação não-enzimática e enzimática.

Exposição ao calor, luz, presença de metais de transição (ex:  $Fe^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ), alterações no pH, bem como agentes redutores e oxidantes, são fatores que prédispõem à liberação de NO por

decomposição de S-nitrosotióis (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2013). Dados ainda não publicados do nosso laboratório mostraram, por exemplo, que a desnitrosilação de proteínas induzida por um agente oxidante de sulfidrila, o DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzóico), reverte a hiporreatividade a vasoconstritores em anéis de aortas incubadas com doador de NO (SNAP, S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina) (TERLUK, 2005) e melhora a resposta pressora à fenilefrina de animais previamente infundidos com doadores de NO (BENEDET, 2013).

Estudos vêm mostrando que enzimas desnitrosilases regulam a catálise de SNO *in vitro*, como por exemplo, a xantina oxidase, a gama-glutamil transpeptidase, a carbonil redutase, a proteína isomerase de dissulfeto e a glutatona peroxidase. Entretanto, a participação fisiológica destas enzimas na remoção do NO de SNO ainda não está clara (ANAND e STAMLER, 2012). Por outro lado, evidências mostram que a S-nitrosoglutationa redutase (GSNOR) (WHALEN et al., 2007; SIPS et al., 2013), a tiorredoxina redutase (TrxR) (BENHAR et al., 2008; OZAWA et al., 2008), a ceruloplasmina (MANI et al., 2004) e a S-nitroso-CoA redutase (ANAND et al., 2014) são cruciais para a regulação de SNO endógenos. Estas desnitrosilases contribuem para limitar a ação de S-nitrosotióis protegendo a célula de uma S-nitrosilação desregulada (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2013).

#### **1.2.4. A S-nitrosilação de proteínas na sepse**

Os primeiros indícios da contribuição da S-nitrosilação para a patogênese e a piora do quadro séptico vieram através do trabalho de Westenberger e colaboradores (1990), ao observarem o aumento da S-nitrosilação do grupamento heme da hemoglobina em ratos sépticos. Posteriormente, Jourdeuil e colaboradores (2000) mostraram que 5 horas após a administração de LPS há aumento de cerca de 25 vezes dos níveis de nitrosohemoglobina (SNO-Hb) circulantes, ao mesmo tempo que triplica a concentração plasmática de nitrosoalbumina em ratos endotoxêmicos. Estes autores igualmente verificaram o aumento da SNO-Hb circulantes em pacientes sépticos. A formação de SNO-Hb é importante fonte de NO endógeno, responsável pelo transporte de NO para todo o organismo, e sua produção contribui para o vasorelaxamento e manutenção da

pressão arterial (JIA et al., 1996). No entanto, níveis elevados de SNO-Hb podem comprometer a manutenção do tônus vascular resultando em hipotensão arterial grave (LIU et al., 2004).

Estudos apontam que a S-nitrosilação de proteínas também está relacionada com a depressão miocárdica séptica. Sips e colaboradores (2013) demonstraram que camundongos endotoxêmicos com prejuízo da função cardíaca apresentam aumento dos níveis de proteínas cardíacas nitrosiladas. Além disso, os autores mostraram que animais transgênicos que expressam níveis elevados da GSNOR possuem níveis diminuídos de proteínas cardíacas nitrosiladas, função cardíaca preservada, e aumento da sobrevivência após serem submetidos à endotoxemia. Por outro lado, um estudo realizado por Liu e colaboradores (2004) mostrou que camundongos *knockout* para a GSNOR apresentam hipotensão arterial espontânea e uma maior taxa de mortalidade quando desafiados pelo LPS ou submetidos ao CLP.

Além do envolvimento na disfunção cardiovascular séptica, trabalhos mostraram que a S-nitrosilação participa de outros aspectos fisiopatológicos. KÜPER e colaboradores (2012) verificaram que o comprometimento da função renal durante a sepse estaria relacionado com a S-nitrosilação do fator nuclear de células T ativadas 5 (NFAT5). Foi observado que receptores CD40 de macrófagos inativos de camundongos e monócitos humanos estariam constitutivamente nitrosilados, mas passariam para o estado desnitrosilado durante a sepse, sendo que esta desnitrosilação do receptor levaria ao comprometimento de sua função (GODOY et al., 2010). Por outro lado, o aumento da S-nitrosilação durante a sepse induz a degradação da proteína cinase LKB1 (LKB1, do inglês *Liver Kinase B1*) de macrófagos de camundongos, e contribui desta forma, para o desequilíbrio da resposta inflamatória (LIU et al., 2015).

## 2. JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Não resta dúvida que o NO é um dos principais mediadores responsáveis pela patogênese da sepse. Porém, apesar do uso de inibidores das NOS e da GCs melhorarem vários aspectos hemodinâmicos em modelos animais, o seu uso na clínica não surtiu nenhum efeito positivo na sobrevivência de pacientes sépticos, embora a hipotensão fosse melhorada. Se a falha destes ensaios clínicos está relacionada com o fracasso da estratégia de inibição das NOS e da GCs ou se fatores como dosagem, tempo e seletividade dos inibidores foram importantes, ainda não está totalmente esclarecido. Além disso, em nenhum momento estes ensaios consideraram um ponto relevante: a S-nitrosilação de proteínas.

A S-nitrosilação apresenta um papel importante (e pouco explorado) para a piora do quadro séptico, porque além de poder modificar a estrutura e a função de proteínas, prolonga os efeitos do NO, mesmo quando a expressão das NOS está em níveis basais. Isto poderia explicar, talvez, o motivo dos inibidores da NOS e da GCs não surtirem efeitos positivos em tempos tardios da sepse porque o excesso de NO produzido em tempos iniciais já foi suficiente para S-nitrosilar proteínas e prolongar desta forma, sua toxicidade. Neste contexto, portanto, resolvemos investigar se a desnitrosilação de proteínas poderia resultar em efeitos benéficos para animais sépticos.

### **3. HIPÓTESE DO TRABALHO**

A desnitrosilação de proteínas poderia exercer efeitos benéficos para a função cardiovascular, diminuir o dano/disfunção de órgãos e prolongar a sobrevivência de animais sépticos, mesmo quando o choque séptico já está instalado.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1.OBJETIVOS GERAIS**

Este trabalho tem como objetivo principal investigar os efeitos da S-nitrosilação/desnitrosilação de proteínas na disfunção cardiovascular e no dano/disfunção de órgãos durante o choque séptico. Para melhor compreender este papel, utilizaremos como tratamento um agente oxidante de sulfidrilas, o 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB).

#### **4.1.1.OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a)** Avaliar a participação da S-nitrosilação/desnitrosilação de proteínas na disfunção cardiovascular de animais submetidos ao modelo de ligadura e perfuração do ceco;
- b)** Avaliar o envolvimento da S-nitrosilação/desnitrosilação de proteínas no dano/disfunção hepática, no dano cardíaco, na função renal, nas alterações hematológicas e no perfil glicêmico de animais sépticos;
- c)** Avaliar as consequências da desnitrosilação de proteínas na sobrevida de animais após a indução da sepse;
- d)** Investigar os efeitos do DTNB sobre os níveis de SNO em aortas de animais sépticos, notadamente sobre canais de potássio sensíveis ao cálcio de alta condutância.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1. Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas pesando entre 200 a 250 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos em local com temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2$  °C) e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h) com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC (CEUA/UFSC) sob o Protocolo PP00790.

### 5.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 5.2.1. Modelo de sepse experimental: ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A indução da sepse foi realizada de acordo com Rittirsch e colaboradores (2008) com algumas modificações. Os animais foram sedados por via i.p com cloridrato de xilazina (5 mg/Kg) e analgesiados com cloridrato de tramadol (10 mg/Kg). Posteriormente, os animais foram acomodados em uma câmara de respiração para a indução de anestesia com oxigênio-isoflurano a 5%. Após a indução da anestesia, os animais foram colocados sobre uma manta aquecida a 37 °C, e a anestesia foi mantida por uma máscara facial com inalação contínua da mistura de isoflurano (3%) e oxigênio (100%) via respiração espontânea durante todo o procedimento cirúrgico. O anestésico local lidocaína a 2% (sem vasoconstritor) foi administrado na região da linha alba para a posterior incisão. Após o procedimento anestésico, foram realizados laparotomia com incisão de aproximadamente 1 cm e subsequente exposição e ligadura não obstrutiva do ceco, abaixo da válvula íleocecal. Foi realizada uma perfuração transfixante no ceco dos animais com agulha 14 G, seguida de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Posteriormente o ceco foi recolocado na cavidade abdominal e a camada muscular foi suturada (fio de nylon 3-0), seguida do clameamento da pele com grampos metálicos (Auto Clip 9 mm Applier, MikRon Precision Inc. Marysville, Washington, Estados Unidos). Após a sutura, os

animais receberam 10 mL de PBS s.c. aquecida (~36°C) para reposição fluidica e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (60 a 120 minutos). Visando diminuir o desconforto e o sofrimento dos animais, foi administrado cloridrato de tramadol (5 mg/kg, s.c.) em intervalos de 12 horas até a 48ª hora pós-cirúrgica.

### **5.2.2. Anéis de aorta torácica isolada**

A aorta torácica dos animais foi removida e colocada em uma placa de Petri contendo solução de Krebs-Ringer, (composição em mM: 131,3 NaCl, 4,7 KCl, 1,18 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,17 MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 14,9 NaHCO<sub>3</sub>, 5,5 Dextrose, 1,6, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 0,08 EDTA) para retirada cuidadosa dos tecidos conectivos e secção em forma de anéis de 3 a 4 mm de comprimento. Dois ganchos metálicos foram inseridos na luz dos mesmos e foram transferidos para cubas de vidro, contendo solução de Krebs-Ringer, conectadas a um transdutor de tensão isométrica, que por sua vez foi acoplado a um sistema de aquisição de dados (modelo PowerLab, AD Instruments, Austrália). A tensão basal utilizada foi de 2 g e os anéis foram mantidos com solução nutritiva a 37° C, pH 7,4 e borbulhada continuamente com uma mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>).

### **5.2.3. Avaliação da pressão arterial média (PAM)**

Neste estudo, utilizamos o modelo de medida direta da pressão arterial de animais anestesiados com cetamina/xilazina (90/15 mg/kg), injetada pela via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35 a 36°C). Em seguida, a veia femoral esquerda foi dissecada para a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50). Este acesso venoso destinou-se à administração de drogas. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina sódica, diluída em 100 µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS), segundo a formulação de Dulbecco (composta por, em mM: 137 NaCl, 2.7 KCl, 1.5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, e 8.1 NaHPO<sub>4</sub>, pH 7.4), foi injetada para prevenir a formação de coágulo e a obstrução das cânulas. Para facilitar a respiração espontânea, os animais foram submetidos à traqueostomia. Na

sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Com o auxílio de uma linha de sutura, o fluxo sanguíneo foi interrompido na altura da extremidade distal, enquanto o fluxo em sua extremidade proximal foi temporariamente suprimido pela compressão com uma pinça curva. Utilizou-se uma tesoura oftálmica, para realizar um pequeno corte na região medial da porção da artéria carótida clampeada, o qual serviu para a inserção de um catéter de polietileno heparinizado, que foi firmemente amarrado à artéria e conectado a um transdutor de pressão ligado a um equipamento de análise de pressão arterial ADInstruments (Austrália). A reatividade vascular foi avaliada através da injeção de três doses crescentes de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg; i.v.). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minutos) foram registrados por um software de integração Chart versão 7 (ADInstruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Ao término dos experimentos, todos os animais foram eutanasiados com doses elevadas de cetamina e xilazina.

#### **5.2.4. Coleta de sangue e aorta**

Para coleta das amostras de sangue e de órgãos os animais foram eutanasiados com uma mistura com doses elevadas de cetamina e xilazina injetada pela via intraperitoneal. Após abertura da cavidade torácica, aproximadamente 4 mL de sangue foram coletados por punção cardíaca. Para os ensaios hematológicos, o sangue foi coletado em tubos contendo 2 mg/mL de EDTA (2 mg/mL de sangue). Parte do sangue foi coletado em tubos contendo heparina, 5 UI/ml de sangue para posterior análise bioquímica. Para dosagem do lactato, o sangue foi coletado em tubos contendo fluoreto de sódio (1,5 mg/mL de sangue). As amostras foram centrifugadas em 1200 g por 8 min a 4°C.

Amostras de aortas torácicas foram removidas e colocadas em uma placa de Petri contendo PBS gelado para retirada cuidadosa dos tecidos conectivos. Para o ensaio de biotilação (*Biotin switch*) as aortas coletadas foram imediatamente processadas. Já para o ensaio de *Western blotting*, as aortas foram colocadas em nitrogênio líquido. As aortas coletadas para o ensaio de imunofluorescência foram fixadas com solução de PFA

a 4% por 14 horas e imersas em solução de sacarose a 20% por 3 h e posteriormente congeladas em Tissue Tek (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, USA). O plasma e as aortas (para *Western blotting* e imunofluorescência) foram armazenados em freezer - 80 °C até o momento das análises, por um período nunca superior a 3 semanas (plasma) e 1 semana (aortas).

### **5.2.5. Dosagem de nitrito e nitrato (NO<sub>x</sub>)**

Os níveis de NO<sub>x</sub> foram mensurados pelo método de Griess como descrito previamente (GRANGER et al., 1990). Para isso foi utilizado o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftiletilenodiamina em água de Milli-Q). O plasma foi desproteínizado pela adição de sulfato de zinco (2%). Para a conversão do nitrato para nitrito, as amostras foram incubadas a 37°C, durante 2 h, em presença de nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após a conversão enzimática do nitrato a nitrito, as amostras foram centrifugadas para a remoção das bactérias, e 100 µL do sobrenadante foram misturados a 100 µL de reagente de Griess, e após 10 min, realizou-se a leitura em 540 nm em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Os resultados foram expressos como µM de NO<sub>x</sub>.

### **5.2.6. Dosagem da glicemia e análises hematológicas**

A glicose foi determinada por exposição de uma gota de sangue em um glicosímetro (Accu Chek Active®, Roche, Mannheim, Alemanha) e os resultados foram expressos em mg/dL. A análise hematológica foi realizada em contador hematológico automatizado (HORIBA ABX®, Micros 60; Montpellier, França). Foram avaliados o hematócrito, a concentração de hemoglobina, o número de leucócitos totais, linfócitos, monócitos, granulócitos e plaquetas.

### **5.2.7. Dosagens bioquímicas**

#### **5.2.7.1. Lactato**

O lactato plasmático foi determinado através do kit comercial Labtest (R138, Labtest Diagnostica S/A, Lagoa Santa,

MG, Brasil). O lactato é determinado através da sua conversão em piruvato e peróxido de hidrogênio mediada pela lactato oxidase. Em seguida o peróxido de hidrogênio reage com aminoantipirina e N-Etil-N-(2-hidroxi-3-sulfopropil)-3-methylaniline produzindo quinoneimina. A absorbância da quinoneimina produzida é proporcional à concentração de lactato na amostra. A absorbância foi detectada em espectrofotômetro com absorbância de 550 nm. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL de lactato.

### **5.2.7.2. Aspartato transaminase (AST)**

A AST plasmática foi mensurada através do kit comercial Bioclin (K034, Belo Horizonte, MG). O princípio se baseia na metodologia cinética colorimétrica de tempo fixo (Reitman e Frankel, 1957). Conforme esta metodologia, a transaminase catalisa a transferência do grupamento amino do aspartato para o alfa-cetoglutarato com formação de glutamato e alfa-oxalacetato. O oxalacetato reage com a dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima em meio alcalino. A coloração é diretamente proporcional à concentração enzimática da amostra. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, sendo a leitura realizada em 505 nm em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em U/mL de AST.

### **5.2.7.3. Alanina transaminase (ALT)**

A determinação da concentração ALT plasmática foi realizada com o kit comercial da Bioclin (K035, Belo Horizonte, MG). A transaminase transfere um grupamento amino de um alfa-Aminoácido para um alfa-cetoácido resultando na geração de piruvato, que reage formando um composto de cor em pH alcalino. A intensidade de cor formada é diretamente proporcional à quantidade de ALT na amostra. A absorbância foi realizada em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça) com absorbância de 505 nm. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em U/mL de ALT (Reitman e Frankel, 1957).

#### **5.2.7.4. Ureia**

A ureia plasmática foi mensurada através do kit comercial Labtest (R27, Labtest Diagnostica S/A, Lagoa Santa, MG, Brasil). A ureia é hidrolisada pela urease em íons amônia e  $\text{CO}_2$ . Em meio alcalino, os íons amônia reagem com salicilato e hipoclorito de sódio, que na presença do nitroprussiato de sódio, resulta o indofenol. A intensidade de cor formada é diretamente proporcional à concentração de ureia na amostra analisada. A absorbância do complexo azul formado é medida em 600 nm por meio de um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL de ureia.

#### **5.2.7.5. Creatinina**

A creatinina plasmática foi mensurada através do kit comercial Labtest (R35, Labtest Diagnostica S/A, Lagoa Santa, MG, Brasil). Em pH alcalino, a creatinina reage com ácido pícrico, formando um complexo corado Creatinina-Picrato e também com outros elementos plasmáticos. Posteriormente foi adicionado o Reagente Ácido, que reduz o pH e a cor devida à creatinina é desfeita, permanecendo a cor devida aos cromogênios. A diferença entre as leituras obtidas no pH alcalino e ácido, obtém-se o valor real da creatinina. A absorbância é medida em 600 nm por meio de um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL de creatinina.

