

LETÍCIA KRAMER PACHECO

**ENVOLVIMENTO DA ANGIOTENSINA II NOS
EVENTOS INICIAIS DA SEPSE AVALIADO ATRAVÉS
DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E
INFLAMATÓRIOS**

FLORIANÓPOLIS – SC

2009

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

**ENVOLVIMENTO DA ANGIOTENSINA II NOS
EVENTOS INICIAIS DA SEPSE AVALIADO ATRAVÉS
DE PARÂMETROS HEMODINÂMICOS E
INFLAMATÓRIOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Co-orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

LETÍCIA KRAMER PACHECO

PACHECO, Letícia Kramer. **Envolvimento da angiotensina II nos eventos iniciais da sepse avaliado através de parâmetros hemodinâmicos e inflamatórios.** Florianópolis, 2009, 71 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Defesa: 10/02/2009

A sepse consiste em uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica secundária à infecção. A angiotensina II além de ser um importante vasoconstritor liberado durante a sepse, também possui efeitos pró-inflamatórios. O tratamento de animais que tiveram a condição de sepse induzida através da cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP), com as doses de 0,25 mg/kg ou 15 mg/kg de losartan, um antagonista dos receptores AT1 de angiotensina, duas horas após a CLP, mostrou nas análises feitas 4 horas após o tratamento, que ambas as doses reduziram a inflamação nos animais sépticos. Nenhuma das doses alterou a hiporreatividade a fenilefrina. A maior dose causou queda da pressão arterial média (PAM) e piora da função renal. Por outro lado, análises feitas 22 horas após o tratamento mostraram que a menor dose não interferiu na PAM, melhorou a hiporreatividade aos agentes vasoconstritores fenilefrina e angiotensina II e permaneceu reduzindo a inflamação. Esta dose não alterou os níveis plasmáticos de creatinina, uréia e NOx que se encontravam elevados nos animais sépticos. A maior dose promoveu uma considerável queda da PAM dos animais e piora da hiporreatividade a fenilefrina e a angiotensina II. Como comparativo, o tratamento precoce dos animais sépticos com a dose de 0,25 mg/kg de enalapril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) mostrou os mesmos resultados apresentados pelo losartan. A administração das duas doses de losartan, em momento tardio da sepse (8 horas após a CLP) com análises feitas 16 horas após o tratamento, mostrou que a dose baixa não melhorou e a maior dose permaneceu piorando a hiporreatividade a fenilefrina e a angiotensina II. Portanto, o tratamento precoce com uma baixa dose de losartan foi capaz de melhorar alguns parâmetros na sepse. Assim, uma interferência de forma adequada no sistema renina-angiotensina pode fornecer importantes ferramentas que auxiliem na compreensão e no tratamento da sepse.

Sepse, angiotensina II, losartan e enalapril

“A força não provém da capacidade física, mas sim de uma vontade indomável”

(Mahatama Gandhi)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jandira e Lori, pelo constante amor, incentivo, investimento e compreensão.

Ao amor da minha vida, meu Anjo, Fernando, pelo amor, carinho, dedicação e pela alegria que é viver ao seu lado.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jamil Assreuy, pela oportunidade, orientação, paciência, amizade, agradável convívio e pelos muitos ensinamentos.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Fernandes, pela constante ajuda no desenvolvimento deste trabalho, pelo apoio, paciência, orientação, ensinamentos e amizade.

À Regina de Sordi, que se tornou uma grande amiga nos últimos 2 anos, pelo enorme auxílio no desenvolvimento deste trabalho e pelo exemplo de organização.

Ao Gustavo Campos Ramos, pela amizade, pelos ensinamentos e pela ajuda na realização dos ensaios de MPO, além de outros experimentos.

À Adriane Madeira, pela amizade, carinho, bom humor e suporte técnico, essenciais para a realização deste trabalho.

À Bettina e a Ângela pela amizade, ajuda para passar na prova do mestrado, auxílio em muitos experimentos e maravilhoso convívio.

Aos demais colegas e amigos do Laboratório do Óxido Nítrico, Ana Favero, Ana, Bete, Bruno, Daniela, Edir, Geisson, Lucas Souza, Sílvia, Simone, por me auxiliarem em muitos experimentos e fazerem do nosso laboratório um ambiente de harmonia e cooperação sem competitividade.

Ao Prof. Dr. Mário Steindel pela oportunidade de ter feito iniciação científica, importante para o meu crescimento profissional.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto por disponibilizar equipamentos importantes para este trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina pela contribuição de uma forma ou de outra em minha formação científica.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, pela dedicação em atender às necessidades dos alunos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, pela ajuda prestada.

Aos funcionários do biotério pela importante ajuda prestada.

À Cristália produtos Farmacêuticos (São Paulo, Brasil), pela doação da heparina utilizada em nossos experimentos.

A Capes pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas.....	i
Lista de Figuras.....	ii
Lista de abreviaturas.....	iv
Resumo.....	vi
Abstract.....	viii
1 - INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Sepsis - definição e epidemiologia.....	1
1.2 Fisiopatologia da sepsis.....	2
1.3 Sistema renina-angiotensina.....	6
1.3.1 Angiotensina II.....	8
1.3.2 Fármacos e o sistema renina-angiotensina.....	10
1.3.3 Angiotensina II e sepsis.....	11
2 - OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivo geral.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	14
3.1 Animais.....	14
3.2 Procedimentos Experimentais.....	14
3.2.1 Modelo de septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	14
3.2.2 Avaliação da pressão arterial.....	14
3.2.3 Dosagens bioquímicas.....	16
3.2.3.1 Determinação dos níveis de nitrato e nitrito (NO _x) plasmático.....	16
3.2.3.2 Dosagem de uréia plasmática.....	16
3.2.3.3 Dosagem de creatinina plasmática.....	17
3.2.3.4 Dosagem de glicose.....	17
3.2.4 Dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão.....	17

3.2.5	Determinação do crescimento de bactérias no sangue e no lavado peritoneal.....	18
3.2.6	Contagem de leucócitos totais.....	18
3.2.7	Avaliação da sobrevivência.....	18
3.3	Protocolos Experimentais.....	19
3.3.1	Determinação da duração do efeito fisiológico do losartan e do enalapril.....	19
3.3.2	Avaliação cardiovascular e do efeito da fenilefrina e da angiotensina II em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, tratados precocemente com losartan ou enalapril.....	19
3.3.3	Avaliação do tratamento precoce com losartan ou enalapril na migração de neutrófilos para o pulmão de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	20
3.3.4	Determinação da glicemia de animais tratados precocemente com losartan.....	20
3.3.5	Avaliação dos efeitos da administração precoce de losartan na sobrevivência de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	20
3.3.6	Avaliação cardiovascular e do efeito da fenilefrina e da angiotensina II em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, tratados tardiamente com losartan	21
3.4	Compostos e reagentes utilizados.....	22
3.5	Análise dos resultados e testes estatísticos.....	22
4	RESULTADOS	23
4.1	Determinação da duração do efeito fisiológico do losartan e do enalapril.....	23
4.2	Efeitos da administração precoce de losartan e enalapril na sepse..	25
4.2.1	Losartan, hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores.....	25
4.2.2	Losartan e a função renal.....	29
4.2.3	Losartan e níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (NOx).....	31
4.2.4	Losartan e nível glicêmico.....	33

4.2.5	Losartan e atividade de mieloperoxidase pulmonar.....	34
4.2.6	Losartan e número de leucócitos.....	34
4.2.7	Losartan e presença de bactérias no sangue e no peritônio.....	35
4.2.8	Losartan e mortalidade.....	36
4.2.9	Enalapril, hipotensão e hiporreatividade vascular.....	37
4.2.10	Enalapril e atividade de mieloperoxidase pulmonar.....	39
4.3	Efeitos da administração tardia de losartan na sepse.....	40
4.3.1	Losartan, hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores.....	40
4.3.2	Losartan e a função renal.....	43
4.3.3	Losartan e níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (NOx).....	45
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÕES	61
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Definições de SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico, conforme estabelecido na Conferência de Consenso feita pelo <i>American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine</i> , no ano de 1991.....	1
-----------------	--	----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Determinação da duração do efeito fisiológico do losartan através da avaliação da pressão arterial média e da resposta vasoconstritora à administração de angiotensina II.....	24
Figura 2	Determinação da duração do efeito fisiológico do enalapril através da avaliação da pressão arterial média e da resposta vasoconstritora à administração de angiotensina I.....	24
Figura 3	Efeito do tratamento com losartan sobre a pressão arterial média de animais submetidos à CLP.....	26
Figura 4	Efeito do tratamento com losartan na hiporreatividade à fenilefrina em animais submetidos à CLP.....	27
Figura 5	Efeito do tratamento com losartan na responsividade à angiotensina II em animais submetidos à CLP.....	29
Figura 6	Níveis plasmáticos de creatinina em animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	30
Figura 7	Níveis plasmáticos de uréia em animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	31
Figura 8	Níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (NO _x) em animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	32
Figura 9	Níveis sanguíneos de glicose em animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	33
Figura 10	Efeito do tratamento com losartan sobre a atividade de mieloperoxidase no pulmão de ratos submetidos à CLP.....	34
Figura 11	Número total de leucócitos em animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	35
Figura 12	Quantificação de bactérias presentes no sangue e no lavado peritoneal de animais tratados com losartan.....	36
Figura 13	Curva de sobrevivência de animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	37
Figura 14	Efeito do enalapril sobre a pressão arterial média de animais submetidos à CLP.....	38

Figura 15	Efeitos do enalapril na hiporreatividade à fenilefrina em animais submetidos à CLP.....	38
Figura 16	Efeito do enalapril na responsividade a 30 pmol/kg de angiotensina II em animais submetidos à CLP.....	39
Figura 17	Efeito do tratamento com enalapril na migração de neutrófilos para o pulmão em animais submetidos à CLP.....	40
Figura 18	Efeito do losartan sobre a pressão arterial média de animais submetidos à CLP.....	41
Figura 19	Efeito do tratamento tardio com losartan na hiporreatividade à fenilefrina em animais submetidos à CLP.....	42
Figura 20	Efeito do losartan na responsividade a 30 pmol/kg de angiotensina II em animais submetidos à CLP.....	43
Figura 21	Níveis plasmáticos de creatinina em animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	44
Figura 22	Níveis plasmáticos de uréia em animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	45
Figura 23	Níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (NO _x) em animais submetidos à CLP e tratados com losartan.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS

CLP	- Ligadura e perfuração do ceco
DO	- Densidade óptica
ECA	- Enzima conversora de angiotensina
EDRF	- Fator de relaxamento derivado do endotélio (do inglês: <i>Endothelium-Derived Relaxing Factor</i>)
ENAL	- Enalapril
EPM	- Erro padrão da média
ICAM-1	- Molécula de adesão intracelular 1
i.p.	- Intraperitoneal
IL-1	- Interleucina-1
s.c.	- Subcutâneo
LOS	- Losartan
LPS	- Lipopolissacarídeo
LTA	- Ácido lipoteicóico
MPO	- Mieloperoxidase
RNA_m	- RNA mensageiro
NO	- Óxido nítrico
NO₂	- Nitrito
NO₃	- Nitrato
NOS	- Óxido nítrico sintase
NADPH	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
NF-κB	- Fator nuclear kappa B

- PBS** - Solução salina tamponada com fosfato
- TNF- α** - Fator de necrose tumoral- α
- TLR-4** - Receptor *Toll-Like* tipo 4
- UFC** - Unidade formadora de colônia

RESUMO

Sepse é definida como uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica secundária à infecção. O choque séptico reflete o final de um processo progressivo e contínuo de deterioração caracterizado por queda da pressão sanguínea, sinais bioquímicos de deficiência de oxigênio, danos vasculares e hiporreatividade a vasoconstritores, conduzindo à disfunção de múltiplos órgãos e morte. Um importante vasoconstritor liberado durante a sepse é a angiotensina II, que também tem efeitos pró-inflamatórios. Neste trabalho avaliamos o efeito do bloqueio dos receptores AT1 e da inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) em ratos submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP). A inibição precoce dos receptores AT1 (2 horas após o CLP) com as doses de 0,25 mg/kg ou 15 mg/kg de losartan mostrou que 4 horas após o tratamento (portanto 6 h após o CLP) ambas as doses melhoraram parâmetros associados à inflamação, não interferindo contudo na hiporeatividade. A menor dose não interferiu na hipotensão característica da sepse, diferente da dose de 15 mg/kg que piorou a hipotensão. Quando analisada 22 horas após o tratamento (24 h após CLP), a menor dose não interferiu na hipotensão, melhorou a hiporreatividade e reduziu a inflamação dos animais sépticos. A maior dose, embora tenha melhorado a inflamação, piorou a hipotensão e a hiporreatividade. A administração destas mesmas doses de losartan 8 horas após a cirurgia mostrou que a menor dose não interfere na hipotensão nem na hiporreatividade dos animais, enquanto que a maior dose permanece piorando esses parâmetros. A dose de 0,25 mg/kg de enalapril, administrada 2 horas após a cirurgia, não interferiu na hipotensão, mas melhorou a hiporeatividade dos animais na análise 24 horas após CLP. Doses de 0,25 e 15 mg/kg de enalapril melhoraram a inflamação apenas no tempo de 6 horas após a cirurgia. Avaliações da função renal, produção de NOx e glicemia de animais tratados com losartan mostraram que independente do tempo de tratamento, precoce ou tardio, e do tempo de análise (6 ou 24 h) a menor dose não interfere na função renal e na produção de NOx. A maior dose piora a função renal já comprometida (6 e 24 h), e aumenta a produção de NOx (24 h). A maior dose (2 h após CLP) inibiu a ocorrência da fase hiperglicêmica dos animais sépticos enquanto que a menor dose não interferiu na glicemia. Nenhuma das doses alterou o perfil da curva de mortalidade dos animais sépticos. Dessa forma, podemos supor que em momentos iniciais da sepse esteja ocorrendo uma liberação de angiotensina II que contribui para o desenvolvimento da inflamação e alterações hemodinâmicas na sepse. O tratamento precoce com baixas doses de losartan inibe parcialmente a ação desta angiotensina II, melhorando a hemodinâmica dos animais sépticos, provavelmente como consequência do efeito antiinflamatório desta dose. O tratamento tardio não é capaz de evitar os danos provocados pela liberação

precoce de angiotensina II. Portanto, uma interferência de forma adequada no sistema renina-angiotensina pode fornecer importantes ferramentas que auxiliem na compreensão e no tratamento da sepse.

Palavras-chave: Sepse, angiotensina II, losartan, enalapril.

ABSTRACT

Sepsis is defined as a systemic inflammatory response syndrome caused by infection. Septic shock reflects the end of a progressive and continuous deterioration process characterized by hypotension, biochemical signs of oxygen deficit, vascular damage and hyporesponsiveness to vasoconstrictors, leading to multiple organ failure and death. An important vasoconstrictor released during the sepsis is angiotensin II, which also has pro-inflammatory effects. In the present work we evaluated the effects consequent to AT1 receptor blockade and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibition in rats subjected to cecum ligation and perforation surgery (CLP), a model for sepsis. Early blockage of AT1 receptors (2 hours after CLP) with 0.25 mg/kg or 15 mg/kg losartan decreased inflammation 4 hours after treatment (that is, 6 hours after CLP) but it did not interfere with the hyporesponsiveness. The lower dose did not affect the septic hypotension, but it was worsened by the higher dose. Twenty-two hours after treatment (that is, 24 h after CLP procedure), the lower dose did not affect the hypotension but improved hyporesponsiveness and decreased inflammatory parameters. The higher losartan dose although has improved inflammation, worsened both the hypotension and the hyporesponsiveness. When injected 8 hours after CLP surgery the lower dose did not interfere with the hypotension nor did the hyporesponsiveness. The higher dose worsen both parameters. The ACE inhibitor enalapril, at 0.25 mg/kg and administered 2 hours after CLP surgery, did not affect the hypotension, but improved hiporesponsiveness 24 hours after surgery. Both doses of enalapril decreased inflammation only when the analysis was performed 6 hours after CLP. Kidney damage indexes, NOx and glucose production in animals treated with losartan showed that, regardless of treatment time (early or late) or analysis time (6 or 24 h), the lowest dose did not change with kidney damage and NOx production. The higher dose worsened renal damage (6 and 24 h) and increased NOx production (24 h). The higher dose of losartan inhibited the septic hyperglycemic phase whereas the lower dose did not affect blood glucose levels. Losartan did not change the mortality rate. Thus, we suggest that in the initial moments of sepsis an angiotensin II release is taking place which contributes to the development of inflammatory and hemodynamic changes in sepsis. Early treatment with low losartan doses partially inhibits these angiotensin II effects, thus improving hemodynamics of septic animals, probably due to its anti-inflammatory effects. On the other hand, late blockage of AT1 receptors is devoid of effect. Therefore, an appropriate interference on the renin-angiotensin system can provide new possibilities for the better understanding and treatment of sepsis.

Keywords: Sepsis, angiotensin II, losartan and enalapril.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sepses - definição e epidemiologia

A sepsis é uma doença caracterizada por infecção grave associada à reação inflamatória sistêmica. Diferentemente de outras doenças, pode se apresentar como distintas situações clínicas dentro de um espectro evolutivo da mesma condição fisiopatológica. No ano de 1991, na Conferência de Consenso feita pelo *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*, foram estabelecidos critérios para a classificação de sepsis e doenças similares (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 infecciosa. Além disso, ficou estabelecido também que o termo sepsis deveria ser utilizado apenas nos casos onde a infecção é documentada (Tabela 1). Esta padronização foi muito importante na clínica, para detecção da fase de evolução da doença em que o paciente se encontra e para a possibilidade de intervenção terapêutica adequada.

Tabela 1: Definições de SIRS, sepsis, sepsis grave e choque séptico, conforme estabelecido na Conferência de Consenso feita pelo *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*, no ano de 1991.

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): Conjunto de manifestações clínicas em resposta a agressão orgânica grave que ocorre necessariamente na ausência de infecção. Caracterizada pela presença de dois ou mais dos seguintes sintomas: temperatura $>38^{\circ}\text{C}$ ou $<36^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca >90 bpm; frequência respiratória >20 movimentos/minuto; leucocitose $>12.000/\text{mm}^3$ ou $<4.000/\text{mm}^3$, ou ainda, presença de $>10\%$ de bastões.

Sepsis: Situação em que há presença dos sinais e sintomas descritos acima (SIRS) secundários a um processo infeccioso.

Sepsis Grave: Quadro de sepsis associada à disfunção orgânica, tais como cardiovascular, respiratória, renal, hematológica e do sistema nervoso central.

Choque séptico: Sepsis grave com hipotensão arterial e alteração perfusional refratárias à reposição volêmica adequada.

Apesar do desenvolvimento tecnológico, a incidência de sepsis vem aumentando nos últimos anos, sendo considerada a principal causa de morte em

unidades de tratamento intensivo (UTI's) não-coronarianas. Anualmente, em todo o mundo, ocorrem cerca de 18 milhões de casos de sepse grave. Acredita-se que o aumento na incidência desta patologia seja devido ao crescente número de pacientes imunodeprimidos, ao uso freqüente de procedimentos invasivos, a freqüência no uso de antibióticos (geração de mais microrganismos resistentes), além do aumento da expectativa de vida, que aumenta o número de pacientes idosos (Niederman *et al.*, 1990; Rangel-Frausto, 2005).

Na Europa 35% dos pacientes internados em UTI's apresentam quadro séptico em algum momento de sua estadia, sendo que 27% morrem de sepse, valor que aumenta para 50% em pacientes com choque séptico (Vincent *et al.*, 2006). No Brasil, a incidência de sepse grave e choque séptico situa-se em 27 e 23%, respectivamente, e a taxa de mortalidade global é de 22%, sugerindo que a sepse é o maior problema de saúde pública nas UTI's do país (Silva *et al.*, 2004).

Os custos para o tratamento da sepse já excedem o valor de U\$ 16 bilhões por ano nos EUA (Angus *et al.*, 2001). No Brasil, dados do estudo BASES (Brazilian Sepsis Epidemiological Study) mostraram que em 2003, os gastos com pacientes internados em UTI's somaram 17,34 bilhões de reais, o que representa de 30 a 35% dos gastos globais com a área de saúde (Andrade *et al.*, 2006). O Brasil tem entre 9 e 10 mil UTI's, e 25% dos leitos destas unidades são ocupadas por pacientes que desenvolvem sepse (Silva *et al.*, 2004).

Embora até o início dos anos 1980, bactérias Gram-negativas fossem os principais microorganismos causadores da sepse, a incidência de Gram-positivas tem aumentado. Uma análise feita nos EUA no ano de 2000 indicou aumento da incidência de infecções Gram-positivas e fúngicas, onde 52,1% dos casos de sepse estão associados com bactérias Gram-positivas, 37,6% com Gram-negativas, 4,7% infecção polimicrobiana, 1% com bactérias anaeróbias e 4,6% de fungos (Poll e Opal, 2008).

1.2 Fisiopatologia da sepse

O choque séptico humano 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, e leva a má distribuição do fluxo sangüíneo na microcirculação (Hollenberg *et al.*, 2004). Geralmente envolve dois estágios distintos de evolução. Uma fase inicial, na qual

ocorre uma exacerbação da atividade cardiovascular (denominada fase hiperdinâmica circulatória), caracterizada por elevação do débito cardíaco e redução da resistência periférica, a princípio acompanhados de um aumento na frequência cardíaca (Parrillo, 1993). Segue-se uma fase hipodinâmica, onde há redução débito cardíaco associado à diminuição da resistência vascular periférica, bem como hiporreatividade a vasoconstritores, definindo a fase tardia da sepse (Abraham *et al.*, 1983).

A interação entre a acentuada resposta inflamatória e as alterações hemodinâmicas, como hipotensão e hipoperfusão, compromete a funcionalidade de diversos órgãos. Usualmente definida como a falência de pelo menos dois sistemas orgânicos, que se tornam incapazes de manter a homeostasia, a falência múltipla de órgãos é classificada como uma síndrome e constitui uma grave complicação da sepse/choque séptico. A falência múltipla, progressiva e seqüencial dos sistemas orgânicos é a responsável pelo grande índice de mortalidade entre pacientes sépticos (Thijs *et al.*, 1996).

As manifestações clínicas vistas no choque séptico são resultado de uma resposta excessiva do hospedeiro à infecção. Além das alterações hemodinâmicas, uma enorme variedade de tipos celulares juntamente com mediadores inflamatórios mostra-se envolvidos na patogênese do choque séptico, durante o qual, citocinas pró-inflamatórias são liberadas na circulação sanguínea levando à ativação de células como neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais. Associado a isso, ocorre ativação de várias cascatas de proteínas plasmáticas como o complemento, a coagulação e o sistema fibrinolítico. A produção e liberação de mediadores lipídicos como eicosanóides e o fator de ativação plaquetária, bem como radicais de oxigênio e nitrogênio também está presente nesta patogênese (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 (Opal, 2007).

O principal receptor para LPS presente na membrana das células de defesa é o TLR-4, da família dos receptores *Toll-like*. O reconhecimento do LPS pelo TLR-4 é bastante complexo e depende de moléculas acessórias, como a proteína ligadora de LPS (LBP) e CD14 (receptor de alta afinidade pelo LPS). 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 α/β , cujas ações convergem para ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) (Sherwood, 2004). O NF- κ B é um regulador pleiotrópico de muitos genes envolvidos na resposta imune e inflamatória. Dentre suas funções, está o controle da expressão de genes incluindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão, enzimas induzidas, fatores de crescimento e de algumas proteínas de fase aguda, os quais desempenham um papel crítico na maioria dos processos inflamatórios (Lindner e Collins, 1996).

