

**Daniel Fernandes**

**DINÂMICA DA GUANILATO CICLASE SOLÚVEL NA SEPSE:  
UMA JANELA DE OPORTUNIDADE.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

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

**FLORIANÓPOLIS-SC**

**2006**

FERNANDES, Daniel. **Dinâmica da guanilato ciclase solúvel na sepse: uma janela de oportunidade.** Florianópolis, 2006, 113p. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Defesa: 14/08/2006

A alta produção de óxido nítrico (NO) é um dos principais responsáveis pela hipotensão e hiporeatividade a vasoconstritores, características clínicas do choque séptico. A ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC) responde pelos principais efeitos do NO durante esta patologia. Entretanto, há controvérsias a respeito se a utilização de inibidores desta enzima é uma opção efetiva e segura para o tratamento do choque séptico. A incubação *in vitro* de pulmões, retirados de animais controles ou injetados com LPS 24 h antes, com nitroprussiato de sódio (SNP), gerou um aumento de 20 vezes nos níveis de cGMP. Já em tecidos de animais injetados com LPS 8 h antes, o SNP falhou em aumentar os níveis de cGMP. Os níveis protéicos da sGC foram reduzidos no tempo de 8 h após a injeção de LPS e voltaram a valores normais em ratos injetados com LPS 24 h antes. A reposta vasoconstritora para fenilefrina foi reduzida em torno de 50 % em 8 e 24 h após a injeção de LPS. O azul de metileno (MeB), inibidor da sGC, restaurou a reatividade para fenilefrina em animais injetados com LPS 24 h antes, mas falhou em animais injetados 8 h antes. Para avaliar o efeito do azul de metileno sobre a mortalidade os animais foram submetidos ao procedimento de ligadura e perfuração do ceco (CLP). Quando os animais receberam MeB 8 h após o CLP, a mortalidade dos animais piorou. Entretanto, quando os animais receberam MeB no tempo de 20 h após o procedimento de CLP, ocorreu uma redução no índice de mortalidade. Portanto, o padrão de resposta da enzima sGC durante a sepse pode determinar o sucesso ou a falha do tratamento com seus inibidores. Assim, o azul de metileno pode ser uma estratégia terapêutica útil se administrado em uma janela correta de oportunidade.

Guanilato ciclase, óxido nítrico, choque séptico, azul de metileno

*Haverá na face de todos um profundo assombro  
E na face de alguns risos sutis cheios de reserva  
Muitos se reunirão em lugares desertos  
E falarão em voz baixa em possíveis milagres  
Como se o milagre tivesse realmente se realizado  
Muitos sentirão alegria[...]  
Muitos não compreenderão  
Porque suas inteligências vão somente até os processos  
E já existem nos processos tantas dificuldades  
Alguns verão e julgarão com a alma[...]*

*No meio de todos eu ouvirei calado e atento, comovido e risonho  
Escutando verdades e mentiras*

*Mas não dizendo nada*

*Só a alegria de alguns compreenderem bastará  
Porque tudo aconteceu para que eles compreendessem  
Que as águas mais turvas contêm às vezes as pérolas mais belas*

*(Vinicius de Moraes, Acontecimento)*

*A Deus*

*Por der me dado serenidade nos momentos difíceis, permitindo que eu chegasse ainda mais longe.*

*Aos meus pais, Pedro Fernandes e Lourdes Z.C. Fernandes, pelos sólidos ensinamentos, pelo amor e apoio incondicionais.*

*A minha namorada Regina de Sordi pela presença constante pelo amor e incentivo que tornaram estes anos muito agradáveis.*

*A minha irmã Patrícia Fernandes Rovaris e meu cunhado Fábio Rovaris pela grande amizade, carinho e apoio transmitidos em nossos encontros.*

*Ao meu orientador Jamil Assreuy pela amizade, apoio e confiança depositada em mim.*

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, pela oportunidade, pelos ensinamentos, pelas ótimas conversas científicas, pela confiança depositada em mim e por sua valiosa amizade. Gostaria de novamente registrar minha admiração pela forma apaixonada como transmite seus conhecimentos e por sua dedicação à ciência e ao ensino.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto por disponibilizar equipamentos e reagentes importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, pela boa discussão proporcionada no exame de qualificação, pelos ensinamentos e exemplo sempre muito importantes.

Ao Prof. Dr. Reinaldo N. Takahashi, ex-Coordenador do Programa de Pós-graduação por incentivar a minha entrada no doutorado.

Ao Prof. Dr. Antônio de Pádua Carobrez por proporcionar contato com atividades de ensino, mas principalmente por modificar os meus conceitos relacionados a estas atividades.

Aos demais professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Catarina pelos ensinamentos.

À Prof. Dra. Thereza Christina Barja-Fidalgo, pela ótima acolhida em seu laboratório onde foram realizados os experimentos de RT-PCR.

À Christina Gaspar Vilella, pela grande atenção dispensada para realização dos experimentos de RT-PCR.

A minha namorada Regina de Sordi, pelo auxílio em vários experimentos, pela leitura e correção criteriosa da tese, mas principalmente pela paciência, companheirismo e incentivo durante todo este tempo.

Ao José Eduardo da Silva-Santos, pelo apoio e incentivo muito preciosos no início do meu doutorado.

À Adriane Madeira, pela amizade, carinho e suporte técnico, fundamentais para realização deste trabalho.

Ao Gustavo Campos Ramos, que se tornou um grande amigo nestes últimos anos, pelo auxílio em alguns experimentos e pelas ótimas discussões sobre ciência.

À Danielle Duma, pelo auxílio em alguns experimentos, pela verdadeira amizade, pelo apoio em vários momentos e pelo grande exemplo de determinação.

À Cândida Kassuya pela amizade e importante auxílio em alguns experimentos.

À Bettina T. Heckert pelo valioso auxílio nos experimentos de Western Blot.

Aos demais colegas do Laboratório do Óxido Nítrico, atuais e do passado: Ângela Cristina Bet, Carla Charão, Edir Rezende, Márcia Terluk, Rafael L. Prim, Renata S.A. Costa e Geisson Nardi, pela agradável convivência, amizade e companheirismo, tornando-se pessoas muito importantes na minha vida. Valeu mesmo!

A todos os colegas de departamento, mas principalmente aos amigos do time de Futebol da Farmacologia, que ao longo destes anos nunca deixaram de me convidar para os jogos, mesmo ficando evidente a minha falta de habilidade com a bola.

Aos colegas de apartamento, atuais e do passado, Renato Donizete, Rafael Mendes, Carlos Henrique, Juliano Carrer, Luis Antônio Hack, pela grande amizade e harmoniosa convivência.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia pela ajuda prestada.

À Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA (São Paulo, Brasil) pela doação de boa parte da heparina utilizada em nos nossos experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	-Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico .....	<b>02</b>
<b>Tabela 2</b>	-Subunidades da guanilato ciclase solúvel em humanos.....	<b>08</b>
<b>Tabela 3</b>	-Efeito da injeção de LPS na pressão arterial e na frequência cardíaca de ratos.....	<b>39</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 01</b>	-Sobrevida de ratos após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>37</b>
<b>Figura 02</b>	-Temperatura corporal de ratos após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>38</b>
<b>Figura 03</b>	-Concentração plasmática de nitrato e nitrito (NO <sub>x</sub> ) no plasma de ratos endotoxêmicos.....	<b>39</b>
<b>Figura 04</b>	-Efeitos da fenilefrina na pressão arterial média de ratos tratados com LPS ou PBS.....	<b>40</b>
<b>Figura 05</b>	- Pressão arterial média e frequência cardíaca mensurada em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>41</b>
<b>Figura 06</b>	- Concentrações plasmáticas de NO <sub>x</sub> de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>42</b>
<b>Figura 07</b>	-Efeitos da fenilefrina e angiotensina II sobre a pressão arterial média de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>43</b>
<b>Figura 08</b>	Registros da pressão arterial média de ratos anestesiados mostrando os efeitos da fenilefrina em animais falso-operado e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>44</b>
<b>Figura 09</b>	-Elevação da concentração de nitrato/nitrito (NO <sub>x</sub> ) no plasma e de cGMP no pulmão de ratos endotoxêmicos e sua inibição pelo tratamento com L-NAME.....	<b>45</b>
<b>Figura 10</b>	-Efeito do LPS na resposta vasodilatadora a doadores de NO.....	<b>47</b>
<b>Figura 11</b>	-Produção de cGMP em resposta a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com nitroprussiato de sódio em pulmão ou aorta de ratos injetados com PBS ou LPS.....	<b>48</b>
<b>Figura 12</b>	-Efeitos do nitroprussiato de sódio sobre a pressão arterial média de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>49</b>

<b>Figura 13</b>	-Produção de cGMP em resposta a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com nitroprussiato de sódio em pulmão ou aorta de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>47</b>
<b>Figura 14</b>	-Efeito do L-NAME nas alterações da resposta vasodilatadora e da produção de cGMP a doadores de NO induzidas pela injeção de LPS.....	<b>51</b>
<b>Figura 15</b>	-Efeito do LPS nos níveis de mRNA e proteína para sGC em pulmão de ratos.....	<b>53</b>
<b>Figura 16</b>	-Avaliação dos níveis da proteína sGC em pulmão de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>54</b>
<b>Figura 17</b>	-Efeito do azul de metileno na hiporeatividade à fenilefrina induzida por LPS.....	<b>56</b>
<b>Figura 18</b>	-Efeito do azul de metileno na hiporeatividade à fenilefrina e angiotensina II em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>58</b>
<b>Figura 19</b>	-Efeitos do azul de metileno sobre a a pressão arterial média e a freqüência cardíaca de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	<b>60</b>
<b>Figura 20</b>	-Avaliação do efeito do azul de metileno na sobrevivência de ratos submetidos à cirurgia de perfuração e ligadura do ceco (CLP).....	<b>62</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	- Difosfato de adenosina
AM	- Azul de metileno
ATP	- Trifosfato de adenosina
CaM	- Calmodulina
CLP	- Ligadura e perfuração do ceco
cGMP	- Monofosfato cíclico de guanosina
EDRF	- Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: <i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i> )
EPM	- Erro padrão da média
GTP	- Trifosfato de guanosina
HSP	- Proteína de choque térmico (do inglês: <i>heat shock protein</i> )
IBMX	- Isobutil-metil-xantina
IFN	- Interferon
GTN	- Trinitrato de glicerila
IL-1	- Interleucina-1
i.p.	- Intraperitoneal
L-NAME	- L-nitro-arginina-metil-éster
LPS	- Lipopolissacarídeo bacteriano
mRNA	- RNA mensageiro
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NO	- Óxido nítrico
NO <sup>-</sup>	- Ânion nitroxil
NO <sup>+</sup>	- Cátion nitrosônio
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- Íon Nitrito
NOS	- Óxido nítrico sintase
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	- Ânion superóxido
ONOO <sup>-</sup>	- Ânion peroxinitrito
PBS	- Salina tamponada com fosfato
RPASMC	- Células musculares lisas de artéria pulmonar de ratos

sGC	- Guanilato ciclase solúvel
SH-	- Sulfidrina
SNAP	- S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
SNP	- Nitroprussiato de sódio
TNF- $\alpha$	- Fator de necrose tumoral- $\alpha$

## RESUMO

O choque séptico é um estado de perfusão tecidual inadequada iniciado por produtos microbianos e caracterizado por queda da pressão sanguínea, sinais bioquímicos de déficit de oxigênio, danos vasculares, hiporreatividade a vasoconstritores e coagulação intravascular disseminada, que pode conduzir à disfunção múltipla de órgãos e à morte. Neste trabalho, nós avaliamos a importância e a relação entre a produção excessiva de NO pela NOS-2, a funcionalidade da enzima guanilato ciclase solúvel e as alterações cardiovasculares que acontecem durante a sepse. Após a injeção de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS, 12,5 mg/kg, i.p.) ou o procedimento cirúrgico de ligadura e perfuração do ceco (CLP), os animais apresentam um prejuízo de 50% na resposta a vasoconstritores (fenilefrina e angiotensina II). O procedimento de CLP causou queda progressiva na pressão arterial e taquicardia nos momentos iniciais. Tanto a injeção de LPS como a cirurgia de CLP causaram um aumento expressivo nos níveis plasmáticos de nitrato/nitrito. Portanto, ambos os modelos reproduzem algumas características da sepse humana. Além do aumento do NO, ocorreu um aumento na produção de cGMP. O tratamento com inibidor não-seletivo das NOS (L-NAME) impediu o aumento da produção de ambos, bem como a instalação da hiporeatividade vascular, mostrando assim uma relação entre NO, sGC e hiporeatividade a vasoconstritores. Para estudar a funcionalidade da enzima guanilato ciclase, foi avaliada a resposta vasodilatadora a doadores de NO. Os animais apresentaram um prejuízo na resposta vasodilatadora nas primeiras 8-12 horas após a indução do quadro endotóxico/séptico, sugerindo que nesse período ocorra um prejuízo na funcionalidade da enzima sGC. Avaliamos então a produção de cGMP pela sGC após estímulo com nitroprussiato de sódio (SNP, 10  $\mu$ M, 10 min). A incubação de pulmões ou aortas retirados de animais controles com SNP *in vitro*, elevou em 10 e 20 vezes os níveis de cGMP, respectivamente. Entretanto, nos mesmos tecidos de animais injetados 8 horas antes com LPS, o SNP não aumentou os níveis de cGMP. Em contraste, o acúmulo de cGMP induzido por SNP nos tecidos de animais injetados com LPS 24 horas antes foi similar ao controle. Em tecidos de animais submetidos ao CLP 12 horas antes, o SNP falhou em aumentar os níveis de cGMP. Já o acúmulo de cGMP induzido por SNP nos tecidos de animais submetidos ao CLP 24 ou 48 horas antes foi semelhante àquele obtido em preparações de animais controle. Para avaliar se o prejuízo na resposta da guanilato ciclase sensível ao NO foi consequência da redução do conteúdo protéico, avaliou-se os níveis de mRNA (através de RT-PCR) e da proteína (*Western Blot*) sGC após a injeção de LPS. Nos pulmões obtidos de ratos injetados com LPS 8 horas antes, os níveis de mRNA para a subunidade  $\alpha$ 1

permaneceram inalterados, mas aumentaram em aproximadamente 50% 24 horas após a injeção de LPS. Os níveis de mRNA para subunidade  $\beta 1$  apresentaram um aumento já em 8 horas, que foi mais expressivo 24 horas após a injeção de LPS. A injeção de LPS causou uma redução nos níveis da guanilato ciclase no tempo de 8 horas, mas por outro lado, os níveis da proteína foram similares ao controle 24 horas após o LPS. O azul de metileno foi capaz de reverter a perda da resposta à fenilefrina nos animais injetados com LPS 2 ou 24 horas antes, falhando entretanto em reverter a hiporeatividade nos animais injetados 8 horas antes. O padrão de resposta nos animais CLP foi similar, o azul de metileno foi capaz de reverter a hiporeatividade tanto à fenilefrina como à angiotensina II em animais submetidos ao CLP 24 ou 48 horas antes, entretanto falhou completamente em animais submetidos ao CLP 12 horas antes. Assim, a falha do azul de metileno em melhorar a resposta da fenilefrina coincide com a perda da resposta vasodilatadora a doadores de NO, com o prejuízo na produção de cGMP induzido por SNP e com uma redução nos níveis da proteína sGC. Finalmente, avaliamos o efeito do azul de metileno, administrado em diferentes tempos, na mortalidade dos animais submetidos ao CLP. O índice de mortalidade geral no grupo CLP que recebeu salina foi 25%. Quando o azul de metileno foi administrado 8 horas após o CLP, a mortalidade dos animais piorou nos momentos iniciais mas, apesar disso, o valor ao final foi semelhante ao grupo controle (10%). Entretanto, no grupo que recebeu azul de metileno 20 horas após a cirurgia a taxa de sobrevivência foi de 55%. Portanto, a falha do azul de metileno em reverter a hipotensão e hiporeatividade a vasoconstritores, parece ser decorrência do prejuízo na funcionalidade da enzima sGC, e a retomada da resposta parece resultar da síntese *de novo* da enzima. Assim, a responsividade diferencial da sGC durante o curso da sepse pode determinar o sucesso ou a falha da terapia com inibidores da enzima. Nossos dados sugerem que o azul de metileno é útil em estágios tardios da sepse, exatamente quando a maioria das demais alternativas terapêuticas falha. Portanto, o azul de metileno pode ser uma estratégia terapêutica útil se administrado em uma janela correta de oportunidade.

## ABSTRACT

Overproduction of nitric oxide (NO) is the one of the most important elements involved in hypotension and hyporesponsiveness to vasoconstrictors, which are hallmarks of sepsis and septic shock. Activation of soluble guanylate cyclase (sGC) accounts for several of NO effects. In spite of being of potential importance as an effective therapeutic strategy for septic shock treatment, sGC inhibition is still controversial. In this study we have attempted to evaluate the importance and relationship between excessive NO production by NOS-2 and soluble guanylate cyclase functionality, as well as the efficacy of methylene blue in reversing cardiovascular changes during septic shock. Either lipopolysaccharide (LPS) injection or cecal ligation and puncture (CLP) procedure increased plasma NO<sub>x</sub> levels. Additionally, animals had their pressor responses to vasoconstrictors reduced by 50% when compared to controls, thus reproducing an important finding of human septic shock. First, we used NO donors as pharmacological tools to activate sGC enzyme and increase cGMP production, with the consequent vasodilation and reduction in MAP. The vasodilatory response NO to donors was reduced in animals injected with LPS 8 h earlier, but was similar to control values in rats injected with LPS 2 or 24 h earlier. Sodium nitroprusside (SNP; 100 μM) increased cGMP levels in lungs harvested from normal rats or those injected with LPS 24 h before. However, SNP failed to increase lung cGMP levels of rats treated with LPS 8 h before. Similarly, SNP failed to change cGMP levels in lungs from animals submitted to CLP surgery 12 h, but in rats submitted to CLP surgery 24 or 48 hours earlier, SNP led to a 10-fold increase in cGMP levels (similar to control rats). In lungs obtained from rats injected with LPS 8 h earlier, sGC α1 subunit mRNA levels remained unchanged compared with control animals but were increased 24 h after LPS. Levels of β1 subunit mRNA were increased 8 and 24 h after LPS. With regard to sGC protein levels, LPS caused a reduction 8 h after its injection, whereas 24 h later, enzyme levels were similar to those of control animals. Methylene blue (MB, a sGC inhibitor, 15 μmol/kg, i.v.) restored the reactivity to phenylephrine in rats injected with LPS 24 h earlier, but failed to do so in animals injected with LPS 8 h earlier. When MB was injected shortly before phenylephrine or angiotensin II at 24 or 48 h after CLP surgery, the responsiveness to the vasoconstrictors was restored to values similar to those obtained in control animals. On the other hand, MB failed to restore vascular responsiveness in animals submitted to CLP 12 hour earlier. Thus, the refractoriness in MB effect in hyporeactivity to Phe at 8 h was mirrored by decreased GC activity and protein levels. The mRNA levels to GC increased 24 h after LPS (~50%). Thus, the recovery in sGC activity 24 h after LPS appears to be due to expression of new sGC protein. To evaluate MB effect in mortality, animals were submitted to cecal ligation and puncture (CLP, a model of

sepsis). When MB was given 8 h after CLP, survival rate was reduced (CLP 25%; CLP+MB 8 h 10%, n=20). In rats which received MB 20 h after the surgery, survival was significantly improved (CLP 25%; CLP+MB 20 h 55%, n=20). Therefore, differential responsiveness to soluble guanylate cyclase during the course of sepsis may determine the success or failure of therapy with guanylate cyclase inhibitors. Interestingly, MB is effective at later stages of sepsis, when other therapeutic alternatives usually meet with failure. Thus, MB may be a useful therapeutic strategy if administered within the proper window.

# SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de Abreviaturas.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
<b>I – Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1 Sepses.....	2
1.2 Fisiopatologia da sepsis.....	3
1.3 Sepsis e óxido nítrico.....	5
1.4 Guanilato ciclase.....	7
1.4.1 Estrutura da guanilato ciclase solúvel .....	8
1.4.2 Isoformas e distribuição tecidual .....	10
1.4.3 Ativação da guanilato ciclase pelo óxido nítrico.....	11
1.4.4 Localização subcelular.....	12
1.5 cGMP e sinalização intracelular .....	14
1.6 Sepsis e Guanilato ciclase.....	16
<b>II – Objetivos.....</b>	<b>19</b>
2.1 Hipótese.....	20
2.2 Objetivos gerais.....	20
2.3 Objetivos específicos.....	20
<b>III – Material e Métodos.....</b>	<b>22</b>
3.1. Animais.....	23
3.2. Procedimentos experimentais.....	23
3.2.1 Avaliação da pressão arterial em ratos.....	23
3.2.2 Indução do quadro de endotoxemia.....	25
3.2.3 Indução do quadro de septicemia através da ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	25
3.2.4 Dosagem de nitrato e nitrito (NO <sub>x</sub> ).....	25
3.2.5 Dosagem de cGMP .....	26
3.2.6 RT-PCR.....	27

<b>3.2.7</b>	Imunoeletroforese para guanilato ciclase solúvel .....	28
3.3	Protocolos experimentais - parte 1.....	29
<b>3.3.1</b>	Avaliação dos efeitos da fenilefrina em ratos endotoxêmicos.....	29
<b>3.3.2</b>	Avaliação do envolvimento da via óxido nítrico/guanilato ciclase na instalação e manutenção da hiporresponsividade à fenilefrina em ratos endotoxêmicos.....	29
<b>3.3.3</b>	Avaliação dos efeitos vasodilatadores de doadores de óxido nítrico em ratos endotoxêmicos.....	30
<b>3.3.4</b>	Avaliação da produção de cGMP em resposta a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com nitroprussiato de sódio em pulmão ou aorta de ratos endotoxêmicos.....	30
<b>3.3.5</b>	Análise do padrão de expressão da enzima guanilato ciclase solúvel em ratos endotoxêmicos através de RT-PCR e imunoeletroforese.....	31
<b>3.3.6</b>	Inibição da enzima guanilato ciclase solúvel em ratos endotoxêmicos.....	31
3.4	Protocolos experimentais - parte 2.....	31
<b>3.4.1</b>	Determinação da letalidade do modelo de ligadura e perfuração do ceco em ratos.....	32
<b>3.4.2</b>	Avaliação das alterações cardiovasculares em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	32
<b>3.4.3</b>	Avaliação da temperatura corporal em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	32
<b>3.4.4</b>	Avaliação da produção de cGMP em resposta a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com nitroprussiato de sódio em pulmão ou aorta de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	33
<b>3.4.5</b>	Análise do padrão de expressão da enzima guanilato ciclase solúvel em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco através de RT-PCR e imunoeletroforese.....	33
<b>3.4.6</b>	Avaliação dos efeitos do azul de metileno sobre as alterações cardiovasculares em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	33
<b>3.4.7</b>	Avaliação do efeito do azul de metileno na sobrevivência de ratos submetidos à cirurgia de perfuração e ligadura do ceco.....	34

3.5	Compostos e reagentes utilizados.....	34
3.6.	Análise dos resultados e testes estatísticos.....	35
<b>IV</b>	<b>– Resultados</b> .....	<b>36</b>
4.1.	Caracterização do índice de mortalidade em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	37
4.2.	Caracterização da produção de óxido nítrico e alterações cardiovasculares em modelos de sepse experimental.....	38
4.3.	Caracterização do envolvimento da via óxido nítrico/guanilato ciclase na hiporeatividade a fenilefrina em ratos endotoxêmicos.....	45
4.4.	Avaliação da funcionalidade da enzima guanilato ciclase solúvel em modelos de sepse experimental.....	46
4.5	Caracterização do envolvimento do óxido nítrico nas alterações da funcionalidade da enzima guanilato ciclase solúvel induzidas pela injeção de LPS.....	51
4.6	Avaliação do perfil de expressão da enzima guanilato ciclase solúvel .....	52
4.7	Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel na hiporeatividade a vasoconstritores em modelos de sepse experimental.....	55
4.8	Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a hipotensão e taquicardia induzidas em ratos pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	59
4.9	Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a mortalidade de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	61
<b>V</b>	<b>– Discussão</b> .....	<b>63</b>
<b>VI</b>	<b>– Conclusões</b> .....	<b>94</b>
<b>VII</b>	<b>– Referências Bibliográficas</b> .....	<b>96</b>

# INTRODUÇÃO

---

## 1.1 Sepses

Por tratar-se de uma resposta inflamatória sistêmica com possibilidade de evolução para quadros clínicos cujos sintomas e sinais diferem muito à medida que a doença evolui, em 1991 foram estabelecidos critérios para a classificação de sepses e doenças similares na Conferência de Consenso feita pelo *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine* (Bone *et al.*, 1992). O termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *systemic inflammatory response syndrome*) foi desenvolvido para implicar a resposta clínica originada de uma agressão não séptica. Além disso, ficou estabelecido também que o termo sepses deveria ser utilizado apenas nos casos onde a infecção é documentada (Tabela 1). Esta medida foi necessária para adequação do tratamento à fase de evolução da síndrome em que o paciente se encontra.

**Tabela 1:** Definições de SIRS, sepses, sepses graves e choque séptico

---

**Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS):** trata-se de um conjunto de sinais e sintomas que traduz a reação do organismo a uma variedade de agressões graves, como grandes queimaduras e pancreatite, que ocorre necessariamente na ausência de infecção. A presença de dois ou mais dos seguintes sintomas definem SIRS: a) temperatura  $>38^{\circ}\text{C}$  ou  $< 36^{\circ}\text{C}$ ; b) frequência cardíaca  $> 90$  bpm; c) frequência respiratória  $> 20$  movimentos/minuto; d) leucometria  $> 12.000/\text{mm}^3$  ou  $< 4.000/\text{mm}^3$  ou ainda, presença de  $>10\%$  de bastonetes.

---

**Sepses:** é considerado séptico todo paciente que apresente os sinais e sintomas descritos acima (SIRS) secundários a um processo infeccioso.

---

**Sepses Graves:** sepses associada à disfunção orgânica. As principais disfunções orgânicas são: a) cardiovascular; b) respiratória; c) renal; e) hematológica; e f) sistema nervoso central.

---

**Choque séptico:** Situação em que o paciente com quadro de sepses graves desenvolve hipotensão arterial refratária à reposição volêmica, necessitando de drogas vasopressoras para estabilizar a pressão arterial.

---

Após 14 anos da publicação original deste consenso (Bone *et al.*, 1992) onde a sepses foi finalmente, mas não definitivamente definida (Bone *et al.*, 1992; Dellinger *et al.*, 2004), o número de casos desta enfermidade ainda não diminuiu, pelo contrário, continua aumentando. Estimativas indicam um total de 750.000 casos de sepses por ano nos Estados Unidos da América, com um índice de mortalidade acima de 50% (Angus *et al.*, 2001). Um estudo epidemiológico recente de sepses no Brasil

mostrou que os dados nacionais são igualmente alarmantes. A incidência de sepse grave e choque séptico situam-se em 27 e 23%, respectivamente, e a taxa de mortalidade global foi de 22%, sugerindo que a sepse é o maior problema de saúde pública nas unidades de terapia intensiva do país (Silva *et al.*, 2004).

Metade dos casos de sepse é causada por bactérias gram negativas, e metade destes casos é associada com cultura de sangue positiva (Wenzel, 1988). Choque séptico é uma complicação de pelo menos 50-60 % das bacteremias gram negativas e 5-10 % de bacteremias gram positivas ou causadas por fungos (Parrillo *et al.*, 1990). A alta incidência se deve em parte ao aumento da expectativa de vida de idosos e pacientes com enfermidades graves, associado ao emprego descontrolado da antibioticoterapia (responsável pelo aumento do número de bactérias resistentes), ao maior no número de procedimentos invasivos e ao aumento do número de pacientes imunodeprimidos (Niederman *et al.*, 1990; Rangel-Frausto, 2005).

## 1.2 Fisiopatologia da sepse

O choque séptico é considerado um agravamento do quadro de sepse, resultante de uma descompensação hemodinâmica que ocorre na presença de agentes infecciosos e mediadores inflamatórios na circulação sangüínea (Hollenberg *et al.*, 2004). Primariamente trata-se de uma forma de choque distributivo, caracterizado por uma incapacidade de fornecimento de oxigênio aos tecidos, associado a uma vasodilatação periférica inadequada, a qual ocorre apesar do débito cardíaco estar preservado ou até mesmo aumentado (Parrillo *et al.*, 1990). Embora muitos pacientes acabem morrendo nos estágios iniciais da doença, em um grande número de casos estas alterações hemodinâmicas evoluem gradualmente para um estado hipodinâmico, estágio tardio do choque, caracterizado por baixa resistência vascular periférica e hiporeatividade a vasoconstritores. Mesmo após a restauração do volume intravascular, a microcirculação permanece diminuída e a persistência desta anormalidade resulta na má distribuição do débito cardíaco (Ince e Sinnasappel, 1999).

As manifestações clínicas vistas no choque séptico são o resultado de uma resposta excessiva do hospedeiro à infecção. Além das alterações hemodinâmicas descritas acima, uma enorme variedade de tipos celulares, bem como mediadores

inflamatórios, estão envolvidos na patogênese do choque séptico. Citocinas pró-inflamatórias são liberadas na circulação sanguínea levando à ativação de células como neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais. Aliado a isso, ocorre ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas como o complemento, a coagulação e o sistema fibrinolítico. Mediadores lipídicos como eicosanóides e fator de ativação plaquetária, bem como radicais de oxigênio e nitrogênio são produzidos e liberados (Beishuizen *et al.*, 1998).

Os fatores desencadeantes da ativação celular e da cascata de eventos plasmáticos são principalmente os componentes da parede celular dos microorganismos, como o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanas, derivados de bactérias Gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias Gram-negativas (endotoxinas). O LPS e as exotoxinas são liberados normalmente durante a replicação da bactéria e/ou como consequência da sua morte, devido à lise da parede celular. A importância do LPS como fator desencadeador da sepse foi demonstrada após sua administração em humanos saudáveis, com reprodução de alterações hemodinâmicas observadas em pacientes com sepse e em modelos experimentais (Suffradin *et al.*, 1989).

O LPS ativa as células fagocíticas através dos receptores Toll-like (TLR-4) complexados à proteína ligadora de LPS e CD14. Vários tipos de receptores TLR foram identificados (TLR-1 a 11) e também sua afinidade específica (por exemplo, TLR-2 que traduz sinais de bactérias gram-positivas e de LTA). Após a ativação destes receptores ocorre o recrutamento de várias proteínas citoplasmáticas acessórias, tais como a proteína adaptadora MyD88 e o receptor para IL-1 associado à quinase (IRAK). O recrutamento destas proteínas acessórias causa auto-fosforilação das mesmas e conseqüentemente ocorre a ativação do TRAF-6 (do inglês, *TNF-receptor activated factor-6*). Este, por sua vez, causa a ativação de várias proteínas, tais como p38, JNK e IKK $\alpha/\beta$ , cujas ações convergem para ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Sherwood, 2004).

É a complexa interação entre os diferentes mediadores inflamatórios e as alterações hemodinâmicas observadas durante o choque séptico que dificulta o tratamento desta patologia, sendo este um dos motivos pelos quais o manejo do paciente em choque não sofreu alterações substanciais nas duas últimas décadas. A

manobra terapêutica prioritária tem sido a manutenção da pressão arterial e do débito cardíaco, através de reposição de líquido e utilização de agentes inotrópicos e vasopressores (Wheeler e Bernard, 1999). Em seguida, busca-se a identificação e eliminação do foco infeccioso através da utilização de antibióticos e em casos extremos, a remoção cirúrgica (Hollenberg *et al.*, 2004).

### 1.3 Seps e óxido nítrico

O NO é sintetizado a partir de oxigênio molecular e do aminoácido L-arginina, por um grupo de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS). Existem pelo menos três isoformas de NOS. Cada isoforma é produto de um gene distinto. A NOS-1, também chamada de neuronal é encontrada em altos níveis em neurônios, bem como em tecidos não neuronais. Esta isoforma é ativada pela calmodulina requerendo concentrações micromolares de cálcio (0,1 a 1  $\mu\text{M}$ ). A NOS-2, também conhecida como óxido nítrico sintase induzida (iNOS), uma vez que sua expressão pode ser induzida após ativação de células como o músculo liso, macrófago e célula endotelial, por bactérias (gram-negativas e gram-positivas), lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) e citocinas pró-inflamatórias (IL-1, interferon, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ). Esta enzima requer concentração nanomolar de cálcio (100 nM, concentração equivalente ao nível basal intracelular) e por isso é classificada como independente de cálcio (Alderton *et al.*, 2001). A NOS-3, também chamada de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), foi a enzima originalmente encontrada como responsável pela produção do fator relaxante derivado do endotélio (Furchgott e Zawadzki, 1980). Semelhante à NOS-1, a NOS-3 é também ativada pela elevação dos níveis de cálcio e pela ligação com a calmodulina.

Outra importante diferença entre as NOS, além das concentrações de cálcio requeridas pelas enzimas, está relacionada com a sua atividade catalítica (produção de NO). As enzimas NOS-1 e NOS-3 (chamadas de constitutivas) produzem e liberam NO em quantidade nanomolar por curto período de tempo (segundos a minutos), em resposta à interação de agonistas, tais como a acetilcolina, bradicinina e histamina, via receptores acoplados à proteína G na membrana plasmática, e ainda por estímulos físicos, como o estresse de cisalhamento causado pela circulação sanguínea. A NOS-2 produz e libera grandes quantidades de NO, na

ordem de micromolar, durante longos períodos quando comparado às NOS constitutivas, e geralmente estão associadas aos efeitos citotóxicos e às ações que promovem as patologias vasculares (Alderton *et al.*, 2001).

Existe um número substancial de evidências indicando que o NO é um dos principais efetores na sepse e no choque séptico (Beishuizen *et al.*, 1998; Titheradge, 1999; Parratt, 1998; Feihl *et al.*, 2001; Fleming *et al.*, 1991). Os níveis plasmáticos e teciduais de nitrito+nitrato (NOx; os metabólitos estáveis do NO) aumentam tanto em humanos quanto animais em sepse e em choque séptico (ver por exemplo, Ochoa *et al.*, 1991; Nava *et al.*, 1992; Evans *et al.*, 1993). Outra importante linha de evidência da relevância do NO derivado da NOS-2 no choque séptico veio de observações de que vários sintomas desta condição são atenuados quando são utilizados inibidores de NOS. Os inibidores da NOS normalizam a queda da pressão arterial (Kilbourn *et al.*, 1990), aumentam a sobrevivência (Wu *et al.*, 1995) e atenuam a falência de múltiplos órgãos e a falência circulatória na sepse experimental em ratos (Wu *et al.*, 1996). Mais recentemente, o papel do NO derivado da NOS-2 na sepse foi reforçado pela demonstração que camundongos *knockout* para o gene da NOS-2 respondem melhor a vasoconstritores e sobrevivem mais em modelos relevantes de sepse (MacMicking *et al.*, 1995; Kilbourn *et al.*, 1997; Hollemberg *et al.*, 2000). Há uma grande quantidade de dados implicando o NO como um mediador chave nos desarranjos cardíacos, vasculares, renais e pulmonares da sepse e do choque séptico (veja por exemplo, Parratt, 1998; Rees, 1995; Schwartz e Blantz, 1999; Vincent *et al.*, 2000).

Apesar do consenso na literatura a respeito do papel do NO na hiporeatividade a vasoconstritores e na alteração da função cardíaca vistas na sepse e no choque séptico (Quezado e Natanson, 1992; Julou-Schaeffer *et al.*, 1990; Gray *et al.*, 1990; Vallance *et al.*, 1992; Cai *et al.*, 1996), os mecanismos moleculares destas alterações permanecem, na sua maior parte, desconhecidos. Vários dos efeitos do NO (notadamente os chamados “efeitos fisiológicos”, tais como vasodilatação e neurotransmissão) são mediados pela ativação da guanilato ciclase solúvel e formação de GMP cíclico (revisado em Krumenacker *et al.*, 2004). Mais recentemente tem se tornado aparente que outros mecanismos podem ser importantes efetores de várias das ações do NO. Estes mecanismos incluem a

ativação anormal de canais de potássio (Miyoshi e Nakaya, 1994; Hall *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1998), a formação de nitrosotíóis (Foster *et al.*, 2003; Gaston *et al.*, 2003) e de produtos resultantes da reação do NO com espécies reativas de oxigênio, particularmente o ânion superóxido (Beckman *et al.*, 1990).

