

Universidade Federal de Santa Catarina  
Centro de Ciências Biológicas  
Departamento de Farmacologia

Karla Lorena Guarido

*Avaliação, in vivo e in vitro, da reatividade vascular renal à vasopressina em ratos endotoxêmicos: importância da via Rho-A/Rho-quinase.*

Florianópolis

2012



Karla Lorena Guarido

*Avaliação, in vivo e in vitro*, da reatividade vascular renal à vasopressina em ratos endotoxêmicos: importância da via Rho-A/Rho-quinase.

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. José Eduardo da Silva Santos

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

G915a Guarido, Karla Lorena  
Avaliação, in vivo e in vitro, da reatividade vascular  
renal à vasopressina em ratos endotoxêmicos [dissertação] :  
importância da via Rho-A/Rho-quinase / Karla Lorena Guarido ;  
orientador, José Eduardo da Silva Santos. - Florianópolis, SC,  
2012.  
135 p.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Vasopressina. 3. Sepse. I. Santos,  
José Eduardo da Silva. II. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.  
Título.

CDU 615





*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Edmur e Sueli. Não sou nada sem  
eles, pois eles são parte de mim.*



*“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito. Não somos quem deveríamos ser; não somos quem iremos ser; mas, graças a Deus, não somos o que éramos!”*

MARTIN LUTHER KING





Primeiramente a Deus que me fortaleceu e me capacitou, mesmo quando eu não soube senti-lo, sei que Ele estava comigo.

Aos meus pais, Edmur e Sueli. Eles são meus bens mais preciosos e tudo o que tenho e sou devo a eles que acreditaram em mim e foram minha fortaleza. Amo vocês incondicionalmente.

À minha irmã e aos meus sobrinhos, Fer, Gabi e Matheus. Eles me fazem crescer a cada dia e fazem de mim uma pessoa melhor.

Ao meu querido orientador, José Eduardo, que se dedicou tanto quanto eu para a concretização deste trabalho. Obrigada pelas conversas e conselhos, e pelas broncas também, é claro.

À Adriane Madeira que foi a primeira pessoa que me acolheu em Florianópolis e se tornou mais do que uma amiga, uma irmã.

Ao Prof. Dr. Jamil Assreuy, à Prof. Dra. Rita Tostes e ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae por comporem a banca examinadora e pelas valiosas correções e conselhos.

À Karina e à Maria Cláudia, pela convivência diária, pelas conversas e por suportarem minhas chatices.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia Cardiovascular e aos amigos do Departamento de Farmacologia da UFSC.

Ao Pedro e ao Murilo que estão sempre dispostos a ajudar.

Aos meus amigos de Londrina que me apoiaram neste meu sonho e que sempre me acolheram quando eu retornava para casa.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro;

E aos animais, que deram a vida pela realização deste trabalho.

... Obrigada!



GUARIDO, K. L. Avaliação, *in vivo* e *in vitro*, da reatividade vascular renal à vasopressina em ratos endotoxêmicos: importância da via Rho-A/Rho-quinase. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Sepse é uma infecção local, acompanhada de uma resposta inflamatória sistêmica e vinculada à elevada incidência e taxa de mortalidade. Apesar desta patologia ser alvo de inúmeras pesquisas, poucos estudos avaliam o papel do leito vascular renal nessa condição. Neste trabalho, avaliamos as alterações vasculares renais e o envolvimento da via Rho-A/Rho-quinase em ratos endotoxêmicos. Ratos machos Wistar, com peso de 230-280 g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, receberam, por via intraperitoneal, PBS (1 ml/kg) ou lipopolissacarídeo (LPS) (10 mg/kg), 6 ou 24 horas antes dos protocolos experimentais. Os animais tratados com LPS apresentaram pressão arterial média (PAM) reduzida, aumento da frequência cardíaca, hiporresponsividade à fenilefrina (Phe), além do aumento na concentração plasmática de óxido nítrico (NO), uréia e creatinina, como descrito por vários autores, demonstrando reprodutibilidade do modelo. Na análise da reatividade vascular renal, houve hiporreatividade à Phe nos rins dos animais do grupo LPS 24 horas. No entanto, a administração de vasopressina (AVP) no leito renal dos animais tratados com LPS revelou uma hiper-reatividade a este agente, além de uma maior sensibilidade à inibição da enzima Rho-quinase (ROCK) no grupo LPS 6 horas. A análise, *in vivo*, da pressão arterial e fluxo microvascular renal também revelou hiper-reatividade à AVP nos animais endotoxêmicos. Além disto, a administração de 0,1 mg/kg de Y-27632 (i.v.), um inibidor da enzima ROCK, diminuiu o efeito da AVP na PAM dos animais do grupo controle. O mesmo não foi observado nos grupos endotoxêmicos. A administração de Y-27632 não influenciou a redução do fluxo sanguíneo renal em resposta às menores doses de AVP, mas nos grupos LPS 6 e 24 h, reduziu significativamente a diminuição causada pela maior dose de AVP utilizada (30 nmol/kg). A análise de parâmetros cardíacos revelou que não há correlação entre as alterações cardíacas induzidas pelo LPS e a hiper-reatividade à vasopressina. As expressões de proteínas não se mostraram alteradas nos grupos que receberam

LPS quando comparadas ao PBS. Por fim, constatamos que houve diminuição na produção inicial de urina que se reestabelece 24 horas após o choque endotoxêmico, o que pode estar relacionando a variações nos níveis de AVP plasmático durante a endotoxemia. Podemos concluir que o leito renal não apresenta hiporreatividade à AVP durante a endotoxemia, o que pode contribuir para a eficácia desse mediador em elevar a pressão arterial no choque séptico. Alterações na funcionalidade da via Rho-A/Rho-quinase parecem contribuir de forma diferenciada para os efeitos vasculares da AVP durante a sepse. Novos estudos precisam ser desenvolvidos a fim de esclarecer o potencial benéfico ou deletério dessa inter-relação.

**Palavras-chave:** sepse, falência renal, vasopressina, ROCK.





GUARIDO, K. L. Evaluation, *in vivo* and *in vitro*, of the renal vascular reactivity to vasopressin in endotoxemic rats: importance of the Rho-A/Rho-kinase pathway. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Sepsis is a local infection, followed by systemic inflammatory response and linked to high incidence and mortality rate. Although very studied, few researches have investigated the role of renal vascular bed in this condition. In this work, we evaluated the changes in the functionality of the renal vascular bed, and the involvement of the Rho-A/Rho-kinase pathway, in endotoxemic rats. Male Wistar rats (230-280 g) received by intraperitoneal route either saline (1 ml/kg) or LPS (10 mg/kg), 6 or 24 hours before the experimental protocols. The endotoxemic animals showed reduced mean arterial pressure (MAP), increased heart rate, hyporesponsiveness to phenylephrine and high levels of plasmatic nitrate+nitrite, urea and creatinine levels, as described by several studies. In the analysis of renal vascular function, kidneys from LPS 24 group were hyporeactivity to Phe. However, the renal bed of the animals treated with LPS showed a hyperreactivity to vasopressin (AVP). An increased sensitivity to inhibition of Rho-kinase (ROCK) was found in the groups LPS 6 hours. The effects of AVP on systemic blood pressure and renal blood flow (both measured *in vivo*) were also enhanced in endotoxemic rats. In addition, the administration of 0.1 mg/kg of Y-27632 (*i.v.*), a ROCK inhibitor, decreased the effect of AVP on MAP of control animals., but not in endotoxemic groups. The administration of Y-27632 partially avoided the reduction in renal blood flow elicited by lower doses of AVP in all experimental groups, but had no effect against the highest dose of AVP (30 nmol/kg) in groups LPS 6 and 24 h. Analysis of cardiac parameters showed no correlation between the LPS-induced cardiac changes and the increased effects of AVP. The protein expression of components of the Rho-A/Rho-kinase pathway had not been significantly impaired in kidneys from LPS-treated animals, when compared to control samples. Finally, we did observe a decreased urinary output in the first 6 h after LPS administration, that was restored between 18-24 hours of endotoxemia. Changes in diuresis may be related to variations in plasma levels of AVP during endotoxemia. We concluded that the

renal bed does not present hyporeactivity to AVP in endotoxemic shock, what can contribute to the effectiveness of this mediator in raising blood pressure in septic shock. Differential changes in the functionality of the Rho-A/Rho-kinase pathway may contribute to the increased vascular effects of AVP in renal vessels during a septic state. Further studies need to be carried out to provide more evidence regarding the beneficial or deleterious importance of this relationship.

**Key-words:** sepsis, kidney failure, vasopressin, ROCK.





a.C.	Antes de Cristo
Ach	Acetilcolina
ADH	Hormônio anti-diurético
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AVP	Vasopressina
BCA	Ácido bicinchoninico 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina
BSA	Albumina sérica bovina
CASP	Peritonite induzida pela introdução de cateter no cólon ascendente (do inglês <i>Colon ascendens stent peritonitis</i> )
cGK	Quinases dependentes de GMPc
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
DAG	Diacilglicerol
FC	Frequência cardíaca
FRA	Falência renal aguda
FRDE	Fator relaxante derivado do endotélio
GAP	Proteínas ativadoras de GTPases (do inglês GTPase activating proteins)
GDI	Inibidoras de dissociação do GDP (do inglês guanine nucleotide dissociation inhibitors)
GDP	Difosfato de guanosina
GEF	Fator de troca do nucleotídeo guanina (do inglês guanine nucleotide exchange factors)
GMPc	Monofosfato de guanosina cíclico
GPCR	Receptor acoplado à proteína G (do inglês <i>G protein-coupled receptor</i> )
GTP	Trifosfato de guanosina
i.m.	Intramuscular
i.p.	Intraperitoneal
i.v.	Intravenoso
IL-10	Interleucina 10
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
INF $\gamma$	Interferon $\gamma$
IP3	Trifosfato de inositol
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA	Ácido lipoteicóico
MLC	Cadeia leve de miosina (do inglês <i>Myosin light chain</i> )

MLCK	Quinase de cadeia leve de miosina (do inglês <i>Myosin light chain kinase</i> )
MLCP	Fosfatase de cadeia leve de miosina (do inglês <i>Myosin light chain phosphatase</i> )
MYPT-1	Unidade regulatória da fosfatase de cadeia leve de miosina (do inglês <i>myosin-phosphatase target unit</i> )
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio
NF $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
NLR	Receptor do tipo NOD (do inglês <i>NOD-like receptor</i> )
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrão de reconhecimento associado à patógenos (do inglês <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBS	Salina tamponada com fosfato
Phe	Fenilefrina
PI3K-c2 $\alpha$	Quinase de trifosfatoinositídeo classe II isoforma $\alpha$ (do inglês <i>phosphoinositide 3-kinase (PI3K) class II <math>\alpha</math>-isoform</i> )
PLC $\beta$	Fosfolipase C $\beta$
PPVR	Pressão de perfusão vascular renal
PRR	Receptores de reconhecimento padrão (do inglês <i>Pattern recognition receptors</i> )
PSS	Salina tamponada com fosfato
RBD	Domínio de ligação da Rho (do inglês <i>Rho-binding domain</i> )
rpm	Rotações por minuto
SEM	Erro padrão da média
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês <i>Systemic inflammatory response syndrome</i> )
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TLR	Receptores do tipo toll (do inglês <i>Toll like receptors</i> )
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral $\alpha$





1. Ativação da enzima Rho-quinase mediada pela proteína Rho-A.....	49
2. Mecanismo contrátil celular desencadeado pela ativação da MLCK e inibição da MLCP, participação da via Rho-A/Rho-quinase.....	51
3. Efeitos da administração de LPS em ratos.....	72
4. Aumento da pressão de perfusão vascular renal (PPVR) em rim isolado e perfundido.....	74
5. Aumento da PPVR basal em animais endotoxêmicos.....	75
6. Alterações na reatividade vascular renal em resposta à fenilefrina e à vasopressina em preparações obtidas de animais tratados com PBS ou LPS, 6 ou 24 horas antes do experimento.....	77
7. Aumento da pressão de perfusão vascular renal de ratos endotoxêmicos após perfusão de fenilefrina ou vasopressina.....	79
8. Redução da pressão de perfusão vascular renal (PPVR) causada pelo composto Y-27632.....	81
9. Influência da inibição da ROCK na resposta contrátil da vasopressina na PPVR de rins isolados de ratos endotoxêmicos.....	83
10. Hiporresponsividade e inibição da vasoconstrição à AVP mediada por Y-27632 em aortas de ratos endotoxêmicos.....	85
11. Aumento do relaxamento induzido pelo composto Y-27632 em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos.....	86
12. Alteração na responsividade à vasopressina na PAM de ratos endotoxêmicos.....	88