Explicações para a vasodilatação periférica na sepse incluem “falha na transmissão”, redução na expressão de receptores (particularmente receptores α -adrenérgicos) e alterações na sinalização celular. Embora muitas substâncias vasodilatadoras sejam liberadas na sepse, sugere-se que o principal fator envolvido na perda do tônus vascular periférico seja a produção de óxido nítrico (NO) (Parratt, 1988).

As primeiras evidências de que o NO teria um envolvimento na fisiopatologia da sepse vieram com a descoberta de elevados níveis de nitrato (NO₃) e nitrito (NO₂) em pacientes sépticos (Ochoa *et al.*, 1991; Evans *et al.*, 1993). Aliado a isso, a redução no tônus vascular vista após a administração de endotoxinas ou citocinas pró-inflamatórias, e a identificação do fator relaxante derivado do endotélio (EDRF) como NO, levaram às sugestões de que esta molécula estaria envolvida nas alterações cardiovasculares que ocorrem no choque séptico (Vincent *et al.*, 2000). Nas duas últimas décadas, tornou-se evidente que, na patogênese da sepse, o NO pode atuar de maneira deletéria ou benéfica. Embora conhecidas as suas propriedades vasodilatadoras, seus efeitos pró- e antiinflamatórios, bem como oxidantes e antioxidantes, entre outros, têm sido motivo de discussões e controvérsia (Hauser *et al.*, 2005).

O NO é sintetizado a partir do 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. As enzimas NOS-1 (neuronal) e NOS-3 (endotelial) conhecidas como constitutivas, produzem e liberam NO em quantidade nanomolar por curto período de tempo 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, também conhecida como óxido nítrico sintase induzida (iNOS), produz e libera grandes quantidades de NO, na ordem de micromolar, durante longos períodos de tempo quando comparada às NOS constitutivas, e geralmente está associada aos efeitos citotóxicos e às ações que promovem as patologias vasculares (Alderton *et al.*, 2001).

A complexa interação entre os diferentes mediadores inflamatórios e as alterações hemodinâmicas observadas durante o choque séptico dificultam o tratamento desta patologia, sendo este um dos motivos pelos quais o manejo do paciente em choque séptico não sofreu alterações substanciais nas duas últimas décadas. A manobra prioritária tem sido a manutenção da pressão arterial e do débito cardíaco através da 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).

Nem todos os leitos vasculares participam igualmente da vasodilatação sistêmica induzida pela sepse. Estudos sugerem que apesar do aumento no débito cardíaco ocorre uma vasoconstrição seletiva acompanhada de redução do fluxo sanguíneo nos rins (Thijs e Thijs, 1998). Esta observação é relevante uma vez que a hipoperfusão renal e o dano isquêmico resultante são considerados um dos principais fatores no desenvolvimento da falência renal aguda induzida pela sepse. A incidência de falência renal aguda aumenta com a severidade das condições e pode ser superior a 50% nos casos de choque séptico (Rangel-Frausto *et al.*, 1995). Em modelos animais de endotoxemia, a hemodinâmica dos rins é caracterizada por acentuada vasoconstrição renal e reduzida taxa de filtração glomerular (Schrier e Wang, 2004; Boffa e Arendshort, 2005). Em caso de endotoxemia, a resposta renal ao agente vasoconstritor angiotensina II é mantida ou aumentada (Tarpey *et al.*, 1998; Boffa e Arendshort, 2005). Além disso, angiotensina II pode prejudicar a

perfusão renal por promover inflamação microvascular (Schwobel *et al.*, 2000) e formação de microtrombos (Dielis *et al.*, 2007).

Existem diversos modelos animais para se estudar a patologia da sepse (Buras *et al.*, 2005), porém a técnica de ligadura e perfuração do ceco (CLP) é um dos modelos de sepse e choque séptico mais utilizados. Desde a sua descrição por Wichterman e colaboradores (1980), o modelo de CLP vem sendo extensamente utilizado, e atualmente representa a melhor simulação experimental do quadro de sepse humana (Parker e Watkins, 2001; Hubbard *et al.*, 2005). Uma característica importante deste modelo é a possibilidade da reprodução de diferentes estágios de complexidade da sepse (através da variação do número de perfurações no ceco), o que o torna útil para diferentes fins experimentais (Hubbard *et al.*, 2005).

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 mimetiza uma ruptura do apêndice ou perfuração intestinal. A técnica envolve uma laparotomia, exteriorização do ceco, ligação da válvula íleo-cecal seguida pela perfuração do ceco. Este procedimento cria uma perfuração intestinal com extravasamento de conteúdo cecal no peritônio, gerando uma infecção com microbiota diversa (para detalhes ver Buras *et al.*, 2005).

1.3 Sistema renina-angiotensina

O sistema renina-angiotensina é um importante componente na regulação da pressão arterial, tanto em curto quanto em longo prazo. Os fatores que reduzem a pressão arterial, como as reduções do volume sanguíneo efetivo ou reduções da resistência periférica total ativam a liberação de renina pelos rins. A renina é uma enzima liberada pelo aparelho justaglomerular renal que atua sobre o angiotensinogênio (globulina liberada pelo fígado) para catalisar a formação do decapeptídeo, a angiotensina I. A seguir, esse decapeptídeo é clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), dando origem ao octapeptídeo, angiotensina II, que alcança os órgãos-alvo através da corrente sanguínea, onde induz uma resposta fisiológica e é rapidamente degradada por aminopeptidases. Este sistema consiste na via clássica de ativação do sistema renina-angiotensina (Peach, 1977; Hall, 2003; Atlas, 2007). Portanto, na patologia da sepse, devido à vasodilatação

sistêmica, a ativação do sistema renina-angiotensina consiste em um importante mecanismo de balanço fisiológico.

A ECA, na verdade não é específica para angiotensina I e, portanto, cliva unidades dipeptídicas de substratos com diferentes seqüências de aminoácidos. A bradicinina é um dos numerosos substratos naturais da ECA (também conhecida como cininase II), sendo inativada por esta enzima. A ECA está presente na superfície luminal das células endoteliais em todo o sistema vascular, sendo mais abundante no tecido pulmonar, devido à extensa rede vascular deste órgão. A ECA circulante representa a enzima de membrana que sofreu proteólise na superfície celular por uma secretase (Beldent *et al.*, 1995).

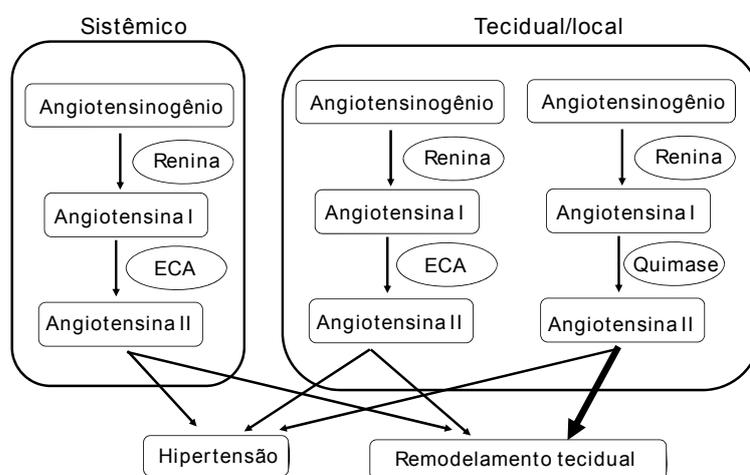
Além do sistema clássico, é importante diferenciar entre os sistemas renina-angiotensina locais extrínsecos e intrínsecos. Como a ECA é encontrada na superfície luminal das células endoteliais vasculares por toda a circulação e a renina circulante de origem renal pode ser captada pela parede arterial, bem como por outros tecidos, a conversão do angiotensinogênio hepático em angiotensina I e a da angiotensina I em angiotensina II podem ocorrer primariamente dentro da parede do vaso sanguíneo ou em sua superfície, mas não na circulação em si. Estudos demonstraram que muitos leitos vasculares produzem angiotensina I e II localmente, e que uma fração substancial da produção local efetivamente não ocorre no plasma, visto que ela atravessa o leito vascular (Danser *et al.*, 1991 e 1994; Bader e Ganten, 2008).

Por outro lado, muitos tecidos, incluindo o cérebro, a hipófise, os vasos sanguíneos, o coração, os rins e glândula supra-renal, expressam RNAm para a renina, o angiotensinogênio e/ou a ECA, e vários tipos de células cultivadas desses tecidos produzem renina, angiotensinogênio, ECA e/ou angiotensina I, II e III (Dzau, 1993; Phillips *et al.*, 1993). Por conseguinte, parece que os sistemas renina-angiotensina locais existem independentemente do sistema renal/hepático. Embora esses sistemas locais não contribuam significativamente para os níveis circulantes de renina ativa ou de angiotensina (Campbell *et al.*, 1991), há evidências de que a produção local de angiotensina II por sistemas renina-angiotensina locais intrínsecos influencia as funções e estruturas vasculares, cardíacas e renais.

O Esquema 1 ilustra os sistemas de formação de angiotensina II tanto sistêmica como local. Na formação sistêmica, tradicional, a renina, oriunda do rim,

representa a etapa limitante da produção de angiotensina II no plasma. Já no sistema local/tecidual, a ECA e a quimase controlam a produção de angiotensina II.

Acredita-se que a angiotensina II circulante esteja envolvida principalmente na regulação da pressão sangüínea. Patologias em que a produção de angiotensina II circulante está alterada, como por exemplo, hipertensão renal maligna, diferente do que se pensa, são relativamente raras. Isto significa que a angiotensina II, envolvida em patologias como hipertensão essencial, diabetes e aterosclerose, é produzida localmente e não pode ser controlada pela renina (para revisão ver Miyazaki e Takai, 2006).



Esquema 1. Produção de angiotensina II pela via sistêmica e pela via tecidual. Modificado de Miyazaki e Takai, 2006.

1.3.1 Angiotensina II

A angiotensina II é um potente peptídeo vasoativo e o principal efetor do sistema renina-angiotensina, sendo um vasoconstritor em torno de 40 vezes mais potente que a noradrenalina. A angiotensina II provoca resposta pressora rápida, devido ao aumento imediato da resistência periférica total, ou lenta, através da redução da função excretora renal, via aldosterona. A angiotensina II altera significativamente a morfologia do sistema cardiovascular. Em associação com aumento da pressão sangüínea, ela induz remodelamento vascular e disfunção endotelial (Marchesi *et al.*, 2008). Além da sua atividade vasoconstritora, a angiotensina II aumenta o rolamento, a adesão e a migração dos leucócitos através de um efeito direto nos mediadores pró-inflamatórios vasculares (De Ciuceis *et al.*, 2005). Atua também como um forte modulador da produção de espécies reativas de

oxigênio na vasculatura. Além disso, estimula NADPH oxidase, a expressão de ICAM-1 e a infiltração de macrófagos de forma independente da elevação da pressão sanguínea (Schiffrin e Touyz, 2003).

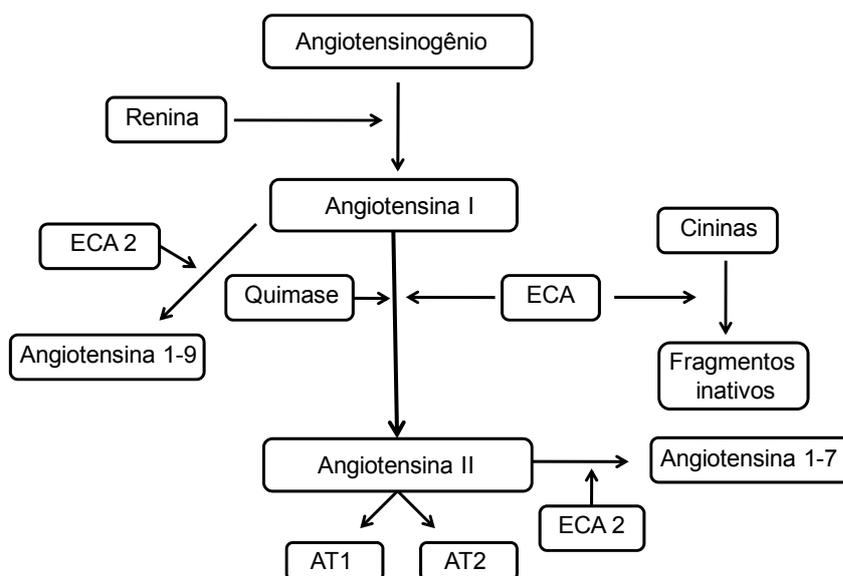
Os efeitos da angiotensina II se devem a ação deste peptídeo nos receptores específicos de superfície celular, AT1 e AT2, membros da família de receptores acoplados à proteína G. Esses receptores exibem pouca homologia quanto à sua seqüência de aminoácidos. Os efeitos biológicos da angiotensina II, como vasoconstrição direta, favorecimento da liberação de noradrenalina, secreção de aldosterona e reabsorção de Na⁺ são mediados, em sua maioria, pelos receptores AT1, os quais têm distribuição ubíqua e abundante nos tecidos adultos, incluindo vasos sanguíneos, coração, rins, glândula adrenal, fígado, cérebro e pulmão. Em contraste, a expressão dos receptores AT2 é alta em fetos e reduzida em tecidos adultos. O papel funcional destes receptores não está bem definido. Entretanto, evidências sugerem que os receptores AT2 podem exercer efeitos antiproliferativos, pró-apoptóticos e vasodilatadores (Ardaillou, 1999; Horiuchi *et al.*, 1999; Inagami *et al.*, 1999; Schulman e Raij, 2008).

Alguns tecidos contêm enzimas de processamento do angiotensinogênio distintas da renina (proteases não-renina), que convertem o angiotensinogênio em angiotensina I ou diretamente em angiotensina II, bem como enzimas de processamento da angiotensina I distintas da enzima conversora de angiotensina (ECA), que convertem a angiotensina I em angiotensina II (catepsina G, enzima geradora de angiotensina II sensível a quimostatina, quimase cardíaca) (Dzau *et al.*, 1993). Há evidências crescentes de que a quimase, possivelmente derivada dos mastócitos, contribui significativamente para a conversão tecidual local da angiotensina I em angiotensina II, sobretudo no coração (Wei *et al.*, 1999) e nos rins (Hollenberg *et al.*, 1998); todavia, o papel da quimase como enzima de processamento da angiotensina I depende da espécie e do órgão (Akasu *et al.*, 1998).

Quimase é a principal protease expressa em grânulos secretórios de mastócitos em muitas espécies de mamíferos. Há alguns anos foi esclarecido que a quimase está envolvida no processo inflamatório de diversas doenças. Um estudo mostrou que esta protease exerce papel quimiotático sobre neutrófilos e monócitos em humanos, e participa da acumulação de células inflamatórias no desenvolvimento da resposta inflamatória crônica em doenças alérgicas e não

alérgicas (Tani *et al.*, 2000). Recentemente demonstrado por Orinska *et al.* (2007), a IL-15 regula de maneira negativa a transcrição de quimase de mastócitos. A inibição intracelular da IL-15 favorece a atividade antibacteriana das quimases contribuindo para aumentar a sobrevivência de camundongos submetidos à CLP.

A enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA-2) é homóloga da ECA e funciona como um regulador negativo do sistema renina-angiotensina por formar outros derivados a partir da angiotensina I e da angiotensina II. Ela é caracterizada como a principal enzima capaz de clivar a angiotensina II em angiotensina 1-7 e clivar a angiotensina I em angiotensina 1-9 (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Níveis aumentados de angiotensina II, devido à redução da expressão da ECA-2 mostraram favorecer a piora do dano pulmonar em camundongos (Imai *et al.*, 2005). Uma visualização do sistema completo está mostrada no Esquema 2.



Esquema 2. Representação da vias do sistema renina-angiotensina.

1.3.2 Fármacos e o sistema renina-angiotensina

Uma grande quantidade de fármacos que interfere no sistema renina-angiotensina está disponível para uso clínico. Esses fármacos pertencem a duas principais classes, que são os inibidores da ECA (enalapril, captopril, lisinopril, etc.) e os antagonistas não-peptídicos dos receptores AT1 de angiotensina II (losartan, eprosartan, candesartan, etc.) (Goodman e Gilman, 2001).

Recentemente disponível na clínica para tratamento da hipertensão, o aliskiren, inibidor direto da renina, oferece um bloqueio mais completo do sistema

renina-angiotensina, juntamente com uma redução da morbidade e mortalidade associadas a doenças cardiovasculares. De maneira dose-dependente, este fármaco reduz a pressão arterial, inibe a atividade da renina plasmática, atenua o dano renal em modelos animais e, além disso, promove um eficiente e duradouro bloqueio do sistema renina-angiotensina em indivíduos normotensos, comparado a outros inibidores do sistema renina-angiotensina (Pool, 2007; Jensen *et al.*, 2008).

Apesar dos inibidores da ECA e dos antagonistas dos receptores AT1 de angiotensina II em última análise bloquearem o sistema renina-angiotensina, os antagonistas diferem dos inibidores da ECA em vários aspectos importantes. Os antagonistas reduzem a ativação dos receptores AT1 com mais eficiência do que os inibidores da ECA. Os inibidores da ECA reduzem a biossíntese da angiotensina II produzida pela ação da ECA sobre a angiotensina I, mas não inibem as vias de geração da angiotensina II independentes da ECA. Como os antagonistas bloqueiam o receptor AT1, as ações da angiotensina II através deste receptor são inibidas, independente da via bioquímica que leva à formação de angiotensina II. Ao contrário dos inibidores da ECA, os antagonistas de AT1 podem ativar indiretamente os receptores AT2. Os inibidores da ECA aumentam a liberação de renina, entretanto, como esses inibidores bloqueiam a conversão da angiotensina I em angiotensina II, a inibição da ECA não está associada a níveis elevados de angiotensina II. Os antagonistas também estimulam a liberação de renina; entretanto, no caso destes fármacos, este efeito é traduzido por um aumento de várias vezes nos níveis circulantes de angiotensina II, e como se trata de um antagonismo competitivo reversível pode ocorrer o deslocamento do antagonista AT1. Os inibidores da ECA aumentam os níveis de bradicinina (Hollenberg *et al.*, 1998; Goodman e Gilman, 2001; Petrie *et al.*, 2001).

Alguns dos efeitos benéficos dos inibidores da ECA podem ser atribuídos a ativação de distintas cascatas de sinalização pela ECA do que pelas mudanças nos níveis de angiotensina II e bradicinina (para detalhes ver Fleming *et al.*, 2005). Provavelmente alguns dos efeitos inesperados dos inibidores da ECA possam estar relacionados a essa via de sinalização.

1.3.3 Angiotensina II e sepse

Embora o efeito vasoconstritor da angiotensina II seja desejável durante a sepse, cabe lembrar que apesar da vasodilatação periférica, alguns leitos vasculares

não sofrem alteração na responsividade a agentes vasoconstritores nesta patologia e, portanto, uma produção excessiva deste peptídeo pode não ser muito desejável.

Hoje se sabe que a angiotensina II tem importante papel no remodelamento cardíaco e vascular, na aterosclerose, na insuficiência cardíaca, na hipertensão e na inflamação (revisado em Marchesi *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 2008). Dessa forma, fármacos que modulam direta ou indiretamente a formação deste peptídeo, como os inibidores da ECA e o inibidor de renina, ou os que interferem nas suas ações, como os antagonistas do receptor AT1 têm ganhado novas indicações terapêuticas, conquistando um espaço no mercado que não foi antecipado inicialmente.

Entretanto, alguns trabalhos que mostram o papel benéfico da interferência do sistema renina-angiotensina em modelos animais de inflamação acabam usando doses elevadas de antagonistas do receptor AT1 ou de inibidor da enzima conversora de angiotensina. Estas doses produzem uma hipotensão excessiva dificultando a interpretação dos dados. Além disso, são doses muito distantes das usadas em humanos e administradas como pré-tratamento, dificultando assim a transposição destes dados para prática clínica. Há, portanto ainda grandes lacunas em relação ao papel da angiotensina II no desenvolvimento da sepse, o que estimula pesquisas para uma melhor compreensão deste assunto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o envolvimento da angiotensina II em algumas alterações hemodinâmicas e do processo inflamatório que ocorrem na sepse, usando para isso o modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) em ratos.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a influência do bloqueio precoce dos receptores AT1 de angiotensina II, com o uso de losartan, e da inibição precoce da enzima conversora de angiotensina, com o uso de enalapril, sobre resposta inflamatória, pressão arterial média e hiporreatividade a vasoconstritores em animais submetidos ao modelo de sepse experimental de ligadura e perfuração do ceco (CLP);
- Avaliar a influência do bloqueio tardio dos receptores AT1 de angiotensina II, com o uso de losartan, na pressão arterial média e na hiporreatividade a vasoconstritores em animais submetidos ao modelo de sepse experimental de ligadura e perfuração do ceco (CLP);
- Avaliar alguns parâmetros bioquímicos dos animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e tratados precoce e tardiamente com losartan.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* fêmeas com 3 meses de idade, pesando entre 200 e 250 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Até o momento da realização dos experimentos, os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia em local com temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h), com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o número 23080.03424/2005-22/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; EUA).

3.2 Procedimentos Experimentais

3.2.1 Modelo de septicemia por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Os animais foram anestesiados com ketamina/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 20 vezes com agulha 18 G, seguido de leve compressão para assegurar o extravasamento do conteúdo cecal. Após a perfuração, o ceco foi recolocado na cavidade abdominal, seguindo-se a sutura da musculatura e da pele do local. 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 (1 a 2 horas). Os animais do grupo controle (animais falso-operados ou *sham*) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, não sofrendo, contudo, ligadura e perfurações no ceco. Os animais *naive* não passaram por nenhum procedimento cirúrgico.

3.2.2 Avaliação da Pressão Arterial

Para a avaliação da pressão arterial os animais foram anestesiados com ketamina/xilazina (90/15 mg/kg), injetada pela via intramuscular, e posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida a 37°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 a uma seringa. Esse acesso venoso foi a via de administração para alguns dos compostos utilizados. A prevenção da formação de coágulos e da obstrução das cânulas foi feita pela injeção de 30 UI de heparina sódica diluída em 100 μ L de PBS, através da cânula implantada. Os animais foram então submetidos a uma traqueostomia para facilitar a respiração espontânea e, em seguida, a artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente separada do nervo vago e dos tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da carótida foi interrompido na extremidade distal através de ligadura com fio de sutura, enquanto que o fluxo da extremidade proximal foi temporariamente interrompido através de compressão com uma pinça curva. Um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida, cujo fluxo estava obstruído, servindo como via de inserção de um cateter de polietileno (Angiocath[®], nº 19), devidamente heparinizado. O cateter foi firmemente amarrado à artéria e conectado ao transdutor de pressão (Mikro-Tip[®], Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, EUA) acoplado a um aparelho Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltda, Castle Hill, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) foram registrados em um computador (sistema operacional Windows XP[™], Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração Chart5[™]. A administração intravenosa dos compostos de interesse, bem como a avaliação das respostas cardiovasculares em nossos experimentos *in vivo*, foi iniciada entre 20 e 30 minutos após o término da manipulação cirúrgica. Esse período mostrou-se suficiente para a estabilização da pressão arterial média dos animais, geralmente elevada devido ao estresse cirúrgico. Os agentes vasoativos estudados foram dissolvidos em PBS e administrados lentamente (volume final de 50 μ L). Imediatamente após, mais 150 μ L de PBS eram injetados para assegurar que nenhum resíduo da droga em uso permanecesse no interior da cânula de polietileno. A injeção lenta de 200 μ 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 decorrentes das ações das drogas administradas. Ao término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através da administração intravenosa de altas doses de xilocaína.