#### **5.2.7.6. Creatina cinase fração MB (CK-MB)**

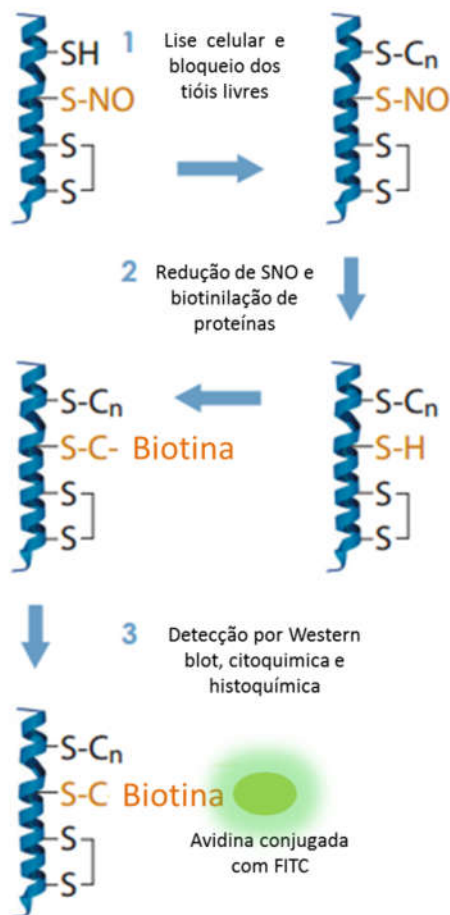
A determinação da concentração da CK-MB nas amostras de plasma foi realizada através do kit comercial Labtest (R118, Labtest Diagnostica S/A, Lagoa Santa, MG, Brasil). A amostra é incubada com o reagente que contém um anticorpo específico que inibe completamente a atividade enzimática do monômero CK-M. A quantificação do monômero CK-B, que não é inibida pelo anticorpo, é medida através da desfosforilação da creatina fosfato pela CK-B e produção da adenosina trifosfato (ATP). O ATP por sua vez reage com a glicose na presença da hexocinase (HK)

produzindo glicose-6-fosfato. A glicose-6-fosfato na presença da glicose-6-fosfato desidrogenase (G-6-PDH) é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) e reduz o NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorvância em 340 nm é proporcional à atividade da CK-B na amostra. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em U/L de CK-MB.

### **5.2.8. Ensaio de biotilação para detecção de proteínas nitrosiladas (*Biotin switch*)**

Para a detecção de proteínas nitrosiladas foi realizado o ensaio *Biotin switch* através de um kit comercial (Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) de acordo com Jaffrey e colaboradores (2001) com algumas modificações (Esquema 6). Esse ensaio detecta proteínas S-nitrosiladas através da substituição do grupo NO ligado ao resíduo de cisteína pela biotina. Após a coleta as aortas foram imersas em nitrogênio líquido e pulverizadas. Posteriormente foi adicionado um agente de bloqueio de sulfidrilas, por 30 min, a 4°C no escuro. Em seguida, foram adicionados 10 volumes de acetona gelada (-20°C) para a precipitação e remoção do agente de bloqueio das amostras e mantidas durante a noite a 4°C e no escuro. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 10 min a 4°C. Posteriormente, a acetona foi retirada e foi adicionado o agente redutor de sulfidrilas e a maleimida ligada à biotina e incubado por 1 hora em temperatura ambiente. Novamente, as amostras foram incubadas com acetona gelada (-20°C), por 1 hora, a 4°C. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 3000 g por 10 min a 4°C e descartada a acetona. Os *pellets* foram resuspenso em um tampão fornecido pelo fabricante. Para detecção de proteínas biotiladas por Western blot, as amostras foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF). As membranas foram bloqueadas com albumina de soro bovino a 2% por 1 h em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram lavadas e incubadas em temperatura ambiente, por 1 h com avidina ligada a fluoresceína, diluição 1:350. Para detecção da fluorescência foi utilizado o equipamento Typhoon FLA 9000 scanner (GE Healthcare Life Sciences, SP, Brazil) com 490 nm de excitação. A fluorescência foi quantificada usando o programa NIH ImageJ 1.50i imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA).





**Esquema 6: Representação esquemática do ensaio de *Biotin Switch*.**

Proteínas podem apresentar resíduos de cisteínas com tiol livre, nitrosotiol e ligação dissulfeto. Os tióis livres são derivatizado pelo agente de bloqueio, tornando-os não reativos. O agente de bloqueio que não reagiu com tióis livres é removido por precipitação com acetona. Depois, os nitrosotióis são reduzidos pela ação do ácido ascórbico (agente redutor) formando tiol, o qual reage covalentemente com a biotina-maleimida. A revelação é feita por western blotting e a detecção da biotilação é realizada pela ligação a avidina conjugada com FITC. Adaptado de Cayman Chemical Company (2016).

## 5.2.9. Imunofluorescência

Com auxílio de um criostato (Leica CM 1850 UV Biosystems Leica, Wetzlar, Germany) as aortas foram cortadas (8 µm) e os cortes foram colocados em lâminas previamente gelatinizadas. Os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica, e foram bloqueados por 1 h com soro bovino fetal 5%. Após o bloqueio, os cortes foram incubados durante a noite, a 4°C, com anticorpo primário anti-SNO (1:200, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e com o anticorpo primário anti-BKCa (1:200, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Um corte foi utilizado como controle negativo, isto é, não recebeu o anticorpo primário. No dia seguinte, os cortes foram lavados 3 vezes com PBS e incubados com os anticorpos secundários anti-IgG conjugados com Alexa Fluor 488 (1:700) e 594 (1:800) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) por 1h em temperatura ambiente. Após a incubação, os cortes foram novamente lavados 3 X com PBS e depois foram colocadas lamínulas sobre as lâminas utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As lâminas foram acondicionadas em ambiente escuro e úmido e mantidas a 4°C até o momento da leitura.

Para leitura, foi utilizado um microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000B®, Wetzlar, HE, Germany). A aquisição das imagens foi realizada através do software LAS AF Lite® (Leica Microsystems®, Wetzlar, HE, Germany). Foram feitos pelo menos 3 cortes de cada animal de cada grupo experimental (n = 3 a 4 por grupo). Foram feitas 10-12 imagens por seção. A quantificação da intensidade relativa de fluorescência foi realizada pelo software NIH ImageJ 1.50i imaging software (NIH, Bethesda, MD, USA). Os resultados foram expressos em intensidade relativa de fluorescência comparados com o grupo controle.

## 5.2.10. Imunoeletroforese – *Western blotting*

### 5.2.10.1. Preparo das amostras e dosagem de proteínas

As amostras foram pulverizadas e foi adicionado tampão de lise (Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil [PMSF] 100 mM, coquetel de inibidores de proteases 1%

[P8340], Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA. O tampão de lise foi preparado em T-Per (Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), e homogeneizadas por sonicção (60 Watts, 5 segundos). Os homogenatos foram centrifugados a 14.000 g por 30 minutos a 4°C. Uma parte do sobrenadante obtido foi separada para a dosagem de proteína através do método de Bradford (Bradford, 1976). No restante do sobrenadante foi adicionado o mesmo volume de tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas (95 °C; 8 min) e armazenadas a -80 °C até o momento da eletroforese.

### 5.2.10.2. Separação de proteínas e imunodeteção

As proteínas foram separadas por eletroforese. Para isso, foi utilizado um gel de separação (acrilamida 8%, bis-acrilamida 0,2%, Tris 375 mM, SDS 0,1%, TEMED 0,06% e persulfato de amônia 0,04%) e um gel de entrada (acrilamida 4%, bis-acrilamida 0,09%, Tris 125 mM, SDS 0,1%, TEMED 0,08% e persulfato de amônia 0,03%). As amostras (75 µg/poço) e o padrão (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, BioRad, CA, EUA) foram aplicados nos géis e a eletroforese foi realizada a 90 V, por aproximadamente 2 h, utilizando-se tampão de corrida. Posteriormente, foi realizada a transferência das proteínas para uma membrana de nitrocelulose (100 V, 1 h, 4 °C). Após a transferência, as membranas foram coradas com vermelho de *Ponceau* a 0,2% para visualização das proteínas. As membranas foram lavadas 3 vezes com TBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, Tween-20 0,05%), para a retirada do excesso do corante. Em seguida foi realizado o bloqueio da membrana com TBS-T contendo leite desnatado a 5% por 1 hora a temperatura ambiente. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpo primário anti-BKCa (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), ou actina conjugado com peroxidase (1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Ao término do período de incubação, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes TBS-T, e em seguida, incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (1:5000, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) por 1 h em

temperatura ambiente. O anticorpo que não se ligou à proteína foi retirado através de lavagens com TBS-T. A revelação foi realizada através da incubação da membrana com a solução do kit de quimiluminescência (ECL; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA) por 1 minuto. A revelação foi feita através de um fotodocumentador (ChemiDoc, BioRad Laboratories, Hercules, CA, EUA). As análises quantitativas das bandas foram realizadas por densitometria com o auxílio do programa Image Lab (versão 4.1; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA).

### 5.3.PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 5.3.1. *Avaliação dos efeitos do ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB) na reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta*

As ratas foram submetidas ao CLP e randomizadas para receber DTNB (63  $\mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) ou veículo (bicarbonato de sódio a 5%) 12 horas após a indução da sepse. Vinte e quatro horas após a cirurgia, as aortas foram obtidas conforme a descrição no Item 5.2.4. A dose de DTNB foi escolhida com base nos resultados anteriores do nosso laboratório (TERLUK E ASSREUY, 2005). Para minimizar a manipulação de animais, usamos animais *naïve* tratados com veículo como controles ao longo dos experimentos.

Após a montagem das aortas, foi mantido um período de estabilização de 60 minutos das preparações. Durante a estabilização, a solução fisiológica foi trocada a cada 15 min. Ao final, a solução nutritiva das cubas foi substituída por uma solução de cloreto de potássio (KCl, 120 mM), para teste de atividade biológica das preparações de aorta. Após o platô da resposta ao KCl, as preparações foram lavadas 3 vezes consecutivas e passaram por um novo período de estabilização de 30 minutos. Posteriormente, as aortas foram estimuladas com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) e após atingir o platô de contração, as preparações receberam acetilcolina (1  $\mu\text{M}$ ). Após um período de estabilização de 60 minutos, curva concentração-resposta (CCR) cumulativa para fenilefrina foi realizada (1 nM a 100  $\mu\text{M}$ ).

### ***5.3.2. Avaliação da ação do DTNB sobre os parâmetros cardiovasculares de animais sépticos***

Os animais receberam DTNB (63  $\mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) ou veículo 30 minutos antes do procedimento cirúrgico para estabelecimento do quadro séptico e após 8 horas os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média (Esquema 7; I). Foram então obtidas curvas dose-resposta para fenilefrina 3, 10 e 30  $\text{nmol/Kg}$ ; i.v.).

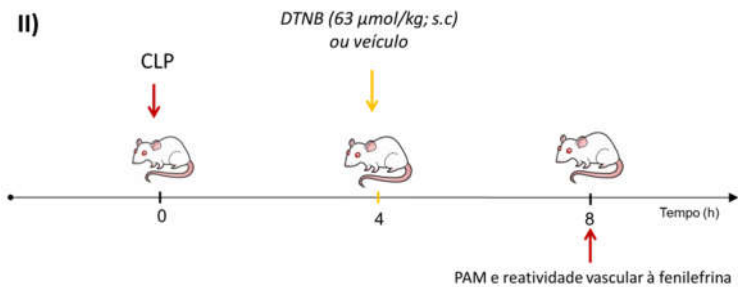
Em outro ensaio, os animais receberam DTNB (63  $\mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) ou veículo 4 horas após o CLP. Oito horas após a cirurgia, curvas dose-resposta para fenilefrina foram obtidas durante a medida direta da pressão arterial (Esquema 7; II).

Adicionalmente, foram avaliados os efeitos tardios do DTNB sobre a disfunção cardiovascular durante o choque séptico. Para isto, as ratas foram submetidas ao CLP e randomizadas para receber DTNB (63  $\mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) ou veículo 12 horas após a indução da sepse. Vinte e quatro horas após a cirurgia, a pressão arterial média e a resposta pressórica à fenilefrina (3, 10 e 30  $\text{nmol/Kg}$ ; i.v.) foram mensuradas. Animais controles foram submetidos somente a curvas dose-resposta para fenilefrina (Esquema 7; III).

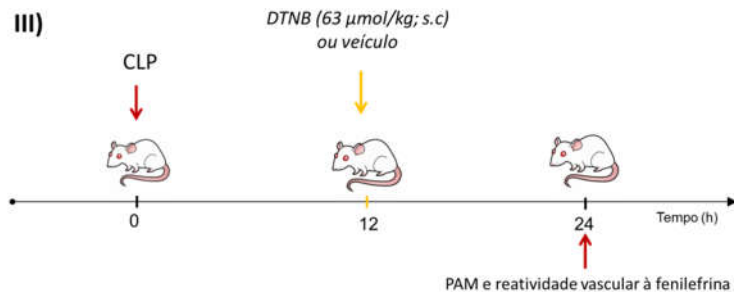
I)



II)



III)



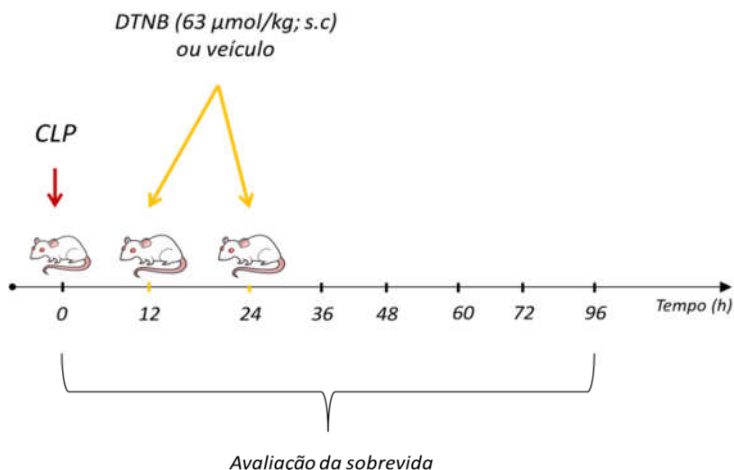
**Esquema 7:** Protocolo experimental I, II e III. Avaliação do efeito do DTNB sobre os parâmetros cardiovasculares de animais sépticos.

### 5.3.3. Avaliação do efeito do DTNB sobre os parâmetros hemodinâmicos, hematológicos e metabólicos de animais sépticos

Os animais foram submetidos ao CLP e randomizados para receber DTNB ( $63 \mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) ou veículo 12 horas após a indução da sepse. Decorridos vinte e quatro horas após o CLP, os animais foram eutanasiados e foram obtidas amostras de sangue para análises bioquímicas, hematológicas e glicêmicas.

### 5.3.4. Avaliação do efeito do DTNB sobre a sobrevida de animais submetidos ao CLP

Os animais submetidos ao CLP receberam DTNB ( $63 \mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) ou veículo 12 h e 24 h após o procedimento cirúrgico. Os animais controle foram tratados com DTNB no mesmo tempo. A sobrevida foi avaliada a cada 12 h ao longo de 96 h (Esquema 8).

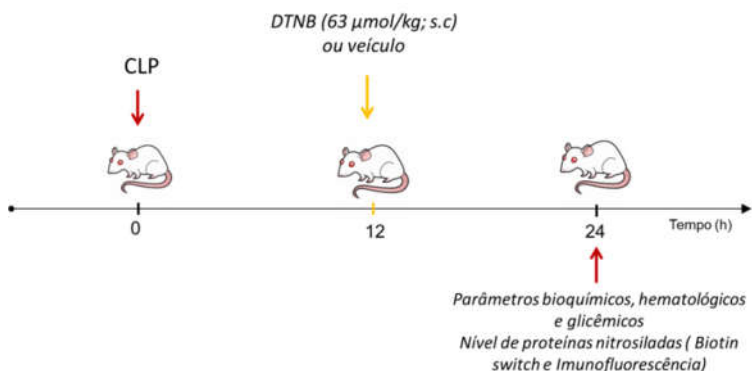


**Esquema 8:** Protocolo experimental. Avaliação do efeito do DTNB sobre a sobrevida de animais sépticos.

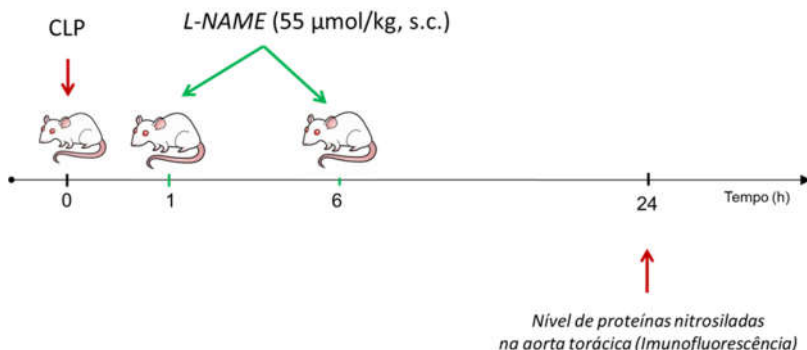
### 5.3.5. Efeito do DTNB sobre a S-nitrosilação de proteínas em aortas torácicas de ratos sépticas

As ratas foram tratadas com DTNB ( $63 \mu\text{mol/kg}$ ; s.c.) ou veículo 12 horas após o CLP. Vinte quatro horas após a indução da sepse, as ratas foram eutanasiadas e as aortas torácicas foram removidas para os ensaios de *biotin switch* e imunofluorescência.

