



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

Marcelo de Almeida Nakashima

Intervindo na via do óxido nítrico durante a sepse experimental: papel dos inibidores da fosfodiesterase 5 sobre as disfunções cardiovasculares induzidas pela sepse

Florianópolis

2020

Marcelo de Almeida Nakashima

Intervindo na via do óxido nítrico durante a sepse experimental: papel dos inibidores da fosfodiesterase 5 sobre as disfunções cardiovasculares induzidas pela sepse

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Farmacologia
Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

Florianópolis

2020

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

Nakashima, Marcelo de Almeida

Intervindo na via do óxido nítrico durante a sepse experimental: papel dos inibidores da fosfodiesterase 5 sobre as disfunções cardiovasculares induzidas pela sepse / Marcelo de Almeida Nakashima ; orientador, Daniel Fernandes, 2020.

80 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Sepse. 3. CLP. 4. cGMP. 5. PDE5. I. Fernandes, Daniel . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Marcelo de Almeida Nakashima

Intervindo na via do óxido nítrico durante a sepse experimental: papel dos inibidores da fosfodiesterase 5 sobre as disfunções cardiovasculares induzidas pela sepse

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Daniel Fernandes
Farmacologia/CCB/UFSC

Profa. Dra. Áurea Elizabeth Linder
Farmacologia/CCB/UFSC

Profa. Dra. Renata Maria Lataro
Fisiologia/CCB/UFSC

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

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Daniel Fernandes
Orientador

Florianópolis, 2020

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família por todo o apoio e atenção que sempre me disponibilizaram, e que foram essenciais para que eu pudesse concluir esta etapa importante da minha vida.

Agradeço ao meu orientador, professor Daniel Fernandes, pela dedicação no ato de ensinar, pela enorme atenção que me deu para me formar como profissional na área de Farmacologia e pelo visível desejo de ajudar a criar um senso crítico para com os questionamentos da Ciência.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular. Ao Gustavo e ao Junior, agradeço pelas conversas, pela amizade, por me ensinarem todas as técnicas e experimentos que eu realizei neste trabalho e por me acolherem na cidade e no laboratório desde o início do Mestrado. Também agradeço à Amanda e ao Lucas, alunos de iniciação científica, pela convivência e parceria dentro e fora do laboratório.

Agradeço a todos os professores do departamento de Farmacologia por todo o aprendizado que recebi durante o curso. Em especial, aos professores da área cardiovascular com quem tive mais convivência, prof. Jamil, prof. José Eduardo, prof^ª. Beth, prof^ª. Regina e prof. Geisson, que sempre disponibilizaram sem hesitar seus tempos e seus laboratórios para quaisquer dúvidas e experimentos que precisassem ser realizados.

Agradeço à prof^ª. Alexandra do departamento de Bioquímica e às suas alunas Tuany e Débora pelas discussões e ajuda em alguns experimentos.

Agradeço à Letícia, farmacêutica da Divisão de Análises Clínicas do HU-UFSC, pela ajuda com as análises bioquímicas.

Um agradecimento especial aos membros da banca examinadora, os professores Renata, Beth, Geisson e José Eduardo, pela disponibilidade e por aceitarem participar e contribuir na avaliação deste trabalho.

Por fim, agradeço ao CNPq e à CAPES, pelo apoio financeiro, e à UFSC e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela oportunidade de realizar este trabalho de Mestrado.

RESUMO

A sepse é definida como uma disfunção de órgãos potencialmente fatal, causada por uma resposta desregulada do hospedeiro frente a uma infecção. Sendo assim, é uma séria complicação que culmina em uma desordem inflamatória complexa e sistêmica, afetando quaisquer órgãos do corpo através de diversos mediadores. Dentre os sistemas afetados, o cardiovascular é um dos principais acometidos, levando os pacientes a apresentarem alterações hemodinâmicas mediadas por perda intrínseca de fluido nos vasos, perda do tônus vascular, depressão miocárdica, redistribuição microcirculatória do fluxo sanguíneo e outros fatores que, em última análise, levam a uma hipotensão arterial persistente e refratária. Dados na literatura frequentemente apontam para uma participação deletéria do óxido nítrico na instalação e manutenção deste estado hipotenso. Entretanto, para contrapor a isquemia induzida pelas altas concentrações de catecolaminas endógenas e exógenas que circulam na tentativa de aumentar a pressão arterial, algumas evidências indicam a necessidade de agentes que possam manter os tecidos devidamente perfundidos, de modo a evitar ainda mais danos nos órgãos. Neste sentido, buscamos neste trabalho avaliar o efeito da inibição da enzima fosfodiesterase 5 em um modelo experimental de sepse em ratos, visando a melhora nos parâmetros de disfunção de órgãos via aumento de cGMP e, consequentemente, a preservação da perfusão tecidual. Para isso, ratos da linhagem Wistar (90 dias, 250 – 350 g, CEUA nº 6005071118) foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos: CLP, nos quais foram realizados os procedimentos de ligadura e perfuração do ceco, e o grupo falsa-cirurgia (Sham). Oito horas após as cirurgias, os animais foram novamente randomizados para receber veículo (DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.) ou os inibidores de fosfodiesterase 5 sildenafil (10 mg/kg, s.c.) ou tadalafil (2 mg/kg, s.c.). Vinte e quatro horas após o CLP, foram analisados diferentes parâmetros cardiovasculares, inflamatórios e metabólicos. Em comparação com os animais dos grupos Sham, os animais sépticos apresentaram hipotensão arterial refratária, taquicardia e redução do fluxo sanguíneo renal. Além disso, o CLP reproduziu alterações fisiopatológicas observadas na clínica em diferentes sistemas, como o aumento da infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco, o aumento exacerbado nos níveis plasmáticos de NOx, redução nos níveis de BH4 na urina, bem como hipoglicemia e aumento nos níveis de diferentes marcadores sanguíneos de dano tecidual. De modo geral, apesar da necessidade de novas terapias adjuvantes para o tratamento das desordens microcirculatória na sepse, a intervenção com inibidores de PDE5 no protocolo experimental utilizado demonstrou pouca ou nenhuma interferência nos parâmetros avaliados.

Palavras-chave: Sepse. CLP. Sildenafil. Tadalafil. cGMP.

ABSTRACT

Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. Therefore, it is a serious complication that culminates in a complex and systemic inflammatory disorder, affecting any body organs through different mediators. Among the affected systems, the cardiovascular system is a major one, leading patients to present hemodynamic changes mediated by intrinsic loss of fluid in the vessels, loss of vascular tone, myocardial depression, microcirculatory redistribution of blood flow and other factors, which ultimately lead to a persistent and refractory arterial hypotension. Data in the literature often point to a deleterious role of nitric oxide in maintaining this hypotensive state. However, to counteract the ischemia induced by the high concentrations of endogenous and exogenous catecholamines that circulate in an attempt to increase blood pressure, some evidence indicates the need for agents that can keep the tissues properly perfused, in order to avoid further organ damage. In this sense, we seek in this work to evaluate the effect of phosphodiesterase 5 enzyme inhibition in an experimental model of sepsis in rats, aiming to improve the parameters of organ dysfunction via increased cGMP and, consequently, the preservation of tissue perfusion. For this, Wistar strain rats (90 days, 250 - 350 g, CEUA n° 6005071118) were randomly assigned to 2 groups: CLP, in which the cecum ligation and puncture procedures were performed, and the fake-surgery group (Sham). Eight hours after surgery, the animals were randomized again to receive vehicle (DMSO, 0.2 mL / kg, s.c.) or phosphodiesterase 5 inhibitors sildenafil (10 mg / kg, s.c.) or tadalafil (2 mg / kg, s.c.). Twenty-four hours after CLP, different cardiovascular, inflammatory and metabolic parameters were analyzed. Compared to animals in the Sham groups, septic animals showed refractory hypotension, tachycardia and reduced renal blood flow. In addition, the CLP reproduced pathophysiological changes observed in the clinic in different systems, such as increased neutrophil infiltration in cardiac tissue, exacerbated increase in plasma NO_x levels, reduction in urine BH₄ levels, as well as hypoglycemia and increase in the levels of different blood markers of tissue damage. In general, despite the need for new adjuvant therapies for the treatment of microcirculatory disorders in sepsis, the intervention with PDE5 inhibitors in the experimental protocol used showed little or no interference in the parameters evaluated.

Keywords: Sepsis. CLP. Sildenafil. Tadalafil. cGMP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dano generalizado induzido pela sepse em múltiplos órgãos e sistemas.....	27
Figura 2: Via de sinalização NO-sGC-cGMP-PKG em células endoteliais e musculares lisas.....	29
Figura 3: Seletividade das 11 famílias de PDEs para degradação de cAMP, cGMP ou ambos.....	30
Figura 4: Estrutura da enzima PDE5	31
Figura 5: Estruturas químicas do cGMP, do sildenafil e do tadalafil	34
Figura 6: Hipótese do estudo dos inibidores de PDE5 na sepse	36
Figura 7: Grupos de caracterização do efeito dos inibidores de PDE5 em parâmetros cardiovasculares.....	40
Figura 8: Grupos experimentais.....	44
Figura 9: Delineamento experimental.....	45
Figura 10: Efeito dos inibidores da PDE5 na PAS e na FC de ratos ao longo do tempo	51
Figura 11: Efeito do sildenafil na duração da resposta hipotensora frente à administração de nitroprussiato de sódio	53
Figura 12: Efeito do tadalafil na duração da resposta hipotensora frente à administração de nitroprussiato de sódio	53
Figura 13: Resposta da infusão de noradrenalina na PA, na FC e no FSR durante a sepse ...	55
Figura 14: Infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco durante a sepse	56
Figura 15: Níveis de BH4 na urina ao longo do estabelecimento da sepse	57
Figura 16: Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) durante a sepse.....	58
Figura 17: Perfil glicêmico dos animais ao longo do estabelecimento da sepse	59
Figura 18: Níveis plasmáticos de marcadores de dano tecidual (creatinina, ureia, AST, ALT e lactato) durante a sepse.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	<i>Quick</i> SOFA (qSOFA).....	25
-----------	--------------------------------	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: <i>Score</i> SOFA	24
Tabela 2: Ensaio clínico em andamento com o termo “sildenafil” – National Institutes of Health (NIH).....	32
Tabela 3: Ensaio clínico em andamento com o termo “tadalafil” – National Institutes of Health (NIH).....	33
Tabela 4: Comparação das características dos fármacos inibidores de PDE5.....	35
Tabela 5: Discrepâncias entre o modelo experimental de sepse CLP e a sepse em humanos.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5'-GMP – Guanosina 5'-monofosfato
- ALT – Aspartato aminotransferase
- ANOVA – Análise de variância
- AST – Alanina aminotransferase
- BH4 – Tetrahydrobiopterina
- BPM – Batimentos por minuto
- cGMP – Guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CLP – Ligadura e perfuração do ceco (do inglês, *cecal ligation and puncture*)
- DMSO – Dimetilsulfóxido
- EPM – Erro padrão da média
- FC – Frequência cardíaca
- FSR – Fluxo sanguíneo renal
- GPCR – Receptores acoplados à proteína G (do inglês, *G-protein-coupled receptors*)
- MPO – Mieloperoxidase
- NO – Óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)
- NOx – Nitrato e nitrito
- PAM – Pressão arterial média
- PAS – Pressão arterial sistólica
- PDE5 – Fosfodiesterase 5 (do inglês, *phosphodiesterase 5*).
- qSOFA – *quick* SOFA
- SOFA – do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*
- UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
- UTI – Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	SEPSE: DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA	23
1.2	SEPSE: FISIOPATOLOGIA	25
1.3	ÓXIDO NÍTRICO: VIAS DE SINALIZAÇÃO	28
1.4	FOSFODIESTERASES COMO ALVOS FARMACOLÓGICOS.....	29
1.5	ENVOLVIMENTO DUAL DO ÓXIDO NÍTRICO NA SEPSE.....	35
2	OBJETIVOS	37
2.1	OBJETIVO GERAL.....	37
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1	ANIMAIS.....	39
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO SILDENAFIL E TADALAFIL EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	39
3.2.1	Avaliação do efeito do tratamento com sildenafil ou tadalafil na pressão arterial sistólica (PAS) e na frequência cardíaca (FC) ao longo do tempo através da pletismografia de cauda.....	41
3.2.2	Avaliação da resposta ao nitroprussiato de sódio <i>in vivo</i>: efeito na pressão arterial (PA).....	41
3.3	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE INIBIDORES DA PDE5 NA SEPSE.....	42
3.3.1	Procedimento cirúrgico.....	42
3.3.2	Grupos experimentais	43
3.3.3	Avaliação da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e fluxo sanguíneo renal (FSR) <i>in vivo</i> frente à infusão de noradrenalina durante a sepse.....	45
3.3.4	Ensaio da atividade enzimática mieloperoxidase (MPO) no tecido cardíaco ...	46
3.3.5	Quantificação dos níveis de tetrahydrobiopterina (BH4) na urina	46
3.3.6	Quantificação dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx).....	47
3.3.7	Quantificação dos níveis de glicose no sangue	48

3.3.8	Quantificação dos níveis plasmáticos de creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato.....	48
3.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	49
4	RESULTADOS.....	51
4.1	CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO SILDENAFIL E TADALAFIL EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES	51
4.1.1	Efeito do tratamento com sildenafil ou tadalafil na pressão arterial sistólica (PAS) e na frequência cardíaca (FC).....	51
4.1.2	Resposta da administração de nitroprussiato de sódio <i>in vivo</i> : efeitos na pressão arterial (PA).....	52
4.2	EFEITOS DE INIBIDORES DA PDE5 NA SEPSE	54
4.2.1	Efeito da infusão de noradrenalina <i>in vivo</i> na pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e fluxo sanguíneo renal (FSR) durante a sepse.....	54
4.2.2	Atividade enzimática mieloperoxidase (MPO) no tecido cardíaco durante a sepse.....	56
4.2.3	Níveis de tetrahydrobiopterina (BH4) na urina	56
4.2.4	Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx)	57
4.2.5	Níveis de glicose no sangue	58
4.2.6	Níveis plasmáticos de creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato	59
5	DISCUSSÃO	61
6	CONCLUSÕES	71
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE: DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA

De acordo com o Terceiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico (*Sepsis-3*), a sepse ocorre quando uma resposta desregulada de um hospedeiro frente a uma infecção resulta em disfunção dos órgãos com risco de morte. Ao contrário da definição prévia (*Sepsis-2*), esta nova definição torna como ponto central a disfunção de órgãos ao invés da resposta inflamatória. Para a codificação da severidade no dano aos órgãos e sistemas, adotou-se o *score* SOFA (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*), indicado na Tabela 1. O choque séptico, por sua vez, é um estágio mais severo da sepse, no qual as alterações metabólicas e circulatórias são intensas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade (SINGER *et al.*, 2016).

Na prática clínica, os pacientes são diagnosticados com sepse ao apresentarem infecção sistêmica e aumento no *score* SOFA de 2 pontos ou mais, ou são diagnosticados com choque séptico se, apesar de ressuscitação adequada com fluidos, ainda apresentarem níveis de lactato sanguíneo acima de 2 mmol/L e hipotensão arterial persistente e refratária, necessitando de vasopressores para manter a pressão arterial média (PAM) acima de 65 mmHg (CECCONI *et al.*, 2018). Além disso, existe outro sistema de classificação denominado *quick* SOFA (qSOFA) que, apesar de não designar critérios para estabelecer um diagnóstico, é utilizado como uma ferramenta para identificar pacientes com alto risco de sepse (Quadro 1). Este sistema, embora não seja robusto como o *score* SOFA, pode ser utilizado rapidamente, sem testes laboratoriais, o que permite medidas repetidas e garante que os pacientes que se encaixem em pelo menos dois critérios recebam a devida atenção para minimizar os riscos de um mau prognóstico.

Tabela 1: *Score* SOFA

Sistema	<i>Score</i>				
	0	1	2	3	4
Respiratório					
PaO ₂ /FiO ₂ (kPa)	≥ 53,3	< 53,3	< 40	< 26,7	13,3
Coagulação					
Plaquetas (x 10 ³ /μL)	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Hepático					
Bilirrubina (μmol/L)	< 20	20 - 32	33 - 101	102 - 204	> 204
Cardiovascular					
	PAM > 70 mmHg	PAM < 70 mmHg	Administração de dopamina < 5 μg/kg/min ou dobutamina	Administração de dopamina 5,1 - 15 μg/kg/min, ou adrenalina ≤ 0,1 μg/kg/min ou noradrenalina ≤ 0,1 μg/kg/min	Administração de dopamina > 15 μg/kg/min, ou adrenalina > 0,1 μg/kg/min ou noradrenalina > 0,1 μg/kg/min
Sistema nervoso central					
Escala de Coma de Glasgow	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	< 6
Renal					
Creatinina (μmol/L)	< 110	111 - 170	171 - 299	300 - 440	> 440
Débito urinário (mL/dia)				< 500	< 200

Fonte: adaptado de Singer *et al* (2016). Notas: o *score* SOFA varia de 0 a 4 para cada um dos seis sistemas e, quanto maior o *score*, mais severa é a disfunção de órgãos. O diagnóstico de sepse é dado para os pacientes com infecção e que somam 2 pontos ou mais no *score*. PaO₂: pressão arterial parcial de oxigênio. FiO₂: fração inspirada de oxigênio. PAM: pressão arterial média.

Quadro 1: *Quick* SOFA (qSOFA)

Frequência respiratória	$\geq 22/\text{min}$
Alteração do estado mental	
Pressão arterial sistólica (PAS)	$\leq 100 \text{ mmHg}$

Fonte: adaptado de Singer *et al* (2016). Notas: o sistema de avaliação qSOFA não classifica um diagnóstico como o *score* SOFA, mas avalia o risco de sepse e de mau prognóstico nos pacientes, permitindo que um monitoramento adequado seja feito naqueles que se encaixarem em pelo menos dois dos critérios listados acima. PAS: pressão arterial sistólica.

Sobretudo, é importante destacar o fardo global que esta síndrome acarreta. Estima-se que ocorram cerca de 50 milhões de casos de sepse por ano, potencialmente levando à morte de 11 milhões de pessoas neste período (RUDD *et al.*, 2020). Nota-se a grande incidência e mortalidade desta doença, principalmente levando-se em consideração que estes dados epidemiológicos foram extrapolados a partir de bancos de dados de países de alta renda, o que torna os valores, ainda que altos, subestimados. No Brasil, um estudo epidemiológico recente (MACHADO *et al.*, 2017) mostrou que pacientes diagnosticados com sepse ocupavam 30,2% dos leitos nas unidades de terapia intensiva (UTI) dos hospitais envolvidos no estudo. Além disso, 56% destes pacientes morreram no hospital, evidenciando a alta taxa de mortalidade pela qual essa síndrome é responsável.

1.2 SEPSE: FISIOPATOLOGIA

A sepse é uma desordem inflamatória complexa e sistêmica, associada a um processo de vasodilatação e hipotensão. Pode ser originada a partir de qualquer organismo infeccioso, sendo que os sítios de infecção que mais frequentemente levam à sepse são: pulmão, abdômen, corrente sanguínea e tratos geniturinário e renal (CECCONI *et al.*, 2018).

Todos os órgãos do corpo podem ser afetados pela sepse, uma vez que diversos tipos de citocinas e outros mediadores são liberados na circulação ao decorrer do desenvolvimento desta desordem (HOTCHKISS *et al.*, 2016). Dentre os principais sistemas que são prejudicados (Figura 1), destacam-se:

- **Neurológico:** a sepse causa uma disfunção cerebral difusa como consequência da inflamação sistêmica, causando alteração no estado mental dos pacientes (letargia, confusão e delírio). Além disso, a longo prazo os sobreviventes desenvolvem sequelas neuropsicológicas,

incluindo declínio funcional e cognitivo, depressão, ansiedade e transtorno do estresse pós-traumático (SONNEVILLE *et al.*, 2013).

- **Pulmonar:** danos induzidos por mediadores inflamatórios nos pulmões aumentam a permeabilidade nas células endoteliais capilares e nas células epiteliais alveolares, causando edema pulmonar e infiltração de fluidos, proteínas, neutrófilos e hemácias no espaço alveolar (MATTHAY *et al.*, 2019). O dano no sistema pulmonar normalmente se manifesta pelo aumento da frequência respiratória (taquipneia), associado a níveis anormais dos gases no sangue arterial e fadiga do músculo respiratório (HOTCHKISS *et al.*, 2016).