#### 1.4 Guanilato ciclase

A guanilato ciclase solúvel (sGC), principal enzima responsável pela conversão enzimática de guanosina-5'-trifosfato (GTP) para guanosina-cíclica-3',5'-monofosfato (cGMP), foi identificada em células de mamíferos quase quatro décadas atrás (Hardman e Sutherland, 1969; Ishikawa *et al.*, 1969; Schultz *et al.*, 1969 e Whitte e Aurbach, 1969). No final da década de 70, o óxido nítrico (NO) foi descoberto como potente ativador da sGC, sugerindo que uma ampla classe de compostos que continham NO induziam a formação de cGMP via um mecanismo comum (Gruetter *et al.*, 1979). Nessa época achava-se que a biossíntese de NO era um processo restrito a bactérias e a significância destas observações na fisiologia de mamíferos não foi apreciada por muitos anos. A descoberta do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelial-derived relaxant factor*) e sua identificação como óxido nítrico (NO; Palmer *et al.*, 1987), não somente mostrou que as células dos mamíferos são capazes de sintetizar este composto inorgânico, mas também identificou o ativador endógeno da sGC. Assim era caracterizado o sistema de transdução NO-sGC-cGMP.

Esta enzima é designada solúvel ou citosólica para distingui-la da outra forma que se encontra ligada à membrana plasmática, por isso chamada de particulada e ativada por peptídeos natriuréticos (revisado em Hofmann *et al.*, 2000). Atualmente alguns grupos de pesquisa propõem a mudança desta nomenclatura, já que recentemente a guanilato ciclase “solúvel” foi encontrada associada à membrana celular (discutido na seção 1.4.4). A sugestão mais recente é de classificar a enzima de guanilato ciclase como sensível ou insensível ao óxido nítrico (Friebe e Koesling, 2003).

### 1.4.1 Estrutura da guanilato ciclase solúvel

#### *Subunidades $\alpha$ e $\beta$ .*

A guanilato ciclase solúvel é um heterodímero, composto por duas subunidades diferentes chamadas  $\alpha$  e  $\beta$ . A purificação de sGC de mamíferos identificou quatro diferentes subunidades ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$  e  $\beta_2$ , Koesling *et al.*, 2004; ver Tabela 2), sendo cada uma delas produto de genes distintos. Embora tenha sido demonstrado a existência de subunidades  $\alpha_3$  e  $\beta_3$ , hoje sabe-se que elas representam variantes da subunidade  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ , ao invés de diferentes isoformas (Zabel *et al.*, 1998).

Estruturalmente as subunidades  $\alpha$  e  $\beta$  da sGC são constituídas de um domínio catalítico ciclase C-terminal, uma região de dimerização central e um segmento N-terminal, onde se encontra o grupamento heme (Esquema 1; Schulz *et al.*, 1999; Foster *et al.*, 1999). A guanilato ciclase particulada difere da forma solúvel, por ser um homômero e possuir, além do sítio catalítico carboxi-terminal e a região de dimerização, um domínio de homologia proteína quinase, um segmento transmembrana e uma porção extracelular para ligação de enterotoxinas e peptídeos como o peptídeo natriurético atrial (Winqvist *et al.*, 1984).

**Tabela 2.** Subunidades da guanilato ciclase solúvel em humanos.

Subunidade	Distribuição tecidual	Localização no cromossomo
$\alpha_1$	Ubíqua	4q31.3-q33
$\alpha_2$	Cérebro, retina, rim, placenta, pâncreas, baço	11q21-q22
$\beta_1$	Ubíqua	4q31.3-q33
$\beta_2$	Rim, fígado	13q14.3

#### *Domínio N-terminal (domínio de ligação do grupo heme)*

A porção N-terminal da sGC exibe baixa homologia entre as isoformas e entre as diferentes espécies quando comparada com o domínio central e catalítico. A porção N-terminal de cada subunidade constitui o domínio de ligação do grupamento heme, constituído por 5 nitrogênios, os quais formam uma estrutura em anel com um

$\text{Fe}^{2+}$  posicionado centralmente. É a presença do grupamento heme que confere a sensibilidade da enzima ao NO. Este, por sua vez, reage com o grupamento heme da enzima sGC formando um complexo nitrosil-heme penta-coordenado e que, alterando a configuração do anel porfirínico, é responsável pela indução do estado ativado da enzima (Esquema 2), aumentando sua atividade catalítica (conversão de GTP em cGMP) em até 200 vezes (Humbert *et al.*, 1990; Stone e Marletta, 1994).

A oxidação do grupamento heme para o estado férrico resulta na perda da atividade da enzima. Assim, agentes redutores como tióis ou ascorbatos aumentam a atividade da enzima, provavelmente por manterem o ferro no estado reduzido e portanto facilitando a ligação do NO ao grupamento heme. Por outro lado, agentes oxidantes, como o azul de metileno, inibem a ativação da enzima (Ignarro *et al.*, 1981).

As duas subunidades são essenciais para uma adequada ligação e orientação do grupamento heme, mas a coordenação do grupamento heme é uma característica principalmente da porção N-terminal da subunidade  $\beta_1$  (Friebe *et al.*, 1997). A histidina-105 da subunidade  $\beta_1$  foi identificada como um resíduo de coordenação do grupamento heme (Wedel *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 1998). Mutação deste aminoácido acarreta a formação de uma enzima insensível ao NO mas com atividade basal intacta. Adicionalmente, duas cisteínas adjacentes à His-105 na subunidade  $\beta_1$  (Cys 78 e Cys 214) foram identificadas como tendo importante função na coordenação do grupamento heme. Mutações de resíduos equivalentes na subunidade  $\alpha_1$  não alteram a responsividade ao NO (Friebe *et al.*, 1997).

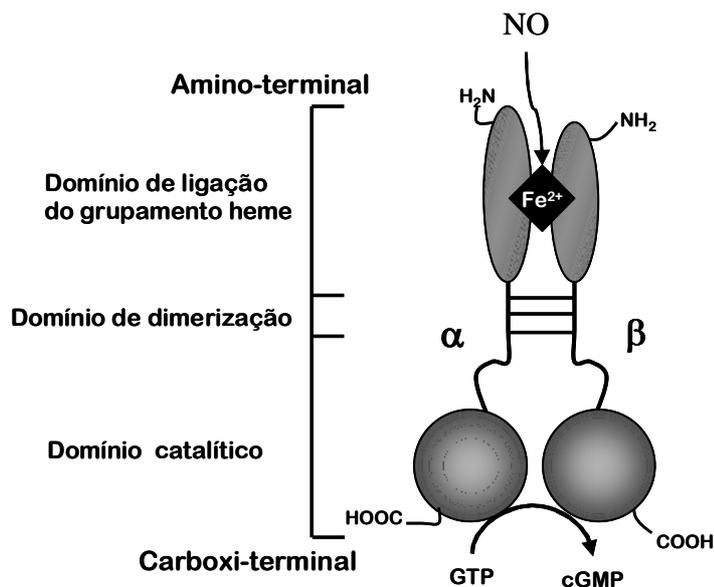
#### *Domínio catalítico*

O sítio catalítico encontra-se na porção C-terminal de cada subunidade. Esta é a região responsável pela ligação do substrato, GTP, com consequente conversão em cGMP. Esta região é bastante conservada, apresentando alto grau de homologia entre os monômeros da sGC e em relação à região C-terminal da guanilato ciclase particulada (Thorpe e Garbers, 1989; Chinkers *et al.*, 1989). Apesar do fato de ambas subunidades,  $\alpha$  e  $\beta$ , possuírem um domínio catalítico, a coexpressão das duas subunidades é necessária para a atividade ciclase (Wedel *et al.*, 1995). A conversão catalítica de GTP para cGMP exige a presença dos cátions

divalentes  $Mn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  como cofatores. A disponibilidade destes dois cátions pode modular a atividade enzimática por acentuar a ativação, bem como por aumentar a afinidade do substrato pela guanilato ciclase (Ohlstein *et al.*, 1982).

### Domínio de dimerização

Esta região é responsável pela associação das duas subunidades, evento obrigatório para a atividade catalítica. Originalmente, a região responsável pela dimerização foi sugerida como sendo similar à região que foi identificada para a guanilato ciclase particulada (Wilson e Chinkers, 1995). Trabalho recente mostrou que a região de contato entre as subunidades  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  ultrapassa 200 resíduos situando-se entre os aminoácidos 204 e 408, e que dentro desta região existem dois sítios específicos de dimerização (204-244 e 379-408; Zhou *et al.*, 2004).



**Esquema 1.** Representação esquemática da estrutura da guanilato ciclase solúvel.

### 1.4.2 Isoformas e distribuição tecidual

Estudos sobre a expressão das subunidades da sGC em diferentes tecidos são raros. Budworth e colaboradores (1999) demonstraram uma distribuição bastante difundida das subunidades  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ , corroborando assim com a idéia de que o heterodímero  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  é a forma predominante e ubiquamente expressa. Em ratos, a subunidade  $\beta_2$  é preferencialmente expressa em rins e fígado (Yuen *et al.*, 1990). É

interessante que até o momento nenhum heterodímero contendo a subunidade  $\beta_2$  foi isolado de tecidos ou células (Pyriochou e Papapetropoulos, 2005), e as propriedades funcionais da subunidade  $\beta_2$  permanecem desconhecidas, uma vez que vários grupos têm falhado na tentativa de expressar um heterodímero  $\alpha_1\beta_2$  cataliticamente ativo (Koesling *et al.*, 2004). Alguns pesquisadores acreditam que a subunidade  $\beta_2$  pode atuar como inibidor da subunidade  $\alpha_1\beta_1$  (Gupta *et al.*, 1997). A subunidade  $\alpha_2$  foi detectada inicialmente no cérebro, placenta e útero (Budworth *et al.*, 1999) e a sua co-expressão com a subunidade  $\beta_1$  gerou uma sGC com atividade similar a do heterodímero  $\alpha_1\beta_1$  demonstrando uma intercambialidade das isoformas das subunidades (Harteneck *et al.*, 1991).

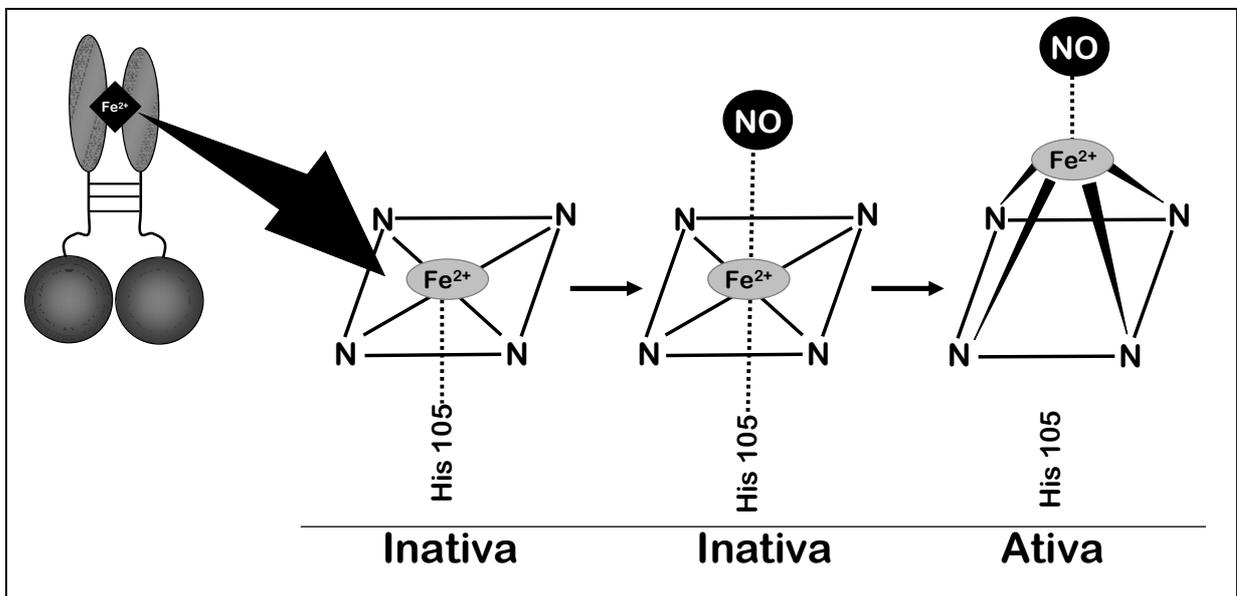
Assim, com a existência de duas subunidades  $\alpha$  e duas subunidades  $\beta$ , em teoria, poderiam existir quatro heterodímeros  $\alpha\beta$ . Entretanto, até o momento somente duas isoformas foram demonstradas: a isoforma  $\alpha_1\beta_1$ , enzima inicialmente purificada de pulmão, e a isoforma  $\alpha_2\beta_1$ , mostrada principalmente em placenta humana (Russwurm *et al.*, 1998).

#### 1.4.3 Ativação da guanilato ciclase pelo óxido nítrico

Existem vários modelos para explicar a ativação da sGC pelo NO, o mais simples deles ocorrendo em duas etapas: i) a ligação do NO na sexta posição coordenada do grupamento heme resulta em um complexo hexa-coordenado NO-Fe<sup>2+</sup>-His e ii) a cisão subsequente da ligação entre o ferro e a histidina leva à formação de um complexo nitrosil-heme penta-coordenado. A abertura da ligação entre a histidina e o ferro é considerada como gatilho para a mudança conformacional que resulta na ativação da enzima (Esquema 2).

Recentemente, um modelo mais complexo da ativação da sGC pelo NO foi sugerido. Zhao e colaboradores (1999) investigaram uma outra cinética de ativação da sGC pelo NO, e geraram dados mostrando que a transição do complexo hexa-coordenado para o penta-coordenado depende da concentração de NO presente. Isto resulta em um modelo onde o NO não ativa a enzima somente por se ligar ao grupamento heme, mas também regula a atividade através da ligação com um segundo sítio, independente do grupamento heme. Entretanto, Bellamy e colaboradores (2002), reinterpretaram os dados obtidos por Zhao, em favor do

modelo mais simples de dois estados, e declaram o sítio adicional sugerido de NO como desnecessário. Atualmente estes dois modelos são disputados por estes dois grupos (Bellamy *et al.*, 2002; Ballou *et al.*, 2002). Entretanto, ainda mais recentemente Cary e colaboradores (2005) publicaram um belo trabalho em que sugerem que concentrações fisiológicas de ATP e GTP podem modular a transição do complexo penta para o hexacoordenado, e podem modular também a taxa de dissociação do NO do grupamento heme. Assim, estes nucleotídeos podem ser incluídos em um modelo ainda mais complexo de ativação da guanilato ciclase pelo NO.



**Esquema 2.** Ativação da guanilato ciclase solúvel pelo NO (modificado de Hobbs, 1997). Ver texto para detalhes.

#### 1.4.4 Localização subcelular

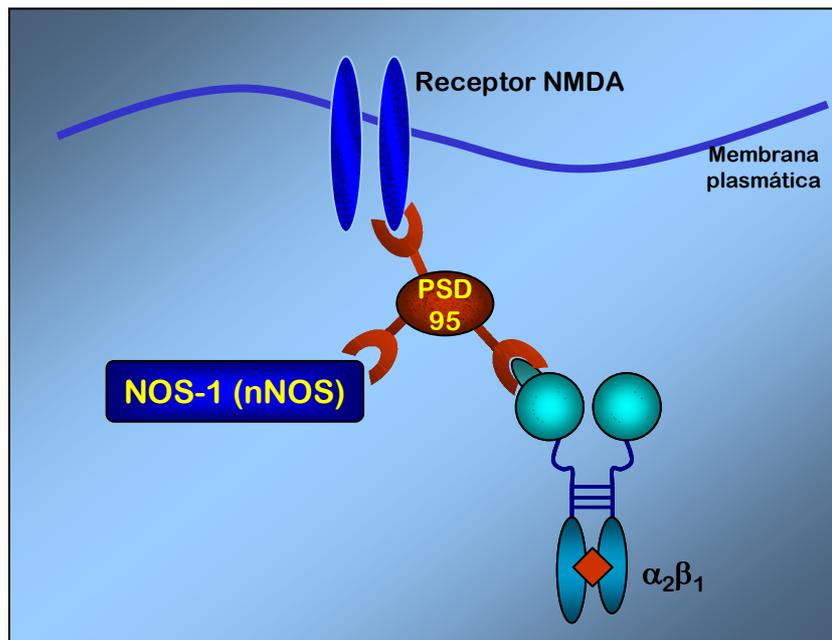
Inicialmente acreditava-se que a sGC fosse inteiramente citosólica, e por isso ela foi chamada de “solúvel”. Entretanto, algumas evidências recentes têm mudado a designação desta enzima como puramente citosólica. Em corações de rato, aproximadamente 1/5 da isoforma  $\alpha_1\beta_1$  se encontra na fração de membrana. Adicionalmente, foi demonstrado que a ativação de plaquetas ou de células endoteliais de pulmão inicia a translocação da sGC para a membrana plasmática através de uma via de sinalização envolvendo íons cálcio (Zabel *et al.*, 2002). A associação da sGC à membrana é funcionalmente importante, tornando a enzima

mais sensível ao NO, como indicado pelo deslocamento à esquerda da curva dose-resposta com doadores de NO em sGC associada à membrana versus a fração citosólica (Zabel *et al.*, 2002). Outros tecidos, incluindo córtex cerebral, glândula adrenal e músculo esquelético, também contêm sGC associada à membrana. Segundo dados publicados por Venema e colaboradores (2003), a sGC interage com a *heat shock protein 90* (HSP-90) em células vasculares endoteliais e células de músculo liso. A exposição das células endoteliais a ativadores como a bradicinina promove o recrutamento da sGC para o complexo HSP-90/NOS-3. Assim a existência de um complexo NOS-3/sGC/HSP-90 pode facilitar a transferência do NO da NOS-3 para sGC, otimizando o processo de sinalização. Entretanto, a importância fisiológica desta interação ainda é assunto de investigação e debate.

Adicionalmente à associação da isoforma  $\alpha_1\beta_1$  à membrana, como dito anteriormente, a subunidade  $\alpha_2$  da sGC pode ser encontrada na membrana fazendo interação com a proteína PSD-95 (do inglês *postsynaptic density protein-95*; Russwurm *et al.*, 2001). Por aproximar várias enzimas de sinalização, a PSD-95 é responsável pela formação de unidades de sinal de transdução (*transducisomes*; para revisão ver Garner *et al.*, 2000; Sheng e Pak, 2000). A interação da PSD-95 com outras proteínas é mediada principalmente por três domínios PDZ. Os domínios PDZ atuam como adaptadores moleculares, que na maioria dos casos interage com a porção carboxi terminal da outra proteína. Dados recentes sugerem que a PSD-95 pode interagir com vários membros da via de sinalização NO/cGMP. Um dos domínios PDZ da proteína PSD-95 interage com receptores NMDA (Kornau *et al.*, 1995), e foi achado também que um segundo domínio PDZ interage com a NOS-1 (nNOS; Brenman *et al.*, 1996). Finalmente, foi demonstrado que a isoforma  $\alpha_2\beta_1$  da guanilato ciclase “solúvel” interage com o terceiro domínio PDZ da PSD-95 (Russwurm *et al.*, 2001; Esquema 3). A importância funcional deste complexo quaternário ainda não é clara, mas ele aponta para um processo de sinalização eficiente, econômico e compartimentalizado.

Baseado em todos estes achados, a denominação de guanilato ciclase solúvel está se tornando insustentável. Assim, uma nova nomenclatura já foi sugerida, e ao invés de guanilato ciclase solúvel e particulada elas seriam chamadas

de guanilato ciclase sensível ou insensível ao NO (Russwurm e Koesling, 2002; Koesling *et al.*, 2004; Pyriochou e Papapetropoulos, 2005).



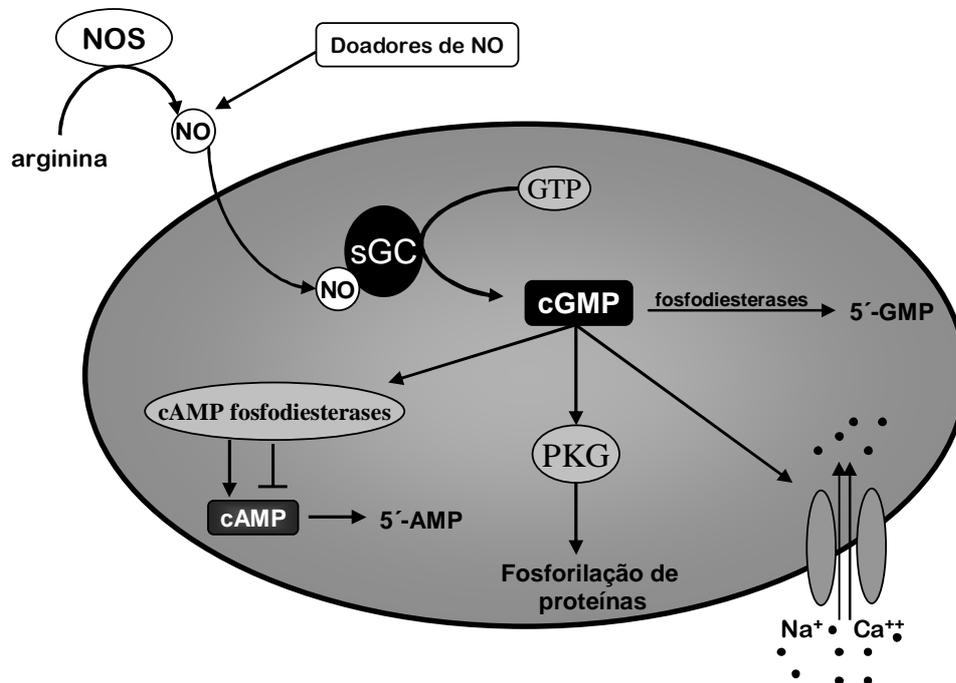
**Esquema 3.** Complexo de sinalização receptor NMDA, óxido nítrico sintase-1 (NOS-1) e guanilato ciclase “solúvel” (modificado de Koesling *et al.*, 2004).

### 1.5 cGMP e sinalização intracelular

A importância da guanilato ciclase é revelada pelo amplo espectro de eventos biológicos regulados pelo cGMP, que incluem respostas da retina a estímulos luminosos, olfato, formação de esteróides, transporte iônico nos rins e no intestino, regulação da concentração intracelular de cálcio livre (importante para a agregação plaquetária), regulação da contratilidade do músculo cardíaco, do músculo liso não-vascular e também do vascular (base para o desenvolvimento de drogas revolucionárias como o citrato de sildenafil – Viagra®). Além disso, disfunções na produção ou respostas ao cGMP estão associadas a situações patológicas, como no choque endotóxico, na diarreia secretória e na hipertensão, dentre outras (para revisão ver Schmidt *et al.*, 1993; Brioni *et al.*, 2002; Sharma, 2002)

Existem pelo menos três proteínas intracelulares receptoras para o cGMP, as fosfodiesterases (PDEs), os canais de cátions abertos por cGMP e proteínas quinase dependentes de cGMP (PKG) que pertencem a uma família de proteínas

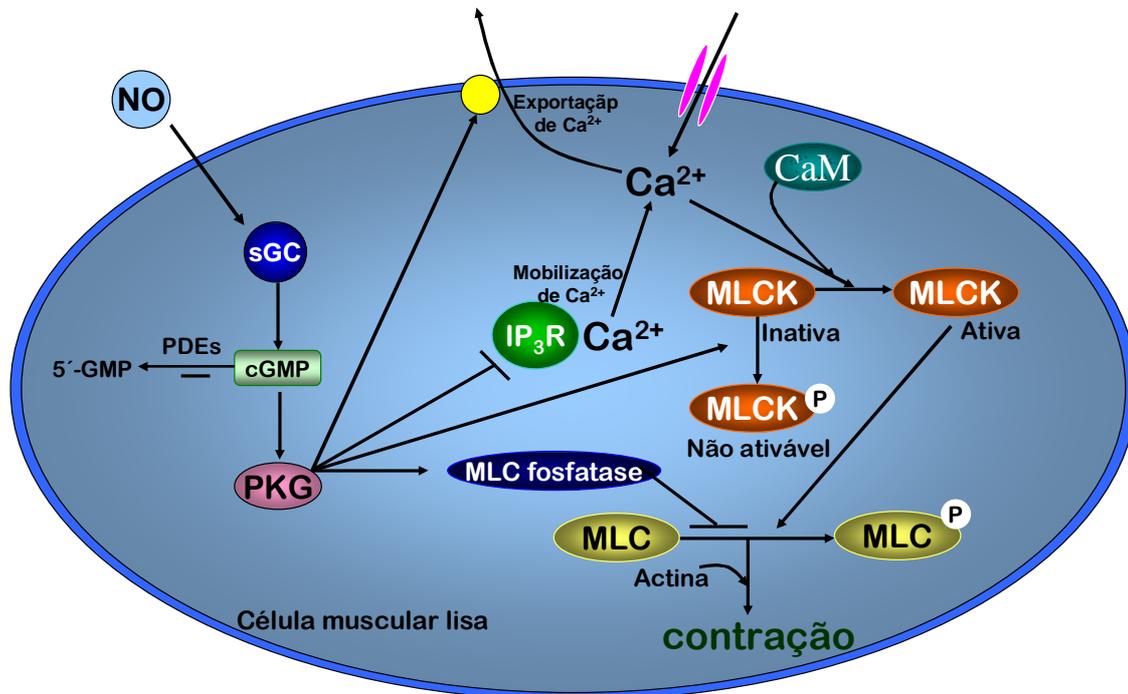
quinases serina/treonina, responsáveis por grande parte dos efeitos do cGMP (Esquema 4; para revisão detalhada ver Hofmann *et al.*, 2000; Lucas *et al.*, 2000).



**Esquema 4. Mecanismos de sinalização da via NO-sGC-cGMP.** O óxido nítrico (NO) produzido endogenamente pelas enzimas NO sintases (NOS) ou liberado a partir de doadores de NO ativa a guanilato ciclase solúvel (sGC) levando a um aumento da síntese de cGMP. Este mensageiro intracelular, por sua vez, modula a atividade da proteína quinase dependente de cGMP (PKG), canais iônicos e fosfodiesterases. Estes efetores estão envolvidos em vários processos do sistema cardiovascular e nervoso.

O tônus da musculatura lisa é regulada pelo cálcio celular, o qual ativa a miosina quinase de cadeia leve (MLCK, do inglês *myosin light chain kinase*) dependente de cálcio/calmodulina (CaM), levando à fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC, do inglês, *myosin light chain*) com conseqüente contração. A via do NO causa relaxamento por estimular a guanilato ciclase, aumentando a produção de cGMP e ativando a PKG. A PKG gera relaxamento por mecanismos que ainda não são totalmente definidos, e que podem incluir: a) redução na concentração de cálcio citosólico, tanto por um aumento na exportação de cálcio como por reduzir a mobilização de cálcio mediada por inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), b) a defosforilação da cadeia leve da miosina, por ativação de fosfatases ou pela manutenção da MLCK

em uma forma fosforilada que não é passível de ativação pela cálcio-calmodulina (para revisão ver Lucas *et al.*, 2000).



**Esquema 5.** Mecanismos de vasodilatação mediados pela via NO-sGC-cGMP. (Adaptado de Beavo e Brunton, 2002).

## 1.6 Seps e Guanilato ciclase

No que tange à seps, foi demonstrado que a inibição da guanilato ciclase restaurou a reatividade de vasos “endotóxicos” (isto é, incubados com LPS *in vitro* ou obtidos de animais injetados com LPS) à noradrenalina (Fleming *et al.*, 1991) e aumentou a pressão arterial e melhorou vários parâmetros cardiovasculares em animais sépticos (Zhang *et al.*, 1995). O primeiro trabalho estudando a inibição da guanilato ciclase na seps humana foi feito em 1992 (Schneider *et al.*, 1992). Uma infusão de curta duração de azul de metileno (um inibidor da guanilato ciclase) mostrou-se consistentemente capaz de melhorar a redução no tônus vascular e a função cardíaca em pacientes em choque séptico (Preiser *et al.*, 1995; Daemen-Gubbels *et al.*, 1995; Andresen *et al.*, 1998; Weingartner *et al.*, 1999; Donati *et al.*, 2002) ou com vasoplegia seguinte a cirurgias cardíacas (Levin *et al.*, 2004). Dois

estudos usaram infusões contínuas de azul de metileno em choque séptico humano e ambos mostraram resultados favoráveis (Brown *et al.*, 1996; Kirov *et al.*, 2001). Outro estudo mostrou efeitos vasculares favoráveis, mas recomendou cautela por causa da diminuição da oxigenação arterial (Gachot *et al.*, 1995). Talvez a relação entre a guanilato ciclase e a sepse tenha que ser revista, já que a sepse humana dura normalmente dias e não algumas poucas horas, como nos ensaios experimentais usando LPS. Considerando os potentes efeitos vasodilatadores do cGMP, e seu claro envolvimento na hiporeatividade a vasoconstritores (Kirov *et al.*, 2001) e na depressão cardíaca (Daemen-Gubbels *et al.*, 1995), a inibição da guanilato ciclase é ainda uma interessante possibilidade terapêutica, mesmo que parte da sua ativação possa ser independente do NO (Wu *et al.*, 1998). Diferentemente dos inibidores das NOS, os inibidores da guanilato ciclase não devem interferir com a capacidade do hospedeiro em combater os microrganismos invasores, já que os efeitos antimicrobianos de NOS-2/NO não dependem da guanilato ciclase (Nathan *et al.*, 2000). Com base nestas informações, alguns pesquisadores julgam necessária a realização de um estudo clínico de larga escala com inibidores da guanilato ciclase, como o azul de metileno, em quadros de choque séptico (Evgenov e Bjertnaes, 2003). Por outro lado, Schneider e colaboradores, do grupo que publicou o primeiro trabalho com azul de metileno em humanos (Schneider *et al.*, 1992), publicaram um editorial em 1995 desencorajando a utilização deste composto, até que houvesse evidências mais claras de que isto poderia trazer benefícios. Fica claro portanto a necessidade de cautela, até porque alguns trabalhos mostram que a inibição desta via de sinalização pode aumentar a resistência vascular pulmonar piorando a oxigenação arterial, um efeito que pode ter conseqüências dramáticas, e até mesmo aumentar a mortalidade (Gachot *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1995; Andresen *et al.*, 1998; Weingartner; 1999).

Entretanto, um ponto importante, e sistematicamente ignorado pelos trabalhos que avaliam os efeitos do azul de metileno na sepse, é uma série de evidências na literatura mostrando que a exposição crônica de cultura de células ao óxido nítrico pode modular tanto a atividade como a expressão da enzima guanilato ciclase (Ujii *et al.*, 1994; Filippov *et al.*, 1997; Scott e Nakayama, 1998a; Scott e Nakayama, 1998b; Takada *et al.*, 2001). Assim, baseado no fato de que o paciente séptico está

cronicamente exposto a altas concentrações de NO, é bastante plausível supor que estes pacientes apresentem alterações na funcionalidade da enzima guanilato ciclase. Portanto estas possíveis alterações podem ser o motivo da dualidade de resultados em relação à eficácia e segurança na utilização de inibidores desta enzima na sepse.

## OBJETIVOS

---

## 2.1 Hipótese

Será que o excesso de óxido nítrico produzido durante a sepse pode afetar a funcionalidade da enzima guanilato ciclase?

## 2.2 Objetivo geral

Considerando que a sepse é uma resposta inflamatória bastante complexa e em constante mudança, e diante da controvérsia a respeito da utilidade e segurança de inibidores da enzima guanilato ciclase para o tratamento da sepse, o presente trabalho objetiva estudar temporalmente o perfil de funcionalidade da enzima guanilato ciclase, bem como correlacionar o estado da enzima com o efeito do azul de metileno nas alterações hemodinâmicas que ocorrem durante a sepse.

## 2.3 Objetivos específicos

- a) Avaliar a produção de óxido nítrico e a instalação de alterações cardiovasculares em modelos de sepse experimental (injeção de LPS e ligadura e perfuração do ceco).
- b) Caracterizar o envolvimento do óxido nítrico e da enzima guanilato ciclase na instalação da hiporeatividade a vasoconstritores após a injeção de LPS.
- c) Avaliar o padrão de responsividade a doadores de óxido nítrico em diferentes tempos após a injeção de LPS ou após a cirurgia de perfuração e ligadura do ceco.
- d) Verificar a funcionalidade da guanilato ciclase através incubação de tecidos retirados de animais sépticos com doadores de NO (ativador da enzima) e posterior mensuração do produto da enzima (cGMP).
- e) Determinar o padrão de expressão da enzima guanilato ciclase solúvel após a injeção de LPS ou após a cirurgia de perfuração e ligadura do ceco.

- f) Avaliar se eventuais alterações na funcionalidade da enzima guanilato ciclase são decorrentes da produção exacerbada de óxido nítrico.
  
- g) Caracterizar o efeito de um inibidor da enzima guanilato ciclase, o azul de metileno, sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela injeção de LPS ou pelo procedimento de CLP.
  
- h) Avaliar o efeito do azul de metileno, administrado em diferentes tempos, sobre a mortalidade de animais no modelo de CLP.

# MATERIAL E MÉTODOS

---

### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar fêmeas, pesando entre 200-300 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ( $22 \pm 2^\circ \text{C}$ ) e ciclo de claro/escuro (12/12 h) controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC) e estão de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde, dos Estados Unidos da América (NIH; USA).

### 3.2. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

#### 3.2.1 Avaliação da pressão arterial em ratos

Neste estudo, utilizamos o modelo de medida direta da pressão arterial de animais anestesiados. Para isso, foi utilizado como anestésico uma mistura contendo cetamina (90 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), injetada pela via intramuscular. A associação dessas drogas é capaz de gerar uma anestesia profunda, sem nenhuma depressão cardiovascular ou respiratória aparente, com padrão de resposta para vasoconstritores melhor do que o obtido com outros anestésicos clássicos, como por exemplo, a uretana (Gratton *et al.*, 1995). Nos experimentos mais prolongados, pequenas doses de reforço (30 e 7 mg/kg, i.m., de cetamina e xilazina, respectivamente) foram administradas a cada 60-75 minutos, também pela via intramuscular.

Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre  $35$  e  $36^\circ \text{C}$ ). Em todos os experimentos, a veia femoral esquerda foi dissecada para a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso venoso foi a via de administração para muitos dos compostos utilizados. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina sódica, diluída em 100  $\mu\text{l}$  de solução salina tamponada com fosfato, segundo a formulação de Dulbecco (PBS, composto

por, em mM: NaCl 137, KCl 2,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5,  $\text{NaHPO}_4$  8,1; pH 7,4), foi injetada pela via intravenosa para prevenir a formação de coágulos e a obstrução das cânulas. Para facilitar a respiração espontânea, todos os animais foram submetidos a traqueostomia. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na extremidade distal através da ligadura com fio de sutura, enquanto o fluxo da extremidade proximal foi temporariamente suprimido por compressão com uma pinça curva. Um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via de inserção de um catéter de polietileno (Angiocath<sup>®</sup>, número 19), devidamente heparinizado, o qual foi firmemente amarrado na artéria e conectado ao transdutor de pressão interligado a um equipamento de análise de pressão arterial Digi-Med (Modelo 190, NY, EUA). Os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados a cada 10 segundos em um computador (sistema operacional Windows 98<sup>™</sup>, Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração Digi-Med (Modelo 200).

A administração intravenosa dos compostos de interesse, bem como a avaliação das respostas cardiovasculares em nossos experimentos *in vivo*, foi iniciada entre 20 a 30 minutos após o término da manipulação cirúrgica. Esse período mostrou-se suficiente para a estabilização da pressão arterial média, geralmente elevada pelo estresse cirúrgico.