3.2.3 Dosagens bioquímicas

3.2.3.1 Determinação dos níveis de nitrato e nitrito (NO_x) plasmático

A determinação da concentração plasmática de NO_x foi feita através da redução enzimática do nitrato pela enzima nitrato redutase, expressa em *Escherichia coli* cultivada em meio anaeróbico, de acordo com metodologia descrita detalhadamente por Granger *et al.* (1990). As amostras de plasma foram diluídas 1:1 em água Milli-Q e desproteinizadas pela adição de sulfato de zinco (20%). Para a conversão do nitrato a nitrito, as amostras foram incubadas a 37° C durante 2 horas, em presença da enzima nitrato redutase expressa em *E. coli*. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção das bactérias, sendo 100 µL do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de α-naftil-etilenodiamina em água Milli-Q) em placas de 96 poços. Em seguida, procedeu-se a leitura a 540 nm num leitor de placas. Simultaneamente, foram feitas curvas padrão de nitrato e nitrito (0 a 150 µM). Nestas condições a conversão de nitrato para nitrito foi maior que 90% e, portanto, não foi realizada nenhuma correção dos resultados. Por meio de regressão linear, os valores plasmáticos foram calculados e expressos como µM de NO_x.

3.2.3.2 Dosagem de uréia plasmática

Os níveis de uréia plasmática foram determinados por teste enzimático colorimétrico utilizando-se o kit Bioclin (K047, Belo Horizonte, MG). O princípio básico da reação é a hidrólise da uréia a íons amônio (NH₄⁺) e dióxido de carbono (CO₂), através da enzima urease. Em pH alcalino e na presença de salicilato e hipoclorito de sódio, a amônia origina um composto esverdeado, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de uréia na amostra analisada. Esse ensaio foi adaptado para ser realizado em placas de 96 poços, utilizando-se 1 µL de amostra para um volume final de reação de 200 µL. A leitura da absorbância foi feita a 630 nm em um leitor de placas. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e a concentração de uréia expressa em mg/dL.

3.2.3.3 Dosagem de creatinina plasmática

Os níveis de creatinina plasmática foram determinados por teste colorimétrico, através do kit Bioclin (K016, Belo Horizonte, MG). Em meio alcalino a creatinina reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhada, que é medido fotometricamente (absorbância a 490 nm). Com adição de um reagente ácido o pH é diminuído e a cor referente à creatinina é desfeita, permanecendo apenas a cor devida aos cromogênios, também registrada por absorbância a 490 nm. Através da diferença entre as leituras obtidas no pH alcalino e no pH ácido, obtém-se o valor real da concentração de creatinina nas amostras. Esse ensaio foi adaptado para ser realizado em placas de 96 poços, utilizando-se 20 µL de amostra para um volume final de reação de 200 µL. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e a concentração de creatinina expressa em mg/dL.

3.2.3.4 Dosagem de glicose

Os níveis de glicose sangüínea foram mensurados eletroquimicamente por meio do sistema de monitoramento da glicemia Trackease Smart System (Home Diagnostics, Inc.; Fort Lauderdale, Florida, USA), utilizando tiras reativas adequadas para o mesmo. Após uma pequena incisão na cauda dos animais, uma gota de sangue foi utilizada e os resultados foram expressos em mg/dL.

3.2.4 Dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão

O recrutamento de neutrófilos foi quantificado indiretamente através da determinação da atividade da MPO em tecido pulmonar. O homogenato de pulmão foi feito em tampão fosfato de sódio (80 mM; pH 5,4), contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5%, p/v), com o auxílio de um homogeneizador do tipo Ultra-Turrax. O homogenato resultante foi centrifugado (20 min., 10.400 x g, 4° C) e uma alíquota de 30 µL do sobrenadante foi utilizada para o ensaio da MPO. A reação enzimática foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H₂O₂ 0,5 mM (em solução tampão fosfato 80 mM; pH 5,4) em volume final de 200 µL. Após o período de incubação (3 min, 37° C) a absorbância foi medida em um leitor de placas a 630 nm (Ultra Microplate Reader EL 808, Biot-Tek Instruments, Inc., EUA). A quantidade de proteína total foi estimada pelo método de Bradford e a

atividade da MPO foi expressa como unidades de densidade óptica (D.O.) por mg de proteína.

3.2.5 Determinação do crescimento de bactérias no sangue e no lavado peritoneal

Realizou-se a abertura da cavidade torácica e aproximadamente 1 mL de sangue foi coletado por punção cardíaca e armazenado em tubo apropriado contendo heparina (3 UI/mL de sangue). Para obtenção do lavado, um volume de 3 mL de PBS foi introduzido na cavidade abdominal e, posteriormente, cerca de 1 mL do conteúdo peritoneal foi coletado. Um volume 10 µL das amostras foi semeado em placas contendo o meio de cultura ágar Mueller-Hinton (Himedia, Mumbai, Índia). Semeou-se o sangue puro e diluído 1:10 e 1:100 em tampão PBS estéril. O lavado peritoneal foi diluído 1:100, 1:1000 e 1:10000 no mesmo tampão antes da semeadura. Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 24 horas a 37° C e o número de colônias foi quantificado. Os resultados foram expressos como Log 10 da Unidade Formadora de Colônias (UFC)/mL para as bactérias presentes no sangue e UFC/cavidade para as bactérias presentes no lavado peritoneal.

3.2.6 Contagem de leucócitos totais

Amostras de sangue coletadas em tubo contendo heparina foram diluídas em líquido de Türk numa proporção de 1:40. Em seguida, a contagem de células foi feita em Câmara de Neubauer. O número de leucócitos totais foi expresso como células/mm³ x 10³.

3.2.7 Avaliação da sobrevivência

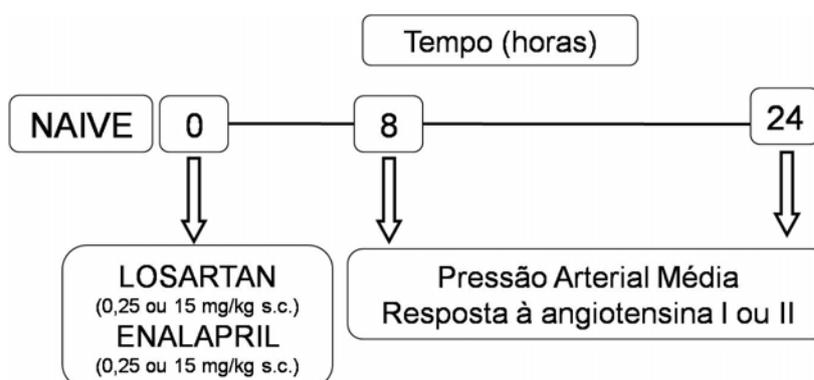
Os animais *sham* e sépticos tiveram sua taxa de sobrevivência determinada após observação a cada 12 horas durante 3 dias consecutivos. Nesse período, os animais foram mantidos em local com temperatura ambiente controlada (22 ± 2°C) e ciclo claro/escuro (12/12 h) com livre acesso a ração e água. Ao término do período, os animais sobreviventes foram sacrificados por inalação de CO₂.

3.3 Protocolos Experimentais

3.3.1 Determinação da duração do efeito fisiológico do losartan e do enalapril

Para determinar o efeito fisiológico do losartan e do enalapril, animais *naive* receberam por via subcutânea as doses de 0,25 ou 15 mg/kg de ambas os fármacos. Nos tempos de 8 e 24 horas após o tratamento, foi verificada a pressão arterial média (PAM) e a variação na PAM em resposta à administração de 30 pmol/kg de angiotensina I e II para os tratamentos com enalapril e losartan, respectivamente, conforme representado no esquema 3. Como controles foram utilizados animais *naive* que receberam apenas PBS. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média, com n=6 animais por grupo.

A escolha das respectivas doses foi baseada em ensaios prévios, onde foram utilizadas 3 diferentes doses, sendo uma chamada de dose alta (15 mg/kg), uma intermediária (2 mg/kg) e outra baixa (0,25 mg/kg). Como a dose de 2 mg/kg não interferiu em nenhum parâmetro analisado, optamos por interromper as análises com a mesma, por isso, os ensaios desse trabalho foram realizados apenas com as doses de 0,25 e 15 mg/kg.



Esquema 3. Protocolo experimental para a avaliação da duração do efeito fisiológico do losartan e do enalapril em ratos.

3.3.2 Avaliação cardiovascular e do efeito da fenilefrina e da angiotensina II em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, tratados precocemente com losartan ou enalapril

Animais *sham* e submetidos à CLP foram tratados com losartan (doses de 0,25 e 15 mg/kg) ou enalapril (dose de 0,25 mg/kg), duas horas após a realização do procedimento cirúrgico. Os animais que receberam losartan foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial, conforme descrito no item 3.2.2, nos

tempos de 6 e 24 horas após a cirurgia, ou seja, 4 e 22 horas após o tratamento. Os grupos tratados com enalapril foram preparados para o registro da pressão arterial 24 horas após a indução da sepse, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.2.2. Para os dois tratamentos foram avaliados os efeitos vasoconstritores da fenilefrina (doses de 3, 10 e 30 nmol/kg) e da angiotensina II (dose de 30 pmol/kg). Ver esquemas 4 e 5. 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 plasma recuperado e armazenado a -20 ° C para posterior realização das análises bioquímicas. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média, com n=6 animais por grupo.

3.3.3 Avaliação do tratamento precoce com losartan ou enalapril na migração de neutrófilos para o pulmão de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

Animais sham e submetidos à CLP foram tratados com as doses de 0,25 ou 15 mg/kg de losartan ou enalapril, duas horas após o procedimento cirúrgico. Nos tempos de 6 e 24 horas os animais foram sacrificados e os pulmões coletados para a determinação da atividade da enzima mieloperoxidase conforme descrito no item 3.2.4. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média, com n=6 animais por grupo.

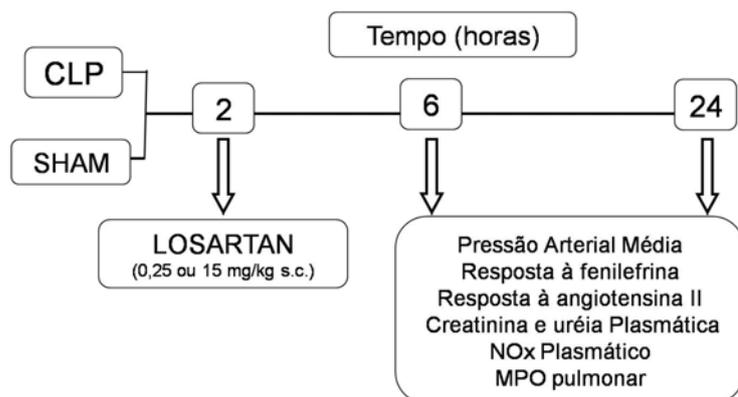
3.3.4 Determinação da glicemia de animais tratados precocemente com losartan

Animais *sham* e submetidos à CLP foram tratados com losartan nas doses de 0,25 ou 15 mg/kg duas horas depois da cirurgia e tiveram a glicemia avaliada nos tempos de 6, 12 e 24 horas após o procedimento cirúrgico. Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média, com n=6 animais por grupo.

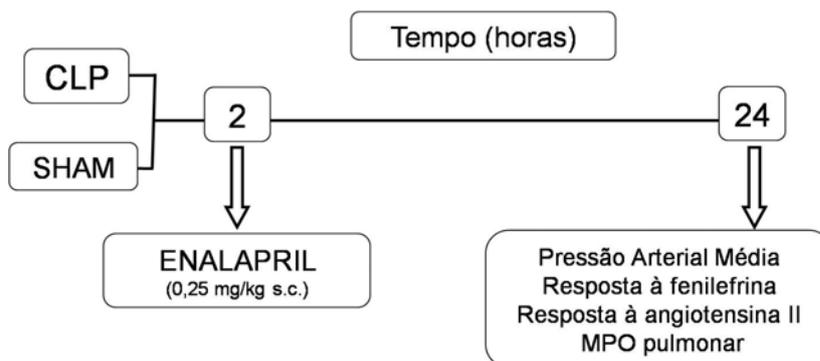
3.3.5 Avaliação dos efeitos da administração precoce de losartan na sobrevivência de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

Decorridas duas horas do procedimento de indução da sepse, os animais foram divididos em grupos (n = 10 animais por grupo) e receberam o tratamento com

losartan nas doses de 0,25 ou 15 mg/kg. Os grupos controle, CLP sem tratamento e *sham*, receberam PBS. A sobrevivência foi avaliada conforme descrito no item 3.2.7.



Esquema 4. Protocolo experimental para a avaliação do tratamento precoce com losartan.

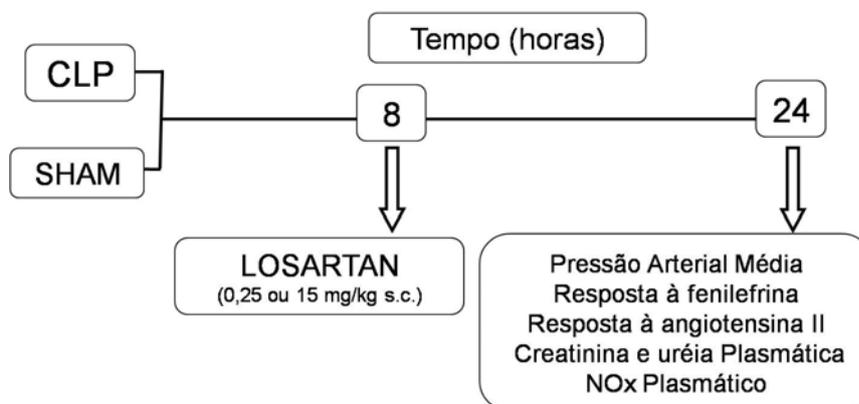


Esquema 5. Protocolo experimental para a avaliação do tratamento precoce com enalapril.

3.3.6 Avaliação cardiovascular e do efeito da fenilefrina e da angiotensina II em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco, tratados tardiamente com losartan

Animais *sham* e submetidos à CLP foram tratados com losartan nas doses de 0,25 ou 15 mg/kg oito horas após o procedimento cirúrgico. Decorridas 24 horas da cirurgia, portanto, 16 horas após o tratamento, os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial, conforme descrito no item 3.2.2. Foram avaliados os efeitos vasoconstritores da fenilefrina (nas doses de 3, 10 e 30 nmol/kg) e da angiotensina II (30 pmol/kg). Ao término dos experimentos, amostras de sangue arterial (cerca de 1 mL) foram coletadas e centrifugadas a 4000 g durante 10 minutos, sendo o plasma recuperado e armazenado a -20 ° C para posterior

realização das análises bioquímicas. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média, com $n=6$ animais por grupo.



Esquema 6. Protocolo experimental para a avaliação do tratamento tardio com losartan.

3.4 Compostos e reagentes utilizados

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: ketamina (Dopalen™, Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), xilazina (Anasedan™, Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil) heparina sódica (gentilmente cedida por Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP, Brasil), fenilefrina, angiotensina II, losartan e enalapril foram comprados da Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri, USA. 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.

3.5 Análise dos resultados e testes estatísticos

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas pelas análises de variância (ANOVA) de uma ou de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls, utilizando o pacote estatístico Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA). Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As curvas de sobrevivência foram expressas como porcentagem de animais vivos observados em um intervalo de 12 horas durante os 3 dias avaliados. Para análise estatística das curvas e cálculo da média foi utilizado o teste de *logrank*. As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$. Todos os gráficos apresentados foram feitos com o auxílio do programa GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

4.1 Determinação da duração do efeito fisiológico do losartan e do enalapril

Embora os fármacos losartan e enalapril tenham seus tempos de meia-vida em humanos definidos (aproximadamente 2,5 horas para o losartan e de 9 horas para seu metabólito ativo E3174, e de aproximadamente 1,3 horas para o enalapril e de 11 horas para seu metabólito ativo enalaprilat) (Goodman e Gilman, 2001; Sica *et al.*, 2005), resolvemos investigar a duração do efeito das doses escolhidas para o uso neste estudo em ratos. A verificação da pressão arterial média, nos tempos de 8 e 24 horas, indica que a dose de 15 mg/kg de losartan causou, por si só, uma hipotensão que pode ser observada nos dois tempos de análise. A dose de 0,25 mg/kg não interferiu na pressão arterial média dos animais (Figura 1, painel A).

No tempo de 8 horas após a administração da angiotensina II (30 pmol/kg), foi observado bloqueio dos receptores AT1 para as duas doses testadas (0,25 e 15 mg/kg). Por outro lado, no tempo de 24 horas, apenas os animais que receberam a dose mais alta ainda apresentavam bloqueio do receptor AT1 (Figura 1, painel B).

Em relação ao enalapril, somente no tempo de 8 horas e com a dose de 15 mg/kg, foi observada uma considerável queda da pressão arterial média induzida pelo fármaco (Figura 2, painel A). A inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) por este fármaco, verificada através da resposta à administração de angiotensina I (30 pmol/kg), foi observada para as duas doses administradas apenas no tempo de 8 horas. Na análise feita 24 horas após a administração de enalapril, já não se constatou mais a inibição da ECA (Figura 2, painel B).

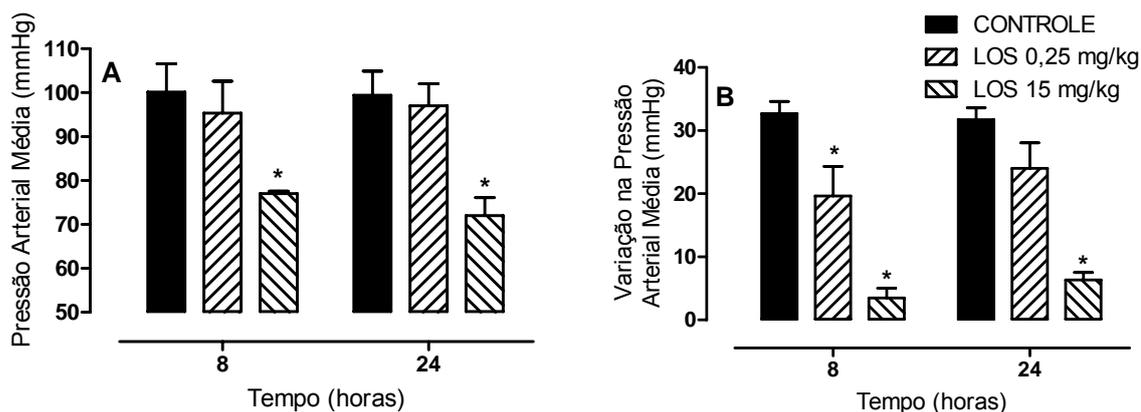


Figura 1. Determinação da duração do efeito fisiológico do losartan através da avaliação da pressão arterial média e da resposta vasoconstritora à administração de angiotensina II. Animais *naive* foram tratados com losartan nas doses de 0,25 ou 15 mg/kg. Oito ou 24 horas após o tratamento eles foram preparados para o registro da pressão arterial média (Painel A). A dose de 30 pmol/kg de angiotensina II foi administrada e a variação na pressão arterial média registrada (Painel B). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n=6. * p < 0,05 em relação ao grupo controle (PBS). (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

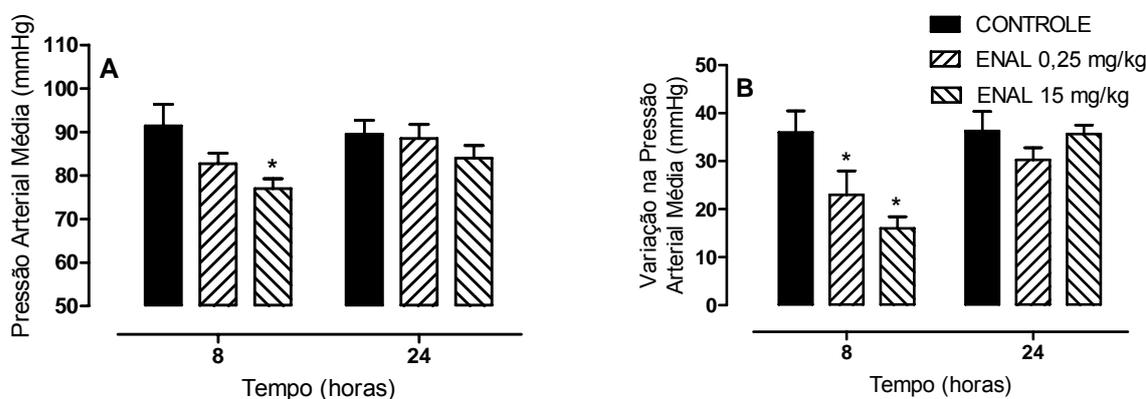


Figura 2. Determinação da duração do efeito fisiológico do enalapril através da avaliação da pressão arterial média e da resposta vasoconstritora à administração de angiotensina I. Animais *naive* foram tratados com enalapril nas doses de 0,25 ou 15 mg/kg. Oito ou 24 horas após o tratamento eles foram preparados para o registro da pressão arterial média (Painel A). A dose de 30 pmol/kg de angiotensina I foi administrada e a variação na pressão arterial média registrada (Painel B). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n=6. * p < 0,05 em relação ao grupo controle (PBS). (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.2 Efeitos da administração precoce de losartan e enalapril na sepse

Estes experimentos foram conduzidos em animais *sham* e CLP que receberam losartan ou enalapril *duas horas* após a cirurgia. Os animais tratados com losartan tiveram alguns parâmetros analisados 6 e 24 horas após a cirurgia, ou seja, 4 e 22 horas após a administração dos fármacos. Os animais que receberam enalapril tiveram alguns parâmetros avaliados 24 horas após a cirurgia.

4.2.1 Losartan, hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores

Todos os animais submetidos à CLP que receberam apenas PBS apresentavam-se hipotensos quando comparados aos animais *sham*. Esta hipotensão foi observada já em 6 horas e manteve-se presente pelo menos até 24 horas após a CLP.

A menor dose de losartan não ocasionou alteração na pressão arterial média dos animais CLP e *sham*, em nenhum dos tempos analisados (Figura 3, painéis A e C). Por outro lado, a dose maior causou hipotensão pronunciada nos animais sépticos, tanto no tempo de 6 quanto de 24 horas após a cirurgia. O tratamento do grupo *sham* com a maior dose de losartan não interferiu nos valores da pressão arterial média (Figura 3, painéis B e D).

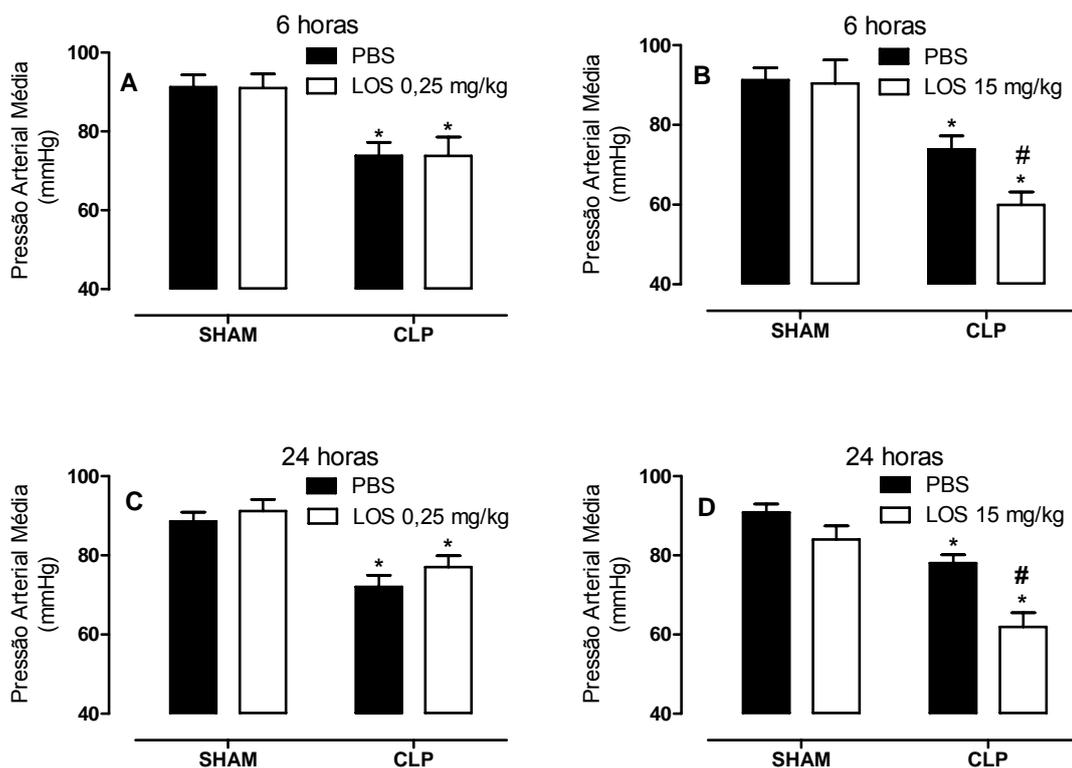


Figura 3. Efeito do tratamento com losartan sobre a pressão arterial média de animais submetidos à CLP. Os animais tratados com losartan, duas horas após a indução da sepse, foram preparados para o registro da pressão arterial média 6 ou 24 horas após o procedimento cirúrgico. Painéis A e B: análise no tempo de 6 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Painéis C e D: análise no tempo de 24 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Os valores representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham+PBS, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS. (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

Em relação à reatividade vascular, os animais submetidos à CLP apresentaram uma significativa perda da resposta à fenilefrina, caracterizando assim a hiporeatividade vascular da sepse (Figura 4, painéis A, B, C e D).