13. Alteração na resposta pressórica à vasopressina na presença do composto Y-27632 em ratos endotoxêmicos.....	90
14. Alteração área sob a curva da resposta pressora à vasopressina causada pelo composto Y-27632 em ratos endotoxêmicos.....	92
15. Avaliação do fluxo vascular renal (FVR) basal em animais endotoxêmicos.....	94
16. Redução do fluxo microvascular do córtex renal frente à administração de vasopressina em animais anestesiados e previamente tratados com PBS ou LPS.....	96
17. Influência da inibição da Rho-quinase pelo composto Y-27632 na redução do fluxo microvascular do córtex renal em animais tratados com PBS ou LPS.....	97
18. Parâmetros mensurados a partir do cateter intraventricular em ratos tratados com PBS ou LPS.....	99
19. Representações de imunoeletoforese e suas correspondentes análises de densitometria (em relação à actina) da proteína Rho-A, ROCK I, ROCK II e MYPT-1 na medula renal de ratos endotoxêmicos.....	102
20. Representações de imunoeletoforese e suas correspondentes análises de densitometria (em relação à actina) da proteína Rho-A, ROCK I e ROCK II no córtex renal de ratos endotoxêmicos.....	103
21. Análise da ingestão de água e de parâmetros de urina em animais controle e endotoxêmicos.....	104
22. Avaliação da diurese de animais controle e endotoxêmicos.....	105





1. Definições.....	40
--------------------	----



1. Efeito da administração de LPS sobre indicadores de função renal.....	71
2. Efeito da inibição da ROCK na CCR da vasopressina....	84
3. Efeito hipotensor da acetilcolina na PAM em ratos anestesiados tratados com PBS ou LPS.....	87
4. Efeito hipertensor da vasopressina (AVP) na ausência e presença do composto Y-27632 na pressão arterial média (PAM) de ratos controle e endotoxêmicos.....	91
5. Efeito da vasopressina (AVP) na ausência e presença do composto Y-27632 na pressão arterial média (PAM) de ratos controle e endotoxêmicos.....	93
6. Redução do fluxo microvascular do córtex renal causadas pela administração de fenilefrina e acetilcolina em ratos controle e endotoxêmicos.....	95
7. Parâmetros de função cardíaca alterados significativamente pela vasopressina em animais controle e endotoxêmicos, avaliados <i>in situ</i> por cateter intracardíaco...	100



<b>1. Introdução</b>	
1.1 Sistema Cardiovascular.....	38
1.2 Sepse.....	39
1.3 Via Rho-A/Rho-quinase.....	47
1.4 Sistema renal e sepse.....	52
<b>2. Objetivos</b>	
2.1 Objetivos gerais.....	56
2.2 Objetivos específicos.....	56
<b>3. Material e métodos</b>	
3.1 Animais.....	58
3.2 Grupos experimentais.....	58
3.3 Dosagem de NOx, creatinina e uréia.....	58
3.4 Preparações isoladas: rim e anéis de aorta.....	59
3.5 Pressão arterial e fluxo sanguíneo cortical renal em ratos anestesiados.....	62
3.6 Cateter intraventricular.....	64
3.7 Western blot.....	66
3.8 Avaliação da diurese.....	68
3.9 Análise estatística.....	68
3.10 Drogas.....	68
<b>4. Resultados</b>	
4.1 Padronização do modelo de endotoxemia induzida por LPS.....	70
4.2 Reatividade do rim isolado e perfundido à fenilefrina...	73
4.3 Efeitos da fenilefrina e vasopressina na PPVR no modelo de rim isolado e perfundido.....	75
4.4 Efeito da inibição da enzima Rho-quinase na reatividade do leito vascular renal.....	80

4.5 Influência da inibição da via Rho-A/Rho-quinase na reatividade vascular à vasopressina em rins perfundidos obtidos de ratos endotoxêmicos.....	82
4.6 Diminuição da resposta contrátil ao KCl e à fenilefrina em aorta de animais com endotoxemia induzida por LPS..	84
4.7 Diminuição da contratilidade induzida por vasopressina pela inibição da enzima Rho-quinase em anéis de aorta.....	84
4.8 Aumento do efeito causado pelo inibidor da enzima ROCK, Y-27632, em animais endotoxêmicos.....	86
4.9 Aumento do efeito da vasopressina na pressão arterial média de ratos endotoxêmicos.....	87
4.10 Avaliação <i>in vivo</i> da influência da inibição da Rho-quinase sobre a vasoconstrição induzida pela vasopressina.....	89
4.11 Avaliação do fluxo microvascular do córtex renal <i>in vivo</i> de ratos endotoxêmicos.....	94
4.12 Avaliação <i>in vivo</i> de parâmetros intracardíacos em ratos controle e endotoxêmicos.....	98
4.13 Western blot.....	101
4.14 Avaliação da diurese.....	104
<b>5. Discussão</b> .....	<b>107</b>
<b>6. Conclusão</b> .....	<b>119</b>
<b>7. Referências bibliográficas</b> .....	<b>123</b>





## 1.1 Sistema Cardiovascular

As primeiras evidências *in vivo* da existência de um sistema fechado no qual o sangue circulava por canais através da força propulsora de uma bomba, o coração, surgiram com o médico inglês William Harvey, no século XVII. No entanto, desde Aristóteles, século IV a.C., há relatos acerca da distribuição sanguínea corpórea (Martins e Silva, 2009a). Foi a partir destes estudos e posteriormente da descoberta dos capilares sanguíneos pelo médico italiano Marcello Malpighi (Martins e Silva, 2009b), que outros pesquisadores aprimoraram técnicas e chegaram no que hoje conhecemos sobre o sistema cardiovascular.

O sistema cardiovascular é compreendido por dois órgãos fundamentais para a manutenção da homeostase corpórea, coração e vasos, e tem por definição sua função principal, ou seja, é o circuito que fornece suprimento sanguíneo e nutriente a todos os órgãos que compõem os diversos organismos. Além desta, este sistema é responsável por diversas outras funções como controle da pressão arterial, do fluxo sanguíneo e do débito cardíaco (Guyton, 1991), de modo que alterações em algum destes fatores acarreta mudanças proporcionais nos demais e no organismo como um todo. O controle do tônus vascular e conseqüentemente da distribuição de fluxo sanguíneo para os tecidos é especialmente importante para a manutenção do estado hemodinâmico fisiológico, sendo realizado de maneira local e humoral, de curto e de longo prazo. O controle agudo ocorre por mudanças rápidas na pressão arterial, no qual os barorreceptores e a liberação humoral de substâncias com ação vascular, através da estimulação do sistema nervoso autônomo, têm envolvimento primordial. Já o controle a longo prazo é um processo lento que pode levar dias, semanas ou até mesmo meses para ser estabelecido. No entanto, este é um controle mais criterioso e que envolve diretamente aspectos volêmicos no qual a participação dos rins, principalmente sob controle do hormônio anti-diurético (também chamado de vasopressina) e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), é fundamental (Guyton, 1991).

Neste contexto, diversas patologias têm sido associadas à interrupção do equilíbrio do sistema cardiovascular, como a hipertensão, a angina e a insuficiência cardíaca. Por outro lado, o desenvolvimento destas e de outras doenças pode culminar em alterações que comprometem o sistema cardiovascular, como é o caso da sepse.

## 1.2 Sepse

### *Definição e epidemiologia*

Desde que Schottmueller, em 1914, sugeriu que a liberação de agentes patogênicos na corrente sanguínea era responsável pela presença de sinais e sintomas sistêmicos, muitos estudos a respeito de doenças infecciosas e suas complicações vem sendo realizados. No entanto, esta vasta literatura, ao longo dos anos, encontrou dificuldades em unificar conceitos. Isto culminou, em 1991, na Conferência de Consenso convocada pela *American College of Chest Physicians* (ACCP) e pela *Society of Critical Care Medicine* (SCCM), na qual várias definições e diagnósticos a respeito de infecção e sepse foram padronizadas (ACCP e SCCM, 1992). Entretanto, durante a década que seguiu este acontecimento, outras definições foram inseridas no conceito generalizado de sepse, como por exemplo, a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês *systemic inflammatory response syndrome*), o que levou à realização de uma nova conferência em 2001, a qual priorizou a manutenção das definições já estabelecidas na década de 90 e o aprimoramento na listagem de sintomas e diagnóstico (Levy *et al.*, 2003). Segundo as conferências realizadas na década de 90 e em 2001, infecção é um processo patológico no qual microrganismos patogênicos invadem tecidos, fluidos ou cavidades corporais que são naturalmente estéreis; sepse é uma síndrome na qual a presença de um quadro infeccioso é acompanhada de uma resposta inflamatória sistêmica; sepse severa é uma complicação do quadro de sepse causada pela disfunção múltipla de órgãos; e choque séptico é um estado de falência circulatória aguda caracterizada por hipotensão, apesar do uso de terapia vasoconstritora e reposição de volume (Levy *et al.*, 2003). SIRS é uma resposta inflamatória sistêmica causada por uma condição infecciosa ou não infecciosa, que deve ser

avaliado a partir da presença de dois ou mais sintomas, conforme descrito no Quadro 1

### Quadro 1: Definições

#### Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS)

Dois ou mais dos sintomas a seguir:

- Temperatura > 38 °C ou < 36 °C
- Frequência cardíaca > 90 batimentos por minuto
- Frequência respiratória > 20 respirações por minuto
- Contagem de leucócitos > 12000/mm<sup>3</sup> ou < 4000/mm<sup>3</sup>

#### Sepse

Infecção acompanhada de SIRS (cultura positiva)

Em caso de cultura negativa:

- Edema significativo ou balanço de fluido positivo (20 ml/kg após 20 horas)
- Hiperglicemia em ausência de quadro diabético (glicose plasmática > 120 mg/dl)
- Marcadores inflamatórios: procalcitonina ou proteína C reativa, ambos > 2 DP além dos valores normais.
- Saturação venosa de O<sub>2</sub> (SVO<sub>2</sub>) > 70%
- Índice cardíaco > 3,5 L/min/M<sup>2,3</sup>

#### Sepse Severa

Sepse associada a disfunção de órgãos, hipoperfusão e hipotensão

- Hipóxia arterial
- Oligúria aguda (débito urinário < 0,5 mL/kg/h)
- Creatinina > 2 mg/dL
- Coagulação anormal (tempo de ativação parcial de tromboplastina > 1 minuto)
- Trombocitopenia (contagem de plaquetas < 100000)
- Hiperbilirrubinemia (bilirrubina plasmática total > 2 mg/dL)
- Hiperlactatemia (lactato > 2 mmol/L)
- Hipotensão arterial (pressão sistólica < 90 mm Hg, pressão arterial média < 70 mm Hg)

#### Choque Séptico

Hipotensão induzida pela sepse apesar de terapia com fluido acompanhada de hipoperfusão tecidual e suas complicações.

Fonte: Dellinger *et al.*, (2004).

Sendo a sepse um importante problema de saúde pública devido aos altos índices de morbidade e mortalidade decorrentes desta síndrome (Angus *et al.*, 2001), nos últimos anos tornou-se evidente a importância de estudos epidemiológicos a seu respeito, em decorrência da variedade de etiologias e da necessidade de um diagnóstico precoce. Um estudo realizado em 1995, com base na Conferência de Consenso (ACCP/SCCM, 1991), publicou um levantamento no qual 3708 pacientes admitidos em unidades de terapia Intensiva (UTIs) foram analisados. Destes, 68% apresentavam critérios para SIRS. Dentre os pacientes com SIRS, 26% desenvolveram sepse, 18% sepse severa e 4% choque séptico (Rangel-Frausto *et al.*, 1995). Angus *et al.* (2001) analisaram mais de 6 milhões de registros em 7 estados norte americanos, concluindo que ocorrem aproximadamente 751.000 casos de sepse severa anualmente, com custo de US\$ 22.100,00 por caso. Um estudo mais recente realizado na Europa reportou que 37,4% dos pacientes admitidos em unidade de terapia intensiva (UTI) durante o período avaliado apresentaram sepse, na admissão ou em algum outro momento da estadia nas UTIs (Vicent *et al.*, 2006).

Estes levantamentos demonstram que apesar da evolução da pesquisa médica sobre a sepse, sua incidência está aumentando progressivamente. Além do aumento da perspectiva de vida dos idosos e enfermos, o uso indiscriminado ou inadequado de tratamento antimicrobiano, o aumento no número de procedimentos invasivos e a crescente ocorrência de infecções hospitalares têm contribuído para este quadro (Blanco *et al.*, 2008).

Embora haja variações na incidência de sepse decorrentes principalmente da heterogeneidade do público alvo, os estudos têm demonstrado concordância na correlação da crescente severidade da doença com o aumento nas taxas de mortalidade (Salvo *et al.*, 1995; Lever & Mackenzie, 2007). Segundo Parrillo *et al.* (1990), a estimativa da taxa de mortalidade de pacientes sépticos é de 30%, podendo chegar a 50% quando associada ao quadro de choque. Dados recentes demonstraram que a sepse está entre as dez principais causas de morte em pacientes dos Estados Unidos (Heron, 2011).