Os agentes vasoativos estudados foram dissolvidos em PBS e administrados lentamente (volume final de 50  $\mu\text{l}$ ). Imediatamente após, mais 150  $\mu\text{l}$  de PBS eram injetados para garantir que nenhum resíduo da droga em uso permanecesse na cânula de polietileno. A injeção lenta de 200  $\mu\text{l}$  de PBS, por si só, não foi capaz de alterar a pressão arterial média, o que nos garantiu que os efeitos observados eram realmente resultados das ações das drogas administradas.

A responsividade vascular, tanto para agentes vasoconstritores como vasodilatadores, geralmente foi avaliada através da injeção (subsequente) de três doses crescentes do composto em estudo. A elevação ou redução da pressão arterial média iniciava-se imediatamente após a administração dos compostos

vasoativos, perdurando por períodos entre 10 segundos a 4 minutos, sendo o pico do efeito observado sempre ao longo do primeiro minuto.

Ao término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através da administração intravenosa de altas doses de xilocaína.

### **3.2.2 Indução do quadro de endotoxemia**

O choque endotoxêmico foi induzido através da injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS) de membrana de *Escherichia coli* (sorotipo 026:B6, Sigma Chemical Co., St Louis, EUA), dissolvido em PBS, na dose de 12,5 mg/kg. Os animais controle foram tratados apenas com PBS (1,0 ml/kg; i.p.)

### **3.2.3 Indução do quadro de septicemia através da ligadura e perfuração do ceco (CLP)**

Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (90/15 mg/kg, i.p.). Em seguida foram submetidos a uma laparotomia com incisão de aproximadamente 1 cm e subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco, abaixo da válvula íleo-cecal. Para indução da septicemia o ceco dos animais foi perfurado (5 ou 20 vezes) com agulhas 18G, seguido de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Após a perfuração do ceco o intestino era recolocado na cavidade abdominal e a musculatura e a pele suturadas. Após a sutura, os animais receberam 2 ml de salina s.c. para reposição fluídica (Benjamin *et al.*, 2000) e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (60 a 120 minutos). Os animais controles foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos não sofrendo, contudo, perfurações e ligadura no ceco (animais falso-operados ou sham).

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

A metodologia utilizada para a dosagem dos valores de NO<sub>x</sub> já foi descrita detalhadamente (Granger *et al.*, 1990). Basicamente, o plasma foi diluído 1:1 com água de Milli-Q e desproteínizado pela adição de sulfato de zinco (2%). Para a conversão do nitrato para nitrito, as amostras foram incubadas a 37° C durante 2 horas, em presença da nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em

anaerobiose. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria, sendo 100  $\mu$ l do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q) em placas de 96 poços para leitura a 540 nm num leitor de placas. Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150  $\mu$ M) foram realizadas simultaneamente. Como, nestas condições, a conversão de nitrato para nitrito foi sempre maior que 90%, não foi realizada nenhuma correção dos resultados. Finalmente, por meio de regressão linear, os valores foram expressos como  $\mu$ M de NO<sub>x</sub> (nitrato e nitrito).

### 3.2.5 Dosagem de cGMP

Em tempos determinados os animais foram sacrificados e exsanguinados, e o pulmão direito e a aorta torácica foram retirados. Um fragmento de tecido pesando aproximadamente 100 mg foi picado em pedaços de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> e incubado com isobutil-metilxantina (IBMX, um inibidor não seletivo de fosfodiesterases, 0,1 mM) por 15 min a 37 °C em uma solução balanceada de sais de Hanks (138 mM NaCl; 5,3 mM KCl; 0,44 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,4 mM MgSO<sub>4</sub>; 0,49 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,26 mM CaCl<sub>2</sub>; 0,34 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 4,2 mM NaHCO<sub>3</sub>, e 5,5 mM D-glucose). Então, nitroprussiato de sódio (SNP, 100  $\mu$ M) ou PBS foram adicionados, e a incubação seguiu por mais 10 minutos. Ao término deste tempo, os tecidos foram rapidamente congelados e homogenizados em ácido tricloroacético gelado (6%, 1 ml) em um homogenizador do tipo Potter de vidro. Os homogenatos foram então centrifugados (4000 x g, 4° C, 30 min) por 30 minutos, o sobrenadante coletado e lavado 4 vezes com éter etílico saturado com água (1,6% v/v). As amostras foram liofilizadas, e o cGMP foi dosado por ELISA utilizando-se um kit comercialmente disponível (Amersham Pharmacia Biotech, São Paulo, SP, Brasil), seguindo-se as instruções do fabricante. Este método permite a dosagem de cGMP em uma faixa de 50 a 12.800 fmol/poço, sendo baseado na competição entre o cGMP da amostra e cGMP conjugado a uma peroxidase na ligação a um anticorpo específico para cGMP. A quantidade total de proteína foi dosada pelo método de Bradford. Os resultados são expressos como picomoles de cGMP por miligrama de proteína.

### 3.2.6 RT-PCR

A extração do RNA total foi realizada através da homogeneização dos tecidos em 1 ml de reagente TRIzol (Invitrogen). Foram adicionados 200 µl de clorofórmio ao homogenato, sendo este posteriormente submetido à agitação e centrifugação (14.000 rpm, 15 min, 4 °C). A fase aquosa contendo o RNA foi transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 500 µl de álcool isopropílico. O conteúdo do tubo foi misturado por inversão e posteriormente mantido em repouso a temperatura ambiente por 10 min. A mistura foi centrifugada (14.000 rpm, 15 min, 4 °C), sendo o precipitado resultante ressuspenso em 1 ml de etanol gelado. Após centrifugação (10.000 rpm, 5 min, 4 °C), o precipitado contendo RNA foi dissolvido em água tratada com 0,1 % de dietilpirocarbonato (DEPC), sendo a concentração e a pureza determinadas em espectrofotômetro pela absorbância a 260 nm. O RNA foi aliquoteado e estocado em freezer a -70 °C até o momento do uso.

A reação da transcrição reversa (RT) foi realizada através da enzima *Moloney Murine Leukemia Virus* (M-MULV) (Invitrogen). Amostras contendo 1 µg de RNA total foram incubadas com 2 U de inibidor de RNase (RNAsin, PROMEGA), dNTPs 0,5 mM, 10 U da enzima e água-DEPC para completar o volume. A mistura foi submetida à temperatura de 20° C por 10 min, 42° C por 45 min e 95° C por 5 min. A concentração do cDNA de cada amostra foi determinada por espectrofotômetro (absorbância à 260 nm).

Os produtos de cDNA obtidos pela técnica de RT foram amplificados com a enzima Taq DNA polimerase, juntamente com dNTPs e MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM e os primers específicos para cada subunidade da enzima guanilato ciclase. As condições da reação foram as seguintes: 95°C por 90 s, 35 ciclos a 95°C por 30 s, 45°C por 60 s, e 72°C por 26 s. Os seguintes primers foram utilizados para amplificar o cDNA da subunidade α1 da guanilato ciclase sensível ao NO: (GenBank nº acesso. U60835): senso, 5'-GAAATCTTCAAGGGTTATG-3' (1527-1545), e anti-senso, 5'-CACAAAGCCAGGACAGTC-3' (2335-2352). O primer utilizado para amplificar a subunidade β1 da enzima guanilato ciclase sensível ao NO foi: (GenBank nº acesso. AB099521): senso, 5'-GGTTTGCCAGAACCTTGTATCCACC-3' (1450-1474), e anti-senso, 5'-GAGTTTTCTGGGGACATGAGACACC-3' (1709-1733). O tamanho esperado para os produtos do PCR foi de 825 pares de base para a subunidade α1

e 284 para a subunidade  $\beta 1$ . Os primers para gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram usados para validar cada reação de cDNA e para estimativa final de mRNA. Os produtos finais do PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3,5% corado com brometo de etídio. Os produtos finais foram fotografados para a análise dos resultados. O experimento foi repetido três vezes.

### 3.2.7 Imunoeletroforese para guanilato ciclase solúvel (*Western blot*)

Nesses experimentos, os tecidos (pulmão de ratos) foram homogeneizados em tampão de homogeneização mantido a 4° C (composto por, em mM: sucrose 320, Tris 10, EDTA 1, PMSF 1 e DTT 1, em pH 7,5, contendo 10  $\mu\text{g/ml}$  de aprotinina, leupeptina e inibidor de tripsina do feijão de soja). A separação de proteínas (50  $\mu\text{g/poço}$ ) provenientes dos homogenatos teciduais foi feita por eletroforese em gel de poliacrilamida (8%) com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Terminado o período de corrida das amostras (1 h, 140 V, 25 mA) as proteínas foram transferidas do gel de migração para uma membrana de polifluoreto de vinilideno (PVDF) através da aplicação de corrente elétrica (15 V; 0,8 mA/cm<sup>2</sup>; 30 min). Em seguida, a membrana foi incubada em PBS/Tween (composto por NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM e Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, contendo 0,05% de Tween-20, pH 7,4) com leite desnatado a 5%, pelo período de 1 hora à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS/Tween a membrana foi incubada durante a noite à 4°C, com anticorpo anti-sGC $\beta 1$  (policlonal) de coelho (2  $\mu\text{g/ml}$ , Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Ao término do período de incubação e lavagem com PBS/Tween (para retirada do excesso de anticorpo) as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG ligado a biotina (Amersham, diluição 1:1000 em PBS/Tween). A seguir, a membrana foi novamente lavada com PBS/Tween e incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase (Amersham, diluição 1:1000 em PBS/Tween) por 1 h em temperatura ambiente. A revelação da membrana foi feita através do kit de quimioluminescência ECL-Amersham®.

### 3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS - PARTE 1

Nesta parte são discutidos os protocolos utilizados para investigação do padrão de expressão e funcionalidade da enzima guanilato ciclase em animais endotoxêmicos, bem como envolvimento da enzima na hiporeatividade a fenilefrina.

#### 3.3.1 Avaliação dos efeitos da fenilefrina em animais endotoxêmicos

Duas, oito ou vinte e quatro horas após o tratamento com LPS (12,5 mg/kg, i.p.) ou PBS (1,0 ml/kg, i.p.), os animais foram anestesiados e preparados para o registro direto da pressão arterial, como descrito no item 3.2.1. Respeitado o período de estabilização da pressão arterial média foram avaliados os efeitos vasoconstritores para a fenilefrina (nas doses de 3, 10 e 30 nmol/kg, iv). Ao término dos experimentos, amostras de sangue arterial (cerca de 1 ml) foram coletadas e centrifugadas a 4000 x g durante 10 minutos, sendo o sobrenadante (plasma) recuperado e armazenado a -20° C para posterior dosagem de nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub>).

#### 3.3.2 Avaliação do envolvimento da via óxido nítrico/guanilato ciclase na instalação e manutenção da hiporeatividade à fenilefrina em animais endotoxêmicos

A produção excessiva de óxido nítrico durante a sepse é considerada de grande importância para o estabelecimento da hiporeatividade a agentes vasoconstritores existente nessa condição patológica. Da mesma forma, a participação da guanilato ciclase neste processo tem sido igualmente estabelecida. Entretanto, os conhecimentos que norteiam essa concepção advém especialmente de experimentos *in vitro* (ver por exemplo Hollenberg *et al.*, 1993; Hom *et al.*, 1995; Mansi *et al.*, 1996; Hollenberg *et al.*, 1997). Por essa razão, nós investigamos a influência de um inibidor da NOS, L-NAME (inibidor não-seletivo da NOS; Rees *et al.*, 1990), sobre a produção de NO (nitrato/nitrito), cGMP e sobre a hiporeatividade a vasoconstritores em animais injetados com LPS.

Os animais receberam duas injeções de L-NAME (55 µmol/kg; correspondente a 10 mg/kg; i.p.), a primeira administrada 1 hora e a segunda 6 horas após a injeção de LPS ou PBS. Esse protocolo experimental teve como principal objetivo prevenir a

grande produção de NO especialmente nas primeiras horas após a administração do LPS ou PBS.

Oito horas após o tratamento com LPS (12,5 mg/kg, i.p.) ou PBS (0,1 ml/kg, i.p.) os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média e uma curva dose-resposta para a fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg) foi registrada. Ao término dos experimentos foram coletadas amostras de sangue e tecido pulmonar para dosagem de NO<sub>x</sub> (ver item 3.2.4) e cGMP (ver item 3.2.5.) respectivamente.

### **3.3.3 Avaliação dos efeitos vasodilatadores de doadores de óxido nítrico em animais endotoxêmicos**

Com objetivo de avaliar a funcionalidade da enzima guanilato ciclase solúvel em animais endotoxêmicos nós utilizamos doadores de NO como ferramenta farmacológica para ativar a guanilato ciclase e aumentar a produção de cGMP com consequente vasodilatação e redução da pressão arterial média.

Os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial 2, 8 ou 24 horas após o tratamento com LPS (12,5 mg/kg, i.p.) ou PBS (1,0 ml/kg, i.p.), como descrito no item 3.2.1. Respeitado o período de estabilização da pressão arterial média, as respostas vasodilatadoras para trinitrato de glicerila (10, 100 e 1000 nmol/kg; i.v.), nitroprussiato de sódio (3, 10 e 30 nmol/kg; i.v.) ou SNAP (10, 100 e 1000 nmol/kg, i.v.) foram avaliadas.

### **3.3.4 Avaliação da produção de cGMP em resposta a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com nitroprussiato de sódio em pulmão ou aorta de animais endotoxêmicos**

Para um estudo mais detalhado da funcionalidade da enzima guanilato ciclase sensível ao NO, nós avaliamos a formação do produto da enzima, cGMP, após estímulo com um doador de NO, nitroprussiato de sódio. Assim, nos tempos de 8 ou 24 horas após o tratamento com LPS (12,5 mg/kg, i.p.) ou PBS (1,0 ml/kg, i.p.), os animais foram sacrificados, amostras de tecido pulmonar e aorta foram coletados, incubados com SNP e rapidamente congeladas para posterior dosagem de cGMP (detalhes no item 3.2.5).

### **3.3.5 Análise do padrão de expressão da enzima guanilato ciclase solúvel em animais endotoxêmicos através de RT-PCR e imunoelctroforese**

Alguns trabalhos na literatura relatam que a exposição de células a doadores de óxido nítrico ou LPS podem reduzir a expressão da guanilato ciclase sensível ao NO (Ujiie *et al.*, 1994; Filippov *et al.*, 1997; Scott e Nakayama, 1998a; Scott e Nakayama, 1998b). Assim, resolvemos estudar o padrão de expressão da enzima guanilato ciclase solúvel em uma condição de alta produção de NO, como a que acontece nos animais endotoxêmicos.

Para isso, 8 ou 24 horas após o tratamento com LPS (12,5 mg/kg, i.p.) ou PBS (1,0 ml/kg, i.p.), os animais foram sacrificados e uma amostra de tecido pulmonar retirada e armazenada a -70° C até o momento da realização do RT-PCR ou imunoelctroforese para a guanilato ciclase solúvel, como descrito nos itens 3.2.6 e 3.2.7 respectivamente.

### **3.3.6 Inibição da enzima guanilato ciclase solúvel em animais endotoxêmicos**

Em seguida resolvemos avaliar o efeito de um inibidor da enzima guanilato ciclase sobre a hiporeatividade a fenilefrina em diferentes tempos após a injeção de LPS. Para isso, 2, 8 ou 24 horas após o tratamento com PBS (1,0 ml/kg, i.p.) ou LPS (12,5 mg/kg, i.p.), os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média. Respeitado o período de estabilização, os efeitos pressóricos da fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg, i.v.) foram avaliados e, imediatamente após o desaparecimento dos efeitos da última dose de fenilefrina, administramos azul de metileno (10 mg/kg, i.v.) ou PBS (1,0 ml/kg). Quinze a trinta minutos após esse tratamento as respostas vasculares à fenilefrina foram novamente avaliadas.

## **3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS - PARTE 2**

Nesta parte são discutidos os protocolos utilizados para avaliação do padrão de expressão e funcionalidade da enzima guanilato ciclase no modelo de CLP, bem como a correlação do estado da enzima com a eficácia do tratamento com azul de metileno.

### **3.4.1 Determinação da letalidade do modelo de ligadura e perfuração do ceco em ratos**

Diferentes grupos de animais ( $n = 10$  a  $12$ ) foram submetidos à cirurgia de CLP, como descrito no item 3.2.3. Porém, nesse conjunto de experimentos, cada grupo de animais foi exposto a uma quantidade diferente de perfurações: 5 ou 20 furos. Após a realização da cirurgia, os animais foram observados em intervalos de no mínimo 6 e no máximo 12 horas pelo período de 5 dias e a letalidade quantificada. Para fins de índice de letalidade não foram considerados aqueles animais que morreram antes da recuperação completa da anestesia.

### **3.4.2 Avaliação das alterações cardiovasculares em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

Para estudar as alterações hemodinâmicas induzidas pelo procedimento cirúrgico CLP, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média e frequência cardíaca 12, 24 e 48 horas após a realização da CLP ou da cirurgia falsa (falso-operados, controle). Respeitando o período de estabilização, os valores de pressão arterial média e frequência cardíaca foram registrados. Avaliamos também os efeitos vasculares da fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg, i.v.) e angiotensina II (3, 10, 30 pmol/kg; i.v.) nestes animais. Ao término dos experimentos amostras de sangue arterial (cerca de 1 ml) foram coletadas e centrifugadas a  $4000 \times g$  durante 10 minutos, sendo o sobrenadante (plasma) recuperado e armazenado a  $-20^{\circ} \text{C}$  para a posterior dosagem de  $\text{NO}_x$ .

### **3.4.3 Avaliação da temperatura corporal em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

Os animais submetidos ao procedimento de CLP tiveram a temperatura mensurada a cada 24 horas durante 4 dias. Para isso foi utilizado um termômetro digital Powerpack® (ET-16, Taiwan), que utiliza raios infravermelhos para medir energia emitida pelo tímpano e tecidos ao seu redor transformando os valores em temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ).

#### **3.4.4 Avaliação da produção de cGMP em resposta a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com nitroprussiato de sódio em pulmão ou aorta de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

Assim como nos animais endotoxêmicos, a funcionalidade da enzima guanilato ciclase também foi avaliada no modelo de CLP. Assim, 12, 24 ou 48 horas após o procedimento de CLP, os animais foram sacrificados, amostras de tecido pulmonar e aorta coletados, incubados com SNP e rapidamente congeladas para posterior dosagem de cGMP (detalhes no item 3.2.5). Animais falso-operados foram usados como controle.

#### **3.4.5 Análise do padrão de expressão da enzima guanilato ciclase solúvel em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco através de RT-PCR e imunoeletroforese**

Nos tempos de 12, 24 ou 48 horas após o procedimento cirúrgico de CLP, os animais foram sacrificados e uma amostra de tecido pulmonar retirada e armazenada a  $-70^{\circ}$  C até o momento da realização do RT-PCR ou imunoeletroforese para a guanilato ciclase solúvel, como descrito nos itens 3.2.6 e 3.2.6 respectivamente. Animais falso-operados foram utilizados como controle.

#### **3.4.6 Avaliação dos efeitos do azul de metileno sobre as alterações cardiovasculares em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

Para avaliar os efeitos de um inibidor da enzima guanilato ciclase solúvel, nas alterações cardiovasculares em diferentes tempos após o procedimento CLP, nós seguimos o seguinte protocolo: nos tempo de 12, 24 ou 48 horas após o CLP ou a falsa cirurgia, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial e frequência cardíaca. Respeitado o período de estabilização, os efeitos pressóricos da fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg, i.v.) ou angiotensina II (3, 10 e 30 pmol/kg) foram avaliados e imediatamente após o desaparecimento do efeito da última dose do agente vasoconstritor, administramos azul de metileno (10 mg/kg, i.v.) ou PBS (1,0

ml/kg). Quinze a trinta minutos após esse tratamento as respostas vasculares à fenilefrina ou angiotensina II foram novamente avaliadas. Os valores de pressão arterial média e frequência cardíaca basal também foram registrados antes e depois da administração de azul de metileno ou PBS.

#### **3.4.7 Avaliação do efeito do azul de metileno na sobrevida de animais submetidos à cirurgia de perfuração e ligadura do ceco**

Após o procedimento cirúrgico de CLP os animais foram divididos em três grupos. Um grupo recebeu azul de metileno (10 mg/kg s.c.) no tempo de 8 horas após o procedimento cirúrgico. Outro grupo recebeu azul de metileno (10 mg/kg s.c.) 20 horas após a cirurgia. No terceiro grupo, falso-operado, a metade dos animais recebeu PBS (veículo) no tempo de 8 horas e a outra metade no tempo de 20 horas após o CLP. A sobrevida foi avaliada ao longo de 5 dias.

### **3.5 COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS**

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub>, MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaHCO<sub>3</sub>, NaHPO<sub>4</sub>, EGTA, D-glucose, ácido acético, ácido fosfórico, nitroprussiato de sódio, nitrato de sódio, nitrito de sódio (todos comprados da Merck, Brasil); heparina sódica e trinitrato de glicerila (doada pela Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP); L-NAME, Tris-HCl, PMSF, DTT, aprotinina, leupeptina, inibidor de tripsina, glicina, Tween-20, anticorpo anti-IgG de coelho, tioglicolato, sulfanilamida, alfa-naftil-etilenodiamina, fenilefrina, angiotensina II, histamina, sulfanilamida, isobutil-metilxantina, lipopolissacarídeo de *E. coli* (sorotipo O111:B6), todos comprados da Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA; isobutil-metilxantina (IBMX, da Sigma; doação do Prof. Dr. João Batista Calixto, UFSC) anticorpo anti-sGCβ1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); cetamina (Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil); xilazina (Ronpum<sup>TM</sup>, Bayer; São Paulo, SP, Brasil); Os sais e reagentes utilizados para preparo de soluções foram dissolvidos em água Milli-Q. Os estoques de angiotensina II foram preparados em HCl (0,01 N). Todos os compostos foram diluídos para uso em PBS estéril, exceto a IBMX, que foi preparada e utilizada em solução de DMSO.

### 3.6 ANÁLISE DOS RESULTADOS E TESTES ESTATÍSTICOS

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística foi realizada pela análise de variância de uma via (ANOVA) ou duas vias seguida pelo teste *t* de Bonferroni. Em alguns grupos foi aplicado o teste *t* de Student para amostras não-pareadas (comparações entre duas amostras). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

As curvas de sobrevivência foram expressas como porcentagem de animais vivos observados em um intervalo de 6 a 12 horas durante os 5 dias avaliados. Para análise estatística das curvas de sobrevivência e cálculo da média de sobrevivência foi utilizado o teste de *logrank*. As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes para  $p < 0,05$ . A análise de duas vias foi feita utilizando-se o pacote estatístico Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e o demais testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism (San Diego, CA, USA).

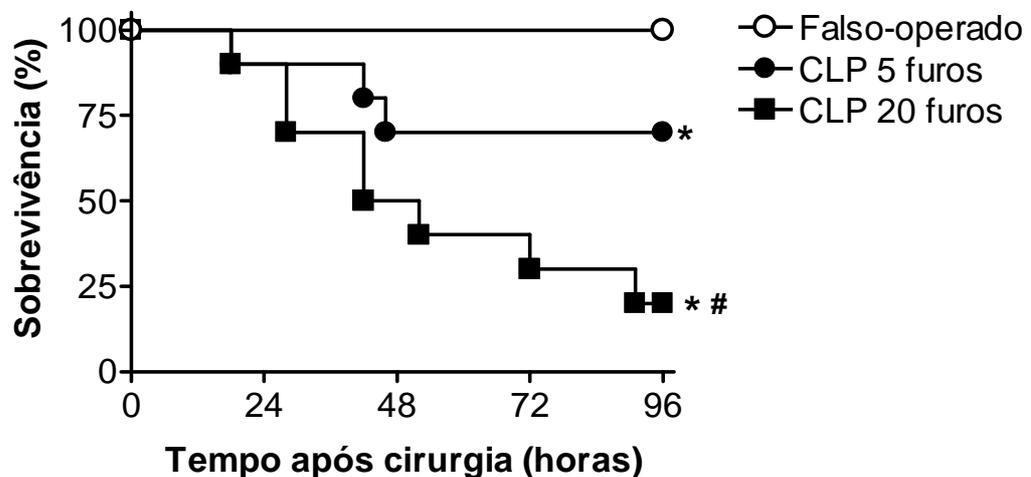
## RESULTADOS

---

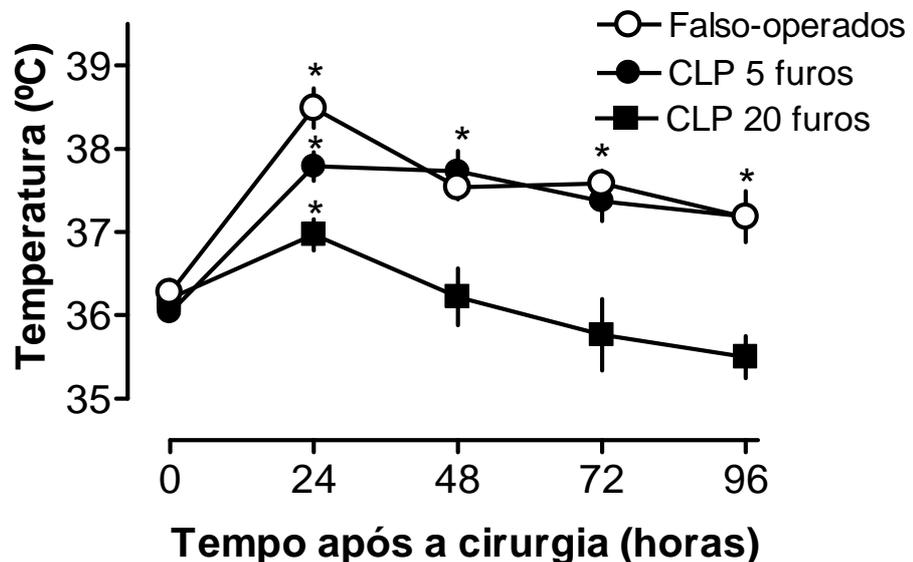
#### 4.1 Caracterização do índice de mortalidade em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

Os animais submetidos à cirurgia de CLP apresentaram piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação, sinais da instalação do estado de sepse. O tempo de latência e a intensidade desses sinais dependeram do número de perfurações executadas (dados não mostrados). Além disso, quanto maior a quantidade de furos no ceco, maior foi a letalidade e menor o tempo de sobrevivência dos animais (Figura 1).

Os animais também tiveram suas temperaturas medidas após o procedimento cirúrgico, durante 4 dias. Conforme indicado na Figura 2, os animais falso-operados mostram um aumento da temperatura corporal, com pico em 24 horas, e que se manteve elevada durante toda a análise. Um padrão muito semelhante foi observado nos animais CLP 5 furos. Entretanto, os animais submetidos ao CLP 20 furos apresentaram um aumento sutil na temperatura corporal somente nos momentos iniciais, permanecendo em valores normais durante o resto da análise.



**Figura 1. Sobrevida de ratos após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Diferentes grupos de animais ( $n = 10$ ) foram submetidos a um número variado de perfurações no ceco, conforme está indicado na legenda. Após a cirurgia e a completa recuperação da anestesia, os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. Os animais do grupo controle foram submetidos a anestesia e abertura do abdome, mas não sofreram a ligadura e perfuração do ceco (Falso-operado). A sobrevida foi avaliada ao longo de 4 dias. (\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo falso-operado, #  $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP 5 furos; comparados pelo teste log-rank,  $n = 20$ ).



**Figura 2. Temperatura corporal de ratos após a cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Diferentes grupos de animais ( $n = 10$ ) foram submetidos a um número variado de perfurações no ceco, conforme está indicado na legenda. Após cirurgia e a completa recuperação da anestesia, os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração. Os animais do grupo controle foram submetidos a falsa cirurgia. A temperatura foi avaliada ao longo de 4 dias. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo falso-operado (círculos abertos) (ANOVA de uma via para medidas repetidas seguida pelo teste t de Bonferroni).

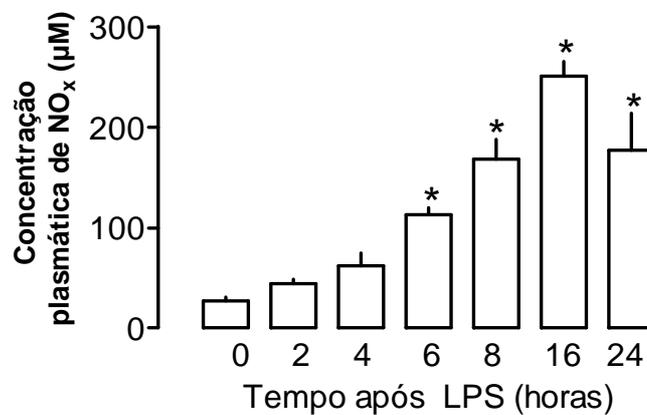
#### 4.2 Caracterização da produção de óxido nítrico e alterações cardiovasculares em modelos de sepse experimental

##### *Ratos endotoxêmicos*

Neste estudo a injeção de LPS não alterou os valores de pressão arterial 2, 8 ou 24 horas após sua administração, mas aumentou a frequência cardíaca no tempo de 8 horas após a injeção de LPS (Tabela 1). A injeção de LPS aumentou significativamente os níveis plasmáticos de nitrato/nitrito ( $\text{NO}_x$ , um indicativo da produção de NO; Figura 3). O aumento dos níveis de  $\text{NO}_x$  foi significativo a partir de 6 horas e apresentou pico em 16 horas.

Como pode ser visto na Figura 4 os ratos injetados com LPS apresentaram redução de 40 a 50% na resposta vasoconstritora à fenilefrina, caracterizando assim

a chamada hiporeatividade a agentes vasoconstritores. O padrão de hiporeatividade à fenilefrina foi muito parecido em todos os tempos avaliados (Figura 4).

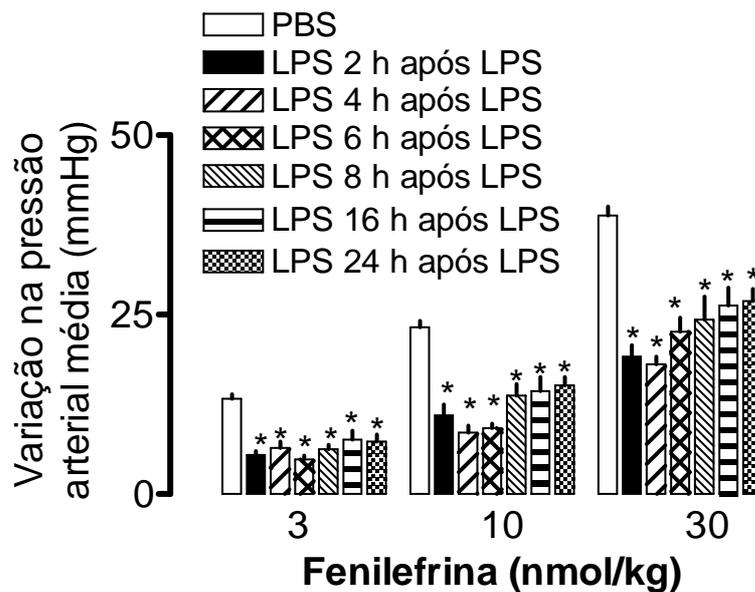


**Figura 3. Concentração plasmática de nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub>) no plasma de ratos endotoxêmicos.** Amostras de sangue foram coletadas após a injeção de LPS (12,5 mg/kg, i.p.) nos tempos indicados, para quantificação do NO<sub>x</sub>. Os resultados representam a média ± erro padrão da média, n= 4-6. \* p<0,05, em relação ao tempo zero (ANOVA de uma via seguida pelo test *t* de Bonferroni).

**Tabela 3: Efeito da injeção de LPS na pressão arterial e frequência cardíaca de ratos.**

Grupos	2 horas		8 horas		24 horas	
	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
PBS	100,1 ± 2,1	239 ± 10	98,6 ± 2,1	240 ± 7	95,4 ± 3,4	245 ± 8
PBS+L-NAME	N.D.	N.D.	116,2 ± 4,2*	200 ± 13	N.D.	N.D.
LPS	97,7 ± 4,1	270 ± 15	104,7 ± 4,1	295 ± 11*	106,7 ± 2,7	242 ± 14
LPS+L-NAME	N.D.	N.D.	95,6 ± 4,1	235 ± 8	N.D.	N.D.

Os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) 2, 8 e 24 horas após a injeção de LPS (12,5 mg/kg, i.p.) ou PBS. Grupos separados receberam injeções de L-NAME (55 µmol/kg, i.p.), uma e seis horas após a injeção de LPS ou PBS. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 6 a 8 animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo PBS. (ANOVA de uma via seguida pelo teste *t* de Bonferroni). N.D.: não determinado

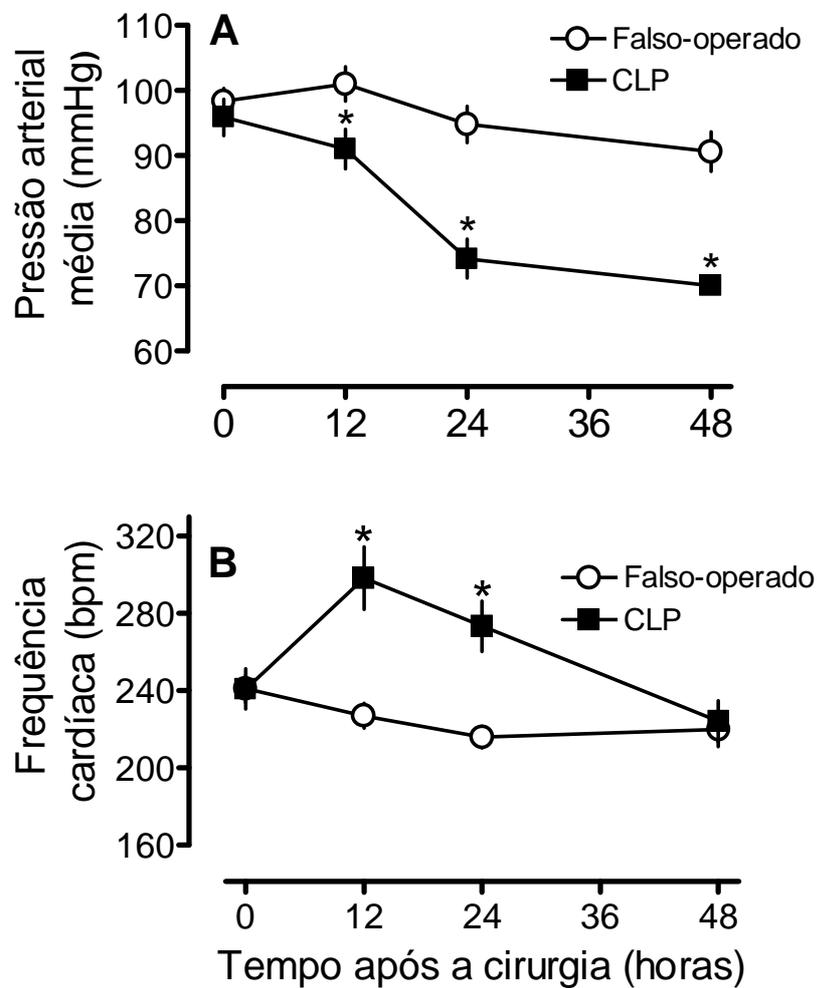


**Figura 4: Efeitos da fenilefrina na pressão arterial média de ratos tratados com LPS ou PBS.** Curvas dose-resposta para a fenilefrina foram registradas em ratos anestesiados, 2, 4, 6, 8, 16 ou 24 horas após a administração de PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (12,5 mg/kg, i.p.). Os dados apresentados no grupo controle agregam resultados obtidos em animais tratados com PBS 2, 4, 6, 8, 16 ou 24 horas antes do registro. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 7 a 15 animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle (PBS). (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

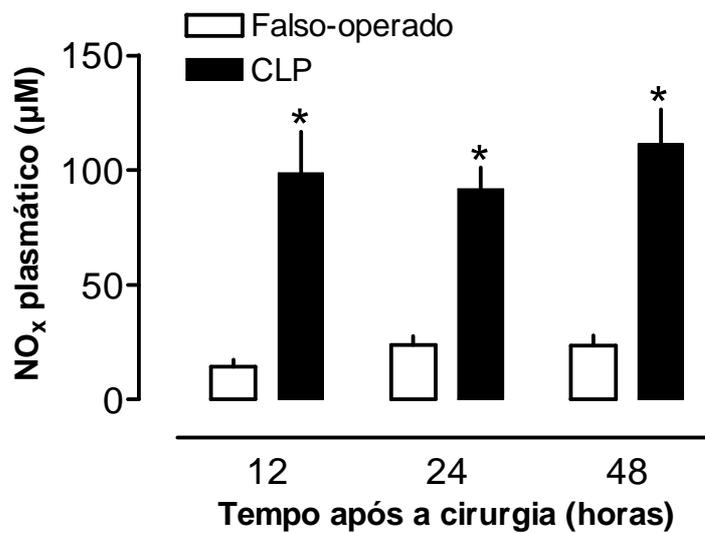
#### **Ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

Diferentemente do modelo LPS, os animais submetidos ao CLP apresentaram um quadro hipotensivo já em 12 horas e com queda progressiva até pelo menos 48 horas. Os animais falso-operados mantiveram o mesmo valor de pressão arterial em todos os tempos do estudo (Figura 5, Painel A). A frequência cardíaca dos animais submetidos ao CLP sofreu elevação em 12 horas, atingindo valores similares ao controle 48 h após o procedimento cirúrgico (Figura 5, Painel B).