Adicionalmente, um grupo de animais foi tratado com NG-nitro-L-arginina metil Ester (L-NAME) ( $55 \mu\text{mol/kg}$ , s.c.), 1 h e 6 h após o CLP. Vinte e quatro horas após a indução da sepse as aortas torácicas foram coletadas para o ensaio de imunofluorescência.



**Esquema 9:** Protocolo utilizado para os experimentos dos itens 5.3.4. e 5.3.5.



**Esquema 10:** Protocolo utilizado para o experimento do item 5.3.5.



## 5.4. Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. A análise estatística foi feita utilizando-se o teste de análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Os testes estatísticos foram feitos com o programa GraphPadPrism5 (San Diego, CA, USA).

## 5.5. Compostos e reagentes

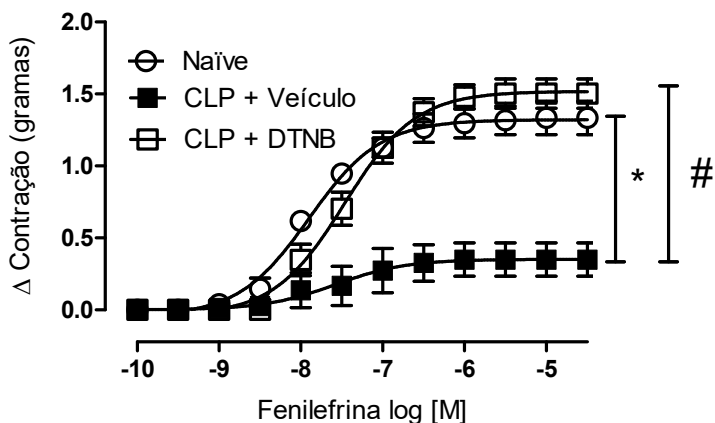
Neste estudo, foram utilizados os seguintes compostos: cloridrato de L-fenilefrina, bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ ), cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), cloreto de potássio ( $\text{KCl}$ ), fosfato de potássio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), fosfato de sódio ( $\text{NaHPO}_4$ ), (Merck, Brasil); o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB), L-NAME, meio de montagem aquoso Gel Mount™, albumina de soro bovino (BSA), Tris-HCl, PMSF, aprotinina, leupeptina, inibidor de tripsina, glicina, Tween-20, o anticorpo anti-SNO e anti-actina foram adquiridos da Sigma-Aldrich Co. LLC (St Louis, MO, EUA); kit de quimioluminescência e tampão de lise T-Per foram comprados da Thermo Scientific (Rockford, IL, EUA), padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, BioRad, CA, EUA); o anticorpo Anti-BKca foi adquirido da Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP); anti-IgG conjugado com Alexa Fluor 488 e Alexa Fluor 594 foram adquiridos da Invitrogen (Paisley, UK); O kit para detecção de proteínas nitrosiladas foi adquirido da Cayman Chemical Company (Ann Harbor, MI, USA); kits bioquímicos de ureia, creatinina, lactato, CK-MB foram adquiridos da Labtest Diagnostica S/A, Lagoa Santa, MG, Brasil e os Kits bioquímicos AST e ALT foram adquiridos da Bioclin (Belo Horizonte, MG). Cetamina (Dopalen™; Agribands do Brasil Ltda., Brasil), cloridrato de xilazina (Anasedan®; Vetbrands do Brasil Ltda., Brasil) e isoflurano (Isoflurine®; Cristália do Brasil Ltda., Brasil) foram comprados pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC. Todos os compostos foram diluídos para uso em PBS estéril, exceto DTNB que foi preparado em solução de bicarbonato de sódio a 5%.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Efeito do DTNB sobre a reatividade à fenilefrina em anéis de aorta

Investigamos se a S-nitrosilação de proteínas estaria relacionada com a hiporresponsividade a vasoconstritores em aortas de animais sépticos.

Pode-se observar na Figura 1 uma redução da resposta máxima à fenilefrina ocorreu nos anéis de aorta do grupo CLP quando comparados ao grupo controle. O tratamento dos animais com DTNB restabeleceu completamente a capacidade contrátil dos vasos. Não houve nenhuma alteração da resposta à fenilefrina em aortas de animais *naïve* tratados com DTNB quando comparados à resposta obtida em vasos do grupo controle (dados não mostrados).



**Figura 1: Efeito do DTNB na resposta à fenilefrina em anéis de aorta de ratas sépticas.** As ratas foram tratadas com DTNB 63  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) ou veículo (bicarbonato de sódio a 5%) 12 h após a indução da sepse. Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP, as aortas foram coletadas e montadas em banhos de órgãos isolados. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 3 anéis de 3 ratas diferentes por curva. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste post hoc de *Bonferroni*).

## 6.2.Efeito do DTNB sobre parâmetros cardiovasculares

Em seguida e considerando a melhora da resposta vasoconstritora à fenilefrina em anéis de aorta de animais sépticos tratados com DTNB, avaliamos se este efeito também ocorreria de forma sistêmica.

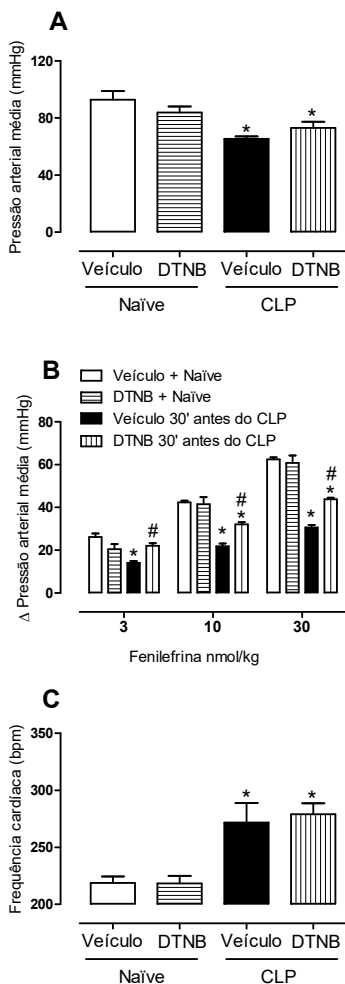
Os resultados mostram que 8 h (Figuras 2A e 3A) e 24 h (Figura 4A) após a instalação do quadro séptico pela cirurgia de CLP, os animais apresentaram uma diminuição substancial da pressão arterial média (PAM), prejuízo da resposta pressora à fenilefrina (Figuras 2B, 3B e 4B) e aumento da frequência cardíaca (Figuras 2C, 3C e 4C), reproduzindo assim uma das principais características do choque séptico humano, a disfunção cardiovascular.

O tratamento com DTNB 30 minutos antes (Figura 2A) ou 4 horas após o CLP (Figura 3A) não alterou a hipotensão arterial dos animais sépticos. Por outro lado, quando o tratamento com o DTNB foi realizado 12 horas após a sepse, a PAM dos animais sépticos foi normalizada (Figura 4A).

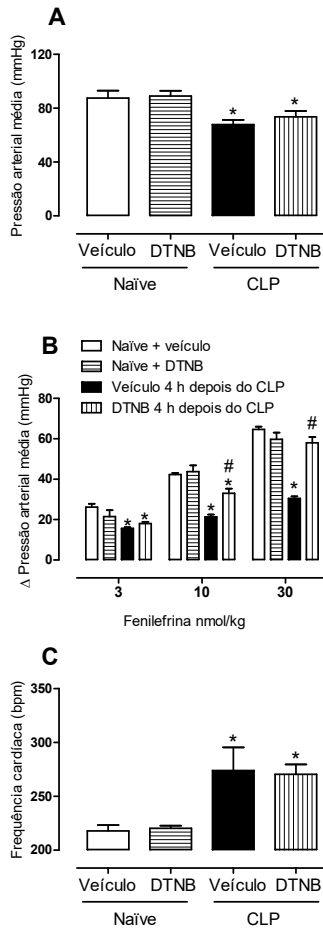
Em relação à resposta pressórica ao vasoconstritor fenilefrina, o tratamento com DTNB 30 minutos antes do procedimento cirúrgico preveniu totalmente a diminuição da resposta pressora à fenilefrina na dose 3 nmol/kg e parcialmente nas doses 10 e 30 nmol/kg (Figura 2B). Em contrapartida, quando os animais foram tratados com DTNB 4 h (Figura 3B) ou 12 h (Figura 4B) após o CLP a resposta ao vasoconstritor foi substancialmente restaurada.

Por fim, o tratamento com DTNB 30 minutos (Figura 2C) antes ou 4 horas após o CLP (Figura 3C) não alterou o aumento da frequência cardíaca dos animais sépticos. Em contrapartida, o tratamento com DTNB 12 horas após o CLP (Figura 4C) atenuou a taquicardia dos animais em choque séptico.

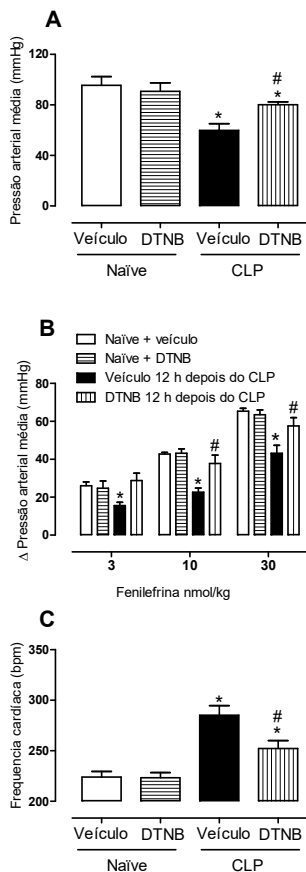
Deve-se ressaltar que o DTNB não alterou a PAM, nem a resposta pressórica  $\alpha_1$ -adrenérgica e nem a frequência cardíaca dos animais controles.



**Figura 2: Efeito do DTNB sobre parâmetros cardiovasculares de animais de ratas sépticas.** Trinta minutos antes do CLP, as ratas receberam DTNB ou veículo. Oito horas após a cirurgia foram avaliados a pressão arterial média (Painel A), a resposta à fenilefrina (Painel B) e a frequência cardíaca (Painel C). Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão da média de 5 ratas (grupo naïve + veículo e grupo naïve + DTNB) a 6 ratas (grupo CLP + veículo e grupo CLP + DTNB). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni).



**Figura 3: Efeito do DTNB sobre parâmetros cardiovasculares de animais de ratos sépticos.** Quatro horas após o CLP, as ratas receberam DTNB ou veículo. Oito horas após a cirurgia foram avaliados a pressão arterial média (Painel A), a resposta à fenilefrina (Painel B) e a frequência cardíaca (Painel C). Cada barra representa média  $\pm$  erro padrão da média de 4 ratas (grupo naïve + veículo e grupo naïve + DTNB) e 5 ratas (grupo CLP + veículo e grupo CLP + DTNB). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni).



**Figura 4: Efeito do DTNB sobre a pressão arterial e na resposta à fenilefrina de ratas sépticas.** Doze horas após o CLP, os animais receberam DTNB ou veículo. Vinte quatro horas após a cirurgia foram avaliados a pressão arterial média (Painel A), a resposta à fenilefrina (Painel B) e a frequência cardíaca (Painel C). Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 4 ratas (grupo naïve + veículo e grupo naïve + DTNB) a 5 ratas (grupo CLP + veículo e grupo CLP + DTNB). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

### 6.3.Efeito do DTNB sobre o dano/função de órgãos

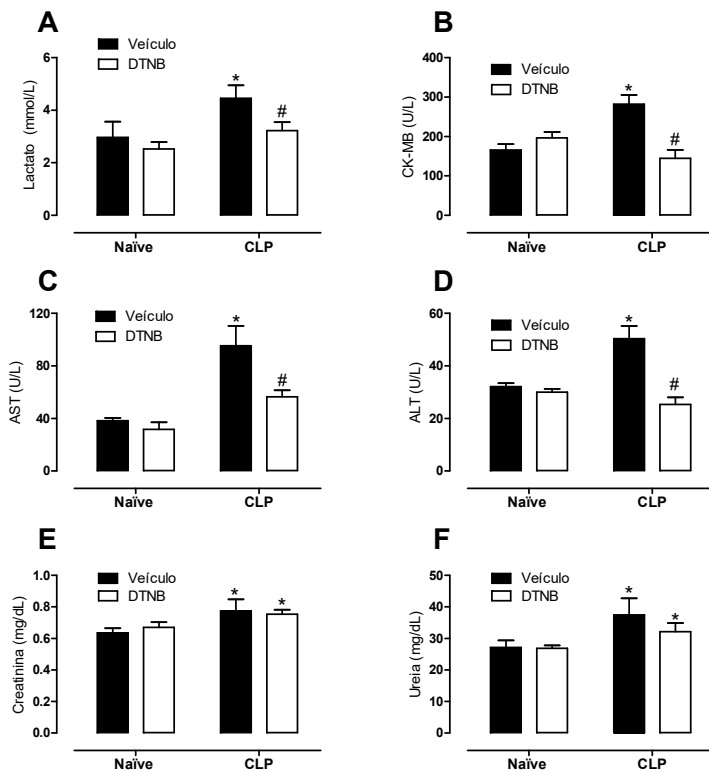
O prejuízo da função cardiovascular está associado com o comprometimento da perfusão tecidual. Devido a isso, investigamos se a melhora da função cardiovascular induzida pelo DTNB poderia ter consequências positivas sobre marcadores plasmáticos de dano/disfunção de órgãos nos animais sépticos.

Os animais sépticos exibiram aumento de lactato plasmático (Figura 5A), indicando hipóxia tecidual generalizada. A sepsé também induziu um profundo dano cardíaco como indicado pelo aumento dos níveis plasmáticos da CK-MB (Figura 5B). Além disso, as ratas sépticas apresentaram também aumentos nos níveis plasmáticos das enzimas aspartato aminotransferase (Figura 5C) e alanina aminotransferase (Figura 5D) sugerindo dano hepático grave. Os animais sépticos apresentaram disfunção renal evidenciado pelo aumento dos níveis plasmáticos de creatinina (Figura 5E) e de ureia (Figura 5F).

É interessante observar que o tratamento com DTNB 12 horas após o CLP reduziu lactato plasmático (Figura 5A). Além disso, o tratamento com DTNB reduziu os danos cardíaco e hepático (Figura 5B, 5C e 5D, respectivamente). Por outro lado, o tratamento não produziu nenhum efeito sobre a função renal de animais em choque séptico (Figura 5E e 5F).

É importante ressaltar que o tratamento com DTNB não produziu nenhuma consequência sobre os parâmetros avaliados em animais do grupo controle (Figura 5).



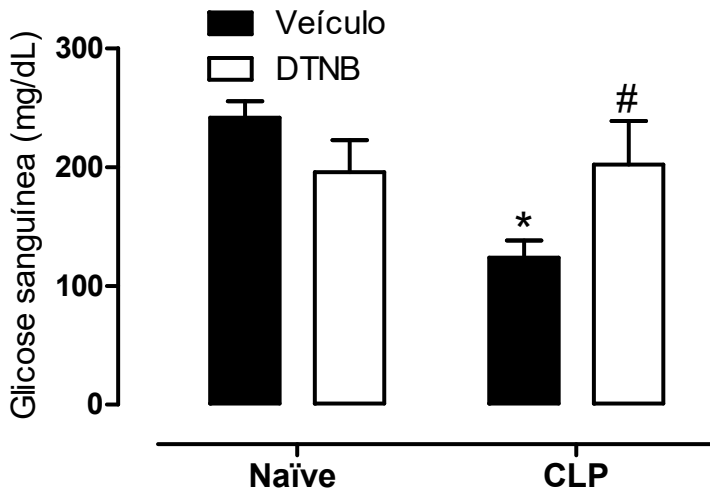


**Figura 5: Efeito do DTNB sobre os marcadores bioquímicos de dano/disfunção de órgãos em ratas sépticas.** Os animais foram tratados com DTNB ou veículo 12 h após indução da sepse. Vinte e quatro horas após CLP, foi obtido sangue e os níveis plasmáticos de lactato (Painel A), creatina quinase-MB (CK-MB, Painel B), aspartato aminotransferase (AST, Painel C), alanina aminotransferase (ALT, Painel D), creatinina (Painel E) e ureia (Painel F) foram mensurados. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média de amostras obtidas de 6 ratas (grupo naïve + veículo e grupo naïve + DTNB) a 7 ratas (grupo CLP + veículo e grupo CLP + DTNB). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de *Bonferroni*).

#### 6.4.Efeito do DTNB sobre a glicemia

A sepse promove um profundo desequilíbrio do metabolismo glicêmico. Inquirimos se os efeitos benéficos do DTNB poderiam ser observados também sobre o perfil glicêmico dos animais sépticos.