O losartan não alterou a resposta a fenilefrina nos animais *sham* em nenhum dos tempos avaliados (Figura 4, painéis A, B, C e D).

A análise realizada no tempo de 6 horas mostrou que o tratamento não alterou a hiporeatividade à fenilefrina. Por outro lado, a hiporeatividade à fenilefrina 24 horas depois da cirurgia foi alterada pelo losartan. O emprego da menor dose promoveu uma considerável melhora na resposta ao vasoconstritor (Figura 4, painel C). Por sua vez, a dose de 15 mg/kg causou uma significativa piora na resposta vasoconstritora dos animais sépticos (Figura 4, painel D).

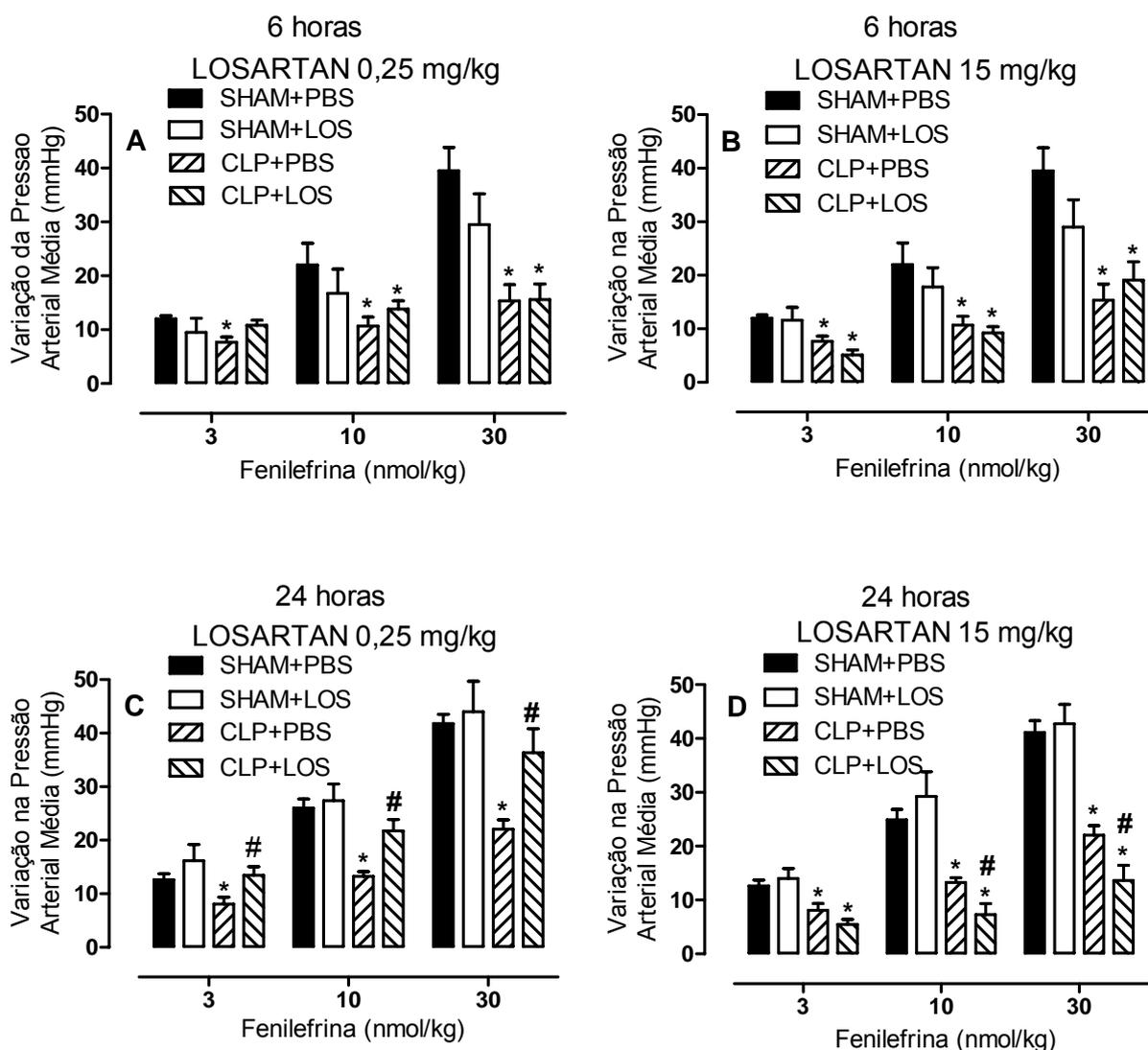


Figura 4. Efeito do tratamento com losartan na hiporreatividade à fenilefrina em animais submetidos à CLP. Os animais foram tratados com losartan duas horas após a indução da sepse. Nos tempos de 6 ou 24 horas após o procedimento cirúrgico foram preparados para o registro da pressão arterial. Doses crescentes de fenilefrina foram injetadas e a variação na pressão arterial média registrada. Painéis A e B: análise no tempo de 6 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Painéis C e D: análise no tempo de 24 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham+PBS*. # $p < 0,05$ em relação ao grupo *CLP+PBS* (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

De forma semelhante ao que ocorreu em resposta à fenilefrina, os animais submetidos à CLP também se apresentaram hiporreativos à angiotensina II (dose de 30 pmol/kg) em ambos os tempos analisados (Figura 5, painéis A, B, C e D).

A análise realizada no tempo de 6 horas com animais submetidos à CLP e tratados com losartan mostrou que a menor dose não interferiu na responsividade ao agente vasoconstritor angiotensina II. A maior dose de losartan promoveu uma redução significativa na resposta a 30 pmol/kg de angiotensina II. Os animais *sham* tratados com 0,25 mg/kg de losartan não diferiram dos que receberam apenas PBS. Por outro lado, o grupo *sham* tratado com 15 mg/kg de losartan, apresentou uma resposta bem inferior àquela observada nos animais *sham* que não receberam esse tratamento (Figura 5, painéis A e B).

Contudo, a análise realizada no tempo de 24 horas mostrou efeitos bastante distintos em relação às duas doses de losartan na responsividade dos animais sépticos à angiotensina II. O emprego da menor dose do fármaco foi capaz de promover uma considerável melhora na resposta a esse agente vasoconstritor (Figura 5, painel C). Por sua vez, a dose de 15 mg/kg não só não reverteu mas *aumentou* a hiporreatividade à angiotensina II nos animais submetidos à CLP (Figura 5, painel D). A resposta dos animais *sham* tratados com 0,25 mg/kg de losartan 22 horas antes da análise, não diferiu daqueles que receberam apenas PBS. Por outro lado, aqueles que receberam 15 mg/kg de losartan apresentaram uma resposta bem inferior àquela observada nos animais *sham* que receberam apenas PBS (Figura 5, painéis C e D).

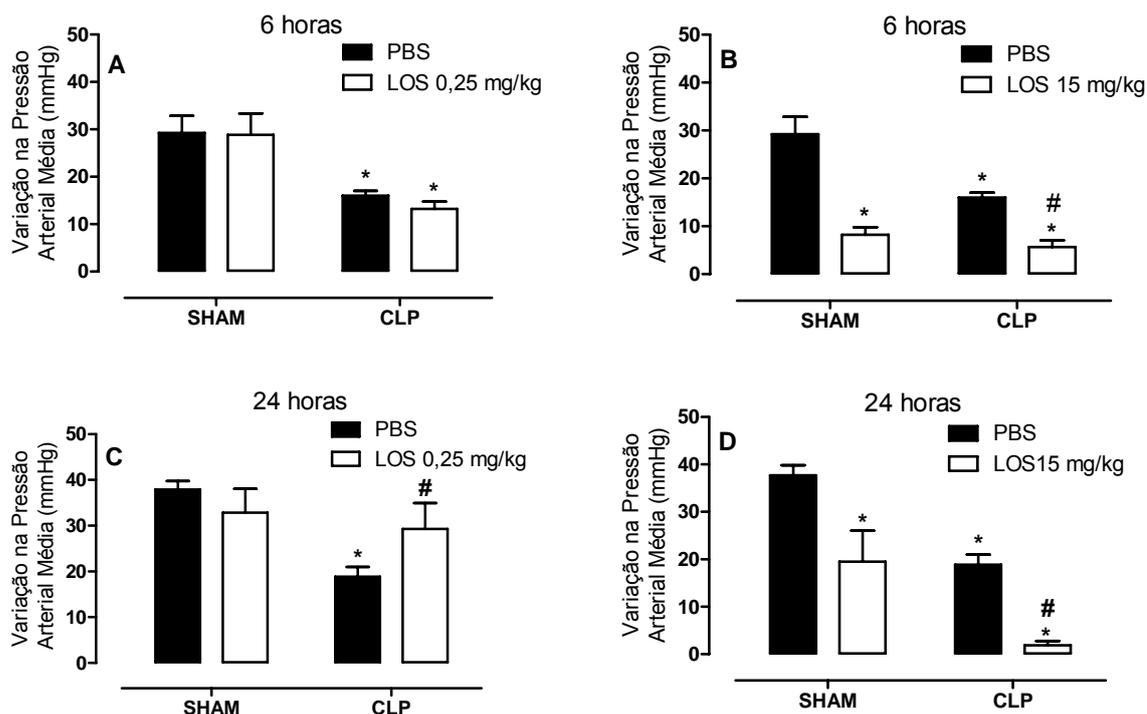


Figura 5. Efeito do tratamento com losartan na responsividade à angiotensina II em animais submetidos à CLP. Os animais foram tratados com losartan duas horas após a indução da sepse. Nos tempos de 6 ou 24 horas após o procedimento cirúrgico os animais foram preparados para o registro da pressão arterial. A dose de 30 pmol/kg de angiotensina II foi injetada e a variação na pressão arterial média registrada. Painéis A e B: análise no tempo 6 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Painéis C e D: análise no tempo de 24 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*+PBS. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.2.2 Losartan e a função renal

Os animais submetidos à CLP apresentaram uma considerável perda da função renal quando comparados aos falso-operados, em ambos os tempos analisados, como pode ser observado através da dosagem da creatinina plasmática (Figura 6, painéis A, B, C e D).

A menor dose de losartan não interferiu nos níveis plasmáticos de creatinina dos animais sépticos, em nenhum dos tempos observados (Figura 6, painéis A e C). Por sua vez, a dose de 15 mg/kg causou uma considerável piora da função renal já comprometida nos animais sépticos, tanto no tempo de 6 quanto de 24 horas (Figura 6, painéis B e D). Nenhuma das doses em estudo interferiu nos níveis de creatinina

plasmática dos animais *sham* em nenhum dos tempos analisado (Figura 6, painéis A, B, C e D).

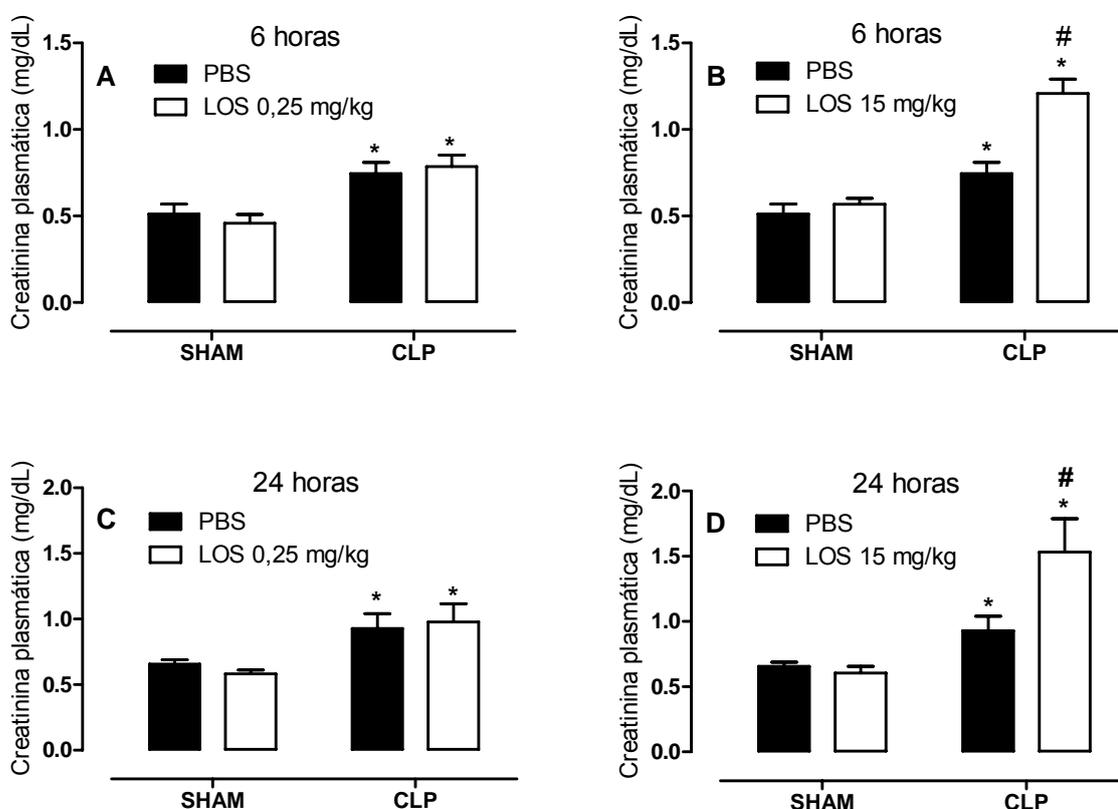


Figura 6. Níveis plasmáticos de creatinina em animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Os animais foram tratados com losartan (0,25 mg/kg ou 15 mg/kg) duas horas após a indução da sepse. No tempo de 6 ou 24 horas após o procedimento cirúrgico o sangue foi coletado e o plasma separado para a determinação dos níveis de creatinina através de ensaio enzimático colorimétrico. Painéis A e B: análise no tempo 6 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Painéis C e D: análise no tempo de 24 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n=6. * p < 0,05 em relação ao grupo *sham*+PBS. # p < 0,05 em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

De forma semelhante à creatinina, os níveis de uréia plasmática também indicam que os animais submetidos à CLP apresentaram um considerável comprometimento da função renal quando comparados aos animais *sham* em ambos os tempos analisados (Figura 7, painéis A, B, C e D).

A menor dose de losartan não interferiu nos níveis plasmáticos de uréia dos animais sépticos e dos *sham* em nenhum dos tempos analisados (Figura 7, painéis

A e C). Entretanto, a maior dose analisada ocasionou um aumento significativo dos níveis de uréia plasmática nos animais submetidos à CLP. Contudo, essa dose não modificou os níveis de uréia dos animais *sham* em nenhum dos tempos (Figura 7, painéis C e D).

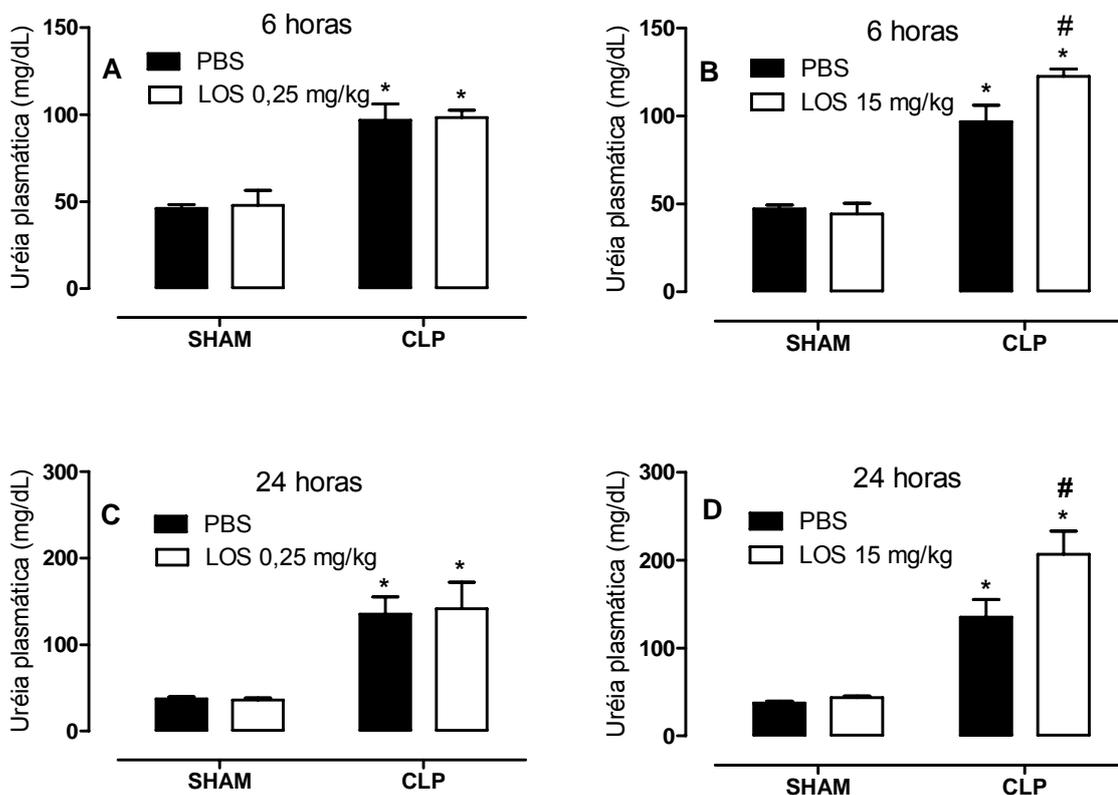


Figura 7. Níveis plasmáticos de uréia em animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Os animais foram tratados com losartan (0,25 ou 15 mg/kg) duas horas após a indução da sepse. No tempo de 6 ou 24 horas após o procedimento cirúrgico o sangue foi coletado e o plasma separado para a determinação dos níveis plasmáticos de uréia através de ensaio enzimático colorimétrico. Painéis A e B: análise no tempo 6 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Painéis C e D: análise no tempo de 24 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*+PBS. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.2.3 Losartan e níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (NOx)

Os animais sépticos apresentaram uma substancial elevação nos níveis plasmáticos de NOx em comparação com os falso-operados, como pode ser

observado nos dois tempos em que foram feitas as análises (Figura 8, painéis A, B, C e D).

No tempo de 6 horas após a cirurgia, o tratamento com losartan não promoveu alteração dos níveis plasmáticos de NO_x nos animais sépticos (Figura 8, painéis A e B). A análise no tempo de 24 horas mostrou que a dose de 0,25 mg/kg de losartan não alterou os níveis dos metabólitos estáveis do NO. Porém, a maior dose em estudo causou um aumento desses metabólitos (Figura 8, painéis C e D). Nenhuma das doses de losartan interferiu nos níveis plasmáticos de NO_x dos animais *sham* em nenhum dos tempos.

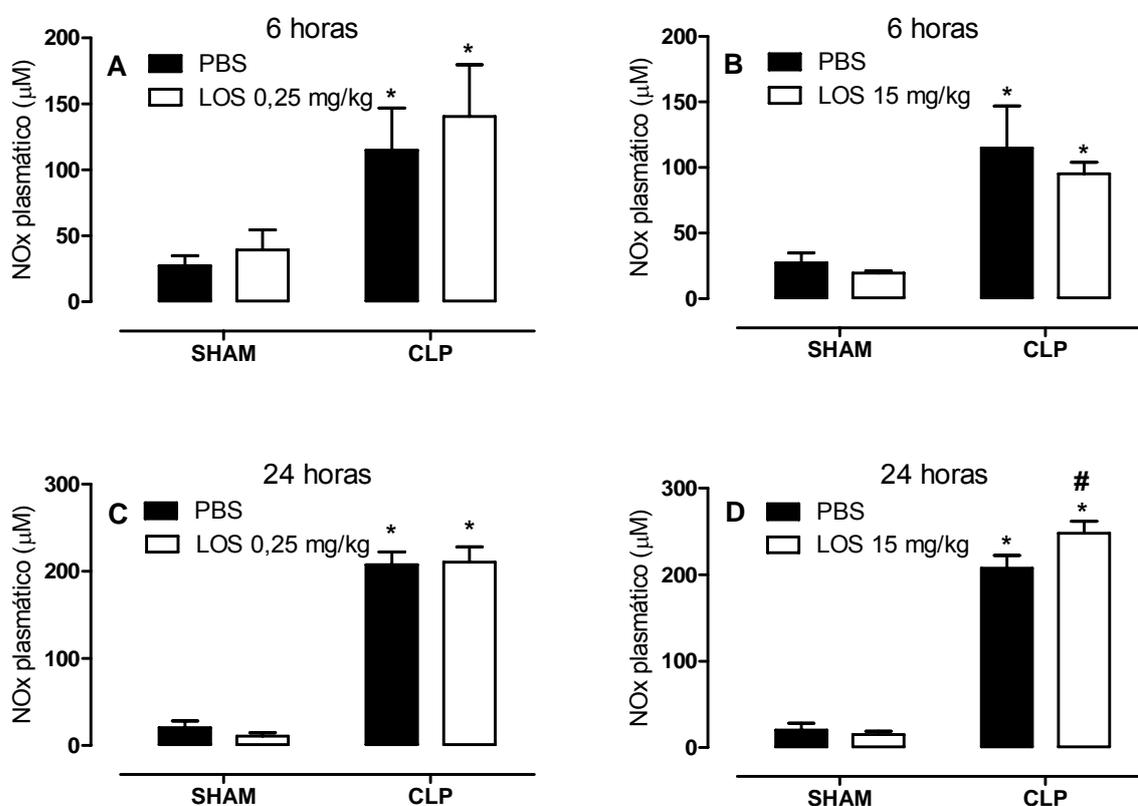


Figura 8. Níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (NO_x) em animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Os animais foram tratados com losartan (0,25 ou 15 mg/kg) duas horas após a indução da sepse. No tempo de 6 ou 24 horas após o procedimento cirúrgico o sangue foi coletado e o plasma separado para a determinação dos níveis plasmáticos de NO_x através da conversão de nitrato a nitrito, seguida da reação de *Griess*. Painéis A e B: análise no tempo 6 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Painéis C e D: análise no tempo de 24 horas para tratamento com losartan 0,25 e 15 mg/kg respectivamente. Os resultados representam a média ± erro padrão da média, n=6. * p < 0,05 em relação ao grupo *sham*+PBS. # p < 0,05 em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.2.4 Losartan e nível glicêmico

No tempo de 6 horas após a cirurgia, os animais submetidos à CLP apresentavam-se hiperglicêmicos quando comparados ao grupo *sham*. A análise feita no tempo de 12 horas após a indução da sepse mostrou que os animais sépticos estavam hipoglicêmicos, quando comparados ao grupo *sham*. Essa queda da glicemia perdurou até o tempo de 24 horas (Figura 9, painel A). O tratamento dos animais *sham* com losartan não interferiu na glicemia (Figura 9, painéis B e C). Os animais sépticos tratados com a dose de 0,25 mg/kg de losartan apresentaram o mesmo perfil glicêmico daqueles que receberam apenas PBS (Figura 9, painel D). Os animais submetidos à CLP que receberam a dose de 15 mg/kg de losartan não apresentaram elevação da glicemia como os animais sépticos. Nos demais tempos analisados, o tratamento com esta dose de losartan apresentou o mesmo perfil do grupo CLP controle (Figura 9, painel E).