A mensuração da concentração plasmática de  $\text{NO}_x$ , outro parâmetro utilizado para confirmação do estado de sepse, revelou valores aumentados já em 12 horas após CLP (Figura 6). Estes valores permaneceram altos por pelo menos 48 horas. Os animais falso-operados não apresentaram aumento dos níveis de  $\text{NO}_x$ , quando comparados aos animais que não foram submetidos a nenhum tipo de procedimento cirúrgico.

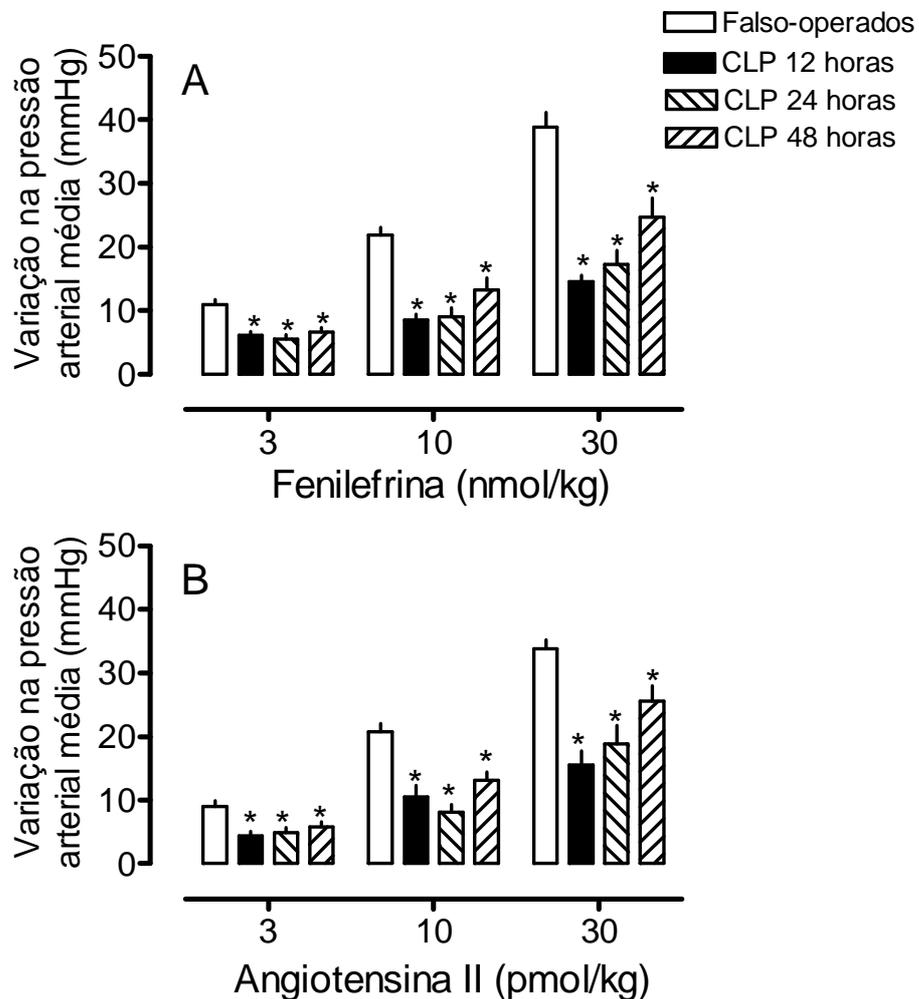


**Figura 5: Pressão arterial média e frequência cardíaca mensurada em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média (Painel A) e frequência cardíaca (Painel B) 12, 24 e 48 horas após a CLP (20 furos), conforme indicado na legenda. Os animais pertencentes ao grupo controle (círculos abertos) foram submetidos à falsa cirurgia. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 8 animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle (círculo aberto) (teste  $t$  Student para amostras não pareadas).

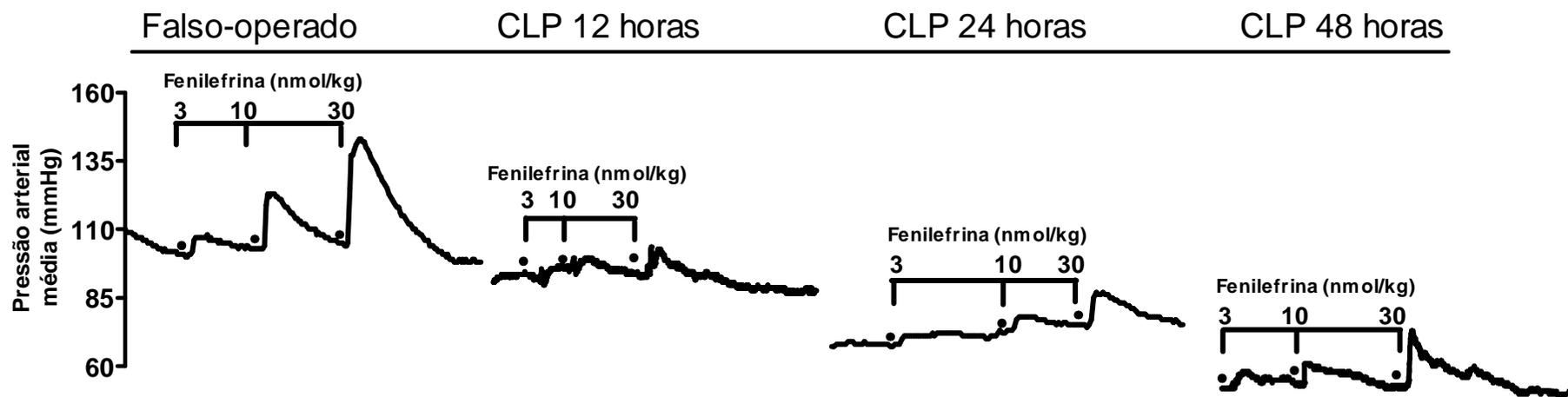


**Figura 6: Concentrações plasmáticas de NO<sub>x</sub> de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Amostras de sangue foram coletadas 12, 24 e 48 horas após a CLP (20 furos, barras pretas) e processadas para a quantificação da concentração de NO<sub>x</sub> pelo método de Griess. As barras abertas referem-se ao grupo falso-operado. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 15 animais. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle (barra aberta) (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

Além da hipotensão progressiva e da taquicardia inicial, os animais submetidos ao CLP apresentaram uma menor resposta vasoconstritora à fenilefrina e à angiotensina II, sendo este efeito constante durante todo o período de análise (12, 24 e 48 horas após CLP; Figura 7 e 8).



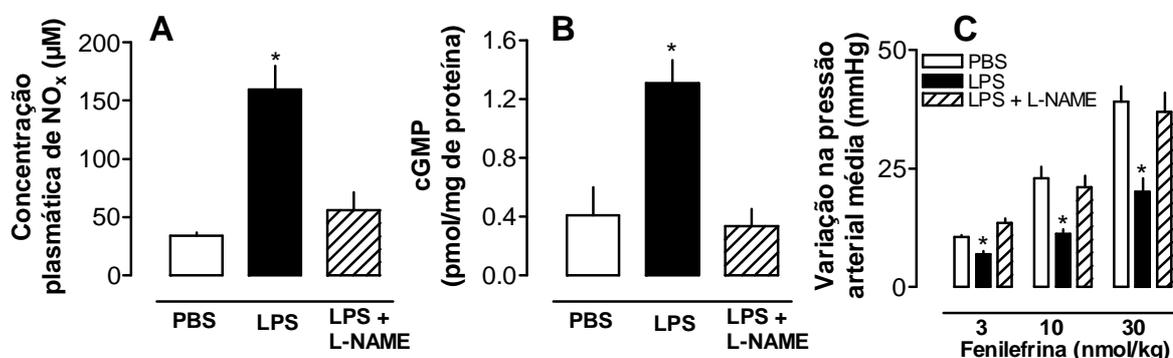
**Figura 7: Efeitos da fenilefrina e angiotensina II sobre a pressão arterial média de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Os animais foram preparados para o registro da PAM 12, 24 e 48 horas após a CLP (20 furos), conforme indicado na legenda, e tiveram os efeitos da fenilefrina (Painel A) e angiotensina II (Painel B) avaliados. Os animais pertencentes ao grupo controle (barras abertas) foram submetidos à falsa cirurgia. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de 6 a 10 experimentos. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle (barra aberta) (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).



**Figura 8. Registros da pressão arterial média de ratos anestesiados mostrando os efeitos da fenilefrina em animais falso-operado e submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média 12, 24 e 48 horas após a CLP (20 furos), conforme indicado na Figura, e tiveram os efeitos da fenilefrina avaliados. O animal falso-operado foi submetido à cirurgia (sem a ligadura e perfuração do ceco) 24 horas antes.

### 4.3 Caracterização do envolvimento da via óxido nítrico/guanilato ciclase na hiporeatividade a fenilefrina em ratos endotoxêmicos

A injeção de LPS, além de aumentar os níveis de  $\text{NO}_x$  no plasma (Figura 3 e Figura 9, Painel A), foi também capaz de aumentar a produção de cGMP (Figura 9, Painel B). Além disso, o tratamento dos animais com um inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase, o L-NAME, bloqueou totalmente a produção de óxido nítrico e cGMP (Figura 9, Painéis A e B), bem como preveniu a instalação do quadro de hiporeatividade (Figura 9, Painel C).



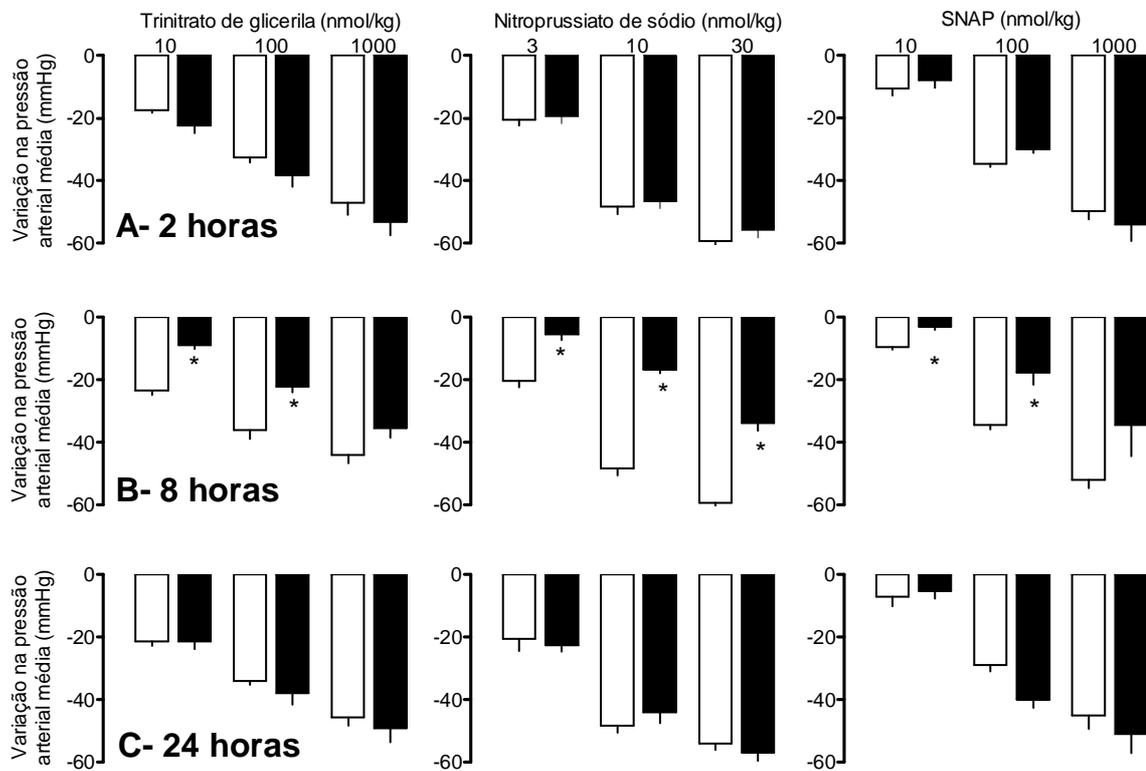
**Figura 9. Elevação da concentração de nitrato/nitrito ( $\text{NO}_x$ ) no plasma e de cGMP no pulmão de ratos endotoxêmicos e sua inibição pelo tratamento com L-NAME.** Painel A: Oito horas após a injeção de PBS (barras abertas) ou LPS (barras fechadas; 12,5 mg/kg i.p.) em ratos, o sangue foi coletado para dosagem de  $\text{NO}_x$ . Grupos separados receberam injeções de L-NAME (55  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), uma e seis horas após a injeção de LPS (barras hachuradas) ou PBS. Painel B: Oito horas após a injeção de PBS (barras abertas) ou LPS (barra fechadas) os animais foram sacrificados, um fragmento de pulmão foi coletado (~ 100 mg), rapidamente congelado e homogenizado em ácido tricloroacético. Os homogenatos foram centrifugados, o sobrenadante coletado, lavado quatro vezes com solução saturada de éter e o cGMP mensurado por ELISA. Grupos separados receberam injeções de L-NAME (55  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), uma e seis horas após a injeção de LPS (barras hachuradas) ou PBS. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 3-6$ . \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### **4.4 Avaliação da funcionalidade da enzima guanilato ciclase solúvel em modelos de sepsis experimental.**

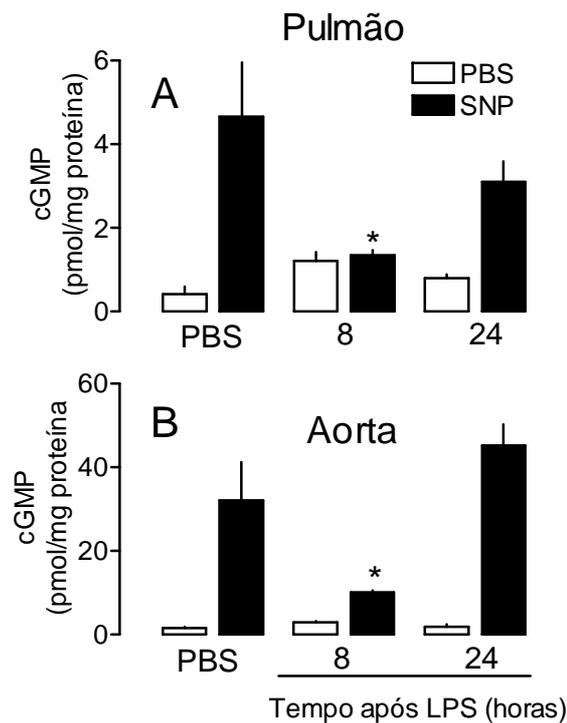
##### ***Ratos endotoxêmicos***

Em seguida, para avaliar a funcionalidade da enzima guanilato ciclase durante este quadro de produção de altos níveis de NO, utilizamos doadores de óxido nítrico como ferramenta farmacológica para ativar a enzima guanilato ciclase sensível ao NO e aumentar a produção de cGMP, com conseqüente vasodilatação e queda na pressão arterial média. A resposta vasodilatadora para trinitrato de glicerila, nitroprussiato de sódio e S-nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP) foi menor em animais injetados com LPS 8 horas antes (Figura 10, Painel B). Por outro lado, a resposta vasodilatadora foi similar aos valores controle, quando o LPS foi injetado 2 ou 24 horas antes (Figura 10, Painéis A e C).

Para uma análise mais refinada sobre o estado da enzima guanilato ciclase solúvel, avaliamos a capacidade de formação do produto da enzima, o cGMP, após estimulação com doador de óxido nítrico. A incubação *in vitro* de fragmentos de pulmão ou aorta retirados de animais controle com nitroprussiato de sódio, gerou um aumento de 10 e 20 vezes nos níveis de cGMP, respectivamente. Entretanto, em tecidos de animais injetados com LPS 8 horas antes, o nitroprussiato de sódio falhou em aumentar os níveis de cGMP. Em contraste, o acúmulo de cGMP induzido por nitroprussiato de sódio nos tecidos de animais injetados com LPS 24 horas antes foi semelhante àqueles obtidos em animais controle (Figura 11).



**Figura 10. Efeito do LPS na resposta vasodilatadora a doadores de NO.** Duas (Painel A), 8 (Painel B) ou 24 horas (Painel C) após a injeção de LPS (12,5 mg/kg, i.p., barras fechadas) ou PBS (barras abertas) os animais foram preparados para registro de pressão arterial. Doses crescentes de trinitrato de glicerila, nitroprussiato de sódio ou SNAP foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial foi registrada. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=8$ . \* $p<0,05$ , em relação ao grupo PBS (teste  $t$  Student para amostras não pareadas).



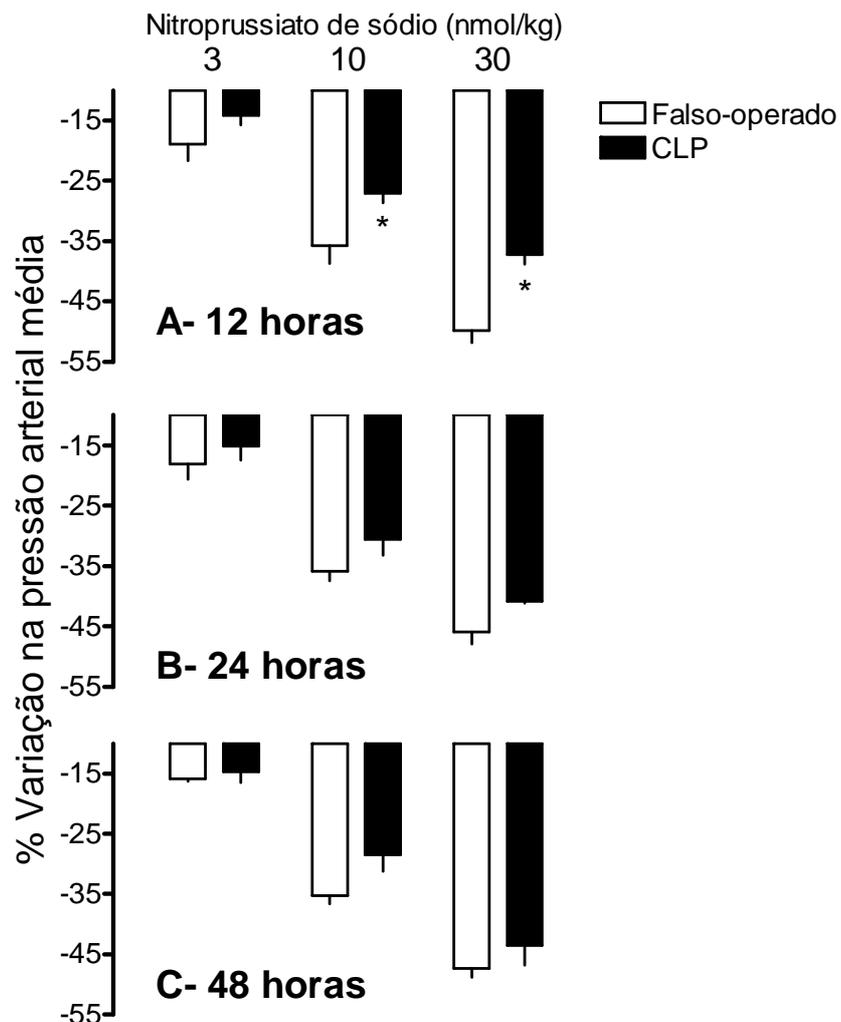
**Figura 11. Produção de cGMP em resposta a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com nitroprussiato de sódio em pulmão ou aorta de ratos injetados com PBS ou LPS.** Oito ou 24 horas após a injeção com LPS (12,5 mg/kg, i.p.) ou PBS, os animais foram sacrificados, um fragmento de pulmão (Painel A) ou de aorta torácica (Painel B) foi retirado e incubado com nitroprussiato de sódio (SNP; 100  $\mu$ M; 10 min, barras fechadas) ou PBS (barras abertas) na presença de isobutilmetilxantina (inibidor inespecífico de fosfodiesterases, 0,1 mM). Os tecidos foram rapidamente congelados e homogenizados em ácido tricloroacético. Os homogenatos foram centrifugados, o sobrenadante coletado, lavado quatro vezes com solução saturada de éter, e o cGMP mensurado por ELISA. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média, n= 3-6. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo PBS/SNP (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

### **Ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

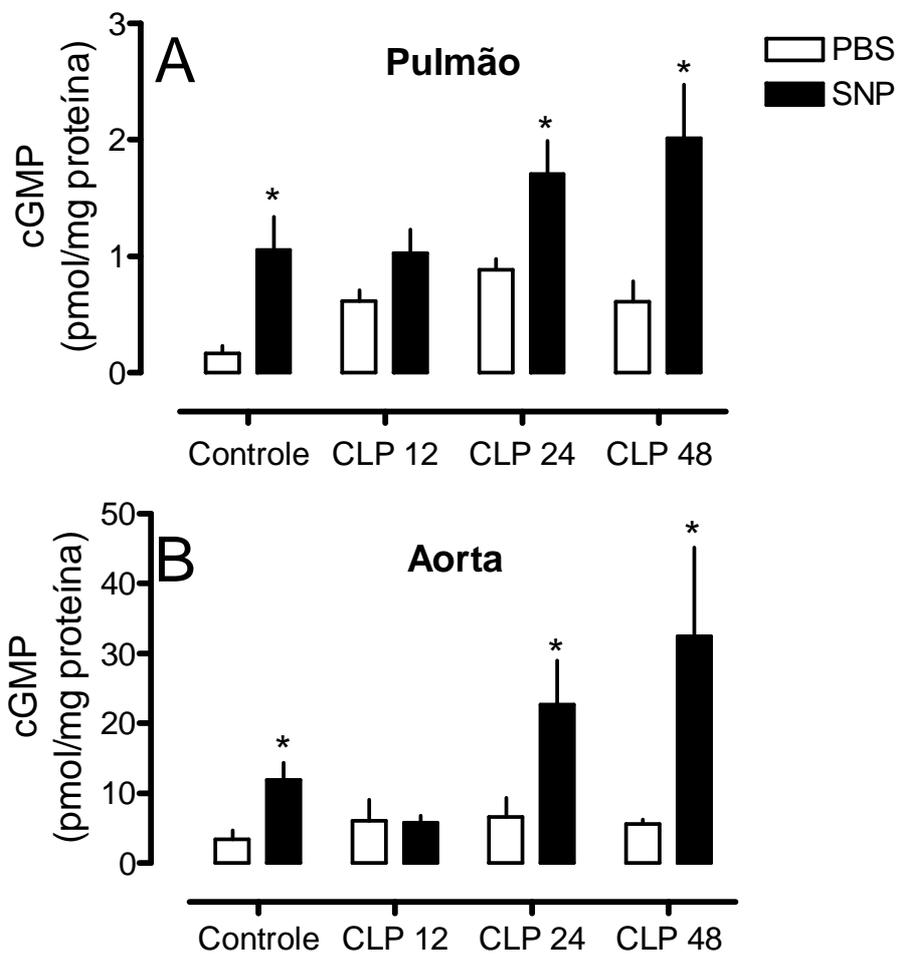
A exemplo do estudo com animais injetados com LPS, avaliamos também a funcionalidade da enzima guanilato ciclase nos animais submetidos ao procedimento de CLP. A resposta vasodilatadora para SNP também foi reduzida somente em animais submetidos a cirurgia de CLP 12 horas antes, apresentando valores similares aos falso-operados nos tempos de 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico (Figura 12).

A incubação *in vitro* com nitroprussiato de sódio do tecido pulmonar ou da aorta retirados dos animais falso-operados, gerou um aumento de 10 vezes nos

níveis de cGMP. Entretanto, em tecidos de animais submetidos ao CLP 12 horas antes, o nitroprussiato de sódio falhou em elevar os níveis de cGMP. Em contraste, o acúmulo de cGMP induzido por nitroprussiato de sódio nos tecidos de animais submetidos ao CLP 24 ou 48 horas antes foi semelhante àqueles obtidos em animais controle (falso-operados, Figura 13).



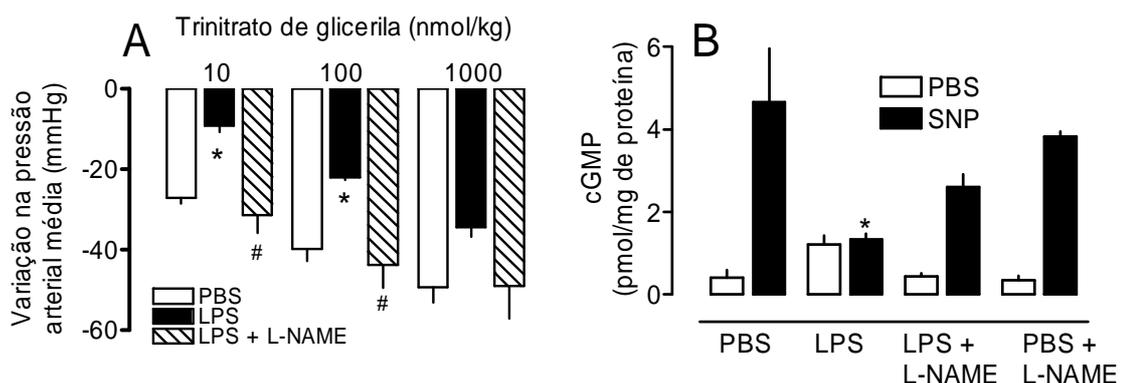
**Figura 12. Efeitos do nitroprussiato de sódio sobre a pressão arterial média de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Doze (Painel A), 24 (Painel B) ou 48 horas (Painel C) após o CLP (barras fechadas) ou falsa cirurgia (barras abertas), os animais foram preparados para o registro da pressão arterial. Doses crescentes de nitroprussiato de sódio foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial foi registrada. Os resultados representam a média ± erro padrão da média, n=8. \* p < 0,05, em relação ao respectivo grupo PBS (teste t Student para amostras não pareadas).



**Figura 13. Produção de cGMP em resposta a estimulação da enzima guanilato ciclase solúvel com nitroprussiato de sódio em pulmão ou aorta de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Doze, 24 ou 48 horas após o procedimento cirúrgico (CLP e falso-operados), os animais foram sacrificados, um fragmento do pulmão (Painel A) ou da aorta torácica (Painel B) foi retirado e incubado com nitroprussiato de sódio (SNP; 100  $\mu$ M; 10 min, barras fechadas) ou PBS (barras abertas) na presença de isobutil-metilxantina (inibidor inespecífico de fosfodiesterases, 0,1 mM). Os tecidos foram rapidamente congelados e homogenizados em ácido tricloroacético. Os homogenatos foram centrifugados, o sobrenadante coletado, lavado quatro vezes com solução saturada de éter, e o cGMP mensurado por ELISA. Como não houve diferença entre os diferentes tempos nos animais falso-operado eles foram agrupados em um único grupo controle. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 3-6$ . \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo PBS/SNP (ANOVA de uma via seguida pelo test  $t$  de Bonferroni).

#### 4.5 Caracterização do envolvimento do óxido nítrico nas alterações da funcionalidade da enzima guanilato ciclase solúvel induzidas pela injeção de LPS

Em seguida avaliamos o envolvimento do NO na alteração da funcionalidade da guanilato ciclase solúvel. Para tanto, após a injeção de LPS, os animais foram tratados com L-NAME, e no tempo em que ocorre o prejuízo na resposta da enzima (8 horas após o LPS), foram avaliados tanto a resposta vasodilatadora, como o acúmulo de cGMP no tecido pulmonar após estímulo com doadores de NO. O tratamento com L-NAME previne tanto a perda da resposta vasodilatadora ao trinitrato de glicerila, como a redução na produção de cGMP após estímulo com SNP (Figura 14).

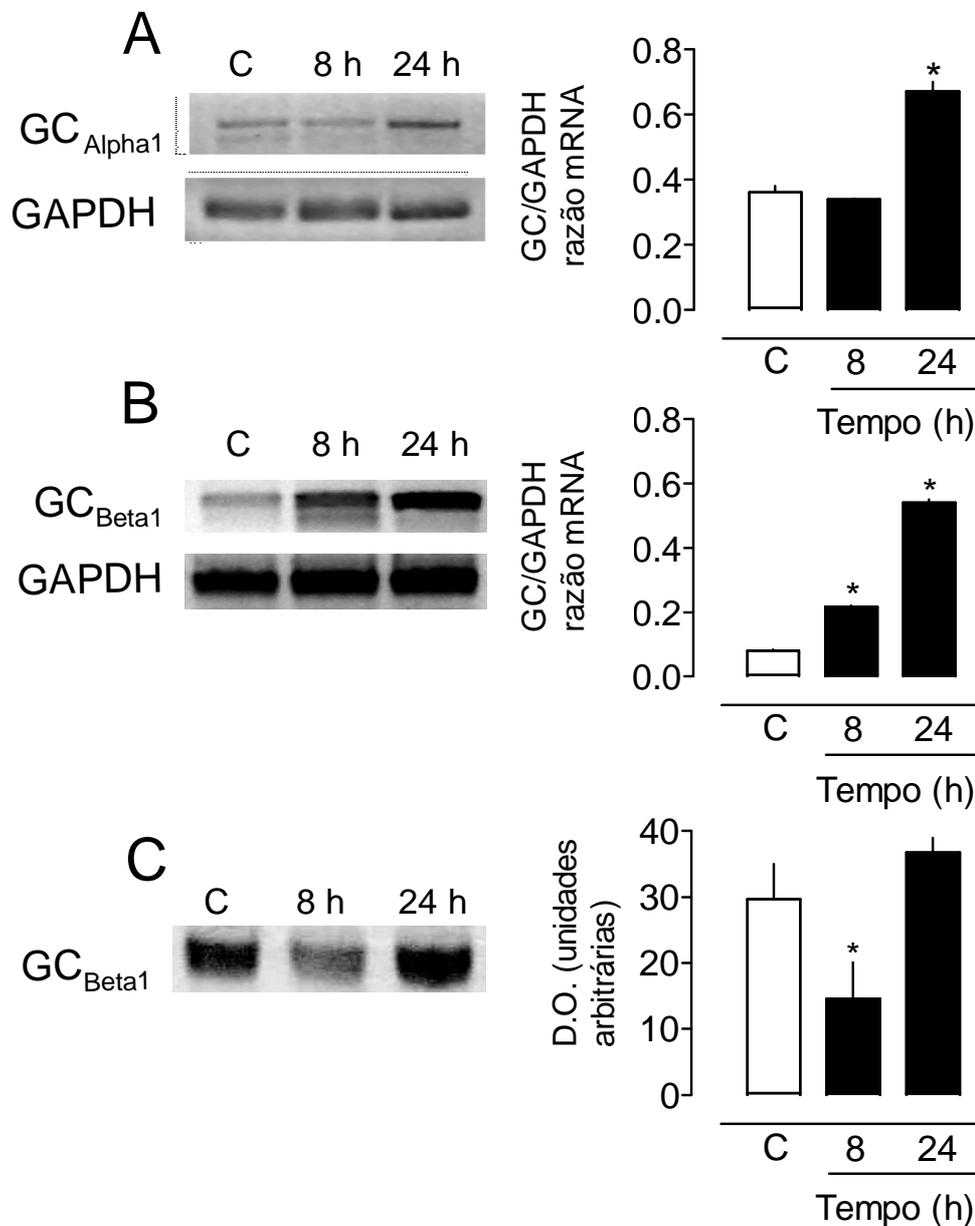


**Figura 14. Efeito do L-NAME nas alterações da resposta vasodilatadora e da produção de cGMP a doadores de NO induzidas pela injeção de LPS.** Painel A: Oito horas após a injeção de LPS (12,5 mg/kg, i.p., barras fechadas) ou PBS (barras abertas), os animais foram preparados para o registro da pressão arterial. Grupos adicionais receberam injeções de L-NAME (55  $\mu$ mol/kg, i.p.; barras hachuradas), uma e seis horas após a injeção de LPS ou PBS. Em cada um desses grupos doses crescentes de trinitrato de glicerila foram injetadas (i.v.) e a variação na pressão arterial foi registrada. Painel B: Um fragmento do pulmão dos mesmos animais mostrados no Painel A foi retirado e incubado com nitroprussiato de sódio (SNP; 100  $\mu$ M; 10 min, barras fechadas) ou PBS (barras abertas) na presença de isobutil-metilxantina (inibidor inespecífico de fosfodiesterases, 0,1 mM). Os tecidos foram rapidamente congelados e homogenizados em ácido tricloroacético. Os homogenatos foram centrifugados, o sobrenadante coletado, lavado quatro vezes com solução saturada de éter, e o cGMP mensurado por ELISA. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média, n= 3-6. Painel A; \* p < 0,05, em relação ao grupo PBS. Painel B; \* p < 0,05, em relação ao grupo PBS/SNP (ANOVA de uma via seguida pelo teste t de Bonferroni).

#### 4.6 Avaliação do perfil de expressão da enzima guanilato ciclase solúvel

##### ***Ratos endotoxêmicos***

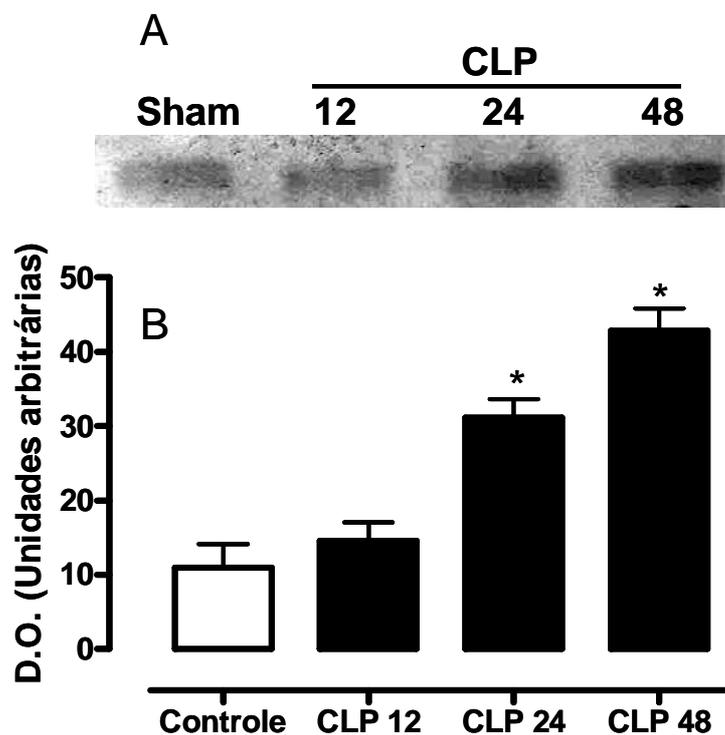
Para avaliar se o prejuízo na resposta da guanilato ciclase sensível ao NO seria consequência da redução no conteúdo protéico da enzima, avaliamos os níveis de mRNA (através de RT-PCR) e da proteína (*Western blot*) após a injeção de LPS. Nos pulmões obtidos de ratos injetados com LPS 8 horas antes, os níveis de mRNA para a subunidade  $\alpha 1$  permaneceram inalterados quando comparados com os animais controle, mas aumentaram em aproximadamente 50% 24 horas após a injeção de LPS (Figura 15, Painel A). Os níveis de mRNA para subunidade  $\beta 1$  apresentaram um aumento já em 8 horas, e um aumento ainda mais expressivo 24 horas após a injeção de LPS (Figura 15, Painel B). Em relação aos níveis protéicos, a injeção de LPS causou uma redução no tempo de 8 horas, mas os níveis de proteína foram similares ao controle 24 horas após o LPS (Figura 15, Painel C).