No Brasil, a incidência e a taxa de mortalidade estão de acordo com os dados mundiais. Um estudo realizado em 2004 com 1393 pacientes admitidos diariamente nas UTIs avaliadas revelou que as incidências de sepse, sepse severa e choque séptico são de 61,4, 35,6 e 30 por 1000 pacientes, respectivamente; e as taxas de mortalidade de pacientes com SIRS, sepse, sepse severa e choque séptico são de 24,3, 34,7, 47,3 e 52,2%, respectivamente (Silva *et al.*, 2004). No entanto, a principal causa dos altos índices de mortalidade ainda não foi bem estabelecida. Um estudo de retrospectiva realizado por Vincent *et al.* (2011) identificou a causa da morte de 4459 pacientes diagnosticados com sepse severa. Os autores concluíram que 43,1% morreram de sepse associada a falência múltipla de órgãos, seguido de 28,6% associado à choque séptico refratário e 13% de falência respiratória. Dentre os sistemas mais acometidos, o cardiovascular, o renal, o hepático, o respiratório e o hematológico são os principais, sendo o hepático e o renal os que apresentam maiores taxas de risco sobre a mortalidade de pacientes nas UTIs (32,2 e 26,4%, respectivamente) (Umegaki *et al.*, 2011).

### *Fisiopatologia da sepse*

As principais causas da infecção que precede o quadro séptico são decorrentes de patógenos ou microrganismos potencialmente patogênicos. Aproximadamente 50% dos casos de sepse são causados por bactérias gram-negativas, atingindo uma taxa de 60% quando o quadro evolui para choque séptico (Rangel-Frausto, 2005). Além destes, bactérias gram-positivas (responsáveis por 5 a 10% dos casos), fungos, parasitas e vírus também podem levar à septicemia. Contudo, em um terço dos pacientes, o agente infeccioso não é identificado. Quanto aos sítios primários de infecção, o de maior incidência é o trato respiratório, sendo a pneumonia a infecção mais comum associada à sepse, seguido de infecção intra-abdominal e no trato urinário (Augus *et al.*, 2001).

O estado inicial de sepse é decorrente de uma sequência de processos celulares em resposta a uma agressão infecciosa. Os agentes infecciosos são reconhecidos pelo organismo do hospedeiro através de componentes de sua parede celular. Os

exemplos clássicos destes são o ácido lipoteicoico (LTA) e os peptidoglicanos presentes nas bactérias gram-positivas, ou o lipopolissacarídeo (LPS) encontrado na parede celular das bactérias gram-negativas (Sweet & Hume *apud* Benjamim, 2001). Essas moléculas são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). O primeiro reconhecimento do hospedeiro ocorre através do sistema imunológico inato. Neutrófilos e macrófagos locais são as células especializadas em reconhecer um agente infeccioso através de seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) (Robertson & Coopersmith, 2006). Dentre estes receptores de reconhecimento de patógenos, os receptores do tipo *Toll* (TLR) são os principais, estando presentes na superfície das células ou em seu interior. Outras proteínas como CD14 e receptores do tipo NOD (NLR do inglês, *NOD-like receptor*) também possuem papel fundamental no reconhecimento de patógenos.

Dentro da vasta literatura que descreve os receptores do tipo *Toll*, os subtipos que estão associados ao reconhecimento de LPS e componentes da parede de bactérias gram-positivas são o TLR4 e o TLR2, respectivamente (Netea *et al.*, 2003). A ativação destes receptores induz a expressão de genes, principalmente via fator de transcrição NF- $\kappa$ B (do inglês, *nuclear factor kappa B*), que resulta na liberação de inúmeros mediadores endógenos pró e anti-inflamatórios. Nesta fase inicial, o fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e a interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) são os mediadores mais abundantes, seguidos de IL-6, fator de ativação plaquetária (PAF), óxido nítrico oriundo da óxido nítrico sintase II, entre outros. Estas citocinas recrutam e ativam leucócitos, com o objetivo de controlar a infecção. Caso este quadro primário não seja contido, os produtos bacterianos e as citocinas presente na corrente sanguínea irão promover as reações sistêmicas encontradas no início da sepse (Benjamim, 2001). Apesar da correlação benéfica que existe entre a presença de um microrganismo e a resposta inflamatória do hospedeiro, estudos tem demonstrado que o aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias leva ao crescimento na taxa de mortalidade tanto em pacientes sépticos como em modelos experimentais, devido à inibição no recrutamento de neutrófilos (Tavares-Murta, Cunha

& Ferreira, 1998). Simultaneamente à liberação de agentes pró-inflamatórios, o hospedeiro também responde à infecção com produção e liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10 e INF- $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ). Estes mediadores têm papel fundamental em contrabalancear as ações dos agentes pró-inflamatórios, tanto inibindo sua síntese e liberação quanto antagonizando seus efeitos (Dinarello, 1997).

Um mediador importante, que merece destaque no desenvolvimento clínico da sepse, que tem sua produção iniciada nos primeiros instantes do quadro infeccioso e que se mantém ativo nos estágios mais avançados da sepse é o óxido nítrico (NO). Furchgott e Zawadzki, em 1980, propuseram a existência de um fator produzido por células endoteliais, responsável pelo relaxamento induzido por acetilcolina e que mais tarde ficou conhecido como fator relaxante derivado do endotélio (FRDE). Em 1987, foi demonstrado que este fator era o NO (Hutchinson, Palmer & Moncada, 1987). A partir disto, inúmeros trabalhos surgiram a respeito do NO, associando-o não somente a estados fisiológicos, mas também às patologias. Moncada, Palmer e Higgs (1989) descreveram que a síntese do NO ocorre a partir de uma molécula precursora, a L-arginina, e que este processo é mediado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), além de outros cofatores essenciais, como o NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato-hidrogênio) e o  $O_2$ . Três isoformas da NOS foram clonadas: a NOS I, também conhecida como nNOS (óxido nítrico sintase neuronal), a NOS III ou eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), duas enzimas constitutivas de uma grande variedade celular, e a NOS II, também conhecida como iNOS (óxido nítrico sintase induzida). A atividade da NOS I e da NOS III é constante, porém a quantidade de NO produzida é baixa, sendo ambas responsáveis por processos fisiológicos envolvendo o NO como neurotransmissão, peristaltismo e controle local da pressão arterial (Zhang, Dawson & Snyder, 1994). A atividade destas enzimas é dependente de cálcio do meio, tanto para ativar suas ações quanto para manutenção de sua atividade. Ao contrário, a NOS II mantém uma produção elevada de NO por longos períodos, mesmo na ausência de  $Ca^{2+}$  livre no meio intracelular. A NOS II é a principal responsável pela geração de NO durante a sepse, especialmente aumentada por conta da presença de lipopolissacarídeo bacteriano, a fim de

induzir a ativação desta isoforma em macrófagos e em neutrófilos e exterminar o agente causador da infecção (Stuehr *et al.*, 1991). No entanto, os altos níveis de NO produzidos por estas e outras células, como a endotelial, tornam-se tóxicos também para as células saudáveis do hospedeiro, sendo este o mecanismo pelo qual o NO pode ser prejudicial em processos inflamatórios e imunológicos (Flora Filho & Zilberstein, 2000).

O NO é um potente vasodilatador e este processo pelo qual causa vasodilatação se inicia nas células endoteliais, após um estímulo que ativa a enzima responsável pela sua produção, a NOS. Por ser um gás lipossolúvel, as membranas celulares oferecem pouca resistência à sua permeabilidade, tornando sua propagação um processo contínuo. Deste modo após ser sintetizado, o NO se difunde das células endoteliais para as células musculares lisas dos vasos, ativando a enzima ciclase de guanilil solúvel que eleva os níveis de monofosfato de guanosina cíclica (GMPc) no interior das células. Estas ativam uma série de proteínas quinases dependentes de GMPc, denominadas cGK, que promovem cascatas de sinalizações intracelulares. Dentre os principais alvos das cGK estão os canais iônicos de  $Ca^{2+}$  e a  $Ca^{2+}$ -ATPase sarcoplasmática, responsáveis pela diminuição dos níveis de cálcio intracelular (Lucas *et al.*, 2000), além de atuarem diretamente na ativação da fosfatase de cadeia leve de miosina (Surks *et al.*, 1999), promovendo o relaxamento celular.

Do ponto de vista hemodinâmico e cardiovascular, o paciente séptico pode apresentar duas fases durante o progresso da doença. A fase inicial é conhecida como hiperdinâmica e é caracterizada pela diminuição da resistência vascular periférica, acompanhada do aumento do débito cardíaco. Nesta fase, o coração trabalha mais para manter a pressão arterial. A fase tardia, denominada hipodinâmica, é associada à diminuição do débito cardíaco, aumento da resistência vascular periférica com diminuição do fluxo microvascular (Flynn, Mani & Mather, 2010). Estas alterações podem levar, de acordo com Levy & Deutschman (2004), ao desenvolvimento de cardiomiopatia séptica, que é caracterizada por dilatação biventricular, diminuição da fração de ejeção e hiporresponsividade à reposição volêmica, acompanhada de aumento na concentração plasmática de catecolaminas. Como consequência à

hipoperfusão tecidual, tem-se a disfunção múltipla de órgãos, que pode levar à morte do indivíduo.

### *Modelos experimentais de sepse*

Os modelos animais utilizados para reproduzir o desenvolvimento da sepse podem ser divididos em: administração de bactéria ou componentes microbianos exógenos, como o LPS, por via endovenosa, intraperitoneal ou nas vias aéreas, ou ainda agressão intestinal, no qual ceco ou cólon são manipulados (Doi *et al.*, 2009; Benjamim, 2001).

Todos os modelos mimetizam as características da sepse, com algumas limitações. O modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP) é o modelo animal mais usado para o estudo da progressão da sepse. Foi descrito pela primeira vez em 1980 por Wichtermann, Baue e Chaudry. O perfil do aparecimento das citocinas é considerado similar ao que ocorre na clínica (Remick *et al.*, 2000), além de evidências que demonstram as duas fases, hiper e hipodinâmica, funcionalmente caracterizadas. Contudo, ele não apresenta reprodutibilidade na disfunção múltipla de órgãos, como falência aguda de rins e pulmões (Doi *et al.*, 2009). Outro modelo de sepse polimicrobiana é a introdução de cateter no cólon ascendente (CASP, do inglês *colon ascendens stent peritonitis*). Neste modelo, semelhante ao que acontece no modelo de CLP, ocorre liberação gradativa do conteúdo intestinal para o peritônio, levando ao desenvolvimento de uma infecção local que pode evoluir para sepse (Benjamim, 2001).

A sepse causada por bactérias gram-negativas é mais comumente identificada e demonstra ser uma das mais importantes no processo de desenvolvimento de choque. O modelo de endotoxemia induzida pela injeção de LPS é prático, barato e de alta reprodutibilidade. No entanto, a evolução do quadro ocorre rapidamente, sendo o pico da produção de citocinas precoce e elevado, diferente do que se é observado em pacientes humanos (Remick *et al.*, 2000). Contudo, a administração de LPS induz uma resposta inflamatória sistêmica com produção elevada de citocinas como TNF $\alpha$  e IL-1. Além do mais, o ajuste da dose de LPS a ser injetada pode permitir o

desenvolvimento de estudos voltados a aspectos clínicos diferentes, que podem aparecer em indivíduos com sepse branda ou apenas em casos mais graves, assim como ocorre na clínica.

Deste modo, o modelo utilizando endotoxinas, como o LPS, tem se mostrado eficaz no estudo sobre esta patologia, além de sua facilidade e reprodutibilidade. Tais vantagens levaram a utilização do LPS como modelo de choque endotoxêmico para este trabalho.

### 1.3 Via Rho-A/Rho-quinase

#### *Rho-A e seu efetor, Rho-quinase*

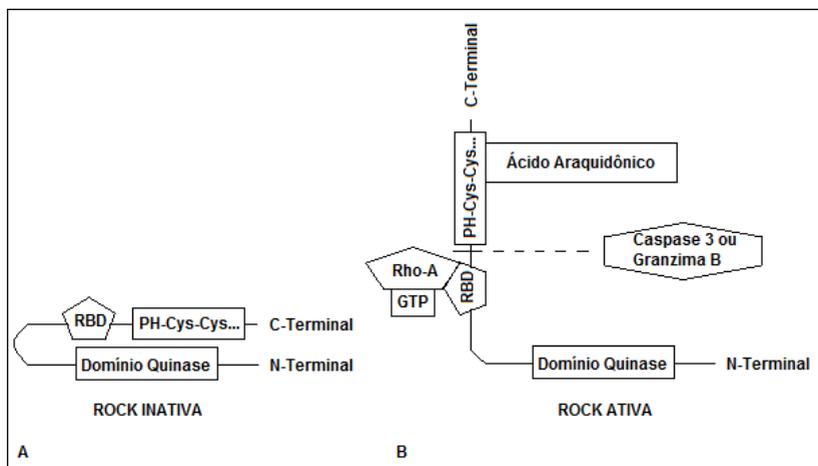
As primeiras proteínas da superfamília Ras foram identificadas em 1985 (Madaule & Axel, 1985). Atualmente mais de 100 membros já foram descritos, sendo elas uma das classes mais atuantes na regulação de comportamentos celulares (Etienne-Manneville & Hall, 2002). Esta família de pequenas GTPases tem sido alvo de muitos estudos devido tanto ao envolvimento nos processos fisiológicos do organismo, como a regulação do tônus muscular liso, migração e proliferação celular, como de sua participação em diversos processos patológicos, como na hipertensão, aterosclerose e disfunção erétil.