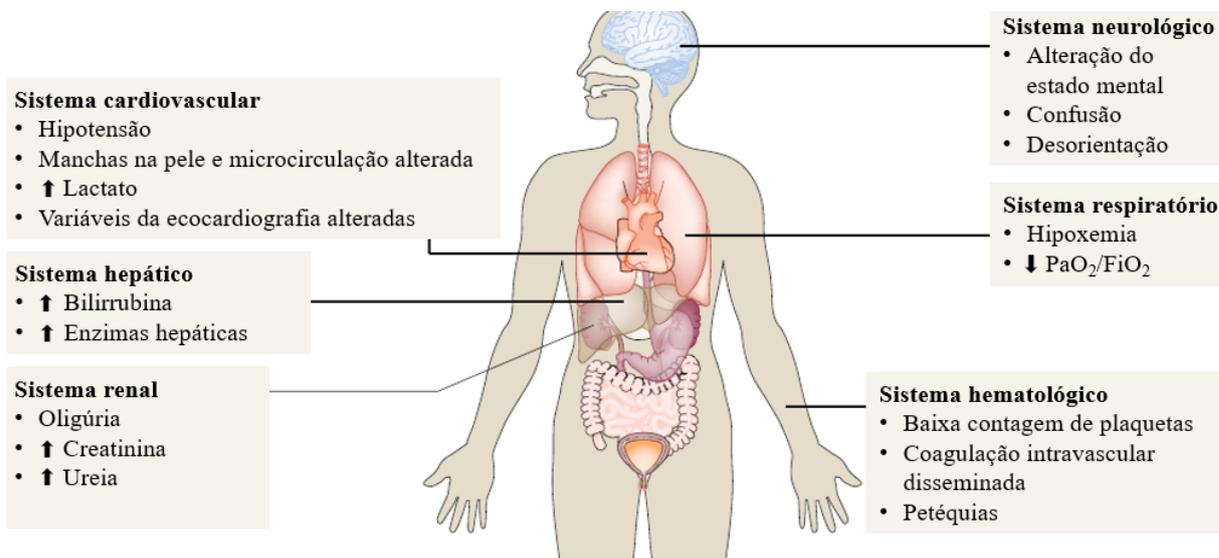
- **Cardiovascular:** a hipotensão arterial é uma característica marcante do choque séptico. Embora muitos mediadores estejam envolvidos na hipotensão, um dos principais fatores é o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que relaciona a inflamação com o comprometimento cardiovascular, contribuindo para a queda da pressão arterial pelo aumento nos níveis de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*). Além disso, o coração é um órgão bastante afetado, apresentando a chamada depressão miocárdica (disfunção em ambos os ventrículos esquerdo e direito), com redução da fração de ejeção (KAKIHANA *et al.*, 2016).

- **Renal:** o comprometimento renal na sepse pode progredir para uma falência renal aguda. Apesar dos exatos mecanismos não serem esclarecidos, parte da disfunção renal se dá pela perda do volume intravascular induzida pelo vazamento capilar e pela vasodilatação. Além disso, aumentos nas concentrações séricas de creatinina são associados com maior mortalidade (RICCI *et al.*, 2011).

- **Hematológico:** uma das principais desordens hematológicas é a coagulação intravascular disseminada (CID). Células endoteliais e mononucleares ativadas produzem citocinas pró-inflamatórias que promovem a coagulação de forma difusa, causando deposições intravasculares de fibrina (OKAMOTO, TAMURA & SAWATSUBASHI, 2016).

- **Hepático:** o comprometimento do fígado durante a sepse também é comum, indicado pelo aumento nos níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), bilirrubina total e fosfatase alcalina. Durante a sepse, a infecção e a resposta inflamatória exacerbada, além da má perfusão tecidual, são responsáveis pelo dano hepático. As lesões no fígado durante a sepse incluem inflamação portal, necrose centrilobular, inflamação lobular, apoptose dos hepatócitos e esteatose (YAN, LI & LI, 2014).

Figura 1: Dano generalizado induzido pela sepse em múltiplos órgãos e sistemas



Fonte: adaptado de Lelubre & Vincent (2018). Notas: a sepse pode levar à disfunção de quaisquer órgãos do corpo. Os sistemas mencionados acima são severamente prejudicados durante a sepse, fazendo com que o paciente apresente sinais e sintomas que são detectados e monitorados na prática clínica.

Uma das principais características da fisiopatologia da sepse é a perfusão inadequada dos órgãos, que contribui para o desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos e que pode ocorrer por perda intrínseca de fluido nos vasos, perda do tônus vascular, depressão miocárdica e por redistribuição microcirculatória do fluxo sanguíneo, dentre outros fatores (SINGER, 2014). A alteração microcirculatória que se desenvolve durante a sepse consiste na diminuição da densidade de capilares e em perfusão tecidual heterogênea, fazendo com que diferentes regiões dos órgãos tenham suprimento sanguíneo limitado (DE BACKER *et al.*, 2014). Tal disfunção pode persistir mesmo que as variáveis globais (como a pressão arterial e a oferta de oxigênio) tenham sido restauradas, o que dificulta ainda mais a obtenção de uma adequada oxigenação dos tecidos. Além disso, o limite na oferta de oxigênio tem efeito direto nas mitocôndrias celulares, seja inibindo a atividade, causando danos e menor síntese de proteínas mitocondriais. Dessa forma, compromete-se a produção de ATP, culminando na disfunção das atividades celulares ou mesmo na ativação de vias de morte celular (SINGER, 2014). Também contribuem para a piora das anormalidades circulatórias a formação de coágulos (microtrombos) e um aumento significativo dos níveis de NO no organismo, uma das causas da perda do tônus vascular e, conseqüentemente, do estabelecimento da hipotensão arterial no decorrer do quadro (LELUBRE & VINCENT, 2018).

1.3 ÓXIDO NÍTRICO: VIAS DE SINALIZAÇÃO

O NO pode ser sintetizado em mamíferos por 3 diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase, sendo elas: nNOS (NOS1, neuronal) e eNOS (NOS3, endotelial), que são constitutivamente expressas e produzem níveis nanomolares de NO, e a iNOS (NOS2, induzível). Esta última, por outro lado, é principalmente expressa sob ativação por mediadores inflamatórios como citocinas ou produtos bacterianos como o lipopolissacarídeo (LPS) e produz maior quantidade de NO em relação à nNOS e eNOS (níveis micromolares) (KESHET & EREZ, 2018). Todas as isoformas da NOS utilizam da arginina como substrato para gerar citrulina e NO.

Além do substrato, as enzimas NOS também requerem oxigênio, NADPH e o cofator tetrahidrobiopterina (BH4) para que ocorra a produção de NO. O BH4 é uma molécula ubíqua, sintetizada a partir do GTP e presente em praticamente todos os tecidos do organismo, uma vez que é um cofator necessário para o funcionamento adequado de diversas enzimas, como a fenilalanina-4-monoxigenase, a tirosina-3-monoxigenase e o triptofano-5-monoxigenase. Ou seja, é um cofator indispensável para a síntese de serotonina, das catecolaminas e do NO, como mencionado anteriormente (WERNER, BLAU & THÖNY, 2011).

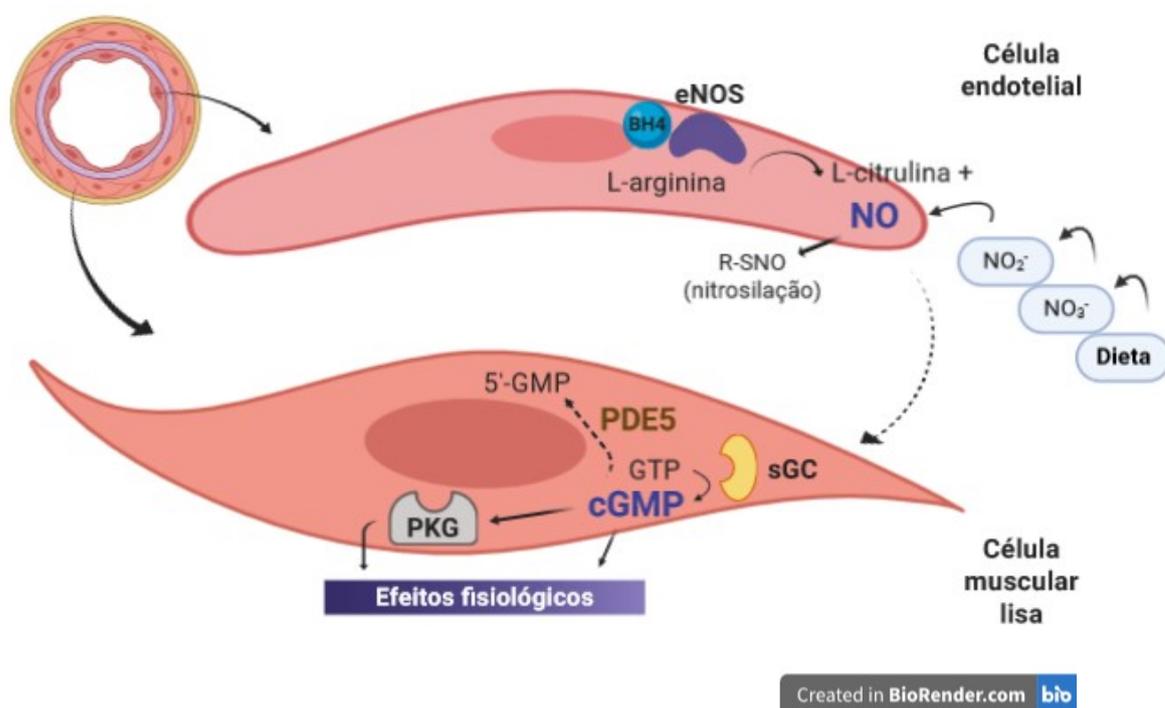
Alternativamente, o NO pode ser gerado através de reduções dos ânions inorgânicos nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) provenientes tanto da oxidação do NO gerado no próprio organismo, quanto pela dieta, através da ingestão de alimentos ricos em nitrato, como os vegetais de folhas escuras. Esta importante fonte de NO é altamente dependente de bactérias comensais orais, as quais possuem um sistema enzimático de redução de nitrato que é ausente em células de mamíferos (LUNDBERG, GLADWIN & WEITZBERG, 2015).

O NO é uma molécula de gás altamente reativo e, uma vez formado, possui diversos alvos biológicos (FARAH, MICHEL & BALLIGAND, 2018). Por exemplo, pode promover modificações de proteínas através da S-nitrosilação (o acoplamento do NO em um grupamento tiol da cisteína, formando um S-nitrosotiol ou SNO). Esta modificação pós-traducional na cisteína de peptídeos e proteínas é responsável por grande parte das vastas influências do NO na transdução da sinalização celular, tanto fisiologicamente quanto em diferentes condições patológicas (HESS *et al.*, 2005; BENEDET *et al.*, 2018).

Entretanto, o alvo principal e mais bem caracterizado do NO é a enzima guanilato ciclase solúvel (sGC, do inglês *soluble guanylate cyclase*). Já em níveis nanomolares, o NO se liga ao grupamento heme da subunidade- β da sGC e causa uma ativação de 100 a 200 vezes

da enzima, levando à conversão de guanosina trifosfato (GTP) em guanosina 3'-5'-monofosfato cíclico (cGMP). O aumento nos níveis deste segundo mensageiro induz a ativação da proteína quinase G (PKG, ou proteína quinase dependente de cGMP), uma quinase responsável pela fosforilação de diversos alvos intracelulares (FRANCIS, BUSCH & CORBIN, 2010). Assim, tanto a PKG quanto o próprio cGMP são responsáveis pela miríade de alterações fisiológicas resultantes desta via de sinalização (Figura 2), como o relaxamento do músculo liso vascular e gastrointestinal, inibição de agregação plaquetária, regulação de canais operados por cGMP, dentre diversas outras ações.

Figura 2: Via de sinalização NO-sGC-cGMP-PKG em células endoteliais e musculares lisas



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: o NO é sintetizado pelas 3 isoformas da enzima óxido nítrico sintase (nNOS, iNOS e eNOS) ou proveniente do NO₃⁻ e NO₂⁻ da dieta. Uma vez biodisponível, o NO possui diversos alvos, podendo modificar a função de proteínas através da nitrosilação ou ativar o seu principal alvo, a enzima sGC. O GTP é convertido em cGMP pela ação catalítica da sGC, e este segundo mensageiro por sua vez ativa a PKG. Tanto a PKG quanto o próprio cGMP são capazes de induzir efeitos fisiológicos no organismo. No caso da célula muscular lisa vascular, a resposta final da via de sinalização é de vasodilatação. O cGMP é hidrolisado e forma guanosina 5'-monofosfato (5'-GMP) por ação de fosfodiesterases, como a fosfodiesterase 5 (PDE5), interrompendo assim seus efeitos.

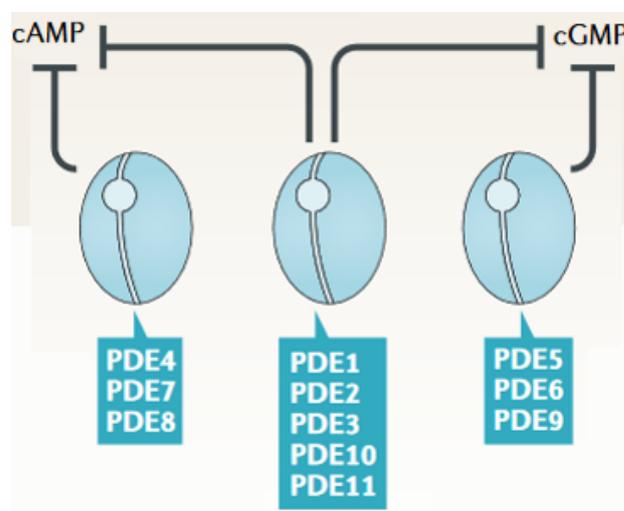
1.4 FOSFODIESTERASES COMO ALVOS FARMACOLÓGICOS

As ações do cGMP, assim como as de adenosina 3'-5'-monofosfato cíclico (cAMP), são interrompidas por uma superfamília de enzimas denominadas fosfodiesterases (PDEs), as

quais hidrolisam os nucleotídeos cíclicos cGMP em 5'-GMP e cAMP em 5'-AMP (BENDER & BEAVO, 2006). Atualmente, já foram identificadas 11 famílias de PDEs, sendo as únicas enzimas capazes de degradar os nucleotídeos cíclicos. Dessa forma, as PDEs participam de vários processos biológicos, tanto fisiologicamente quanto em condições patológicas (BAILLIE, TEJEDA & KELLY, 2019).

As PDEs apresentam uma organização estrutural em comum, com diferentes regiões catalíticas c-terminais e regiões regulatórias n-terminais. Enquanto as regiões catalíticas determinam a seletividade para degradação de cAMP e/ou cGMP, as regiões regulatórias são responsáveis por determinarem diferentes localizações subcelulares para as enzimas e as respostas distintas frente às modificações pós-traducionais, moléculas e sinais regulatórios (como efetores alostéricos ou sítios de fosforilação) (MAURICE *et al.*, 2014). De forma bastante didática e relevante biologicamente, as PDEs são agrupadas de acordo com a seletividade para degradação do nucleotídeo cíclico (Figura 3):

Figura 3: Seletividade das 11 famílias de PDEs para degradação de cAMP, cGMP ou ambos

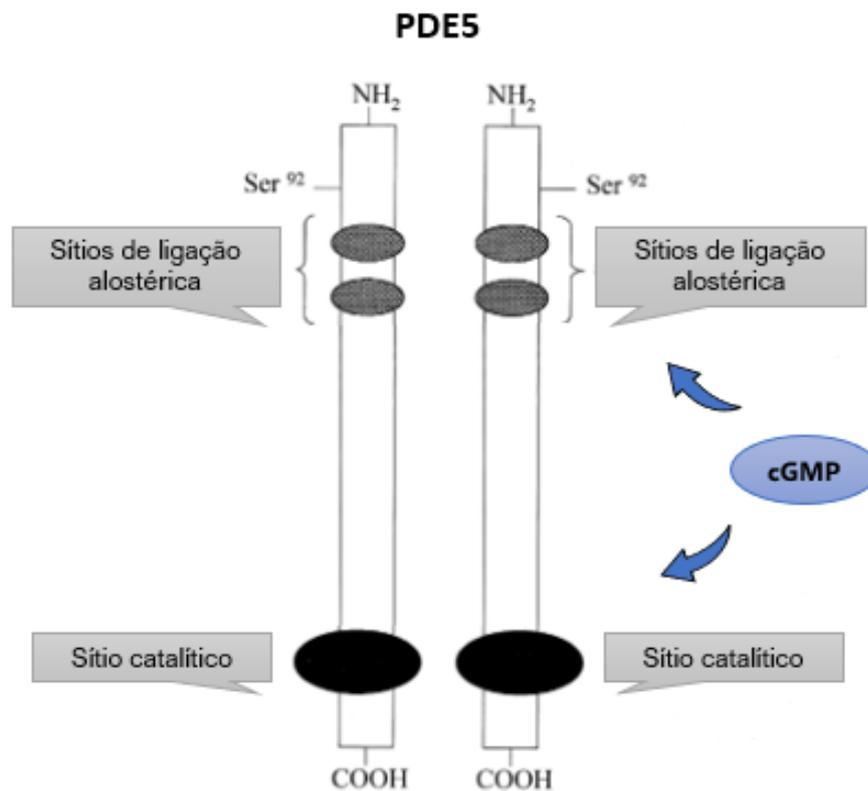


Fonte: adaptado de Baillie, Tejada & Kelly (2019).

Dentre as diversas famílias, a fosfodiesterase 5 (PDE5) é uma enzima amplamente distribuída por diversos tecidos, tendo preferência de substrato 100 vezes maior para o cGMP do que para o cAMP, e, desse modo, sendo considerada seletiva para degradação de cGMP (BENDER & BEAVO, 2006). A PDE5 é um homodímero, com cada subunidade composta por 875 aminoácidos. Como mencionado anteriormente, a região n-terminal das PDEs é majoritariamente regulatória. No caso da PDE5, a região amino-terminal contém um sítio de fosfo-

relação (Ser⁹²) que pode ser fosforilado pela proteína quinase A (PKA) ou pela PKG, resultando em aumento da atividade enzimática em 50 a 70% (CORBIN *et al.*, 2000). A PDE5 também contém sítios alostéricos (não-catalíticos) nos quais o próprio substrato cGMP ocupa necessariamente para que ocorra a fosforilação na Ser⁹², e assim aumentar a atividade enzimática (Figura 4) (GIBSON, 2001). A PDE5 é uma proteína citosólica e sua expressão já foi demonstrada no músculo liso do corpo cavernoso, músculo liso visceral e vascular, músculo esquelético, plaquetas, rim, coração, pulmão, medula espinhal, cerebelo, pâncreas, próstata, uretra e bexiga (ANDERSSON, 2018).

Figura 4: Estrutura da enzima PDE5



Fonte: adaptado de Gibson (2001). Notas: diagrama simplificado da estrutura da enzima PDE5. A PDE5 é um homodímero, cada subunidade contendo 875 aminoácidos, um sítio de fosforilação na Ser⁹², dois sítios alostéricos de ligação de cGMP e um sítio catalítico c-terminal, responsável pela conversão de cGMP em 5'-GMP.

A PDE5 é bastante expressa no corpo cavernoso e na vasculatura pulmonar, o que justifica as indicações clínicas atuais para os quais os inibidores de PDE5 são aprovados (isto é, disfunção erétil, hipertensão arterial pulmonar e sintomas do trato urinário inferior). Entretanto, devido à variedade de tecidos nos quais a PDE5 é expressa, o interesse comercial em se desenvolver inibidores desta enzima ou mesmo redirecionar os já existentes para o tratamento

de diferentes desordens é alto. As Tabelas 2 e 3 demonstram o vasto leque de ensaios clínicos para os quais o sildenafil e o tadalafil, fármacos inibidores da PDE5, estão sendo estudados.

Tabela 2: Ensaios clínicos em andamento pesquisando-se o termo “sildenafil” – National Institutes of Health (NIH)

	Título	Condição / doença	Data de aplicação
1	Can Hyperbaric Oxygen Improve Erectile Function Following Surgery for Prostate Cancer	Impotência; Neoplasias da próstata.	Julho, 2009
2	Pharmacological Penile Rehabilitation in the Preservation of Erectile Function Following Bilateral Nerve-Sparing Radical Prostatectomy	Câncer de pênis; Disfunção erétil; Prostatectomia radical.	Agosto, 2009
3	Sildenafil Versus Placebo in Chronic Heart Failure	Insuficiência cardíaca; Hipertensão pulmonar.	Março, 2013
4	A Study To Evaluate Safety And Efficacy Of IV Sildenafil In The Treatment Of Neonates With Persistent Pulmonary Hypertension Of The Newborn	Hipertensão pulmonar persistente do recém-nascido.	Agosto, 2013
5	Chronic Thrombo-embolic Pulmonary Hypertension: Classification and Long Term Outcome	Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica; Hipertensão arterial pulmonar idiopática.	Fevereiro, 2015
6	Study of Regorafenib and Sildenafil for Advanced Solid Tumors	Tumor sólido.	Julho, 2015
7	Sildenafil Administration to Treat Neonatal Encephalopathy	Encefalopatia neonatal.	Julho, 2016
8	Pharmacologically Triggered Migraine Without Aura and Neuroimaging	Enxaqueca com aura.	Agosto, 2016
9	Riociguat rEplaing PDE-5i Therapy 32valuated Against Continued PDE-5i thErapy	Hipertensão arterial pulmonar.	Janeiro, 2017
10	Efficacy, Safety, and Tolerability Study of Pirfenidone in Combination With Sildenafil in Participants With Advanced Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) and Risk of Group 3 Pulmonary Hypertension	Fibrose pulmonar idiopática.	Janeiro, 2017
11	Investigating Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Greece (INDULGE IPF)	Fibrose pulmonar idiopática.	Abril, 2017
12	Sildenafil in Hemodialysis Patients With Pulmonary Hypertension	Hipertensão pulmonar; Complicação de hemodiálise.	Dezembro, 2018

Fonte: adaptado de National Institutes of Health, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>. Acesso em: 20 dez. 2019.