Vinte quatro horas após a sepse, os animais sépticos apresentaram hipoglicemia grave quando comparados ao grupo controle. Podemos observar ainda que o tratamento com DTNB promoveu a normalização dos níveis de glicose sanguínea (Figura 6).

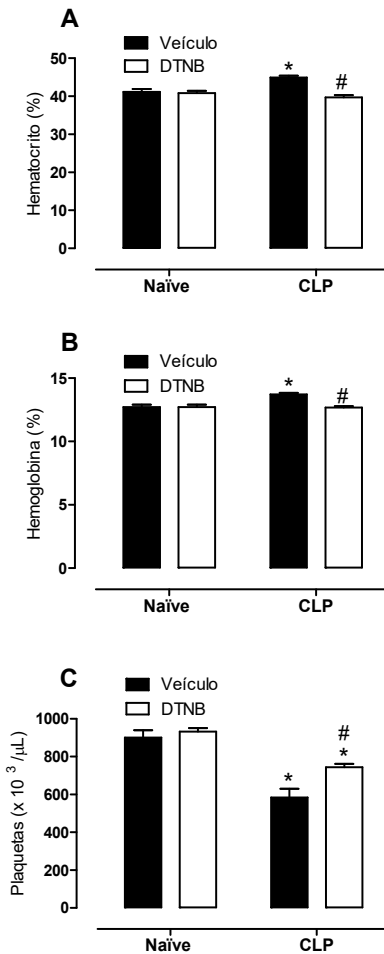


**Figura 6: Efeito do DTNB sobre os níveis de glicose sanguínea de ratos sépticos.** Os animais foram tratados com DTNB ou veículo 12 h após indução da sepse. Vinte e quatro horas após CLP foi obtido sangue e os níveis plasmáticos de glicose foram avaliados. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 ratos (grupo naïve + veículo e grupo naïve + DTNB) a 7 ratos (grupo CLP + veículo e grupo CLP + DTNB). \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni).

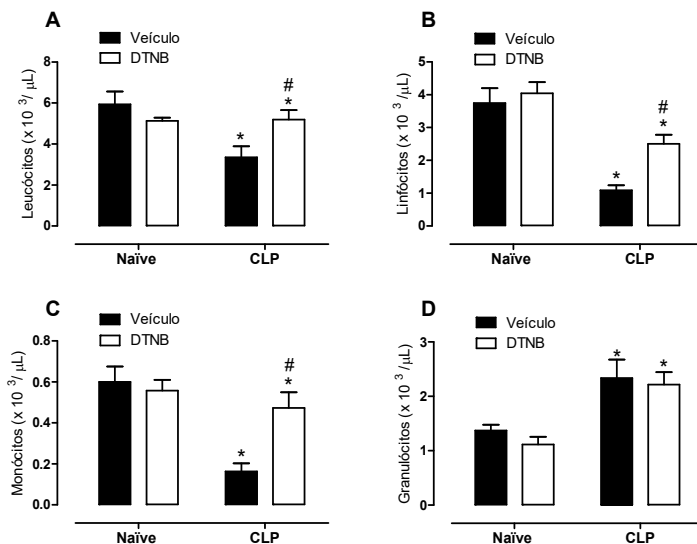
### **6.5.Efeito do DTNB sobre as alterações hematológicas**

Nossos resultados mostram que 24 h após o CLP os animais apresentaram aumentos tanto no hematócrito (Figura 7A) como da hemoglobina (Figura 7B). Além de alterações na série vermelha, os animais sépticos exibiram trombocitopenia grave quando comparados ao grupo controle (Figura 7C). Em relação à série branca, os animais sépticos apresentaram leucopenia (Figura 8A), com diminuição substancial do número de linfócitos e monócitos (Figuras 8B e 8C, respectivamente), bem como aumento de granulócitos (Figura 8D). O tratamento com DTNB 12 h após a sepse normalizou o hematócrito e o nível da hemoglobina, bem como aumentou o número de leucócitos totais sanguíneos e atenuou tanto a linfopenia, a monocitopenia e a trombocitopenia. Por outro lado, o tratamento com DTNB não produziu nenhum efeito sobre a granulocitose.

Os animais controle tratados com DTNB não apresentaram nenhuma alteração no hemograma.



**Figura 7: Efeito do DTNB sobre hematócrito, hemoglobina e o número de plaquetas sanguíneas de animais sépticos.** Os animais foram tratados com DTNB ou veículo 12 h após indução da sepse. Vinte e quatro horas após o CLP foi obtido sangue e os índices hematimétricos (Painéis A e B), bem como o número de plaquetas (Painel C) foram avaliados. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 a 10 ratos. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, # $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo post hoc de Bonferroni).



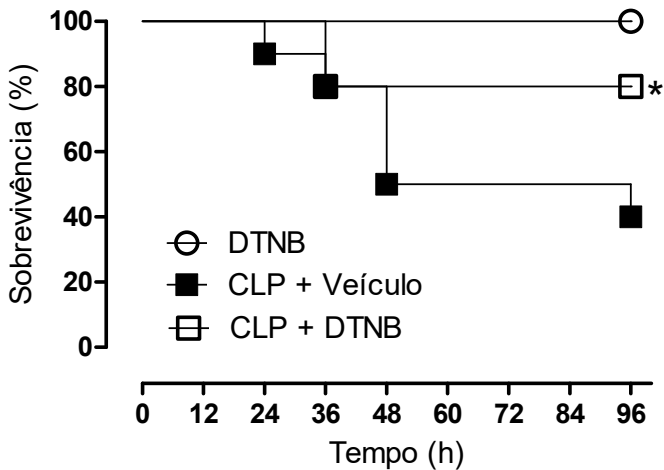
**Figura 8: Efeito do DTNB sobre o leucograma de animais sépticos.**

Os animais foram tratados com DTNB ou veículo 12 h após indução da sepse. Vinte e quatro horas após o CLP foi obtido sangue e leucograma foi obtido. Paineis A: Leucócitos totais. Paineis B: Linfócitos. Paineis C: Monócitos. Paineis D: Granulócitos. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 8 a 10 ratos. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo (ANOVA de duas vias seguida pelo post hoc de Bonferroni).

## 6.6. Efeito do DTNB sobre a sobrevida

Como o DTNB induziu melhora substancial nos aspectos cardiovasculares diminuiu o dano/disfunção de órgãos, melhorou o perfil glicêmico e hematológico dos animais sépticos, investigamos se a melhora destes parâmetros induzida pelo DTNB produziria consequências benéficas na sobrevida dos animais.

Como observamos na Figura 9, a mortalidade dos animais sépticos tratados com veículo foi de 60% em 96 h. O tratamento com DTNB melhorou substancialmente a taxa de sobrevivência, representando assim um aumento de 40% na sobrevida ao longo das 96 h analisadas. O tratamento com DTNB não alterou a mortalidade de animais controle. Essa curva de sobrevivência foi reproduzida por 3 vezes em períodos distintos.

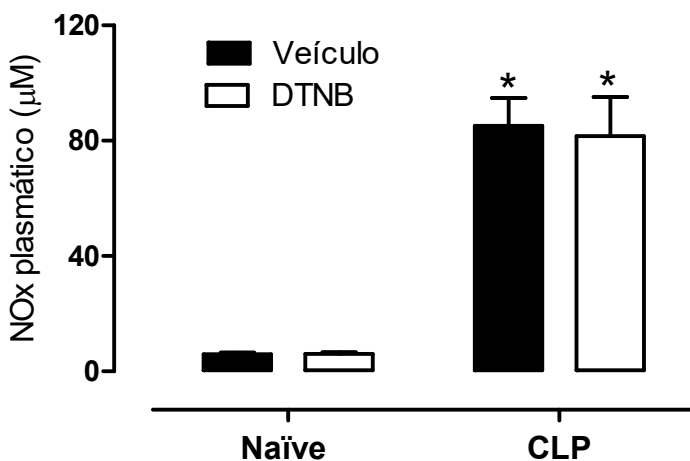


**Figura 9: Efeito de DTNB na sobrevivência de animais sépticos.** As ratas foram submetidas ao CLP e receberam DTNB ou veículo 12 e 24 h após a cirurgia. A sobrevida foi avaliada a cada 12 h ao longo de 96 h. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência e são representativos de 3 experimentos diferentes, n = 30 por grupo. \* P < 0,05 estatisticamente diferente do CLP + veículo. A análise estatística utilizada foi o teste de *log rank*.

### 6.7. Efeito do DTNB sobre a produção de NO

Outro fator importante que ocorre durante a sepse é a síntese exacerbada de NO. Nós investigamos se o DTNB estaria produzindo seus efeitos benéficos através da inibição da síntese do NO. Para isto nós dosamos a concentração de nitrito+nitrato plasmáticos (NOx), como indicativo indireto da produção de NO.

Conforme podemos observar na Figura 10, houve um aumento significativo dos níveis de NOx plasmático nos animais sépticos 24 h após a indução da sepse. O tratamento com DTNB não produziu nenhum efeito sobre os níveis plasmáticos dos metabólitos do NO, tanto dos animais sépticos como dos animais controle.



**Figura 10: Efeito do DTNB sobre a concentração de nitrito + nitrato (NOx) plasmáticos de animais sépticos.** Os animais foram tratados com DTNB ou veículo 12 h após indução da sepse. Vinte e quatro horas após o CLP foi obtido sangue e o NOx plasmático foi mensurado. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 ratas. \* $p < 0,05$  em relação ao grupo controle (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

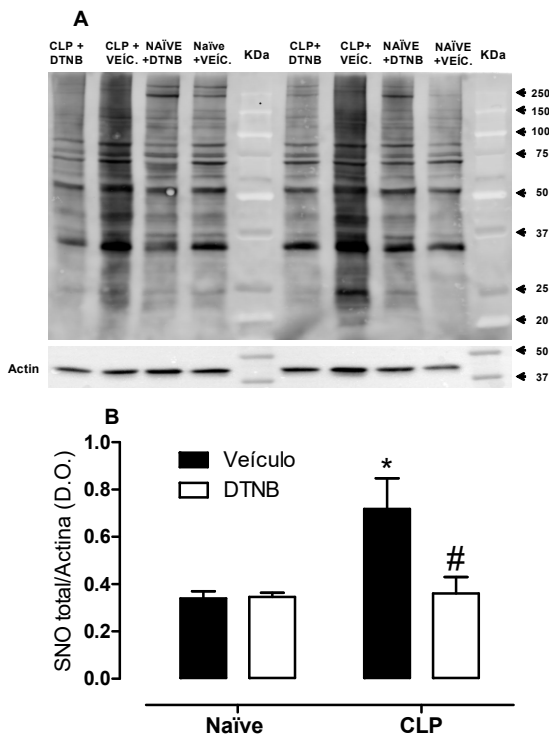
### **6.8.Efeito do DTNB sobre a S-nitrosilação de proteínas em aortas torácicas**

Agentes oxidantes e redutores de sulfidrilas podem induzir a desnitrosilação de proteínas. Assim, investigamos se o DTNB estaria promovendo seus efeitos na sepse através da desnitrosilação de proteínas vasculares.

Como observado, vinte e quatro horas após a sepse há um aumento pronunciado de proteínas nitrosiladas em aortas torácicas, como demonstrado pelo método *Biotin switch*. O tratamento com DTNB 12 h após a indução da sepse reduziu substancialmente o nível a S-nitrosilação de proteínas (Figura 11, Painel A e B).

É importante observar que o DTNB não promoveu nenhum efeito sobre a S-nitrosilação de proteínas constitutivas dos animais naïve.





**Figura 11: Efeito do DTNB sobre a S-nitrosilação de proteínas em aortas de animais sépticos.** As ratas foram submetidas CLP e 12 horas após a cirurgia foram tratadas com DTNB ou veículo. Vinte e quatro horas após a indução da sepse amostras de aorta torácica foram coletadas para realização do ensaio de *Biotin Switch*. PAINEL A: *Western blot* representativo de proteínas nitrosiladas totais nas aortas de dois animais por grupo. PAINEL B: A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ®. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 7 aortas por grupo. KDa indica marcadores de peso molecular. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA duas vias seguida pelo teste *post hoc* de *Bonferroni*). \*  $P < 0,05$  estatisticamente diferente do grupo controle e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo).

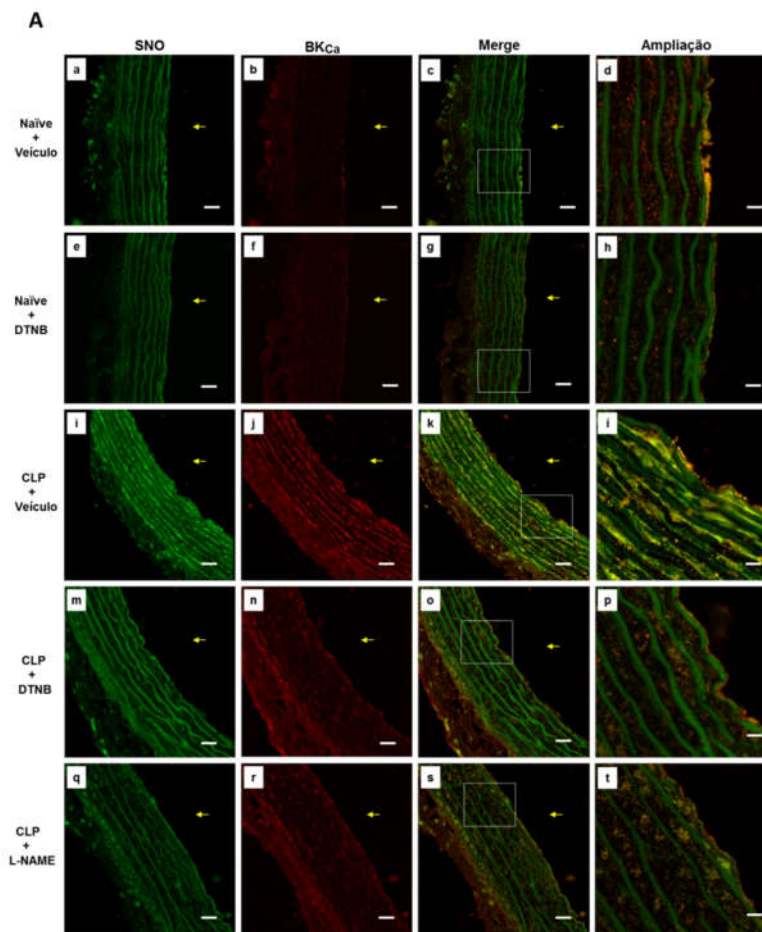
### **6.9.Efeito do DTNB e do L-NAME sobre S-nitrosilação do BK<sub>Ca</sub> de alta condutância em aorta torácica**

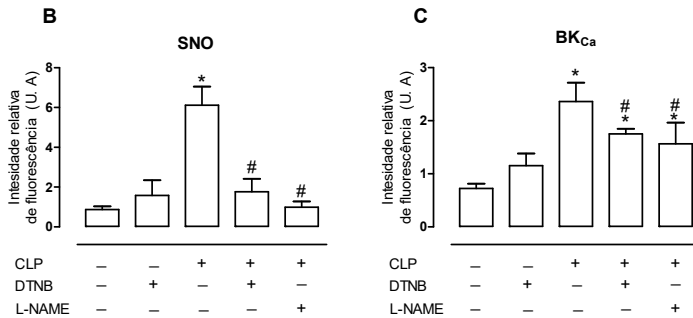
Os canais de potássio são alvos conhecidos da S-nitrosilação e estão relacionados com o prejuízo da contratilidade vascular durante o choque séptico. Desta forma, nós utilizamos os canais de potássio sensível ao cálcio de alta condutância como prova de conceito dos efeitos induzidos pelo DTNB sobre a desnitrosilação de proteínas.

Resultados obtidos mostram que em aorta de ratas sépticas ocorre um aumento significativo da intensidade de fluorescência de SNO quando comparados aos animais controle (Figura 12A, Painel i e Figura 12B). Podemos observar também que este aumento da intensidade de fluorescência está amplamente distribuído, deste o endotélio à musculatura lisa das aortas dos animais sépticos. A sobreposição indica que, de fato, os BK<sub>Ca</sub> estão S-nitrosilados constitutivamente e que a sepse induz o aumento da fluorescência (Figura 12A, Painéis k-l). Isto pode ser melhor visualizado na ampliação de uma área da sobreposição (Figura 12A, Painel l). Concomitantemente, foi observado um aumento da intensidade de fluorescência de BK<sub>Ca</sub> na aorta torácica destes animais (Figuras 12A, Painel j; Figura 12B).

Os resultados mostram ainda que os tratamentos tanto com DTNB quanto com L-NAME diminuíram consideravelmente a intensidade de fluorescência de SNO (Figura 12A, Painel m; Figura 12A, Painel q, respectivamente; e Figura 12B). Todavia, estes dois compostos reduziram parcialmente a fluorescência do BK<sub>Ca</sub> (Figura 12A, Painel n; Figura 12A, Painel r, respectivamente; Figura 12C).

A administração de DTNB em animais controle não induziu nenhum efeito significativo sobre os parâmetros avaliados.