**Figura 15. Efeito do LPS nos níveis de mRNA e proteína para sGC em pulmão de ratos.** Oito e 24 horas após a injeção de LPS (12,5 mg/kg, i.p., barras fechadas) ou PBS (barras abertas) os ratos foram sacrificados e o pulmão coletado. Painel A: produto do RT-PCR e a razão entre a subunidade  $\alpha_1$  e o GAPDH, obtido por densitometria. Painel B: produto representativo do RT-PCR e a razão entre a subunidade  $\beta_1$  e o GAPDH, obtido por densitometria. Painel C: imunoeletroforese representativa para subunidade  $\beta_1$  da guanilato ciclase solúvel e densitometria. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 3$ . \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

**Ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

Avaliamos também a o padrão de expressão da enzima guanilato ciclase nos animais submtidos ao procedimento de CLP. Diferente do que foi observado no modelo LPS, não houve queda dos níveis protéicos na fase inicial do processo séptico. Pelo contrário, foi observado um aumento na expressão da enzima nos tempos de 24 e 48 horas após o procedimento de CLP (Figura 16).



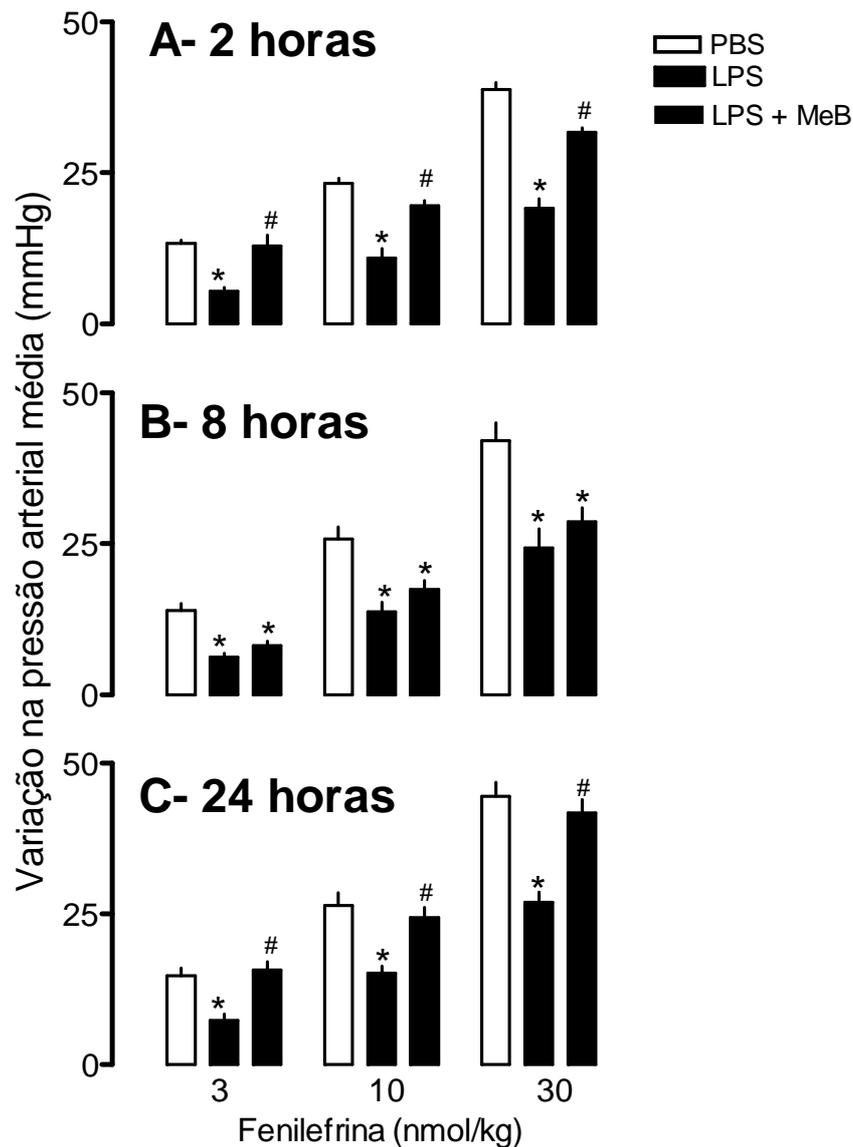
**Figura 16. Avaliação dos níveis da proteína sGC em pulmão de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.** Doze, 24 ou 48 horas após o procedimento cirúrgico (CLP e falso-operados), os animais foram sacrificados e o pulmão coletado. Painel A: Imunoelctroforese representativa para subunidade  $\beta 1$  da guanilato ciclase solúvel. Painel B: densitometria. Cada barra representa a média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 4$ . \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste t de Bonferroni).

#### **4.7 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel na hiporeatividade a vasoconstritores em modelos de sepse experimental**

##### ***Ratos endotoxêmicos***

Com base nas alterações de atividade e expressão da enzima guanilato ciclase observadas após a injeção de LPS, resolveu-se estudar o efeito do azul de metileno sobre a hiporeatividade à fenilefrina induzida por LPS em diferentes tempos. A análise da Figura 4 mostra que a hiporeatividade à fenilefrina em animais injetados com LPS 2 ou 8 horas antes, é idêntica a dos animais que receberam LPS 24 horas antes, mostrando que o prejuízo na resposta vasoconstritora à fenilefrina permanece constante, pelo menos nas primeiras 24 horas após a injeção de LPS. O azul de metileno foi capaz de reverter a perda da resposta à fenilefrina nos animais injetados com LPS 2 ou 24 horas antes (Figura 17, Painéis A e C), tendo entretanto falhado completamente em reverter a hiporeatividade nos animais que receberam LPS 8 horas antes (Figura 17, Painel B). Concordando com dados da literatura (Paya *et al.*, 1993), o azul de metileno não alterou a resposta a vasoconstritores em animais controle (dados não mostrados). Assim, a falha do azul de metileno em melhorar a resposta da fenilefrina coincide com a perda da resposta vasodilatadora a doadores de NO (Figura 10), com o prejuízo na produção de cGMP induzido por SNP (Figura 11) e com uma redução nos níveis da proteína guanilato ciclase solúvel (Figura 15, Painel C).

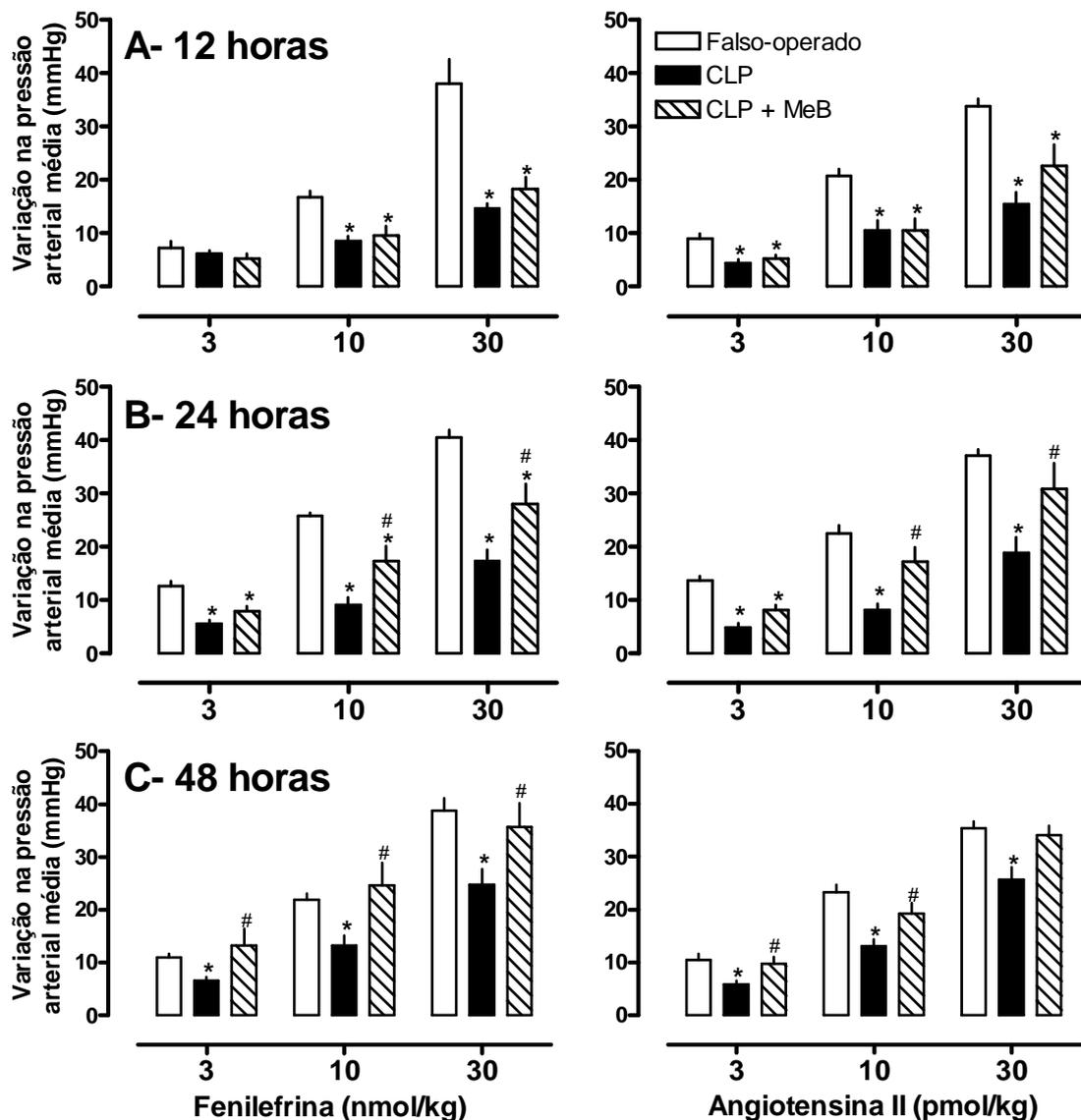
Portanto, a injeção de LPS gera um importante aumento na produção de óxido nítrico, que por sua vez altera a funcionalidade da enzima guanilato ciclase, e isto parece determinar a eficiência de inibidores da enzima como o azul de metileno (Figura 17) em reverter a hiporeatividade a fenilefrina.



**Figura 17. Efeito do azul de metileno na hiporeatividade à fenilefrina induzida por LPS.** Duas (Painel A), 8 (Painel B) ou 24 horas (Painel C) após a injeção de LPS (12,5 mg/kg, i.p, barras fechadas) ou PBS (barras abertas), os animais foram preparados para o registro da pressão arterial. Doses crescentes de fenilefrina foram injetadas e a variação na pressão arterial média registrada. Após a injeção da última dose de fenilefrina os animais receberam uma injeção de azul de metileno (10 mg/kg i.v., barras hachuradas) ou PBS. Trinta minutos após a injeção de azul de metileno ou PBS outra curva dose resposta para fenilefrina foi realizada e as variações na pressão arterial novamente registradas. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$ . \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo PBS. #  $p < 0,05$ , em relação ao grupo LPS (ANOVA de duas vias seguida pelo test  $t$  de Bonferroni).

***Ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco***

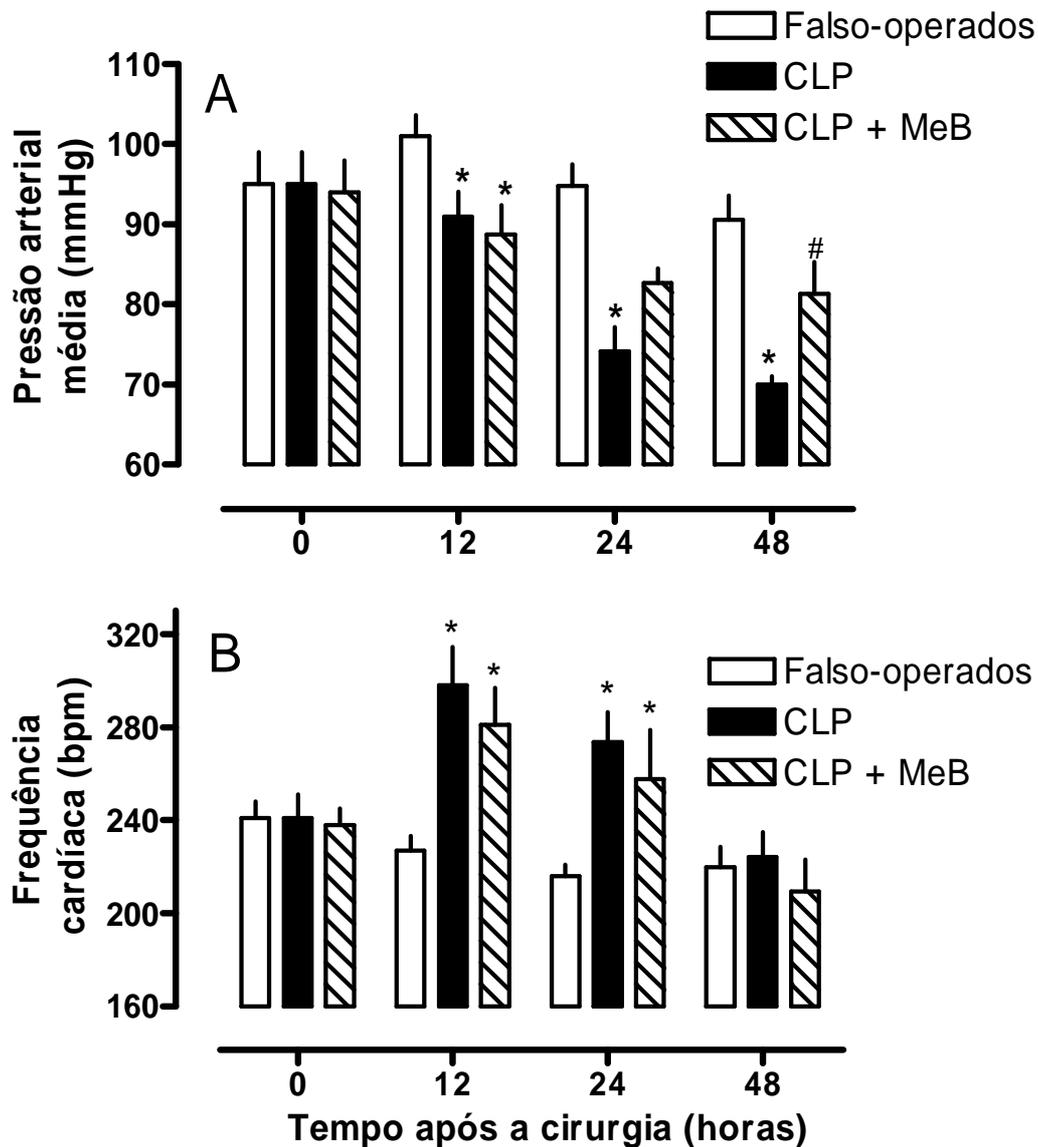
Avaliamos também o efeito do azul de metileno sobre a hiporeatividade a vasoconstritores em diferentes tempos após o procedimento de CLP. O azul de metileno foi capaz de reverter a hiporeatividade tanto à fenilefrina como à angiotensina II em animais submetidos ao CLP 24 ou 48 horas antes (Figura 18, Painéis B e C). Entretanto, o azul de metileno falhou completamente em reverter a hiporeatividade a estes vasoconstritores em animais submetidos ao CLP 12 horas antes (Figura 18, Painel A).



**Figura 18.** Efeito do azul de metileno na hiporeatividade à fenilefrina e angiotensina II em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco. Doze (Painel A), 24 (Painel B) ou 48 horas (Painel C) após o procedimento cirúrgico, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial. Doses crescentes de fenilefrina ou angiotensina II foram injetadas e a variação na pressão arterial média registrada. Após a injeção da última dose de fenilefrina os animais receberam uma injeção de azul de metileno (10 mg/kg i.v., barras hachuradas) ou PBS. Trinta minutos após a injeção de azul de metileno ou PBS outra curva dose resposta para fenilefrina ou angiotensina foi realizada e as variações na pressão arterial novamente registradas. Os resultados representam a média  $\pm$  erro padrão da média,  $n=6$ . \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo PBS. #  $p < 0,05$ , em relação ao grupo LPS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### **4.8 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a hipotensão e taquicardia induzidas em ratos pela cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

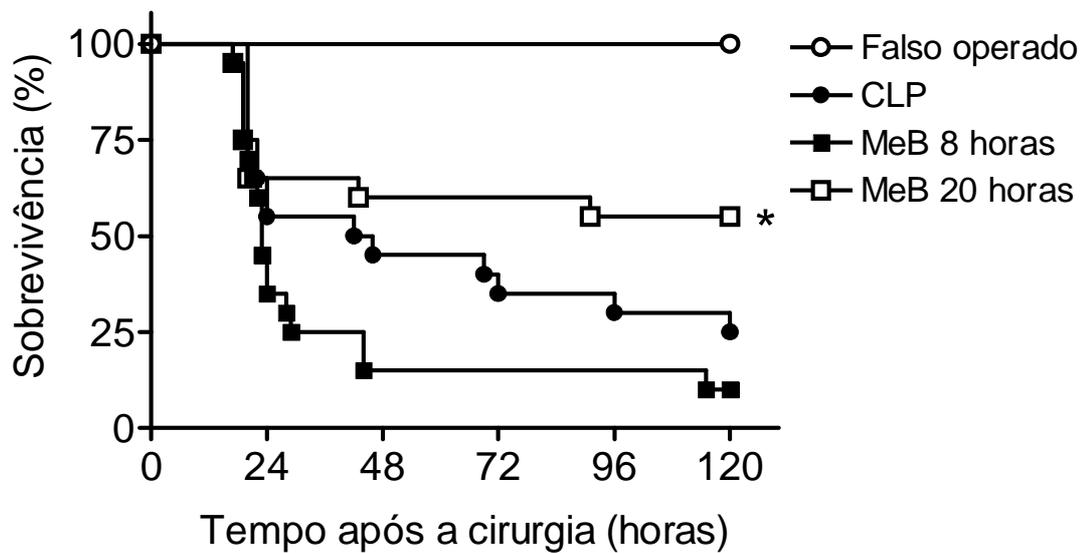
Avaliamos o efeito do azul de metileno sobre as alterações hemodinâmicas induzidas pelo procedimento de ligadura e perfuração do ceco. Como já mostrado anteriormente, após o CLP os animais apresentam uma queda progressiva da pressão arterial. O azul de metileno foi capaz de normalizar os valores de pressão arterial média somente no tempo de 48 horas, falhando todavia em reverter a hipotensão observada no tempo de 12 e 24 horas após o CLP (Figura 19, Painel A). O azul de metileno não modificou o curso das alterações dos valores de frequência cardíaca dos animais submetidos ao CLP em nenhum dos tempos avaliados (Figura 19, Painel B). Em concordância com outros relatos da literatura (Keaney *et al.*, 1994; Cheng e Pang, 1998), o azul de metileno não alterou a pressão arterial e a frequência cardíaca de animais controle (dados não mostrados).



**Figura 19.** Efeito do azul de metileno sobre a pressão arterial média e a frequência cardíaca de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco. Os animais foram preparados para o registro da pressão arterial média e frequência cardíaca 0, 12, 24 e 48 horas após o procedimento cirúrgico, conforme indicado na legenda. Os dados apresentados no grupo controle (barras abertas) representam os animais falso-operados. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão da média de pelo menos 6 experimentos. \*  $p < 0,05$ , em relação ao grupo controle (barra aberta) (ANOVA de uma via seguida pelo teste  $t$  de Bonferroni).

#### **4.9 Efeito da inibição da enzima guanilato ciclase solúvel sobre a mortalidade de ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco**

A fim de verificar se o padrão do efeito do azul de metileno sobre a hiporeatividade a vasoconstritores poderia ter implicações no resultado final do CLP, avaliamos o efeito desta droga sobre o índice de mortalidade dos animais neste modelo. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram divididos em três grupos: um grupo controle, um grupo que recebeu uma única injeção de azul de metileno 8 horas após a cirurgia e outro grupo que recebeu azul de metileno 20 horas após a cirurgia. A mortalidade foi avaliada ao longo de 5 dias. O índice de mortalidade geral no grupo CLP que recebeu salina foi 25% ao final da análise. Quando o azul de metileno foi injetado 8 horas após o CLP a mortalidade dos animais piorou no ponto de 20 horas. Apesar disso, o valor ao final de 5 dias foi semelhante ao grupo controle (10%). Por outro lado, os animais que receberam azul de metileno no tempo de 20 horas após o CLP, a mortalidade final foi de 55%, sendo significativamente melhor que o controle (Figura 20).



**Figura 20. Efeito do azul de metileno na sobrevivência de ratos submetidos à cirurgia de perfuração e ligadura do ceco (CLP).** Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de perfuração e ligadura do ceco (CLP). Após a cirurgia, os animais foram divididos em três grupos. Um grupo recebeu azul de metileno (10 mg/kg, s.c.) no tempo de oito horas após o procedimento cirúrgico. Outro grupo recebeu azul de metileno (10 mg/kg, s.c.) 20 horas após a cirurgia. No terceiro grupo, controle, a metade dos animais recebeu PBS (veículo) no tempo de 8 horas e a outra metade no tempo de 20 horas após o CLP. Como não houve diferença entre estes dois subgrupos, eles foram agrupados. O grupo falso operado foi submetido à anestesia e abertura do abdome, mas não sofreu a ligadura e perfuração do ceco. A sobrevivência foi avaliada ao longo de 5 dias. (\*  $p < 0,05$  em relação ao grupo CLP; comparados pelo teste log-rank,  $n = 20$ ).

DISCUSSÃO

---

Em 1980, Furchgott and Zawadski descreveram um vasodilatador de músculo liso liberado de células endoteliais em resposta à acetilcolina. Sete anos mais tarde este fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelial-derived relaxant factor*) foi identificado como sendo o NO (Palmer *et al.*, 1987). Iniciava-se a saga do NO. Poucos mediadores foram tão estudados em tão pouco tempo. O NO é considerado uma das maiores descobertas científicas do final do século XX, e todos os aspectos de sua química e biologia vem sendo extensamente estudados. A importância das descobertas acerca do NO, aclamado como “a molécula do ano” em 1992 (Koshland, 1992), rendeu o prêmio Nobel de Medicina de 1998 a Robert Furchgott, Louis Ignarro e Ferid Murad.

Enquanto a identidade do EDRF permanecia desconhecida, Stuehr e Marletta (1985) mostraram pela primeira vez, utilizando macrófagos de camundongos, a produção de nitrato/nitrito em células de mamíferos *in vitro* em resposta ao lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Estava então demonstrada inequivocamente pela primeira vez a produção de óxidos de nitrogênio em células específicas de mamíferos. Imediatamente começaram a surgir vários trabalhos que implicavam os óxidos de nitrogênio em diversas funções fisiopatológicas. Destaca-se a demonstração feita por Hibbs e colegas (1987) de que a L-arginina era substrato para formação de nitrato e nitrito, e que este evento era necessário para citotoxicidade de macrófagos ativados contra células tumorais.

Em pouco tempo vários modelos animais e dados clínicos em humanos forneceram evidências de um aumento na produção de NO na sepse. Citocinas associadas com a sepse (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , interferon- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ ) e endotoxinas (como por exemplo LPS) induzem a expressão da NOS-2, aumentando a produção de NO (Salvemini *et al.*, 1990; Nathan e Xie, 1994; Liu *et al.*, 1993). À luz da função do NO como vasodilatador endógeno e da observação do tônus vascular reduzido após a administração de endotoxina (LPS) ou citocinas pró-inflamatórias em animais, logo surgiu a idéia de uma função patogênica para o NO derivado da NOS-2 durante a sepse. Adicionalmente, animais deficientes de NOS-2 demonstram resistência a hipotensão e mortalidade induzidas por endotoxina (Gunnnett *et al.*, 1998, MacMicking *et al.*, 1995). Juntos estes dados confirmavam que a expressão da NOS-2 e a conseqüente produção de NO contribuíam para vasodilatação excessiva,

hiporeatividade a vasoconstritores, aumento de permeabilidade vascular e depressão cardíaca, sendo todas estas, características clínicas de pacientes em choque séptico.

Uma grande quantidade de mediadores é liberada durante a sepse, cada um deles com uma função proeminente (Brandtzaeg, 1996; Beishuizen *et al.*, 1999). A medida que cada um destes mediadores é identificado, eles passam a ser estudados como potencial alvo terapêutico para sepse. Entretanto poucos mediadores geraram tanta expectativa no campo da sepse como o NO. Este gás de estrutura química simples, mostrou uma biologia complexa, podendo interagir com uma grande diversidade de alvos, modulando assim vários sistemas. O NO foi então acusado como grande vilão do quadro de sepse, e a utilização de inibidores da enzima da NOS parecia uma solução milagrosa para reduzir os altos índices de mortalidade desta doença. Como conseqüência, em pouco tempo após a descoberta do NO, um grande ensaio clínico utilizando L-NMMA (um inibidor não seletivo de NOS) foi realizado em pacientes com sepse. Apesar de alguns estudos iniciais bastante promissores (Grover, 1999) o *trial* prospectivo de fase III, randomizado, duplo-cego, controlado com placebo foi interrompido devido ao inesperado aumento na mortalidade dos pacientes tratados (Lopez *et al.*, 2004). Estes dados polemizaram os estudos acerca do NO e o seu envolvimento na sepse humana. Atualmente este ensaio clínico tem sido severamente criticado pelo desenho inadequado do protocolo, que gerou um aumento da toxicidade, provavelmente pela inibição excessiva da NOS-3. Portanto, estes resultados frustrantes mostram somente que precisamos de um melhor entendimento da função do NO na sepse, bem como de suas vias de sinalização, antes de nos aventuramos em ensaios clínicos.

A guanilato ciclase solúvel é um dos principais efetores do NO, principalmente no sistema cardiovascular. A ativação excessiva desta enzima pelo NO durante a sepse tem sido mostrada com uma das principais responsáveis pelo colapso hemodinâmico durante o quadro séptico. Assim, principalmente na última década, vários estudos têm focado a guanilato ciclase como alvo potencial para o desenvolvimento de novas drogas em patologias onde a alta produção de NO apresenta efeitos deletérios (Evgenov e Bjertnas, 2003). Alguns trabalhos em

animais têm demonstrado que o azul de metileno pode melhorar as condições hemodinâmicas de animais endotoxêmicos (Cheng e Pang, 1998; Paya *et al.*, 1993; Keaney *et al.*, 1994). Em 1992, Schneider e colaboradores demonstraram um aumento na pressão arterial após injeção intravenosa *in bolus* de azul de metileno em pacientes com choque séptico. Adicionalmente, nove trabalhos clínicos foram publicados nos últimos 10 anos (Schneider *et al.*, 1992; Daemen-Gubbels *et al.*, 1995; Gachot *et al.*, 1995; Preiser *et al.*, 1995; Andresen *et al.*, 1996; Andresen *et al.*, 1998; Weingartner *et al.*, 1999; Kirov *et al.*, 2001; Memis *et al.*, 2002), incluindo o primeiro estudo controlado e randomizado de uma infusão de curta duração de azul de metileno em pacientes com choque séptico hiperdinâmico (Kirov *et al.*, 2001). Sumarizando, estes estudos mostram que o azul de metileno pode aumentar a pressão arterial, melhorar a função cardíaca, manter o transporte de oxigênio e reduzir o suporte adrenérgico, trazendo à tona uma antiga droga como nova possibilidade para tratamento da sepse.

A falta de uma terapia realmente efetiva para o tratamento do choque séptico tem lançado a indústria farmacêutica em uma busca persecutória por uma nova droga que atenda a esta necessidade. A cada mês aparecem inúmeros trabalhos na literatura com evidências de potenciais candidatos para o tratamento da sepse. Entretanto, até o momento praticamente nenhuma destas estratégias resultou em uma redução significativa na mortalidade dos pacientes (Riedemann *et al.*, 2003). Um bom exemplo é o anticorpo anti-TNF $\alpha$ . A injeção de LPS em ratos gera um aumento substancial dos níveis de TNF- $\alpha$  circulante. Adicionalmente, a infusão de TNF- $\alpha$  induz sintomas característicos de sepse (Michie *et al.*, 1988), ao passo que a imunização passiva com anti-TNF- $\alpha$  teve efeito protetor. Altos níveis de TNF- $\alpha$  também foram achados no soro de humanos após a injeção intravenosa de LPS (Michie *et al.*, 1988). Seguiram-se alguns trabalhos confirmando que o bloqueio do TNF- $\alpha$  protegia camundongos de choque endotóxico letal (Beutler *et al.*, 1985; Tracey *et al.*, 1986; Tracey *et al.*, 1987). Apesar de todas estas evidências, o ensaio clínico subsequente falhou em demonstrar a utilidade desta terapia na sepse humana ou em CLP de camundongos. Portanto, o surgimento de uma “nova” possibilidade terapêutica para o tratamento do choque séptico, como o azul de

metileno, deixa evidente que muitas vezes melhor do que buscar novas estratégias é compreender as que já estão disponíveis.

Entretanto, o melhor entendimento da ação de um fármaco implica necessariamente no entendimento do alvo de ação da droga e a falta deste entendimento pode trazer uma série de prejuízos sociais e econômicos. Um bom exemplo disso são os inibidores da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2). A indústria farmacêutica investiu consideráveis quantias de dinheiro em uma busca incessante por drogas que inibissem seletivamente a COX-2, com a certeza que seriam anti-inflamatórios eficientes e desprovidos de efeitos colaterais. Entretanto, pouco tempo após a entrada destas drogas no mercado, veio a decepção. Primeiro, esta nova classe de drogas não mostrou melhor ação anti-inflamatória entre as drogas que já estavam no mercado, e segundo, o uso crônico de uma destas drogas (rofecoxib, Vioxx®) desencadeou sérios problemas cardiovasculares, a ponto de ser retirada do mercado.

Enquanto isso, “velhos” fármacos como a aspirina, ganham novas utilidades chegando a receber a denominação de substância “milagrosa” por ser benéfica não apenas na inflamação, mas em um número crescente de condições. Atualmente, além de ser usado como analgésico, anti-inflamatório e antipirético, a aspirina é muito utilizada em pacientes com insuficiência coronariana, para prevenção de trombos, devido a sua atividade anti-plaquetária. Além disso, tem sido apontada como possibilidade no tratamento de alguns tipos de câncer (ver, por exemplo, Harris *et al.*, 2005) e ainda há evidências de que a aspirina também reduz o risco da doença de Alzheimer (ver Imbimbo, 2004). Em 2002, Amann e Peskar publicaram uma revisão descrevendo 5 mecanismos para a ação antiinflamatória da aspirina, o que é no mínimo curioso, já que o renomado cientista John R. Vane ganhou o prêmio Nobel em 1982, por elucidar o mecanismo de ação da aspirina. Isto mostra novamente, que muitas vezes, tão importante quanto descobrir novos fármacos é compreender melhor as que já temos. A medicina moderna pode ainda se beneficiar muito utilizando “velhos” fármacos para novas indicações.

Portanto, baseado em experiências prévias fica evidente a necessidade de uma avaliação mais detalhada de drogas como o azul de metileno, o que implica em um estudo em paralelo do seu principal alvo, a enzima guanilato ciclase. Assim

avaliamos o envolvimento desta enzima nas alterações cardiovasculares durante a sepse, bem como o seu padrão de funcionalidade durante este processo.

A alta produção de NO pela NOS-2 após a injeção de LPS é claramente observada através da mensuração dos níveis plasmáticos dos metabólitos estáveis do NO (nitrato/nitrito; NOx; Figura 3). A administração de toxinas exógenas (como LPS ou zymosan) é um modelo amplamente utilizado pela comunidade científica para estudar os efeitos consequentes da expressão da NOS-2 (Buras *et al.*, 2005). A injeção de LPS, além de gerar um importante aumento na produção de NO, causa uma redução na resposta à fenilefrina (Figura 4), reproduzindo em animais algumas características clínicas do choque séptico. A análise da Figura 4 mostra que a hiporeatividade à fenilefrina já é evidente a partir de 2 horas, e permanece constante por pelo menos 24 horas.

É importante chamar a atenção que os altos níveis de nitrato/nitrito, não necessariamente indicam a presença de altos níveis de NOS-2 produzindo NO ativamente. Diversos autores já investigaram em vários tecidos, o decurso do aparecimento da NOS-2 após a administração de uma única dose de LPS (Knowles *et al.*, 1990; Salter *et al.*, 1991; Cunha *et al.*, 1994; Ress *et al.*, 1995). Todos estes estudos demonstram que a atividade da NOS-2 atinge seu pico, invariavelmente, entre a 4<sup>a</sup> e 8<sup>a</sup> hora após o LPS, atingindo valores muito baixos na 24<sup>a</sup> hora de endotoxemia. Através de imunoeletroforese, nosso laboratório demonstrou que há uma grande quantidade de enzima NOS-2 na aorta de ratos 8 horas após a administração de LPS. Por outro lado, na 24<sup>a</sup> hora de endotoxemia, detectamos apenas uma pequena quantidade de NOS-2 na aorta dos animais (Silva-Santos *et al.*, 2002). Assim os altos níveis de nitrato/nitrito observados nos tempos mais tardios devem ser interpretados com cuidado, não sendo tomados com índice de produção ativa de NO.

Uma vez que o NO reage facilmente com tióis intracelulares, formando os S-nitrosotióis (para revisão ver Butler e Rhodes, 1997 ou Hogg, 2002), é possível que a grande quantidade de NO produzida pela NOS-2 durante as primeiras horas de endotoxemia, interaja com tióis endógenos (como a glutatona) formando estoques intracelulares de nitrosotióis. Em períodos posteriores (como na 24<sup>a</sup> hora após a injeção de LPS), quando não existe uma alta produção de NO (a julgar pela pequena

quantidade de NOS-2 encontrada na aorta), o NO pode ser liberado desses nitrosotíóis.

Mais recentemente, alguns trabalhos têm mostrado que o nitrato não é um metabólito tão estável como se imaginava, podendo ser convertido em NO novamente. Várias vias distintas têm sido implicadas neste processo de reciclagem. Interessantemente todas estas reações são enormemente acentuadas em condições de hipóxia. Portanto, durante a sepse, uma condição invariavelmente associada a uma má perfusão tecidual, este processo de reciclagem de NO pode ser fundamental para a manutenção dos efeitos do NO, mesmo na ausência de altos níveis da enzima NOS-2 (para revisão ver Lundberg e Weitzberg, 2005).

Uma explicação, adicional é que devido à disfunção renal que ocorre nestes modelos de sepse (Buras *et al.*, 2005), os metabólitos do NO (nitrato e nitrito) não são excretados e dessa maneira, acumulam no sangue.

Outro ponto importante é que a hiporeatividade à fenilefrina é evidente já em 2 horas após a injeção de LPS, momento que os níveis de nitrato/nitrito ainda são idênticos ao controle (comparar figuras 3 e 4). Entretanto trabalhos prévios demonstraram que o prejuízo na resposta a vasoconstritores ocorre 60 minutos após a injeção de LPS em ratos anestesiados, enquanto que o aumento na expressão da NOS-2 só pode ser detectado a partir de 4 horas após a injeção de LPS (Julou-Schaeffer *et al.*, 1990; Szabo *et al.*, 1993). Este efeito parece estar associado ao NO originado das enzimas constitutivas (Szabo *et al.*, 1993).

Muitos agentes terapêuticos que foram efetivos contra sepse em animais falharam em demonstrar benefícios similares em humanos (Riedemann, 2003). Várias razões podem ser apontadas para esta falha: i) a falta de definição clara do estágio do paciente para obter-se uma amostra homogênea no estudo; ii) heterogeneidade das populações estudadas em relação a idade, raça e comorbidades; e iii) a aplicação de uma terapia baseada em observações incorretas ou incompletas em modelos animais de sepse.