Uma classificação quanto à função destas proteínas foi proposta por Wennerberg, Rossman & Der (2005). Deste modo, seis subfamílias foram criadas: Ras, Ran, Rad, Rab, Arf/Sar1 e Rho, sendo esta última a mais envolvida nos processos regulatórios relacionados à contração celular. A subfamília Rho é dividida em cinco subgrupos: Rho-, Cdc42-, Rac-, Rnd-, e RhoBTB (BurrIDGE & Wennerberg, 2004). No início da década de 90, Hirata *et al.*, (1992) demonstraram o envolvimento da Rho na inibição da fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP, do inglês myosin light chain phosphatase), comprovando a importância desta proteína na manutenção da contração do músculo liso.

São conhecidas 3 isoformas da proteína Rho-: A, B e C, sendo a Rho-A a mais ubíqua e abundante no organismo de mamíferos (Narumiya, 1996). Estas pequenas proteínas tem a função de intermediar a transmissão do sinal entre os receptores acoplados às proteínas G e seus efetores, que podem ser tanto

enzimas como canais iônicos. Os principais alvos da Rho-A são as enzimas Rho-quinases, também conhecidas como ROCKs, que são serina/treonina quinases, com peso molecular de aproximadamente 160 kDa. Duas isoformas de ROCK já foram identificadas: ROCK I e ROCK II, sendo ambas expressas em tecidos de invertebrados e vertebrados. Apresentam 65% de homogeneidade de suas estruturas moleculares e, por isso, acreditava-se que ambas tinham funções semelhantes, assim como os mesmos alvos moleculares (Nakagawa *et al.*, 1996). No entanto, nos últimos anos, estudos têm elucidado as principais diferenças entre estas duas isoformas e suas consequentes funções (pare revisão ver Zhou, Gensch & Liao, 2011).

De acordo com sua estrutura molecular, as ROCKs são formadas por um domínio quinase, localizado na porção amino-terminal (N-terminal), seguido por uma região que contém o domínio de ligação da Rho (RBD, do inglês *Rho-binding domain*) e na região carboxi-terminal (C-terminal) um domínio rico em resíduos de cisteína (PH, do inglês *Pleckstrin-homology*) cuja função parece estar relacionada à localização da enzima na célula (Wirth, 2010). A conformação molecular das ROCKs faz delas proteínas auto-inibitórias, ou seja, a porção rica em resíduos de cisteínas está localizada próxima ao domínio quinase, impedindo a atuação destas enzimas na ausência de qualquer molécula responsável por desencadear seu efeito de quinase (Amano *et al.*, 1999). A ativação das ROCKs ocorre a partir da ligação da Rho-A ativada no domínio RBD, que resulta em uma alteração conformacional da enzima e consequente exposição do domínio quinase que irá exercer sua atividade (Ishizaki *et al.*, 1996). Além da Rho-A outras moléculas ativam as ROCKs, como o ácido aracdônico, que atua diretamente na porção C-terminal, e algumas enzimas relacionadas à apoptose, que clivam a porção C-terminal destas enzimas, como a caspase 3 para a ROCK I e a granzima B para ROCK II (Sebbagh *et al.*, 2001)(Figura 1).



**Figura 1: Ativação da enzima ROCK mediada pela Rho-A.** (A) Estrutura inativa da enzima na qual a porção C-Terminal inibe o domínio quinase. (B) Exposição do domínio quinase proporcionado pela ligação da Rho-A-GTP ou de moléculas como ác. araquidônico e enzimas da cascata de apoptose (Adaptada de Wirth, 2010).

### *Sinalização da via Rho-A/Rho-quinase na contração da musculatura lisa.*

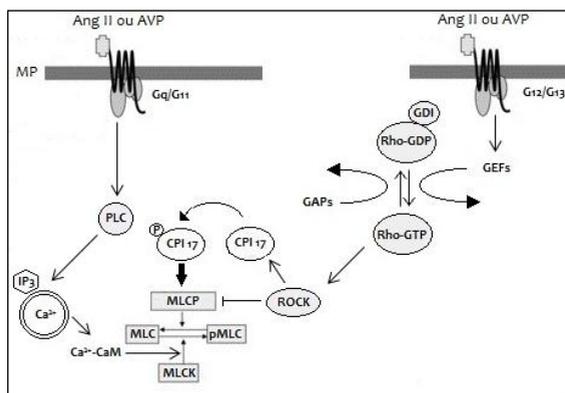
De maneira simplificada, o estado contrátil das células musculares lisas é dependente da fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC, do inglês *myosin light chain*) e o processo de relaxamento, de sua defosforilação. A ligação de um agonista com propriedade vasopressora, como a angiotensina II ou a vasopressina, a seus respectivos receptores acoplados à proteínas G (GPCR, do inglês *G protein-coupled receptor*) desencadeia a abertura de canais de  $\text{Ca}^{2+}$  e consequente aumento do seu influxo celular. Este mecanismo ocorre através de proteínas G do tipo  $\text{G}_q/\text{G}_{11}$ , responsáveis pela ativação de uma classe de enzimas denominadas fosfolipases  $\text{C}\beta$  ( $\text{PLC}\beta$ ) que clivam fosfolipídios de membrana em inositol (1,4,5) trifosfato ( $\text{IP}_3$ ) e diacilglicerol (DAG). As moléculas de  $\text{IP}_3$  atuam em receptores ionotrópicos específicos presentes na membrana do retículo sarcoplasmático, liberando  $\text{Ca}^{2+}$  do mesmo e aumentando a concentração do cálcio livre no meio intracelular. Este cálcio se liga à calmodulina, formando um complexo  $\text{Ca}^{2+}$ -

calmodulina que ativa a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK do inglês, *myosin light chain kinase*). Esta por sua vez, fosforila a MLC, que leva ao aumento da afinidade dos filamentos grossos de miosina pelos de actina e promove a contração celular (ver isto em Hong *et al.*, 2011).

Paralelamente ao processo acima descrito, algumas moléculas agonistas também são capazes de ativar uma outra classe de GPCR, que se acopla às proteínas G<sub>12</sub>/G<sub>13</sub> (Figura 2). Após a ligação do agonista, ocorre a modulação da atividade de três classes de proteínas regulatórias da Rho-A: o fator de troca do nucleotídeo guanina (GEFs), as proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) e os inibidores de dissociação do GDP (GDIs). Deste modo, a ligação de um agonista a seu receptor age aumentando a atividade das GEFs, responsáveis por promoverem a troca de uma molécula de GDP por uma de GTP ligada à Rho-A, e diminuindo a atividade das GAPs e GDIs, que aceleram a hidrólise do GTP ligado à Rho-A e inibem a dissociação do complexo GDP/Rho-A, respectivamente (para revisão ver Purtz, Lubomirov & Pfitzer, 2009). Este conjunto de mecanismos promove a translocação do complexo GDP/Rho-A, que é a forma inativa da proteína e que está localizada no citoplasma da célula, para a membrana celular em sua forma ativa, ou seja, com a Rho-A ligada a uma molécula de GTP. A Rho-A ativa fosforila a ROCK, ativando-a. Esta última atua na fosforilação da subunidade regulatória da fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP, do inglês *myosin light chain phosphatase*) denominada MYPT-1 (do inglês, *myosin-phosphatase target unit*), impedindo seu efeito sobre a contração. Outro alvo importante das ROCKs é a proteína fosfatase do tipo 1 inibitória (CPI-17), assim denominada por ter o peso molecular de 17 kDa. A CPI-17, quando fosforilada no sítio T-38 pela Rho-quinase, liga-se a subunidade fosfatase da MLCP, bloqueando sua função inibitória (Eto, Kitazawa & Brautigam, 2004).

Além dos GPCRs, trabalhos recentes têm demonstrado outros mecanismos de ativação da via Rho-A/Rho-quinase. Wang *et al.* (2006) demonstraram que o influxo de Ca<sup>2+</sup>, que ocorre após um potencial de ação, seguido de uma despolarização celular, também ativa a via da Rho-A/Rho-quinase através da PI3K-C2α (do inglês, *phosphoinositide 3-*

kinase (PI3K) class II  $\alpha$ -isoform). Estas evidências agregam informações importantes sobre o funcionamento desta via, e demonstram o quão importante é sua ação sobre a contratilidade celular.



**Figura 2: Mecanismo contrátil celular desencadeado pela ativação da MLCK e inibição da MLCP, participação da via Rho-A/Rho-quinase.** A ligação de um agonista ao seu receptor acoplado à proteína  $G_{q/11}$ , aumenta a  $[Ca^{2+}]$  e promove a ativação da quinase de cadeia leve de miosina (MLCK). Simultaneamente, a ativação de proteínas  $G_{12/13}$  ativa Rho-A e seu efector, Rho-quinase, que fosforila a fosfatase de cadeia leve de miosina (MLCP) e a proteína fosfatase do tipo 1 (CPI-17), mantendo a contração celular. (Fonte: a autora).

### *Rho-A/Rho-quinase na sepse*

Sabe-se que devido à disfunção endotelial promovida durante a sepse, alguns sistemas responsáveis pelo controle do tônus vascular se encontram alterados. A contribuição do excesso de NO produzido principalmente pela NOS II durante a septicemia, por exemplo, já está relativamente bem elucidada. No entanto, o tratamento de pacientes sépticos com inibidores das NOS não se mostrou eficiente, como seria esperado. Deste modo, acredita-se que outras vias contribuam de forma exponencial para o agravamento do quadro séptico.

Na década de 90, inúmeros estudos mostraram a participação da via Rho-A/Rho-quinase em processos patológicos. Um dos primeiros foi publicado por Uehata *et al.*

(1997), que demonstraram a habilidade da via da Rho-A/Rho-quinase em causar sensibilização ao cálcio e, conseqüentemente contribuir para o desenvolvimento da hipertensão. Além disto, outros trabalhos evidenciaram uma possível modulação do NO sobre a via da Rho-A/Rho-quinase. Em 2002, Chitale e Webb demonstraram que o efeito vasodilatador do NO, em aorta de ratos saudáveis é parcialmente mediado por inibição da via Rho-A/Rho-quinase. Sabendo desta interação, algumas evidências recentes a respeito da possível influência no excesso de NO produzido durante a sepse sobre a via do Rho-A/Rho-quinase têm sido reportadas. Da Silva-Santos *et al.* (2009) demonstraram que a atividade da via Rho-A/Rhoquinase em artéria mesentérica isolada de rato endotoxêmico pode estar comprometida por um mecanismo que envolve a via NO-guanilato ciclase.

Estes achados levantam vários questionamentos a respeito do possível envolvimento da via Rho-A/Rho-quinase na sepse e sua influência no acometimento de diversos órgãos nos estágios mais avançados desta patologia. No entanto, apesar dos últimos avanços na pesquisa relacionada aos mecanismos fisiopatológicos da sepse, poucos estudos têm abordado a importância da manutenção vascular e funcional dos rins durante o progresso desta patologia, e pouco se sabe sobre o possível envolvimento da via Rho-A/Rho-quinase neste contexto.

#### 1.4 Sistema renal e sepse

Os rins possuem papel fundamental no controle, de longo-prazo, da pressão arterial, através da ativação da via de secreção da aldosterona e pela reabsorção de água e eletrólitos, via hormônio antidiurético (ADH). Pacientes com patologias que comprometem este sistema apresentam altas taxas de morbidade e mortalidade. A falência renal aguda (FRA) é um quadro clínico associado a diminuição da taxa de filtração glomerular (Boffa & Arendshorst, 2005). Cerca de 30% dos pacientes admitidos em UTIs desenvolvem FRA, com taxa de mortalidade de aproximadamente 50% (Levy, Viscoli & Horwitz, 1996). Estes números são ainda mais alarmantes quando associados à sepse. A prevalência de FRA em pacientes com sepse severa ou choque séptico é de aproximadamente 43%

(Oppert *et al.*, 2008), com taxa de mortalidade que alcança 75% (Neveu *et al.*, 1996).