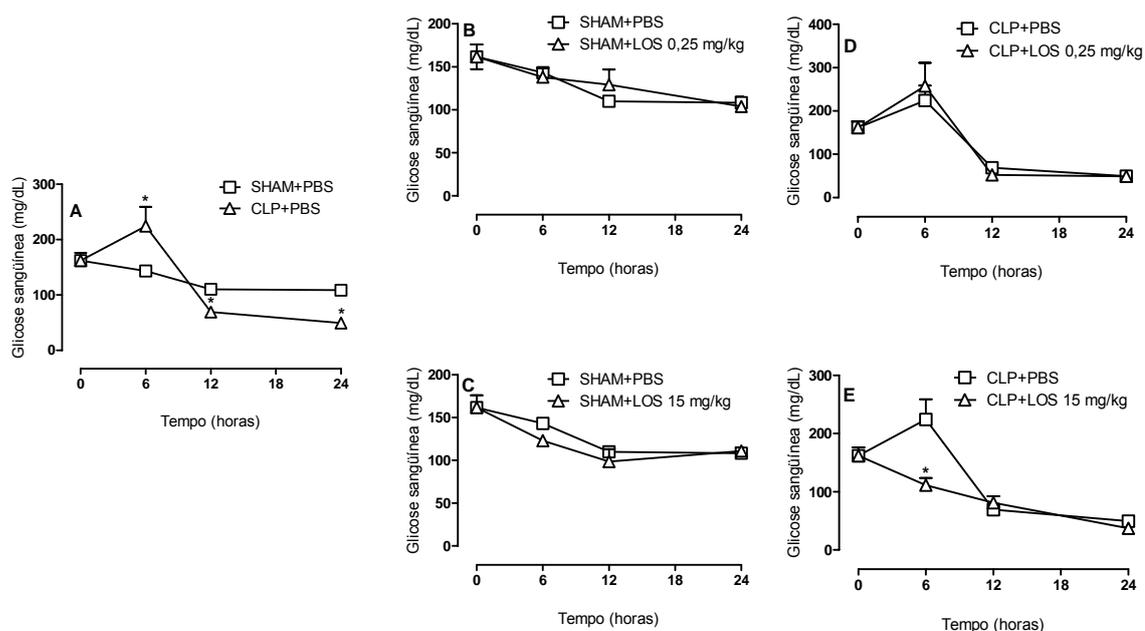


Figura 9. Níveis sanguíneos de glicose em animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Os animais foram tratados com losartan (0,25 mg/kg ou 15 mg/kg) duas horas após a indução da sepse. Nos tempos de 6, 12 e 24 horas após o procedimento cirúrgico tiveram a glicemia avaliada. Painel A: glicemia temporal dos grupos CLP e *sham* que receberam PBS. Painel B: glicemia temporal dos grupos *sham*+PBS e *sham* tratado com 0,25 mg/kg de losartan. Painel C: glicemia temporal dos grupos *sham*+PBS e *sham* tratado com 15 mg/kg de losartan. Painel D: glicemia temporal dos grupos CLP+PBS e CLP tratado com 0,25 mg/kg de losartan. Painel E: glicemia temporal dos grupos CLP+PBS e CLP tratado com 15 mg/kg de losartan. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n=6. * p < 0,05 em relação ao grupo *sham*. (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.2.5 Losartan e atividade de mieloperoxidase pulmonar

Os animais submetidos à CLP apresentaram um aumento considerável da migração de neutrófilos para seus pulmões, quando comparados ao grupo *sham*, em ambos os tempos analisados (Figura 10, painéis A e B).

O tratamento dos animais sépticos com losartan mostrou que ambas as doses promoveram considerável redução da atividade da mieloperoxidase (Figura 10, painéis A e B). O efeito do losartan foi mais evidente quando a atividade da MPO foi avaliada 6 horas após o início da sepse. No tempo mais tardio a inibição foi parcial (Figura 10, painel B).

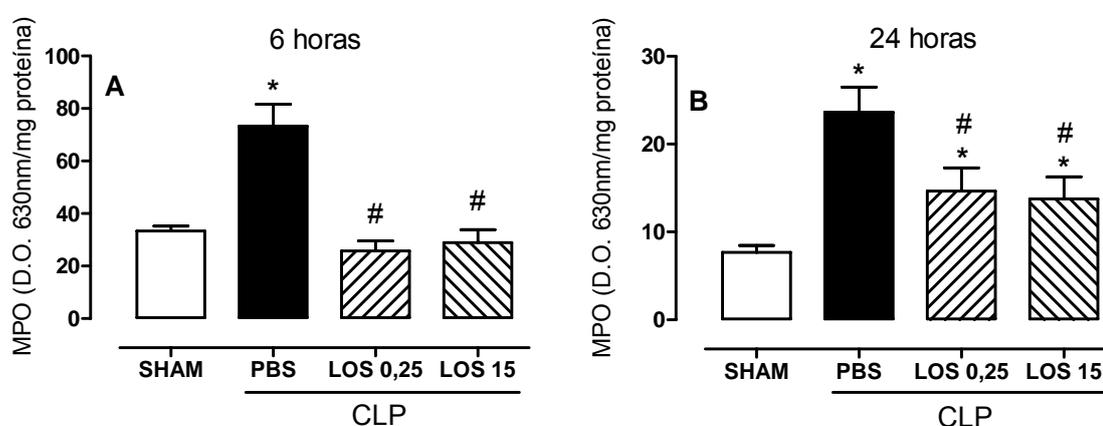


Figura 10. Efeito do tratamento com losartan sobre a atividade de mieloperoxidase no pulmão de ratos submetidos à CLP. Os animais tratados com losartan (doses de 0,25 ou 15 mg/kg) duas horas após o procedimento cirúrgico tiveram seus pulmões coletados nos tempos de 6 horas (Painel A) ou 24 horas (Painel B) depois da cirurgia, para realização do ensaio. Os valores representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.2.6 Losartan e número de leucócitos

Sepse induziu leucopenia tardia (24 h) em ratos (Figura 11, painéis A e B). A dose de 0,25 mg/kg de losartan administrada no início da sepse preveniu a leucopenia tardia. Por outro lado, a dose de 15 mg/kg não interferiu no número de leucócitos dos animais sépticos (Figura 11).

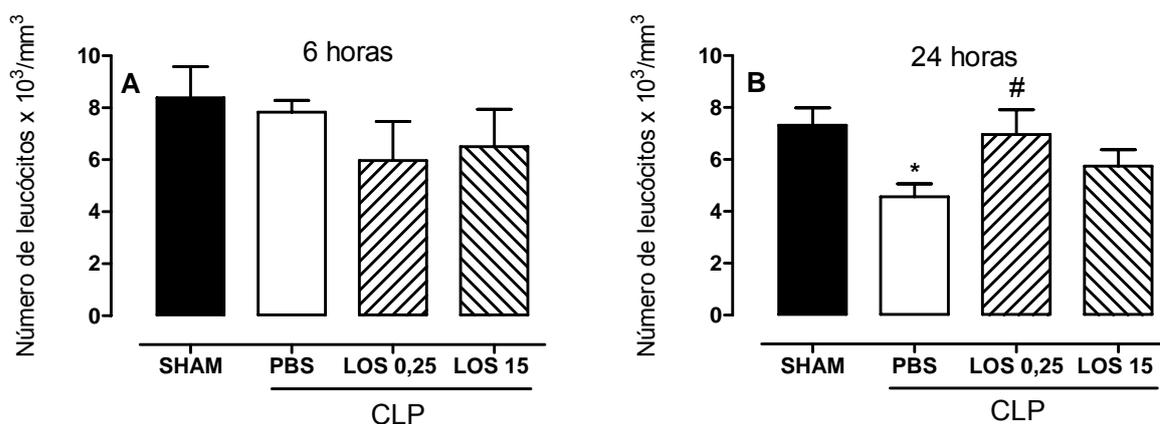


Figura 11. Número total de leucócitos em animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Os animais foram tratados com losartan (0,25 ou 15mg/kg) duas horas após a indução da sepse. Nos tempos de 6 horas (Painel A) e 24 horas (Painel B) após o procedimento cirúrgico o sangue foi coletado e a contagem total do número de leucócitos realizada. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n=6. (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.2.7 Losartan e presença de bactérias no sangue e no peritônio

Os animais submetidos à CLP apresentavam elevada quantidade de bactérias, tanto no sangue quanto no lavado peritoneal, 24 horas após a indução da sepse. No grupo *sham* não foi observado crescimento bacteriano em nenhum dos materiais biológicos analisados (Figura 12, painéis A e B).

Nenhuma das doses de losartan (0,25 ou 15 mg/kg) interferiu no crescimento bacteriano no sangue e no lavado peritoneal dos animais sépticos (Figura 12, painéis A e B).

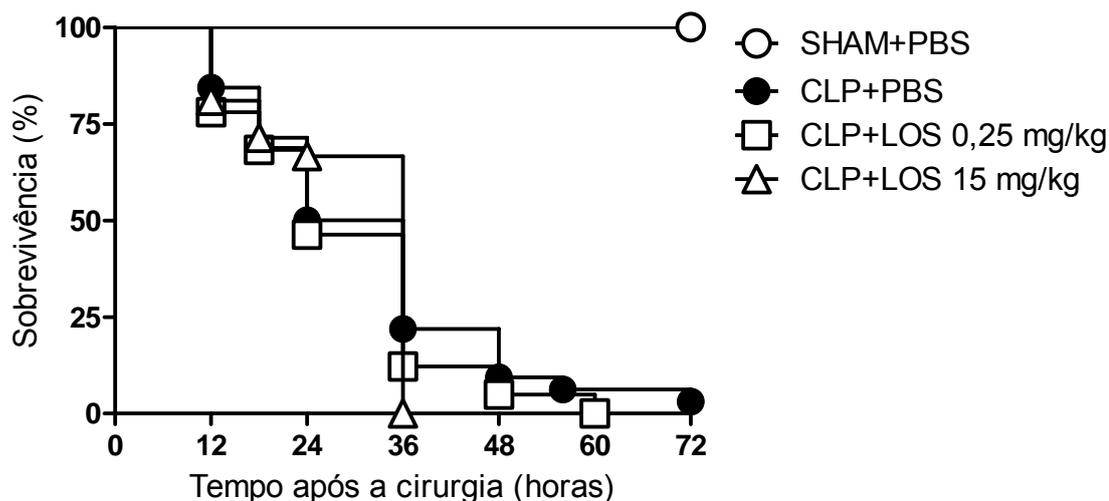


Figura 13. Curva de sobrevivência de animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Decorridas duas horas do procedimento de indução da sepse, os animais foram divididos em grupos (n = 10 animais por grupo) e receberam o tratamento com losartan nas doses de 0,25 ou 15 mg/kg. Os grupos controle, CLP sem tratamento e falso-operado (*sham*), receberam PBS. Os grupos foram observados a cada 12 horas, durante 3 dias.

4.2.9 Enalapril, hipotensão e hiporreatividade vascular

Para avaliar os efeitos da inibição da enzima conversora de angiotensina sobre as alterações cardiovasculares induzidas pelo procedimento de CLP, os animais foram tratados com 0,25 mg/kg de enalapril duas horas após a cirurgia (*sham* ou CLP), e no tempo de 24 horas após a cirurgia (portanto, 22 horas após o tratamento com enalapril) foram preparados para registro da pressão arterial. Todos os animais submetidos à CLP apresentavam-se hipotensos. O tratamento com enalapril não ocasionou alteração na pressão arterial média dos animais (CLP e *sham*) (Figura 14).

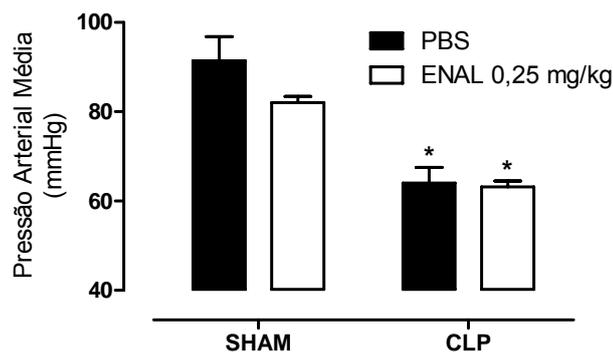


Figura 14. Efeito do enalapril sobre a pressão arterial média de animais submetidos à CLP. Os animais foram tratados com enalapril (0,25 mg/kg) duas horas após a indução da sepse. Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico foram preparados para o registro da pressão arterial média. Os valores representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*+PBS, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS. (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

O tratamento com a dose de 0,25 mg/kg de enalapril, de forma semelhante ao observado com o losartan, promoveu uma considerável melhora na resposta ao agente vasoconstritor fenilefrina nos animais sépticos. O tratamento com enalapril não interferiu na resposta dos animais *sham* à fenilefrina (Figura 15).

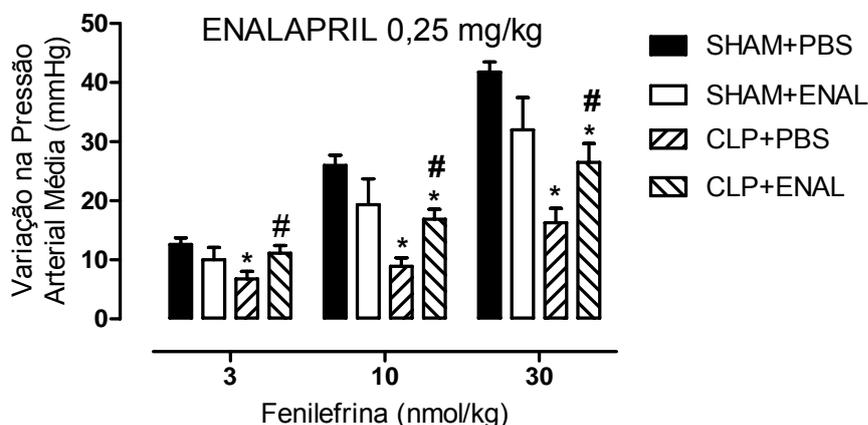


Figura 15. Efeitos do enalapril na hiporreatividade à fenilefrina em animais submetidos à CLP. Os animais foram tratados com enalapril (0,25 mg/kg) duas horas após a indução da sepse e 24 horas após o procedimento cirúrgico foram preparados para o registro da pressão arterial. Doses crescentes de fenilefrina foram injetadas e a variação na pressão arterial média registrada. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*+PBS. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo teste *t* de Newman-Keuls).

A análise realizada no tempo de 24 horas revelou que o tratamento com esta dose de enalapril foi capaz de promover uma considerável melhora na resposta à angiotensina II (Figura 16). Esse tratamento não interferiu na responsividade dos animais *sham*.

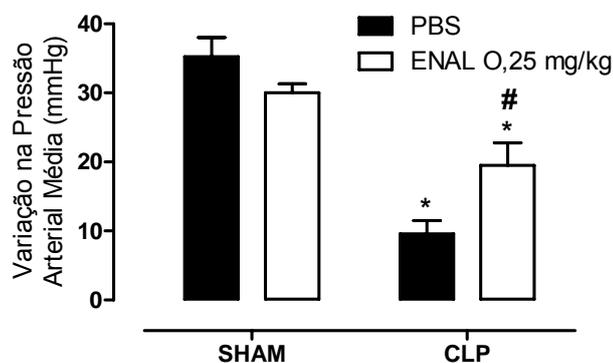


Figura 16. Efeito do enalapril na responsividade a 30 pmol/kg de angiotensina II em animais submetidos à CLP. Os animais foram tratados com enalapril duas horas após a indução da sepse com a dose de 0,25 mg/kg e 24 horas após o procedimento cirúrgico foram preparados para o registro da pressão arterial. A dose de 30 pmol/kg de angiotensina II foi injetada e a variação na pressão arterial média registrada. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*+PBS. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.2.10 Enalapril e atividade de mieloperoxidase pulmonar

A dosagem da atividade da enzima mieloperoxidase indicou que os animais submetidos à CLP apresentaram um aumento considerável da migração de neutrófilos para seus pulmões, em análise feita no tempo de 6 horas, quando comparados ao grupo *sham* (Figura 17, painel A). Diferente do que ocorreu na análise realizada anteriormente para o tratamento com losartan, aqui, no tempo de 24 horas não se observou diferença entre o grupo CLP e o grupo *sham* (Figura 17, painel B). A análise feita no tempo de 6 horas após a realização da CLP, mostrou que o tratamento dos animais sépticos com as doses de 0,25 ou 15 mg/kg de enalapril, no tempo de duas horas após a cirurgia, foi capaz de promover uma considerável redução na migração de neutrófilos para os pulmões desses animais (Figura 17, painel A). Por sua vez, no tempo de 24 horas não houve diferença entre os grupos (Figura 17, painel B).

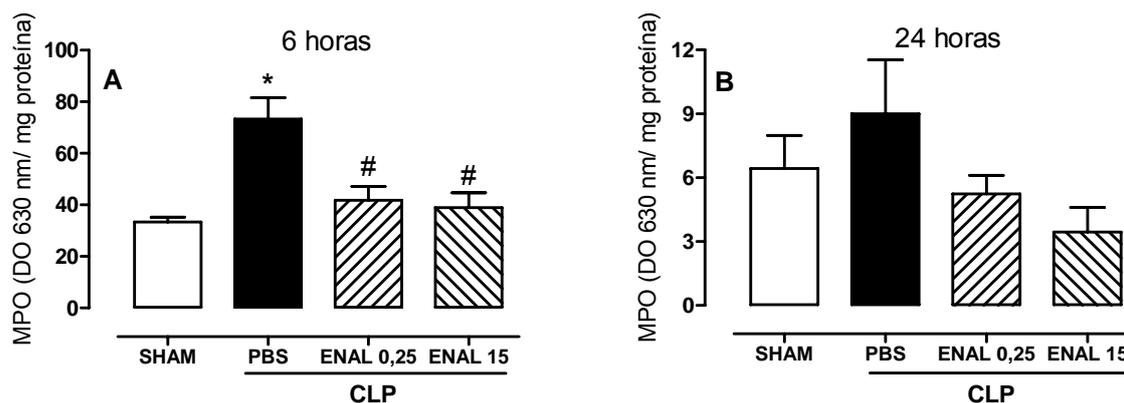


Figura 17. Efeito do tratamento com enalapril na migração de neutrófilos para o pulmão em animais submetidos à CLP. Os animais tratados com enalapril (doses de 0,25 ou 15 mg/kg) duas horas após o procedimento cirúrgico tiveram seus pulmões coletados nos tempos de 6 horas (Painel A) ou 24 horas (Painel B) depois da cirurgia, para realização do ensaio da MPO. Os valores representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS. (ANOVA de uma via seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.3 Efeitos da administração tardia de losartan na sepse

Neste grupo de experimentos, o tempo de administração do losartan foi alterado para 8 horas depois da cirurgia e a avaliação dos parâmetros foi feita somente 24 horas após o procedimento de CLP ou falsa cirurgia, ou seja, 16 horas após a administração do fármaco.

4.3.1 Losartan, hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores

Levando em consideração que o primeiro protocolo de tratamento com losartan foi feito logo no início do quadro de sepse, ou seja, duas horas após a CLP, resolvemos avaliar se um tratamento realizado em tempo mais distante da realização da cirurgia causaria os mesmos efeitos hemodinâmicos observados no tratamento inicial. Para isso, os animais receberam as mesmas doses do fármaco (0,25 e 15 mg/kg), porém, no tempo de 8 horas após o procedimento cirúrgico, e tiveram a pressão arterial média verificada 24 horas após a CLP (16 horas após o tratamento).

A dose de 0,25 mg/kg de losartan não interferiu na pressão arterial média dos animais *sham* e CLP quando comparamos estes aos grupos que receberam apenas PBS (Figura 18, painel A). Por outro lado, a dose de 15 mg/kg causou uma

redução na pressão arterial média, tanto no grupo CLP quanto no *sham* (Figura 18, painel B).

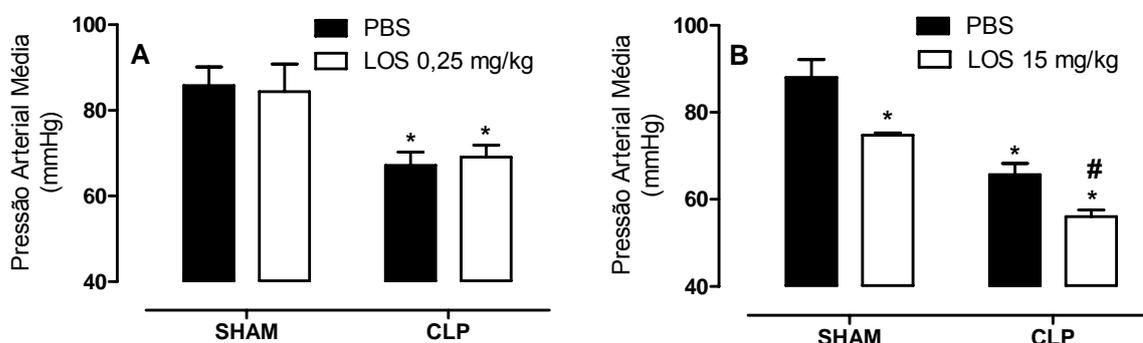


Figura 18. Efeito do losartan sobre a pressão arterial média de animais submetidos à CLP. Os animais foram tratados com losartan oito horas após a indução da sepse com as doses de 0,25 mg/kg (Painel A) ou 15 mg/kg (Painel B) e 24 horas após o procedimento cirúrgico foram preparados para o registro da pressão arterial média. Os valores representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*+PBS, # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS. (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

A análise das conseqüências do tratamento tardio com losartan sobre a reatividade vascular mostrou que a menor dose de losartan não modificou a reatividade dos animais (CLP e *sham*) à fenilefrina (Figura 19, painel A). Por outro lado, a dose de 15 mg/kg promoveu uma considerável piora na resposta vasoconstritora para as doses de 3 e 10 nmol/kg de fenilefrina. O grupo *sham* tratado essa dose de losartan respondeu de forma semelhante ao grupo que recebeu PBS (Figura 19, painel B).