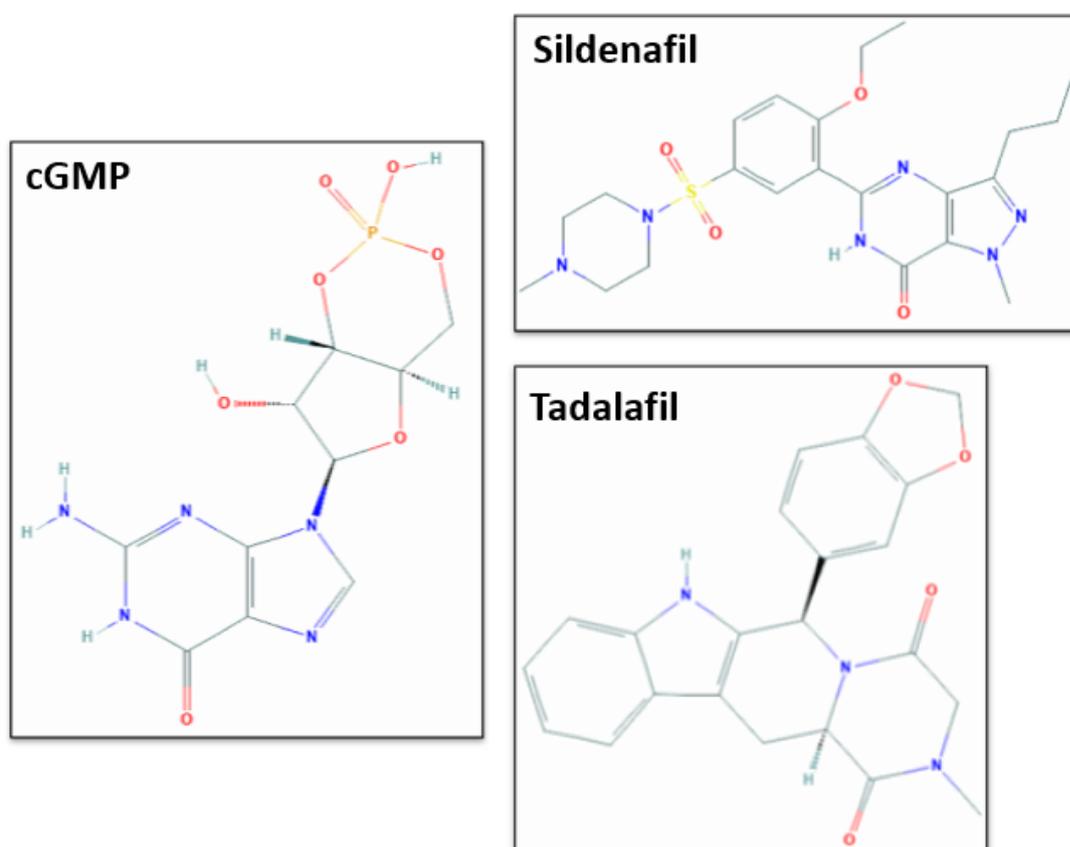
Tabela 3: Ensaios clínicos em andamento pesquisando-se o termo “tadalafil” – National Institutes of Health (NIH)

	Título	Condição / doença	Data de aplicação
1	Can Hyperbaric Oxygen Improve Erectile Function Following Surgery for Prostate Cancer	Impotência; Neoplasias da próstata.	Julho, 2009
2	Pharmacological Penile Rehabilitation in the Preservation of Erectile Function Following Bilateral Nerve-Sparing Radical Prostatectomy	Câncer de pênis; Disfunção erétil; Prostatectomia radical.	Agosto, 2009
3	A Phase II Trial of Tadalafil in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Upper Aero Digestive Tract	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.	Outubro, 2012
4	A Study of Tadalafil in Pediatric Participants With Pulmonary Arterial Hypertension (PAH)	Hipertensão pulmonar.	Abril, 2013
5	Tadalafil for Pulmonary Hypertension Due to Chronic Lung Disease	Hipertensão pulmonar; Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica.	Maio, 2013
6	Sexual and Urological Rehabilitation to Men Operated for Prostate Cancer and Their Partners	Câncer de próstata.	Abril, 2014
7	Effect of 12 Weeks Treatment With Tadalafil vs Placebo on Lower Urinary Tract Symptoms	Hiperplasia da próstata; Sintomas do Trato Urinário Inferior.	Setembro, 2014
8	Perfusion by Arterial Spin Labelling Following Single Dose Tadalafil in Small Vessel Disease (PASTIS) Trial	Demência vascular.	Maio, 2015
9	The Efficacy and Safety of Initial Triple Versus Initial Dual Oral Combination Therapy in Patients With Newly Diagnosed Pulmonary Arterial Hypertension	Hipertensão arterial pulmonar.	Setembro, 2015
10	PDE5 Inhibition Via Tadalafil to Enhance Anti-Tumor Mucin 1 (MUC1) Vaccine Efficacy in Patients With HNSCC	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço; Câncer de cabeça e pescoço.	Setembro, 2015
11	Chronic Thrombo-embolic Pulmonary Hypertension: Classification and Long Term Outcome	Hipertensão pulmonar tromboembólica crônica; Hipertensão arterial pulmonar idiopática.	Outubro, 2015
12	Riociguat rEplacing PDE-5i Therapy evalUated Against Continued PDE-5i therapy	Hipertensão arterial pulmonar.	Setembro, 2016
13	Effect of Phosphodiesterase-5 Inhibition With Tadalafil on SystEmic Right VEntricular Size and Function	Cardiopatía congênita; Transposição dos Grandes Vasos com inversão ventricular.	Fevereiro, 2017
14	Investigating Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Greece (INDULGE IPF)	Fibrose pulmonar idiopática.	Março, 2017
15	Hookah Smoking, Carbon Monoxide, and Coronary Endothelial Function	Fumante; Disfunção endotelial.	Maio, 2017
16	The Safety of Dapoxetine/Tadalafil Combination Therapy	Ejaculação precoce; Disfunção erétil;	Junho, 2017
17	Window of Opportunity Trial of Nivolumab and Tadalafil in Patients With Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.	Agosto, 2017

Fonte: adaptado de National Institutes of Health, U.S. National Library of Medicine. Disponível em: <https://clinicaltrials.gov/ct2/home>. Acesso em: 20 dez. 2019.

A inibição da PDE5 ocorre de forma competitiva e reversível: o sildenafil, o tadalafil e outros fármacos inibidores de PDE5 competem com o cGMP pelo sítio ativo da enzima, interferindo com a degradação do nucleotídeo cíclico. Assim, ocorre o acúmulo intracelular de cGMP, amplificando dessa forma a transdução de sinal regulada por este segundo mensageiro (KAYIK, TÜZÜN & DURDAGI, 2017). A estrutura dos fármacos em comparação com o cGMP é demonstrada na Figura 5.

Figura 5: Estruturas químicas do cGMP, do sildenafil e do tadalafil



Fonte: adaptado de PubChem (U.S. National Library of Medicine). Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>. Acesso em: 22 jan. 2020.

Existem diversos fármacos inibidores de PDE5 utilizados na clínica atualmente (Tabela 4), incluindo os mais conhecidos sildenafil (Viagra®, Pfizer, Nova York, NY, EUA), vardenafil (Levitra®, Bayer, Leverkusen, Alemanha) e tadalafil (Cialis®, Eli Lilly, Indianapolis, IN, EUA). Também são comercializados o avanafil (Stendra®, Metuchen Pharmaceuticals, Englishtown, NJ, EUA), lodenafil (Helleva®, Cristália, Itapira, SP, Brasil), mirodenafil (Mvix®, SK Chemicals Life Science, Seongnam, Coreia do Sul) e udenafil (Zydena®, Dong-A Pharmaceutical Co., Seul, Coreia do Sul).

Tabela 4: Comparação das características dos fármacos inibidores de PDE5

Inibidor de PDE5	T _{máx} (h)	t _{1/2} (h)	IC ₅₀ para PDE5 (nmol/L)
Sildenafil	0,95	3,98	3,7
Tadalafil	2	17,5	1,8
Avanafil	0,75	5,1	5,2
Lodenafil	1,2	2,4	0,015
Mirodenafil	1,4	2,5	0,33
Vardenafil	1,5	4,23	0,091
Udenafil	0,76	9,88	8.25

Fonte: adaptado de Hatzimouratidis *et al* (2016). Notas: os fármacos citados acima, embora sejam todos seletivos para a inibição da PDE5, possuem propriedades distintas. T_{máx}: tempo necessário para obter a concentração plasmática máxima. t_{1/2}: tempo de meia vida plasmática, isto é, tempo necessário para eliminação da metade da concentração do fármaco no plasma. IC₅₀: concentração do fármaco necessária para inibir 50% da atividade enzimática.

1.5 ENVOLVIMENTO DUAL DO ÓXIDO NÍTRICO NA SEPSE

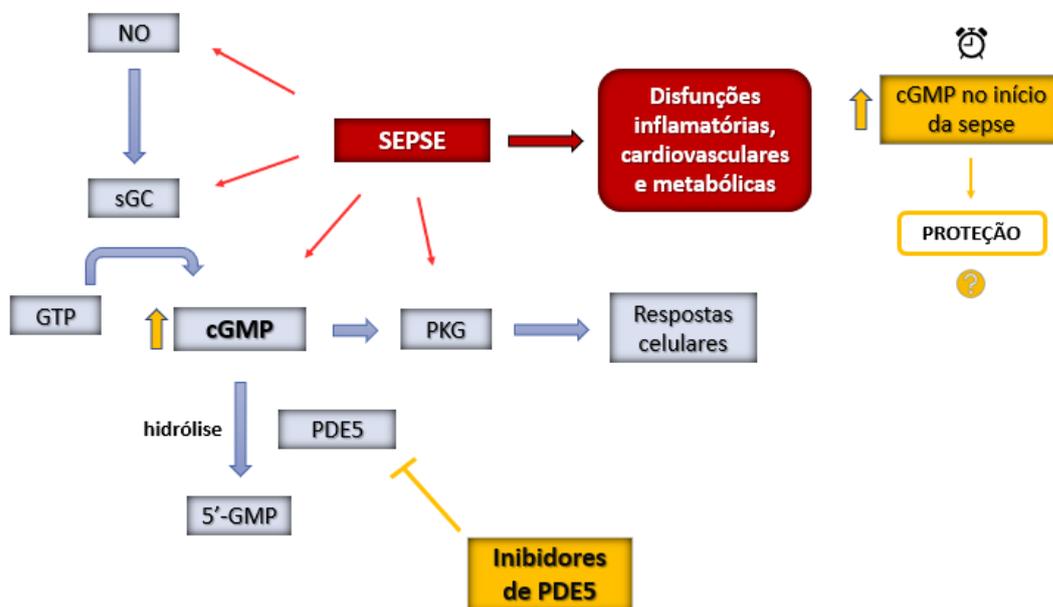
Embora o NO possa, em altas quantidades, contribuir para o processo fisiopatológico na sepse e participar da desordem cardiovascular que esta síndrome provoca (ASSREUY, 2006), existem evidências de que o aumento da sua biodisponibilidade poderia, por outro lado, prover algum papel benéfico. Em modelo canino de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS), observou-se que a administração de doses baixas e moderadas do agente doador de NO 3-morpholinosydnonimine (SIN-1) melhorou o fluxo sanguíneo mesentérico sem causar efeitos deletérios na pressão arterial (ZHANG *et al.*, 1996). Adicionalmente, Cauwels *et al* (2009) mostraram que um pré-tratamento com nitrito reduziu significativamente a mortalidade de camundongos em modelo experimental de choque endotóxico induzido por LPS. Importante ressaltar que o nitrito pode ser convertido a NO, principalmente durante situações de hipóxia, em que a acidose intracelular aumenta a taxa de conversão de nitrito para NO (ZWEIER *et al.*, 2010).

Além disso, dados prévios do nosso grupo (FERNANDES *et al.*, 2009) mostraram importante papel da via de sinalização do NO em ratos submetidos a um modelo experimental de sepse induzido por ligadura e perfuração do ceco (CLP, do inglês *cecal ligation and puncture*). Observou-se que a administração de azul de metileno (MB, do inglês *methylene blue*) e de ODQ (1H-[1,2,4]-oxadiazol-[4,3-a]-quinoxalin-1-ona), ambos inibidores da enzima sGC,

aumentaram a mortalidade dos ratos sépticos quando administrados no início da sepse (8 h após o CLP), o que sugere que o cGMP possa ter um papel protetor nas fases iniciais do estabelecimento da sepse e que a manutenção de níveis adequados deste segundo mensageiro possa ser um importante alvo de estudo. Corroborando essa ideia, um trabalho recente de nosso grupo mostrou uma melhora em parâmetros como o fluxo sanguíneo renal em ratos sépticos tratados com sildenafil (KOVALSKI *et al.*, 2017) sugerindo, dessa forma, uma modulação importante via cGMP, desta vez demonstrando a preservação da perfusão renal, melhorando a oxigenação tecidual e reduzindo o dano causado pela sepse.

Levando estas informações em consideração e visando a modulação da via do NO durante a sepse, a hipótese elaborada para o presente trabalho é que o aumento da biodisponibilidade de cGMP no início da sepse, via inibição da PDE5, restaura o comprometimento da via de sinalização do NO e confere proteção a diferentes órgãos pela melhora de parâmetros cardiovasculares e metabólicos, os quais sofrem disfunções induzidas pelo modelo experimental de sepse em ratos.

Figura 6: Hipótese do estudo dos inibidores de PDE5 na sepse



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: o quadro de sepse leva a alterações fisiopatológicas inflamatórias, cardiovasculares e metabólicas, podendo causar disfunções em múltiplos órgãos. Observa-se no esquema, em azul, a via de sinalização pela qual o NO fisiologicamente ativa a enzima sGC e leva às respostas celulares pelo aumento de cGMP e ativação da PKG. Em vermelho, observam-se os danos induzidos pelo quadro de sepse, no qual a via de sinalização do NO torna-se disfuncional em diferentes pontos. Em amarelo, destaca-se a intervenção farmacológica realizada neste trabalho. O sildenafil e o tadalafil, inibidores seletivos de PDE5, foram escolhidos como tratamento visando aumentar os níveis de cGMP no início da sepse, agindo nos vasos e melhorando parâmetros circulatórios e metabólicos. Por consequência, o tratamento visa preservar a função dos órgãos frente ao insulto infeccioso e inflamatório causado pela sepse.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inibição da enzima fosfodiesterase 5 sobre as disfunções cardiovasculares, inflamatórias e metabólicas induzidas pela sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar o efeito dos inibidores de PDE5 sildenafil e tadalafil em parâmetros cardiovasculares como a pressão arterial, frequência cardíaca e na resposta pressórica à administração de nitroprussiato de sódio.
- Verificar se a inibição da PDE5 é capaz de reverter as alterações na pressão arterial, frequência cardíaca e fluxo sanguíneo renal induzidas pela sepse.
- Avaliar o recrutamento de neutrófilos durante a sepse para o tecido cardíaco e verificar se a inibição de PDE5 pode atenuar este recrutamento celular.
- Avaliar se os níveis de BH4 na urina estão alterados durante a sepse e se a inibição da PDE5 pode reverter estas alterações.
- Verificar se o modelo experimental de sepse reproduz o aumento dos níveis de NO observado na clínica, através da quantificação dos níveis plasmáticos dos metabólitos nitrato e nitrito (NOx), e se a inibição da PDE5 interfere nas alterações destes níveis.
- Analisar as alterações do perfil glicêmico dos animais ao longo do desenvolvimento da sepse e se a inibição da PDE5 atenua as alterações na glicemia.
- Verificar se a inibição da PDE5 previne o aumento nos marcadores sanguíneos de dano tecidual induzidos pela sepse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*, 90 dias, 250 - 350 g) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia da UFSC, com temperatura controlada por ar condicionado do tipo Split (22 ± 2 °C), ciclo automático claro/escuro de 12 horas com luzes acesas entre 07:00 e 19:00 horas e livre acesso à água e ração (Puro Trato, Santo Augusto, RS, Brasil). Três semanas antecedendo o início dos protocolos experimentais, os ratos foram transferidos para o Biotério Setorial do Laboratório de Biologia Cardiovascular para ambientação nas mesmas condições descritas acima. Os ratos permaneceram em mini-isoladores de polissulfona (Tecniplast, Buguggiate, VA, Itália) em rack ventilada (Tecniplast), tendo cama de maravalha trocada 3 vezes por semana. Além disso, os animais foram tratados com fembendazol (Gral Animal, Florianópolis, SC, Brasil), um anti-helmíntico de amplo espectro, com o objetivo de eliminar possíveis enteroparasitoses que poderiam interferir com os procedimentos experimentais. Para isso, foi utilizado um protocolo de tratamento no qual o fembendazol foi diluído na água de livre acesso dos ratos, na dose de 20 mg/kg/dia, durante 5 dias, seguido por um período de carência de 7 dias antes do início dos protocolos experimentais. Tal dose é considerada efetiva e segura, uma vez que a dose letal de fembendazol em 50% de roedores (DL_{50}) excede 10 g/kg (VILLAR *et al.*, 2007). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA nº 6005071118), de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). A manutenção e os cuidados com os animais foram supervisionados por uma médica veterinária do Centro de Ciências Biológicas (CCB – UFSC).

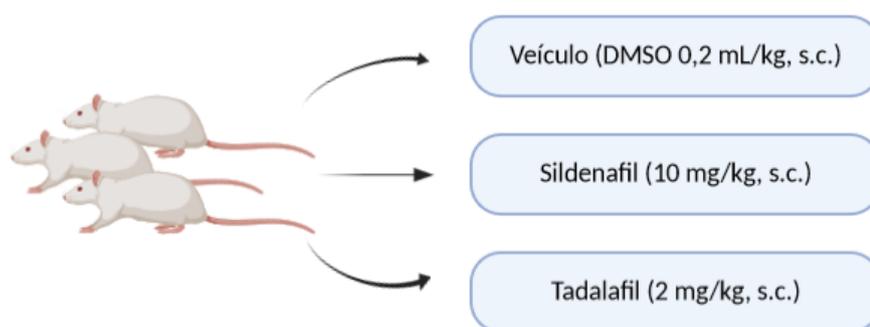
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO SILDENAFIL E TADALAFIL EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

Uma vez que o sildenafil, um inibidor de PDE5 de meia-vida plasmática curta (aproximadamente 4 horas), provou apresentar alguns efeitos benéficos em modelos de sepse experimental, o tadalafil também foi escolhido neste estudo para se avaliar os efeitos de um inibidor de PDE5 de meia-vida plasmática mais longa (cerca de 17,5 horas) durante a sepse (AN-

DERSSON, 2018). A dose de sildenafil de 10 mg/kg foi escolhida com base em estudo que avaliou sua farmacocinética em ratos (SHIN, BAE & LEE, 2006), bem como na experiência prévia do grupo (KOVALSKI *et al.*, 2017). A dose de tadalafil foi escolhida com base em estudos que mostraram que a dose de 2 mg/kg foi capaz de proteger contra danos causados pela isquemia tecidual em diferentes modelos em ratos (NOMIYA *et al.*, 2013) (ZARIFPOUR *et al.*, 2015). Além disso, tanto a dose de sildenafil de 10 mg/kg quanto a de tadalafil de 2 mg/kg são equivalentes às doses humanas utilizadas na clínica (sildenafil 100 mg e tadalafil 20 mg), de acordo com a conversão de doses entre roedores e humanos descrita por Nair & Jacob (2016).