Vários estudos tem buscado compreender a causa real da FRA induzida pela sepse, já que esta é uma comorbidade comum em pacientes com septicemia. Boffa *et al.*, (2004) demonstraram que após injeção de LPS, camundongos apresentaram uma fase inicial de vasoconstrição renal, acompanhada da redução do fluxo sanguíneo renal e taxa de filtração glomerular. Estes achados contrastam com as características de hipotensão e vasodilatação sistêmicas que acompanham o quadro clínico de sepse e podem sugerir que o sistema renal apresenta um mecanismo independente de controle do tônus vascular.

Em 2005, Boffa e Arendshorst demonstraram que uma provável causa da falência renal induzida pela sepse é devido a manutenção da reatividade vascular renal a agentes vasoconstritores. Apesar da existência de muitos estudos sobre sepse, pouco se sabe sobre a manutenção do tônus renal e quais os mecanismos envolvidos nesta regulação independente. Cavarape *et al.* (2003) evidenciaram a importância da via da Rho-A/Rho-quinase no controle fisiológico do tônus vascular renal, assim como ocorre em outros leitos, frente a agentes vasoconstritores como angiotensina II, arginina-vasopressina e tromboxano AII. Frente a estes achados e a escassa literatura a respeito da manutenção do tônus vascular renal na sepse, levantou-se a hipótese de que o aumento na atividade da via Rho-A/Rho-quinase no leito vascular renal poderia contribuir para a manutenção da resposta à agentes vasopressores durante a sepse, e isto poderia resultar no comprometimento funcional dos rins, levando à falência deste órgão.





## 2.1 Objetivo geral

Investigar as alterações vasculares renais que ocorrem durante a endotoxemia em ratos e explorar a participação da via Rho-A/Rho-quinase neste processo.

## 2.2 Objetivos específicos

- × Padronizar o modelo de endotoxemia induzida pela administração de LPS;
- × Padronizar a metodologia de rim isolado e perfundido para estudo da reatividade vascular da microcirculação renal;
- × Avaliar o efeito vascular renal de distintas substâncias vasoativas em ratos endotoxêmicos;
- × Avaliar, *in vivo* e *in vitro*, os efeitos da vasopressina sobre o leito vascular renal, abordando a importância da ROCK na vasoconstrição induzida pela mesma;
- × Investigar o efeito da vasopressina e do composto Y-27632 em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos;
- × Avaliar, *in situ*, a função cardíaca e o efeito da administração de vasopressina no coração de ratos endotoxêmicos;
- × Investigar a expressão de proteínas da via Rho-A/Rho-quinase, assim como da MYPT-1, em amostras de rim e aorta de ratos endotoxêmicos;
- × Avaliar a diurese e alguns parâmetros bioquímicos da urina de ratos tratados com LPS, durante as 24 horas que se seguem pós-tratamento.



### 3.1 Animais

Para a realização deste estudo, foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) Wistar, com três meses de idade e peso de 230-280 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia, com luminosidade e temperatura controladas (ciclo 12 horas claro/escuro;  $22 \pm 2^\circ$  C, respectivamente) e tiveram livre acesso à água e ração até a realização dos experimentos. Todo o projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº PP00463).

### 3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos, de maneira aleatória, em três grupos experimentais. O grupo controle foi tratado com PBS estéril (solução salina tamponada com fosfato, composto por NaCl 137, KCl 2,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,5,  $\text{NaHPO}_4$  8,1 em mM, com pH de 7,4), administrada pela via intraperitoneal (i.p., 1 ml/kg), 6 ou 24 horas antes dos procedimentos. Os dois outros grupos receberam, via i.p., lipopolissacarídeo (LPS) de membrana de *Escherichia coli* dissolvido em PBS, na dose de 10 mg/kg. Estes dois grupos endotoxêmicos diferiram no tempo de análise, sendo um grupo analisado 6 e outro 24 horas após a injeção de LPS.

### 3.3 Dosagem de NOx, creatinina e uréia

Para as dosagens plasmáticas de NOx, creatinina e uréia, foram coletadas amostras de sangue de aproximadamente 2 ml. As amostras foram centrifugadas à 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo.

O método de Griess foi utilizado para mensurar de forma indireta os níveis de óxido nítrico plasmático. Os procedimentos adotados estão bem detalhados em Bryan e Grisham (2007). Em resumo, as amostras plasmáticas (200  $\mu$ l) foram diluídas e desproteinizadas com sulfato de zinco (1:10), incubadas por 1 hora a 0 °C e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos a 4° C. Simultaneamente, curvas padrão de nitrito e nitrato foram preparadas (0 a 150  $\mu$ M). As curvas padrão e 200  $\mu$ L das

amostras (em duplicata) foram acondicionadas em placas de 96 poços para conversão do nitrato em nitrito, na qual foram incubadas a 37 °C por 3 horas na presença de *Escherichia coli* expressando a nitrato redutase juntamente com os reagentes de conversão. As amostras foram centrifugadas novamente por 10 minutos a 3000 rpm e 100 µl do sobrenadante foi transferido para outra placa de 96 poços, no qual 100 µl do reagente de Griess foi adicionado e, após 10 minutos, foi realizada a leitura a 543 nm.

A concentração de creatinina no plasma foi dosada através de kit K016 (Quibasa/Bioclin), cujo princípio é a colorimetria. Utilizou-se 20 µl de amostra para um volume final de 200 µl em uma placa de 96 poços. A leitura foi feita em um leitor de placas (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). Os dados foram calculados através de um fator de calibração e expressos em mg/dl de creatinina.

A concentração plasmática de uréia foi dosada através do kit K047 (Quibasa/Bioclin), por meio de uma metodologia enzimática colorimétrica. Utilizou-se 1 µl de amostra para um volume final de 200 µl em uma placa de 96 poços. A leitura foi realizada à 630 nm em um leitor de placas (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). Os dados foram calculados através de um fator de calibração e expressos em mg/dl de uréia.

### 3.4 Preparações isoladas: rim e anéis de aorta

#### Procedimento cirúrgico

Para isolar o rim dos animais utilizou-se a técnica descrita por Tölle *et al.* (2010), porém com algumas modificações. Brevemente, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente), via i.p.. Todos os animais foram tratados com heparina (300 UI/kg i.p.) após o anestésico. Após a obtenção do estado de anestesia geral, os animais foram posicionados em decúbito dorsal e uma laparotomia foi realizada para exposição dos órgãos abdominais. Após ligadura do ureter esquerdo, a aorta abdominal foi isolada da veia e de seus tecidos conectivos e uma ligadura foi posicionada abaixo da artéria renal direita e acima da artéria

renal esquerda. Um cateter acoplado a uma bomba de perfusão foi inserido na porção distal da aorta abdominal. O fluxo sanguíneo foi interrompido por meio da ligadura e a bomba de perfusão foi acionada de modo que uma solução salina fisiológica (PSS) (em mM, NaCl 131,3, KCl 4,7,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,18,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1,17,  $\text{NaHCO}_3$  14,9, Dextrose 5,5,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  1,6, EDTA 0,08) com fluxo de 4 ml/min, a 37 °C e aerado com mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$ / 5%  $\text{CO}_2$ ) perfundia o rim esquerdo. Sob perfusão contínua, este órgão foi removido da cavidade abdominal e acoplado a um sistema de perfusão que mantém as mesmas características descritas acima. Mudanças na pressão de perfusão vascular renal (PPVR, medida em mm Hg), registradas a partir de um transdutor de pressão acoplado ao circuito de perfusão, determinaram os diferentes estados contráteis da vasculatura do leito renal. Este transdutor, acoplado ao sistema de aquisição de dados (modelo PowerLab, AD Instruments, Austrália), capta estas mudanças, as quais foram expressas na forma de pressão de perfusão da preparação.

Na sequência, a aorta torácica dos animais foi cuidadosamente removida e colocada em uma placa de petri contendo PSS para retirada dos tecidos conectivos e secção em forma de anéis de 3 a 4 mm de comprimento. Dois ganchos metálicos foram inseridos na luz dos mesmos, sendo, em seguida, transferidos para cubas de vidro, contendo solução fisiológica e conectadas a um transdutor de tensão isométrica, que por sua vez está acoplado a um sistema de aquisição de dados (modelo PowerLab, AD Instruments, Austrália). Nestas preparações, a tensão basal utilizada foi de 3 g e durante todo o protocolo experimental, os anéis foram mantidos com solução nutritiva a 37° C, pH 7,4 e borbulhada continuamente com uma mistura carbogênica (95%  $\text{O}_2$  e 5%  $\text{CO}_2$ ).

### Protocolos experimentais

#### *Validação da metodologia de rim isolado e perfundido no teste de reatividade vascular renal à fenilefrina em ratos naïve*

Após um período de estabilização de 1 hora, uma primeira exposição à fenilefrina (Phe, 300 nmol) foi realizada através da injeção deste composto no sistema de perfusão, em

uma localidade próxima ao tecido. Após 30 minutos, foram realizadas três curvas dose-resposta cumulativa deste mesmo agente vasoconstritor (1 a 300 nmol), com intervalo de 30 minutos entre cada curva.

#### *Avaliação da reatividade vascular renal à fenilefrina e vasopressina em animais tratados com PBS ou LPS*

Seguindo um protocolo semelhante ao descrito no item anterior, após 1 hora de estabilização da preparação, os tecidos foram expostos a 30 nmol de Phe. Trinta minutos após o retorno da preparação à sua pressão de perfusão basal, curvas dose-resposta cumulativa de Phe (0,1 a 300 nmol) ou dose-resposta cumulativa e simples à vasopressina (AVP, 0,1 a 300 pmol) foram realizadas.

#### *Análise dos efeitos do inibidor da enzima Rho-quinase*

Após perfusão durante 30 minutos de PSS com fenilefrina (3  $\mu$ M), doses crescentes e cumulativas de composto Y-27632, de 3 a 300 nmol, foram adicionadas ao sistema de perfusão. Neste conjunto de experimentos, o relaxamento do leito renal também foi avaliado na constrição prévia com vasopressina (3 nM), condição na qual os efeitos de doses crescentes cumulativa e simples do composto Y-27632 sobre a PPVR foram avaliadas.

Além destes, um experimento extra com perfusão de Phe (1  $\mu$ M) em PSS foi realizado somente nos rins isolados de animais tratados com PBS, como forma de controle do experimento anterior. Após 30 min de perfusão, doses crescentes do composto Y-27632 foram adicionadas de forma cumulativa para análise de seu efeito na PPVR dos animais do grupo controle.

#### *Avaliação do efeito vasoconstritor da vasopressina frente a inibição da enzima ROCK*

Em um segundo conjunto de experimentos, após 1 hora de estabilização, as preparações receberam 30 nmol de fenilefrina para testar a viabilidade das mesmas. Após 30 minutos, doses crescentes de vasopressina (3, 10 e 30 pmol) foram administradas. Após o retorno da preparação à sua

pressão de perfusão basal, o inibidor da ROCK, Y-27632, foi diluído em PSS (300 nM) e perfundiu as preparações. Após 20 minutos de estabilização, as mesmas doses de vasopressina descritas anteriormente foram administradas.

#### *Avaliação reatividade vascular à vasopressina e efeito do composto Y-27632 em anéis de aorta*

Após a montagem e um período de estabilização de 60 minutos das preparações, no qual a solução fisiológica foi trocada a cada 15 min, a solução nutritiva das cubas foi substituída por uma solução de cloreto de potássio (KCl) 60 mM, para teste de atividade biológica das preparações de aorta. Após alcançar o platô, ou seja, uma estabilização da resposta vasoconstritora induzida pelo KCl, as preparações foram lavadas três vezes consecutivas e passaram por um novo período de estabilização de 30 minutos. Em seguida, as aortas foram estimuladas com fenilefrina (1  $\mu$ M) e após atingir o platô de contração, as preparações receberam acetilcolina (1  $\mu$ M).

Após um novo período de estabilização de 60 minutos, veículo ou Y-27632 (1  $\mu$ M) foram adicionados as cubas e uma curva concentração-resposta (CCR) cumulativa para vasopressina foi realizada (10 pM a 100 nM). Em um segundo conjunto de experimentos, a importância da via Rho-A/Rho-quinase foi avaliada através do efeito vasodilatador do composto Y-27632. Para isso, as preparações foram contraídas com fenilefrina (1  $\mu$ M) e uma CCR cumulativa para o composto Y-27632 (1nM a 30  $\mu$ M) foi realizada.