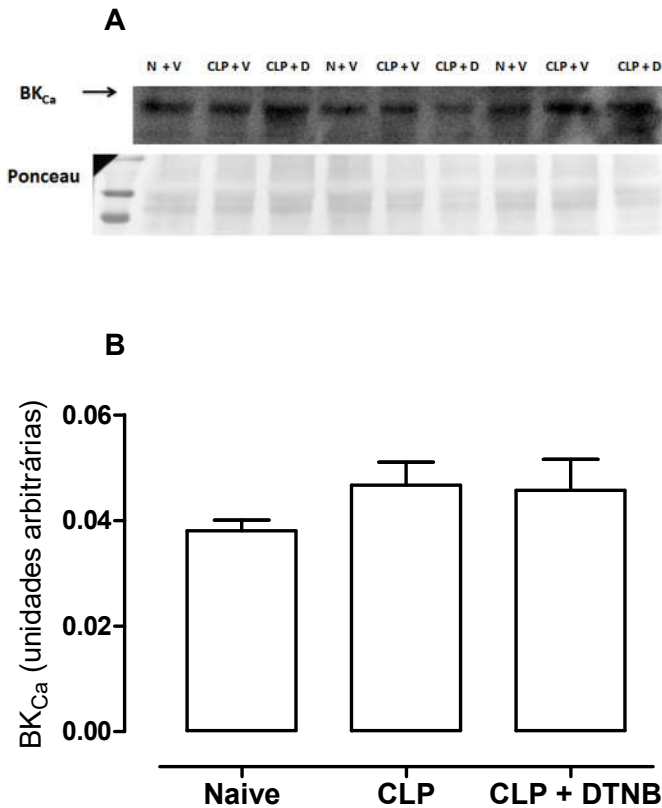




**Figura 12: Detecção de SNO e BK<sub>Ca</sub> de alta condutância por imunofluorescência em anéis de aorta torácica de ratas.** O DTNB (63  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.) ou veículo foi administrado 12 horas após o CLP. Um grupo de animais foi tratado com L-NAME (55  $\mu\text{mol/kg}$ , s.c.), 1 h e 6 h após o CLP. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais foram eutanasiados e aortas torácicas foram colhidas, congeladas, cortadas em fatias (8  $\mu\text{m}$  de espessura) e incubadas com os anticorpos anti-SNO (Painéis a, e, I, m e q) e anti-BK<sub>Ca</sub> (Painéis b, f, j, n e r). Painéis a-d: anéis de aorta de animais controle tratados com veículo; Painéis e-h: anéis de aorta de animais controle tratados com DTNB; Painéis i-l: anéis de aorta de animais sépticos tratados com veículo; Painéis m-p: anéis de aorta de animais sépticos tratados com DTNB; Painéis q-t: anéis de aorta de animais sépticos tratados com L-NAME. Os anticorpos secundários utilizados foram Alexa fluor 488 (verde) e Alexa fluor 594 (vermelho). As imagens foram adquiridas em microscópio confocal com aumento de 63 vezes e magnificação com zoom digital de 3 X (Painéis d, h, i, p, t). Setas amarelas indicam a luz do vaso. As barras brancas representam 20  $\mu\text{m}$ . Caixas brancas representam a área que foi realizada o *zoom*. Para facilitar a visualização todos os painéis tiveram o seu contraste aumentado igualmente em 40%. Os Painéis B e C mostram a análise quantitativa da intensidade da fluorescência para SNO e BK<sub>Ca</sub>, respectivamente (unidades arbitrárias). Cada barra representa a média de 3 a 4 aortas obtidas de ratas por grupo. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA duas vias seguida pelo teste *post hoc* de *Bonferroni*. \* $P < 0,05$  estatisticamente diferente do grupo controle e #  $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP + veículo).

### **6.10. Avaliação do conteúdo proteico de canal de potássio sensível ao cálcio de alta condutância**

Os BK<sub>Ca</sub> são regulados fisiologicamente através da S-nitrosilação de proteínas. Nós verificamos se o aumento da intensidade de fluorescência do SNO estaria relacionado ao aumento da expressão da proteína BK<sub>Ca</sub> durante a sepse. Assim, avaliamos o perfil de expressão da proteína em aortas torácica através da imunoelektroforese. Pode-se observar que não houve aumento da expressão do BK<sub>Ca</sub> em aortas de animais sépticos quando comparados ao controle. Além disso, os resultados mostram que o tratamento com DTNB não causou nenhuma diferença significativa nestes grupos experimentais (Figuras 13A e 13B).



**Figura 13: Expressão do BK<sub>Ca</sub> em aorta de animais sépticos.** Os animais foram submetidos ao CLP e 12 horas após a cirurgia foram tratados com DTNB ou veículo. Vinte quatro horas após a indução da sepse, aortas torácicas foram colhidas e processadas para o imunoelctroforese. Painel A: experimento representativo de proteínas nitrosiladas totais nas aortas de 3 animais por grupo. Painel B: a densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As amostras foram normalizadas em relação à densidade da banda obtida pela solução de Ponceau S. Cada barra representa 3 animais por grupo. Os dados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias seguido pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

## 7. DISCUSSÃO

Desde as primeiras observações na década de 80 que identificaram o NO como o fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) (PALMER et al., 1987), sucessivas descobertas fundamentaram a importância deste gás em inúmeros processos biológicos (CALMELS et al., 1997; DHEIN et al., 1999; STRAUB et al., 2012). A relevância do NO foi reconhecida pelo meio científico em diferentes ocasiões até que 1992, a revista *Science* o elegeu como a molécula do ano (KOSHLAND, 1992). Hoje não nos restam dúvidas quanto à multiplicidade dos efeitos biológicos produzidos pelo NO, fruto do seu envolvimento em diferentes vias de sinalização (PALMER et al., 1987; DHEIN et al., 1999; SCOTT et al., 2001; STRAUB et al., 2012). Porém, continuamos a nos surpreender com o fato de uma molécula tão simples poder exercer papéis tão complexos, e muitas vezes antagônicos.

Há tempos que a comunidade científica vem tentando entender esta dicotomia biológica do NO. Por muitos anos, foi assumido que os efeitos biológicos impulsionados pelo NO estariam relacionados com a sinalização da via guanilato ciclase solúvel (GCs) (RAPOPORT e MURAD, 1993). Hoje, no entanto, o entendimento do modo de ação do NO se tornou maior quando foi observado que a GCs é somente uma parte, ainda que de grande importância, da história.

A ação do NO se estendeu quando foi observada a sua capacidade de alterar a estrutura e a função de proteínas, através modificações pós-traducionais (HESS et al., 2005; ANAND e STAMLER, 2012). Modificações estas, em especial a S-nitrosilação de proteínas, vêm contribuindo para clarear pontos obscuros da nossa (in)compreensão da relevância e importância do NO em situações fisiológicas e patológicas, como a sepse. Portanto, ao invés de pensarmos apenas no excesso de NO na sepse, ligado às enzimas NOS e/ou à GCs, devemos analisar também como a S-nitrosilação de proteínas pode estar contribuindo para a piora do quadro clínico.

Desta forma, este trabalho de doutorado avaliou o envolvimento da S-nitrosilação de proteínas nas alterações cardiovasculares durante a sepse, bem como verificou o potencial terapêutico da desnitrosilação de proteínas neste processo.

Para isto, optamos por utilizar o modelo de CLP para a indução da sepse. Este modelo é frequentemente utilizado para indução de sepse em roedores, pois é o que mais se aproxima das características da sepse em humanos.

O modelo CLP produz alterações nas barreiras protetoras endógenas dos animais, o que permite a translocação de bactérias locais extras intestinais. Este modelo além de ser de baixo custo, mostra uma progressão similar à sepse na clínica, com a ativação do sistema imunológico (para revisão ver BURAS et al., 2005; DEJAGER et al., 2011), alterações progressivas do sistema cardiovascular e disfunção de órgãos (FERNANDES et al., 2009; SORDI et al., 2010; NARDI et al., 2014).

Embora haja limitações em transpor os dados de estudos com animais para clínica, ainda assim, estes estudos são indispensáveis para o entendimento da fisiopatologia da sepse.

Por ser um modelo invasivo, os animais expostos ao CLP produzem sinais de desconforto e dor como piloereção, baixa mobilidade, cifose vertebral, cromodaciorreia, orelhas curvadas para trás e dispneia (SOTOCINA et al., 2011). O processo doloroso aumenta a secreção de catecolaminas e altera a resposta imunológica e desta forma, pode comprometer os dados do estudo (para revisão ver WAITE et al., 2015). Visando minimizar a dor e o desconforto, os animais submetidos ao CLP foram tratados com um analgésico opióide, o tramadol. Este analgésico é um derivado sintético da codeína e atua centralmente inibindo a transmissão da dor através da inibição da recaptação neuronal da noradrenalina e aumento da liberação de serotonina (MINAMI et al., 2015). Trabalhos observaram que analgésicos opióides como a morfina, podem promover alterações na resposta do sistema imunológico (para revisão ver SACERDOTE, 2006). Entretanto, ao contrário da morfina e da codeína, o tramadol não apresenta efeitos imunossupressores (SACERDOTE, 2006; HUGUNIN et al., 2010). Os opióides também podem promover alterações no sistema cardiovascular (para revisão ver MOLINA, 2006). O estudo conduzido por Nardi e colaboradores (2013) demonstrou que o tramadol normalizou a pressão arterial de animais sépticos. Por outro lado, neste presente trabalho, nós observamos que o tramadol não alterou a pressão arterial média, como também não modificou o perfil hematológico e a taxa de sobrevivência de animais sépticos (dados não mostrados). Uma possível explicação para esta discrepância de resultados estaria relacionada com a



dose de tramadol. No trabalho de Nardi e colaboradores (2013) a dose de tramadol utilizada foi maior do que é preconizada para ratos (FISH et al., 2008).

Como citado anteriormente, a instabilidade hemodinâmica é considerada uma das principais responsáveis pela morte de pacientes com choque séptico, devido à persistência e irreversibilidade da hipotensão (GROENEVELD et al., 1986). No choque séptico, a vasoplegia é caracterizada por vasodilatação, com diminuição grave da pressão arterial sistêmica, apesar do alto débito cardíaco e reanimação adequada, além de apresentar resistência vascular sistêmica marcadamente baixa, mesmo com a administração vasopressora adrenérgica (para revisão consultar SHARAWY, 2014).

Nossos resultados mostraram que 8 h e 24 h após a indução da sepse, os animais apresentaram profundas alterações cardiovasculares, evidenciadas pela hipotensão arterial, hiporreatividade à fenilefrina e aumento da frequência cardíaca. No choque séptico, a disfunção cardiovascular tem sido atribuída a uma combinação de lesão endotelial, disfunção do sistema arginina-vasopressina e liberação excessiva de mediadores inflamatórios vasodilatadores, dos quais o NO desempenha um importante papel (para revisão ver MATSUDA e HATTORI, 2007; FERNANDES e ASSREUY, 2008).

Há anos, o NO vem sendo estudado como um potencial alvo terapêutico nas alterações cardiovasculares durante a sepse. Estudos demonstraram, por exemplo, que inibidores das enzimas NOS promovem a melhora da pressão arterial sistêmica e da reatividade a vasoconstritores, além de resultar no aumento da sobrevivência de animais sépticos (KILBOURN et al., 1990; SZABO et al., 1993; WU et al., 1996). Além disso, animais que não expressam a NOS-2 e submetidos ao modelo de endotoxemia apresentaram a função cardiovascular preservada (MACMICKING et al., 1995; GUNNETT et al., 1998).

Se por um lado os estudos com animais mostraram que NO poderia ser um alvo terapêutico promissor, os ensaios clínicos vieram de encontro a nossas expectativas devido ao aumento na mortalidade (LOPEZ et al., 2004; DZAVIK et al., 2007). Estes resultados provocaram cautela na comunidade científica. Certamente, o uso de inibidores das NOS como terapêutica para sepse é uma tarefa árdua, principalmente se

consideramos o papel essencial do NO para o controle da homeostasia vascular e da imunidade inata.

Além disso, até hoje poucos estudos consideraram a possibilidade de que o aumento da S-nitrosilação de proteínas poderia estar interferindo em diferentes vias de sinalização durante a sepse. Talvez a dificuldade de encontrar ferramentas farmacológicas e terapêuticas eficientes tenha inibido a comunidade científica de avançar nesta área.

Agentes oxidantes de sulfidrilas podem levar à desnitrosilação de proteínas (MARTÍNEZ-RUIZ et al., 2013). Estudos apontam que agentes oxidantes e redutores de grupamentos sulfidrilas provocam alterações no estado redox de canais iônicos, regulando sua atividade (LIU E GUTTERMAN, 2002). Foi observado também que o agente oxidante de sulfidrilas, o DTNB, induz o aumento de  $Ca^{2+}$  intracelular em cultura de neurônios hipocâmpais (LONG et al., 2009) e reduz a atividade de canais de potássio sensíveis ao  $Ca^{2+}$  em células endoteliais da aorta bovina (CAI e SAUVE, 1997). Resultados prévios do nosso laboratório mostraram que o DTNB previne e reverte a hiporreatividade a vasoconstritores induzida por doadores de NO, tanto *in vitro* como *in vivo* (TERLUK e ASSREUY, 2005; BENEDET e ASSREUY, 2013).

Deste modo, investigamos a ação do DTNB sobre a disfunção cardiovascular de animais em choque séptico. A ideia inicial foi tentar oxidar os tióis livres e assim evitar a reação com o NO. Esta abordagem mostrou-se proveitosa uma vez que o pré-tratamento com DTNB antes do início da sepse proporcionou proteção parcial. Ao passarmos o tratamento com DTNB para 4 h após a instalação do quadro séptico a resposta ao vasoconstritor foi melhorada, embora não tenha proporcionado nenhum benefício na pressão arterial e na frequência cardíaca. No entanto, para nossa surpresa, o tratamento com DTNB 12 h após a indução da sepse, além de reverter completamente a hiporreatividade à fenilefrina, normalizou a pressão arterial e atenuou a taquicardia de animais em choque séptico.

O aumento da S-nitrosilação de proteínas contribui para a hipotensão arterial em ratos endotoxêmicos (WESTENBERGER et al., 1990; JOURD'HEUIL et al., 2000; LIU et al., 2004). Além disso, a S-nitrosilação de proteínas também está relacionada com a diminuição da resposta a vasoconstritores. Foi mostrado que a exposição do tecido vascular a doadores de NO resulta no

aumento dos níveis de SNO e na consequente perda da resposta pressórica às catecolaminas (Da SILVA-SANTOS et al., 1999; ALENCAR et al., 2003a e 2003b). Trabalhos subsequentes mostraram que a hiporreatividade vascular está relacionada com a S-nitrosilação da PKC (proteína cinase C) (CHOI et al., 2011) e também com a S-nitrosilação do receptor  $\alpha 1$ -adrenérgico (NOZIK-GRAYCK et al., 2005). Apesar de estes trabalhos apontarem uma importante contribuição da S-nitrosilação de proteínas para o prejuízo da resposta vasoconstritora, até hoje nenhum trabalho havia avaliado o seu papel na hiporreatividade vascular durante o choque séptico.

Nós observamos que além da hipotensão arterial, proteínas importantes para a resposta vasoconstritora são S-nitrosiladas na sepse, resultando na redução da resposta contrátil frente à fenilefrina. De maneira interessante, o DTNB reverte substancialmente esta hiporreatividade vascular tanto em anéis de aorta isoladas de animais sépticos quanto na resposta pressórica frente ao agonista  $\alpha 1$ -adrenérgico. Deve-se ressaltar que o DTNB não altera a PAM nem a vasoconstrição  $\alpha 1$ -adrenérgica dos animais do grupo controle, sugerindo que este composto não interfere na regulação da pressão arterial e nem na ligação da fenilefrina ao receptor.

Um ponto relevante do nosso trabalho é o fato do tratamento com DTNB ser mais efetivo na fase tardia da sepse. Estes resultados podem estar relacionados com a expressão da NOS-2. No modelo experimental de endotoxemia, o nível proteico máximo de NOS-2 ocorre em torno da 12<sup>a</sup> hora após o início da sepse, sendo que na 24<sup>a</sup> hora sua expressão está normalizada (DA SILVA-SANTOS et al., 2002; KADOI e GOTO, 2004; LIN et al., 2006). Desta forma, o NO pode estar sendo liberado dos S-nitrosotíóis mantendo a hipotensão e a hiporreatividade a vasoconstritores nos períodos tardios da sepse, mesmo quando a expressão da NOS-2 está diminuída.

A função cardíaca é altamente regulada pela S-nitrosilação de proteínas. Foram identificadas mais de 100 proteínas nitrosiladas em corações de camundongos saudáveis (SHAO et al., 2016). Entretanto, alterações nos níveis de SNO endógeno também estão relacionadas com o prejuízo cardíaco. Foi observado, por exemplo, que a depressão miocárdica em animais endotoxêmicos está associada com o aumento de proteínas cardíacas nitrosiladas (SIPS et al., 2013).

Adicionalmente, nós observamos que a administração do DTNB não apenas melhora a frequência cardíaca, como também diminui os níveis do biomarcador de dano cardíaco (CK-MB, creatina cinase fração MB). Apesar de estes resultados sugerirem que o DTNB diminui a lesão cardíaca de animais sépticos, não se pode determinar de fato se há uma melhora concomitante da função cardíaca. Para isto, ensaios específicos para avaliar a função cardíaca, como coração isolado e perfundido (modelo de Langendorff) deverão ser realizados.