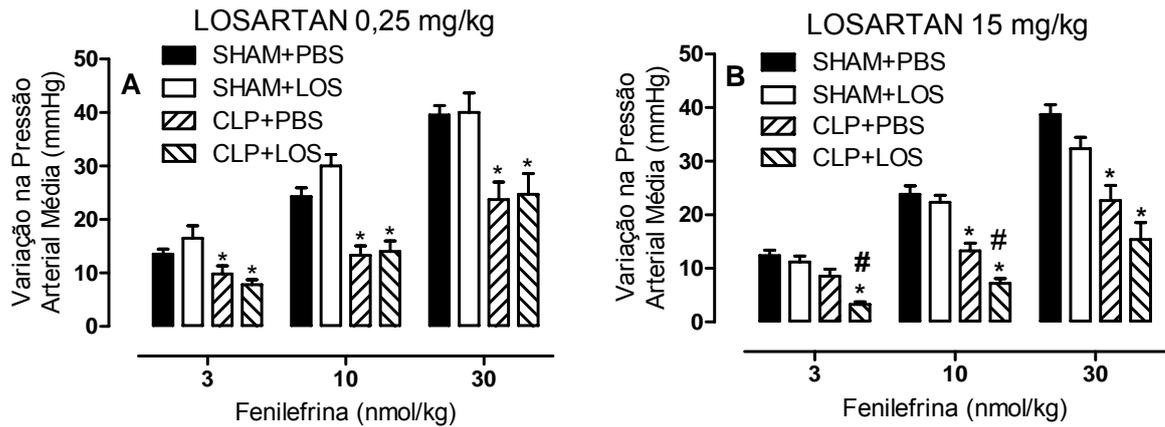


Figura 19. Efeito do tratamento tardio com losartan na hiporreatividade à fenilefrina em animais submetidos à CLP. Os animais foram tratados com losartan 8 horas após a indução da sepse, nas doses de 0,25 mg/kg (Painel A) ou 15 mg/kg (Painel B) e 24 horas após o procedimento cirúrgico os animais foram preparados para o registro da pressão arterial. Doses crescentes de fenilefrina foram injetadas e a variação na pressão arterial média registrada. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

A análise realizada no tempo de 24 horas indicou que o tratamento tardio com a menor dose de losartan não alterou o perfil de resposta à angiotensina II, tanto para os animais sépticos quanto para o grupo *sham* (Figura 20, painel A). Contudo, a dose de 15 mg/kg causou uma piora na resposta vasoconstritora dos animais sépticos. Esta dose também afetou negativamente a resposta do grupo *sham*, quando comparados àqueles que receberam apenas PBS (Figura 20, painel B).

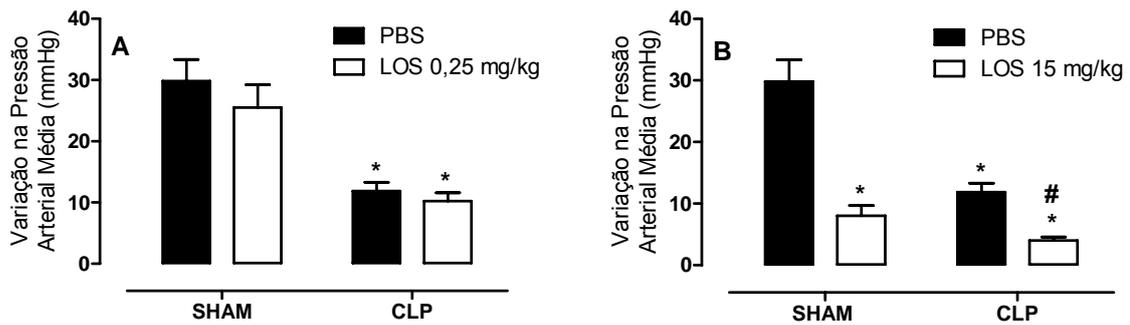


Figura 20. Efeito do losartan na responsividade a 30 pmol/kg de angiotensina II em animais submetidos à CLP. Os animais foram tratados com losartan 8 horas após a indução da sepse com as doses de 0,25 mg/kg (Painel A) ou 15 mg/kg (Painel B) e 24 horas após o procedimento cirúrgico os animais foram preparados para o registro da pressão arterial. A dose de 30 pmol/kg de angiotensina II foi injetada e a variação na pressão arterial média registrada. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*+PBS. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.3.2 Losartan e a função renal

O tratamento tardio com losartan mostrou um perfil de resposta semelhante àquele obtido com os animais tratados duas horas após a cirurgia. A menor dose administrada não influenciou o perfil de resposta quando comparada aos animais sépticos. Entretanto, a maior dose contribuiu para piorar a função renal já comprometida nos animais sépticos (Figura 21, painéis A e B). Nenhuma das doses interferiu nos níveis de creatinina plasmática dos animais *sham*.

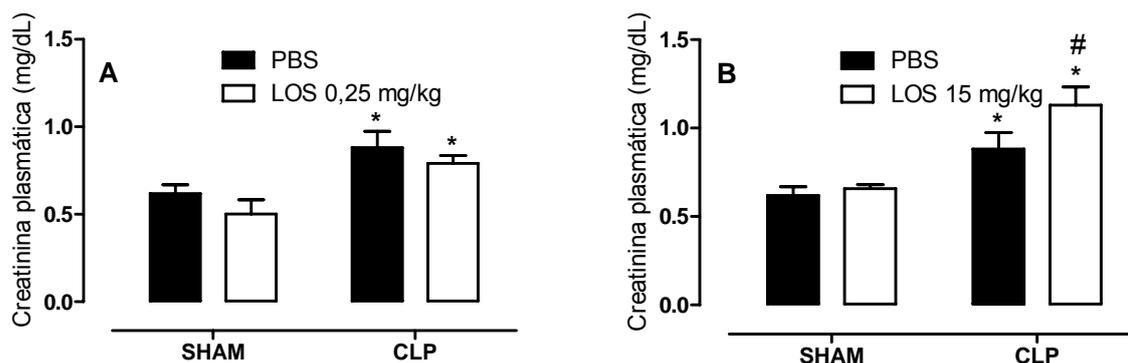


Figura 21. Níveis plasmáticos de creatinina em animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Os animais foram tratados com losartan 8 horas após a indução da sepse, com as doses de 0,25 mg/kg (Painel A) ou 15 mg/kg (Painel B). No tempo de 24 horas após o procedimento cirúrgico o sangue foi coletado e o plasma separado para a determinação dos níveis plasmáticos de creatinina através de ensaio enzimático colorimétrico. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, $n=6$. * $p < 0,05$ em relação ao grupo *sham*+PBS. # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

A administração de losartan em tempo mais tardio do quadro de sepse mostrou que a dose de 0,25 mg/kg não interferiu nos níveis de uréia plasmática. Concordando com os dados de creatinina, a maior dose de losartan empregada causa uma considerável piora da função renal já comprometida nos animais sépticos (Figura 22, painéis A e B). O uso deste fármaco não interferiu nos níveis de uréia dos animais *sham*.

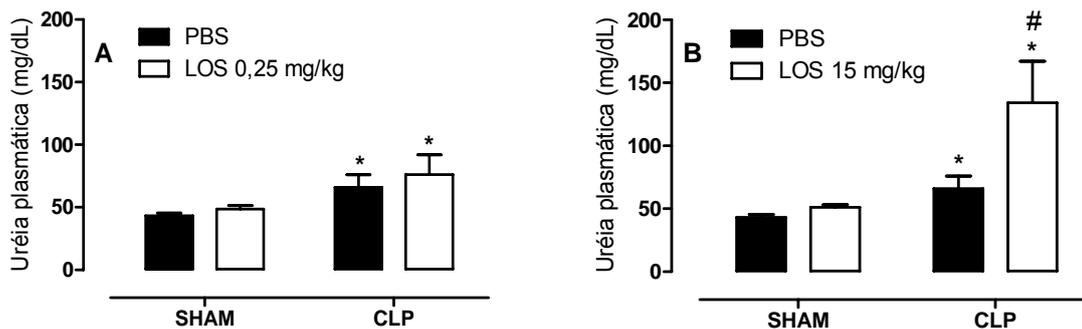


Figura 22. Níveis plasmáticos de uréia em animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Os animais foram tratados com losartan 8 horas após a indução da sepse, com as doses de 0,25 mg/kg (Painel A) ou 15 mg/kg (Painel B). No tempo de 24 horas após o procedimento cirúrgico o sangue foi coletado e o plasma separado para a determinação dos níveis plasmáticos de uréia através de ensaio enzimático colorimétrico. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n=6. * p < 0,05 em relação ao grupo sham+PBS. # p < 0,05 em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

4.3.3 Losartan e níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (NO_x)

As duas doses de losartan não interferiram nos níveis de NO_x dos animais sépticos e dos sham (Figura 23, painéis A e B).

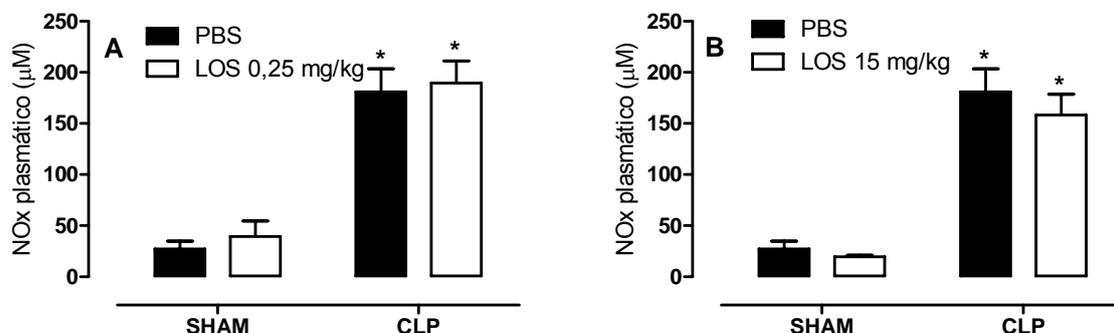


Figura 23. Níveis plasmáticos de nitrato + nitrito (NO_x) em animais submetidos à CLP e tratados com losartan. Os animais foram tratados com losartan 8 horas após a indução da sepse, nas doses de 0,25 mg/kg (Painel A) ou 15 mg/kg (Painel B). No tempo de 24 horas após o procedimento cirúrgico o sangue foi coletado e o plasma separado para a determinação dos níveis plasmáticos de NO_x através da conversão de nitrato a nitrito, seguida da reação de Griess. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n=6. * p < 0,05 em relação ao grupo sham+PBS. # p < 0,05 em relação ao grupo CLP+PBS (ANOVA de duas vias seguida pelo *post-hoc* de Newman-Keuls).

5. DISCUSSÃO

O ensaio de determinação da duração do efeito fisiológico foi realizado para termos uma idéia da duração do efeito dos fármacos nos animais empregados neste estudo, haja vista que, em razão de seu pequeno tamanho corporal, o metabolismo nestes animais é mais acelerado que em humanos (Schmidt-Nielsen, 1996).

Os resultados encontrados indicaram importantes diferenças no que diz respeito à duração do efeito fisiológico do losartan e do enalapril em ratos, quando comparados a humanos. Além disso, houve uma diferença substancial na duração do efeito dos dois fármacos, o que pode ser devido à ocorrência de uma maior depuração do enalapril em relação ao losartan. Ademais, cabe ressaltar que esta avaliação da duração do efeito fisiológico diz respeito apenas à capacidade dos fármacos de inibirem as respostas vasoconstritoras da angiotensina II. O uso de técnicas mais sensíveis, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), por exemplo, possibilitaria quantificar adequadamente as concentrações plasmáticas destes fármacos. Contudo, nosso interesse estava na sua atividade fisiológica por isso a avaliação farmacocinética não foi feita no presente trabalho.

Ao iniciarmos este estudo, com o objetivo de investigar o envolvimento da angiotensina II na patologia da sepse, optamos inicialmente pelo fármaco losartan, pois os antagonistas dos receptores de angiotensina têm uma maior seletividade de interferência no sistema renina-angiotensina do que os inibidores da enzima conversora (ECA) (Hollenberg *et al.*, 1998). Os antagonistas interferem na ação da angiotensina II, seja ela formada pela ação da ECA ou, a partir de vias alternativas, como as que envolvem outras peptidases como catepsina G e quimases. Além disso, o uso de antagonistas dos receptores de angiotensina não interfere em outros mecanismos de ação da ECA, como a degradação de bradicinina, por exemplo. Contudo, decidimos também avaliar os efeitos do enalapril em alguns parâmetros, como forma de nos certificar se os resultados se reproduziriam ou caso contrário, outros mecanismos poderiam estar envolvidos.

A diminuição na resistência vascular sistêmica é uma característica típica do choque séptico e é um grande fator causador de hipotensão nessa condição. A persistente perda no tônus vascular periférico seguida da hiporreatividade a agentes vasoconstritores são fatores determinantes da mortalidade em pacientes sépticos. Em nossos resultados, os animais submetidos à CLP apresentavam-se hipotensos e

hiporreativos aos vasoconstritores fenilefrina e angiotensina II. Portanto como descrito acima isto, além de simular a sepse humana, mostra que este efeito é amplo e não parece se restringir a uma simples falha de ativação de um receptor específico, já que a fenilefrina e angiotensina II atuam em diferentes receptores.

Dentre as propostas deste estudo estava fazer uso de fármacos que inibissem os efeitos inflamatórios da angiotensina II na sepse, haja vista que estudos recentes têm demonstrado que estes efeitos são importantes em diversas patologias (Dandona *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2007; Marchesi *et al.*, 2008). No entanto, ao mesmo tempo em que a angiotensina II tem uma participação indesejável no processo inflamatório que conduz a lesão dos tecidos do hospedeiro em sepse, este mesmo mediador é responsável por promover vasoconstrição e aumento da pressão arterial. Esta vasoconstrição é, por sua vez, uma ação desejável em pacientes acometidos por choque séptico. Neste contexto, desenhamos uma série de experimentos que tinham como objetivo determinar quais doses de losartan e enalapril estariam reduzindo parâmetros inflamatórios, mas sem piorar o quadro de hipotensão.

Existem trabalhos disponíveis na literatura mostrando efeitos antiinflamatórios com o uso de fármacos que interferem no sistema renina-angiotensina. Contudo, o tratamento é iniciado antes da indução do processo inflamatório e, além disso, utilizando doses bastante altas (Nagai *et al.*, 2005; Hagiwara *et al.*, 2009).

Com relação aos efeitos do tratamento com losartan sobre a pressão arterial média, observamos que o tratamento de animais sépticos com a dose de 15 mg/kg promoveu um agravamento da hipotensão. Este resultado provavelmente está relacionado ao fato desta dose promover um sustentado bloqueio dos receptores AT1, como observado no ensaio de duração do efeito fisiológico. A angiotensina II é um potente vasoconstritor endógeno e, portanto, a privação prolongada do seu efeito sobre os receptores AT1 pode ter conseqüências indesejadas, principalmente num quadro patológico caracterizado por acentuada hipotensão como é o caso da sepse.

Os efeitos da angiotensina II estão relacionados à sua ação nos receptores AT1 e AT2. Siragy (2000) descreveu que os receptores AT2 não são abundantes em adultos saudáveis, porém, em condições de estresse, incluindo lesão vascular, infarto do miocárdio e ataque cardíaco, há aumento da sua expressão. Como a patologia da sepse é uma condição de intenso estresse para o organismo

hospedeiro é provável que os animais apresentem um aumento da expressão desses receptores. O número de estudos envolvendo receptores AT2 de angiotensina ainda é reduzido quando comparado àqueles com receptores AT1. Sugere-se que ao atuar em receptores AT2, a angiotensina II acaba promovendo efeitos opostos àqueles do obtidos através da sua ação em receptores AT1, inclusive contribuindo com os efeitos terapêuticos dos antagonistas de receptores AT1, uma vez que este bloqueio pode deslocar a ação da angiotensina II para os receptores AT2 (Widdop *et al.*, 2003). Possivelmente em nosso estudo, devido ao intenso bloqueio dos receptores AT1, esteja ocorrendo este deslocamento para AT2, o que poderia explicar a maior queda da pressão arterial encontrada em animais sépticos tratados com altas doses de losartan. Cervenka *et al.*, (1998) observaram a ocorrência de queda da pressão arterial após a administração de altas doses de angiotensina II em ratos normais tratados com candesartan, uma antagonista dos receptores AT1. Este efeito foi atribuído à ação da angiotensina II nos receptores AT2. Alguns autores mostraram que dentre as ações da angiotensina II mediadas pelos receptores AT2 está incluída a liberação de NO (Ichiki *et al.*, 1995; Gohlke *et al.*, 1998). Conjuntamente estes achados contribuem para explicar o aumento dos níveis de nitrato e nitrito, bem como a acentuada hipotensão encontrada no tempo de 24 horas, nos animais tratados com a maior dose de losartan.

Em contrapartida, tanto o tratamento precoce como tardio com a menor dose de losartan não interferiu de maneira significativa na pressão arterial média dos animais em estudo (sham e CLP) nos tempos analisados. Com base nisso, esta dose mostrou ser a mais atrativa para o estudo na sepse, pois embora a angiotensina II tenha sido implicada como importante mediador inflamatório em diversas patologias (Dandona *et al.*, 2007; Yao *et al.*, 2007; Marchesi *et al.*, 2008), ela não deixa de ser um importante agente vasoconstritor, e um bloqueio demasiado intenso pode agravar o colapso cardiovascular durante a sepse.

A ausência de hipotensão nos animais sham tratados com a maior dose de losartan chamou nossa atenção, pois esta mesma dose reduziu a pressão nos animais *naive* no ensaio de avaliação da duração do efeito fisiológico. Isto pode ter ocorrido porque os animais *sham*, diferente dos animais *naive*, passaram por um procedimento cirúrgico, o qual pode desencadear um processo inflamatório nestes animais. Em um trabalho publicado recentemente pelo nosso laboratório mostramos que os animais falso-operados apresentam, embora em proporção muito menor que

os animais CLP, um aumento progressivo na migração de neutrófilos para o pulmão, bem como aumento dos níveis de lactato sérico (marcador de hipoxia tecidual) quando comparados com animais *naive* (Fernandes *et al.*, 2009). Além disso, dados não publicados do nosso grupo, mostram que os animais falso-operados apresentam um aumento de temperatura corporal. Assim estes dados sugerem que embora não ocorra um aumento da produção de NO plasmático nem alterações cardiovasculares, estes animais apresentam uma resposta inflamatória induzida pelo procedimento de falsa cirurgia. Portanto, a presença de uma resposta inflamatória secundária a falsa cirurgia associada à anestesia utilizada para realização do procedimento pode modificar a meia-vida ou a resposta fisiológica do fármaco estudado.

Ainda que os tratamentos com losartan em baixas doses (0,25 mg/kg, 2 e 8 horas após cirurgia) não tenham modificado a hipotensão de animais sépticos, cabe ressaltar que, quando iniciado precocemente (2 horas após a cirurgia) em animais submetidos à CLP, este protocolo terapêutico foi capaz de promover uma significativa melhora da hiporreatividade aos vasoconstritores fenilefrina e angiotensina II. Portanto, uma inibição feita em momentos iniciais da sepse pode apresentar reflexos positivos em análises feitas em período mais tardio. Cabe ressaltar que de acordo com os dados da duração do efeito deste fármaco, no momento em que foi observada a melhora na hiporreatividade, o bloqueio dos receptores ou a inibição da enzima conversora não estava mais ocorrendo. Assim, estes dados mostram que a angiotensina II tem um papel importante na sinalização para o desenvolvimento de alterações vasculares na sepse.

A hipotensão é uma característica da condição de sepse. Por sua vez, o choque séptico se caracteriza pela ocorrência de hipotensão associada à hiporreatividade a vasoconstritores. Portanto, embora no quadro de choque séptico a hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores estejam associadas, sendo muitas vezes confundidas, elas são eventos distintos. Um trabalho prévio do nosso grupo mostrou que uma breve infusão de doadores de óxido nítrico (30 min.) em ratos pode gerar uma hiporreatividade a vasoconstritores que perdura por até 24 horas (Da Silva-Santos e Assreuy, 1999). É interessante chamar a atenção que a hipotensão foi presente apenas durante o tempo de infusão dos doadores de óxido nítrico. Portanto, estes dados além de mostrarem a importância do óxido nítrico na instalação da hiporreatividade a vasoconstritores, mostram que a ausência de

resposta não é resultado de um simples excesso da liberação/produção de agentes vasodilatadores durante a sepse, mas sim parece ser um evento independente e que pode ter mecanismo distinto. Além disso, corroborando com esta idéia, trabalhos do nosso grupo (Da Silva-Santos *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006) e de outros (Julou-Schaeffer *et al.*, 1990; Szabo *et al.*, 1993) mostram que animais normotensos podem apresentar hiporreatividade a vasoconstritores ou que animais hipotensos podem responder normalmente a vasoconstritores exógenos. Em nosso estudo, a menor dose de losartan preservou a hiporreatividade dos animais, contudo, sem melhorar o quadro hipotensivo dos mesmos. Portanto, embora este tratamento não restabeleça na íntegra a hemodinâmica do animal, ele pode estar contribuindo para que os animais não entrem no grave quadro de choque séptico e tornem-se novamente responsivos a terapia vasopressora.

Através dos resultados obtidos no presente estudo pode-se dizer que apenas o tratamento precoce com uma dose baixa de losartan em animais submetidos à CLP é capaz de promover uma melhora da hiporreatividade aos vasoconstritores fenilefrina e angiotensina II.

Durante a sepse há uma intensa produção de NO, o qual contribui para a acentuada hipotensão que ocorre nesta patologia (Parrilo, 1993). A perda da resistência vascular periférica que ocorre na sepse é acompanhada de um intenso aumento da produção de vasoconstritores endógenos (Vincent, 1998). Como observamos uma considerável queda da pressão arterial média já nas primeiras horas da sepse (ver Figura 3), provavelmente está ocorrendo precocemente um grande aumento na liberação de angiotensina II, a qual irá atuar como vasoconstritor, na tentativa de reverter a hipotensão e, além disso, como agente pró-inflamatório.

A perda da responsividade a certos agentes vasoconstritores pode estar relacionada a alguma interferência na funcionalidade dos receptores, como por exemplo, dessensibilização, internalização, etc. Em um estudo com animais sépticos, Bucker *et al.* (2001) perceberam que apesar dos níveis plasmáticos de renina e de angiotensina II estarem aumentados, as concentrações de aldosterona não se alteravam. Associado a isso eles observaram uma perda da ação pressora em resposta à administração de angiotensina II, e concluíram que os animais sépticos tinham a expressão dos receptores AT1 reduzida. Atribuíram esse fenômeno a ação sinérgica do NO com citocinas pró-inflamatórias. Estudando a

perda de resposta à noradrenalina em pacientes sépticos, Bucher e colaboradores (2003) observaram que há uma redução da expressão dos receptores α 1-adrenérgicos, a qual é mediada por citocinas pró-inflamatórias. Grzesk e Szadujkis-Szadurski (2003) reportaram que a perda do tônus vascular, em modelos de endotoxemia, pode estar diretamente relacionada com a redução dos receptores α -adrenérgicos de reserva ou ser resultante de mudanças de afinidade do receptor e do agonista. Schimidt e colaboradores (2008) mostraram que a redução da expressão dos receptores α 1-adrenérgicos está relacionada com a ativação do fator de transcrição NF- κ B, o qual tem papel central na ação de citocinas pró-inflamatórias, e que a inibição deste fator de transcrição previne a diminuição da expressão desses receptores. Os resultados destes estudos contribuem para explicar a hiporreatividade que ocorre durante a sepse.

A piora da hiporreatividade a vasoconstritores, vista com a dose de 15 mg/kg de losartan, pode estar relacionada com uma privação muito intensa da ação de um importante agente vasoconstritor durante uma patologia caracterizada por intensa vasodilatação. Portanto, se por um lado, um bloqueio parcial dos receptores AT1 no início da sepse pode impedir alguns efeitos da angiotensina II, conseqüentemente preservando a reatividade vascular, por outro lado uma dose alta pode causar um bloqueio excessivo e sustentado, privando o organismo da ação de um agente vasoconstritor que pode ser importante para manter a hemodinâmica na sepse.

O bloqueio intenso de receptores AT1 pode estar promovendo a liberação de grandes quantidades de catecolaminas como efeito reflexo, e isso pode favorecer a dessensibilização dos receptores α -adrenérgicos, que pode se refletir na piora da hiporreatividade à fenilefrina. Por outro lado, a piora da hiporreatividade à angiotensina II está relacionada com intenso bloqueio dos receptores, como foi visto na análise da duração do efeito do losartan.