### 3.5 Pressão arterial e fluxo sanguíneo cortical renal em ratos anestesiados

#### Procedimento cirúrgico

Para os procedimentos que permitiram a mensuração da pressão arterial, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente), por via intramuscular (i.m.) e receberam doses suplementares (30 e 7 mg/kg, respectivamente) também por via i.m. em intervalos de 40 a 50 minutos, quando necessário. Após verificar a resposta reflexa a dor, os animais foram colocados em decúbito dorsal sobre uma

mesa aquecida (37 °C). A técnica a seguir está descrita em Da Silva-Santos *et al.* (2002). Para um acesso venoso, a veia femoral esquerda foi dissecada para inserção de uma agulha (26 G ½) conectada a uma cânula de polietileno (PE 20) e uma seringa de 1 ml. Este acesso foi utilizado para administração dos compostos testados e para uma administração inicial de 3,75 UI de heparina sódica diluída em 300 µl de PBS, a fim de evitar a formação de coágulos e obstrução das cânulas. Em seguida, os animais foram traqueostomizados (para facilitar a respiração espontânea) e a artéria carótida direita foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da porção distal da artéria carótida foi interrompido com uma ligadura, enquanto o fluxo na porção proximal foi obstruído temporariamente com o auxílio de uma pinça. Foi realizado um corte na região medial da carótida e um cateter de polietileno heparinizado foi introduzido e firmemente amarrado. Todo este aparato foi conectado a um transdutor de pressão que, por sua vez, estava acoplado a um sistema de aquisição digital de dados (PowerLab), no qual os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em mm Hg) e da frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm), foram mensurados e registrados através do software LabChart versão 7.2 (todos da AD Instruments, Austrália).

Simultaneamente a este conjunto de análises, foi realizada uma incisão abdominal unilateral para localização do rim direito dos animais. As vísceras foram afastadas e um sensor à laser foi posicionado sobre o rim, sem pressioná-lo. Este probe, como também é chamado o sensor, permaneceu acoplado a um sistema de leitura e captura de fluxo sanguíneo e temperatura por laser *doppler* (*Laser Doppler Perfusion and Temperature Monitor*, modelo VMS-LDF2, Moor Instruments, Reino Unido). Ao término dos experimentos, os animais, que neste momento se encontravam sob anestesia profunda, foram mortos por excesso de anestésico, por via intravenosa.

### Protocolos experimentais

*Avaliação da pressão arterial e do fluxo microvascular renal frente à exposição a agentes vasoconstritores e vasodilatadores*

Após o procedimento cirúrgico e um período de estabilização de 20 minutos, no qual a pressão arterial média, sistólica, diastólica e a frequência cardíaca foram mensuradas em seus estados basais, doses crescentes de substâncias vasoconstritoras (Phe, 3, 10, 30 nmol/kg e AVP, 3, 10, 30 pmol/kg) ou vasodilatadoras (Ach, 3, 10 e 30 nmol/kg) foram administradas (i.v.) *in bolus*, com intervalo de 10 minutos entre cada doses. Após cada administração, 100 µl de PBS estéril foram injetados (i.v.) para garantir que não houvesse volume residual do agente vasoativo no cateter intravenoso. Para mensuração da resposta a estes agentes na pressão arterial, descontou-se o valor máximo dos valores basais, obtendo-se o delta ( $\Delta$ ) da variação da pressão arterial registrada. Para o fluxo cortical renal, valores basais e os picos de resposta às substâncias vasoativas foram mensurados e as variações no fluxo foram expressas em porcentagem de aumento ou redução do mesmo.

#### *Avaliação da influência da inibição da Rho-quinase sobre os efeitos da vasopressina na PAM e no fluxo microvascular renal*

Com o objetivo de avaliar o efeito da inibição da Rho-quinase sobre a ação da vasopressina, um outro lote de experimentos foi realizado. Após o procedimento cirúrgico e o período de estabilização (20 min), foram administradas (i.v., *in bolus*) três doses crescentes de AVP (3, 10 e 30 pmol/kg) seguida de uma dose única de Y-27632 (0,1 mg/kg) e uma nova sequência de injeções de vasopressina (3, 10 e 30 pmol/kg). Um intervalo de 10 minutos foi respeitado entre cada administração. Neste protocolo, além da obtenção do  $\Delta$  de cada resposta, também foi mensurada a área sob a curva de cada administração de AVP.

### 3.6 Cateter intraventricular

#### Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados, por via i.m., com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente) e receberam doses de reforço (30 e 7 mg/kg, respectivamente) a cada 40-50 minutos ou quando necessário. Após verificar a

resposta reflexa dos animais, estes foram colocados em decúbito dorsal sobre uma mesa aquecida (37° C). A veia caudal foi canulada com um cateter de polietileno (24 GX  $\frac{3}{4}$ ) acoplado a uma seringa de 1 ml. Este acesso venoso foi utilizado para administração dos compostos testados e para uma administração prévia de 3,75 UI de heparina sódica diluída em 300  $\mu$ l PBS, a fim de evitar a formação de coágulos e conseqüentemente uma possível interferência na captação de dados do cateter intraventricular. Em seguida, os animais foram traqueostomizados para facilitar a respiração espontânea e a artéria carótida direita foi localizada e cuidadosamente isolada do nervo vago e tecidos adjacentes. Um volume de aproximadamente 1 ml foi coletado através deste acesso para posterior calibração do sistema. O fluxo sanguíneo da porção distal da artéria foi interrompido com uma ligadura, enquanto que o fluxo na porção proximal foi temporariamente obstruído com o auxílio de uma pinça. Foi realizado um corte na região medial da carótida e o cateter foi inserido até o ventrículo esquerdo, sendo o cateter fixado cuidadosamente à artéria através de uma ligadura. Este cateter (modelo SPR-901, Millar Instruments®, EUA) é conectado a um sistema de captação de dados (PowerLab®) e software (LabChart versão 7.2, AD Instruments®, Austrália), que, após calibração, possibilitou o registro da pressão intraventricular, do volume sistólico, do débito cardíaco e da frequência cardíaca.

### Protocolo experimental

#### *Análise de parâmetros cardíacos basais e frente à administração de vasopressina em animais controle e endotoxêmicos*

Após um período de estabilização de 20 minutos, foram analisados 10 segundos do registro para obtenção de valores basais de débito cardíaco, volume sistólico, pressão intraventricular máxima e frequência cardíaca entre os animais tratados com PBS (1 ml/kg) ou LPS (10 mg/kg) 24 horas antes do experimento.

Após o período de estabilização, doses crescentes de AVP (3, 10 e 30 pmol/kg) foram administradas, com intervalo de

10 minutos entre elas. A variação da pressão intraventricular máxima e da frequência cardíaca foi mensurada.

### 3.7 Western blot

#### Coleta de tecidos

Para coleta das amostras, os animais foram previamente anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente; i.p.). Uma incisão torácica-abdominal foi realizada e um cateter tipo *butterfly*, acoplado a um sistema de perfusão, foi inserido no ventrículo cardíaco esquerdo. Os órgãos foram perfundidos com solução salina 0,9%, a uma temperatura de 4 °C. Após 5 minutos de perfusão ou aproximadamente 150 ml de solução salina, os animais foram sacrificados e os rins foram retirados e colocados em tubos, sendo mantidos em nitrogênio líquido. As amostras foram estocadas a - 80 °C.

#### Preparação das amostras e dosagem de proteínas

As amostras foram transferidas do freezer - 80 °C para um isopor contendo nitrogênio líquido. Aproximadamente 200 mg de cada tecido (congelado em nitrogênio líquido) foi pulverizado e colocado em microtubos plásticos contendo 300 µL de tampão de lise. As amostras foram homogeneizadas, sonicadas por 5 segundos a uma potência de 60 Watts e incubadas em gelo por 1 hora. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 15000 rpm por 30 minutos a 4 °C. A dosagem de proteína baseou-se no método de Smith, também conhecido como BCA (Smith *et al.*, 1985). Para isto, 6 µl do sobrenadante de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo e diluídos em 24 µl de tampão de lise (1:6). Em uma placa de 96 poços, uma curva padrão foi preparada, utilizando-se albumina sérica bovina (BSA), e colocada na primeira coluna da placa, que foi completada com as amostras. Em cada poço foram acrescentados 100 µl de BCA (ácido bicinchonínico 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolina) e a placa foi incubada por 1 hora a 37 °C. Após este período, a dosagem foi realizada em um leitor de placas à 570 nm. O restante do sobrenadante das amostras foi quantificado e transferido para um novo microtubo e acrescido de tampão de Laemmli (Laemmli, 1970), na proporção de 1:1 e

incubado a 95 °C por 10 minutos. As amostras foram estocadas em temperatura - 80 °C até a realização da imunoeletroforese.

### Eletroforese e transferência

A eletroforese foi realizada utilizando-se um gel de separação e um de entrada, ambos de poliacrilamida, 10 e 5%, respectivamente. As amostras, juntamente com o padrão (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, BioRad), foram colocadas nos poços do gel e um tampão de corrida foi adicionado dentro de um suporte, no qual a cuba contendo o gel estava. A corrida foi realizada durante 3 horas a 90 V. Em seguida, iniciou-se o processo de transferência, no qual as proteínas que estavam contidas no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose ao longo de 1 hora, a 100 V e sob temperatura de 4 °C. Em seguida, a membrana foi corada com Ponceau e lavada com TBS-T durante 30 minutos, sob agitação. A membrana foi incubada com TBS-T milk 5% por mais uma hora.

### Incubação de anticorpo, revelação e análise

A revelação da membrana foi realizada por quimioluminescência ampliada. Para isto, a membrana foi incubada com anticorpo primário, a 4 °C ao longo de uma noite (~ 16 horas). Na manhã seguinte, as membranas foram lavadas com TBS durante 30 minutos e colocadas na presença dos anticorpos secundários por 1 hora em temperatura ambiente. Após este período, as membranas foram lavadas novamente com TBS-T por 30 minutos. Para o processo de revelação, as membranas foram colocadas na presença de solução ECL (Normal ou Plus, Thermo Scientific, EUA) durante 1 minuto e em seguida, foram acondicionadas em cassete de exposição com filme radiográfico. Os períodos de exposição variaram de 1 segundo a 10 minutos, de acordo com a proteína analisada. A revelação dos filmes foi realizada em uma reveladora modelo SRX-101A (Konica Minolta, Japão).

A análise quantitativa das bandas foi realizada por densitometria, com o auxílio do programa ImageJ (versão 1.44, NIH, EUA).

### 3.8 Avaliação da diurese

Para análise da diurese, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais. Os grupos PBS 6 e PLS 6 receberam uma injeção, via i.p., de PBS (1 ml/kg) ou LPS (10 mg/kg) e foram alocados em gaiolas metabólicas, sendo um animal por gaiola, com livre acesso a comida e água. Nos tempos 1, 2, 4 e 6 horas, a quantidade de urina foi mensurada. Os grupos PBS 24 e LPS 24 também receberam, via i.p., PBS ou LPS, nas mesmas doses e sob as mesmas condições anteriormente descritas, sendo o volume urinário mensurado nos tempos 1, 2, 4, 6, 19, 20, 22 e 24 horas após alocação nos animais nas gaiolas metabólicas. Ao final da 6<sup>a</sup> e da 24<sup>a</sup> hora, o consumo de água, o pH e a densidade.

### 3.9 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). O número de animais em cada grupo experimental variou de 5 a 15. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 5.01 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Para análise dos testes paramétricos, pareados ou não pareados, utilizou-se teste *t* de Student, análise de variância de uma via (ANOVA) ou de duas vias, seguidos pelo teste post hoc de Bonferroni. O nível de significância considerado foi de 5% ( $p < 0,05$ ).

### 3.10 Drogas e reagentes

As seguintes drogas e reagentes foram utilizados neste estudo: fenilefrina, vasopressina, acetilcolina, LPS de *Escherichia coli* sorotipo tipo 1 O111:B4 (comprados da Sigma-Aldrich Co. LLC.), Y-27632 dicloridrato (comprado da Tocris Bioscience), heparina sódica (comprada da Hipolabor Farmacêutica, Belo Horizonte, MG), cetamina e xilazina (Syntec do Brasil, adquirida pelo Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC).