O modelo de injeção de LPS é altamente reprodutível, permitindo administrar com precisão a mesma carga de toxina em todos os animais, sendo uma ferramenta prática para estudar alguns parâmetros inflamatórios. Entretanto, embora reproduza algumas características da sepse humana, como a hiporeatividade a

vasoconstritores e o aumento da produção de NO, a injeção de LPS é muito distante da condição observada na clínica. A injeção em bolus de LPS resulta em aumento rápido e transitório nos níveis de citocinas circulantes. É importante notar que a sepse clínica difere desta resposta por apresentar uma elevação prolongada de citocinas circulantes, cujas concentrações são várias ordens de magnitude abaixo dos modelos de endotoxina. Além disso, e talvez mais importante, a injeção de LPS não representa um processo infeccioso (Remick *et al.*, 2000; Freise *et al.*, 2001; Esmon, 2004; Buras *et al.*, 2005).

Em decorrência destas limitações, a técnica de CLP tem ganhado popularidade por sua similaridade com a progressão da sepse humana. Notavelmente o perfil de citocinas observado no modelo de CLP é semelhante ao observado em pacientes, recriando as fases hemodinâmicas e metabólicas observadas na prática clínica (Remick *et al.*, 2000). O modelo de CLP é considerado padrão de ouro na pesquisa de sepse, e mimetiza uma ruptura do apêndice ou perfuração intestinal. A técnica envolve uma laparotomia, exteriorização do ceco, ligação e perfuração da válvula íleo-cecal. Desta maneira, este procedimento cria uma perfuração intestinal com extravazamento do conteúdo cecal no peritônio, gerando uma infecção com microbiota diversa (para detalhes ver Buras *et al.*, 2005; revisão muito interessante em que os autores discutem as vantagens e desvantagens de diferentes modelos de sepse).

Como evidenciado por diversos autores, o modelo de CLP empregado neste trabalho mostrou um índice de mortalidade que variou de acordo com o número de furos. Como a mortalidade nos animais que sofreram 5 furos foi de apenas 30%, o que tornaria difícil a visualização de manobras que levassem à possível redução deste valor, optamos por focar os experimentos com CLP 20 furos.

O desenvolvimento da sepse humana é dividido em duas fases hemodinâmicas distintas: a primeira fase (inicial) é conhecida como fase hiperdinâmica. Esta fase é caracterizada por uma baixa resistência periférica e aumento no débito cardíaco (Parker e Parrillo, 1983; Groeneveld *et al.*, 1986). Durante a progressão da sepse o débito cardíaco cai e os valores de resistência vascular periférica permanecem baixos. A combinação de baixo débito cardíaco e diminuição da resistência vascular periférica bem como hiporeatividade a

vasoconstritores são características de choque séptico, e definem a segunda fase (tardia), conhecida como hipodinâmica da sepse (Abraham *et al.*, 1983).

Embora não tenhamos avaliado o débito cardíaco, mas somente os valores de frequência cardíaca, o modelo de CLP de 20 furos apresentou características hemodinâmicas muito similares às descritas no parágrafo anterior. Portanto, ocorre uma hipotensão progressiva e hiporeatividade a vasoconstritores (fenilefrina e angiotensina II), que foi constante durante todo o tempo de análise (Figura 7). Além disso, fica evidente um aumento da frequência cardíaca nos tempos iniciais do CLP (Figura 5). Ainda mais interessante, em paralelo a estes eventos ocorre um expressivo aumento nos níveis de NOx, indicando uma elevada produção de NO (Figura 6). Estes eventos se assemelham às condições humanas, e confirmam que este modelo é confiável, relevante e de boa aplicabilidade para estudo da sepse.

Um ponto importante é que a hiporeatividade a vasoconstritores foi observada tanto para fenilefrina como angiotensina II, compostos que atuam em diferentes receptores, mostrando que este efeito é amplo e não parece se restringir a uma simples falha de ativação de um receptor específico.

No presente estudo a injeção de LPS não causou queda na pressão arterial dos ratos. Não temos uma boa explicação para este fato, mas outros grupos também têm falhado em demonstrar uma queda significativa na pressão arterial de ratos Wistar após a injeção de doses similares de LPS (15 mg/kg), embora tenham documentado um aumento na expressão da NOS-2, produção de NO e TNF- $\alpha$  circulante (Lee *et al.*, 2001; Yamaguchi *et al.*, 2006). Os autores implicam a linhagem Wistar como responsável por esta resistência. De fato, a sensibilidade de diferentes linhagens de ratos ao LPS varia enormemente (Fink e Heard, 1990), sendo algumas linhagens bastante resistentes aos sintomas de toxicidade do LPS (Lee *et al.*, 2001).

Os animais falso operados mostram um aumento de temperatura corporal, mostrando que, embora não ocorra uma produção de NO nem alterações cardiovasculares, estes animais apresentam uma resposta inflamatória induzida pelo procedimento. De maneira interessante, os animais CLP 20 furos não apresentaram um aumento de temperatura na mesma magnitude dos animais falso-operados ou 5 furos (Figura 2). Talvez isto decorra de prejuízo na liberação, ou resposta aos mediadores responsáveis pela hipertermia, ou mais provavelmente, este efeito é

conseqüência do colapso cardiovascular. A análise das Figuras 2 e 5 mostra que os valores de temperatura corporal tornam-se mais baixos na medida que a hipotensão torna-se mais severa. Portanto, os animais submetidos ao CLP 20 furos não apresentam um quadro de hipertermia, provavelmente por apresentarem uma maior troca de calor com o meio ambiente, e este efeito deve ser conseqüência principalmente da vasodilatação excessiva. Estes dados tornam-se interessantes a luz de observações de que 13 a 25% dos pacientes com sepse apresentam hipotermia e isto foi associado com aumento da mortalidade (Arons *et al.*, 1999; Bernard *et al.*, 1997; Peres-Bota *et al.*, 2004). Além de sugerir um grave colapso cardiovascular, vários autores têm mostrado que a hipotermia reduz a resposta imune e aumenta a incidência de complicações relacionadas à infecção (Russwurm *et al.*, 2002). Mais ainda, o aumento de temperatura corporal é importante para induzir a expressão de *heat shock proteins*, que por sua vez previnem algumas disfunções durante a sepse. Villar e colaboradores, por exemplo, mostraram que o pré-tratamento térmico (15 minutos a 41°C 18 h antes do CLP) reduz o dano pulmonar e a taxa de mortalidade, um efeito que parece estar relacionado com aumento da expressão da HSP-70 (Ribeiro *et al.*, 1994).

Estudos em humanos ainda não definiram se a febre durante a sepse deve ou não ser controlada (Poblete *et al.*, 1997; Gozzoli *et al.*, 2001). Entretanto os dados obtidos até agora mostram a forte relação entre resposta inflamatória, processo infeccioso, alterações cardiovasculares, temperatura corporal e o prognóstico da doença, tornando fundamental a compreensão da relação destes processos.

Estando caracterizados alguns parâmetros do modelo experimental de choque séptico, voltamos a atenção para o padrão de funcionalidade da enzima guanilato ciclase solúvel durante o transcurso deste modelo.

A utilização de um inibidor da enzima NOS bloqueou a produção de NO e cGMP após a injeção de LPS. Mais ainda, foi capaz de impedir o estabelecimento da hiporeatividade à fenilefrina. Portanto, estes dados corroboram vários trabalhos na literatura que mostram uma clara relação entre NO, guanilato ciclase e hiporeatividade a vasoconstritores na sepse (Fleming *et al.*, 1991; Paya *et al.*, 1993; Keaney *et al.*, 1994; Silva-Santos *et al.*, 2002).

Recentemente foi demonstrado pelo grupo da Dra. Salvemini, que a produção de superóxido que acontece na resposta inflamatória pode oxidar as catecolaminas endógenas (adrenalina e noradrenalina) destruindo sua atividade biológica, resultando assim em prejuízo na resposta vasoconstritora (Macarthur *et al.*, 2000). Entretanto, esta não parece ser uma boa explicação para a hiporeatividade observada nos nossos experimentos, uma vez que a fenilefrina, uma catecolamina cujo grupamento metila adicional em relação à noradrenalina confere certa resistência aos processos de oxidação, também apresenta prejuízo na resposta vasoconstritora. Mais ainda, a angiotensina II, um peptídeo cuja resposta não é afetada pelo stress oxidativo, também tem a resposta reduzida (Figura 7).

Diante de evidências mostrando a relação entre produção de níveis altos de NO, ativação da guanilato ciclase e colapso cardiovascular, muitos grupos tem estudado a interação entre estes fatores. Assim, surgiram trabalhos mostrando que a exposição de anéis de artéria coronária bovina ou aorta de rato ou de células musculares lisas em cultura ao NO exógeno gerava um prejuízo na resposta vasodilatadora e na produção de cGMP (Henry *et al.*, 1989; Papapetropoulos *et al.*, 1996). Na sequência, alguns grupos mostraram que a exposição de tecidos vasculares ou células de musculo liso vascular a citocinas ou endotoxinas também diminuía a resposta vasodilatadora, bem como a produção de cGMP, induzidas por doadores de NO (De Kimpe *et al.*, 1994; Tsuchida *et al.*, 1994; Scott e Nakayama, 1998b; Takata *et al.*, 2001). Estes resultados corroboram os trabalhos anteriores com doadores de NO, e ainda mostram que a produção endógena de NO pode modular negativamente a atividade da sGC.

Diante deste cenário resolvemos então avaliar o estado funcional da enzima guanilato ciclase em uma condição *in vivo* de alta produção de NO, como a que acontece no choque endotóxico. Como pode ser visto na Figura 10, no tempo de 8 horas após a injeção de LPS ocorre prejuízo de aproximadamente 50% na resposta vasodilatadora de doadores de NO. Por outro lado, quando o LPS foi injetado 2 ou 24 horas antes, a resposta vasodilatadora foi similar ao controle. A resposta reduzida ao trinitrato de glicerila (GTN) no tempo de 8 horas não pode ser atribuída a um problema de metabolização deste composto, uma vez que o nitroprussiato de sódio e o SNAP, que liberam NO não enzimaticamente mostram o mesmo padrão de

resposta. O achado de que a resposta vasodilatadora causada por altas concentrações de GTN ou SNAP (100 nmol/kg) foi similar em ratos controles e em ratos injetados com LPS 8 horas antes, sugere de que, em altas concentrações, o NO pode atingir outros alvos além da guanilato ciclase. Existem trabalhos, por exemplo, mostrando que o NO pode abrir canais de potássio através da nitrosilação de grupamentos sulfidrilas presentes em resíduos de cisteína destes canais (Bolotina *et al.*, 1994, ver esquema 6), com decorrente hiperpolarização e relaxamento vascular (Thirstrup e Nielsen-Kudsk, 1992; Ishibashi *et al.*, 1995; Bolotina *et al.*, 1994). De qualquer forma, demonstramos, pela primeira vez em um modelo *in vivo*, que após a injeção de LPS ocorre um prejuízo temporário na resposta vasodilatadora a doadores de NO.

Este dado foi confirmado pelo achado de que o nitroprussiato de sódio é capaz de induzir um aumento de até 20 vezes na produção de cGMP em tecidos de animais controle ou tratados 24 h antes com LPS, mas falha em aumentar os níveis de cGMP em animais tratados com LPS 8 horas antes (Figura 11). O aumento na degradação de cGMP, em tecidos de animais tratados com LPS devido a uma maior atividade de fosfodiesterases, não é uma boa explicação para a falha do SNP em estimular a guanilato ciclase, uma vez que os experimentos foram realizados na presença de um inibidor de fosfodiesterases (IBMX).

Concordando com os dados obtidos em ratos endotoxêmicos, os animais submetidos ao CLP também demonstraram uma menor resposta vasodilatadora ao nitroprussiato de sódio somente nos tempos iniciais do processo (12 horas após o CLP), novamente sugerindo um prejuízo na resposta da guanilato ciclase neste período (Figura 12). A avaliação da produção de cGMP pela guanilato ciclase após estímulo com SNP em tecidos retirados de animais CLP confirma esta hipótese (Figura 13).

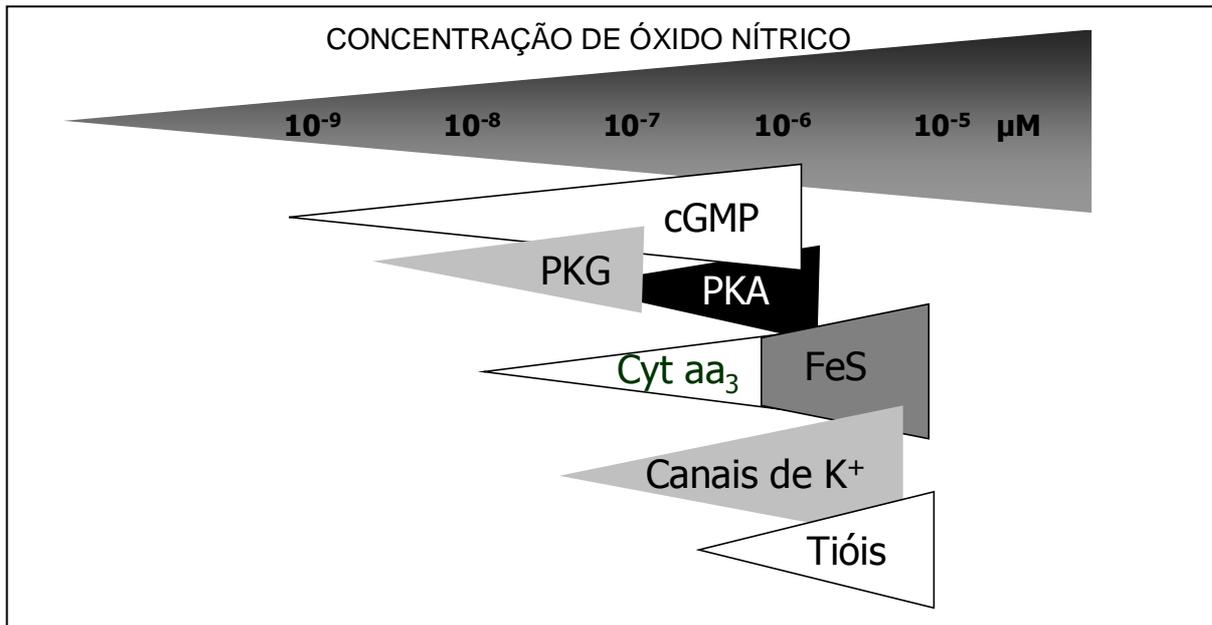
O mecanismo exato de inibição da enzima sGC ainda não é claro, mas os trabalhos citados anteriormente, bem como o fato de o prejuízo na resposta da guanilato ciclase ser coincidente com o pico de expressão da enzima NOS-2 (Silva-Santos *et al.*, 2002) e com a produção de NO (Figura 3) sugere que a produção de níveis elevados de NO após a injeção de LPS seja responsável por este efeito. Esta idéia é corroborada pelo fato de que o L-NAME previne tanto a perda da resposta

vasodilatadora, como a redução na produção de cGMP após estímulo com SNP (Figura 14).

Embora o L-NAME seja um inibidor não-seletivo das NOS, ele é bastante específico. Assim uma potencial redução nos níveis do substrato da enzima guanilato ciclase, causada pelo LPS, também não é uma boa explicação para estes resultados, uma vez que o L-NAME, que inibe apenas as NOS, restaurou a resposta da enzima.

De forma muito intrigante, dados do nosso laboratório mostram que após a injeção de LPS ou a cirurgia de CLP, ocorre uma potencialização na resposta vasodilatadora da bradicinina (Silva-Santos *et al*, 2002). Este efeito ocorre inclusive em momentos em que há prejuízo na funcionalidade da enzima guanilato ciclase com conseqüente redução na resposta vasodilatadora a doadores de NO. É ainda mais interessante o fato de que tanto a potencialização da resposta da bradicinina como a redução da resposta a doadores de NO, dependem da produção excessiva de NO, uma vez que ambos os efeitos podem ser prevenidos pelo tratamento com inibidores da NOS. Assim, se por um lado o excesso de NO durante a sepse gera um prejuízo na funcionalidade da guanilato ciclase, por outro, potencializa a resposta da bradicinina. Em conjunto, estes dados podem explicar a manutenção de uma baixa pressão arterial durante todo o período de sepse, mesmo na vigência de um prejuízo na resposta da guanilato ciclase. A hiperreatividade a bradicinina parece ser mediada pela abertura de canais de potássio. Mais ainda, estes dados mostram que embora o resultado final seja a hipotensão, os mecanismos envolvidos neste processo variam no transcorrer da sepse.

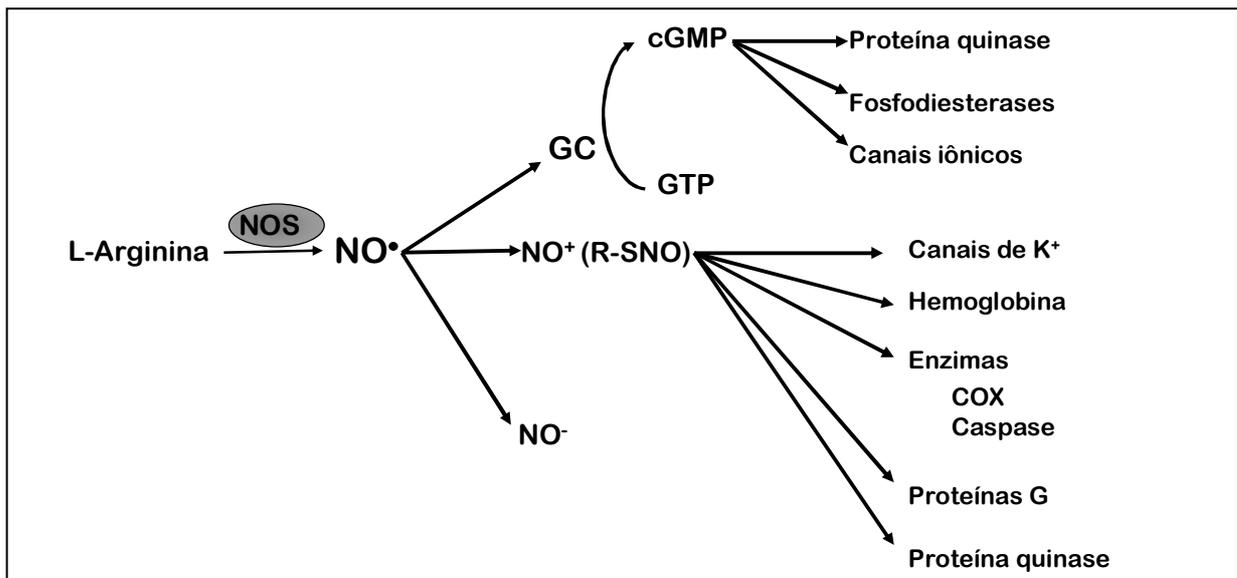
A química do NO é bastante complexa, entretanto sua compreensão é fundamental para entender seus efeitos. Para decifrar um pouco desta complexidade e enorme gama de efeitos do NO é importante realçar que suas ações nos sistemas biológicos são dependentes de sua concentração, de diferentes taxas de produção (Esquema 6), bem como do seu estado redox (Esquema 7).



**Esquema 6.** Concentração de NO e ativação de diferentes vias de sinalização intracelular. (Modificado de McAndrew *et al.*, 1997).

Dentre as três formas redox de NO ( $\text{NO}^-$ ,  $\text{NO}^\bullet$ ,  $\text{NO}^+$ ), somente a forma  $\text{NO}^\bullet$  é ativador efetivo da guanilato ciclase solúvel (Dierks e Burstyn, 1996). A ativação da enzima pelo NO envolve uma ligação com o grupamento heme da enzima, o que gera um aumento em torno de 200 vezes na atividade da enzima (Stone e Marletta, 1994, Humbert *et al.*, 1990).

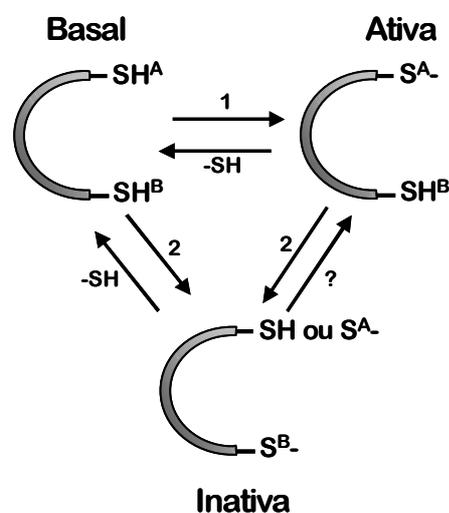
Outra forma de reação do NO com alvos moleculares diz respeito à ligação do  $\text{NO}^+$  com grupamento tiol para formar S-nitrosotióis (R-SNO) (Stamler, 1994). Esta nitrosação do grupamento tiol, mais conhecida como “S-nitrosilação”, pode causar modificação pós-transducional para modular a função de proteínas (Hess *et al.*, 2005) de maneira independente da via sGC-cGMP.



**Esquema 7.** Alvos do óxido nítrico (Modificado de Broillet, 1999).

A ligação de NO a estes grupamentos tióis em geral exige concentrações de NO mais elevadas do que aquelas necessárias para ativar a sGC (Esquema 6). Portanto, em condições de elevada produção de NO, como as que acontecem durante um quadro clínico de sepse e que podem facilmente ser reproduzidas em modelos animais (Figuras 3 e 6), a nitrosilação de proteínas pode representar um papel muito importante. Alguns trabalhos mostram que a expressão da NOS-2 coincide com o aumento da nitrosilação de proteínas (Eu *et al.*, 2000; Marshall e Stamler, 2002), o que sugere que o NO, adicionalmente à ligação ao grupamento heme, pode modular a atividade da guanilato ciclase através de nitrosilação de grupamentos tióis da enzima. Tseng e colaboradores (2000), por exemplo, demonstraram que o NO pode ativar a guanilato ciclase solúvel através da ligação a grupamentos tióis presentes em resíduos de cisteína, os quais são totalmente independentes do grupamento heme (Tseng *et al.*, 2000).

Mais interessante ainda é que no início da década de 80, alguns trabalhos já apontavam a importância de grupamentos sulfidrilas na modulação da atividade da guanilato ciclase (Brandwein et al., 1981; Braugher, 1983). Braugher propôs um modelo hipotético interessante, onde existem duas classes de grupamentos sulfidrilas. Uma classe, chamada de  $-SH^A$ , estaria envolvida na ativação da guanilato ciclase pelo NO, bem como outros agentes oxidantes (Hidaka e Asano, 1977; Graff et al., 1978; DeRubertis e Craven, 1977). A segunda classe de grupamentos sulfidrilas, chamada de  $-SH^B$ , seria importante para a manutenção da atividade da enzima, e a oxidação destas sulfidrilas por uma exposição excessiva ao NO resultaria em uma inativação da guanilato ciclase. É interessante perceber que este modelo é anterior à demonstração da produção endógena de NO (Palmer et al., 1987), portanto, esta proposta não despertou interesse imediato. Atualmente, a importância da produção endógena de NO é notória, e as consequências da produção de altos níveis de NO em patologias como a sepse são amplamente estudadas.



**Esquema 8. Modelo proposto por Braugher para o envolvimento de grupamentos sulfidrilas na atividade da guanilato ciclase.** A conversão pelo NO do estado basal para o ativado, envolve a oxidação de grupamentos sulfidrilas designados  $-SH^A$  (1). A reversão do processo é alcançada pela redução do  $-S^A$ . A inativação da enzima basal ou ativa (2) envolve a oxidação de grupamentos sulfidrilas designadas  $-SH^B$ . A conversão do estado inativo para o basal pode acontecer pela redução dos grupamentos  $-S^B$ . (modificado de Braugher, 1983).

Entretanto, apesar de muito atraente, a idéia de que o próprio ativador endógeno da guanilato ciclase (o NO) estaria inibindo a atividade da enzima quando presente em altas concentrações, não é a única boa explicação para o prejuízo da resposta da guanilato ciclase. Se de um lado existem fortes evidências mostrando que o NO pode se ligar diretamente a grupamentos sulfidrilas de proteínas, de outro existem uma série de trabalhos na literatura mostrando que o NO pode modular vários fatores de transcrição e assim a expressão de diversas proteínas (Pfeilschifter *et al.*, 2001). Há inclusive vários relatos mostrando que o NO pode modular a expressão da enzima guanilato ciclase.

A literatura tem documentado várias condições em que acontece redução na expressão da guanilato ciclase solúvel. Por exemplo, foi demonstrado que o pré-tratamento de células de medula óssea de rato com doadores de NO pode reduzir o mRNA da subunidade  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  (Ujii *et al.*, 1994). Esta foi a primeira evidência que o próprio NO poderia dessensibilizar esta via de sinalização através da redução dos níveis da sGC. Adicionalmente, Filippov e colaboradores demonstraram em 1997 que a exposição de células musculares lisas de artéria pulmonar de ratos (RPASMC) a doadores de NO, diminui os níveis de mRNA da subunidade  $\alpha_1$  e  $\beta_1$  da guanilato ciclase solúvel, com conseqüente redução de proteína. Este efeito é inibido quando a atividade da sGC foi bloqueada pelo ODQ, sugerindo que o acúmulo de cGMP é necessário para este efeito. Mais ainda, a actinomicina D (um inibidor de RNA polimerase) ou cicloheximide (um inibidor de síntese protéica) impediram a inibição da expressão da guanilato ciclase induzida pelo NO, sugerindo que o NO afeta o mRNA da guanilato ciclase via mecanismos dependentes de transcrição protéica (Filippov *et al.*, 1997). Um ano mais tarde, Scott e Nakayama (1998a) publicaram um trabalho corroborando estes dados, mostrando que a incubação destas células (RPASMC) com SNAP reduz os níveis de mRNA para a subunidade  $\alpha_1$ . Ainda neste mesmo ano, estes mesmos autores mostraram que a estimulação de RPASMC com LPS, o que gera um aumento na produção de NO, leva a uma diminuição dos níveis de mRNA e dos níveis protéicos da subunidade  $\alpha_1$  da guanilato ciclase. Adicionalmente, eles mostraram que a utilização de um inibidor da NOS impede a redução da expressão da sGC (Scott e Nakayama, 1998b).

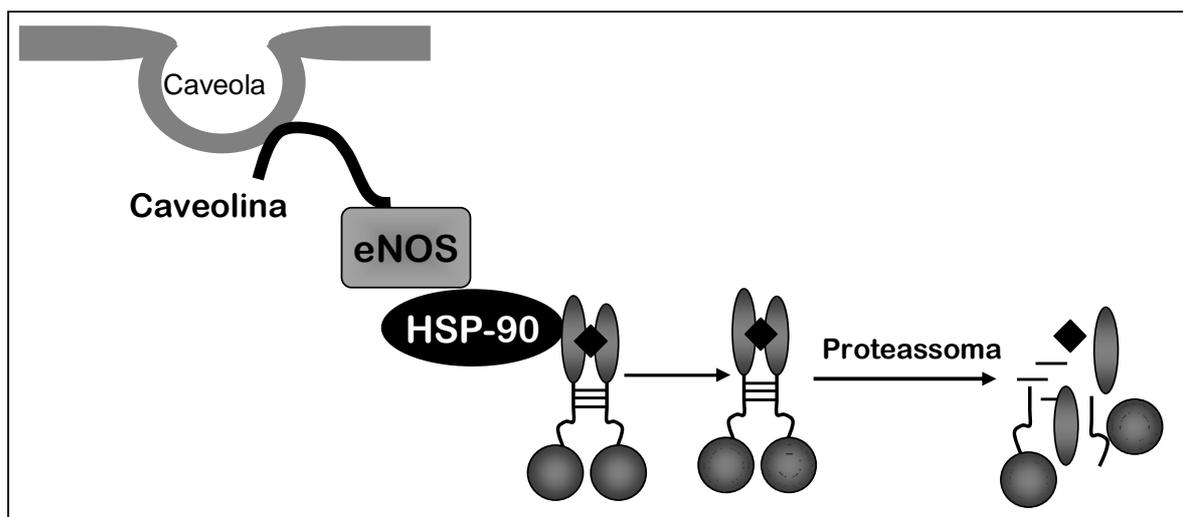
Mais recentemente foi demonstrado que a incubação de RPASMC com interleucina-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  também leva a uma diminuição da expressão das subunidades  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ . O mais interessante é que este efeito não foi completamente abolido quando a produção de NO foi inibida, e a utilização do mesmo tipo celular retirada de um animal knockout para NOS-2, ainda apresenta inibição da expressão da guanilato ciclase solúvel (Takata *et al.*, 2001). Portanto, alguma outra via além da via NO-cGMP, pode ter um importante papel na regulação da expressão da sGC.

Portanto, vários dados na literatura sugerem que o NO pode diminuir a expressão da enzima guanilato ciclase. Assim a compreensão desta dinâmica da regulação da expressão da guanilato ciclase durante situações de produção excessiva de NO, como a que acontece na sepse, pode ser fundamental para compreensão destas patologias e futura intervenção terapêutica. Mais ainda, estes dados apontam que o prejuízo na produção de cGMP induzido por NO 8 horas após a injeção de LPS (Figura 11) pode ser uma consequência da redução dos níveis protéicos da enzima.

Diferente do que foi previamente demonstrado em cultura de células onde a exposição ao NO (endógeno ou exógeno) diminui os níveis do mRNA para as subunidades da sGC (Filippov *et al.*, 1997; Scott e Nakayama, 1998a; Scott e Nakayama, 1998b; Takata *et al.*, 2001), observamos um aumento nos níveis de mRNA para a subunidade  $\beta_1$  8 horas após a injeção de LPS em ratos. Em tempos mais tardios (24 após o LPS), tanto o mRNA para subunidade  $\alpha_1$  como para  $\beta_1$  estão substancialmente elevados (Figura 15, Painéis A e B). Não há uma clara explicação para esta discrepância, mas isto pode acontecer em virtude dos eventos mais complexos que ocorrem em um modelo *in vivo*. Apesar disso, observamos uma redução nos níveis da subunidade  $\beta_1$  no tempo de 8 horas após a injeção de LPS (Figura 15, Painel C). Embora este dado seja compatível com as observações em cultura de células ou tecido isolado (Filippov *et al.*, 1997; Scott e Nakayama, 1998b; Takata *et al.*, 2001), é difícil conciliar os níveis de proteína com o padrão de mRNA observados neste tempo. Esta discrepância reforça que os níveis de mRNA muitas vezes não podem ser tomados como indicadores diretos dos níveis de proteína, ou ainda, uma explicação alternativa, é que tenha ocorrido uma redução nos níveis de mRNA para a(s) subunidade(s) da guanilato ciclase em tempos bem precoces à

injeção de LPS (2 a 4 horas), mas como a análise foi feita somente em 8 horas, a visualização do efeito foi perdida. Os níveis normais de proteína encontrados 24 horas após a injeção de LPS, talvez reflitam os altos níveis de mRNA encontrados nos animais endotoxêmicos. Mais ainda, sugerem que a retomada de resposta da guanilato ciclase no tempo de 24 é, pelo menos em parte, resultado da sua síntese.

De qualquer forma, diante do fato demonstrado na Figura 15, onde não ocorre redução dos níveis de mRNA para as subunidades da guanilato ciclase, o motivo para redução dos níveis protéicos da guanilato ciclase podem incluir dois mecanismos: um prejuízo no processo de translação ou um aumento na taxa de degradação da proteína. Para a primeira possibilidade não há uma clara evidência na literatura corroborando esta hipótese. Para o segundo mecanismo, foi demonstrado recentemente que a guanilato ciclase solúvel pode estar associada com a HSP-90 e este heterocomplexo parece ser importante para a estabilidade da enzima (Papapetropoulos *et al.*, 2005). Assim, condições que levem a ruptura deste complexo poderão favorecer a ubiquitinação e degradação proteolítica da guanilato ciclase. Portanto, supondo que a injeção de LPS de alguma maneira promova a ruptura deste complexo proteico, esta passa ser uma hipótese bastante plausível para a redução da proteína guanilato ciclase, sem redução dos níveis de mRNA (Esquema 9).



**Esquema 9.** Interação da guanilato ciclase solúvel com a HSP-90. (adaptado de Papapetropoulos *et al.*, 2005).

Assim a redução nos níveis de proteína observada 8 horas após a injeção de LPS, deve contribuir para redução na vasodilatação (Figura 10) bem como na produção de cGMP induzida por SNP (Figura 11), já que estes eventos são interligados e coincidentes temporalmente (comparar as Figuras 10, 11 e 15). A Figura 14 indubitavelmente demonstra que o NO é responsável pela redução na funcionalidade da enzima guanilato ciclase solúvel. Este dado, tomado em conjunto com os trabalhos publicados na literatura, permite sugerir que o excesso de NO após a injeção de LPS, é responsável pela redução dos níveis desta enzima. Entretanto, a redução nos níveis protéicos não é capaz de explicar sozinha o acentuado prejuízo no acúmulo de cGMP observado após a estimulação com nitroprussiato de sódio (ver Figura 11). Assim, é provável que o excesso de NO produzido após a injeção de LPS também esteja inibindo a enzima diretamente, concordando com o modelo proposto por Braughler em 1983 (Esquema 8).

De maneira muito intrigante, não ocorreu uma redução nos níveis da enzima guanilato ciclase solúvel no modelo de CLP. Estes dados sugerem que o prejuízo na funcionalidade da enzima neste modelo seja consequência exclusiva da inibição da atividade enzimática e não dos níveis proteicos da enzima. Estes dados, embora diferentes do modelo de LPS, concordam com trabalhos na literatura que mostram que a exposição de células em cultura a doadores de NO reduz a expressão e também a atividade da enzima (Scott e Nakayama, 1998a; Takada *et al.*, 2001). Portanto, de maneira mais abrangente, estes dois mecanismos podem participar conjuntamente para o prejuízo na funcionalidade da enzima guanilato ciclase.

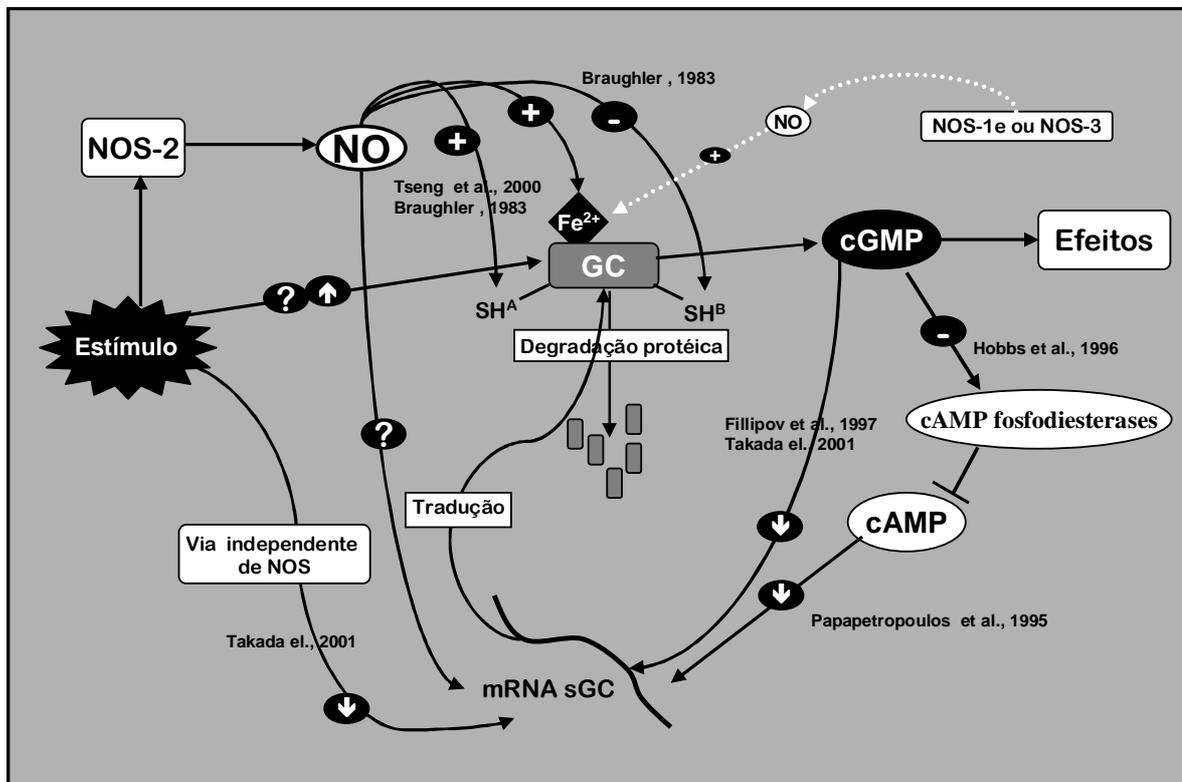
A injeção de LPS, principalmente nas doses utilizadas neste estudo, é uma agressão bastante vigorosa, levando a uma produção e liberação intensa e em curto período de tempo de uma série de mediadores inflamatórios, inclusive o próprio NO (como discutido anteriormente). Talvez esta “tempestade” inflamatória, com modulação intensa de uma série de fatores de transcrição, seja responsável pela redução na expressão da enzima guanilato ciclase solúvel. Assim, pode ser que no modelo CLP, onde a liberação de mediadores inflamatórios acontece de modo mais lento e progressivo, não haja redução na expressão da enzima, ou ainda, que esta redução seja muito sutil. Neste contexto é importante chamar a atenção que a

técnica de imunoeletroforese é semi-quantitativa, e pequenas variações nos níveis protéicos podem ter sido perdidos durante o procedimento.