No que diz respeito ao achado que 0,25 mg/kg de losartan melhora a hiporreatividade, nos chama a atenção fato de um antagonista de angiotensina estar promovendo a melhora da hiporreatividade de um agonista α -adrenérgico. O mais interessante é o fato dessa melhora ser percebida tardiamente, quando o bloqueio direto de receptores AT1 com o losartan já não mais existe. Portanto, podemos supor que o bloqueio dos receptores AT1 devido ao tratamento com a menor dose de losartan feito em momentos iniciais da sepse, esteja promovendo a preservação

desses receptores. Levando em consideração que a angiotensina II facilita a neurotransmissão noradrenérgica periférica ao aumentar a liberação e inibir a recaptação de noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas e ao intensificar a resposta vascular à norepinefrina (Jackson *et al.*, 1985), podemos supor que ao bloquear alguns receptores AT1, conseqüentemente não está ocorrendo a ativação plena do sistema noradrenérgico pela ação da angiotensina II, e isso implica em menor liberação de catecolaminas, evitando uma possível dessensibilização de receptores α -adrenérgicos.

Diferentemente dos dados com administração precoce, a administração da menor dose de losartan em momento mais tardio da sepse não reflete melhora na hiporreatividade dos animais. Estes dados sugerem que a angiotensina II liberada no início da sepse, e não em momentos mais tardios, pode ser um evento chave para o desenvolvimento de alterações vasculares.

Por outro lado, mesmo quando administrada em momentos mais tardios a dose mais alta utilizada continuou agravando o quadro de hiporreatividade a vasoconstritores. É importante chamar a atenção, que segundo o estudo de duração do efeito fisiológico, o bloqueio do receptor AT1 com a dose mais alta perdura durante todo o tempo de análise. Assim, supondo que no animal submetido à CLP esta dose de losartan também foi capaz de bloquear o efeito da angiotensina II no receptor AT1 durante todo o tempo, podemos sugerir que a angiotensina II formada em momentos tardios pode ser importante para organismo na tentativa de manter a pressão arterial adequada. Esta dose de losartan pode, portanto, causar uma má perfusão tecidual com conseqüente dano e alterações da reatividade vascular justificando a hiporreatividade a vasoconstritores. Além disso, oito horas após a cirurgia o processo inflamatório pode estar em uma etapa muito avançada, não sendo possível ver melhora com esse tratamento.

Apesar do enalapril atuar por mecanismo diferente do losartan, a administração da dose de 0,25 mg/kg deste inibidor da ECA em período inicial da sepse mostrou os mesmos efeitos hemodinâmicos observados com o antagonismo de AT1. Isso favorece a idéia de que os efeitos observados neste estudo estão relacionados à angiotensina II e não pelo envolvimento de outras vias.

O fato do tratamento com losartan não interferir na hiporreatividade 6 horas após a instalação da sepse, mas o fazendo 24 horas após, nos permite sugerir que esse fármaco precise de um tempo maior para interferir na hiporreatividade tardia

(24 horas pós-CLP) da sepse. Esta hipótese não corrobora com os trabalhos usando inibidores da NOS (Da Silva-Santos *et al.*, 2002) e da guanilato ciclase (Fernandes *et al.*, 2006) que observaram uma reversão imediata da hiporreatividade após a administração dos inibidores destas duas enzimas.

Embora na sepse ocorra hipotensão, conseqüente à vasodilatação periférica e hiporreatividade a vasoconstritores, foi demonstrado que a microvasculatura renal mantém a reatividade vascular normal ou até mesmo aumentada a agentes vasoconstritores (Tarpey *et al.*, 1998; Boffa e Arendshorts, 2005). A associação de baixa perfusão em razão da baixa pressão, aliada a vasoconstrição renal intensa conduz a um rápido desenvolvimento de falência renal na sepse, contribuindo para a letalidade dos pacientes. Este cenário torna o rim um dos órgãos mais vulneráveis na sepse.

Existem trabalhos na literatura mostrando que a angiotensina II pode prejudicar a perfusão renal através do favorecimento da inflamação microvascular (Schwobel *et al.*, 2000) e pela formação de microtrombos (Dielis *et al.*, 2007)

Cervenka e colaboradores (1998) observaram que uma dose baixa de candesartan (0,01 mg/kg) é capaz de promover aumento da taxa de filtração e do fluxo sanguíneo renal em ratos normais. Além disso, mostraram que o antagonismo dos receptores AT1 pode melhorar a oxigenação renal através da redução do trabalho de reabsorção tubular. Portanto, estes dados revelam que o bloqueio dos receptores AT1 tem efeitos diretos na hemodinâmica renal.

Em nosso trabalho as dosagens de creatinina e uréia indicam que em ratos sépticos o comprometimento da função renal tem início rápido e de forma severa.

A maior piora da função renal observada com a dose de 15 mg/kg pode estar relacionada ao fato desta dose estar contribuindo para piorar a hipotensão periférica dos animais sépticos, agravando a má perfusão renal. Como mecanismo compensatório desta hipotensão há uma maior liberação de catecolaminas que irão atuar no leito renal gerando uma vasoconstrição intensa e agravando o dano renal como já descrito acima. Em nosso trabalho não observamos prevenção do dano renal com o uso de baixa dose do antagonista de receptores AT1. Como as análises da função renal neste trabalho foram feitas através de dosagens de parâmetros bioquímicos no plasma, não podemos descartar a hipótese de que a análise do rim isolado, pouco tempo após o tratamento pudesse mostrar uma prevenção da função renal com a menor dose de losartan.

O NO é um dos principais efetores da sepse e do choque séptico (Beishuizen *et al.*, 1998; Parrat, 1988) e os níveis plasmáticos e teciduais de nitrato e nitrito estão elevados nestas condições (Nava *et al.*, 1991; Ochoa *et al.*, 1991). Nossos resultados indicam um intenso aumento do NOx nos animais sépticos, desde os momentos iniciais. De maneira muito interessante observamos um aumento de NOx com a dose de 15 mg/kg de losartan no tempo de 24 horas. Este efeito pode estar relacionado a uma maior atividade da enzima NOS ou até mesmo pelo maior comprometimento da função renal com essa dose, o que pode estar dificultando a adequada excreção dos metabólitos de NO. Adicionalmente, o agravamento da perfusão sangüínea na microvasculatura de outros órgãos que não foram analisados neste estudo pode contribuir para a geração um processo inflamatório e aumento da expressão da NOS-2, com conseqüente aumento na produção de NO. Além disso, o bloqueio dos receptores AT1 com a dose de 15 mg/kg de losartan pode favorecer o deslocamento da angiotensina II para atuar nos receptores AT2, e conforme descrito, dentre as ações da angiotensina II neste receptores está a liberação de NO (Ichiki *et al.*, 1995; Gohlke *et al.*, 1998). Estas informações contribuem para explicar o aumento de NOx com a maior dose de losartan. Também podemos atribuir a esse aumento de NOx a piora da hiporreatividade à fenilefrina vista com a maior dose de losartan.

Na maioria das vezes pacientes em sepse severa apresentam hiperglicemia em comparação a indivíduos saudáveis (Revelly *et al.*, 2005). Na prática clínica observa-se que pacientes sépticos são resistentes à insulina, exibindo aumento de produção de glicose pelo fígado e reduzida utilização pelos tecidos (Rusavy *et al.*, 2004). Estudos utilizando o modelo CLP em ratos demonstraram a ocorrência de duas fases na resposta glicêmica do organismo em conseqüência à cirurgia, um período inicial hiperglicêmico, seguido de hipoglicemia em momentos mais tardios (Maitra *et al.*, 2000). Outros trabalhos reportaram apenas hipoglicemia em ratos submetidos à CLP, embora não descartando a possibilidade de ocorrência de fase hiperglicêmica inicial não detectada (Heuer *et al.* 2004; Brooks *et al.*, 2007).

Em nossos experimentos observamos a ocorrência de duas fases glicêmicas bem definidas. Inicialmente houve um período hiperglicêmico detectado na análise em 6 horas, seguido de uma hipoglicemia nos demais tempos. O que nos chamou a atenção foi a não ocorrência da fase hiperglicêmica nos animais que receberam a maior dose de losartan. A angiotensina II foi descrita como indutora de hiperglicemia

em ratos, estando este efeito relacionado com a ação da mesma sobre os receptores AT1 (Machado *et al.*, 1998). Rao (1996) mostrou que doses de angiotensina II, capazes de aumentar a pressão arterial, promovem a liberação de glicose hepática.

Como demonstrado por Marchesi *et al.*, 2008 a angiotensina II apresenta um importante papel na iniciação do processo inflamatório, e, portanto, esta angiotensina II produzida em tempos iniciais da sepse pode ter importante influência como mediador do processo inflamatório. Um trabalho publicado recentemente, por exemplo, mostra que a infusão de angiotensina II, através de sua ação em receptores AT1 leva a ativação de NADPH oxidase, com conseqüente produção de ânion superóxido, aumento de estresse oxidativo e a ativação de NF-kB, aumentando a expressão de proteínas inflamatórias como o receptor B1 da bradicinina em aorta de ratos. A ativação deste receptor causa vasodilatação dependente de endotélio e aumenta a geração de NO, alterando assim a reatividade vascular (Ceravolo *et al.*, 2007). Supomos, portanto que o tratamento precoce com baixas doses de losartan possa reduzir a resposta inflamatória, que sabidamente contribui para promover a hiporreatividade vascular, o que explicaria nossos achados. Para comprovar esta hipótese, conduzimos na seqüência alguns experimentos que tratavam de explorar os efeitos antiinflamatórios do losartan nesta condição experimental.

A migração celular é um evento de grande importância no decurso do processo inflamatório. A enzima mieloperoxidase (MPO) está presente em grande quantidade no interior dos neutrófilos, representando cerca de 5% do conteúdo protéico total dessas células (Klebanoff, 2005). Esta enzima possui atividade catalítica fundamental no combate aos microrganismos invasores. Por produzir grandes quantidades de produtos oxidantes e altamente reativos, sua liberação a partir dos grânulos intracelulares para o exterior da célula é muito nociva aos tecidos (Haegens *et al.*, 2008). A dosagem da enzima MPO em pulmão representa uma medida indireta do recrutamento de neutrófilos para este órgão.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam a ocorrência de resposta inflamatória neutrofílica e lesão tecidual no pulmão dos animais, em conseqüência da indução de sepse, pois a atividade de MPO dos animais submetidos à CLP foi superior à encontrada no grupo *sham*.

As diferenças entre as escalas observadas entre os resultados de MPO podem ser explicadas pelo fato deste ensaio não possuir uma curva padrão.

Pequenas variações no tempo de incubação, bem como as variações intrínsecas do modelo de CLP podem contribuir para as diferenças entre as leituras. Devido a isso, em cada ensaio todos os controles são processados juntos, sendo essa uma forma de controlar as variações do método. Isso nos garante confiabilidade nos resultados.

Existem trabalhos mostrando que a angiotensina II exerce efeitos pró-inflamatórios em leucócitos, células endoteliais e células do músculo liso vascular (Pueyo *et al.*, 2000; Ruiz-Ortega *et al.*, 2000; Zahradka *et al.*, 2002). Alguns estudos clínicos com diversas condições cardiovasculares mostraram que o bloqueio do sistema renina-angiotensina é capaz de reduzir a inflamação e o estresse oxidativo (Graninger *et al.*, 2004; Schieffer *et al.*, 2004; Rosei *et al.*, 2005). Estas razões ajudam a justificar parte dos efeitos benéficos de fármacos que reduzem a ação da angiotensina II em doenças com caráter inflamatório como a aterosclerose (Dol *et al.*, 2001; Dandona *et al.*, 2007; Egido e Ruiz-Ortega, 2007).

A enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA-2) é homóloga da ECA e funciona como um regulador negativo do sistema renina-angiotensina por inativar a angiotensina II (Donoghue *et al.*, 2000; Tipnis *et al.*, 2000). Imai e colaboradores (2005) mostraram que condições patológicas que causam dano agudo pulmonar resultam na redução da expressão da ECA-2 e isto está associado a um aumento dos níveis de angiotensina II com conseqüente piora do dano pulmonar. Esses mesmos pesquisadores relataram que os receptores AT1 e AT2 exercem funções opostas no controle da severidade do dano pulmonar agudo, sendo que a ação da angiotensina II nos receptores AT1 favorece o dano pulmonar.

De acordo com os resultados do nosso estudo, a menor dose de losartan mostrou ser suficiente para alcançar o efeito antiinflamatório máximo. Esse efeito foi mais pronunciado na análise feita no tempo de 6 horas, onde os animais tratados não diferiram do grupo *sham*. A administração precoce de um antagonista dos receptores AT1 foi importante para reduzir o processo inflamatório em animais sépticos. Assim como os demais parâmetros avaliados, o processo inflamatório na sepse ocorre de maneira muito rápida.

Visando investigar se o efeito antiinflamatório observado com losartan estava relacionado com um envolvimento direto da angiotensina II, decidimos administrar um inibidor da enzima conversora de angiotensina, enalapril, e verificar se ocorria reprodutibilidade dos resultados. A análise no tempo de 6 horas mostrou que os resultados obtidos com enalapril foram muito semelhantes àqueles obtidos

com losartan. Apesar da ECA não possuir um mecanismo de ação muito seletivo, esses dados sugerem que nossos resultados estão relacionados à angiotensina II.

A ausência de diferença entre o grupo CLP e o *sham* observada no tempo de 24 horas para o tratamento com enalapril pode ser justificada pelo grande número de variáveis que envolvem o modelo de CLP (Buras *et al.*, 2005). Além disso, nestes animais a remoção dos neutrófilos que migraram para o pulmão pode ter iniciado precocemente. Os mecanismos para explicar essa redução do recrutamento de neutrófilos para o pulmão ainda são pouco compreendidos. Arndt e colaboradores (2006) observaram que o pré-tratamento de camundongos com enalapril reduzia o recrutamento de neutrófilos para o pulmão após a administração de LPS. Isso não ocorria com a administração de hidralazina. Portanto, este efeito parece estar relacionado ao aumento de bradicinina e a redução de angiotensina II, ambos atuando através de mecanismos distintos. Segundo os autores, o aumento de bradicinina promove redução do fator quimiotático IL-8. Ao usar losartan eles também observaram redução do recrutamento, e sugerem que isso se deve a redução dos níveis do inibidor do ativador de plasminogênio-1 (PAI-1), o qual foi recentemente demonstrado desempenhar importante papel regulador no recrutamento de neutrófilos para o pulmão em modelo de inflamação pulmonar aguda induzida pelo LPS.

Em contrapartida, existem trabalhos descrevendo que o antagonismo dos receptores B2 reduz o recrutamento de neutrófilos para o pulmão em modelos de isquemia-reperfusão e de sepse (Ridings *et al.*, 1995; Souza *et al.*, 2003).

O bloqueio do sistema renina-angiotensina é potencialmente maior com o uso de bloqueadores dos receptores de angiotensina do que com a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA), porque, aproximadamente 40% da angiotensina II é formada por vias diferentes da ECA (por exemplo, a via das quimases) em humanos (Hollenberg *et al.*, 1998; Petrie *et al.*, 2001). Além disso, o uso de antagonistas AT1 pode ser mais vantajoso por potencializar ações anti-inflamatórias através dos receptores AT2 (Siragy, 2000). Recentemente entrou na prática clínica um fármaco inibidor direto da renina, o aliskiren, para tratamento da hipertensão. Este fármaco tem a capacidade de bloquear o sistema renina-angiotensina de maneira mais completa que os demais fármacos disponíveis há mais tempo no mercado (Pool, 2007; Jensen *et al.*, 2008).

A melhora da hiporreatividade observada com a menor dose de losartan parece estar relacionada com a melhora inflamatória encontrada para essa dose.

A presença de leucopenia ou leucocitose é um sintoma característico da sepse (Bone *et al.*, 1992). Em nosso estudo os animais apresentaram uma redução do número de leucócitos circulantes, indicando novamente características da instalação do quadro de sepse. A não alteração do número de leucócitos observada com a menor dose de losartan provavelmente está relacionada ao efeito antiinflamatório presenciado com esta dose. O mesmo seria esperado para a maior. Nossos resultados nos levam a supor que o aumento da MPO observado nos animais CLP pode ter relação com a leucopenia observada, pois, o número de leucócitos está reduzido porque os mesmos estão migrando para o pulmão. A menor dose de losartan por reduzir a MPO, conseqüentemente evitou a leucopenia.

Embora o losartan tenha reduzido a resposta inflamatória dos animais sépticos, a capacidade do hospedeiro de combater a infecção não foi afetada, uma vez que o tratamento não interferiu na quantidade de bactérias encontrada neste estudo. Este fato é muito relevante por mostrar que é possível dissociar ações da angiotensina no sistema cardiovascular e no sistema de defesa.

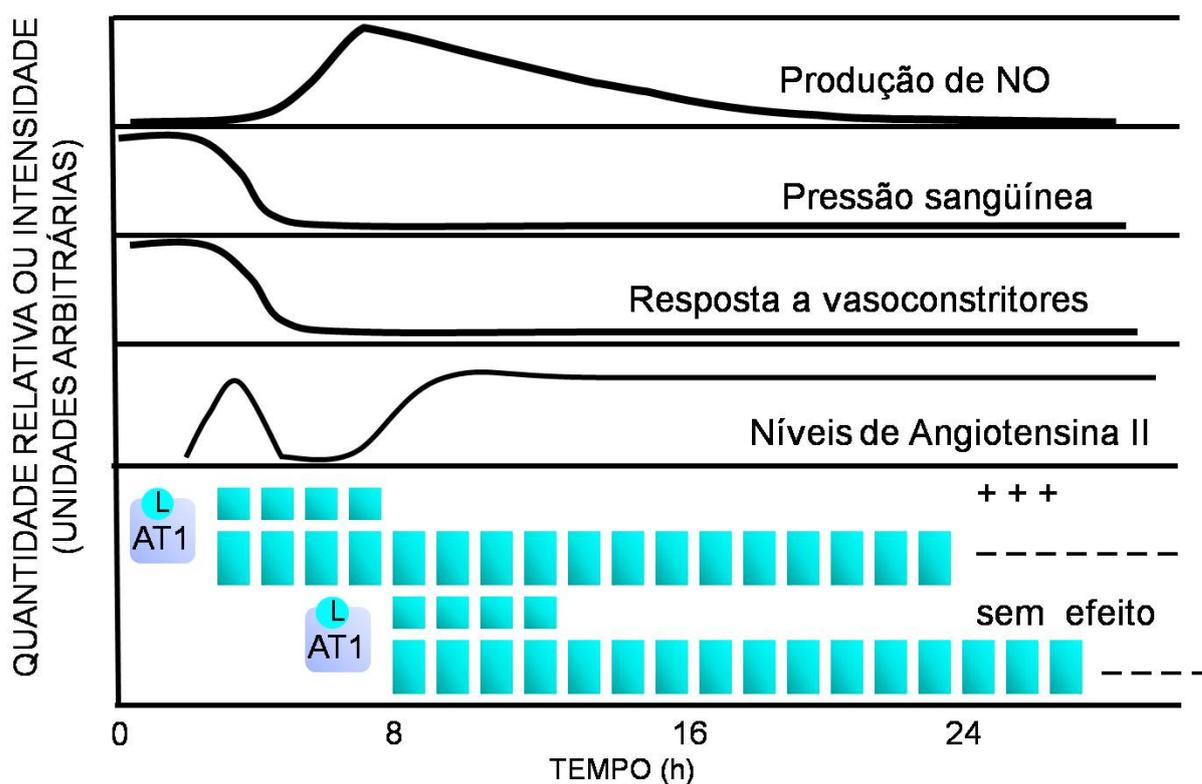
O principal objetivo da terapia durante a sepse é garantir a sobrevivência do paciente. Laesser *et al.* (2004) reportaram que o pré-tratamento de porcos com candesartan, antes da indução da endotoxemia com LPS foi capaz de aumentar o tempo de sobrevivência dos animais. Porém, quando o tratamento se iniciava durante a manifestação da endotoxemia, a taxa de mortalidade aumentava.

Embora em análises isoladas, como na hiporreatividade e na inflamação, o uso de losartan mostrou interferir de maneira positiva nestes parâmetros, durante a avaliação da sobrevivência dos animais tratados não observamos nenhuma alteração. Isto pode estar relacionado ao fato de termos feito uma única administração do fármaco e associado a isso, nenhuma outra intervenção medicamentosa foi feita. O crescimento excessivo de bactérias somado a progressão do processo inflamatório contribui para a mortalidade dos animais.

Como foi observado nos resultados obtidos com a menor dose de losartan, embora os animais estejam hipotensos eles não estão mais hiporreativos, ou seja, respondem a terapia vasoconstritora. Portanto, a realização do experimento para avaliar a sobrevivência dos animais seria enriquecido se, além do losartan

fizéssemos uso de agentes vasopressores, o que inclusive tornaria o experimento mais próximo da realidade clínica.

De maneira resumida, e de acordo com o esquema 6, podemos dizer que durante a sepse há um aumento da produção de NO, que leva a uma redução da pressão sanguínea e perda da capacidade de responder a agentes vasoconstritores. Nossos resultados sugerem que haja uma liberação de angiotensina II logo no início da sepse, a qual parece ter efeitos deletérios em momentos mais tardios. Isso ficou claro quando administramos losartan em baixa dose precocemente. Esse tratamento bloqueou a ação dessa angiotensina II liberada inicialmente. Por outro lado, a liberação de angiotensina II parece ser muito importante durante a sepse, pois quando tratamos os animais com a dose de 15 mg/kg de losartan, a qual promove um bloqueio intenso dos receptores AT1, observamos um agravamento do quadro. A administração de baixas doses em momentos mais tardios não é capaz de evitar os efeitos da angiotensina II liberada inicialmente.



Esquema 6. Resumo dos eventos que ocorrem durante um quadro de sepse.

Dessa maneira, nossos resultados sugerem que um aprofundamento das pesquisas em relação ao envolvimento do sistema renina-angiotensina na patologia

da sepse pode fornecer importantes ferramentas que auxiliarão na compreensão e no tratamento desta enfermidade. Um maior conhecimento deste assunto poderá fornecer alternativas mais eficazes para o tratamento desta patologia, reduzindo assim o tempo de recuperação dos pacientes sépticos e sua estadia nas UTI's e conseqüentemente os custos gerados por esta doença.

6. CONCLUSÕES

Os resultados aqui apresentados sugerem que:

- O bloqueio precoce com a dose de 0,25 mg/kg de losartan (antagonista dos receptores AT1) melhora a reatividade vascular dos animais sépticos, sem interferir na pressão arterial média;

- O uso precoce da dose de 0,25 mg/kg de enalapril (inibidor da enzima conversora de angiotensina) melhora a reatividade vascular dos animais sépticos, sem interferir na pressão arterial média;

- Independente do tempo de tratamento, a administração de losartan não interfere ou compromete ainda mais a função renal dos animais sépticos;

- O uso precoce de uma dose alta de losartan (15 mg/kg) diminui a hiperglicemia de animais sépticos;

- O uso de losartan e enalapril melhora parâmetros associados à resposta inflamatória em animais sépticos.

- Interferências na funcionalidade da angiotensina II em momentos específicos do quadro séptico podem ser ferramentas interessantes a serem exploradas para a melhoria das possibilidades terapêuticas da sepse.