#### 4.1 Padronização do modelo de endotoxemia induzida por LPS

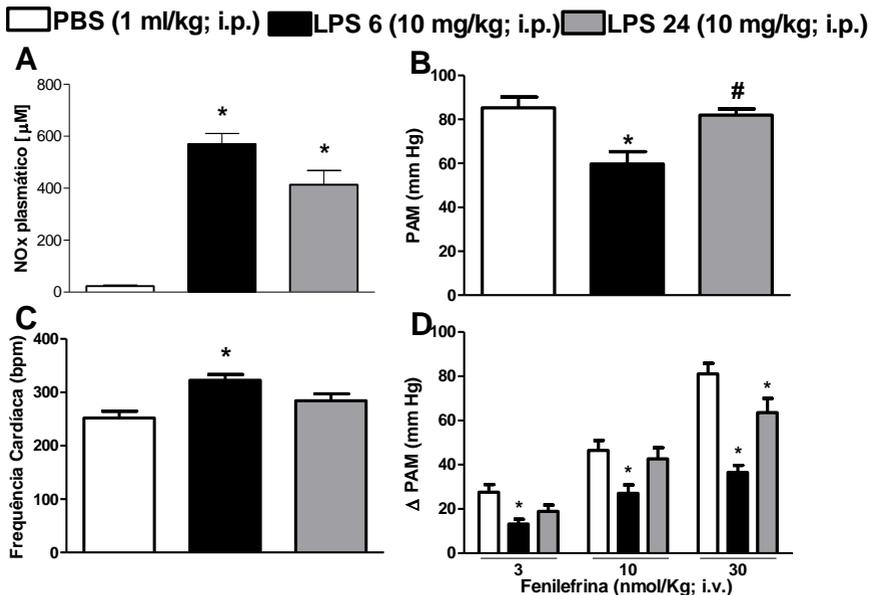
A fim de validar o modelo de choque endotoxêmico induzido por LPS (10 mg/kg), alguns parâmetros bioquímicos e vasculares foram mensurados. A administração de LPS aumentou os valores plasmáticos de NOx, um indicador direto da produção de óxido nítrico, em ambos os grupos 6 e 24 horas ( $570,3 \pm 40,7$  e  $413,9 \pm 54,8$   $\mu\text{M}$ , respectivamente), quando comparados ao grupo tratado com PBS ( $23,9 \pm 2,9$   $\mu\text{M}$ ) (Figura 3A). Além disto, creatinina e uréia plasmáticas também foram dosadas para avaliar possíveis danos renais e, em ambas as dosagens, os valores encontrados estavam significativamente aumentados no grupo LPS 6 horas quando comparado ao grupo controle (Tabela 1).

Na figura 3B, observa-se que o tratamento com LPS induziu uma diminuição significativa na pressão arterial média (PAM) do grupo LPS 6 horas ( $59,7 \pm 5,6$  mm Hg) quando comparada ao grupo controle ( $85,3 \pm 5,0$  mm Hg). No entanto, o mesmo não foi observado no grupo LPS 24 ( $81,9 \pm 2,8$  mm Hg). Provavelmente, estes dados estão relacionados ao modelo de endotoxemia induzido por LPS, visto que este desencadeia mudanças mais agudas do que em longo prazo. Características semelhantes foram encontradas na frequência cardíaca destes grupos (Figura 3C), de modo que os animais tratados com LPS 6 h antes do protocolo experimental apresentaram um aumento na frequência cardíaca, enquanto o grupo LPS 24 h manteve um valor basal semelhante ao grupo PBS. Para concluir a padronização do modelo, uma curva de efeito dependente da dose para a fenilefrina foi realizada (Figura 3D) e as alterações na pressão arterial média foram registradas. Este agente vasoconstritor foi utilizado, pois dados na literatura já evidenciaram a hiporresponsividade que os animais tratados com LPS apresentam frente à sua administração. O grupo que recebeu LPS 6 horas antes do protocolo respondeu menos a todas as doses de Phe ( $13,2 \pm 2,2$ ;  $27,1 \pm 3,8$ ;  $36,6 \pm 3,2$  mm Hg, para 3, 10 e 30 nmol/kg, respectivamente), enquanto no grupo LPS 24, a resposta apresentou-se reduzida somente na maior dose desse vasoconstritor (30 nmol/kg,  $63,5 \pm 6,5$  mm Hg), quando comparados ao grupo PBS ( $27,5 \pm 3,5$ ;  $46,4 \pm 4,5$ ;  $81,1 \pm 4,7$  mm Hg, para 3, 10 e 30 nmol/kg, respectivamente).

**Tabela 1: Efeito da administração de LPS sobre indicadores de função renal.**

(mg/dL)	PBS	LPS 6 h	LPS 24 h
Creatinina	1,25 ± 0,05	1,87 ± 0,07*	1,33 ± 0,11
Uréia	60,03 ± 4,88	109,49 ± 16,51*	65,95 ± 9,36

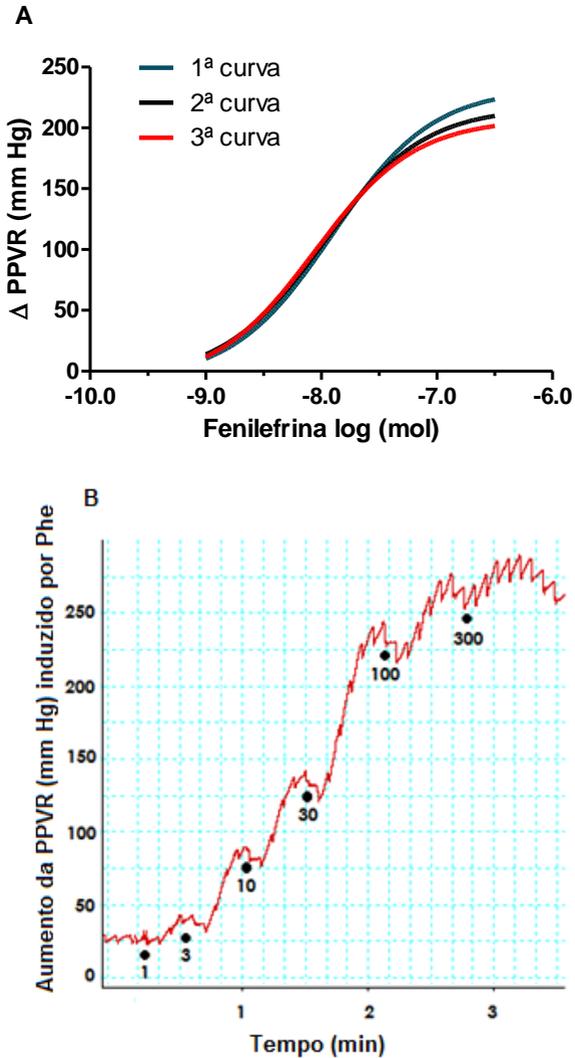
Dosagem de creatinina e uréia plasmáticas (ambas em mg/dl) em ratos tratados com PBS (1 ml/kg) ou LPS (10 mg/kg), 6 ou 24 horas antes da coleta. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (*n* de 4 a 6 animais por grupo). Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes do grupo PBS ( $p < 0,05$ ). ANOVA de uma via seguida de Bonferroni.



**Figura 3: Efeitos da administração de LPS em ratos.** Análise de parâmetros em ratos anestesiados tratados com PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (10 mg/kg, i.p.) 6 ou 24 antes dos procedimentos realizados. A, concentração de NOx ( $\mu\text{M}$ ) plasmático; B, pressão arterial média (PAM); C, frequência cardíaca basal; e D, efeito da fenilefrina na PAM. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* e # são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle (barra branca) e grupo LPS 6 (barra preta), respectivamente. ANOVA de uma via (figuras A, B e C) e ANOVA de duas vias (figura D), seguidas de Bonferroni.

#### 4.2 Reatividade do rim isolado e perfundido à fenilefrina.

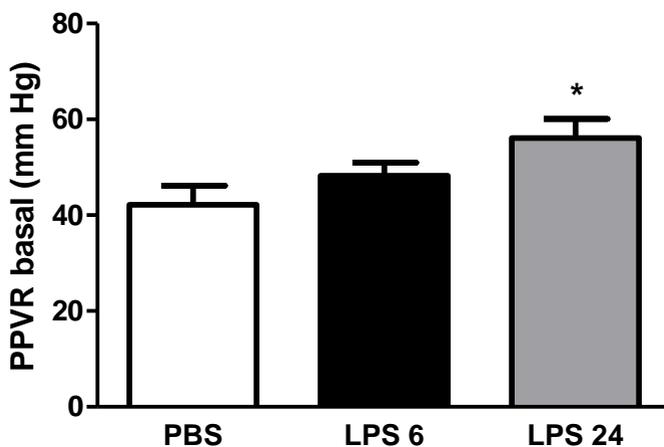
Após exposição a uma única dose de fenilefrina (300 nmol), os rins de ratos naïve foram submetidos a 3 curvas cumulativas de Phe, 1 a 300 nmol, respeitando-se um intervalo de 30 minutos entre elas. Este protocolo experimental foi realizado visando a padronização do modelo de rim isolado e perfundido no laboratório. As figuras 4A e 4B demonstram, respectivamente, a similaridade das respostas à Phe ao longo do período de manutenção das preparações no sistema de perfusão (aproximadamente 150 minutos) e um registro típico de uma curva dose-resposta cumulativa à fenilefrina.



**Figura 4: Aumento da pressão de perfusão vascular renal (PPVR) em rim isolado e perfundido. A, efeito da adição de doses crescentes de maneira cumulativa de fenilefrina (1 a 300 nmol); e B, registro típico de uma curva dose-resposta para Phe ( $n = 7$ ).**

#### 4.3 Efeitos da fenilefrina e vasopressina na PPVR no modelo de rim isolado e perfundido.

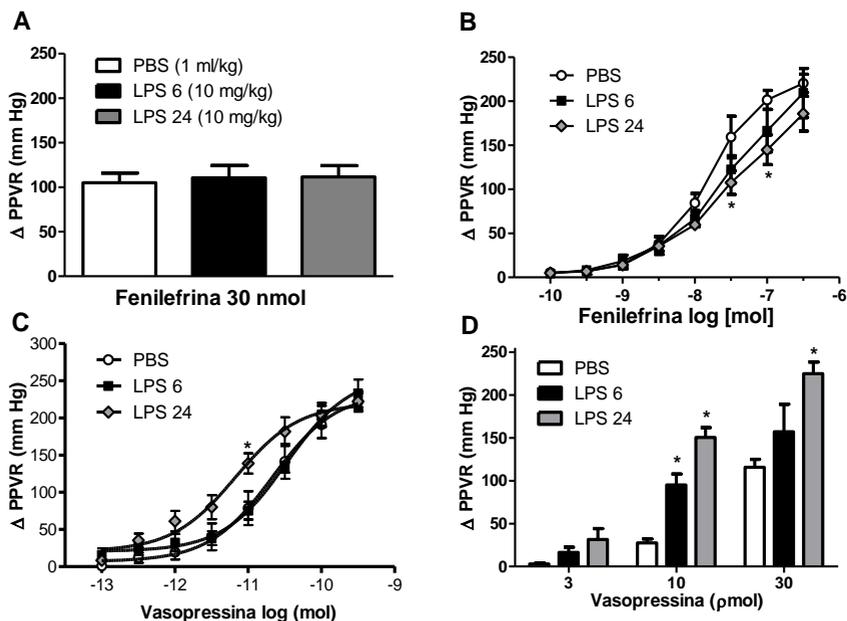
A análise da PPVR basal dos grupos experimentais, controle, LPS 6 e LPS 24, revelou um aumento significativo nos valores registrados em rins obtidos de animais pré-tratados 24 horas antes com LPS (10 mg/kg), demonstrado na figura 5.



**Figura 5: Aumento da PPVR basal em animais endotoxêmicos.** Ratos machos receberam PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (10 mg/kg, i.p.) 6 ou 24 horas antes da realização dos experimentos de rim isolado e perfundido. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n$  de 5 a 8 animais, por grupo). Dados seguidos de \* apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle (barra branca). ANOVA de uma via seguida de Bonferroni.

Em um segundo momento, as preparações renais foram expostas à fenilefrina ou à vasopressina (Figura 6). Durante a primeira exposição à Phe (dose única de 30 nmol), não houve diferença estatisticamente significativa na alteração da PPVR (Figura 6A). No entanto, assim como no modelo *in vivo*, as preparações dos animais do grupo tratado com LPS 24 horas antes do experimento apresentaram uma hiporresponsividade vascular renal visualizada nas concentrações de 30 e 100 nmol na curva dose-resposta cumulativa (CDRc) (Figura 6B).