O prejuízo da função cardiovascular durante a sepse pode resultar em hipoperfusão tecidual e conseqüentemente em disfunção e falência de órgãos (para revisão ver DELLINGER et al., 2013). Todavia, o aumento da PAM pode ser insuficiente para a melhora da perfusão tecidual, uma vez que a disfunção microcirculatória pode persistir (DOERSCHUG et al., 2007). De acordo com o Surviving Sepsis Campaign de 2012, o aumento de lactato sérico na sepse é considerado o melhor biomarcador de hipoperfusão tecidual na clínica (DELLINGER e tal., 2013), e seu aumento está relacionado com um pior prognóstico para o paciente. Mikkelse e colaboradores (2009) observaram que a mortalidade de pacientes sépticos é proporcional ao aumento das concentrações de lactato sanguíneo. Constataram ainda que concentrações baixas de lactato séricos (<2,5 mmol/L), intermediária (2,5 - 4 mmol/L) e elevada (>4 mmol/L) resultaram num índice de mortalidade de 8,7%, 16,4% e 31,8%, respectivamente. Por ser um bom parâmetro de adequação do fornecimento de oxigênio e resolução da hipóxia tecidual global, a normalização das concentrações séricas de lactato deve constituir um dos pontos imprescindíveis na ressuscitação do paciente com sepse (DELLINGER et al., 2013).

Desta forma, nós avaliamos o nível de lactato plasmático dos animais tratados com DTNB. Corroborando com os dados clínicos, os animais submetidos ao modelo de CLP apresentaram um aumento expressivo do lactato plasmático. Mas o mais surpreendente foi o fato do tratamento com DTNB reverter totalmente a hiperlactatemia séptica. Estes resultados sugerem que o aumento de NO pode estar nitrosilando proteínas importantes para o funcionamento da microcirculação e comprometendo a perfusão tecidual. Mais ainda, mostram que a desnitrosilação de proteínas não apenas normalizou a pressão

arterial, mas também contribui para a melhora da perfusão tecidual.

O comprometimento da perfusão tecidual induzida pela sepse pode causar danos funcionais nos órgãos, e no nosso modelo experimental além do dano cardíaco, observamos que a sepse induziu dano hepático.

O fígado tem papéis cruciais na sepse, pois é essencial para o controle de bactérias e toxinas da corrente sanguínea e regula processos metabólicos, além de ser um alvo frequente da inflamação desregulada (para revisão ver STRAND et al., 2017). A desregulação hepática induzida pela sepse tem valor prognóstico relevante e está associada a altos índices de mortalidade (DIZIER et al., 2015). O aumento de marcadores de dano hepático, como as transaminases, está relacionado com a hipoperfusão hepatoesplânica e a consequente disfunção hepática. Hildebrand e colaboradores (2000) mostraram que durante o choque séptico há uma redução do fluxo microcirculatório do fígado em aproximadamente 50%. Além disso, o prejuízo da perfusão hepática gera lesões estruturais e funcionais, e pode ser responsável por desencadear e/ou sustentar a falência de vários outros órgãos (para revisão ver STRAND et al., 2017).

Embora o colapso do sistema cardiovascular na sepse esteja associado, em parte, ao aumento da síntese de NO, seu papel na disfunção hepática na sepse ainda é controverso. Se por um lado estudos mostraram que inibidores seletivos da NOS restauraram a circulação arterial hepática (SAETRE et al., 1998), por outro, a sua inibição produziu efeitos prejudiciais na perfusão, no transporte de oxigênio e na morfologia hepática (HUANG et al., 1997; WANG et al., 1998).

Alternativamente, há uma relação importante no aumento dos níveis SNO com efeitos deletérios no sistema hepático. Níveis aumentados de proteínas nitrosiladas no fígado estão relacionados com o aumento substancial das transaminases hepáticas e apoptose dos hepatócitos (LIU et al., 2004; SCHONHOFF et al., 2010). Corroborando com a literatura, nossos resultados mostram uma forte contribuição do aumento dos níveis de SNO para a disfunção hepática na sepse. Nossos resultados também mostram que o DTNB reverteu o dano hepático em animais sépticos. Desta forma, podemos inferir que os efeitos benéficos do DTNB sobre a função cardiovascular e principalmente sobre a perfusão tecidual favoreceu a melhora da

função hepática no choque séptico. Novamente, é digno de mencionar que todos estes efeitos benéficos foram observados mesmo quando o DTNB foi administrado após a sepse já estava instalada.

A creatinina e ureia plasmática também estavam aumentadas nos animais submetidos ao CLP, indicando falência renal. Apesar de o DTNB ter melhorado substancialmente os parâmetros hemodinâmicos e a função hepática, o tratamento não foi capaz de reverter a disfunção renal. No momento, não temos uma boa explicação do motivo dos índices renais não terem sido afetados pelo DTNB. Sabe-se, no entanto, que a S-nitrosilação do fator nuclear de células T ativadas 5 (NFAT5; do Inglês *nuclear factor of activated T-cells 5*) renal está associado com o prejuízo na osmolalidade urinária induzido pela sepse (KÜPER et al., 2012). Como o DTNB é incapaz de atravessar as membranas plasmáticas, talvez a S-nitrosilação de alvos proteicos intracelulares esteja mais relacionada com o prejuízo da função renal. Outra especulação é que a falta de hiporresponsividade do leito renal durante a sepse (BOFFA et al., 2005) poderia não deixar evidente os efeitos benéficos do DTNB.

Na sepse, o comprometimento do metabolismo celular também contribui para o desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos. O distúrbio do metabolismo da glicose está relacionado a piores consequências para pacientes sépticos. Durante os períodos iniciais da sepse, adrenalina, glucagon e glicocorticoides estão aumentados, levando à hiperglicemia via gliconeogênese e glicogenólise no fígado (para revisão ver PUMMER e DEANE, 2016).

Nas fases tardias da sepse, no entanto, há o predomínio da fase hipometabólica, caracterizada pela hipoglicemia (para revisão ver PUMMER e DEANE, 2016), sendo esta uma característica que ocorre principalmente em pacientes em estado crítico (FINFER et al., 2012).

Assim como na clínica, o modelo experimental de sepse induziu hipoglicemia grave nos animais sépticos. É interessante observar que o tratamento com DTNB normalizou os níveis glicêmicos dos animais sépticos. A gravidade e a duração da hipoglicemia necessária para causar danos permanecem incertas, e os mecanismos pelos quais a hipoglicemia aumenta a mortalidade na sepse ainda não foram completamente elucidados.

Contudo, a hipoglicemia pode causar danos neurológicos irreversíveis (SUH et al., 2007; DUNING et al., 2010).

Até o momento, não existe na literatura um estudo que relacione o aumento de S-nitrosilação de proteínas com a hipoglicemia na sepse. Mas o aumento de SNO hepático está relacionado com alterações no metabolismo glicêmico (SHINOZAKI et al., 2011). Desta maneira, podemos especular que a melhora da função hepática induzida pela DTNB tenha refletido na regulação do metabolismo glicêmico. Portanto, a contribuição destes resultados é muito importante, uma vez que há uma forte relação entre a hipoglicemia e a mortalidade em pacientes críticos (EGI et al., 2010; FINFER et al., 2012).

Outro aspecto interessante é o fato do tratamento com o DTNB também apresentar efeitos imunomoduladores na sepse. O tratamento com DTNB atenuou a leucopenia, linfopenia, monocitopenia e trombocitopenia dos animais sépticos, embora não tenha produzido nenhum efeito sobre a granulocitose. Na sepse, a diminuição dramática de linfócitos e monócitos circulantes constitui o principal mecanismo de supressão imunológica prolongada, sendo responsável em grande parte pelas mortes tardias após lesão (VENET et al., 2010; DREWRY et al., 2014).

Também é comum na sepse a ocorrência de disfunções na agregação e coagulação plaquetária, de forma que a diminuição do número de plaquetas também pode estar relacionada com a mortalidade da doença (MURONOI et al., 2016). Foi descrito na literatura que o aumento de SNO mediado por doadores de óxido nítrico reduz a adesão plaquetária (IRWIN et al., 2009). No entanto, até hoje não foi observado a participação da S-nitrosilação de proteínas na diminuição da adesão plaquetária, tampouco na trombocitopenia séptica. Embora nós tenhamos observado que a S-nitrosilação de proteínas poderia contribuir para alterações da resposta imune e plaquetária durante a sepse, mais estudos devem ser realizados.

Além de promover melhora sobre o número de linfócitos monócitos e plaquetas circulantes, o DTNB normalizou o percentual de hemoglobina e hematócrito sanguíneo. Aumentos nestes parâmetros estão correlacionados, indiretamente, com a maior permeabilidade vascular e consequentemente, com o aumento do extravasamento plasmático (SU et al., 2007). Desta maneira, podemos inferir que parte dos efeitos benéficos induzido

pelo tratamento com DTNB pode estar relacionado também com a diminuição do extravasamento vascular durante o choque séptico.

Até o dado momento, o conjunto de dados mostra que: i) o aumento da S-nitrosilação de proteínas contribui para a disfunção cardiovascular e para disfunção múltipla de órgãos associada ao choque séptico; ii) o tratamento com DTNB realizado durante o choque séptico restaura as funções hemodinâmica, melhora a perfusão tecidual, diminui o dano/disfunção de órgão, restabelece o perfil glicêmico, melhora o perfil imunológico e plaquetário de animais sépticos e normaliza a hemoconcentração.

Desta forma, nós avaliamos se os benefícios obtidos pelo tratamento com DTNB poderiam refletir na sobrevivência de animais sépticos. Estudos já haviam observado que o aumento de SNO contribui para a mortalidade de animais endotoxêmicos (LIU et al., 2004). Ademais, dados prévios do nosso laboratório observaram que a administração de DTNB reduziu a mortalidade de animais desafiados com *Escherichia coli* (TERLUK, 2005). Igualmente, nossos resultados mostraram que o tratamento com o composto, após a indução da sepse, aumenta em 40% a sobrevivência de animais sépticos. Além disso, os animais CLP exibiram letargia e cromodacriorreia já nas primeiras 12 horas após a indução da sepse, enquanto que os animais sépticos tratados com DTNB apresentaram estes sinais em menor intensidade, com evidente aumento da atividade motora (dados não mostrados).

Desta maneira acreditamos que desnitrosilação de proteínas pode ser uma ferramenta terapêutica importante, pois o tratamento em estágios tardios da sepse trouxe muitos resultados benéficos, exatamente quando a maioria das demais alternativas terapêuticas não obteve sucesso.

Embora esteja descrito que agentes oxidantes de sulfidrilas promovam a desestabilização de SNO, não há evidências que comprovem que o DTNB induz a desnitrosilação de proteínas. Nossos resultados mostram que muitas proteínas estão nitrosiladas constitutivamente na aorta de animais controle. Estes resultados, de certa forma, não trouxeram nenhuma surpresa, já que várias proteínas estão nitrosiladas em condições fisiológicas, sendo este um fator crítico para sua função (para revisão ver ANAND E STAMLER, 2012).



Portanto, estes resultados mostram uma clara demonstração da relevância dos nitrosotíóis *in vivo*. Mostramos também que durante a sepse "novas" proteínas parecem nitrosiladas, assim como algumas já nitrosiladas exibiram uma S-nitrosilação mais elevada. O mais interessante é que o DTNB não "eliminou" todos os nitrosotíóis de proteínas da aorta. Em vez disso, parece que o composto não afetou a nitrosilação basal. Como o DTNB não é capaz de atravessar a membrana celular, podemos especular que as proteínas nitrosiladas intracelulares sejam importantes para a homeostase, enquanto que as proteínas da face externa da membrana celular são relevantes para o resultado da sepse.

Outro fator relevante é que o tratamento não alterou a síntese de NO, visto que os níveis plasmáticos dos metabólitos do NO não foram diminuídos. Como comentado anteriormente, este fato é muito significativo já que a inibição da NOS pode gerar consequências nocivas para o hospedeiro.

Nosso grupo vem mostrando a participação de canais de potássio para a disfunção cardiovascular na sepse. Da Silva-Santos e colaboradores (2002) observaram que o prejuízo da contratilidade vascular em animais endotoxêmicos está relacionado com a ativação excessiva dos canais de potássio sensíveis ao ATP (KATP), uma vez que bloqueadores de canais de potássio (glibenclamida e tetraetilamônio) restauraram a hiporeatividade a vasoconstritores. Somando-se a isso, Sordi e colaboradores (2010) mostraram que o tetraetilamônio, além de melhorar a função cardiovascular e a disfunção orgânica, contribui para a diminuição da expressão da NOS-2 em ratos sépticos. Esta importante relação do NO e canais de potássio foi observada igualmente em outros trabalhos, os quais demonstraram que o aumento da produção de NO durante a sepse é responsável pelo aumento da expressão de KATP (CZAIKA et al., 2000; COLLIN et al., 2011).

Sabe-se que em condições fisiológicas a S-nitrosilação de canais potássio é importante para a regulação da sua atividade (BOLOTINA et al., 1994; ASADA et al., 2009; GÓMEZ et al., 2009; KAWANO et al., 2009). No entanto, a contribuição da S-nitrosilação destes canais para o desenvolvimento da sepse ainda não está bem esclarecida. Visto que a S-nitrosilação dos canais de potássio é importante para a regulação da sua atividade em condições fisiológicas, destacamos BKCa de alta condutância

como prova de conceito para mostrar que um alvo relevante para controle fisiológico vascular seria de fato também um alvo para S-nitrosilação em nosso modelo.

Os resultados de imunofluorescência confirmam os dados com o *biotin switch* e claramente mostram que nas aortas dos ratos sépticos o nível de SNO está aumentado. Níveis elevados de SNO são igualmente observados tanto na musculatura lisa, quanto na região endotelial das aortas das ratas sépticas. Nossos resultados sugerem, ainda, um evidente aumento na S-nitrosilação do BKCa. É interessante notar que o tratamento com DTNB assim como o tratamento com L-NAME, reduziu substancialmente os níveis de SNO vascular, embora ambos os compostos não tenham reduzido os níveis de BKCa na aorta dos animais sépticos. Além da importância para a disfunção vascular induzida pela sepse, estes resultados mostram que o BKCa pode ser um alvo relevante para S-nitrosilação desregulada na sepse. Por outro lado, estes resultados apontam que sua denitrosilação pode ser um fator importante para os efeitos benéficos do DTNB na sepse.

Embora os experimentos com imunofluorescência tenham demonstrado um aumento concomitante do conteúdo de BKCa vascular com o SNO, os resultados com Western blot foram divergentes. Como o DTNB não atravessa a membrana plasmática, decidimos não permeabilizar os tecidos durante a imunofluorescência. Portanto, estes resultados representam o aumento do BKCa apenas na face externa da membrana, enquanto os resultados do *Western Blot* mostram o conteúdo proteico total.

A principal limitação do nosso trabalho está relacionada com os mecanismos pelos os quais o DTNB exerce seus efeitos desnitrosilantes. Entretanto, o trabalho descrito por Gergel e Cederbaum (1997) nos fornece alguns esclarecimentos. Este trabalho mostra que o NO reage com o TNB, o ácido nitrotiobenzóico, resultando na formação de SNO-TNB (TNB ligado ao NO). Embora estes resultados nos forneçam uma possível explicação para a ação desnitrosilante do DTNB, o exato mecanismo de interação NO e TNB não está claro, e desta forma, novos trabalhos deverão ser realizados para esclarecer este ponto.

Não desconsideramos a hipótese de que outros alvos proteicos, além dos BKCa, estejam sendo S-nitrosilados na sepse. É provável que os efeitos do tratamento com o DTNB também

estejam surtindo efeitos positivos em outras proteínas. Se por um lado a falta de seletividade do composto possa ter sido uma limitação, por outro, este fator foi talvez a chave do sucesso terapêutico, visto a característica multifatorial da sepse. Portanto, a desnitrosilação de proteínas pode ser uma alternativa eficaz no tratamento da sepse porque melhora a condição do hospedeiro mesmo depois de todas as respostas fisiológicas terem sido perturbadas pela sepse.

## 8. CONCLUSÃO

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que:

- 1- A produção elevada de NO durante a sepse resulta no aumento de SNO no tecido vascular;
- 2- Proteínas importantes para a regulação da pressão arterial e para funcionamento vascular estão S-nitrosiladas durante a sepse;
- 3- O aumento de S-nitrosilação de proteínas na sepse está envolvido com: a) hipotensão arterial sistêmica; b) perda da resposta pressora à fenilefrina; c) diminuição da perfusão tecidual; d) disfunção de órgãos; e) alterações do metabolismo glicêmico, imune e plaquetário; f) extravasamento vascular e g) aumento da mortalidade de animais sépticos;
- 4- O tratamento com DTNB durante o choque séptico restabeleceu as funções hemodinâmicas, resultou na diminuição da lesão/disfunção de órgãos, melhorou o perfil glicêmico e hematológico e aumentou a sobrevivência de ratos sépticos;
- 5- O tratamento com DTNB realizado durante o choque séptico provocou uma redução substancial das proteínas nitrosiladas na aorta e, nomeadamente, nos canais de potássio dependentes do cálcio, sem alterar a síntese de NO.