7. 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.
- Akasu, M.; Urata, H.; Kinoshita, A.; Sasaguri, M.; Ideishi, M.; Arakawa, K. Differences in tissue angiotensin II-forming pathways by species and organs *in vitro*. **Hypertension**, 32: 514-520, 1998.
- Alderton, W.K.; Cooper, C.E.; Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem. J.**, 357: 593-615, 2001.
- Andrade, J.L.S.; Júnior; David, C.M.; Hatum, R.; Souza, P.C.S.P.; Japiassú, A.; Pinheiro, C.T.S.; Friedman, G.; Silva, O.B; Dias, M.D.; Koterba, E.; Dias, F.S.; Piras, C. Grupo de Estudo de Sepse do Fundo AMIB; Luiz, R.R. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **RBTI**, 18(1): 9-17, 2006.
- 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.
- Ardailou, R. Angiotensin II receptors. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 10 (11): S30-S39, 1999.
- Arndt, P.G.; Young, S.K.; Poch, K.R.; Nick, J.A.; Falk, S.; Schrier, R.W.; Worthen, G.S. Systemic inhibition of the angiotensin-converting enzyme limits lipopolisaccharide-induced lung neutrophil recruitment through both bradykinin and angiotensin II-regulated pathways. **The J. Immun.** 177: 7233-7241, 2006.
- Atlas, S.A. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. **J. Manag. Care Pharm.**, 13: 9-20, 2007.
- Bader, M.; Ganten, D. Update on tissue renin-angiotensin systems. **J. Mol. Med.**, 86 (6): 615-621, 2008.
- Beishuizen, A.; Vermes, I.; Haanen, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. **Adv. Clin. Chem.**, 33: 55-131, 1998.
- Beldent, V.; Michaud, A.; Bonnefoy, C.; Chauvet, M.T.; Corvol, P. Cell surface localization of proteolysis of human endothelial angiotensin I converting enzyme. Effect of the amino-terminal domain in the solubilization process. **J. Biol. Chem.**, 270: 28962-28969, 1995.
- Benjamin, 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.
- Boffa, J.J.; Arendshort, W.J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 16: 117-124, 2005.

- Bone, R.C.; Balk, R.A.; Cerra, F.R.; 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.
- Bucher, M.; Ittner, K.P.; Hobbhahn, J.; Taeger, K.; Kurtz, A. Downregulation of angiotensin II type 1 receptors during sepsis. **Hypertension**. 38: 177-182, 2001.
- Bucher, M.; Kees, F.; Taeger, K.; Kurtz, A. Cytokines down-regulate alpha1-adrenergic receptor expression during endotoxemia. **Crit. Care Med.** 31 (2): 566-571, 2003.
- Buras, J.A.; Holzmann, A.; Sitkovsky, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat. Rev. Drug Disc.**, 4(10): 854-865, 2005.
- Brooks, H.F.; Osabutey, C.K.; Moss, R.F.; Andrews, P.L.R.; Davies, D.C. Cecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. **Metab. Brain. Dis.**, 22: 353-373, 2007.
- Campbell, D.J.; Kladis, A.; Skinner, S.L.; Whitworth, J.A. Characterization of angiotensin peptides in plasma of anephric man. **J. Hypertens.**, 9: 265-274, 1991.
- Ceravolo, G.S.; Fernandes, L.; Munhoz, C.D.; Fernandes, D.C.; Tostes, R.C.A.; Laurindo, F.R.M.; Scavone, C.; Fortes, Z.B.; Carvalho, M.H.C. Angiotensin II chronic infusion induces B1 receptor expression in aorta of rats. **Hypertension**. 50(4): 756-761, 2007.
- Cervenka, L.; Wang, C.T.; Navar, L.G. Effects of acute AT₁ receptor blockade by candesartan on arterial pressure and renal functions in rats. **Am. J. Physiol Renal Physiol.**, 274: 940-945, 1998.
- Dandona, P.; Dhindsa, S.; Ghanim, H.; Chaudhuri, A. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. **J. Human Hyperten.**, 21: 20-27, 2007.
- Danser, A.H.J.; Sassen, L.M.A.; Admiraal, P.J.J.; Derkx, F.H.M.; Verdouw, P.D.; Schalekamp, M.A.D.H. Regional production of angiotensins I and II: contribution of vascular kidney-derived rennin. **J. Hypertens.**, 9: S234-S235, 1991.
- Danser, A.H.J.; Van Kats, J.P.; Admiral, P.J.J.; Derkx, F.H.M.; Lamers, J.M.J.; Verdouw, P.D.; Saxena, P.R.; Schalekamp, M.A.D.H. Cardiac rennin and angiotensins. Uptake from plasma versus *in situ* synthesis. **Hyperten.**, 24: 37-48, 1994.
- Da Silva-Santos J.E.; Assreuy, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion:

- involvement of potassium channels. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 290(1): 380-387, 1999.
- Da 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(1): 70-6, 2002.
- De Ciuceis, C.; Amiri, F.; Brassard, P.; Endemann, D.H.; Touyz, R.M.; Schiffrin, E.L. Reduced vascular remodeling, endothelial dysfunction, and oxidative stress in resistance arteries of angiotensin II-infused macrophage colony-stimulating factor-deficient mice: evidence for a role in inflammation in angiotensin-induced vascular injury. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 25: 2106-2113, 2005.
- Dielis, A.W.; Smid, M.; Spronk, H.M.; Houben, A.J.; Hamulyak, K.; Kroon, A.A.; Ten-Cate, H.; Del, P.W. Changes in fibrinolytic activity after angiotensin II receptor blockade in therapy-resistant hypertensive patients. **J. Thromb. Haemost.** 5: 1509-1515, 2007.
- Dol, F.; Martin, G.; Staels, B.; Mares, A.M.; Cazaubon, C.; Nisato, D.; Bidouard, J.P.; Janiak, P.; Schaeffer, P.; Herbert, J.M. Angiotensin AT1 receptor antagonist irbesartan decreases lesion size, chemokine expression, and macrophage accumulation in apolipoprotein E-deficient mice. **J. Cardiovas. Pharmacol.**, 38: 395-405, 2001.
- Donoghue, M.; Hsieh, F.; Baronas, E.; Godbout, K.; Gosselin, M.; Stagliano, N.; Donovan, M.; Woolf, B.; Robison, K.; Jeyaseelan, R.; Breitbart, R.E.; Acton, S. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ. Res.**, 87: E1-E9, 2000.
- Dzau, V.J. Vascular renin-angiotensin system and vascular protection. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 22(5):S1-S9, 1993.
- Dzau, V.J.; Sasamura, H.; Hein, L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and pharmacological implications. **J. Hypertens.**, 11: S13-S18, 1993.
- Egido, J.; Ruiz-Ortega, M. Anti-inflammatory actions of quinalapril. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, 21: 211-220, 2007.
- 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.
- Fernandes, D.; da Silva-Santos, J.E.; Duma, D.; Villela, C.G.; Barja-Fidalgo, C.; Assreuy, J. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Mol. Pharmacol.** 69(3): 983-990, 2006.
- Fernandes, D.; de Sordi, R.; Pacheco, L.K.; Nardi, G.M.; Heckert, B.T.; Villela, C.G.; Lobo, A.R.; Barja-Fidalgo, C.; Assreuy, J. Late but not early inhibition of soluble

- guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 328 (3): 991-999, 2009.
- Fleming, I.; Kohlstedt, K.; Busse, R. New faces to the rennin-angiotensin system. **Physiology**, 20: 91-95, 2005.
- Gohlke, P.; Pees, C.; Unger, T. AT2 receptor stimulation increases aortic cyclic GMP in SHRSP by a kinin-dependent mechanism. **Hypertension**. 31: 349-355, 1998.
- Goodman, L.S.; Gilman, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 9 ed.: McGraw-Hill, pp. 609-628, 2001.
- 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: 264-273, 1990.
- Graninger, M.; Reiter, R.; Drucker, C.; Minar, E.; Jilma, B. Angiotensin receptor blockade decreases markers of vascular inflammation. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 44: 335-339, 2004.
- Grzesk, G.; Szadujkis-Szadurski. Physiological antagonism of angiotensin II and lipopolysaccharides in early endotoxemia: pharmacometric analysis. **Pol. J. Pharmacol.** 55: 753-762, 2003.
- Haegens, A.; Vernooy, J.H.; Heeringa, P.; Mossman, B.T.; Wouters, E.F. Myeloperoxidase modulates lung epithelial responses to pro-inflammatory agents. **Eur. Resp. J.** 31(2): 252-60, 2008.
- Hagiwara, S.; Iwasaka, H.; Matumoto, S.; Hidaka, S.; Noguchi, T. Effects of an angiotensin-converting enzyme inhibitor on the inflammatory response in *in vivo* and *in vitro* models. **Crit. Care Med.**, 37(2): 1-8, 2009.
- Hall, J.E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Mol. Biotechnol.**, 24 (1): 27-39, 2003.
- Hauser, B.; Bracht, H.; Matejovic, M.; Radermacher, P.; Venkatesh, B. Nitric Oxide Synthase Inhibition in Sepsis? Lessons Learned from Large-Animal Studies. **Anesth. Analg.**, 101: 488-98, 2005.
- Heuer, J.G.; Bailey, D.L.; Sharma, G.R.; Zhang, T.; Ding, C.; Ford, A.; Stephens, E.J.; Holmes, K.C.; Grubbs, R.L.; Fynboe, K.A.; Chen, Y.F.; Jakubowski, J.A. Cecal ligation and puncture with total parenteral nutrition: a clinically relevant model of the metabolic, hormonal, and inflammatory dysfunction associated with critical illness. **J. Surg. Res.**, 121: 178-186, 2004.
- Hollenberg, N.K.; Fischer, N.D.L.; Price, D.A. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the rennin system. **Hypertension**, 32: 387-392, 1998.

- 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.
- Horiuchi, M.; Akishita, M.; Dzau, V.J. Recent progress in angiotensin II type 2 receptor research in the cardiovascular system. **Hypertension**, 33: 613-621, 1999.
- Hubbard, W.J.; Choudhry, M.; Schwacha, M.G.; Kerby, J.D.; Rue L.W; Chaudry, I.H. Cecal ligation and puncture. **Shock**, 24 (S1): 52-57, 2005.
- Ichiki, T.; Labosky, P.A.; Shiota, C.; Okuyama, S.; Imagawa, Y.; Fogo, A. Effects on blood pressure and exploratory behaviour of mice lacking angiotensin II type-2 receptor. **Nature**. 377: 748-750, 1995.
- Ilieva, I.; Ohgami, K.; Jin, X.H.; Suzuki, Y.; Shiratori, K.; Yoshida, K.; Kase, S.; Ohmo, S. Captopril suppresses inflammation in endotoxin-induced uveitis in rats. **Exper. Eye Res.**, 83: 651-657, 2006.
- Imai, Y.; Kuba, K.; Rao, S.; Huan, Y.; Guo, F.; Guan, B. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. **Nature**, 436: 112-116, 2005.
- Inagami, T.; Eguchi, S.; Numaguchi, K.; Motley, E.D.; Tang, H.; Matsumoto, T.; Yamakawa, T. Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. **J. Am. Soc. Nephrol.**, 10: S57-S61, 1999.
- Jackson, E.K.; Branch, R.A.; Margolius, H.S.; Oates, J.A. Physiological functions of the renal prostaglandin, renin, and kallikrein systems. In: *The Kidney: Physiology and Pathophysiology*. (Seldin, D.W.; Giebisch, G.H. eds.) New York, Raven Press, Ltda, pp. 613-644, 1985.
- Jean-Baptiste, E. Cellular mechanisms in sepsis. **Int. Care Med.**, 22(2): 63-72, 2007.
- Jensen, C.; Herold, P.; Brunner, H.R. Aliskiren: the first rennin inhibitor for clinical treatment. **Drug Discov.**, 7: 399-410, 2008.
- Julou-Schaeffer, G.; Gray, G.A.; Fleming, I.; Schott, C.; Parratt, J.R.; Stoclet, J.C. Loss of vascular responsiveness induced by lipopolysaccharide involves L-arginine pathways. **Am. J. Physiol.**, 259: H1038-H1043, 1990.
- Klebanoff, S.J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J. Leuk. Biol.**, 77(5): 598-625, 2005.
- Kumar, R.; Singh, V.P.; Baker, K. The intracellular rennin-angiotensin system: implications in cardiovascular remodeling. **Curr. Opin. Nephrol. Hyperten.**, 17: 168-173, 2008.

- Laesser, M.; Oj, Y.; Ewert, S.; Fandriks, L.; Aneman, A. The angiotensin II receptor blocker candesartan improves survival and mesenteric perfusion in an acute porcine endotoxin model. **Acta Anaesthesiol. Scan.** 48: 198-204, 2004.
- Lindner, V.; Collins, T. Expression of NF- κ B and I κ B- α by aortic endothelium in an arterial injury model. **Am. J. Pathol.**, 148 (2): 427-438, 1996.
- Machado, L.J.C.; Marubayashi, U.; Reis, A.M.; Coimbra, C.C. The hyperglycemia induced by angiotensin II in rats is mediated by AT1 receptors. **Braz. J. Med. Biolog. Res.**, 31: 1349-1352, 1998.
- Maitra, S.R.; Wojnar, M.M.; Lang, C.H. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. **Shock**, 13:379–385, 2000.
- Marchesi, C.; Paradis, P.; Schiffrin, E.L. Role of the rennin-angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in Pharmacol. Sci.**, 29 (7): 367-374, 2008.
- Miyazaki, M.; Takai, S. Tissue angiotensin II generating system by angiotensin-converting enzyme and chymase. **J. Pharmacol. Sci.**, 100: 391-397, 2006.
- Nagai, N.; Oike, Y.; Noda, K.; Urano, T.; et al. Suppression of ocular inflammation in endotoxin-induced uveitis by blocking the angiotensin II type 1 receptor. **Invest. Ophthalm. & Vis. Sci.**, 46(8): 2925-2931, 2005.
- Nava, E.; Palmer, R.M.; Moncada, S. The role of nitric oxide in endotoxic shock: effects of NG-monomethyl-L-arginine. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, 20: S132-S134, 1991.
- 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.R.; Simons, R.L.; Peitzman, A.B. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Ann. Surg.**, 214(5): 621-626, 1991.
- Opal, S.M. The host response to endotoxin, antilipopolsaccharide strategies, and the management of severe sepsis. **Int. J. Med. Microbiol.**, 297(5): 365-77, 2007.
- Orinska, Z.; Maurer, M.; Mirghomizadeh, F.; Bulanova, E.; Metz, M.; Nashkevich, N.; Schiemann, F.; Schulmistrat, J.; Budagian, V.; Giron-Michel, J.; Brandt, E.; Paus, R.; Bulfone-Paus, S. IL-15 constrains mast cell-dependent antibacterial defenses by suppressing chymase activities. **Nature Med.**, 13(8): 927-934, 2007.
- Parker, S.J.; Watkins, P.E. Experimental models of gram-negative sepsis. **Br. J. Surg.**, 88(1): 22-30, 2001.
- Parratt, J.R. Pathophysiology of myocardial ischemia: importance of platelet-vessel wall interactions. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, 2(1): 35-40, 1988.

- 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.
- Parrillo, J.E. Pathogenetic mechanism of septic shock. **N. Engl. J. Med.**, 328: 1471-1478, 1993.
- Peach M. Renin–angiotensin system: biochemistry and mechanism of action. **Physiol. Rev.**, 57: 313–70, 1977.
- Petrie, M.C.; Padmanabhan, N.; McDonald, J.E.; Hillier, C.; Connell, J.M.; McMurray, J.J. Angiotensin converting enzyme (ACE) and non-ACE dependent angiotensin II generation in resistance arteries from patients with heart failure and coronary heart disease. **J. Am. Coll. Cardiol.**, 37(4): 1056-1061, 2001.
- Phillips, M.I.; Speakman, E.A.; Kimura, B. Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. **Regul. Pept.**, 43: 1-20, 1993.
- Poll, T.V.D.; Opal, S.M. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infect. Dis.**, 8: 32-43, 2008.
- Pool, J.L. Direct rennin inhibition: focus on aliskiren. **J. Manag. Care Pharm.**, 13(8): S21-S33, 2007.
- Pueyo, M.E.; Gonzalez, W.; Nicoletti, A.; Savoie, F.; Arnal, J.F.; Michel, J.B. Angiotensin II stimulates endothelial vascular cell adhesion molecule-1 via nuclear factor kappa B activation induced by intracellular oxidative stress. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.** 20: 645–651, 2000.
- Rangel-Frausto, M.S.; Pittet, D.; Costigan, M.; Hwang, T.; Davis, C.S.; Wenzel, R.P. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS). A prospective study. **J. Am. Med. Assoc.**, 273: 117-123, 1995.
- Rangel-Frausto, M.S. Sepsis: still going strong. **Arch. Med. Res.**, 36: 672-681, 2005.
- Rao, R.H. Pressor doses of angiotensinII increase hepatic glucose output and decrease insulin sensitivity in rats. **J. Endocrinol.**, 148: 311-318, 1996.
- 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.
- Revelly, J.P.; Tappy, L.; Martinez, A.; Bollmann, M.; Cayeux, M.C. Berger, M.M.; Chiólero, R.L. Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock. **Crit. Care Med.**, 33(10): 2235-2240, 2005.
- Ridings, P.C.; Blocher, C.R.; Fischer, B.J.; Fowler, A.A.; Sugerman, H.J. Beneficial effects of bradykinin antagonist in a model of gram-negative sepsis. **J. Trauma.** 39: 81-88, 1995.

- Rosei, E.A.; Rizzoni, D.; Muiesan, M.L.; Sleiman, I.; Salvetti, M.; Monteduro, C. Effects of candesartan cilexetil and enalapril on inflammatory markers of atherosclerosis in hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Hypertens.** 23: 435-444, 2005.
- Ruiz-Ortega, M.; Lorenzo, O.; Ruperez, M.; Konig, S.; Witting, B.; Egido, J. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappa B through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanism. **Circ. Res.** 86: 1266-1272, 2000.
- Rusavy, Z.; Sramek, V.; Lacigova, S.; Novak, I.; Tesinsky, P.; MacDonald, I.A. Influence of insulin on glucose metabolism and energy expenditure in septic patients. **Critical Care**, 8(4): R213-220, 2004.
- Schieffer, B.; Bunte, C.; Witte, J.; Hoepfer, K.; Boger, R.H.; Schwedhelm, E. Comparative effects of AT1-antagonism and angiotensin-converting enzyme inhibition on markers of inflammation and platelet aggregation in patients with coronary artery disease. **J. Am. Coll. Cardiol.** 44: 362-368, 2004.
- Schiffrin, E.L.; Touyz, R.M. Inflammation and vascular hypertrophy induced by angiotensin II: role of NADPH oxidase-derived reactive oxygen species independently of blood pressure elevation? **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, 23: 707-709, 2003.
- Schmidt-Nielsen, K. **Fisiologia animal – adaptação e meio ambiente**. 5ª edição. Santos Livraria Editora. São Paulo, 1996.
- Schmidt, C.; Kurt, B.; Höcherl, K.; Bucher, M. Inhibition of NF-kappaB activity prevents downregulation of alpha1-adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis. **Shock**. 2008.
- Schrier, R.W.; Wang, W. Acute renal failure in sepsis. **New Engl. J. Med.**, 351 (2): 159-169, 2004.
- Schulman, I.H.; Raij, L. The angiotensin II type 2 receptor: what is its clinical significance? **Curr. Hypertens. Rep.**, 10 (3): 188-93, 2008.
- Schwobel, J.; Fischer, T.; Lanz, B.; Mohaupt, M. Angiotensin II receptors subtypes determine induced NO production in rat glomerular mesangial cells. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, 279: F1092-F1100, 2000.
- Sherwood, E.R. Mechanism of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, 18: 385-405, 2004.
- Sica, D.A.; Gehr, T.W.B.; Ghosh, S. Clinical pharmacokinetics of losartan. **Clin. Pharmacokinet.** 44(8): 797-814, 2005.
- Silva, E.; Pedro, M. de A.; Sogayar, A.C.; Mohovic, T.; Silva, C.L.; Janiszewski, M.; Cal, R.G.; de Sousa, E.F.; Abe, T.P.; de Andrade, J.; et al. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). **Crit. Care**, 8(4): R251-60, 2004.

- Siragy, H.M. The role of the AT₂ receptor in hypertension. **Am. J. Hypertens.** 13: 62S-67S, 2000.
- Souza, D.G.; Pinho, V.; Pesquero, J.L.; Lomez, E.S.; Poole, S.; Juliano, L.; Correa, A.; Castro, Jr. M.S.A.; Teixeira, M.M. Role of the bradykinin B₂ receptor for the local and systemic inflammatory response that follows severe reperfusion injury. **Br. J. Pharmacol.** 139: 129-139, 2003.
- Szabo, C.; Mitchell, J.A.; Thiermermann, 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.
- Tani, K.; Ogushi, F.; Kido, H.; Kawano, T.; Kunori, Y.; Kamimura, T.; Cui, P.; Sone, S. Chymase is a potent chemoattractant for human monocytes and neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**, 67: 585-589, 2000.
- Tarpey, S.B.; Bennett, T.; Randall, M.D. Gardiner, S.M. Differential effects of endotoxaemia on pressor and vasoconstrictor actions of angiotensin II and arginine vasopressin in conscious rats. **Brit. J. Pharmacol.**, 123: 1367-1374, 1998.
- Thijs, L.G.; Groeneveld, A.B.J.; Hack, C.E. Multiple organ failure in septic shock. In: Rietschel, E.T.; Wagner, H. **Pathophysiology of septic shock. Current Topics in Microbiology and Immunology**, 216: 209-237. Berlin: Springer Verlag, 1996.
- Thijs, A.; Thijs, L.G. Pathogenesis of renal failure in sepsis. **Kidney Int Suppl.**, 66: 34-37, 1998.
- Tipnis, S.R.; Hooper, N.M.; Hyde, R.; Karran, E.; Christie, G.; Turner, A.J. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J. Biol. Chem.** 275: 33238-33243, 2000.
- Vincent, J.L. Cardiovascular alterations in septic shock. **Antimicrob. Chemother.**, 41: 9-15, 1998.
- 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.
- Vincent, J.L.; Sakr, Y.; Sprung, C.L.; Ranieri, V.M.; Reinhart, K.; Gerlach, H.; Moreno, R.; Carlet, J.; Le Gall, J.R.; Payen, D. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. **Crit. Care Med.**, 34(2): 344-53, 2006.
- Wei, C.C.; Meng, Q.C.; Palmer, R.; Hageman, G.R.; Durand, J.; Bradley, W.E.; Farrell, D.M.; Hankes, G.H.; Oparil, S.; Dell'Italia, L.J. Evidence for angiotensin-converting enzyme- and chymase-mediated angiotensin II formation in the interstitial fluid space of the dog heart in vivo. **Circulation**, 99: 2583-2589, 1999.

- Weigand, M.A.; Hörner, C.; Bardenheuer, H.J.; Bouchon, A. The systemic inflammatory response syndrome. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol.** 18(3): 455-75, 2004.
- Wheeler, A.P.; Bernard, G.R. Treating patients with severe sepsis. **N. Engl. J. Med.**, 340: 207-214, 1999.
- Wichterman, K.A.; Baue, A.E.; Chaudry, I.H. Sepsis and septic shock- a review of laboratory models and a proposal. **J. Surg. Res.**, 29: 189–201, 1980.
- Widdop, R.E.; Jones, E.S.; Hannan, R.E.; Gaspari, T.A. Angiotensin AT₂ receptors: cardiovascular hope or hype? **British J. Pharmacol.**, 140: 809-824, 2003.
- Yao, S.; Feng, D.; Wu, Q.; Li, K.; Wang, L. Losartan attenuates ventilator-induced lung injury. **J. Surg. Res.**, 145 (1): 25-32, 2007.
- Zahradka, P.; Werner, J.P.; Buhay, S.; Litchie, B.; Helwer, G.; Thomas, S. NF-kappa B activation is essential for angiotensin II-dependent proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. **J. Mol. Cell Cardiol.** 34: 1609–1621, 2002.