Entretanto, apesar das informações descritas anteriormente suportarem a escolha das doses, julgou-se importante ter uma ideia do efeito destes fármacos em alguns parâmetros cardiovasculares, para se ter uma melhor noção da proporção e duração da resposta. Para isso, foram utilizados ratos naive, os quais foram separados aleatoriamente em 3 grupos: no grupo veículo, foi administrado dimetilsulfóxido (DMSO), 0,2 mL/kg, por via s.c. Nesta dose, o DMSO não afeta significativamente a pressão arterial (SORDI, FERNANDES & ASSREUY, 2010) e também não gera alterações nos marcadores plasmáticos que são avaliados neste trabalho (ALVES, 2019). No grupo sildenafil, administrou-se sildenafil por via s.c. na dose de 10 mg/kg, e no grupo tadalafil, foi administrado tadalafil por via s.c. na dose de 2 mg/kg (ambos os fármacos diluídos em DMSO). Estes 3 grupos, utilizados para caracterização do efeito dos inibidores de PDE5 (Figura 7) fizeram parte apenas dos experimentos descritos nas seções 3.2.1 e 3.2.2. O número de animais utilizado em cada experimento (n) será sempre indicado na legenda de seus respectivos resultados.

Figura 7: Grupos de caracterização do efeito dos inibidores de PDE5 em parâmetros cardiovasculares



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020).

3.2.1 Avaliação do efeito do tratamento com sildenafil ou tadalafil na pressão arterial sistólica (PAS) e na frequência cardíaca (FC) ao longo do tempo através da pletismografia de cauda

Com o objetivo de avaliar se a administração de sildenafil ou tadalafil altera a pressão arterial basal dos animais, ratos naive foram aleatoriamente separados em 3 grupos e tratados com veículo (DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.), sildenafil ou tadalafil (10 e 2 mg/kg, s.c., respectivamente). A PAS foi aferida pelo método de pletismografia de cauda, utilizando o pletismógrafo MLT125R (ADInstruments, Sydney, NSW, Austrália). Inicialmente, durante 3 dias, os animais passaram por um período de adaptação e acondicionamento diários, no qual foram colocados nos tubos de contenção usados para medida dos valores de PAS. No quarto dia, os animais foram tratados e submetidos à avaliação da PAS nos tempos 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h pós-tratamento. Os valores basais pré-tratamento (0 h) foram obtidos a partir da média dos resultados obtidos nos 3 dias do período de adaptação. A avaliação da PAS consistiu no acondicionamento dos animais em uma sala com temperatura ambiente de 30 °C para facilitar a circulação sanguínea caudal. Os animais foram então imobilizados em tubos de contenção durante a avaliação. Para auxiliar no aquecimento das caudas dos animais, foi utilizada uma manta de aquecimento e as caudas foram pressionadas por cerca de 5 minutos sobre a superfície da manta. Foi colocado um manguito juntamente com um transdutor de pulso (pletismógrafo) nas caudas dos animais, para detectar variações de pressão e volume sanguíneo, respectivamente. Os sinais obtidos foram processados por um sistema de aquisição de dados (PowerLab, ADInstruments) e registrados por um *software* de integração LabChart 7 Pro (ADInstruments). Os dados da PAS foram expressos em mmHg e os da FC em batimentos por minuto (BPM).

3.2.2 Avaliação da resposta ao nitroprussiato de sódio *in vivo*: efeito na pressão arterial (PA)

Para avaliar por quanto tempo dura o efeito biológico dos fármacos de interesse no organismo, foi realizado outro experimento controle, no qual animais naive foram novamente separados aleatoriamente em 3 grupos, tratados com veículo (DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.), sildenafil ou tadalafil (10 e 2 mg/kg, s.c., respectivamente). Nos tempos de 1, 2, 4, 8 ou 16 h após a administração dos fármacos, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e

xilazina (90 e 10 mg/kg, respectivamente) por via intramuscular (i.m.). Posteriormente, foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida à 37 °C. Após a localização da veia jugular direita, foi inserida uma cânula de polietileno PE 50 e seringa. Este acesso venoso foi utilizado como via de administração do nitroprussiato de sódio. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente separada do nervo vago e tecidos adjacentes. A artéria teve seu fluxo sanguíneo temporariamente suprimido por compressão de uma pinça curva, e em seguida, foi inserida uma cânula de polietileno PE 50 devidamente heparinizada (50 UI/mL de solução fisiológica NaCl 0,9% estéril). A cânula foi então amarrada e conectada a um transdutor de pressão descartável acoplado ao PowerLab 8/30 (ADInstruments). Os valores basais de pressão arterial média (PAM) foram obtidos após 10 minutos de estabilização, sendo registrados em um computador pelo software de integração LabChart 7 Pro (ADInstruments).

Através do acesso venoso, o nitroprussiato de sódio foi administrado em doses crescentes não-cumulativas, sendo elas: 0,1; 0,3; 1,0; 3,0; 10,0; 30,0; 100,0 e 300,0 nmol/kg. Os resultados foram avaliados em uma curva dose-resposta pela duração da resposta hipotensora em segundos (s) em função de cada dose administrada.

3.3 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DE INIBIDORES DA PDE5 NA SEPSE

3.3.1 Procedimento cirúrgico

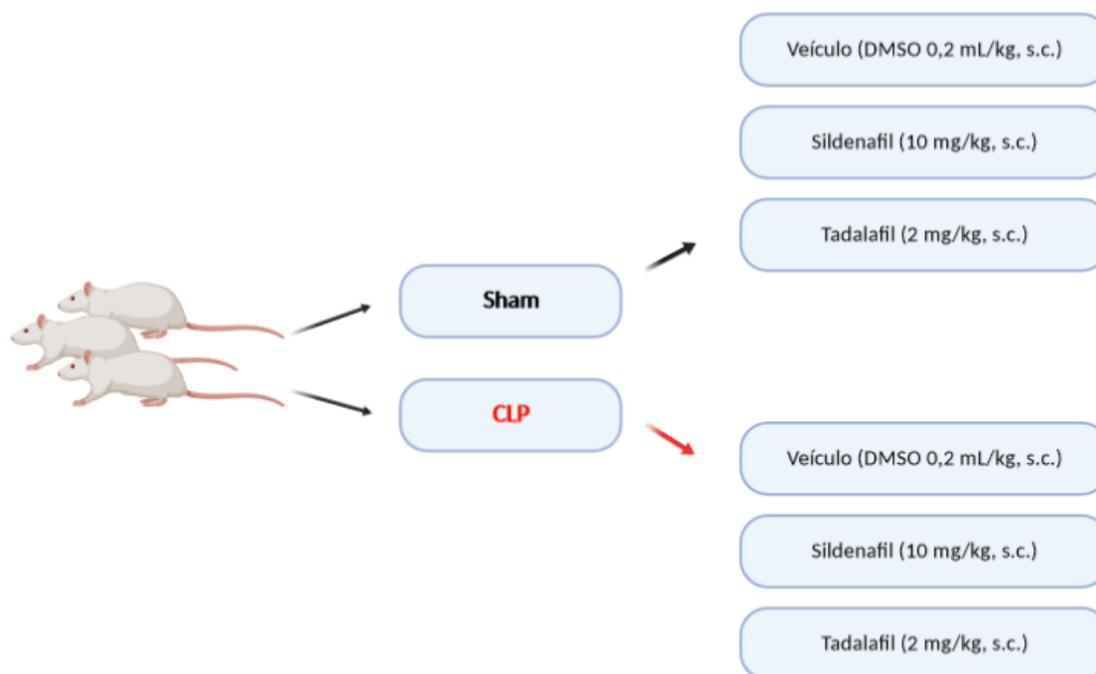
Como modelo experimental de sepse, foi realizado o procedimento de CLP modificado de Wichterman, Baue & Chaudry (1980). Cinco minutos antes do início do procedimento, os ratos foram tratados com o analgésico opioide tramadol, na dose de 10 mg/kg, por via intraperitoneal (i.p.). Em seguida, os ratos foram anestesiados, também por via i.p., com uma solução de cetamina e xilazina nas doses de 90 e 10 mg/kg, respectivamente. Foi realizada uma tricotomia na região abdominal dos ratos, bem como a antisepsia do local com álcool iodado (iodo 0,1%, álcool etílico 50%, v/v). Iniciou-se a cirurgia através de uma incisão longitudinal na região da linha alba com lâmina de bisturi descartável nº 10, com um corte de aproximadamente 2 cm. O ceco foi exposto e ocluído parcialmente próximo à válvula íleo-cecal com fio de algodão. Para a padronização desta oclusão parcial, foram utilizadas hastes plásticas flexíveis na região da ligadura, que foram removidas após o nó com o fio de algodão. Uma agulha estéril tamanho 22 G foi utilizada para a perfuração transfixante no ceco.

Depois de perfurado, o ceco foi levemente comprimido para o extravasamento do conteúdo intestinal (aproximadamente 5 mm). Após esta etapa, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal, e os músculos e a pele da região abdominal dos animais foram suturados com fio de sutura agulhado de seda (Lamedid, Osasco, SP, Brasil). Os animais então receberam ressuscitação volêmica com solução fisiológica aquecida de NaCl 0,9% estéril, na dose de 50 mL/kg por via subcutânea (s.c.) e foram dispostos em manta aquecida com iluminação para aquecimento pós-operatório, até retornarem da anestesia. Doze horas após o procedimento cirúrgico, os ratos foram tratados novamente com tramadol, na dose de 5 mg/kg por via i.p., para a manutenção do efeito analgésico. Nos animais falso-operados (grupos Sham), foram realizados todos os procedimentos descritos acima, com exceção da ligadura e da perfuração do ceco.

3.3.2 Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, Sham e CLP, nos quais foram realizados os procedimentos descritos na seção 3.2. Oito horas após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram novamente randomizados para receber diferentes tratamentos: no grupo veículo, foi administrado dimetilsulfóxido (DMSO), 0,2 mL/kg, por via s.c. No grupo sildenafil, administrou-se sildenafil por via s.c. na dose de 10 mg/kg. Já no grupo tadalafil, foi administrado tadalafil por via s.c. na dose de 2 mg/kg, conforme o esquema abaixo (Figura 8). Ambas as drogas foram diluídas em DMSO.

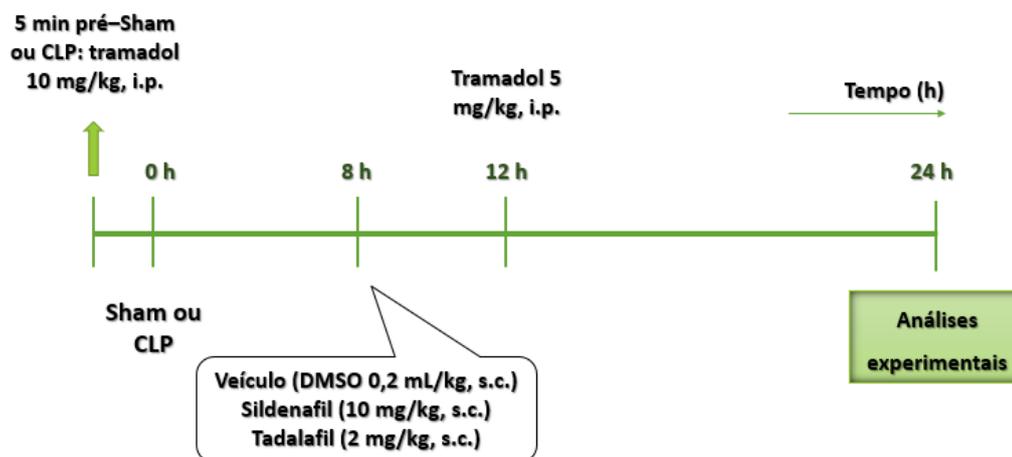
Figura 8: Grupos experimentais



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: ratos Wistar foram randomizados em dois grupos (Sham e CLP). Posteriormente, 8 h após os procedimentos cirúrgicos, cada um destes foi randomizado novamente para serem tratados com veículo (DMSO 0,2 mL/kg), sildenafil (10 mg/kg) ou tadalafil (2 mg/kg), todos por via s.c.

O protocolo experimental do trabalho foi realizado conforme a linha do tempo abaixo (Figura 9). O tratamento (veículo, sildenafil ou tadalafil) foi administrado 8 horas após o procedimento de falsa cirurgia ou CLP e as análises foram realizadas no tempo de 24 horas após o CLP. A escolha racional do tempo do tratamento é fundamental no estudo, visto que em um trabalho prévio do grupo (FERNANDES *et al.*, 2009) foi mostrado que em momentos iniciais da sepse (12 h) ocorre um prejuízo na produção de cGMP, e isto foi associado com isquemia e aumento na mortalidade. Portanto, para o presente estudo, sugeriu-se o aumento dos níveis de cGMP via inibidores da PDE5 no início da sepse para se avaliar um possível efeito protetor.

Figura 9: Delineamento experimental



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: os ratos foram pré-tratados com analgésico e foram designados para os procedimentos dos grupos Sham ou CLP. Oito horas após tais procedimentos, foram tratados com veículo ou com um dos inibidores de fosfodiesterase 5 (sildenafil ou tadalafil) e, no tempo de 12 h, receberam reforço de analgésico. As análises experimentais foram realizadas 24 h após os procedimentos.

3.3.3 Avaliação da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e fluxo sanguíneo renal (FSR) *in vivo* frente à infusão de noradrenalina durante a sepse

Visando avaliar a hiporreatividade a vasoconstritores que ocorre durante a sepse, foi realizada uma infusão de noradrenalina. Para isso, foram utilizados 4 grupos experimentais: Sham ou CLP, tratados com veículo ou tadalafil. Um dia após o procedimento Sham ou CLP (24 h), os animais foram submetidos à análise da pressão arterial invasiva, como mencionado anteriormente na seção 3.2.2. O acesso venoso, entretanto, foi conectado a uma seringa contendo uma solução de noradrenalina. A dose de noradrenalina contida na seringa foi calculada individualmente para cada animal, para que a infusão se realizasse em uma taxa de 0,03 $\mu\text{mol/kg/min}$. A seringa foi posicionada em uma bomba de infusão 4 canais (Bonther Equipamentos para Ensino e Pesquisa, Ribeirão Preto, SP, Brasil).

Concomitantemente à avaliação da PA e da FC, obteve-se o sinal do fluxo sanguíneo renal (FSR). Para isso, foi realizada a antisepsia do abdômen com álcool iodado (iodo 0,1%, álcool etílico 50%, v/v) e uma incisão longitudinal de aproximadamente 2 cm foi feita no flanco esquerdo do animal. Em seguida, com auxílio de duas pinças, o intestino foi gentilmente movido permitindo a localização do rim esquerdo. Foi posicionada sobre a superfície renal uma sonda (modelo VP1T) conectada ao laser Doppler de monitoramento de fluxo sanguíneo (VMS-LDF2, Moor Instruments, Axminster, DN, Reino Unido) também acoplado ao sistema PowerLab (ADInstruments). A sonda laser foi mantida fixa para evitar variações bruscas nos

valores do fluxo. A incisão cirúrgica foi coberta com uma gaze embebida de solução fisiológica NaCl 0,9% estéril. Os dados basais de FSR (em unidade de perfusão, UP) foram obtidos após 10 minutos de estabilização. Após o tempo de estabilização para obtenção dos valores basais de PA, FC e FSR, deu-se início à infusão de noradrenalina por um período de 30 minutos.

3.3.4 Ensaio da atividade enzimática mieloperoxidase (MPO) no tecido cardíaco

O recrutamento de neutrófilos para o tecido cardíaco foi determinado indiretamente através da quantificação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). Para isto, foram utilizados os animais dos 6 grupos experimentais (Sham ou CLP, tratados com veículo, sildenafil ou tadalafil). Um dia após o procedimento Sham ou CLP (24 h), os animais foram eutanasiados e um fragmento do ventrículo esquerdo do coração de cada animal foi pesado (aproximadamente 200 mg) e homogeneizado em 1 mL de solução tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 7,4). Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (13.000 \times g, 10 min., 4 °C) e o sobrenadante foi descartado. Os pellets foram então ressuspensos em 1 mL de tampão fosfato de sódio (50 mM; pH 6,0), contendo 0,5% (p/v) de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Todas as amostras foram vortexadas e centrifugadas novamente (13.000 \times g, 10 min., 4°C) e o sobrenadante resultante foi utilizado para determinação da atividade da MPO. Para o ensaio enzimático, foi utilizada uma alíquota de 30 μ L do sobrenadante em placas de 96 poços. A reação enzimática foi iniciada na presença de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ (0,3 mM; em tampão fosfato de sódio 80 mM; pH 5,4) em um volume final de 230 μ L. As placas foram incubadas (10 min, 37 °C) em uma leitora de placas (Multileitora Infinite M200, Tecan, Männedorf, Suíça) e os valores de absorvância foram obtidos a 650 nm a cada 2 minutos. Os valores de densidade óptica (D.O.) utilizados foram os obtidos no tempo de 8 min. A quantidade total de proteínas foi estimada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) como descrito por Smith *et al* (1985). Os valores foram apresentados na forma de unidades de densidade óptica D.O. / mg de proteína.

3.3.5 Quantificação dos níveis de tetrahydrobiopterina (BH4) na urina

Para determinação dos níveis de BH4 na urina, foram utilizados 4 grupos experimentais: Sham ou CLP, tratados com veículo ou sildenafil. Amostras de urina foram coletadas em

3 tempos diferentes: antes do procedimento Sham ou CLP (tempo 0 h) e nos tempos de 12 e 24 h após os procedimentos. Foi adicionado ácido clorídrico 0,1 M na proporção 1:10 com o volume de urina. Em seguida, as amostras foram centrifugadas ($16.000 \times g$, 10 min, 4 °C) e o sobrenadante foi coletado. Deste, 20 μL foram então transferidos para um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) (Alliance e2695, Waters Corporation, Milford, MA, EUA). Para a quantificação dos níveis de BH₄, foi utilizada uma coluna de fase reversa Waters Atlantis dC18 (4,6 x 250 mm; partícula 5 μm) (Waters Corporation), com um fluxo de 0,7 mL/min e uma eluição isocrática de NaH₂PO₄ 6,5 mM, ácido cítrico 6 mM, octil sulfato de sódio 1 mM, ácido dietilenotriaminopentacético 2,5 mM, ditiotreitól 160 μM e acetonitrila 8%, pH 3,0. A temperatura do compartimento da coluna foi ajustada para 35 °C. A identificação e quantificação de BH₄ foi realizada por um detector eletroquímico (modelo 2465, Waters Corporation) com uma voltagem de +450 mV. Os resultados das quantificações por HPLC foram expressos em $\mu\text{mol/nmol}$ de creatinina. As concentrações de creatinina na urina foram analisadas por kit comercial da Lab-test (LabTest Diagnóstica S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil).

3.3.6 Quantificação dos níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NO_x)

Para determinar os níveis plasmáticos de nitrito e nitrato (metabólitos do NO), foram utilizados os animais dos 6 grupos experimentais (Sham ou CLP, tratados com veículo, sildenafil ou tadalafil). Um dia após o procedimento Sham ou CLP (24 h), os animais foram eutanasiados para coleta do sangue em microtubos contendo heparina (5 UI/mL) através de um cateter inserido na artéria carótida esquerda. O plasma foi separado por centrifugação ($1.500 \times g$, 10 min, 4 °C). Os níveis plasmáticos de NO foram estimados a partir da quantificação dos metabólitos nitrito e nitrato (NO_x), de acordo com a metodologia descrita por Granger *et al* (1990). Primeiramente, as amostras passaram por um processo de desproteíntização, no qual o plasma foi diluído na proporção 1:1 com água destilada. Em seguida, adicionou-se sulfato de zinco 20% (1/10 do volume de amostra diluída). As amostras foram então homogeneizadas e deixadas em repouso por 1 hora em banho de gelo. Em seguida, as mesmas foram centrifugadas ($7.300 \times g$, 15 min, 4°C). Para a segunda etapa, o sobrenadante obtido foi incubado com *Escherichia coli* em placa de 96 poços à 37 °C durante 3 horas para conversão de nitrato em nitrito, uma vez que estas bactérias expressam a enzima nitrato redutase. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas ainda na placa ($2.250 \times g$, 15 minutos, à temperatura ambiente)

para remoção das bactérias e 100 μ L do sobrenadante foram transferidos para outra placa. Após a conversão enzimática de nitrato em nitrito, a reação foi revelada pela adição de 100 μ L do reagente de Griess (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 10% e alfa-naftil-etilenodiamina 0,1% em água ultrapura Milli-Q). As absorvâncias das amostras foram determinadas à 540 nm. Curvas-padrão de nitrato e nitrito (nas concentrações de 0 a 150 μ M) foram realizadas simultaneamente com as amostras. Por meio de regressão linear, os valores foram expressos em μ M de nitrito/nitrato (NO_x).

3.3.7 Quantificação dos níveis de glicose no sangue

A avaliação do perfil glicêmico dos animais dos 4 grupos experimentais (Sham ou CLP, tratados com veículo ou tadalafil) foi determinada através de um aparelho comercial medidor de glicose Accu-Check Active (Roche, Basileia, Suíça). Sem uso de anestesia, os animais foram submetidos a um corte transversal (2 mm) na extremidade da cauda para obtenção de uma gota de sangue, suficiente para o teste. Foram medidos os níveis glicêmicos nos tempos 0 h (antes do procedimento Sham ou CLP), 8, 12 e 24 h. O tratamento com veículo ou tadalafil foi feito após a medida obtida do tempo de 8 h. Os níveis de glicemia foram expressos em mg/dL.