Apesar dos níveis protéicos da guanilato ciclase terem permanecido constantes na fase inicial do CLP, ocorreu um aumento significativo na expressão da enzima em tempos mais tardios. Mais ainda, de maneira muito interessante, a retomada de resposta da enzima guanilato ciclase solúvel (Figura 13) foi coincidente com aumento do conteúdo proteico da enzima, mostrando que a síntese *de novo* da proteína é fundamental para retomada da sua atividade. Mais ainda, o aumento da quantidade da enzima não ocorreu paralelamente a um aumento significativo na funcionalidade (comparar Figuras 13 e 16), sugerindo que uma parcela da enzima ainda permanece inibida. Assim, estes dados sugerem que a inibição da enzima pelo NO é irreversível, sendo necessário a síntese de novas moléculas proteicas para uma retomada da resposta funcional.

A escolha da subunidade  $\beta_1$  para monitorar os níveis da enzima foi baseada em trabalhos prévios que mostram, em cultura de células, que esta subunidade parece ser mais rápida e robustamente regulada por estímulos inflamatórios (Takada *et al.*, 2001). Adicionalmente, como a subunidade  $\beta_1$  é um parceiro obrigatório na atividade do heterodímero guanilato ciclase e contém o maior domínio de ligação ao grupamento heme, reduções nos níveis da subunidade  $\beta_1$  é suficiente para explicar uma redução na atividade da enzima guanilato ciclase (Hobbs, 1997).

Tomadas em conjunto com os dados da literatura, estas informações permitem propor um novo modelo. Assim, o NO pode ativar a guanilato ciclase através da ligação com grupamento heme, ou talvez até mesmo através de ligações em grupamentos sulfidril (SH<sup>A</sup>, Braugher, 1983; Tseng *et al.*, 2000). Entretanto, altas concentrações de NO, como aquelas produzidas pela NOS-2, podem atingir sulfidrilas críticas (SH<sup>B</sup>) inibindo assim a enzima. Mais ainda, a exposição crônica ao NO pode alterar os níveis de mRNA para as subunidades  $\alpha_1$  e  $\beta_1$ , alterando a expressão da enzima sGC. Esse efeito pode ser dependente tanto da ação direta do NO, como por uma ação do cGMP, ou até mesmo de cAMP (Esquema 10).



**Esquema 10. Modelo especulativo sobre a regulação da atividade e expressão da enzima sGC durante condições de alta produção de NO.** Após um estímulo inflamatório como o LPS, ocorre a indução da expressão da enzima NOS-2, que passa a produzir grandes quantidades de NO. Este excesso de NO, além de ativar a enzima sGC por se ligar ao grupamento heme, pode ativar a enzima através da oxidação de grupamentos sulfidrilas específicos ( $-SH^A$ ). A exposição da sGC a altas concentrações de NO pode também levar à inibição da enzima pela oxidação de outro grupo de sulfidrilas ( $-SH^B$ ; ver Esquema 8). Mais ainda, este NO pode modular a expressão da sGC através de uma modulação do mRNA. O excesso de cGMP produzido pela ativação massiva da sGC como consequência da alta concentração de NO, pode também modular a expressão da sGC através da modulação do mRNA. Adicionalmente, o cGMP pode inibir algumas fosfodiesterases responsáveis pela degradação do cAMP, levando a um acúmulo deste nucleotídeo que também pode modular a expressão da sGC.

Voltando à sepse, resolvemos avaliar se alterações na funcionalidade da enzima guanilato ciclase após a injeção de LPS poderiam influenciar os efeitos do azul de metileno sobre a hiporeatividade a vasoconstritores.

A análise da Figura 17 mostra que o azul de metileno foi capaz de reverter a perda da resposta à fenilefrina nos animais injetados com LPS 2 ou 24 horas antes, falhando entretanto em reverter a hiporeatividade nos animais que receberam LPS 8 horas antes. Assim, a falha do azul de metileno em melhorar a resposta da fenilefrina coincide com a perda da resposta vasodilatadora a doadores de NO (Figura 10), com o prejuízo na produção de cGMP induzido por SNP (Figura 11) e com uma redução nos níveis da proteína guanilato ciclase solúvel (Figura 15, Painel C).

Em seguida avaliamos se o tratamento com azul de metileno pode reverter algumas das alterações cardiovasculares induzidas pelo CLP. A hiporeatividade a vasoconstritores é visível já em 12 horas e permanece constante durante todo o tempo de análise. Entretanto o azul de metileno, da mesma forma que acontece no modelo LPS, reverte a hiporeatividade somente em tempos mais tardios falhando nos tempos iniciais da sepse. Novamente, a falha do azul de metileno coincide com o prejuízo na resposta da enzima guanilato ciclase. A hipotensão, embora sutil, também já é observada em 12 horas, entretanto o azul de metileno é eficaz em reverter este quadro somente no tempo de 48 horas após o CLP.

Em conjunto estes dados sugerem que a falha do azul de metileno é devida à perda da funcionalidade da enzima guanilato ciclase, enquanto que o seu sucesso depende da retomada de resposta que acontece em virtude do aumento da expressão da proteína. Portanto, o sucesso terapêutico da inibição da sGC na sepse pode depender da condição da enzima no momento do tratamento, reforçando portanto a importância da compreensão temporal da sua funcionalidade. Assim, o período de administração do azul de metileno pode ser crítico para o resultado final do tratamento.

Entretanto apesar do prejuízo na resposta da guanilato ciclase em tempos determinados, a hiporeatividade a vasoconstritores se mantém constante durante todo o tempo de análise. Assim, durante o prejuízo na resposta da enzima guanilato ciclase, outros mecanismos são responsáveis pela manutenção da hiporeatividade.

Neste sentido, trabalhos do nosso laboratório têm demonstrado que a abertura de canais de potássio mediada por NO, é um importante mecanismo envolvido na manutenção da hiporeatividade durante estes períodos (Terluk *et al.*, 2000; Silva-Santos *et al.*, 2002). Além disso, alguns pesquisadores têm postulado que a intensa ativação e adesão de neutrófilos na parede vascular, que ocorre principalmente em momentos iniciais da resposta inflamatória, geram um stress oxidativo intenso levando à disfunção vascular (Eiserich *et al.*, 2002), podendo esta ser uma explicação para a hiporeatividade a vasoconstritores neste período.

Avaliamos então o efeito do azul de metileno injetado em diferentes tempos sobre a mortalidade de animais submetidos a cirurgia de CLP e o resultado mostrou-se surpreendente (Figura 20). A mesma droga, administrada na mesma dose, mas em tempos diferentes mostra resultados opostos. A injeção de azul de metileno no tempo de 20 horas após o procedimento cirúrgico diminuiu a mortalidade, ao passo que quando injetado no tempo de 8 horas, o azul de metileno além de não proteger, precipita a morte dos animais. O tempo em que o tratamento obteve sucesso é coincidente com o tempo que o azul de metileno foi capaz de reverter a hiporeatividade à fenilefrina. É ainda mais interessante notar que também é coincidente com um aumento da expressão e um perfil normal de funcionalidade da enzima guanilato ciclase. Por outro lado, o tempo em que o tratamento falhou coincide com a falha do azul de metileno em reverter a hiporeatividade à fenilefrina e com uma expressão e atividade reduzida da enzima sGC.

A sepse é uma resposta inflamatória complexa, e envolve pelo menos duas fases distintas, mas não exclusivas: uma resposta inflamatória sistêmica e uma resposta antiinflamatória. Idealmente, o desenvolvimento de uma resposta inflamatória efetiva contra um agente infeccioso é contido por um mecanismo para terminar a inflamação; seguido da eliminação do agente incitante. Um balanço correto entre estas duas respostas, principalmente em relação à intensidade, influenciaria positivamente a sobrevivência do hospedeiro. O desbalanço ou exagero destas respostas resulta em prejuízo para o hospedeiro causado diretamente pela inflamação excessiva, ou indiretamente através de uma disfunção imune. Fica claro que tanto agentes pró-inflamatórios como anti-inflamatórios podem ter um lugar no tratamento da sepse (Bone, 1996). O tratamento com terapias opostas como esta

requer que o agente (pró- ou anti-inflamatório) seja administrado no estágio apropriado da sepse para benefício e não prejuízo do paciente. Portanto, o tratamento ideal para sepse pode ser individualmente ajustado de acordo com o estado de cada paciente.

É com foco nesta idéia que se percebe uma importante janela terapêutica para utilização de inibidores da guanilato ciclase na sepse. De maneira surpreendente (e também preocupante), os dados mostram que, ao mesmo tempo em que o resultado final da utilização terapêutica do azul de metileno na sepse pode ser satisfatório, ele pode ser desastroso. Portanto, antes da utilização do azul de metileno em um teste clínico de larga escala, como tem sido sugerido por vários pesquisadores (Koch, 1996; Evgenov e Bjertnaes, 2003), é fundamental uma melhor compreensão temporal dos diferentes estágios da sepse humana. A sepse é uma resposta multimediada, e os mediadores inflamatórios importantes no seu início muitas vezes são irrelevantes em tempos mais tardios e vice versa. Este é, inclusive, um dos principais motivos do insucesso terapêutico de muitas drogas que foram testadas na clínica nos últimos anos (Riedemann *et al.*, 2003). Portanto, um paciente no início de um quadro séptico é totalmente diferente de um paciente em estágios tardios, embora algumas características clínicas sejam as mesmas. Isto torna fundamental a clareza de que, em se tratando de pacientes diferentes, faz-se necessário uma terapia diferenciada. Atualmente, embora seja aceito que o choque séptico acontece em diferentes fases, as intervenções terapêuticas são essencialmente as mesmas. Não surpreende portanto o fato da terapia atual não ter um sucesso consistente (Baumgartner e Calandra, 1999). A falta de marcadores clínicos que indiquem em qual estágio o paciente se encontra é um ponto complicador neste evento, entretanto reforça a necessidade de esforços para uma melhor compreensão dos diferentes estágios da sepse. Uma melhor compreensão destes estágios pode fazer com que o azul de metileno venha a ser uma boa opção de tratamento para o choque séptico.

O sucesso do azul de metileno em alguns momentos após a injeção de LPS (Figura 17), ou após o CLP (Figura 18) confirma os trabalhos anteriores, mostrando que a via NO-sGC-cGMP é ativa na sepse, sendo responsável por alterações vasculares importantes como a hiporeatividade a vasoconstritores (Paya *et al.*, 1993;

Silva-Santos *et al.*, 2002). Portanto, como já antecipado por outros trabalhos, a inibição desta via pode apresentar benefícios importantes no tratamento desta patologia (Schneider *et al.*, 1992; Daemen-Gubbels *et al.*, 1995; Gachot *et al.*, 1995; Preiser *et al.*, 1995; Andresen *et al.*, 1996; Andresen *et al.*, 1998; 1999; Zingarelli *et al.*, 1999; Kirov *et al.*, 2001; Zacharowski *et al.*, 2001). Entretanto, é importante salientar que a informação mais importante não é o sucesso, mas a falha do azul de metileno em tempos iniciais da sepse, chegando até mesmo a precipitar a morte dos animais. Ainda mais interessante, é que este evento coincide no tempo com o momento em que a sGC tem sua funcionalidade prejudicada.

Embora o azul de metileno aparentemente não apresente significantes efeitos colaterais (Kirov *et al.*, 2001), alguns trabalhos relatam uma vasoconstrição pulmonar acentuada e uma piora da oxigenação arterial após a injeção de azul de metileno em pacientes com choque séptico. Por exemplo, em experimento usando anéis de aorta de ratos, a contração causada pela endotelina foi maior quando os anéis foram pré-tratados com azul de metileno (Wu e Bohr, 1990). Neste ponto é importante ressaltar que por razões ainda não bem compreendidas, enquanto a maioria dos leitos vasculares responde mal aos vasoconstritores endógenos e exógenos, outros leitos (renal e pulmonar por exemplo) tem sua reatividade mantida em valores relativamente normais. Assim, a associação de baixa perfusão em razão da baixa pressão, aliada à vasoconstrição intensa em alguns órgãos conduz ao desenvolvimento de falência orgânica, contribuindo para o êxito letal de pacientes chocados. Portanto, a utilização do azul de metileno, um inibidor de uma via de relaxamento de músculo liso (NO-sGC-cGMP) deve ser feita com cautela. Em outras palavras, se por um lado a produção de cGMP gera uma série de alterações cardiovasculares que devem ser combatidas, por outro este cGMP pode ser essencial para evitar uma vasoconstrição excessiva em alguns leitos vasculares. Baseado neste raciocínio, a utilização de um inibidor da enzima exatamente no momento em que ela apresenta um prejuízo na funcionalidade, pode ser um golpe de misericórdia precipitando a morte dos pacientes/animais. Estes dados ressaltam a importância da compreensão da dinâmica da guanilato ciclase na sepse, para correta utilização do azul de metileno.

O conceito de inibição da via NO-sGC na sepse tem recebido muita atenção

e gerado calorosos debates (Marczin *et al.*, 1995; Schneider, 1995; Koch, 1996; Evgenov e Bjertnaes, 2003). Alguns pesquisadores consideram que os resultados positivos observados com inibidores da guanilato ciclase solúvel são inesperados, uma vez que estes compostos bloqueiam tanto a ação do NO produzido pelas NOS constitutivas, como a vasodilatação patológica causada pela NOS-2. Em outras palavras, os efeitos de inibidores da guanilato ciclase deveriam ser similares àqueles causados por inibidores não-seletivos das NOS (uma intervenção que, como discutido anteriormente, não parece ser benéfica). Por outro lado, alguns pesquisadores consideram estes compostos uma opção segura, já que restauram alguns parâmetros hemodinâmicos durante a sepse, preservando entretanto, efeitos benéficos do NO que não são mediados por esta via de sinalização, como as atividades microbicida e *scavenger* de radicais livres de oxigênio (Rubanyi *et al.*, 1991; Malawista *et al.*, 1992, Cauwels *et al.*, 2000). Este é outro ponto que gera polêmica, já que o azul de metileno também pode impedir a síntese de NO (Mayer *et al.*, 1993). Mais ainda, foi demonstrado que o azul de metileno pode gerar superóxido em solução aquosa (Visarius *et al.*, 1997), levando alguns pesquisadores a argumentarem que estes radicais podem limitar os efeitos deletérios do NO. Entretanto, foi demonstrado que a combinação do tratamento de azul de metileno com múltiplas injeções de superóxido dismutase, ou um superóxido mimético (permeável à membrana), não afetam o efeito protetor do azul de metileno após a injeção de TNF- $\alpha$  em camundongos, indicando que este composto não parece ter seu efeito protetor mediado por mecanismos dependentes de superóxido (Cauwels *et al.*, 2000). Adicionalmente, este mesmo trabalho demonstrou que a utilização de um inibidor de fosfodiesterases (zaprinast), que prolongam a vida do cGMP, aboliu o efeito protetor do azul de metileno contra a mortalidade induzida por TNF- $\alpha$  (Cauwels *et al.*, 2000). Além disso, o ODQ, um inibidor altamente seletivo para guanilato ciclase (Garthwaite *et al.*, 1995), também recuperou a reatividade a vasoconstritores em animais endotoxêmicos (Silva-Santos *et al.*, 2002), aumentou a sobrevivência em animais tratados com LPS (Zingarelli *et al.*, 1999) e reduziu a disfunção de múltiplos órgãos induzida por LPS (Zacharowski *et al.*, 2001). Estes dados mostram claramente que a sGC tem importante função na manutenção do tônus vascular durante a endotoxemia e convincentemente argumentam em favor da

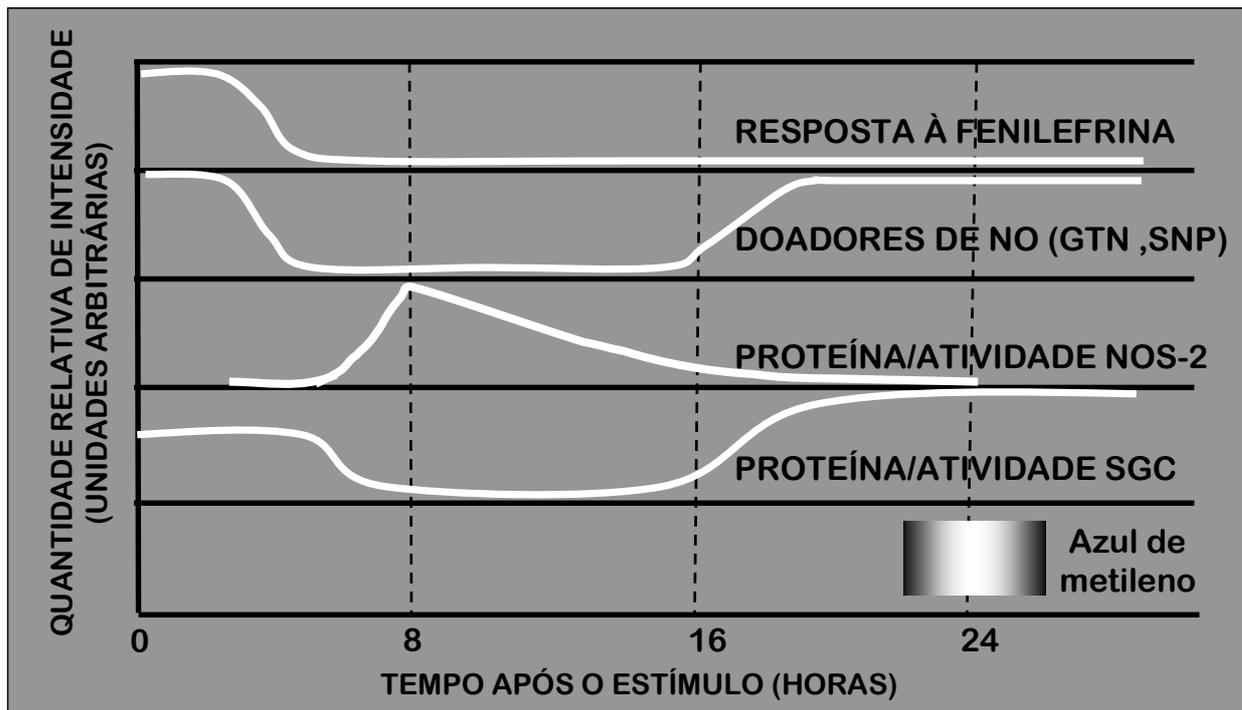
inibição da guanilato ciclase solúvel como o mecanismo de proteção induzido pelo azul de metileno.

A despeito da forma exata de ação do azul de metileno, a verdade é que este composto parece ser uma ferramenta útil para o tratamento da sepse. É possível inclusive que as várias ações e interações do azul de metileno sejam o segredo do seu efeito benéfico. A sepse é uma resposta inflamatória multimedida e a história tem mostrado que, na maioria das vezes, compostos que interferem em vários pontos da resposta inflamatória se apresentam como ferramentas mais úteis na terapia do que compostos altamente específicos para afetar um único mediador ou alvo molecular. Talvez este seja o motivo do sucesso da proteína C ativada (Xigris®), aprovado em 2001 para o tratamento da sepse severa. Este composto parece interferir com várias cascatas da resposta inflamatória, mas o exato mecanismo pelo qual a mortalidade é reduzida ainda não foi completamente definido. É claro que este é um ponto bastante delicado para os farmacologistas, que em geral se deslumbram com drogas altamente específicas. Embora seja ousado continuar a comparação, é interessante ressaltar que uma redução significativa na mortalidade com a proteína C ativada foi observada somente em pacientes com sepse severa, os quais parecem ser mais beneficiados por estratégias antiinflamatórias. Os nossos dados não permitem definir com clareza o estado do animal no momento da administração do azul de metileno, e de qualquer modo a comparação com a sepse humana não é direta, mas como já dito anteriormente o azul de metileno funciona somente em momentos tardios, geralmente relacionados à uma maior disfunção de órgãos (Remick *et al.*, 2000; Buras *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que as conclusões derivadas de trabalhos com animais devem ser interpretadas com cuidado. Uma consideração importante é que foi usado um modelo experimental que simula algumas características hemodinâmicas da sepse e choque séptico. Entretanto, ainda assim há uma série de limitações. Primeiro, embora o modelo reproduza bem as alterações hemodinâmicas que acontecem no choque séptico humano, os animais são inicialmente saudáveis e suas respostas podem ser diferentes de pacientes cronicamente doentes. Segundo, diferente da situação clínica, os animais não receberam antibióticos ou agentes

vasoativos. Terceiro, a administração de anestésicos pode influenciar o desenvolvimento da sepse nos animais. Quarto, o modelo CLP leva os animais quase diretamente à um quadro de sepse grave/choque séptico, sem passar pelos estágios iniciais de SIRS e sepse que existem nos quadros humanos.

Feitas as devidas considerações, este conjunto de dados nos permite criar um esquema simplificado para explicar algumas alterações vasculares durante a sepse. O excesso de NO produzido durante quadros de sepse leva a um prejuízo na resposta vasoconstritora, um efeito que é mediado, pelo menos em parte, pela via sGC-cGMP. O excesso de NO seria responsável também por uma redução na atividade e na expressão da enzima sGC, causando assim um prejuízo na resposta vasodilatadora de doadores de NO. Este mecanismo pode ser inclusive um mecanismo auto-protetor para conter a vasodilatação excessiva que acontece durante a sepse. Esta falta de funcionalidade da enzima sGC seria responsável pela falha do azul de metileno em reverter a hiporeatividade a vasoconstritores. Isto sugere que outros mecanismos independentes da sGC são importantes para esta hiporeatividade a vasoconstritores, principalmente em tempos iniciais. Neste sentido, dados do nosso laboratório demonstraram a participação de canais de potássio na hiporeatividade à fenilefrina (Silva-Santos *et al.*, 2002). Entretanto, independente da via de sinalização responsável pela refratariedade a vasoconstritores, é notório que o NO é o principal mediador deste efeito, já que inibidores da NOS são capazes de reverter o prejuízo na resposta vasoconstritora em qualquer momento (Silva-Santos *et al.*, 2002). Assim, concluímos que em tempos iniciais do quadro séptico, a guanilato ciclase não é funcional, como consequência da redução da atividade e da expressão da enzima. Isto levaria a falha terapêutica dos inibidores da enzima guanilato ciclase neste momento. Entretanto, devido a uma recuperação da funcionalidade da enzima, um efeito mediado em parte pela síntese *de novo* da proteína, inibidores como o azul de metileno passam a ser efetivos em reverter a hiporeatividade a vasoconstritores e diminuir a mortalidade em modelos de choque séptico (Esquema 11).



**Esquema 11. Decurso temporal das alterações vasculares relacionadas ao óxido nítrico durante o choque séptico (especulativo).** Algumas horas após um estímulo inflamatório, ocorre um prejuízo na resposta vasoconstritora à fenilefrina. Ocorre também um prejuízo temporário na resposta vasodilatadora a doadores de NO. Paralelo a estes eventos ocorre um aumento na expressão da enzima NOS-2, e redução da expressão da sGC. Juntos, estes dados sugerem que as altas quantidades de NO, conseqüentes do aumento da expressão da NOS-2, gera uma redução na resposta à fenilefrina bem como na atividade e níveis protéicos da enzima sGC, levando a uma redução na resposta vasodilatadora a doadores de NO. Entretanto, a perda da funcionalidade da sGC é reversível, um efeito que é devido pelo menos em parte pela síntese *de novo* da mesma. Devido a estas condições o azul de metileno falha em reverter a falta de resposta à fenilefrina em tempos iniciais, funcionando somente em tempos mais tardios. Estes dados mostram também que outros mecanismos, além da via sGC-cGMP, devem estar envolvidos na hiporeatividade à fenilefrina nos tempos iniciais.

Assim, estes dados deixam evidente que o azul de metileno pode ser uma ferramenta útil para tratamento de pacientes em sepse, principalmente em pacientes em tempos mais tardios. Juntamente com outros trabalhos da literatura, inclusive em humanos, nossos resultados reforçam a necessidade de estudos em larga escala. Ao mesmo tempo, os dados aqui apresentados fazem um alerta para que se tenha cautela. Rígidos critérios de inclusão no estudo devem ser adotados, uma vez que o estado do paciente pode ser crítico para o resultado final do tratamento.

Apesar das evidências mostrando que o azul de metileno pode ser uma boa opção para o tratamento da sepse, há uma grande barreira à realização de estudos grandes. Por tratar-se de uma droga antiga, inclusive já usada na clínica para outras finalidades, não é possível obter-se patente, o que limita enormemente o interesse por este composto, seja ele útil ou não, por parte das indústrias farmacêuticas.

Embora seja justo que uma empresa que trabalha no campo da investigação farmacêutica procure um lucro lícito sobre os investimentos feitos, às vezes acontece que os interesses econômicos prevalentes levam a tomar decisões contrárias aos valores humanos autênticos e às exigências de justiça, exigências estas que não devem ser separadas da própria finalidade da investigação. O resultado pode ser um conflito entre os interesses econômicos, por um lado, e a assistência médica por outro. Neste sentido, talvez as autoridades públicas, como defensoras do bem comum, devam desempenhar o papel de assegurar que a investigação seja orientada para o bem estar das pessoas e da sociedade, e a moderar e reconciliar as pressões de interesses divergentes.

De qualquer forma, é diante da ampla visão do compromisso em favor da verdade e do bem comum que este trabalho espera escrever páginas de progresso autêntico, independente do provável descaso da indústria farmacêutica.

**CONCLUSÕES**

---

Os resultados aqui apresentados permitem concluir que:

- 1- A produção excessiva de óxido nítrico pela NOS-2 e consequente ativação da enzima guanilato ciclase estão envolvidas na instalação da hiporeatividade a vasoconstritores durante a sepse.
- 2- Esta produção excessiva de NO é responsável por um prejuízo na funcionalidade da enzima guanilato ciclase nos momentos iniciais de sepse.
- 3- No modelo de injeção de LPS, a redução da funcionalidade da enzima parece ser consequência tanto de uma redução na expressão como prejuízo na atividade da enzima.
- 4- No modelo de CLP, o prejuízo na resposta guanilato ciclase parece ser consequência exclusiva de uma inibição direta da enzima, já que o conteúdo protéico não foi reduzido.
- 5- Em ambos os modelos utilizados, a retomada da funcionalidade da enzima parecer ser consequência da síntese *de novo* da proteína, sugerindo que esta inibição seja irreversível.
- 6- O prejuízo na funcionalidade da enzima guanilato ciclase é responsável pela falha do azul de metileno em reverter a hiporeatividade a vasoconstritores e a hipotensão nos momentos iniciais da sepse.
- 7- Como consequência, a administração do azul de metileno reduz a mortalidade dos animais submetidos ao CLP somente em momentos mais tardios, quando ocorre a recuperação da atividade da enzima guanilato ciclase.
- 8- Portanto, inibidores da enzima guanilato ciclase podem ser ferramentas terapêuticas úteis para o tratamento da sepse, desde que administrados na correta janela de oportunidade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abraham, E.; Shoemaker, W.C.; Bland, R.D.; Cobo, J.C. Sequential cardiorespiratory patterns in septic shock. **Crit. Care Med.**, 11: 799–803, 1983.
- Alderton, W.K; Cooper, C.E; Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, 357: 593-615, 2001.
- Amann R, Peskar BA. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. **Eur. J. Pharmacol.**, 447: 1-9, 2002.
- Andresen, M.; Dougnac, A.; Hernandez, G.; Espejo, J.; Castillo, L.; Bugedo, G.; Letelier, L.M.; Dagnino, J. Inhibition of the nitric oxide pathway in refractory septic shock. **Rev. Med. Chil.**, 124: 442-447, 1996.
- Andresen, M.; Dougnac, A.; Diaz, O.; Hernandez, G.; Castillo, L.; Bugedo, G.; Alvarez, M.; Dagnino, J. Use of methylene blue in patients with refractory septic shock: impact on hemodynamics and gas exchange. **J. Crit. Care.** 13: 164-168, 1998.
- Angus, D.C.; Linde-Zwirble, W. T.; Lidicker, J.; Clermont, G.; Carcillo, J.; Pinsky, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care sepsis. **Crit. Care Med.**, 29: 1303-1310, 2001.
- Arons, M.M.; Wheeler, A.P.; Bernard, G.R.; Christman, B.W.; Russell, J.A.; Schein, R.; Summer, W.R.; Steinberg, K.P.; Fulkerson, W.; Wright, P.; Dupont, W.D.; Swindell, B.B. Effects of ibuprofen on the physiology and survival of hypothermic sepsis. Ibuprofen in Sepsis Study Group. **Crit. Care Med.**, 27(4):699-707, 1999.
- Ballou, D.P.; Zhao, Y.; Brandish, P.E.; Marletta, M.A. Revisiting the kinetics of nitric oxide (NO) binding to soluble guanylate cyclase: the simple NO-binding model is incorrect. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 99: 12097-12101, 2002.
- Baumgartner, J.D.; Calandra, T. Treatment of sepsis: past and future avenues. **Drugs**, 57: 127-132, 1999.
- Beavo, J.A.; Brunton, L.L. Cyclic nucleotide research-still expanding after half a century. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 3: 710-718, 2002.
- Beckman, J.S.; Beckman, T.W.; Chen, J.; Marshall, P.A.; Freeman, B.A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87: 1620-1624, 1990.
- Benjamim, C.F.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. Role of nitric oxide in failure of neutrophil migration in sepsis. **J. Infect. Dis.**, 182: 214-223, 2000.
- Beishuizen, A.; Vermes, I.; Haanen, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. **Adv. Clin. Chem.**, 33: 55-131, 1998.

- Bellamy, T.C.; Wood, J.; Garthwaite, J. On the activation of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 99: 507-510, 2002.
- Bernard, G.R.; Wheeler, A.P.; Russell, J.A.; Schein, R.; Summer, W.R.; Steinberg, K.P.; Fulkerson, W.J.; Wright, P.E.; Christman, B.W.; Dupont, W.D.; Higgins, S.B.; Swindell, B.B. The effects of ibuprofen on the physiology and survival of patients with sepsis. The Ibuprofen in Sepsis Study Group. **N. Engl. J. Med.**, 336(13):912-918, 1997.
- Beutler, B., Milsark, I.W., and Cerami, A.C. Passive immunization against cachectin/tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. **Science.**, 229:869-871, 1985.
- Bolotina, V.M.; Najibi, S.; Palacino, J.J.; Pagano, P.J.; Cohen, R. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, 362: 850-853, 1994.
- Bone, R.C.; Balk, R.A.; Cerra, F.B.; Dellinger, R.P.; Fein, A.M.; Knaus, W.A.; Schein, R.M.; Sibbald, W.J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, 101: 1644-1655, 1992.
- Bone, R.C. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. **Crit. Care Med.** 24(7):1125-1128, 1996.
- Brandtzaeg, P. Significance and pathogenesis of septic shock. **Curr. Top. Microbiol., Immunol.** 216:15-37, 1996.
- Brandwein, H.J.; Lewicki, J.A.; Murad, F. Reversible inactivation of guanylate cyclase by mixed disulfide formation. **J. Biol. Chem.**, 256: 2958-2962, 1981.
- Braugher, J.M. Soluble guanylate cyclase activation by nitric oxide and its reversal. Involvement of sulfhydryl group oxidation and reduction. **Biochem. Pharmacol.**, 32: 811-818, 1983.
- Brenman, J.E.; Chao, D.S.; Gee, S.H.; McGee, A.W.; Craven, S.E.; Santillano, D.R.; Wu, Z.; Huang, F.; Xia, H.; Peters, M.F.; Froehner, S.C.; Bredt, D.S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and alpha1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell**, 84: 757-767, 1996.
- Brioni, J. D.; Nakane, M.; Hsieh, G. C.; Moreland, R. B.; Kolasa, T.; Sullivan, J. P. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. **Int. J. Impot. Res.**, 14: 8-14, 2002.
- Broillet, M.C. S-nitrosylation of proteins. **Cell Mol. Life Sci.**, 55:1036-1042, 1999.

- Brown, G.; Frankl, D.; Phang, T. Continuous infusion of methylene blue for septic shock. **Postgrad. Med. J.**, 72: 612-614, 1996.
- Budworth, J.; Meillerais, S.; Charles, I.; Powell, K. Tissue distribution of the human soluble guanylate cyclases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 263: 696-670, 1999.
- Buras, J.A.; Holzmann, B.; Sitkovsky, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat. Rev. Drug. Discov.**, 4: 854-865, 2005.
- Butler, A.R.; Rhodes, P. Chemistry, analysis, and biological roles of S-nitrosothiols. **Anal Biochem.**, 249: 1-9, 1997.
- Cary, S.P.; Winger, J.A.; Marletta, M.A. Tonic and acute nitric oxide signaling through soluble guanylate cyclase is mediated by nonheme nitric oxide, ATP, and GTP. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 102: 13064-13069, 2005.
- Cheng, X.; Pang, C.C. Pressor and vasoconstrictor effects of methylene blue in endotoxaemic rats. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.**, 357: 648-653, 1998.
- Chinkers, M.; Garbers, D.L.; Chang, M.S.; Lowe, D.G.; Chin, H.M.; Goeddel, D.V.; Schulz, S. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. **Nature**, 338: 78-83, 1989.
- Cunha, F.Q.; Assreuy, J.; Moss, D.W.; Rees, D.; Leal, L.M.; Moncada, S.; Carrier, M.; O'donnell, C.A.; Liew, F.Y. Differential induction of nitric oxide synthase in various organs of the mouse during endotoxaemia: role of TNF-alpha and IL-1-beta. **Immunology**, 81: 211-215, 1994.
- Daemen-Gubbels, C.R.; Groeneveld, P.H.; Groeneveld, A.B.; Van Kamp, G.J.; Bronsveld, W.; Thijs LG. Methylene blue increases myocardial function in septic shock. **Crit. Care Med.**, 23: 1363-1370, 1995.
- Donati, A.; Conti, G.; Loggi, S.; Munch, C.; Coltrinari, R.; Pelaia, P.; Pietropaoli, P.; Preiser, J.C. Does methylene blue administration to septic shock patients affect vascular permeability and blood volume? **Crit. Care Med.**, 31: 1601-1602, 2002.
- De Kimpe, S.J.; Van Heuven-Nolsen, D.; Van Amsterdam, J.G.; Radomski, M.W.; Nijkamp, F.P. Induction of nitric oxide release by interferon-gamma inhibits vasodilation and cyclic GMP increase in bovine isolated mesenteric arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 268: 910-915, 1994.
- Dellinger, R.P.; Carlet, J.M.; Masur, H.; Gerlach, H.; Calandra, T.; Cohen, J.; Gea-Banacloche, J.; Keh, D.; Marshall, J.C.; Parker, M.M.; Ramsay, G.; Zimmerman, J.L.; Vincent, J.L.; Levy, M.M. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med.**, 32: 858-873, 2004.