Embora nosso estudo com animais de experimentação tenha uma limitação óbvia, pela dificuldade de transpor os resultados experimentais para o ambiente clínico, os resultados aqui relatados indicam que devemos considerar que a S-nitrosilação é um importante mecanismo pelo qual o NO exerce seus efeitos sobre as funções vasculares durante a sepse e contribui assim para a piora do quadro. No entanto, o mais interessante é que a desnitrosilação de proteínas pode ser uma alternativa eficaz no tratamento da sepse, mesmo após o choque séptico já estar em curso. Portanto, seria interessante que este conceito pudesse ser transposto na clínica e desta forma, abrir novas oportunidades terapêuticas para a redução do prognóstico alarmante desta síndrome.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, 357: 593-615, 2001.

ALENCAR, J. L.; LOBYSHEVA, I.; GEFFARD, M.; et al. Role of S-nitrosation of cysteine residues in long-lasting inhibitory effect of nitric oxide on arterial tone. **Molecular Pharmacology**, 63: 1148-1158, 2003a.

ALENCAR, J.L.; LOBYSHEVA, I.; CHALUPSKY, K. et al. S-nitrosating nitric oxide donors induce long-lasting inhibition of contraction in isolated arteries. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, 307, 152-159, 2003b.

AMBS, S.; MERRIAM, W. G.; BENNETT, W. P.; et al. Frequent nitric oxide synthase-2 expression in human colon adenomas: implication for tumor angiogenesis and colon cancer progression. **Cancer Research**, 58, 334-341, 1998.

ANAND, P. E.; STAMLER, J. S. Enzymatic mechanisms regulating protein S-nitrosylation: implications in health and disease. **Journal Molecular Medicine**, 90:233-244, 2012.

ANAND, P.; HAUSLADEN, A.; WANG, Y. J.; et al. Identification of S-nitroso-CoA reductases that regulate protein S-nitrosylation. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 30;111(52):18572-7, 2014.

ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Critical Care Medicine**, 29(7): 109-16, 2001.

ARAÚJO, A. V.; FERREZIN, C. Z.; PEREIRA, A. D. E.; et al. Augmented nitric oxide production and up-regulation of endothelial nitric oxide synthase during cecal ligation and perforation. **Nitric Oxide**, 30;27(1):59-66, 2012.

ASADA, K.; KUROKAWA, J.; FURUKAWA, T. Redox- and Calmodulin-dependent S-Nitrosylation of the KCNQ1 Channel. **Journal Biology Chemical** 27;284(9):6014-20, 2009.

CUENODA, C. A.; BALVAYB, D. Perfusion and vascular permeability: Basic concepts and measurement in DCE-CT and DCE-MRI. **Diagnostic and Interventional Imaging**, 94, (12): 1187–1204, 2013.

BENEDET, P. O.; ASSREUY, J. **Óxido nítrico e alterações na reatividade vascular: envolvimento de nitrosotíóis**. Dissertação de mestrado em Farmacologia. Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2013.

BENHAR, M.; FORRESTER, M. T.; HESS, D. T. et al. Regulated Protein Denitrosylation by Cytosolic and Mitochondrial Thioredoxins. **Science**, 320(5879): 1050–1054, 2008.

BOFFA, J. J.; ARENDSHORST, W. J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock. **Journal American Society Nephrology**, 16:117–124, 2005.

BOLOTINA, V. M.; NAJIBE, S.; PALACINO, J. J.; et al. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 368: 850-853, 1994.

BONE, R. C.; BLAK, R. A.; CERRA, F. B.; et al. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, 101(6):1644-1655, 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 7;72:248-54, 1976.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews**, 4(10):854-865, 2005.

CAI, S; SAUVE, R. Effects of thiol-modifying agents on a K(Ca<sup>2+</sup>) channel of intermediate conductance in bovine aortic endothelial cells. **Journal Membrane Biology**, 158: 147-158, 1997.

CALMELS, S.; HAINAUT, P.; OHSHIMA, H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. **Cancer Research**, 1997; 57:3365–3369, 1997.

CARVALHO-FILHO, M. A, UENO, M. HIRABARA, S. M. et al.. S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1, and protein kinase B/Akt: a novel mechanism of insulin resistance. **Diabetes**, 54:959–967, 2005.

CHI-HUI T; WEI WEI; LIMIN, L. Regulation of DNA repair by S-nitrosylation. **Biochimica Biophysica Acta**. 1820(6):730-5, 2012.

CHO, D. H.; NAKAMURA, T.; FANG, J.; et al. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. **Science**, 324:102–105, 2009.

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

CHOUCHANI, E.T.; HURD, T. R.; NADTOCHIY, S. M.; et al. Identification of S-nitrosated mitochondrial proteins by S-nitrosothiol difference in gel electrophoresis (SNO-DIGE):

implications for the regulation of mitochondrial function by reversible S-nitrosation. **Biochemical Journal**, 430:49–59, 2010.

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

COHEN, J.; VINCENT, J-L.; ADHIKARI, N. K. J. et al. Sepsis: a roadmap for future research, **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 5, p. 581–614, 2015.

COLLIN, S.; SENNOUN, N.; DRON, A-G, et al. Vascular ATP-sensitive potassium channels are over-expressed and partially regulated by nitric oxide in experimental septic shock. **Intensive Care Medicine**, 37:861–869, 2011.

CONDE, K. A.; SILVA, E.; SILVA, C. O.; et al. Differences in sepsis treatment and outcomes between public and private hospitals in Brazil: a multicenter observational study. **PLoS One**, 6; 8(6):e64790, 2013.

COSBY, K.; PARTOVI, K. S, CRAWFORD, J. H.; et al. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine**, 9:1498-1505; 2003.

CUTLER, MJ.; PLUMMER, B. N.; WAN, X.; et al. Aberrant S-nitrosylation mediates calcium-triggered ventricular arrhythmia in the intact heart. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 30;109(44):18186-91, 2012.

CZAIKA, G.; GINGRAS, Y.; ZHU. E.; et al. Induction of the ATP-sensitive potassium (uKATP-1) Channel by Endotoxemia. **Muscle & Nerve**, 23: 967–969, 2000.

DA SILVA-SANTOS, J.E.; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced



by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, **290**: 380-387, 1999.

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

DEJAGER, L.; PINHEIRO, I.; DEJONCKHEERE, E.; et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, 19(4):198-208, 2011.

DELANO, M. J.; WARD, P. A. The immune system's role in sepsis progression, and resolution, and long-term outcome. **Immunological Reviews**, 274(1):330-353, 2016.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; RHODES, A.; et al. Surviving Sepsis Campaign Guidelines Committee including the Pediatric Subgroup. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2012. **Critical Care Medicine**, 41(2):580-637, 2013.

DHEIN, S.; SALAMEH, A.; BERKELS, R. et al. Dual mode of action of dihydropyridine calcium antagonists. A role for nitric oxide. **Drugs**, 58, 397-404, 1999.

DIZIER, S.; FOREL, J-M.; AYZAC, L. et al. Early hepatic dysfunction is associated with a worse outcome in patients presenting with acute respiratory distress syndrome: a post-hoc analysis of the ACURASYS and PROSEVA studies. **PLoS ONE**, 10: e0144278, 2015.

DOERSCHUG, K. C.; DELSING, A. S.; SCHMIDT, G. A.; Impairments in microvascular reactivity are related to organ failure in human sepsis. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, 293(2):H1065-71, 2007.

DREWRY, A. M.; SAMRA, N.; SKRUPKY, L. P.; et al: Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. **Shock**, 42(5):383-91, 2014.

DUNING, T.; VAN DEN HEUVEL, I.; DICKMANN, A. et al. Hypoglycemia aggravates critical illness-induced neurocognitive dysfunction. **Diabetes Care**, 33(3): 639–644, 2010.

DZAVIK, V.; COTTER, G.; REYNOLDS, H. R. et al., Effect of nitric oxide synthase inhibition on haemodynamics and outcome of patients with persistent cardiogenic shock complicating acute myocardial infarction: a phase II dose-ranging study. **European Heart Journal**, 28(9):1109-16, 2007.

EGI, M.; BELLOMO, R.; STACHOWSKI, E. et al. Hypoglycemia and outcome in critically ill patients. **Mayo Clinic Proceedings**, 85(3):217–224, 2010.

ERWIN, PA.; LIN, A. J.; GOLAN, D. E.; et al. Receptor-regulated dynamic S-nitrosylation of endothelial nitric-oxide synthase in vascular endothelial cells. **Journal Biology Chemistry**, 20;280(20):19888-94, 2005.

EU, J.; SUN, J.; XU, L.; STAMLER, J. S.; et al. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. **Cell**, 102:499–509, 2000.

EVANGELISTA, A. M.; KOHR, M. J.; MURPHY, E. S-nitrosylation: Specificity, Occupancy, and Interaction with Other Post-translational Modifications. **Antioxidant Redox Signalling**, 10;19(11):1209-19, 2013.

FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock** 30 (Suppl 1):10-13, 2008.

FERNANDES, D.; SORDI, R.; PACHECO, L. K.; et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylatecyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **Journal Pharmacology Experimental Therapeutics**, 328: 991-999, 2009.

FISH, E.R., BROWN, M.J., DANNEMAN, P.J, KARAS, A.Z. **Anaesthesia and Analgesia for Laboratory Animals**, 2nd ed. Elsevier:Oxford, P. 239–297, 2008.

FLEISCHMANN, C.; SCHERAG, A.; ADHIKARI, N. K.; et al. Assessment of global incidence and mortality of hospital-treated sepsis — current estimates and limitations. **American Journal of Respiratory Critical and Care Medicine**, 193: 259–272, 2016.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, 33(7):829-37, 837a-837d, 2012.

FOSTER, M. W.; MCMAHON, T. J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. **TRENDS in Molecular Medicine**, 9(4): 160–168, 2003.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word “sepsis”. **Intensive Care Medicine**, 32(12): 2077, 2006.

GOCAN, N.C.; SCOTT, JA, TYML, K. Nitric oxide produced via neuronal NOS may impair vasodilation in septic rat skeletal muscle. **American Journal of Physiology**, 278: H1480–H1489, 2000.

GONZALEZ, D. R.; BEIGI, F.; TREUER, A. V.; et al. Efficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes.

**Proceedings of the National Academy of Sciences**, 104: 20612–20617, 2007.

GROENEVELD, A. B.; BRONSVELD, W.; THIJS, L. G. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. **Surgery**, 99(2):140-53, 1986.

GONZALEZ, D. R.; TREUER, A. V.; CASTELLANOS, J.; et al. Impaired S-nitrosylation of the ryanodine receptor caused by xanthine oxidase activity contributes to calcium leak in heart failure. **Journal Biology Chemical**, 285: 28938–28945, 2010.

GROENEVELD, A.B., BRONSVELD, W. AND THIJS, L.G. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. **Surgery**, 99:140–153, 1986.

GÓMEZ, R.; CABALLERO, R.; BARANA, A.; et al. Nitric oxide increases cardiac IK1 by nitrosylation of cysteine 76 of Kir2.1 channels. **Circulation Research**. 14;105(4):383-92, 2009.

GU, Z.; KAUL, M.; YAN, B.; et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. **Science**, 16;297(5584):1186-90, 2002.

GUAN W., SHA J, CHEN X, XING Y, YAN J, WANG Z. S-nitrosylation of mitogen activated protein kinase phosphatase-1 suppresses radiation-induced apoptosis. **Cancer Letter**, 314:137–146, 2012.

GUEQUÉN, A.; CARRASCO, R.; ZAMORANO, P.; et al. S-nitrosylation regulates VE-cadherin phosphorylation and internalization in microvascular permeability. **American Journal Physiology Heart Circulatory Physiology**, 15;310(8):H1039-44, 2016.

GUNNETT, C. A.; CHU, Y.; HEISTAD, D. D.; et al. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. **American Journal Physiology**, 275(2 Pt 2):H416-21, 1998.

JAFFREY, S. R.; SNYDER, S. H. The biotin switch method for the detection of S-nitrosylated proteins. **Science signal transduction knowledge environment**, 12:2001(86):p11, 2001.

JIA, L.; BONAVENTURA, C.; BONAVENTURA, J.; et al. S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. **Nature**, 380:221–26, 1996.

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

HALDAR, S. M.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation: integrator of cardiovascular performance and oxygen delivery. **The Journal of Clinical Investigation**, 123 (1):101-110, 2013.

HALEY, J. E.; DICKENSON, A. H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. **Neuropharmacology**, 31(3):251-8, 1992.

HESS, D. T.; MATSUMOTO, A.; KIM, S.; et al. Protein s-nitrosylation: purview and parameters. **Nature**, 6:150-166, 2005.

HILTEBRAND, L. B.; KREJCI, V.; BANIC, A.; et al. Dynamic study of the distribution of microcirculatory blood flow in multiple splanchnic organs in septic shock. **Critical Care Medicine**, 28:3233–3241, 2000.

HIRSCH, J.; SCHLATTER, E. K<sup>+</sup> channels in the basolateral membrane of rat cortical collecting duct are regulated by a cGMP-dependent protein kinase. **Pflugers Arch.** 429(3):338-44, 1995.

HOLLENBERG, S. M.; GUGLIELMI, M.; PARRILLO, J. E. Discordance between microvascular permeability and leukocyte dynamics in septic inducible nitric oxide synthase deficient mice. **Critical Care**, 11(6):125, 2007.

HÖLSCHER, C.; ROSE, S. P. An inhibitor of nitric oxide synthesis prevents memory formation in the chick. **Neuroscience Letter**, 12;145(2):165-7, 1992.

HOTCHKISS, R.S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Review Immunology**, v. 13, n.12, p. 862–874, 2013.

HOTCHKISS, R. S.; MOLDAWER, L. L, OPAL, S. M.; et al. Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, 30(2):16045, 2016.

HUANG, T-P, NISHIDA. T.; KAMIKE, W.; et al. Role of nitric oxide in oxygen transport in rat liver sinusoids during endotoxemia. **Hepatology**, 26:336–342, 1997.

HUGUNIN, K. M.; FRY, C.; SHUSTER, K.; et al. Effects of tramadol and buprenorphine on select immunologic factors in a cecal ligation and puncture model. **Shock**, 34: 250-260, 2010.

IGNARRO, L. J.; BARRY, B. K.; GRUETTER, D. Y.; et al. Guanylate cyclase activation of nitroprusside and nitrosoguanidine is related to formation of S-nitrosothiol intermediates. **Biochemical and Biophysical Research Communications**,. 94:93–100, 1980.

INSTITUTO LATINO-AMERICANO PARA ESTUDOS DA SEPSE E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. **Sepsis: um problema de saúde pública**. Brasília, 2015.

IRWIN, C.; ROBERTS, W.; NASEEM, K. M. Nitric oxide inhibits platelet adhesion to collagen through cGMP-dependent and independent mechanisms: the potential role for S-nitrosylation. **Platelets**, 20(7):478-86, 2009.

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

KAWANO, T.; ZOGA, V.; KIMURA, M.; et al. Nitric oxide activates ATP-sensitive potassium channels in mammalian sensory neurons: action by direct S-nitrosylation. **Molecular Pain**, 14;5:12, 2009.

KANEKI, M.; SHIMIZU, N.; YAMADA, D.; et al. Nitrosative stress and pathogenesis of insulin resistance. **Antioxidants Redox Signalling**, 9(3):319-29, 2007.

KAUKONEN, K. M.; BAILEY, M.; SUZUKI, S.; et al. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. **Journal of the American Medical Association**, 2,311(13):1308-16, 2014.

KEANEY, J. F.; PUYANA, J. C.; FRANCIS, S.; et al. Methylene blue reverses endotoxin-induced hypotension. **Circulation Research**, 74, 1121-1125, 1994.

KELLEHER, Z. T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J. S.; et al. NOS2 regulation of NF-kappaB by S-nitrosylation of p65. **Journal Biology Chemical**, 282: 30667–30672, 2007.

KILBOURN, R. G.; JUBRAN, A.; GROSS, S. S.; et al. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 172: 1132-1138, 1990.

KIMMOUN, A.; DUCROCQ, N.; LEVY, B. Mechanisms of Vascular Hyporesponsiveness in Septic Shock. **Current Vascular Pharmacology**, 11:139-149, 2013.

KOCK, D.; C. DAELE, V.; POELAERT, J. Sepsis and septic shock: pathophysiological and cardiovascular background as basis for therapy. **Acta Clinica Belgica**, 65(5):323-9, 2010.

KOSHLAND, D. E. JR. The molecule of the year. **Science**. 18:258(5090):1861, 1992.

KÜPER, C.; FRAEK, M-L.; MÜLLER, H-H, et al. Sepsis-induced urinary concentration defect is related to nitric oxide-dependent inactivation of TonEBP/NFAT5, which downregulates

renal medullary solute transport proteins and aquaporin-2. **Critical Care Medicine**, 40(6):1887-95, 2012.

LAGU, T.; ROTHBERG, M. B.; SHIEH, M-S.; et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Critical Care Medicine**, 40(3), 754–761, 2012.

LEVY, B.; COLLIN, S.; SENNOUN, N.; et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. **Intensive Care Medicine**, 36:2019–2029, 2010.

LIM, C. H.; DEDON, P. C.; DEEN, W. M. Kinetic analysis of intracellular concentrations of reactive nitrogen species. **Chemical Research Toxicology**, 21:2134-2147, 2008.