3.3.8 Quantificação dos níveis plasmáticos de creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato

Para a quantificação dos níveis de marcadores plasmáticos indicativos de danos de órgãos e tecidos, foi coletado o sangue dos animais por um cateter na artéria carótida esquerda em microtubos contendo heparina (5 UI/mL), 24 h após os procedimentos Sham ou CLP. O plasma foi separado por centrifugação (1.500 x g, 10 min, 4 °C), coletado e levado ao Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC (projeto de pesquisa 169/2018 GEP/HU/UFSC/EBSERH), onde as amostras passaram por dosagem em equipamento automatizado Dimension RxL Max HM (Siemens Healthineers, Erlanger, BY, Alemanha). Foram quantificados os níveis de creatinina (em mg/dL), ureia (BUN, em mg/dL), AST (em U/L) e ALT (em U/L). Todas as dosagens foram feitas a partir dos kits comerciais da Siemens, de acordo com as instruções do fabricante.

A coleta do sangue para determinação de lactato plasmático foi feita a partir do acesso na artéria carótida esquerda, porém em microtubos contendo EDTA dissódico (0,023 M) e fluoreto de sódio (0,95 M) para inibição da glicólise. O plasma foi separado por centrifugação ($1.500 \times g$, 10 min, 4 °C) e os níveis de lactato foram determinados por kit comercial da Lab-test (LabTest Diagnóstica S.A.). Os resultados foram expressos em mmol/L.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O n experimental variou entre 4 e 12 de acordo com cada experimento, sendo indicado nas figuras e/ou nas legendas. O n foi suficiente para se detectar uma possível diferença com poder de pelo menos 80%, um nível de significância de 0,05, usando-se testes bicaudais e de acordo com a magnitude da diferença esperada para cada variável analisada (de acordo com dados prévios do laboratório ou da literatura). Foi verificado se os dados apresentaram normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk e homogeneidade de variâncias pelo teste de Bartlett. Quando necessário, os dados foram transformados em logaritmos para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. Os dados foram analisados por análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA), seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Exclusivamente para análise de PAS e FC ao longo do tempo através da pletismografia de cauda, utilizou-se ANOVA de duas vias com medidas repetidas. Os valores obtidos foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) do número de animais utilizados em cada experimento. As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 7.00 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

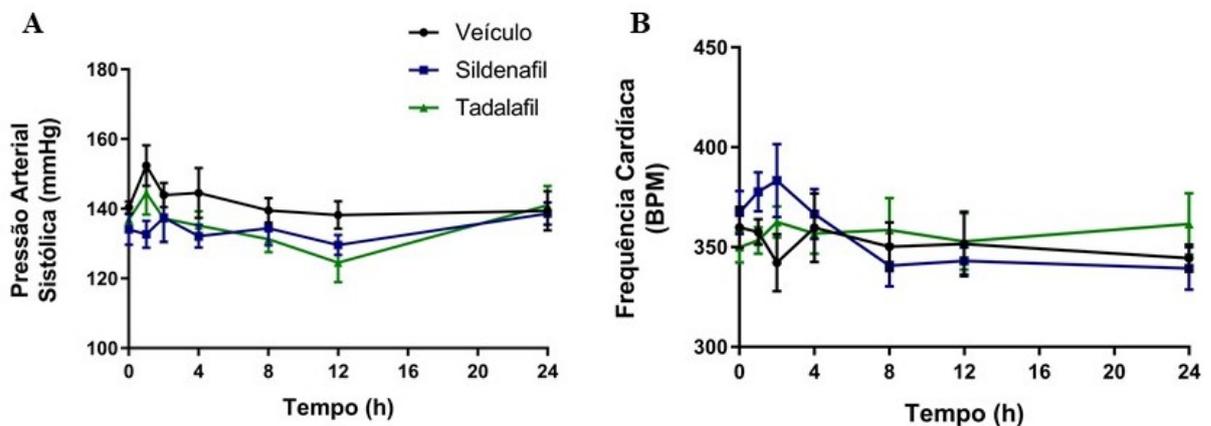
4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO EFEITO DO SILDENAFIL E TADALAFIL EM PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

4.1.1 Efeito do tratamento com sildenafil ou tadalafil na pressão arterial sistólica (PAS) e na frequência cardíaca (FC)

Fármacos com mecanismo de ação diretamente relacionado com a via do NO, como os inibidores de PDE5, podem causar alterações na pressão arterial. Para averiguar este efeito, ratos naive foram tratados com veículo (DMSO), sildenafil ou tadalafil e foram posicionados para que a PAS e a FC fossem aferidas em diferentes tempos pós-tratamento. Como é possível observar na figura abaixo, a administração de sildenafil ou tadalafil nos ratos não induziu diferenças na PAS (Figura 10 A) ou na FC (Figura 10 B) nos tempos analisados.

Figura 10: Efeito dos inibidores da PDE5 na PAS e na FC de ratos ao longo do tempo



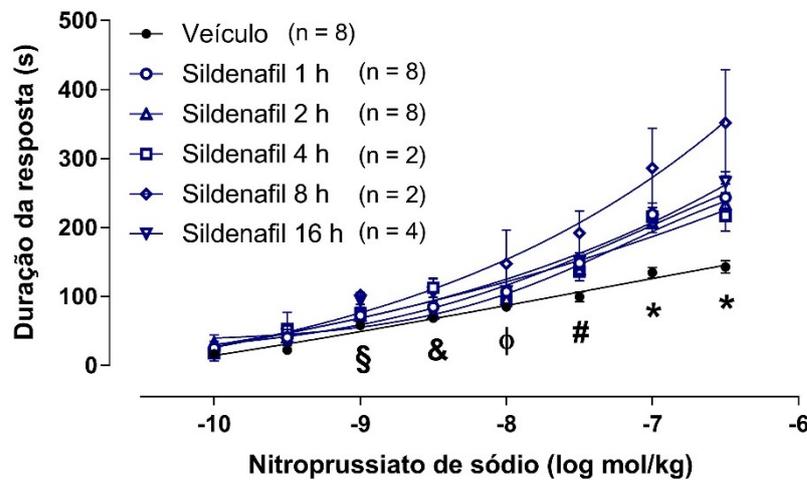
Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: ratos naive foram tratados com veículo (círculos pretos, DMSO 0,2 mL/kg, s.c.), sildenafil (quadrados azuis, 10 mg/kg, s.c.) ou tadalafil (triângulos verdes, 2 mg/kg, s.c.) e foram posicionados nos tubos de contenção para análise da (A) pressão arterial sistólica (PAS) e (B) frequência cardíaca (FC) sem uso de anestesia, através da técnica de pletismografia de cauda. Os valores foram obtidos nos tempos 1, 2, 4, 8, 12 e 24 h pós-tratamento. Os valores basais pré-tratamento (0 h) foram obtidos a partir da média de resultados obtidos nos 3 dias do período de adaptação. Os resultados representam a média \pm EPM ($n = 6$). (ANOVA de duas vias com medidas repetidas seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

4.1.2 Resposta da administração de nitroprussiato de sódio *in vivo*: efeitos na pressão arterial (PA)

Devido à diferença nos tempos de meia-vida plasmática do sildenafil e tadalafil mencionados anteriormente, foi realizado um experimento controle para determinar a resposta na pressão arterial ao nitroprussiato de sódio, um doador de NO, cujo efeito hipotensor é potencializado na presença dos inibidores de PDE5. Ratos naive foram tratados com veículo (DMSO), sildenafil ou tadalafil e submetidos à análise da PA *in vivo* frente à administração de doses crescentes de nitroprussiato de sódio em diferentes tempos pós-tratamento. Os ratos permaneceram anestesiados durante toda a obtenção dos valores.

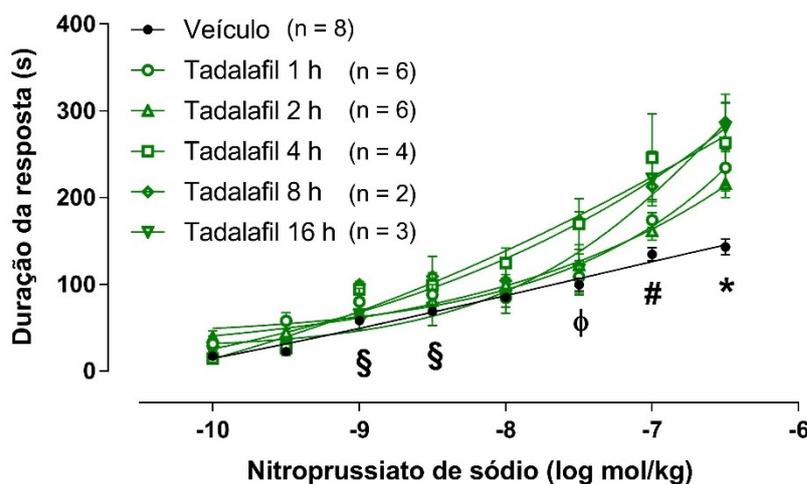
De uma forma geral, em todos os tempos pós-tratamento analisados (1, 2, 4, 8 e 16 h), a administração dos inibidores de PDE5 sildenafil (Figura 11) e tadalafil (Figura 12) aumentou a duração do tempo da resposta hipotensora frente a diferentes doses de nitroprussiato, sendo a resposta muito semelhante entre os tempos observados, com pequenas diferenças que podem ser notadas pela indicação na legenda dos gráficos. Por exemplo, a partir da dose de 1,0 nmol/kg, já foram observadas diferenças na duração da resposta ao nitroprussiato nos animais tratados com sildenafil e analisados 16 h depois (aumento de 1,62 vez) e nos animais tratados com tadalafil e analisados 8 h depois (aumento de 1,72 vez), quando comparados com os animais do grupo Veículo. A duração da resposta hipotensora na dose mais alta administrada, de 300,0 nmol/kg, aumentou em todos os tempos analisados e foi pelo menos 1,51 vez maior nos animais tratados com sildenafil ou tadalafil.

Figura 11: Efeito do sildenafil na duração da resposta hipotensora frente à administração de nitroprussiato de sódio



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: ratos naive foram tratados com veículo (V: DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.) ou sildenafil (10 mg/kg, s.c.). Em diferentes tempos após o tratamento (1, 2, 4, 8 ou 16 h), os animais foram anestesiados e preparados para análise de pressão arterial (PA). Os valores registrados demonstram a duração da resposta hipotensora frente à administração de diferentes doses de nitroprussiato de sódio (i.v.), variando de 0,1 a 300 nmol/kg. Para melhor clareza dos resultados, os resultados obtidos dos grupos que receberam veículo (1, 2, 4, 8 e 16 h) foram agrupados em um único grupo. Os resultados representam a média \pm EPM. *grupo Veículo em relação a todos os outros grupos; #grupo Veículo em relação aos grupos Sildenafil 1, 2, 8 e 16 h; ϕ grupo Veículo em relação ao grupo Sildenafil 8 h; & grupo Veículo em relação aos grupos Sildenafil 4 e 16 h; § grupo Veículo em relação ao grupo Sildenafil 16 h ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

Figura 12: Efeito do tadalafil na duração da resposta hipotensora frente à administração de nitroprussiato de sódio



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: ratos naive foram tratados com veículo (V: DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.) ou tadalafil (2 mg/kg, s.c.). Em diferentes tempos após o tratamento (1, 2, 4, 8 ou 16 h), os animais foram anestesiados e preparados para análise de pressão arterial (PA). Os valores registrados demonstram a duração da resposta hipotensora frente à administração de diferentes doses de nitroprussiato de sódio (i.v.), variando de 0,1 a 300 nmol/kg. Para melhor clareza dos resultados, os resultados obtidos dos grupos que receberam veículo (1, 2, 4, 8 e 16 h) foram agrupados em um único grupo. Os resultados representam a média \pm EPM. *grupo Veículo em relação a todos os outros grupos; #grupo Veículo em relação aos grupos Tadalafil 1, 4, 8 e 16 h; ϕ grupo Veículo em relação aos grupos Tadalafil 4 e 8 h; § grupo Veículo em relação aos grupos Tadalafil 8 h ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

4.2 EFEITOS DE INIBIDORES DA PDE5 NA SEPSE

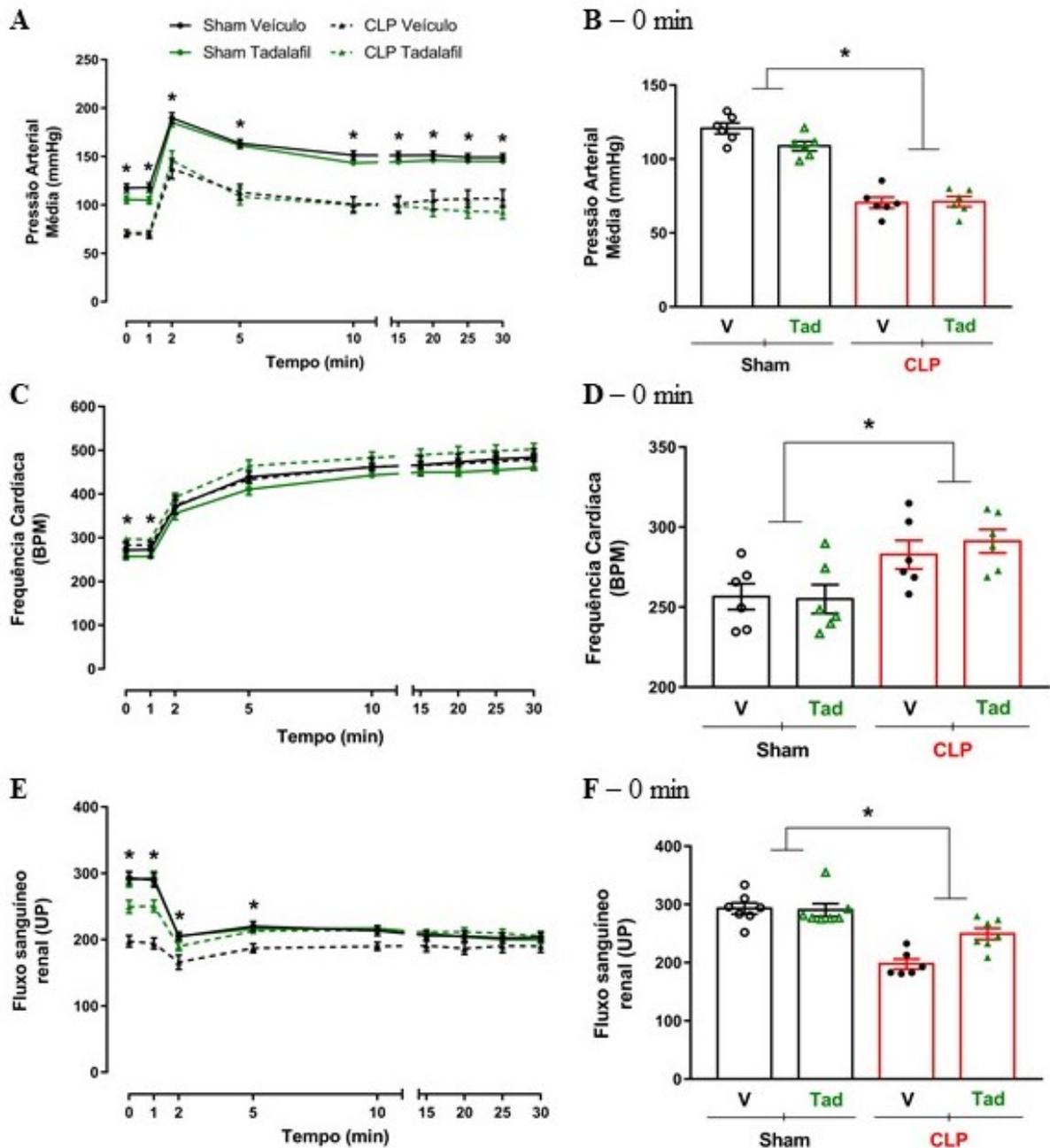
4.2.1 Efeito da infusão de noradrenalina *in vivo* na pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e fluxo sanguíneo renal (FSR) durante a sepse

A hipotensão persistente e refratária a agentes vasoconstritores é característica do choque séptico. Assim, foi avaliada a resposta à noradrenalina, um agonista adrenérgico, na pressão arterial. Ratos Sham e CLP foram tratados com veículo (DMSO) ou tadalafil e foram anestesiados e preparados para avaliação da pressão arterial, frequência cardíaca e fluxo sanguíneo renal.

Os dados obtidos sobre a pressão arterial média mostram que, 24 horas após o CLP, os animais apresentam hipotensão arterial (Figura 13 B - tempo 0 min; Sham Veículo: $120,7 \pm 3,706$ mmHg; CLP Veículo: $70,49 \pm 3,679$ mmHg). O tratamento com tadalafil não alterou a pressão arterial basal dos animais. No tempo de 2 minutos após o início da infusão com noradrenalina (Figura 13 A), houve a resposta máxima de aumento da pressão arterial para todos os grupos experimentais (aumento de 1,58 vez no grupo Sham Veículo; de 1,69 vez no grupo Sham Tadalafil; de 1,81 vez no grupo CLP Veículo e de 1,74 vez no grupo CLP Tadalafil). Durante os 30 minutos de infusão com noradrenalina, a resposta pressórica dos animais sépticos permaneceu sempre inferior quando comparada com a resposta pressórica dos animais Sham.

Na Figura 13 D, podemos observar um aumento da frequência cardíaca basal dos animais sépticos em relação aos animais Sham (tempo 0 min; Sham Veículo: $256,6 \pm 8,058$ BPM; CLP Veículo: $282,8 \pm 8,927$ BPM) bem como no tempo de 1 minuto após o início da infusão (Figura 13 C - Sham Veículo: $256,6 \pm 8,07$ BPM; CLP Veículo: $283,8 \pm 8,582$ BPM). Ao longo do tempo restante com a infusão de noradrenalina, os valores de frequência cardíaca foram aumentando gradualmente e se igualaram em todos os grupos experimentais. Os animais sépticos também apresentaram fluxo sanguíneo renal basal reduzido comparado com os animais Sham (Figura 13 F - tempo 0 min; Sham Veículo: $292,9 \pm 11,34$ UP; CLP Veículo: $197,7 \pm 8,544$ UP), assim como durante os tempos após o início da infusão de 1 min, no qual apresentaram redução de 1,49 vez, 2 min (redução de 1,24 vez) e 5 min (redução de 1,18 vez). Após esse tempo, não houve mais diferenças no fluxo sanguíneo renal dos animais Sham e CLP (Figura 13 E). O tratamento com tadalafil não interferiu em nenhum dos parâmetros registrados antes ou durante a infusão com noradrenalina.

Figura 13: Resposta da infusão de noradrenalina na PA, na FC e no FSR durante a sepse



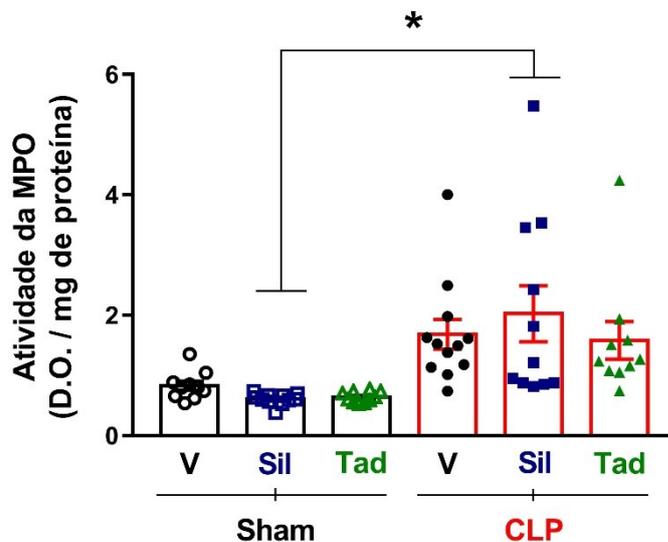
Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: oito horas após o procedimento Sham ou CLP, os ratos foram tratados com veículo (V: DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.) ou tadalafil (Tad: 2 mg/kg, s.c.). Um dia após os procedimentos cirúrgicos (24 h), os animais foram anestesiados e preparados para análise de pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC) e fluxo sanguíneo renal (FSR), obtendo-se os valores basais (tempo 0 min; Figuras B, D e F) e os valores registrados durante 30 minutos de infusão com noradrenalina, na dose de 0,03 $\mu\text{mol/kg/min}$ (Figuras A, C e E). Os resultados representam a média \pm EPM ($n = 6$). *grupos CLP em relação aos grupos Sham ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni). BPM: batimentos por minuto. UP: unidades de perfusão.