- DeRubertis, F.R.; Craven, P.A. Activation of hepatic guanylate cyclase by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. Effects of thiols, N-ethylmaleimide, and divalent cations. **J. Biol. Chem.**, 252: 5804-5814, 1977.
- Eiserich, J.P.; Baldus, S.; Brennan, M.L.; Ma, W.; Zhang, C.; Tousson, A.; Castro, L.; Luscis, A.J.; Nauseef, W.M.; White, C.R.; Freeman, B.A. Myeloperoxidase, a leukocyte-derived vascular NO oxidase. **Science**, 296:2391-4, 2002.
- Eu, J.P.; Sun, J.; Xu, L.; Stamler, J.S.; Meissner, G. The skeletal muscle calcium release channel: coupled O<sub>2</sub> sensor and NO signaling functions. **Cell** 102: 499-509, 2000.
- Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? **Crit. Care Med.**, 32:S219-222, 2004.
- Evgenov, O.V.; Bjertnaes, L.J. Administration of methylene blue in human septic shock: renaissance of an old drug? **Crit. Care Med.**, 31: 1601-1602; 2003.
- Evans, T.; Carpenter, A.; Kinderman, H.; Cohen, J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circ. Shock.**, 41: 77-81, 1993.
- Feihl, F.; Waeber, B.; Liaudet, L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacol. Ther.**, 91: 179-213, 2001
- Field, L.; Dilts, R.V.; Ravichandran, R.; Lenhert, P.G.; Carnahan, G.E. An unusually stable thionitrite from N-acetyl-D,L-penicillamine; X-ray crystal and molecular structure of 2-(acetylamino)-2-carboxy-1,1-dimethylethyl thionitrite. **J. Chem. Soc. Comm.**, 249-250, 1978.
- Fink, M.P.; Heard, S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock. **J. Surg. Res.**, 49, 186-196, 1990.
- Filippov, G.; Bloch, D.B.; Bloch, K.D. Nitric oxide decreases stability of mRNA encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. **J. Clin. Invest.**, 100: 942-948, 1997.
- Fleming, I.; Julou-Schaeffer, G.; Gray, G.A.; Parratt, J.R.; Stoclet, J.C. Evidence that an L-arginine/nitric oxide dependent elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by endotoxin. **Br. J. Pharmacol.**, 103: 1047-1052, 1991.
- Foster, D.C.; Wedel, B.J.; Robinson, S.W.; Garbers, D.L. Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. **Rev Physiol Biochem Pharmacol.**, 135: 1-39, 1999.
- Foster, M.W.; McMahon, T.J.; Stamler, J.S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends Mol. Med.**, 9: 160-168, 2003.

- Freise H, Bruckner UB, Spiegel HU. Animal models of sepsis. **J. Invest. Surg.**, 14(4):195-212, 2001.
- Friebe, A.; Wedel, B.; Harteneck, C.; Foerster, J.; Schultz, G.; Koesling, D. Functions of conserved cysteines of soluble guanylyl cyclase. **Biochemistry**, 36: 1194-1198, 1997.
- Friebe, A.; Koesling, D. Mechanism of YC-1-induced activation of soluble guanylyl cyclase. **Mol. Pharmacol.**, 53: 123-127, 1998.
- Friebe, A.; Koesling, D. Regulation of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase. **Circ. Res.**, 93: 96-105, 2003.
- Foster, M.W.; McMahon, T.J.; Stamler, J.S: S-nitrosylation in health and disease. **Trends Mol Med.**, 9: 160-168, 2003.
- Furchgott, R.F.; Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, 288: 372-376, 1980.
- Gachot, B.; Bedos JP, Veber B, Wolff M, Regnier B. Short-term effects of methylene blue on hemodynamics and gas exchange in humans with septic shock. **Intensive Care Med.**, 21: 1027-1031, 1995.
- Garner CC, Nash J, Huganir RL. PDZ domains in synapse assembly and signalling. **Trends Cell Biol.**, 10: 274-280, 2000.
- Garthwaite, J.; Southam, E.; Boulton, C.L.; Nielsen, E.B.; Schmidt, K.; Mayer, B. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one. **Mol. Pharmacol.**, 48: 184-188, 1995.
- Gaston, B.M.; Carver, J.; Doctor, A.; Palmer, L.A. S-nitrosylation signaling in cell biology. **Mol. Interv.**, 3: 253-263, 2003.
- Gozzoli, V.; Schottker, P.; Suter, P.M.; Ricou, B. Is it worth treating fever in intensive care unit patients? Preliminary results from a randomized trial of the effect of external cooling. **Arch. Intern. Med.**, 161(1):121-123, 2001.
- Graff, G.; Stephenson, J.H.; Glass, D.B.; Haddox, M.K.; Goldberg, N.D. Activation of soluble splenic cell guanylate cyclase by prostaglandin endoperoxides and fatty acid hydroperoxides. **J. Biol. Chem.**, 253:7662-7676, 1978.
- Granger, D.L.; Hibbs, J.B.; JR.; Perfect, J.R.; Durack, D.T. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. **J. Clin. Invest.**, 85(1): 264-273, 1990.

- Gratton, J.P.; Maurice, M.C.; Rae, G.A.; D'orleans-juste, P. Pharmacological properties of endothelins and big endothelins in ketamine/xylazine or urethane anesthetized rats. **Am. J. Hypertens.**, 8(11): 1121-1127, 1995.
- Gray, G.A.; Julou-Schaeffer, G.; Oury, K.; Fleming, I.; Parratt, J.R.; Stoclet, J.C. An L-arginine-derived factor mediates endotoxin-induced vascular hyposensitivity to calcium. **Eur. J. Pharmacol.**, 191: 89-92, 1990.
- Groeneveld, A.B.; Bronsveld, W.; Thijs, L.G. Hemodynamic determinants of mortality in human septic shock. **Surgery**, 99:140–153, 1986.
- Grover, R.; Zaccardelli, D.; Colice, G.; Guntupalli, K.; Watson, D.; Vincent, J.L. An open-label dose escalation study of the nitric oxide synthase inhibitor, N(G)-methyl-L-arginine hydrochloride (546C88), in patients with septic shock. Glaxo Wellcome International Septic Shock Study Group. **Crit. Care Med.**, 27(5):913-922, 1999.
- Gruetter, C.A.; Barry, B.K.; McNamara, D.B.; Gruetter, D.Y.; Kadowitz, P.J. Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. **J. Cyclic. Nucleotide Res.**, 5: 211-224, 1979.
- Gunnett, C.A.; Chu, Y.; Heistad, D.D.; Loihl, A.; Faraci, F.M. Vascular effects of LPS in mice deficient in expression of the gene for inducible nitric oxide synthase. **Am. J. Physiol.**, 275:H416-421, 1998.
- Gupta, G.; Azam, M.; Yang, L.; Danziger, R.S. The beta2 subunit inhibits stimulation of the alpha1/beta1 form of soluble guanylyl cyclase by nitric oxide. Potential relevance to regulation of blood pressure. **J. Clin. Invest.**, 100: 1488-1492, 1997.
- Hall, S.; Turcato, S.; Clapp, L. Abnormal activation of K<sup>+</sup> channels underlies relaxation to bacterial lipopolysaccharide in rat aorta. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 224: 184-190, 1996.
- Hardman, J.G.; Sutherland, E.W. Guanyl cyclase, an enzyme catalyzing the formation of guanosine 3',5'-monophosphate from guanosine triphosphate. **J. Biol. Chem.**, 244: 6363-6370, 1969.
- Harris, R.E.; Beebe-Donk, J.; Doss, H.; Burr Doss, D. Aspirin, ibuprofen, and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in cancer prevention: a critical review of non-selective COX-2 blockade. **Oncol Rep.**, 13: 559-583, 2005.
- Harteneck, C.; Wedel, B.; Koesling, D.; Malkewitz, J.; Bohme, E.; Schultz, G. Molecular cloning and expression of a new alpha-subunit of soluble guanylyl cyclase. Interchangeability of the alpha-subunits of the enzyme. **FEBS Lett.**, 292: 217-222, 1991.
- Hibbs, J.B.JR.; Taintor, R.R.; Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine

- deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Sci. Wash. DC.**, 235: 437-476, 1987.
- Hibbs, J.B.; Taintor, R.R.; Vavrin, Z.; Rachlin, E.M. Nitric Oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 1587: 87-94, 1988.
- Hidaka, H.; Asano, T. Stimulation of human platelet guanylate cyclase by unsaturated fatty acid peroxides. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 74:3657-3661, 1977.
- Henry, P.J.; Drummer, O.H.; Horowitz, J.D. S-nitrosothiols as vasodilators: implications regarding tolerance to nitric oxide-containing vasodilators **Br. J. Pharmacol.**, 98:757-766, 1989.
- Hobbs, A.J. Soluble guanylate cyclase: the forgotten sibling. **Trends Pharmacol. Sci.**, 12: 484-491, 1997.
- Hofmann, F.; Ammendola, A.; Schlossmann, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. **J. Cell Sci.**, 113: 1671-1676, 2000.
- Hogg, N. The biochemistry and physiology of S-nitrosothiols. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 42: 585-600, 2002
- Hollenberg, S.M.; Cunnion, R.E.; Zimmerberg, J. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. **Am. J. Physiol.**, 264: H660-663, 1993.
- Hollenberg, S.M.; Piotrowski, M.J.; Parrillo, J.E. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to endothelin-1 in septic rats. **Am. J. Physiol.**, 272: R969-974, 1997.
- Hollenberg, S.M.; Broussard, M.; Osman, J.; Parrillo, J.E. Increased microvascular reactivity and improved mortality. **Circ. Res.**, 86: 774-778, 2000.
- Hollenberg, S. M.; Ahrens, T. S.; Annane, D.; Astiz, M. E.; Chalfin, D. B.; Dasta, J. F.; Heard, S. O.; Martin, C.; Napolitano, L. M.; Susla, G. M.; Totaro, R.; Vincent, J. L.; Zanotti-Cavazzoni, S. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. **Crit. Care Med.**, 32: 1928-1948, 2004.
- Hom, G.J.; Grant, S.K.; Wolfe, G.; Bach, T.J.; Macintyre, D.E.; Hutchinson, N.I. Lipopolysaccharide-induced hypotension and vascular hyporeactivity in the rat: tissue analysis of nitric oxide synthase mRNA and protein expression in the presence and absence of dexamethasone, NG-monomethyl-L-arginine or indomethacin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 272: 452-459, 1995.
- Humbert, P.; Niroomand, F.; Fischer, G.; Mayer, B.; Koesling, D.; Hinsch, K.D.; Gausepohl, H.; Frank, R.; Schultz, G.; Bohme, E. Purification of soluble guanylyl

- cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. **Eur. J. Biochem.**,190: 273-278, 1990.
- Ignarro, L.J.; Barry, B.K.; Gruetter, D.Y.; Ohlstein, E.H.; Gruetter, C.A.; Kadowitz, P.J.; Baricos, W.H. Selective alterations in responsiveness of guanylate cyclase to activation by nitroso compounds during enzyme purification. **Biochim. Biophys. Acta.**, 673: 394-407, 1981.
- Imbimbo, B.P. The potential role of non-steroidal anti-inflammatory drugs in treating Alzheimer's disease. **Expert Opin. Investig. Drugs.**,13: 1469-1481, 2004.
- Ince, C.; Sinnasappel, M. Microcirculatory oxygenation and shunting in sepsis and shock. **Crit. Care Med.**, 27: 1369-1377, 1999.
- Ishibashi, T.; Kawada, T.; Kato, K.; Hamaguchi, M.; Imai, S. Contribution of activation of K<sup>+</sup> channels to glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta. **Gen. Pharmacol.**, 26: 543-552, 1995.
- Ishikawa, E.; Ishikawa, S.; Davis, J.W.; Sutherland, E.W. Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues and of guanyl cyclase in rat intestine. **J. Biol. Chem.** 244: 6371-6376, 1969.
- Julou-Schaeffer, G.; Gray, G.A.; Fleming, I.; Schott, C.; Parratt, J.R.; Stoclet, J.C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **Am. J. Physiol.**, 259: H1038-H1043, 1990.
- Keaney, J.F.; Puyana, J.C.; Francis, S.; Loscalzo, J.F; Stamler JS and Loscalzo J Methylene blue reverses endotoxin-induced hypotension. **Circ. Res.**,74: 1121-1125, 1994.
- Kilbourn, R.G.; Jubran, A.; Gross, S.S.; Griffith, O.W.; Levi, R.; Adams, J.; Lodato, R.F. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Biochim. Biophys. Res. Commun.**, 172: 1132-1138, 1990.
- Kilbourn, R.G.; Szabó, C.; Traber, D.L. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. **Shock**, 7: 235-246, 1997.
- Kirov, M.Y.; Evgenov, O.V.; Evgenov, N.V.; Egorina, E.M.; Sovershaev, M.A.; Sveinbjornsson, B.; Nedashkovsky, E.V.; Bjertnaes, L.J. Infusion of methylene blue in human septic shock: a pilot, randomized, controlled study. **Crit. Care Med.**, 29: 1860-1867, 2001.
- Knowles, R.G.; Merrett, M.; Salter, M.; Moncada, S. Differential induction of brain, lung and liver nitric oxide synthase by endotoxin in the rat. **Biochem. J.**, 270: 833-836, 1990.

- Koch, H.J. Effects of methylene blue in septic shock. **Crit. Care Med.**, 24: 1093-1094, 1996.
- Koesling, D. Studying the structure and regulation of soluble guanylyl cyclase. **Methods**, 19: 485-493, 1999.
- Koesling, D.; Russwurm, M.; Mergia, E.; Mullershausen, F.; Friebe, A. Nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase: structure and regulation. **Neurochem. Int.**, 45: 813-819, 2004.
- Koshland, D.E. The molecular of the year (Editorial). **Science**, 258: 1861, 1992.
- Kornau, H.C.; Schenker, L.T.; Kennedy, M.B.; Seeburg PH. Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. **Science** 269: 1737-1740, 1995.
- Krumenacker, J.S.; Hanafy, K.A.; Murad, F. Regulation of nitric oxide and soluble guanylyl cyclase. **Brain Res Bull.**, 62: 505-515, 2004.
- Lee, K.Y.; Perretta, S.G.; Zar, H.; Mueller, R.A.; Boysen, P.G. Increase in rat plasma antioxidant activity after E. coli lipopolysaccharide administration. **Yonsei Med. J.**, 42: 114-119, 2001.
- Levin, R.L.; Degrange, M.A.; Bruno, G.F.; Del Mazo, C.D.; Taborda, D.J. Griotti, J.J. Boullon, F.J. Methylene blue reduces mortality and morbidity in vasoplegic patients after cardiac surgery. **Ann. Thorac. Surg.**, 77: 496-499, 2004.
- Liu, S.; Adcock, I.M.; Old, R.W.; Barnes, P.J.; Evans, T.W. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 196: 1208-1213, 1993.
- Lopez, A.; Lorente, J.A.; Steingrub, J.; Bakker, J.; McLuckie, A.; Willatts, S.; Brockway, M.; Anzueto, A.; Holzapfel, L.; Breen, D.; Silverman, M.S.; Takala, J.; Donaldson, J.; Arneson, C.; Grove, G.; Grossman, S.; Grover, R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Crit. Care Med.**, 32:21-30, 2004.
- Lucas, K.A.; Pitari, G.M.; Kazerounian, S.; Ruiz-stewart, I.; Park, J.; Schulz, S.; Chepenik, K.P.; Waldman, S.A. Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.**, 52: 375-413, 2000.
- Lundberg, J.O.; Weitzberg, E. NO generation from nitrite and its role in vascular control. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 25:915-922.
- Macarthur, H.; Westfall, T.C.; Riley, D.P.; Misko, T.P.; Salvemini, D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 97:9753-9758, 2000.

- MacMicking, J.D.; Nathan, C.; Hom, et al: Altered responses to bacterial infection and endotoxin shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Cell**, 81: 641-650, 1995.
- Mansi, G.; Serio, M.; Potenza, M. A.; Montagnani, M.; Mitolo-chieppa, D. Involvement of nitric oxide in hyporeactivity of rat mesenteric vascular bed during endotoxic shock: effect of dexamethasone and endothelin-I. **Boll. Soc. Ital. Biol. Sper**, 72: 155-162, 1996.
- Marczin, N.; Tekeres, M.; Salzman, A.L.; Szabo, C. Methylene blue infusion in septic shock. **Crit. Care Med.**, 23(11):1936-1938, 1995.
- Marshall, H.E.; Stamler, J.S. Nitrosative stress-induced apoptosis through inhibition of NF-kappa B. **J. Biol. Chem.**, 277(37):34223-34228, 2002.
- Mayer, B.; Brunner, F.; Schmidt, K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. **Biochem. Pharmacol.**, 45: 367-374, 1993.
- McAndrew, J.; Patel, R.P.; JO, H.; Cirbwekkm T.; Kubcikb, T.; Moellering, D.; White, C.R.; Matalon, S.; darley-usmar, V. The interplay of nitric oxide and peroxynitrite with signal transduction pathways: implications for disease. **Sem. Perinatol.**, 21: 351-366, 1997.
- McDonald, L.J.; Murad, F: Nitric oxide and cGMP signaling. **Adv Pharmacol.**, 34: 263-275, 1995.
- Memis, D.; Karamanlioglu, B.; Yuksel, M.; Gemlik, I.; Pamukcu, Z. The influence of methylene blue infusion on cytokine levels during severe sepsis. **Anaesth. Intensive Care**, 30: 755-762, 2002.
- Michie, H.R.; Spriggs, D.R.; Manogue, K.R.; Sherman, M.L.; Revhaug, A.; O'Dwyer, S.T.; Arthur, K.; Dinarello, C.A.; Cerami, A.; Wolff, S.M. Tumor necrosis factor and endotoxin induce similar metabolic responses in human beings. **Surgery**. 104(2):280-286, 1988.
- Miyoshi, H.; Nakaya. Y. Endotoxin-induced nonendothelial nitric oxide activates the Ca(2+)-activated K+ channel in cultured vascular smooth muscle cells. **J. Mol. Cell Cardiol.**, 26: 1487-1495, 1994.
- Nathan, C.; Xie, Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. **J. Biol. Chem.**, 269: 13725-13728, 1994.
- Nathan, C.; Shiloh, M.U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 97: 8841-8848, 2000.

- Nava, E.; Palmer, R.M.J.; Moncada, S. The role of nitric oxide in endotoxin shock: effects of L-NMMA. **J Cardiovasc Pharmacol.**, 12: S132-S134, 1992.
- Niederman, M.S.; Fein, A.M. Sepsis syndrome, the adult respiratory distress syndrome, and nosocomial pneumonia. A common clinical sequence. **Clin. Chest. Med.**, 11: 633-656, 1990.
- Ochoa, J.B.; Udekwu, A.O.; Billiar, T.R.; Curran, R.D.; Cerra, F.B.; Simmons, R.L.; Peitzman, A.B. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Ann. Surg.**, 214: 621-626, 1991.
- Ohlstein, E.H.; Wood, K.S.; Ignarro, L.J. Purification and properties of heme-deficient hepatic soluble guanylate cyclase: effects of heme and other factors on enzyme activation by NO, NO-heme, and protoporphyrin IX. **Arch. Biochem. Biophys.**, 218: 187-198, 1982.
- Palmer, R.M.J.; Ferrige, A.G.; Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, 327: 524-526, 1987.
- Papapetropoulos, A.; Go, C.Y.; Murad, F.; Catravas, J.D. Mechanisms of tolerance to sodium nitroprusside in rat cultured aortic smooth muscle cells. **Br. J. Pharmacol.**, 117: 147-155, 1996.
- Papapetropoulos, A.; Zhou, Z.; Gerassimou, C.; Yetik, G.; Venema, R.C.; Roussos, C.; Sessa, W.C.; Catravas, J.D. Interaction between the 90-kDa heat shock protein and soluble guanylyl cyclase: physiological significance and mapping of the domains mediating binding. **Mol. Pharmacol.**, 68(4):1133-1141, 2005.
- Parker, M.M.; Parrillo, J.E. Septic shock. Hemodynamics and pathogenesis. **JAMA**, 250:3324-3327, 1983.
- Parratt, J.R.; Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. **J. Antimicrob. Chemother.**, 41: 31-39, 1998.
- Parrillo, J.E.; Parker, M.M.; Natanson, C.; Suffredini, A.F.; Danner, R L.; Cunnion, R.E.; Ognibene, F.P. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. **Ann. Intern. Med.**, 113: 227-242, 1990.
- Paya, D.; Gray, G.A.; Stoclet, J.C. Effects of methylene blue on blood pressure and reactivity to norepinephrine in endotoxemic rats. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 21: 926-930, 1993.
- Peres-Bota, D.; Lopes-Ferreira, F.; Melot, C.; Vincent, J.L. Body temperature alterations in the critically ill. **Intensive Care Med.**, 30(5):811-816, 2004.

- Pfeilschifter, J.; Eberhardt, W.; Beck, K.F. Regulation of gene expression by nitric oxide. **Pflugers Arch.**, 442(4):479-486, 2001.
- Poblete, B.; Romand, J.A.; Pichard, C.; König, P.; Suter, P.M. Metabolic effects of i.v. propacetamol, metamizol or external cooling in critically ill febrile sedated patients. **Br. J. Anaesth.**, 78(2):123-127, 1997.
- Preiser, J.C.; Lejeune, P.; Roman, A.; Carlier, E.; De Backer, D.; Leeman, M.; Kahn, R.J.; Vincent, J.L. Methylene blue administration in septic shock: a clinical trial. **Crit. Care Med.**, 23: 259-264, 1995.
- Pyriochou, A.; Papapetropoulos, A. Soluble guanylyl cyclase: more secrets revealed. **Cell Signa.**, 17: 407-413, 2005.
- Quezado, Z.M.N.; Natanson C. Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock. **Am. J. Kidney Dis.**, 20: 214-222, 1992.
- Rangel-Frausto, M.S. Sepsis: still going strong. **Arch. Med. Res.**, 36: 672-681, 2005.
- Rees, D.D.; Cellek, S.; Palmer, R. M.; Moncada, S. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 173(2): 541-547, 1990.
- Rees, D.D. Role of nitric oxide in the vascular dysfunction of septic shock. **Biochem. Soc. Trans.**, 23: 1025-1029, 1995.
- Rees, D. D.; Cunha, F. Q.; Assreuy, J.; Herman, A. G.; Moncada, S. Sequential induction of nitric oxide synthase by *Corynebacterium parvum* in different organs of the mouse. **Br. J. Pharmacol.**, 114: 689-693, 1995.
- Remick, D.G.; Newcomb, D.E.; Bolgos, G. L.; Call, D.R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, 13, 110–116, 2000.
- Ribeiro, S.P.; Villar, J.; Downey, G.P.; Edelson, J.D.; Slutsky, A.S.; Sodium arsenite induces heat shock protein-72 kilodalton expression in the lungs and protects rats against sepsis. **Crit. Care Med.**, 22(6):922-929, 1994.
- Riedemann, N.C; Guo, R.F.; Ward, P.A. The enigma of sepsis. **J. Clin. Invest.**, 112: 460-467, 2003.
- Russwurm, M.; Behrends, S.; Harteneck, C.; Koesling, D. Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. **Biochem. J.**, 335:125-130, 1998.

- Russwurm, M.; Wittau, N.; Koesling, D. Guanylyl cyclase/PSD-95 interaction: targeting of the nitric oxide-sensitive  $\alpha_2\beta_1$  guanylyl cyclase to synaptic membranes. **J. Biol. Chem.**, 276: 44647-446452, 2001.
- Russwurm, M.; Koesling, D. Isoforms of NO-sensitive guanylyl cyclase. **Mol. Cell Biochem.**, 230: 159-164, 2002.
- Salter, M.; Knowles, R.G.; Moncada, S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent and  $\text{Ca}^{2+}$ -independent nitric oxide synthases. **FEBS Lett.**, 291: 145-149, 1991.
- Salvemini D, Korb R, Anggard E, Vane J. Immediate release of a nitric oxide-like factor from bovine aortic endothelial cells by Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc Natl Acad Sci.**, 87: 2593-2597, 1990.
- Schmidt, H.H.; Lohmann, S. M.; Walter, U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1178: 153-175, 1993.
- Schneider, F.; Lutun, P.; Hasselmann M, Stoclet JC, Tempe JD. Methylene blue increases systemic vascular resistance in human septic shock. Preliminary observations. **Intensive Care Med.**, 18: 309-311, 1992.
- Schneider F. Methylene blue infusion in septic shock. **Crit.Care Med.**, 23:1935-1936, 1995.
- Schultz, G.; Bohme, E.; Munske, K. Guanylyl cyclase. Determination of enzyme activity. **Life Sci.**, 8: 1323-1332, 1969.
- Schulz, A.; Marx, U.C.; Hidaka, Y.; Shimonishi, Y.; Rosch, P.; Forssmann, W.G.; Adermann, K. Role of the prosequence of guanylin. **Protein Sci.**, 8: 1850-1859, 1999.
- Schwartz, D.; Blantz RC: Nitric oxide, sepsis, and the kidney. **Semin. Nephrol.**, 19: 272-276, 1999.
- Scott, W.S.; Nakayama, D.K. Sustained nitric oxide exposure decreases soluble guanylate cyclase mRNA and enzyme activity in pulmonary artery smooth muscle. **Surg. Res.**, 79: 66-70, 1998a.
- Scott WS and Nakayama DK. Escherichia coli lipopolysaccharide downregulates soluble guanylate cyclase in pulmonary artery smooth muscle. **J. Surg. Res.**, 80: 309-314, 1998b.
- Sharma, R.K. Evolution of the membrane guanylate cyclase transduction system. **Mol. Cell. Biochem.**, 230: 3-30, 2002.

- Sheng, M.; Pak, D.T. Ligand-gated ion channel interactions with cytoskeletal and signaling proteins. **Annu. Rev. Physiol.**, 62: 755-778, 2000.
- Sherwood, E.R.. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, 18: 385-405, 2004.
- Silva-Santos, J.E. **Envolvimento do óxido nítrico e de canais de potássio nas alterações da reatividade vascular em modelos experimentais de sepse.** 2003. 152 f. Tese (Doutorado em Farmacologia). Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003.
- Silva-Santos, J.E.; Terluk, M.R.; Assreuy, J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. **Shock**, 17: 70-76, 2002.
- Silva, E.; Pedro, Mde A.; Sogayar, A.C.; Mohovic, T.; Silva, C.L.; Janiszewski, M.; Cal, R.G.; de Sousa, E.F.; Abe, T.P.; de Andrade, J.; de Matos, J.D.; Rezende, E.; Assunção, M.; Avezum, A.; Rocha, P.C.; de Matos, G.F.; Bento, A.M.; Correa, A.D.; Vieira, P.C.; Knobel, E.; Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit. Care.**, 8: R251-260, 2004.
- Stone JR, Marletta MA. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. **Biochemistry**, 33:5636-5640, 1994
- Stuehr, D.J.; Marletta, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 82: 7738-7742, 1985.
- Suffradini, A.F.; Fromm, R.E.; Parker, M.M.; Breener, M.; Kovacs, J.A.; Wesley, R.A.; Parvilho, J.E. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. **N. Engl. J. Med.**, 321: 280-287, 1989.
- Szabo, C.; Mitchell, J.A.; Thiemermann, C.; Vane, J.R. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in lipopolysaccharide shock. **Br. J. Pharmacol.**, 108:786-792, 1993.
- Takata, M.; Filippof, G.; Liu, H.; Ichinose, F.; Janssens, S.; Bloch, D.B.; Bloch, K.D. Cytokines decrease sGC in pulmonary artery smooth muscle cells via NO-dependent and NO-independent mechanisms. **Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.**, 280: L272-L278, 2001.
- Terluk, M.R.; Silva-Santos, J.E.; Assreuy, J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. **Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.**, 361:477-483, 2000.

- Thirstrup, S.; Nielsen-kudsk, J.E. Effects of K<sup>+</sup> channel blockers on the relaxant action of dihydralazine, cromakalim and nitroprusside in isolated rabbit femoral arteries. **Eur. J. Pharmacol.**, 215(2-3): 177-183, 1992.
- Thorpe, D.S.; Garbers, D.L. The membrane form of guanylate cyclase. Homology with a subunit of the cytoplasmic form of the enzyme. **J. Biol. Chem.**, 264: 6545-6549, 1989.
- Titheradge, M.A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim. Biophys. Acta**, 1411: 437-455, 1999.
- Tracey, K.J.; Beutler, B.; Lowry, S.F.; Merryweather, J.; Wolpe, S.; Milsark, I.W.; Hariri, R.J.; Fahey, T.J.; Zentella, A.; Albert, J.D. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. **Science.**, 234:470-4, 1986.
- Tracey, K.J.; Fong, Y.; Hesse, D.G.; Manogue, K.R.; Lee, A.T.; Kuo, G.C.; Lowry, S.F.; Cerami, A. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. **Nature**, 330(6149):662-664, 1987.
- Tseng, C.M.; Tabrizi-Fard, M.A.; Fung, H.L. Differential sensitivity among nitric oxide donors toward ODQ-mediated inhibition of vascular relaxation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 292: 737-742, 2000.
- Tsuchida, S.; Hiraoka, M.; Sudo, M.; Kigoshi, S.; Muramatsu, I. Attenuation of sodium nitroprusside responses after prolonged incubation of rat aorta with endotoxin. **Am. J. Physiol.**, 267: H2305-H2310, 1994.
- Ujii, K.; Hogarth, L.; Danziger, R.; Drewett, J.G.; Yuen, P.S.; Pang, I.H.; Star, R.A. Homologous and heterologous desensitization of a guanylyl cyclase-linked nitric oxide receptor in cultured rat medullary interstitial cells. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 270: 761-767, 1994.
- Vallance, P.; Palmer, R.M.J.; Moncada, S. The role of induction of nitric oxide synthesis in the altered responses of jugular veins from endotoxaemic rabbits. **Br.J. Pharmacol.**, 106: 459-463, 1992.
- Venema, R.C.; Venema, V.J.; Ju, H.; Harris, M.B.; Snead, C.; Jilling, T.; Dimitropoulou, C.; Maragoudakis, M.E.; Catravas, J.D. Novel complexes of guanylate cyclase with heat shock protein 90 and nitric oxide synthase. **Am J Physiol. Heart. Circ. Physiol.**, 285: H669- H678, 2003.
- Villar, J.; Ribeiro, S.P.; Mullen, J.B.; Kuliszewski, M.; Post, M.; Slutsky, A.S. Induction of the heat shock response reduces mortality rate and organ damage in a sepsis-induced acute lung injury model. **Crit. Care Med.**, 22:914-921, 1994.
- Vincent, J.L.; Zhang, H.; Szabo, C., Preiser, J.C. Effects of nitric oxide in septic shock. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** 161: 1781-1785, 2000.

- Visarius, T.M.; Stucki, J.W.; Lauterburg, B.H. Stimulation of respiration by methylene blue in rat liver mitochondria. **FEBS Lett.**, 412: 157-160, 1997.
- Wedel, B.; Humbert, P.; Harteneck, C.; Foerster, J.; Malkewitz, J.; Bohme, E.; Schultz, G.; Koesling, D. Mutation of His-105 in the beta 1 subunit yields a nitric oxide-insensitive form of soluble guanylyl cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 91: 2592-2596, 1994.
- Wedel, B.; Harteneck, C.; Foerster, J.; Friebe, A.; Schultz, G.; Koesling, D. Functional domains of soluble guanylyl cyclase. **J. Biol. Chem.**, 270: 24871-2485, 1995.
- Wei, X.Q.; Charles, I.G.; Smith, A.; Ure, J.; Feng, G.J.; Huang, F.P.; Xu, D.; Muller, W.; Moncada, S.; Liew, F.Y. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature.**, 375:408-411, 1995.
- Weingartner, R.; Oliveira, E.; Oliveira, E.S.; Sant'Anna, U.L.; Oliveira, R.P.; Azambuja, L.A.; Friedman, G. Blockade of the action of nitric oxide in human septic shock increases systemic vascular resistance and has detrimental effects on pulmonary function after a short infusion of methylene blue. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 32: 1505-1513, 1999.
- Wenzel, RP. The mortality of hospital-acquired bloodstream infections: need for a new vital statistic? **Int. J. Epidemiol.**, 17: 225-227, 1988.
- Wheeler, A.P.; Bernard, G.R. Treating patients with severe sepsis. **N. Eng. J. Med.**, 340: 207-214, 1999.
- White, A.A.; Aurbach, G.D. Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues. **Biochim. Biophys. Acta**, 191: 686-697, 1969.
- Wilson, E.M.; Chinkers, M. Identification of sequences mediating guanylyl cyclase dimerization. **Biochemistry**, 34: 4696-4701, 1995.
- Winqvist, R.J.; Faison, E.P.; Waldman, S.A.; Schwartz, K.; Murad, F.; Rapoport, R.M. Atrial natriuretic factor elicits an endothelium-independent relaxation and activates particulate guanylate cyclase in vascular smooth muscle. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 81: 7661-7664, 1984.
- Wu, C.C.; Chen, S.J.; Szabo, C.; Thiernemann, C.; Vane, J.R. Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent model of endotoxic shock. **Br. J. Pharmacol.** 114: 1666-1672, 1995.
- Wu, C.C.; Ruetten, H. Thiernemann C: Comparison of the effects of aminoguanidine and N-nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat. **Eur. J. Pharmacol.**, 300: 99-104, 1996.

- Wu, C.C.; Chen, S.J.; Yen, M.H. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylyl cyclase contributes to endotoxin shock in rats. **Am. J. Physiol.**, 275: H1148-H1157, 1998.
- Zabel, U.; Weeger, M.; La, M.; Schmidt, H.H. Human soluble guanylate cyclase: functional expression and revised isoenzyme family. **Biochem J.**, 335: 51-57, 1998.
- Zabel, U.; Kleinschnitz, C.; Oh, P.; Nedvetsky, P.; Smolenski, A.; Muller, H.; Kronich, P.; Kugler, P.; Walter, U.; Schnitzer, J.E.; Schmidt, H.H. Calcium-dependent membrane association sensitizes soluble guanylyl cyclase to nitric oxide. **Nat. Cell. Biol.** 4: 307-311, 2002.
- Zhang, H.; Rogiers, P.; Preiser, J.C.; Spapen, H.; Manikis, P.; Metz, G.; Vincent, J.L. Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock. **Crit. Care Med.**, 23: 1711-1721, 1995.
- Zhao, Y.; Schelvis, J.P.; Babcock, G.T.; Marletta, M.A. Identification of histidine 105 in the beta1 subunit of soluble guanylate cyclase as the heme proximal ligand. **Biochemistry** 37: 4502-4509, 1998.
- Zhao, Y.; Brandish, P.E.; Ballou, D.P.; Marletta, M.A. A molecular basis for nitric oxide sensing by soluble guanylate cyclase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A** 96: 14753-14758, 1999.
- Zhou, Z.; Gross, S.; Roussos, C.; Meurer, S.; Muller-Esterl, W.; Papapetropoulos, A. Structural and functional characterization of the dimerization region of soluble guanylyl cyclase. **Biol. Chem.**, 279: 24935-24943, 2004.
- Zacharowski, K.; Berkels, R.; Olbrich, A.; Chatterjee, P.K.; Cuzzocrea, S.; Foster, S.J.; Thiemermann, C. The selective guanylate cyclase inhibitor ODQ reduces multiple organ injury in rodent models of Gram-positive and Gram-negative shock. **Crit. Care Med.**, 29: 1599-1608, 2001.
- Zingarelli, B.; Hasko, G.; Salzman, A.L.; Szabo, C. Effects of a novel guanylyl cyclase inhibitor on the vascular actions of nitric oxide and peroxynitrite in immunostimulated smooth muscle cells and in endotoxic shock. **Crit. Care Med.**, 27: 1701-1707, 1999.
- Yamaguchi, N.; Jesmin, S.; Zaedi, S.; Shimojo, N.; Maeda, S.; Gando, S.; Koyama, A.; Miyauchi, T. Time-dependent expression of renal vaso-regulatory molecules in LPS-induced endotoxemia in rat. **Peptides**, doi:10.1016/j.peptides.2006.03.025.
- Yuen, P.S.; Potter, L.R.; Garbers, D.L. A new form of guanylyl cyclase is preferentially expressed in rat kidney. **Biochemistry**, 29: 10872-10878, 1990.