LIN, NT.; YANG, FL.; LEE, RP.; et al. Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats. **Life Science**, 2;78(10):1038-43, 2006.

LIPTON, S. A.; CHOI, Y. B.; PAN, Z. H.; et al. A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodestructive effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. **Nature**, 364: 626–632, 1993.

LIU, L.; YAN, Y.; ZEN, M.; et al. Essential Roles of S-Nitrosothiolsin Vascular Homeostasis and Endotoxic Shock. **Cell**, 116:617–628, 2004.

LIU, Z.; DAI, X.; ZHU, H.; et al. Lipopolysaccharides Promote S-Nitrosylation and Proteasomal Degradation of Liver Kinase B1 (LKB1) in Macrophages in Vivo. **The Journal of Biological Chemistry**, 290:31, 19011–19017, 2015.

LIU, Y; GUTTERMAN, DD. Oxidative stress and potassium channel function. **Clinical Experimental Pharmacology Physiology**, 29: 305-311, 2002.

LONG, L. H.; LIU, J.; LIU, R-L.; WANG, F.; ZHUANG-LI, H.; XIE, N.; FU, H.; CHEN, J-G. Differential Effects of Methionine



and Cysteine Oxidation on  $[Ca^{2+}]_i$  in Cultured Hippocampal Neurons. **Cell Molecular Neurobiology**, 29:7–15, 2009.

LOPEZ, A.; LORENTE, J.A.; STEINGRUB, J.; et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, 32:21-30, 2004.

LU, J.; KATANO, T.; UTA, D.; et al. Rapid S-nitrosylation of actin by NO-generating donors and in inflammatory pain model mice. **Molecular Pain**, 22;7:101., 2011.

MCCONNELL, K. W.; COOPERSMITH, C. M. Pathophysiology of septic shock: From bench to bedside. **La Presse Médicale**, V. 45, n. 4, p. e93–e98

MACMICKING, J. D.; NATHAN, C.; HOM, G.; et al. Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell**, 19;81(4):641-50, 1995.

MARSHALL, H. E.; STAMLER, J. S. Inhibition of NF-kappa B by Snitrosylation. **Biochemistry**, 40: 1688–1693, 2001.

MARINO, S. M.; GLADYSHEV, V. N. Structural analysis of cysteine S-nitrosylation: a modified acid-based motif and the emerging role of trans-nitrosylation. **Journal Molecular Biology**, 29;395(4):844-59, 2010.

MANI, K.; CHENG, F.; HAVSMARK, B.; et al. Involvement of glycosylphosphatidylinositol-linked ceruloplasmin in the copper/zinc-nitric oxide-dependent degradation of glypican-1 heparan sulfate in rat C6 glioma cells. **Journal Biology Chemical**, 279:12918–12923, 2004.

MARÍN, N.; ZAMORANO, P.; CARRASCO, R.; et al. S-Nitrosation of  $\beta$ -Catenin and p120 Catenin: A Novel Regulatory Mechanism in Endothelial Hyperpermeability. **Circulation Research**, 17;111(5):553-63, 2012.

MARON, B. A.; TANG, S-S.; JOSEPH, L. S-Nitrosothiols and the S-Nitrosoproteome of the Cardiovascular System. **Antioxidants & Redox Signaling**, 20; 18(3): 270–287, 2013.

MARTÍNEZ-RUIZ, A.; ARAUJO, I. M. A. IZQUIERDO-ALVAREZ, A.; et al. Specificity in S-Nitrosylation: A Short-Range Mechanism for NO Signaling? **Antioxidants & Redox Signaling**, 19(11): 1220-1235, 2013.

MASSY, Z. A.; FUMERON, C.; BORDERIE, D.; et al. Increased plasma S-nitrosothiol concentrations predict cardiovascular outcomes among patients with end-stage renal disease: a prospective study. **Journal of the American Society of Nephrology**, 15:470–476, 2004.

MATSUDA, N.; HATTORI, Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. **Journal Smooth Muscle Research**, 43:117–137, 2007.

MCPHERSON, D.; GRIFFITHS, C.; WILLIAMS, M.; et al. Sepsis-associated mortality in England: an analysis of multiple cause of death data from 2001 to 2010. **British Medical Journal Open**, 2;3(8). pii: e002586, 2013.

MELLION, B. T.; IGNARRO, L. J.; OHLSTEIN, E. H.; et al.. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3', 5'-monophosphate in ADP-induced human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. **Blood**, 57(5):946-55. 1981.

MIKKELSEN, M.E.; MILTIADES, A.N.; GAIESKI, D.F. Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. **Critical Care Medicine**, 37(5):1670–7, 2009.

MINAMI, K.; OGATA, J.; UEZONO, Y. What is the main mechanism of tramadol? Format: AbstractSend to **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology**. 388(10):999-1007, 2015.

MIAO, W.; QU, Z.; SHI, K.; et al. RIP3 S- nitrosylation contributes to cerebral ischemic neuronal injury. **Brain Research**, 28, 2015.

MOLINA, P. E. Opioids and opiates: analgesia with cardiovascular, haemodynamic and immune implications in critical illness. **Journal International Medicine**, 259: 138–154, 2006.

MÖLLER, M. N.; LI, Q.; VITTURI, D. A.; et al. Membrane “Lens” Effect: Focusing the Formation of Reactive Nitrogen Oxides from the  $\bullet$  NO/O<sub>2</sub> Reaction. **Chemical Research Toxicology**, 20, 709-714, 2007.

MONCADA, S.; PALMER, R. J.; HIGGS, A. E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, 43:109-142, 1991.

MURONOI, T.; KOYAMA, K.; NUNOMIYA, S, et al: Immature platelet fraction predicts coagulopathy-related platelet consumption and mortality in patients with sepsis. **Thrombosis Research**, 144:169-75, 2016

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Emerging roles of S-nitrosylation in protein misfolding and neurodegenerative diseases. **Antioxidants & Redox Signaling**, 10(1): 87-102, 2007.

NAKAMURA, T.; LIPTON, S. A. Emerging Role of Protein-Protein Transnitrosylation in Cell Signaling Pathways. **Antioxidants & Redox signalling**, 18, 3, 2013.

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

NAMAS, R.; ZAMORA, R.; NAMAS, R.; et al. Sepsis: Something Old, Something New, and a Systems View. **Critical Care**, 27(3): 314.e1–314.e11, 2012.

NARDI, G. M.; BET, A. C.; SORDI, R.; et al. Opioid analgesics in experimental sepsis: effects on physiological, biochemical, and haemodynamic parameters. **Fundamental Clinical Pharmacology**, 27(4):347-53, 2013.

NARDI, G. M.; SCHESCHOWITSCH, K.; AMMARD, D. E.; et al. Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. **Critical Care Medicine**. 42(6):391-400, 2014.

NICE-SUGAR STUDY INVESTIGATORS, S. FINFER, B. LIU, ET AL. Hypoglycemia and risk of death in critically ill patients. **New England Journal Medicine**, 367 (12) (2012), pp. 1108–1118

NOZIK-GRAYCK, E.; WHALEN, E. J.; STAMLER, J. S.; et al. S-nitrosoglutathione inhibits alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery. **American Journal Physiology Lung Cell Molecular Physiology**, 290(1):136-43, 2006.

O'BRIEN, A. J.; WILSON, A. J.; SIBBALD, R.; et al. Temporal variation in endotoxin-induced vascular hyporeactivity in a rat mesenteric artery organ culture model. **British Journal of Pharmacology**, 133, 351 ± 360, 2001.

OCHOA, J.B, UDEKWU, A. O.; BILLIAR, T. R.; et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Annals Surgery**, 214(5): 621-626, 1991.

OKAMOTO, S.; LIPTON, S. A. S-Nitrosylation in neurogenesis and neuronal development. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1850:1588–1593, 2015.

OPAL, S. M.; VAN DER POLL, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. **Journal of Internal Medicine**, 277(3):277-93, 2015.

OZAWA, K.; WHALEN, E. J.; NELSON, C. D.; et al. S-nitrosylation of beta-arrestin regulates beta-adrenergic receptor trafficking. **Molecular Cell**, 31:395–405, 2008.

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

PARK, C. S.; PARK, R.; KRISHNA, G. Constitutive expression and structural diversity of inducible isoform of nitric oxide synthase in human tissues. **Life Science**, 59: 219–225, 1996.

PAULI, J. R.; ROPELLE, E. R.; CINTRA, D. E.; et al. Acute physical exercise reverses S-nitrosation of the insulin receptor, insulin receptor substrate 1 and protein kinase B/Akt in diet-induced obese Wistar rats. **Journal Physiology**, 586:659–671, 2008.

PLUMMER, M. P.; DEANE, A. M. Dysglycemia and Glucose Control During Sepsis. **Clinics in Chest Medicine**, 37(2):309-19, 2016.

QU, Z. W.; MIAO, W. Y.; HU, S. Q. et al. N-methyl-D-aspartate receptor-dependent denitrosylation of neuronal nitric oxide synthase increase the enzyme activity. **PLoS One**, 7(12):e52788, 2012.

RAHMAN, M. A.; SENGA, T.; ITO, S.; et al. S-nitrosylation at cysteine 498 of c-Src tyrosine kinase regulates nitric oxidemediated cell invasion. **J. Chemical Biology**, 285:3806–3814, 2010

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Archives of Medical Research**, 36(6): 672-81, 2005.

RAPOPORT, R. M.; MURAD, F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat aorta may be mediated through cyclic GMP. **Circulation Research**, 52: 352- 7, 1983.

REITMAN, S.; FRANKEL, S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic

transaminases. **American Journal of Clinical Pathology**, 28:56, 1957.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M. S.; FLIERL, M. A.; et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocol**, 4(1):31-6, 2009.

RODRIGUEZ-ORTIGOSA CM, CELAY J, OLIVAS I, JUANARENA N, ARCELUS S, URIARTE I, MARÍN JG, AVILA MA, MEDINA JF, PRIETO J. A GAPDH-mediated trans-nitrosylation pathway is required for feedback inhibition of bile salt synthesis in rat liver. **Gastroenterology**, 147, 1084–1093, 2014.

ROSSI, M. A.; CELES, M. R.; PRADO, C. M.; et al. Myocardial structural changes in long-term human severe sepsis/septic shock may be responsible for cardiac dysfunction. **Shock**, 27(1): 10–8, 2007.

SACERDOTE, P. Opioids and the immune system. **Palliative Medicine**, 20:9Y15, 2006.

SAETRE, T.; GUNDERSEN, Y.; THIEMERMANN, C. Aminoethyl-isothiourea, a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase activity, improves liver circulation and oxygen metabolism in a porcine model of endotoxemia. **Shock**, 9:109–115, 1998.

SCHONHOFF, C. M.; RAMASAMY, M. U.; ANWER, S. Nitric oxide-mediated inhibition of taurocholate uptake involves S-nitrosylation of NTCP. **American Journal Physiology Gastrointestinal Liver Physiology**, 300(2): G364–G370, 2011.

SHARAWY, N. Vasoplegia in septic shock: Do we really fight the right enemy? **Journal of Critical Care**, 29:83–87, 2014.

SHINOZAKI, S.; CHOI, C. S.; SHIMIZU, N. et al. Liver-specific inducible nitric-oxide synthase expression is sufficient to cause hepatic insulin resistance and mild hyperglycemia in mice. **Journal Biology Chemistry**, 7;286(40):34959-75, 2011.

SILVA, E.; PEDRO, M. D. E.; SOGAYAR, A. C.; et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, 8:(4):251-60, 2004.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of the American Medical Association**, 23;315(8):801-10, 2016.

SIPS, P. Y.; IRIE, T.; ZOU, L.; SHINOZAKI, S.; et al. Reduction of cardiomyocyte S-nitrosylation by S-nitrosogluthione reductase protects against sepsis-induced myocardial depression. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, 15;304(8):1134-46, 2013.

SCHARFSTEIN, J. S.; KEANEY, J. F.; SLIVKA, A.; et al. In vivo transfer of nitric oxide between a plasma protein-bound reservoir and low molecular weight thiols. **Journal Clinical Investigative**, 94(4): 1432–1439, 1994.

SCOTT, D. J.; HULL, M. A.; CARTWRIGHT, E. J.; et al. Lack of inducible nitric oxide synthase promotes intestinal tumorigenesis in the Apc(Min/+) mouse. **Gastroenterology**. 121(4):889-99, 2001.

SHAO Q.; FALLICA J.; CASIN KM.; MURPHY E.; STEENBERGEN C.; KOHR MJ. Characterization of the sex-dependent myocardial S-nitrosothiol proteome. **American Journal Physiology Heart Circulation Physiology**, 310(4):H505-15, 2016.

SMITH BC, MARLETTA MA. Mechanisms of S-nitrosothiol formation and selectivity in nitricoxide signaling. **Current Opinion in Chemical Biology**, 16:498–506, 2012.

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

SOTOCINAL, S. G.; SORGE, R. E.; ZALOUM, A.; et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Molecular Pain**, 29;7:55, 2011.

STRNAD, P.; TACKE, F.; KOCH, A.; TRAUTWEIN, C. Liver - guardian, modifier and target of sepsis. **Nature Review Gastroenterology Hepatology**, 14(1):55-66, 2017.

STAMLER, J. S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; et al. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proceedings of the National Academy of Sciences U S A**, 89:7674–7, 1992.

STAMLER, J. S.; TOONE, E. J.; LIPTON, S. A.; et al. (S)NO signals: translocation, regulation, and a consensus motif. **Neuron**, 18:691–696, 1997.

STRAUB, A.C.; BILLAUD, M.; JOHNSTONE, S. et al. Compartmentalized Connexin 43 S-Nitrosylation/Denitrosylation Regulates Heterocellular Communication in the Vessel Wall. **Arteriosclerosis, Thrombosis Vascular Biology**, 31:399-407, 2011.

STUEHR, D.J. E MARLETTA, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 82: 7738-42, 1985.

SUN, C.; JAIN, R. K.; MUNN, L. L. Non-uniform plasma leakage affects local hematocrit and blood flow: implications for inflammation and tumor perfusion. **Annals of Biomedical Engineering**, 35(12):2121-9, 2007.

SUNICO, C. R.; NAKAMURA, T.; ROCKENSTEIN, E.; et al. S-Nitrosylation of parkin as a novel regulator of p53-mediated neuronal cell death in sporadic Parkinson's disease. **Molecular Neurodegeneration**, 28;8:29: 1-16, 2013.



SUN, J.; MORGAN, M.; SHEN, R. F.; et al. Preconditioning results in S-nitrosylation of proteins involved in regulation of mitochondrial energetic and calcium transport. **Circulation Research**, 101:1155–1163, 2007.

SZABO, C.; MITCHELL, J. A.; THIEMERMANN, C.; et al., Nitric oxide mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. **British Journal of Pharmacology**, 108:786-792, 1993.

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

THIBEAULT, S.; RAUTUREAU, Y.; OUBAHA, M.; et al. S-nitrosylation of beta-catenin by eNOS-derived NO promotes VEGF-induced endothelial cell permeability. **Molecular Cell**, 13;39(3):468-76, 2010.

THOMAS, D. D.; HEINECKE, L. A.; RIDNOUR, R. C.; et al. Signaling and stress: The redox landscape in NOS2 biology. **Free Radical Biology and Medicine**, 24;87:204-225, 2015.

TSCHUDI, M. R.; MESAROS, S.; LÜSCHER, T. F.; et al. Direct in situ measurement of nitric oxide in mesenteric resistance arteries. Increased decomposition by superoxide in hypertension. **Hypertension**, 27:32-5, 1996.

TSUTSUI, M.; TANIMOTO, A.; TAMURA, M.; et al. Significance of nitric oxide synthases: Lessons from triple nitric oxide synthases null mice. **Journal of Pharmacological Sciences**. 127:(1) 42–52, 2015.

VENET, F.; DAVIN, F.; GUIGNANT, C.; et al: Early assessment of leukocyte alterations at diagnosis of septic shock. **Shock**, 34(4):358-63, 2010.

WANG, Y.; LAWSON, J. A.; JAESCHKE, H. Differential effect of 2-aminoethyl-isothiourea, an inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, on microvascular blood flow and organ injury in models of hepatic ischemia-reperfusion and endotoxemia. **Shock**, 10:20–25, 1998.

WANG, Y.; ZHOU, Z.; LEYLEK, T.; et al. Protein cysteine S-nitrosylation inhibits vesicular uptake of neurotransmitters. **Neuroscience**, 2:311:374-381, 2015.

WAITE, M. E.; TOMKOVICH, A.; QUINN, T. L.; et al. Efficacy of Common Analgesics for Postsurgical Pain in Rats. **Journal American Association Laboratory Animal Science**, 54(4):420-5, 2015.

WANG, Y.; MATHEWS, W.R.; GUIDO, D.M.; et al. Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. **Shock**, 4: 282, 1995.

WESTENBERGER, U.; THANNERS, R. H. H.; GERSONDE, K.; et al. Formation of free radicals and nitricoxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. **Free Radical Research Communications**, 11:167–178, 1990.

WHALEN, E. J.; FOSTER, M. W.; MATSUMOTO, A.; et al. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by Snitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. **Cell**, 129:511–522, 2007.

WU, C. C.; CHEN, S. J.; SZABO, C.; et al. Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent model of endotoxic shock. **British Journal of Pharmacology**, 114: 1666-1672, 1995.