4.2.2 Atividade enzimática mieloperoxidase (MPO) no tecido cardíaco durante a sepse

Para avaliar a infiltração de neutrófilos no coração, foi realizado um ensaio quantitativo da atividade enzimática da MPO, um marcador indireto da presença destas células. Esta enzima constitui a maior parte do conteúdo proteico nos grânulos azurófilos citoplasmáticos dos neutrófilos (GROSS *et al.*, 2009), e uma maior atividade enzimática sugere maior presença destas células.

Os resultados mostram que houve aumento de aproximadamente 2 vezes na infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco dos animais sépticos em relação aos animais Sham (Figura 14). O tratamento com sildenafil ou tadalafil, entretanto, não alterou o aumento induzido pelo procedimento de CLP.

Figura 14: Infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco durante a sepse



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: oito horas após o procedimento Sham ou CLP, os ratos foram tratados com veículo (V; DMSO 0,2 mL/kg, s.c.), sildenafil (Sil; 10 mg/kg, s.c.) ou tadalafil (Tad; 2 mg/kg, s.c.).

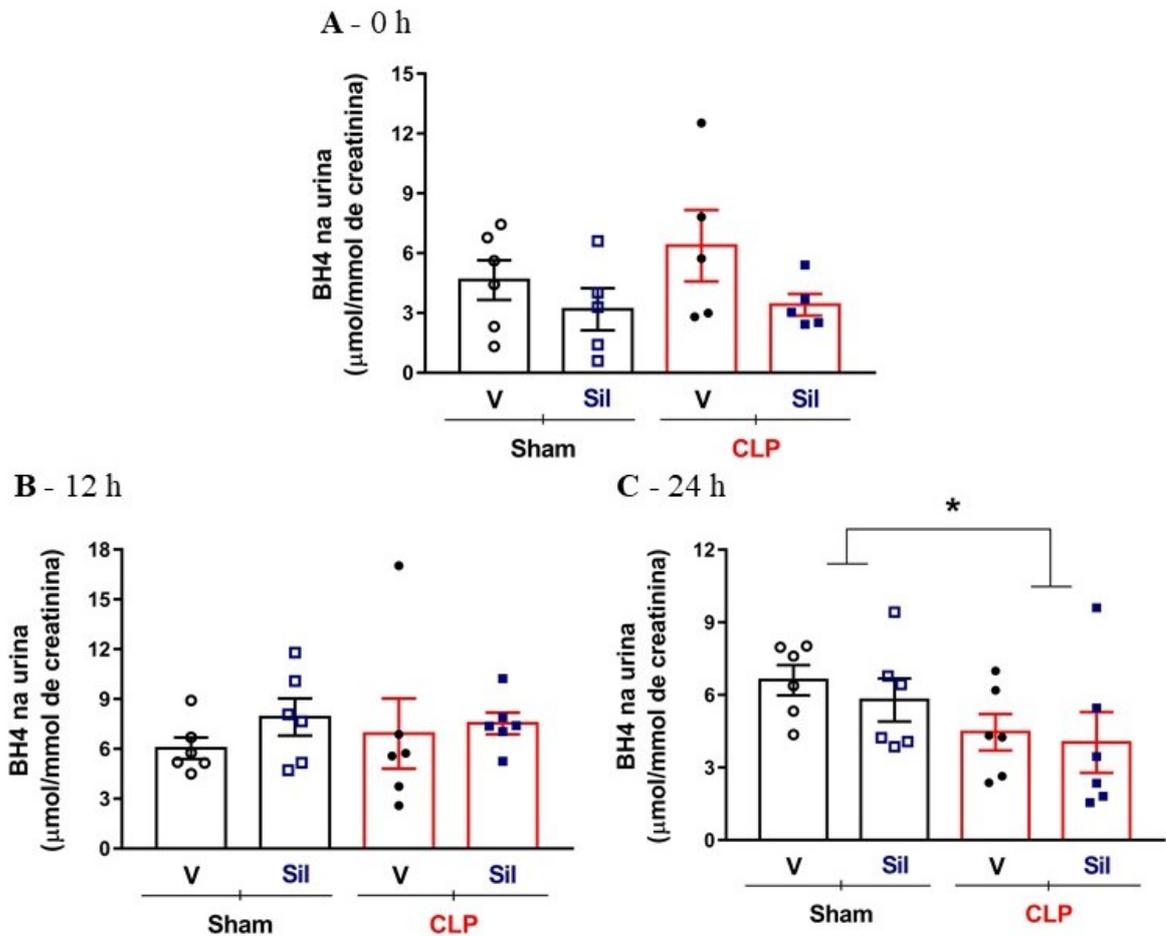
Um dia após os procedimentos (24 h), os corações dos animais foram coletados e analisados para atividade da MPO. Os resultados representam a média ± EPM (n = 10 a 12). *grupos CLP em relação aos grupos Sham (p < 0,05, ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

4.2.3 Níveis de tetrahydrobiopterina (BH4) na urina

Sabendo-se que a via de sinalização do NO está diretamente envolvida na fisiopatologia da sepse, foram quantificados os níveis de BH4, um cofator essencial para a atividade das 3 isoformas da enzima óxido nítrico sintase (MOENS & KASS, 2006). Nos tempos de 0 h

e 12 h após os procedimentos Sham ou CLP (Figuras 15 A e 15 B), não houve diferenças significativas entre os grupos experimentais. Entretanto, é possível observar que, no tempo de 24 h (Figura 15 C), os níveis de BH4 na urina dos animais sépticos apresentaram redução de 1,48 vez quando comparados aos animais Sham.

Figura 15: Níveis de BH4 na urina ao longo do estabelecimento da sepse



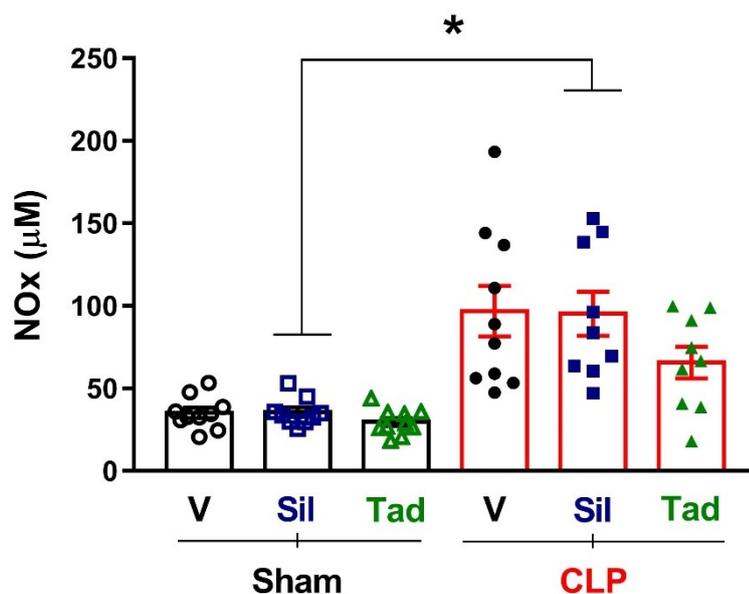
Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: oito horas após o procedimento Sham ou CLP, os ratos foram tratados com veículo (V; DMSO 0,2 mL/kg, s.c.) ou sildenafil (Sil; 10 mg/kg, s.c.). Nos tempos 0 h (antes dos procedimentos), 12 h e 24 h, a urina dos animais foi coletada e analisada para quantificação de BH4. Os resultados representam a média \pm EPM (n = 5 a 6). *grupos CLP em relação aos grupos Sham (p < 0,05, ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

4.2.4 Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx)

Visando a determinação indireta do NO plasmático, foram mensurados os níveis de seus metabólitos, nitrito e nitrato (NOx). Os dados obtidos demonstram um aumento significativo de 2,75 vezes nos níveis plasmáticos de NOx dos grupos CLP, 24 h após os procedi-

mentos, em relação aos grupos Sham. A administração de tadalafil foi capaz de atenuar este aumento de NOx plasmático induzido pelo CLP, reduzindo cerca de 1,47 vez (Figura 16). O sildenafil, por outro lado, não alterou os níveis de NOx.

Figura 16: Níveis plasmáticos de nitrito/nitrato (NOx) durante a sepse

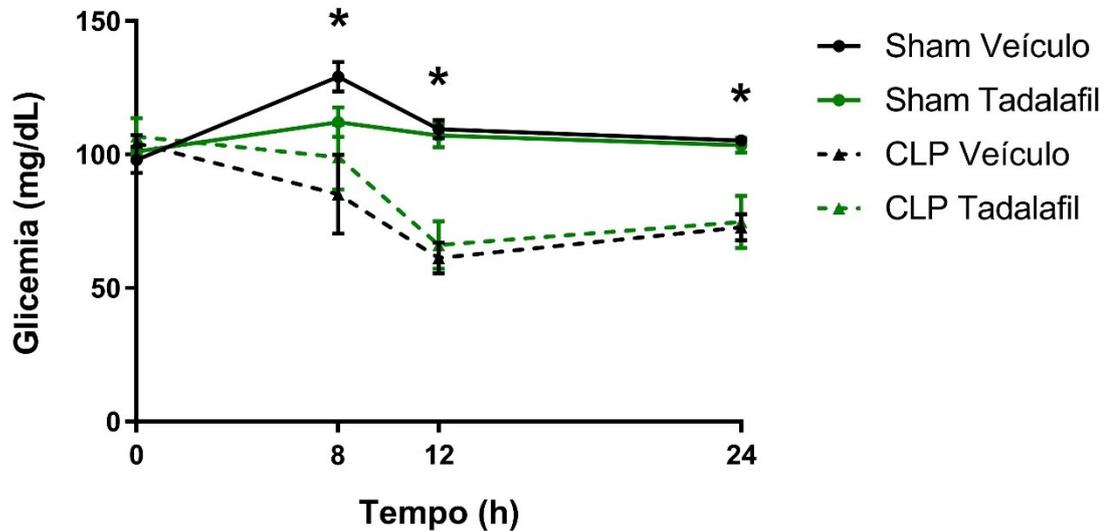


Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: oito horas após o procedimento Sham ou CLP, os ratos foram tratados com veículo (V; DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.), sildenafil (Sil; 10 mg/kg, s.c.) ou tadalafil (Tad; 2 mg/kg, s.c.). O sangue dos animais foi obtido 24 h após os procedimentos e o plasma foi separado para mensuração dos níveis de nitrito/nitrato (NOx). Os resultados representam a média ± EPM (n = 9 a 10). *grupos CLP em relação aos grupos Sham. #CLP Tad comparado com CLP V. (p < 0,05, ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

4.2.5 Níveis de glicose no sangue

Sabendo-se que durante a sepse ocorrem alterações metabólicas, foi determinado o perfil glicêmico dos animais ao longo do tempo (antes dos procedimentos cirúrgicos – tempo 0 h e nos tempos 8, 12 e 24 h após Sham ou CLP). Os resultados apresentados na Figura 17 demonstram que os animais sépticos, já no tempo de 8 horas, apresentam níveis glicêmicos menores quando comparado com os animais Sham (Sham Veículo: 129,2 ± 5,516 mg/dL; CLP Veículo: 85,17 ± 14,79 mg/dL). Os dados obtidos das medidas nos tempos de 12 e 24 h demonstram que os animais sépticos permaneceram hipoglicêmicos quando comparados com os animais Sham (no tempo de 12 h, a glicemia dos animais CLP comparada com os animais Sham estava 1,78 vez menor; no tempo de 24 h, 1,45 vez menor). O tratamento com tadalafil não interferiu nos níveis glicêmicos dos grupos experimentais.

Figura 17: Perfil glicêmico dos animais ao longo do estabelecimento da sepse

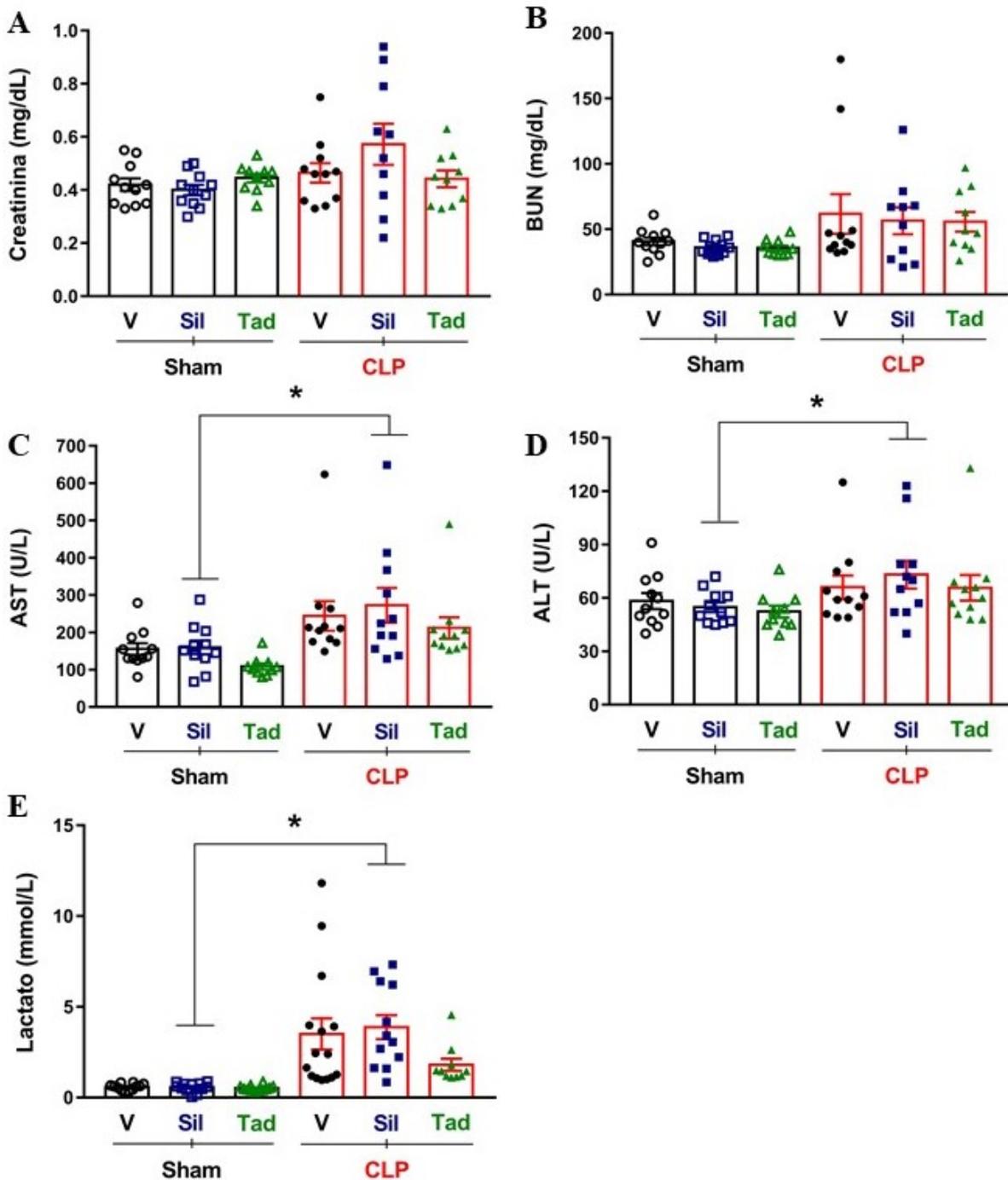


Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: os animais foram divididos em quatro grupos e tiveram seus níveis de glicemia medidos antes (0 h) e após os procedimentos de Sham ou CLP nos tempos 8, 12 e 24 h. No tempo de 8 h, após a medida da glicemia, os ratos foram tratados com veículo (DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.) ou tadalafil (2 mg/kg, s.c.). O sangue dos animais foi obtido sem uso de anestésico, através de um corte transversal na cauda, suficiente para obtenção de uma gota de sangue para medida em glicosímetro. Os resultados representam a média \pm EPM (n = 6). *grupos CLP em relação aos grupos Sham. ($p < 0,05$, ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

4.2.6 Níveis plasmáticos de creatinina, ureia, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e lactato

Para avaliar o dano de múltiplos órgãos durante a sepse, foram quantificados os níveis de marcadores bioquímicos plasmáticos de dano renal (creatinina e ureia), dano hepático (AST e ALT) e indicador de má perfusão tecidual (lactato). Os dados representados nas Figuras 18 C, D e E mostram, respectivamente, um aumento de 1,57 vez nos níveis de AST, de 1,13 vez nos níveis de ALT e de 6,07 vezes nos níveis de lactato dos animais sépticos em relação aos dados obtidos do plasma dos animais Sham, 24 h após os procedimentos. O tratamento com inibidores de PDE5 não alterou essa resposta. Não houve diferenças nos níveis de creatinina e ureia entre os animais dos grupos Sham e CLP (Figuras 18 A e B).

Figura 18: Níveis plasmáticos de marcadores de dano tecidual (creatinina, ureia, AST, ALT e lactato) durante a sepse



Fonte: figura elaborada pelo autor (2020). Notas: oito horas após o procedimento Sham ou CLP, os ratos foram tratados com veículo (V; DMSO, 0,2 mL/kg, s.c.), sildenafil (Sil; 10 mg/kg, s.c.) ou tadalafil (Tad; 2 mg/kg, s.c.). O sangue dos animais foi obtido 24 h após os procedimentos e o plasma foi separado para mensuração de creatinina (A), ureia (B), AST (C), ALT (D) e lactato (E). Os resultados representam a média \pm EPM (n = 10 a 15). *grupos CLP em relação aos grupos Sham. (p < 0,05, ANOVA de duas vias seguido pelo pós-teste de Bonferroni).

5 DISCUSSÃO

O papel do NO vem sendo analisado em diversos modelos de doenças cardiovasculares. Na sepse, o NO foi inicialmente implicado como um mediador deletério, porém evidências de que o NO não age apenas como um fator prejudicial se encontram na literatura e demonstram a importância de se manter um ambiente de microcirculação adequado, para que os tecidos se mantenham devidamente perfundidos durante o estabelecimento desta síndrome. No presente estudo, avaliamos os possíveis efeitos da potencialização da via do NO através da inibição da PDE5 nas disfunções cardiovasculares e metabólicas induzidas por um modelo experimental de sepse em ratos. A sepse experimental foi induzida através do modelo CLP, gerando alterações deletérias em vários aspectos, como hipotensão arterial refratária, aumento de infiltração de neutrófilos no tecido cardíaco e hipoglicemia, bem como aumento nos níveis de marcadores plasmáticos de dano tecidual. De modo geral, a intervenção com inibidores de PDE5 no protocolo experimental utilizado demonstrou pouca ou nenhuma interferência nos parâmetros avaliados.

Existem diferentes estratégias para aumentar a sinalização da via do NO, cada uma com suas próprias limitações. Por exemplo, existe a possibilidade de potencializar a via através do fornecimento do próprio NO por inalação ou pela administração de nitratos, mas a resposta obtida é transiente pois a meia-vida do NO é muito curta, além dos nitratos passarem por um mecanismo de tolerância com perda da eficácia terapêutica (MÜNDEL, DAIBER & MÜLSCH, 2005). Adicionalmente, espécies reativas de oxigênio geradas em excesso em condições patológicas podem não só sequestrar a molécula de NO, como também oxidar o grupamento heme da enzima sGC, limitando o sítio de ação do óxido nítrico para produção de cGMP (LUNDBERG, GLADWIN & WEITZBERG, 2015). Este mesmo mecanismo interfere no modo de ação dos compostos estimuladores da sGC, como o riociguat. Neste sentido, inibir a enzima PDE5 para potencializar a via do NO em momentos mais adiantes (*downstream*) parece ser uma boa estratégia em diferentes condições patológicas.

Os inibidores de PDE5 possuem um bom perfil de segurança para sua administração, mesmo em indivíduos com doenças cardiovasculares ou que estejam fazendo uso de anti-hipertensivos (com exceção de nitratos) (RASHID, 2005). Dados obtidos em ensaios clínicos controlados indicam que não há aumento no risco de infarto do miocárdio ou morte por motivos cardiovasculares em pessoas que fazem uso de inibidores de PDE5, comparados com indivíduos que não o fazem (SUSSMAN, 2004). Dessa forma, os inibidores de PDE5 somente

são contraindicados em indivíduos que fazem uso de doadores de NO, como os nitratos, ou estimuladores da guanilato ciclase (riociguat), uma vez que o efeito final da via NO/cGMP será potencializado. Entretanto, existem controvérsias em estudos que avaliam se doses únicas de sildenafil reduzem ou não a pressão arterial de forma aguda em pessoas saudáveis (OLIVER, MELVILLE & WEBB, 2006). Em nosso trabalho, avaliamos esta questão através do experimento de pletismografia de cauda, observando que doses únicas de 10 mg/kg de sildenafil e 2 mg/kg de tadalafil em ratos naive não geraram alterações na pressão arterial sistólica ao longo de um período de 24 horas.

Por outro lado, quando analisamos a resposta da administração do nitroprussiato de sódio na pressão arterial média dos animais, observa-se uma maior duração no tempo em que os animais ficam hipotensos. Inusitadamente, o efeito hipotensor do nitroprussiato permaneceu prolongado no tempo de 16 horas após o tratamento tanto com sildenafil quanto com tadalafil, ao contrário do que se esperava, uma vez que o sildenafil possui tempo de meia-vida plasmática muito menor quando se compara os dois fármacos. Apesar de este ser um resultado preliminar com um número pequeno de animais, nos leva a pensar sobre possíveis motivos para esta resposta. Resultados anteriores do grupo (KOVALSKI *et al.*, 2017) mostraram que, no tempo de 16 h após a administração de sildenafil, a duração da resposta hipotensora do nitroprussiato já estava igual a dos animais tratados com veículo. Entretanto, algumas diferenças são observadas entre os trabalhos. Optamos pela diluição do fármaco com DMSO ao invés de solução salina (NaCl 0,9%), uma vez que o fármaco apresentou pouca solubilidade em meio aquoso. Além disso, apesar da dose utilizada ter sido a mesma (10 mg/kg), a via de administração foi alterada de via oral para a via subcutânea neste trabalho. Um estudo com avaliações farmacocinéticas feitas por Shin, Bae e Lee (2006) em ratos mostrou que, devido a um extenso metabolismo de primeira passagem, a biodisponibilidade do sildenafil após administração por via oral é de somente 14,6%, sendo talvez um dos principais fatores que possam ter determinado as divergências encontradas. Sugere-se que a administração subcutânea do sildenafil aumentou a biodisponibilidade do fármaco substancialmente, possivelmente fazendo com que o sildenafil continuasse tendo efeito mesmo após 16 h do tratamento.

A sepse é uma das condições clínicas mais difíceis de se reproduzir em modelos animais. Os modelos atualmente utilizados englobam a administração de toxinas exógenas (como o LPS), a administração de patógenos viáveis ou a ruptura das barreiras endógenas protetoras do animal. Dentre eles, considera-se que o CLP é o modelo que fornece uma boa representação da complexidade da sepse humana (DEJAGER *et al.*, 2011). Entretanto, apesar

da sua relevância clínica, o CLP possui suas limitações assim como qualquer outro modelo experimental. Uma das principais desvantagens é a grande variabilidade nas respostas obtidas através do CLP. Dentre os fatores de variabilidade, se incluem: a porção do ceco em que é feita a ligadura (ou seja, o tamanho da necrose induzida), pois mesmo com a padronização podem ocorrer pequenas variações; a força exercida para fazer a ligadura; a quantidade de conteúdo intestinal extravasado; a microbiota de cada animal; a ocorrência de pequenas hemorragias, dentre outros (BURAS, HOLZMANN & SITKOVSKY, 2005). Assim, tanto a variabilidade intrínseca do modelo, a qual dificulta a reprodutibilidade entre laboratórios de pesquisa, quanto as diferenças entre o modelo experimental CLP e a sepse em humanos (Tabela 5) justificam as falhas na translação de efeitos benéficos de fármacos em estudos com animais para utilização em ensaios clínicos humanos.

Tabela 5: Discrepâncias entre o modelo experimental de sepse CLP e a sepse em humanos

Discrepância	Modelo de sepse: CLP	Sepse em humanos
Idade	Normalmente animais jovens	Maioria em neonatos ou idosos
Peso	Semelhante	Variável
Sexo	Normalmente um sexo	Ambos os sexos
Estado imunológico	Ótimo	Frequentemente sub-ótimo
Estado nutricional	Igual	Diverso
Genética	Geneticamente similares	Heterogêneos
Fatores sociais	Raramente	Frequente: hábitos de fumar e beber, estresse
Ambiente	Padronizado, frequentemente livre de patógenos	Variável
Início da doença	Normalmente rápido	Normalmente lento
Insulto causador	Polimicrobiano: mistura de bactérias entéricas	Bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, vírus, fungos
Antibióticos	Às vezes	Frequentemente usados, muitas vezes inefetivos
Tratamento	Normalmente inicial	Normalmente tardio
Comorbidades	Raramente	Comum: hipertensão, câncer, aterosclerose, diabetes, imunossupressão pré-existente
Tratamento de suporte	Raramente	Comum: antibióticos, ressuscitação fluida, ventilação mecânica, suporte na pressão sanguínea com vasopressores

Fonte: adaptado de Dejager *et al* (2011).

Em nosso estudo, observamos um indicativo de maior infiltrado de neutrófilos no tecido cardíaco, através do aumento da atividade da enzima MPO. Estes resultados corroboram análises observadas na clínica, em que tecidos coletados de pacientes sépticos com disfunção de múltiplos órgãos apresentam a presença de neutrófilos sequestrados nos rins e pulmões (BREALEY & SINGER, 2000). Os neutrófilos fazem parte do sistema imune e são células apropriadas para a função de eliminação de bactérias patogênicas, uma vez que possuem estoques de enzimas proteolíticas e alta produção de espécies reativas para degradar os patógenos que são internalizados (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013). Entretanto, uma vez que os neutrófilos são recrutados aos tecidos, os mediadores inflamatórios liberados extracelularmente como os fatores proteolíticos e citocinas pró-inflamatórias geram danos locais e contribuem para a falência de múltiplos órgãos observada na sepse (BROWN *et al.*, 2006). Adicionalmente, os neutrófilos sequestrados nos leitos capilares podem causar danos indiretamente pela oclusão do lúmen vascular, contribuindo para a isquemia tecidual (SÔNEGO *et al.*, 2016). As evidências, portanto, mostram o papel dual do neutrófilo como crucial para conter o crescimento microbiano, mas com indução de danos secundários aos órgãos durante a infecção. Estudo em modelo de fibrose pulmonar induzido por bleomicina em ratos apresentou redução da infiltração de neutrófilos nos pulmões através do tratamento com sildenafil, também na dose de 10 mg/kg (YILDIRIM *et al.*, 2010). Entretanto, os inibidores de PDE5 não interferiram no recrutamento dos neutrófilos no modelo de sepse utilizado no presente trabalho.

Assim como o aumento de infiltração de neutrófilos, a inflamação excessiva durante o quadro de sepse leva a uma produção exacerbada de NO, resultante principalmente da ativação da isoforma induzível da NOS. Como foi atribuído um papel deletério para esta produção acentuada de NO durante a sepse, investigações no sentido de limitar a síntese de NO foram conduzidas e um estudo clínico em fase II chegou a mostrar resultados promissores na sepse através da utilização do inibidor de NOS não seletivo L-NMMA (GROVER *et al.*, 1999). Porém, o estudo foi interrompido precocemente na subsequente fase III devido ao aumento da mortalidade induzido pelo tratamento (LÓPEZ *et al.*, 2004). É importante destacar, entretanto, que existe um questionamento no protocolo deste estudo. A falta de benefícios na inibição não-seletiva da NOS não significa, necessariamente, que a falha se repetiria se houvesse uma inibição seletiva de alguma das isoformas, como a induzível (STAHL, MATEJOVIC & RADERMACHER, 2010), reforçando a ideia de que é importante manter algum nível de produção e funcionamento da via NO/sGC/cGMP pelas isoformas constitutivas da NOS.

Como mencionado anteriormente, o papel do NO na sepse é discutível pois apresenta aspectos negativos relevantes, como a hipotensão arterial, mas também participa da manutenção da função microvascular e da resposta imunológica com efeitos antimicrobianos (WINKLER *et al.*, 2017). Em nosso estudo, observamos um aumento nos níveis plasmáticos de NOx, condizente com o aumento nos níveis de NOx presentes em pacientes com sepse e choque séptico (MITAKA *et al.*, 2003). Interessantemente, o tratamento com tadalafil atenuou o aumento do NOx plasmático nos ratos sépticos, o que pode ser resultante de uma menor produção de NO ou, mais provavelmente, do aumento da depuração destes metabólitos pelo sistema renal. Experimentos adicionais, como por exemplo a avaliação da expressão proteica da iNOS por Western Blotting, seriam válidos para verificar se a inibição da PDE5 interfere de alguma forma na produção do NO por esta enzima.

Ainda relacionado à via do NO, nós quantificamos no presente trabalho os níveis de BH4 na urina dos animais, os quais se encontravam reduzidos nos animais sépticos. Dados na literatura corroboram este resultado, apresentando menor biodisponibilidade de BH4 no cérebro de ratos sépticos 24 h após o procedimento CLP (GAMAL *et al.*, 2018), bem como menor expressão das enzimas envolvidas na sua síntese. Neste trabalho, os autores discutem que a redução nos níveis de BH4 durante a sepse pode ser deletéria em vários aspectos, principalmente porque a falta de BH4 resulta na alteração da produção de NO pelas enzimas NOS para produção de espécies reativas (LAM, HYLAND & HEALES, 2007).

Durante a sepse, há uma grande variabilidade entre os sintomas dos pacientes, que podem apresentar tanto hiperglicemia quanto hipoglicemia (PLUMMER & DEANE, 2016). Na prática clínica, as últimas diretrizes do *Surviving Sepsis Campaign* recomendam manter a glicemia ≤ 180 mg/dL, sem um alvo mínimo (a não ser que o paciente entre em estado de hipoglicemia, isto é, < 70 mg/dL) (RHODES *et al.*, 2017). Episódios hipoglicêmicos e a severidade dos mesmos em pacientes criticamente doentes se correlacionam diretamente com aumento de risco de morte no hospital (EGI *et al.*, 2010). Em relação ao perfil glicêmico dos animais no presente trabalho, observou-se uma hipoglicemia decorrente do modelo de sepse, condizente com o que ocorre na clínica em humanos. Interessantemente, alguns dados na literatura indicam que o cGMP pode ter papel no controle glicêmico (AYALA *et al.*, 2007), levando a realização de estudos clínicos envolvendo inibidores seletivos de PDE5 na diabetes tipo 2. Grandes estudos estão em andamento¹, porém já há indicação de resultados positivos no uso dos inibidores de PDE5 no aumento da captação de glicose para o tecido muscular

¹ ClinicalTrials.gov: NCT02601989

(JANSSON *et al.*, 2010; MURDOLO *et al.*, 2013). Nos nossos resultados, o tratamento com inibidores de PDE5 não alterou o perfil glicêmico dos animais e não potencializou a hipoglicemia induzida pela sepse.

Os marcadores plasmáticos de dano tecidual utilizados neste estudo compõem parte de uma gama de testes laboratoriais de índices bioquímicos analisados na prática clínica para avaliar função de órgãos em pacientes sépticos (LI *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2019), bem como em modelos experimentais de sepse (HUBER-LANG *et al.*, 2001). Os marcadores analisados foram os indicadores de função renal, ureia e creatinina, os indicadores de função hepática, AST e ALT, e o indicador de má perfusão tecidual, lactato. Tanto os níveis de ureia quanto os de creatinina não foram diferentes entre os grupos Sham e CLP, similar aos resultados encontrados em um recente estudo (HOU *et al.*, 2019), enquanto por outro lado há também os que encontram aumento destes marcadores (WANG *et al.*, 2017), o que nos remete à alta variabilidade inerente ao modelo. Há inclusive um estudo que compara, em camundongos sépticos, a efetividade da mensuração de creatinina, ureia e cistatina C, correlacionando com a taxa de filtração glomerular de inulina. Com base nos resultados, o estudo sugere que a cistatina C, comparada com a creatinina e a ureia, detecta o dano renal agudo mais precocemente no curso do estabelecimento da sepse induzida por CLP e melhor reflete a taxa de filtração glomerular (LEELAHAVANICHKUL *et al.*, 2014).

O fígado abrange funções de detoxificação e síntese de proteínas, tanto fisiologicamente quanto durante a sepse. Para manter o funcionamento normal, 25% do débito cardíaco é direcionado para perfusão hepática. Entretanto, durante a sepse, a entrega de oxigênio para o tecido é comprometida, gerando dois tipos de lesões principais: a hepatite hipóxica e a colestase, podendo também haver aparecimento de icterícia (NESSELER *et al.*, 2012). Para monitorar a função hepática, são dosados alguns marcadores, como os níveis de bilirrubina total, gama-glutamil transferase, fosfatase alcalina e as aminotransferases (AST e ALT). Os marcadores utilizados no presente estudo, AST e ALT, frequentemente se encontram aumentados em pacientes com sepse (KOSKINAS *et al.*, 2008). Vale ressaltar que a AST não é uma enzima majoritariamente liberada do fígado, pois também é expressa em vários outros tecidos (como músculo esquelético, coração, pulmões, cérebro, rins, entre outros), enquanto a ALT é expressa principalmente no fígado (LESCOT *et al.*, 2012). Em nosso estudo, assim como em outros envolvendo modelos animais de sepse (JIANG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2019), os níveis de AST e ALT se apresentaram elevados nos animais CLP em relação aos animais Sham, indicando dessa forma o dano hepático induzido pela sepse.

O aumento da concentração de lactato no sangue, também chamado de hiperlactatemia, é visto com frequência em pacientes com sepse (MARTY *et al.*, 2013), sendo inclusive um critério de inclusão no diagnóstico de choque séptico. Este aumento de lactato é visto como um marcador biológico de hipóxia tecidual devido a um desbalanço entre a demanda e a oferta de oxigênio no corpo (LEE & AN, 2016). De fato, os animais sépticos avaliados no presente estudo apresentaram aumento nos níveis sanguíneos de lactato quando comparado com os animais dos grupos Sham, corroborando dados de modelos experimentais que se encontram na literatura (DESHPANDE, HEIDEMANN & SARNAIK, 2000). Contudo, a interpretação dos níveis de lactato apenas como um índice de má perfusão tecidual é tida como simplificada atualmente, pois há de se levar em consideração alguns outros aspectos que podem causar uma acumulação de lactato no organismo, mesmo que na ausência de hipóxia tecidual. Um estudo observou altas concentrações de lactato sérico em pacientes sépticos mesmo que a disponibilidade de oxigênio no organismo estivesse três vezes mais alta do que o ponto crítico de oferta de oxigênio (RONCO *et al.*, 1993). Dentre outras causas de hiperlactatemia a serem consideradas durante a sepse, estão:

- A disfunção microvascular, com perfusão heterogênea, levando a regiões específicas do tecido gerarem lactato mesmo que com uma oferta global de oxigênio adequada (BATEMAN & WALLEY, 2005);

- A disfunção mitocondrial, fazendo com que mesmo em tecidos devidamente oxigenados ocorra metabolismo anaeróbico, com produção de lactato (SUETRONG & WALLEY, 2016);

- O aumento da taxa de metabolismo nos pacientes sépticos (KREYMANN *et al.*, 1993), isto é, um maior fluxo glicolítico (o que excede a capacidade da enzima piruvato desidrogenase, levando parte do piruvato a ser convertido para lactato);

- O prejuízo na depuração do lactato, ao invés de sua superprodução, o que pode ocorrer em pacientes com função hepática prejudicada (LEVRAUT *et al.*, 1998).

De modo sistêmico, o que se observa como características fundamentais da disfunção cardiovascular durante a sepse (e, progressivamente, evoluindo a um choque séptico) são a vasodilatação periférica, hiporreatividade a vasoconstritores, aumento da permeabilidade vascular, hipovolemia e disfunção cardíaca (RUSSEL, RUSH & BOYD, 2018). De acordo com o *Surviving Sepsis Campaign* (RHODES *et al.*, 2017), recomenda-se que a noradrenalina seja utilizada como droga vasopressora de primeira escolha. Dessa forma, escolhemos a noradrenalina em nosso estudo para avaliar a resposta pressórica a um agente vasoconstritor durante a

sepsis. Ainda de acordo com estas diretrizes, vasopressinas podem ser utilizadas em conjunto para diminuir a dose de noradrenalina. A dopamina também é sugerida, mas apenas para grupos específicos de pacientes, os quais devem ter baixo risco de taquiarritmias e apresentar bradicardia. Adicionalmente, sugere-se dobutamina em pacientes que ainda apresentam sinais de hipoperfusão apesar da ressuscitação fluida e do(s) agente(s) vasopressor(es). Sobretudo, é importante considerarmos sobre a dose de noradrenalina utilizada na infusão. Na clínica, altas doses de noradrenalina estão diretamente associadas com pior prognóstico e excesso de mortalidade (AUCHET *et al.*, 2017), uma vez que vasopressores adrenérgicos possuem o potencial de causar efeitos adversos como aumento de estresse oxidativo, alterações no metabolismo energético e modulação da resposta inflamatória (HARTMANN *et al.*, 2017).

Como esperado, os animais sépticos apresentaram-se hipotensos. A hipotensão na sepsis é originada de um conjunto de fatores, dentre eles a depressão miocárdica, a vasodilatação excessiva e a perda do volume de sangue circulante (hipovolemia) devido a um extravasamento capilar (QURESHI & RAJAH, 2008). Em ordem de se obter a estabilização hemodinâmica, é recomendado a administração de fluidos cristaloides para ressuscitação volêmica, o que foi mimetizado neste trabalho através da administração subcutânea de solução salina estéril. Também foi observado em nosso estudo o fato de que, apesar de administrada a mesma dose de noradrenalina durante a infusão, os animais sépticos não atingiram a mesma pressão arterial que os animais dos grupos Sham, uma vez que além de hipotensos os animais se apresentavam hiporreativos. Os principais agentes endógenos que geram vasoconstrição atuam através de receptores acoplados à proteína G, ou GPCR (do inglês, *G-protein-coupled receptors*). Isto é, os receptores adrenérgicos, os receptores V1 (de vasopressinas) e os receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1). Durante diferentes estados de choque, como o choque séptico, estes três subtipos de receptores passam por um processo de dessensibilização, uma vez que a ativação sustentada destes receptores pelos seus agonistas durante as fases iniciais do choque são associadas com a sua fosforilação pela família de quinases GPCR (GRKs, do inglês *G-protein-coupled receptors kinases*) (LEVY *et al.*, 2018), sendo uma das principais causas da hiporreatividade a estes três principais vasopressores. Atualmente, está bem estabelecido que a hipotensão associada com a hiporreatividade vascular é associada com maior mortalidade na sepsis (VARPULA *et al.*, 2005). Desse modo, é possível que a não visualização do aumento de alguns dos marcadores de dano tecidual ocorreu devido ao tempo em que foram feitas as análises, visto que as disfunções hemodinâmicas observadas neste trabalho evidenciam a gravidade do quadro de sepsis induzido pelo CLP.

Assim como em pacientes sépticos, os quais frequentemente possuem frequência cardíaca aumentada (DAGHER *et al.*, 2018), os animais dos grupos CLP apresentaram sintomas de taquicardia em relação aos animais dos grupos Sham. Em resposta a patógenos invasores, o organismo se dispõe de uma super-estimulação do sistema nervoso simpático, para que o hospedeiro monte uma resposta rápida e eficiente (PEMBERTON *et al.*, 2015). Contudo, alguns pacientes mantêm uma elevação contínua de catecolaminas (BENEDICT & ROSE, 1992), o que somado com a terapia vasopressora culmina em um excesso de catecolaminas que pode ser deletério no organismo. Já foi demonstrado em pacientes criticamente doentes que uma taquicardia prolongada se relaciona com uma maior incidência de eventos cardíacos, além de estar associada com maior tempo de estadia na UTI (SANDER *et al.*, 2005). Dessa forma, o excesso de vasoconstritores endógenos e exógenos na circulação visando o aumento da pressão arterial e a melhora na pressão de perfusão nos órgãos vitais pode, de forma contraditória, acabar gerando uma vasoconstrição excessiva e resultar em um prejuízo na perfusão tecidual (DE BACKER & FOULON, 2019). Neste sentido, o uso de inibidores de PDE5 poderia ter sido interessante, embora pelos dados obtidos neste trabalho esta hipótese não tenha sido confirmada.

Além disso, os animais sépticos também apresentaram valores basais reduzidos de fluxo sanguíneo renal. Contudo, no decorrer da infusão de noradrenalina, diferentemente do que houve na resposta da pressão arterial, os valores de frequência cardíaca e de fluxo sanguíneo renal se igualaram entre os grupos Sham e CLP. Um estudo em modelo experimental de choque séptico em porcos mostrou aumento da resistência vascular renal e disfunção dos rins (BENES *et al.*, 2011), sendo que esta resposta vasoconstritora ocorreu na presença da vasodilatação em outras partes do organismo, sugerindo uma redistribuição do fluxo sanguíneo. Além disso, não só a perfusão do órgão como um todo é afetada, pois também se desenvolvem disfunções microcirculatórias. Estudos em modelo de endotoxemia em camundongos (WU *et al.*, 2007) e em modelo de sepse em ratos (SEELY *et al.*, 2011) mostraram redução do fluxo sanguíneo na microcirculação peritubular. Quanto às evidências clínicas, Prowle *et al.* (2012) demonstraram que pacientes com dano renal agudo induzido pela sepse apresentam uma redução no fluxo sanguíneo renal. Estes dados, portanto, corroboram os achados neste estudo no quesito de redução de fluxo sanguíneo renal, embora o tratamento com o tadalafil não foi capaz de reverter este quadro.

No *status* atual, a sepse se encontra como uma síndrome desafiadora, para a qual um protocolo rígido e homogêneo não levará a um bom padrão de tratamento dados os diversos

sintomas e a população heterogênea de pacientes. Por este motivo, a terapia deve ser ajustada para atender as necessidades de cada paciente, e isso se estende à urgência de encontrar abordagens alternativas de tratamentos adjuvantes. Neste sentido, evidências já apontam que é necessário minimizar a exposição a vasoconstritores e priorizar a perfusão de órgãos, evitando assim o dano generalizado. Uma das formas de melhorar a perfusão microvascular seria através de agentes vasodilatadores, os quais vem sendo estudados e têm mostrado resultados promissores (SPRONK *et al.*, 2002; HE *et al.*, 2012; KOVALSKI *et al.*, 2017), embora de fato ainda haja uma escassez de evidências básicas e clínicas para levantar concretamente os pontos positivos e negativos neste tipo de terapia. No presente trabalho, investigamos esta linha de raciocínio, visando melhorar as anormalidades hemodinâmicas para amenizar os danos em diferentes órgãos através da inibição da PDE5. Apesar da nossa hipótese não ter se mostrado verdadeira, ainda há muito espaço para explorar possíveis benefícios oriundos de uma melhora de perfusão tecidual, seja com diferentes protocolos experimentais ou com fármacos com diferentes mecanismos de ação.

6 CONCLUSÕES

De um modo geral, com base nos dados obtidos neste trabalho, conclui-se que os animais sépticos apresentaram disfunções e danos em diferentes sistemas, assim como se observa na prática clínica. Os inibidores seletivos de PDE5 sildenafil e tadalafil não demonstraram melhorar ou interferir nas disfunções induzidas pela sepse nas condições do protocolo experimental utilizado neste trabalho.

Contudo, os presentes achados não dispensam a necessidade da investigação de novos agentes para auxiliar no desequilíbrio dos diferentes sistemas do organismo durante a sepse, principalmente os que auxiliem no processo de melhora de perfusão tecidual, uma vez que esta é muito acometida durante esta síndrome.

Adicionalmente, destaca-se a consideração de perspectivas com possíveis experimentos para o entendimento de alguns pontos neste trabalho, como o Western Blotting para determinação da expressão tecidual de iNOS e PDE5, a quantificação de citocinas, a avaliação da função cardíaca pelo método de Langendorff, bem como análises no tecido renal. Considera-se também o teste de diferentes doses de sildenafil por via subcutânea, para que se possam distinguir os efeitos tardios do sildenafil com o tadalafil.

REFERÊNCIAS

- ALVES, Gustavo F. **Efeitos da inibição da fosfodiesterase-4 sobre parâmetros cardiovasculares e inflamatórios durante a sepse.** 2019. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.
- ANDERSSON, Karl-Erik. PDE5 inhibitors—pharmacology and clinical applications 20 years after sildenafil discovery. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 13, p. 2554-2565, 2018.
- ASSREUY, Jamil. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, v. 6, n. 2, p. 165-173, 2006.
- AUCHET, Thomas *et al.* Outcome of patients with septic shock and high-dose vasopressor therapy. **Annals of Intensive Care**, v. 7, n. 1, p. 43, 2017.
- AYALA, Julio E. *et al.* Chronic treatment with sildenafil improves energy balance and insulin action in high fat-fed conscious mice. **Diabetes**, v. 56, n. 4, p. 1025-1033, 2007.
- BAILLIE, George S.; TEJEDA, Gonzalo S.; KELLY, Michy P. Therapeutic targeting of 3', 5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 10, p. 770-796, 2019.
- BATEMAN, Ryon M.; WALLEY, Keith R. Microvascular resuscitation as a therapeutic goal in severe sepsis. **Critical Care**, v. 9, n. S4, p. S27, 2005.
- BENDER, Andrew T.; BEAVO, Joseph A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.
- BENEDET, Patrícia O. *et al.* The therapeutic value of protein (de) nitrosylation in experimental septic shock. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 1, p. 307-316, 2018.
- BENEDICT, C. R.; ROSE, J. A. Arterial norepinephrine changes in patients with septic shock. **Circulatory shock**, v. 38, n. 3, p. 165-172, 1992.
- BREALEY, David; SINGER, Mervyn. Multi-organ dysfunction in the critically ill: effects on different organs. **Journal-Royal College of Physicians of London**, v. 34, n. 5, p. 428-431, 2000.
- BROWN, K. A. *et al.* Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157-169, 2006.
- BURAS, Jon A.; HOLZMANN, Bernhard; SITKOVSKY, Michail. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 854-865, 2005.

CASSINA, Adriana; RADI, Rafael. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxy-nitrite on mitochondrial electron transport. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 328, n. 2, p. 309-316, 1996.

CAUWELS, Anje *et al.* Nitrite protects against morbidity and mortality associated with TNF- or LPS-induced shock in a soluble guanylate cyclase-dependent manner. **Journal of Experimental Medicine**, v. 206, n. 13, p. 2915-2924, 2009.

CECCONI, Maurizio *et al.* Sepsis and septic shock. **The Lancet**, v. 392, n. 10141, p. 75-87, 2018.

CORBIN, Jackie D. *et al.* Phosphorylation of phosphodiesterase-5 by cyclic nucleotide-dependent protein kinase alters its catalytic and allosteric cGMP-binding activities. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 9, p. 2760-2767, 2000.

DAGHER, Gilbert Abou *et al.* Outcomes of patients with systolic heart failure presenting with sepsis to the emergency department of a tertiary hospital: a retrospective chart review study from Lebanon. **BMJ Open**, v. 8, n. 7, p. e022185, 2018.

DE BACKER, Daniel *et al.* Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 73-79, 2014.

DE BACKER, Daniel; FOULON, Pierre. Minimizing catecholamines and optimizing perfusion. **Critical Care**, v. 23, n. 1, p. 149, 2019.

DEJAGER, Lien *et al.* Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis?. **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198-208, 2011.

DESHPANDE, Girish G.; HEIDEMANN, Sabrina M.; SARNAIK, Ashok P. Heat stress is associated with decreased lactic acidemia in rat sepsis. **Critical Care**, v. 4, n. 1, p. 45, 2000.

EGI, Moritoki *et al.* Hypoglycemia and outcome in critically ill patients. In: **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2010. p. 217-224.

FARAH, Charlotte; MICHEL, Lauriane YM; BALLIGAND, Jean-Luc. Nitric oxide signaling in cardiovascular health and disease. **Nature Reviews Cardiology**, v. 15, n. 5, p. 292, 2018.

FERNANDES, Daniel *et al.* Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, n. 3, p. 991-999, 2009.

FISCHER, Johan C. *et al.* Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. **Clinica Chimica Acta**, v. 153, n. 1, p. 23-36, 1985.

FRANCIS, Sharron H.; BUSCH, Jennifer L.; CORBIN, Jackie D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 3, p. 525-563, 2010.

- GAMAL, Maha *et al.* Possible involvement of tetrahydrobiopterin in the disturbance of redox homeostasis in sepsis–Induced brain dysfunction. **Brain Research**, v. 1685, p. 19-28, 2018.
- GIBSON, Alan. Phosphodiesterase 5 inhibitors and nitrergic transmission—from zaprinast to sildenafil. **European Journal of Pharmacology**, v. 411, n. 1-2, p. 1-10, 2001.
- GRANGER, D. L. *et al.* Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 85, n. 1, p. 264-273, 1990.
- GROSS, Shimon *et al.* Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. **Nature Medicine**, v. 15, n. 4, p. 455, 2009.
- GROVER, Robert *et al.* An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, NG-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 5, p. 913-922, 1999.
- HARTMANN, Clair *et al.* Non-hemodynamic effects of catecholamines. **Shock**, v. 48, n. 4, p. 390-400, 2017.
- HATZIMOURATIDIS, Konstantinos *et al.* Pharmacotherapy for erectile dysfunction: recommendations from the Fourth International Consultation for Sexual Medicine (ICSM 2015). **The Journal of Sexual Medicine**, v. 13, n. 4, p. 465-488, 2016.
- HE, Xinrong *et al.* Administration of tetrahydrobiopterin improves the microcirculation and outcome in an ovine model of septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 10, p. 2833-2840, 2012.
- HERBERTSON, Michael J. *et al.* Myocardial oxygen extraction ratio is decreased during endotoxemia in pigs. **Journal of Applied Physiology**, v. 79, n. 2, p. 479-486, 1995.
- HESS, Douglas T. *et al.* Protein S-nitrosylation: purview and parameters. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 150, 2005.
- HOTCHKISS, Richard S. *et al.* Sepsis and septic shock. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 2, p. 16045, 2016.
- HOU, Yu-Chen *et al.* Effects of prophylactic administration of glutamine on CD4+ T cell polarisation and kidney injury in mice with polymicrobial sepsis. **British Journal of Nutrition**, v. 122, n. 6, p. 657-665, 2019.
- HUBER-LANG, Markus *et al.* Role of C5a in multiorgan failure during sepsis. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 2, p. 1193-1199, 2001.
- JANSSON, P.-A. *et al.* Tadalafil increases muscle capillary recruitment and forearm glucose uptake in women with type 2 diabetes. **Diabetologia**, v. 53, n. 10, p. 2205-2208, 2010.
- JIANG, Zhengyu *et al.* Overexpression of homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) attenuates sepsis-mediated liver injury by restoring autophagy. **Cell Death & Disease**, v. 9, n. 9, p. 1-16, 2018.

- KAKIHANA, Yasuyuki *et al.* Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. **Journal of Intensive Care**, v. 4, n. 1, p. 22, 2016.
- KAYIK, Gülru; TÜZÜN, Nurcan Ş.; DURDAGI, Serdar. Investigation of PDE5/PDE6 and PDE5/PDE11 selective potent tadalafil-like PDE5 inhibitors using combination of molecular modeling approaches, molecular fingerprint-based virtual screening protocols and structure-based pharmacophore development. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 32, n. 1, p. 311-330, 2017.
- KESHET, Rom; EREZ, Ayelet. Arginine and the metabolic regulation of nitric oxide synthesis in cancer. **Disease Models & Mechanisms**, v. 11, n. 8, p. dmm033332, 2018.
- KOLACZKOWSKA, Elzbieta; KUBES, Paul. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.
- KOSKINAS, John *et al.* Liver histology in ICU patients dying from sepsis: a clinico-pathological study. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 14, n. 9, p. 1389, 2008.
- KOVALSKI, Vanessa *et al.* Protective role of cGMP in early sepsis. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 174-181, 2017.
- KREYMANN, Georg *et al.* Oxygen consumption and resting metabolic rate in sepsis, sepsis syndrome, and septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 21, n. 7, p. 1012-1019, 1993.
- LAM, A. A. J.; HYLAND, K.; HEALES, S. J. R. Tetrahydrobiopterin availability, nitric oxide metabolism and glutathione status in the hph-1 mouse; implications for the pathogenesis and treatment of tetrahydrobiopterin deficiency states. **Journal of Inherited Metabolic Disease: Official Journal of the Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism**, v. 30, n. 2, p. 256-262, 2007.
- LATINI, Alexandra *et al.* Mitochondrial energy metabolism is markedly impaired by D-2-hydroxyglutaric acid in rat tissues. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 86, n. 1-2, p. 188-199, 2005.
- LEE, Su Mi; AN, Won Suk. New clinical criteria for septic shock: serum lactate level as new emerging vital sign. **Journal of Thoracic Disease**, v. 8, n. 7, p. 1388, 2016.
- LEELAHAVANICHKUL, Asada *et al.* Comparison of serum creatinine and serum cystatin C as biomarkers to detect sepsis-induced acute kidney injury and to predict mortality in CD-1 mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 307, n. 8, p. F939-F948, 2014.
- LELUBRE, Christophe; VINCENT, Jean-Louis. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 417, 2018.
- LESCOT, Thomas *et al.* Acquired liver injury in the intensive care unit. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 117, n. 4, p. 898-904, 2012.

LEVRAUT, Jacques *et al.* Mild hyperlactatemia in stable septic patients is due to impaired lactate clearance rather than overproduction. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 157, n. 4, p. 1021-1026, 1998.

LEVY, Bruno *et al.* Vasoplegia treatments: the past, the present, and the future. **Critical Care**, v. 22, n. 1, p. 52, 2018.

LI, Yi *et al.* Effects of Shenfu injection in the treatment of septic shock patients: a multicenter, controlled, randomized, open-label trial. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

LÓPEZ, Angel *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**, v. 32, n. 1, p. 21-30, 2004.

LUNDBERG, Jon O.; GLADWIN, Mark T.; WEITZBERG, Eddie. Strategies to increase nitric oxide signalling in cardiovascular disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 9, p. 623, 2015.

MACHADO, Flavia R. *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180-1189, 2017.

MARTY, Philippe *et al.* Lactate clearance for death prediction in severe sepsis or septic shock patients during the first 24 hours in Intensive Care Unit: an observational study. **Annals of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 3, 2013.

MATTHAY, Michael A. *et al.* Acute respiratory distress syndrome. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 5, n. 1, p. 18, 2019.

MAURICE, Donald H. *et al.* Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 4, p. 290, 2014.

MITAKA, Chieko *et al.* Relationships of circulating nitrite/nitrate levels to severity and multiple organ dysfunction syndrome in systemic inflammatory response syndrome. **Shock**, v. 19, n. 4, p. 305-309, 2003.

MOENS, An L.; KASS, David A. Tetrahydrobiopterin and cardiovascular disease. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 26, n. 11, p. 2439-2444, 2006.

MÜNZEL, Thomas; DAIBER, Andreas; MÜLSCH, Alexander. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. **Circulation Research**, v. 97, n. 7, p. 618-628, 2005.

MURDOLO, Giuseppe *et al.* The selective phosphodiesterase-5 inhibitor tadalafil induces microvascular and metabolic effects in type 2 diabetic postmenopausal females. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 1, p. 245-254, 2013.

NAIR, Anroop B.; JACOB, Shery. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

- NESSELER, Nicolas *et al.* Clinical review: the liver in sepsis. **Critical Care**, v. 16, n. 5, p. 235, 2012.
- NOMIYA, Masanori *et al.* Prophylactic effect of tadalafil on bladder function in a rat model of chronic bladder ischemia. **The Journal of Urology**, v. 189, n. 2, p. 754-761, 2013.
- OKAMOTO, Kohji; TAMURA, Toshihisa; SAWATSUBASHI, Yusuke. Sepsis and disseminated intravascular coagulation. **Journal of Intensive Care**, v. 4, n. 1, p. 23, 2016.
- OLIVER, James J.; MELVILLE, Vanessa P.; WEBB, David J. Effect of regular phosphodiesterase type 5 inhibition in hypertension. **Hypertension**, v. 48, n. 4, p. 622-627, 2006.
- PEMBERTON, Philip *et al.* Is it time to beta block the septic patient?. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.
- PLUMMER, Mark P.; DEANE, Adam M. Dysglycemia and glucose control during sepsis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 2, p. 309-319, 2016.
- PROWLE, John R. *et al.* Measurement of renal blood flow by phase-contrast magnetic resonance imaging during septic acute kidney injury: a pilot investigation. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 6, p. 1768-1776, 2012.
- QURESHI, Khadija; RAJAH, Abid. Septic shock: a review article. **Br J Med Pract**, v. 1, p. 7-12, 2008.
- RASHID, Aly. The efficacy and safety of PDE5 inhibitors. **Clinical Cornerstone**, v. 7, n. 1, p. 47-55, 2005.
- RICCI, Zaccaria *et al.* The implications and management of septic acute kidney injury. **Nature Reviews Nephrology**, v. 7, n. 4, p. 218, 2011.
- RHODES, Andrew *et al.* Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 3, p. 304-377, 2017.
- RONCO, Juan J. *et al.* Identification of the critical oxygen delivery for anaerobic metabolism in critically ill septic and nonseptic humans. **Jama**, v. 270, n. 14, p. 1724-1730, 1993.
- RUDD, Kristina E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200-211, 2020.
- RUSSELL, James A.; RUSH, Barret; BOYD, John. Pathophysiology of septic shock. **Critical Care Clinics**, v. 34, n. 1, p. 43-61, 2018.
- RUSTIN, P. *et al.* Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. **Clinica Chimica Acta**, v. 228, n. 1, p. 35-51, 1994.

- SANDER, Olaf *et al.* Impact of prolonged elevated heart rate on incidence of major cardiac events in critically ill patients with a high risk of cardiac complications. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 1, p. 81-88, 2005.
- SEELY, Kathryn A. *et al.* Hemodynamic changes in the kidney in a pediatric rat model of sepsis-induced acute kidney injury. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 301, n. 1, p. F209-F217, 2011.
- SINGER, Mervyn. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 66-72, 2014.
- SINGER, Mervyn *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.
- SHIN, Hyun S.; BAE, Soo K.; LEE, Myung G. Pharmacokinetics of sildenafil after intravenous and oral administration in rats: hepatic and intestinal first-pass effects. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 320, n. 1-2, p. 64-70, 2006.
- SMITH, Paul K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76-85, 1985.
- SÔNAGO, Fabiane *et al.* Paradoxical roles of the neutrophil in sepsis: protective and deleterious. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 155, 2016.
- SONNEVILLE, Romain *et al.* Understanding brain dysfunction in sepsis. **Annals of Intensive Care**, v. 3, n. 1, p. 15, 2013.
- SORDI, Regina; FERNANDES, Daniel; ASSREUY, Jamil. Differential involvement of potassium channel subtypes in early and late sepsis-induced hyporesponsiveness to vasoconstrictors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 184-189, 2010.
- SPRONK, Peter E. *et al.* Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. **The Lancet**, v. 360, n. 9343, p. 1395-1396, 2002.
- STAHL, Wolfgang; MATEJOVIC, Martin; RADERMACHER, Peter. Inhibition of nitric oxide synthase during sepsis: revival because of isoform selectivity?. **Shock**, v. 34, n. 3, p. 321-322, 2010.
- SUETRONG, Bandarn; WALLEY, Keith R. Lactic acidosis in sepsis: it's not all anaerobic: implications for diagnosis and management. **Chest**, v. 149, n. 1, p. 252-261, 2016.
- SUSSMAN, David O. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and efficacy of phosphodiesterase type 5 inhibitors. **Journal of the American Osteopathic Association**, v. 104, n. 3 supplement, p. 11S, 2004.
- VARPULA, Marjut *et al.* Hemodynamic variables related to outcome in septic shock. **Intensive Care Medicine**, v. 31, n. 8, p. 1066-1071, 2005.

VILLAR, David *et al.* Biologic effects of fenbendazole in rats and mice: a review. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**, v. 46, n. 6, p. 8-15, 2007.

WANG, Nian *et al.* Resveratrol protects against early polymicrobial sepsis-induced acute kidney injury through inhibiting endoplasmic reticulum stress-activated NF- κ B pathway. **Oncotarget**, v. 8, n. 22, p. 36449, 2017.

WANG, Fei *et al.* Protective role of thymoquinone in sepsis-induced liver injury in BALB/c mice. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 18, n. 3, p. 1985-1992, 2019.

WERNER, Ernst R.; BLAU, Nenad; THÖNY, Beat. Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. **Biochemical journal**, v. 438, n. 3, p. 397-414, 2011.

WICHTERMAN, Keith A.; BAUE, Arthur E.; CHAUDRY, Irshad H. Sepsis and septic shock—a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, v. 29, n. 2, p. 189-201, 1980.

WINKLER, Martin Sebastian *et al.* Markers of nitric oxide are associated with sepsis severity: an observational study. **Critical Care**, v. 21, n. 1, p. 189, 2017.

WU, Liping *et al.* Peritubular capillary dysfunction and renal tubular epithelial cell stress following lipopolysaccharide administration in mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 292, n. 1, p. F261-F268, 2007.

YAN, Jun; LI, Song; LI, Shulin. The role of the liver in sepsis. **International Reviews of Immunology**, v. 33, n. 6, p. 498-510, 2014.

YILDIRIM, Alper *et al.* Phosphodiesterase-5 inhibition by sildenafil citrate in a rat model of bleomycin-induced lung fibrosis. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 215-221, 2010.

ZARIFPOUR, Mona *et al.* Protective effect of tadalafil on the functional and structural changes of the rat ventral prostate caused by chronic pelvic ischemia. **The Prostate**, v. 75, n. 3, p. 233-241, 2015.

ZHANG, Haibo *et al.* Effects of nitric oxide donor SIN-1 on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. **Archives of Surgery**, v. 131, n. 7, p. 767-774, 1996.

ZHANG, Yucai *et al.* AST-to-platelet ratio index as potential early-warning biomarker for sepsis-associated liver injury in children: a database study. **Frontiers in Pediatrics**, v. 7, p. 331, 2019.

ZWEIER, Jay L. *et al.* Mechanisms of nitrite reduction to nitric oxide in the heart and vessel wall. **Nitric Oxide**, v. 22, n. 2, p. 83-90, 2010.