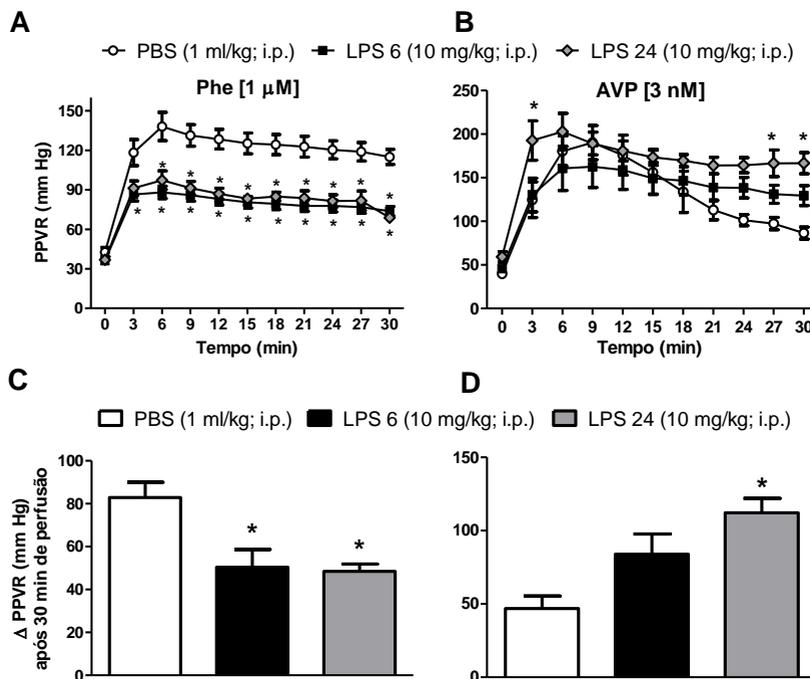
Por outro lado, a análise dos efeitos da vasopressina revelou que o grupo tratado com LPS 24 h antes da realização do experimento apresentou um aumento na resposta vasopressora quando exposto a 10 pmol de vasopressina ( $138.9 \pm 13.7$  mm Hg), se comparado ao grupo PBS ( $78.6 \pm 22.8$  mm Hg) (Figura 6C). Além disto, a  $CE_{50}$  para a vasopressina, calculada a partir dos dados obtidos na CDRc, mostrou-se deslocada de 21,4 (11,5 - 39,7 pmol) para 6,7 (3,7 - 122 pmol) nos grupos controle e LPS 24, respectivamente. Esta hiperreatividade observada na CDRc foi melhor visualizada quando as preparações foram expostas a doses crescentes de vasopressina, adicionadas de forma não cumulativa (Figura 6D).



**Figura 6: Alterações na reatividade vascular renal em resposta à fenilefrina e à vasopressina em preparações obtidas de animais tratados com PBS ou LPS, 6 ou 24 horas antes do experimento.** Em A, efeito agudo da administração de 30 nmol de fenilefrina; em B Curva dose-resposta cumulativa (CDRc) para fenilefrina (0,1 a 300 nmol); em C, CDRc (0,1 a 300 pmol) para vasopressina; e em D, efeito da adição não cumulativa de vasopressina (3, 10 e 30 pmol). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle (círculos ou barras brancas). ANOVA de uma via (figura A) ou duas vias (figuras B, C e D), seguida de Bonferroni.

Além destes protocolos, os rins isolados foram perfundidos com Phe (3  $\mu$ M) ou AVP (1 nM) ambas adicionadas diretamente em PSS (Figura 7). A resposta máxima induzida pela fenilefrina foi estatisticamente menor nos grupos LPS 6 e 24 (88,1  $\pm$  4,8 e 97,2  $\pm$  7,2 mm Hg, respectivamente), quando comparada a resposta obtida no grupo controle (138,1  $\pm$  10,8) (Figura 7A). Além disto, o aumento da PPVR induzida por Phe não se manteve sustentada ao longo do período analisado (30 minutos) (Figura 7B). Isto demonstra que, em uma avaliação através da infusão contínua, o leito vascular renal apresenta uma hiporreatividade mais evidente à fenilefrina, que se assemelha mais ao que ocorre na clínica em humanos.

Ao contrário do que ocorreu com a resposta à Phe, os rins de animais endotoxêmicos que foram perfundidos com vasopressina demonstraram hiper-reatividade a este agente (Figuras 7C e 7D). Embora as preparações de rins dos animais do grupo controle (PBS) tenham apresentado respostas semelhantes as do grupo LPS 24 nos primeiros 15 minutos da perfusão, o aumento da PPVR induzido pela vasopressina não se manteve sustentado ao longo dos 30 minutos de perfusão no grupo controle, enquanto permaneceu elevado no grupo LPS 24. Apesar das preparações do grupo LPS 6 apresentarem seu pico máximo de resposta de 162,7  $\pm$  23,8 mm Hg, não atingindo a contração máxima que se observa nos rins do grupo LPS 24, (203  $\pm$  20,8 mm Hg) há uma similaridade entre estes grupos em manter as respostas sustentadas, no que tange ao aumento da PPVR.

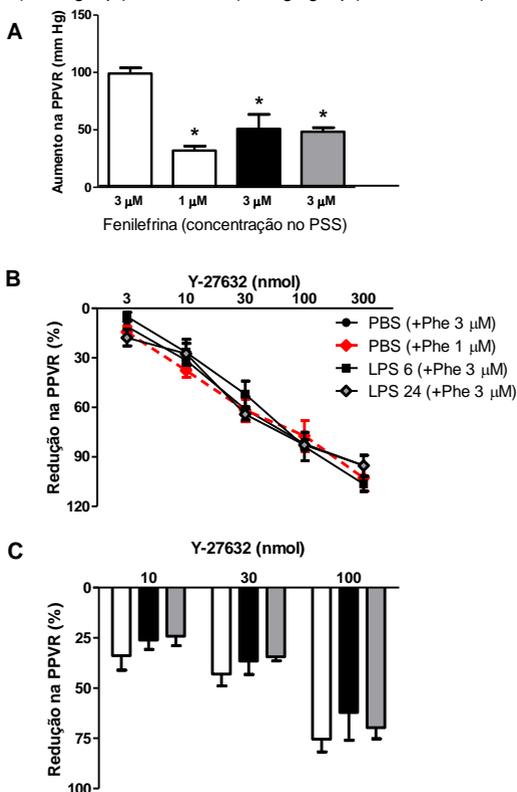


**Figura 7: Aumento da pressão de perfusão vascular renal de ratos endotoxêmicos após perfusão de fenilefrina ou vasopressina.** Rins obtidos de ratos controle (PBS) ou endotoxêmicos (LPS 6 e 24), conforme indicado na legenda sobre cada painel. Em A, efeito da perfusão com PSS contendo fenilefrina (Phe, 1  $\mu$ M) e, em B, PSS contendo vasopressina (AVP 3 nM). C e D mostram em destaque, os valores da PPVR no tempo de 30 min após início das perfusões com Phe ou AVP, respectivamente. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao controle (círculos e barras brancos). ANOVA de uma (Painéis C e D) e duas vias (A e B), seguida de Bonferroni.

#### 4.4 Efeito da inibição da enzima Rho-quinase na reatividade do leito vascular renal

Nestes experimentos utilizou-se o composto Y-27632, um inibidor da enzima Rho-quinase. Para garantir que os efeitos da inibição da ROCK na PPVR de rins obtidos de animais endotoxêmicos não seria mascarado em virtude da hiporresponsividade das preparações à agentes vasoconstritores, os efeitos do composto Y-27632 foram avaliados em preparações controle perfundidas com PSS contendo 1 ou 3  $\mu\text{M}$  de fenilefrina. Como mostrado na Figura 8A, a perfusão com 1  $\mu\text{M}$  de Phe elevou a PPRV a valores semelhantes aqueles registrados em rins obtidos dos animais dos grupos LPS 6 e 24. A adição cumulativa do composto Y-27632 reduziu, de maneira dependente da dose, a PPRV dos rins previamente perfundidos com Phe (1 ou 3  $\mu\text{M}$ ) de todos os grupos experimentais, não sendo encontradas diferenças entre os grupos controle perfundidos com 1 ou 3  $\mu\text{M}$  de fenilefrina, e tampouco entre o grupo controle e os grupos LPS 6 e 24 (Figura 8B). Da mesma forma, o efeito vasorelaxante do composto Y-27632, administrado de maneira não-cumulativa em preparações perfundidas com vasopressina (3 nM) não foi diferente entre os grupos PBS e LPS 6 e 24 (Figura 8C).

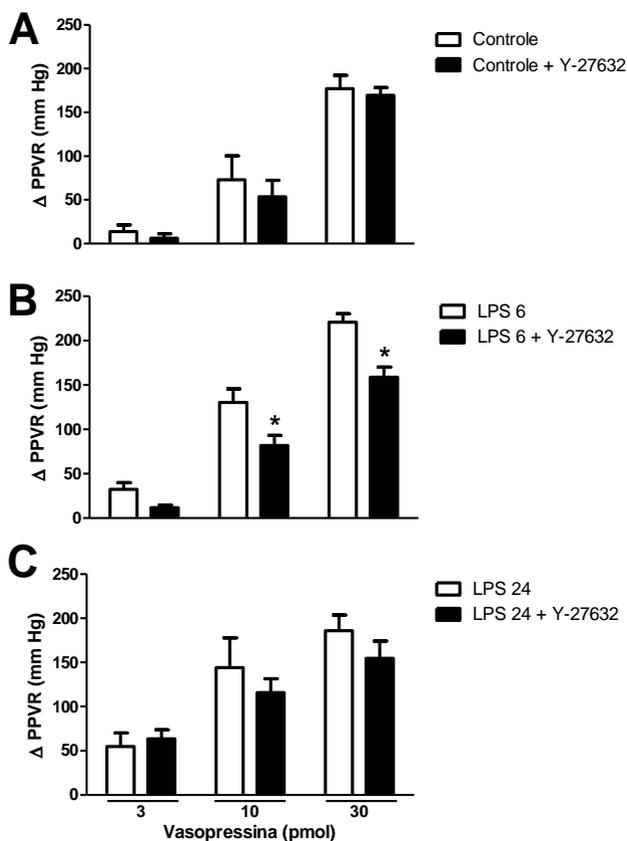
□ PBS (1 ml/kg; i.p.) ■ LPS 6 (10 mg/kg; i.p.) ▒ LPS 24 (10 mg/kg; i.p.)



**Figura 8: Redução da pressão de perfusão vascular renal (PPVR) causada pelo composto Y-27632.** Em A, aumento da PPVR gerado pela perfusão de PSS contendo 1 ou 3  $\mu$ M de Phe, em rins obtidos de animais tratados com PBS ou LPS, conforme indicado na figura. Em B, redução da PPVR gerada por Y-27632, em forma de curva cumulativa, cujas preparações foram previamente contraídas com Phe, como mostrado em A. Em C, redução da PPVR pela adição não-cumulativa de Y-27632 em preparações perfundidas com VPN. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do grupo controle. ANOVA de uma (Figura 6A) e duas vias (B e C), seguida de Bonferroni.

#### 4.5 Influência da inibição da via Rho-A/Rho-quinase na reatividade vascular à vasopressina em rins perfundidos obtidos de ratos endotoxêmicos

A perfusão com composto Y-27632 não reduziu a resposta vascular renal à vasopressina tanto nos rins dos animais do grupo controle quanto nos dos animais do grupo LPS 24 horas. No entanto, no grupo tratado com LPS 6 horas antes do experimento, houve uma redução significativa na reatividade renal à vasopressina nas doses de 10 e 30 pmol quando comparamos antes ( $130,6 \pm 15,2$  e  $220,9 \pm 9,4$  mm Hg, respectivamente) e após ( $82,1 \pm 11,2$  e  $158,8 \pm 11,3$  mm Hg, respectivamente) a inibição da enzima Rho-quinase (Figura 9).



**Figura 9: Influência da inibição da ROCK na resposta contrátil da vasopressina na PPVR de rins isolados de ratos endotoxêmicos.** Efeito da perfusão de Y-27632 ( $3 \times 10^{-7}$  M) diluído em PSS sobre a reatividade renal da vasopressina em: (A) animais tratados com PBS (1 ml/kg, i.p.), (B) e (C) animais tratados com LPS (10 mg/kg, i.p.) 6 ou 24 horas do experimento, respectivamente. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do seu grupo controle (barras brancas). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

#### 4.6 Diminuição da resposta contrátil ao KCl e à fenilefrina em aorta de animais com endotoxemia induzida por LPS

A avaliação da reatividade da preparação à solução de KCl 60 mM demonstrou uma diminuição da contração máxima nas aortas do grupo LPS 24 ( $1,3 \pm 0,6$  g) quando comparado ao controle ( $1,7 \pm 0,15$  g) ( $p < 0,05$ ). O mesmo foi observado na contração induzida pela fenilefrina ( $1 \mu\text{M}$ ), com diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) da resposta no grupo LPS 24 ( $1,63 \pm 0,6$  g), mas não no grupo LPS 6 ( $2,09 \pm 0,4$  g) quando comparado ao grupo PBS ( $2,33 \pm 0,6$  g).

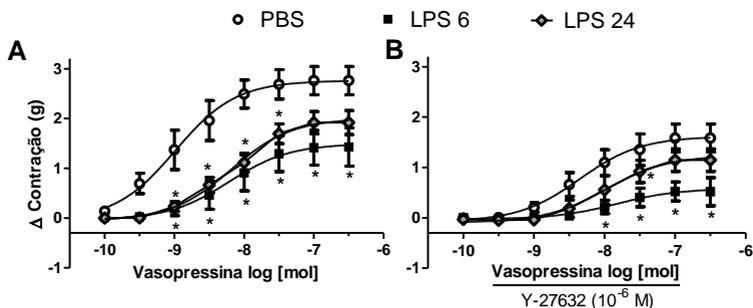
#### 4.7 Diminuição da contratilidade induzida por vasopressina pela inibição da enzima Rho-quinase em anéis de aorta

A figura 10A demonstra uma diminuição significativa de 49,2 e 29,6% da ação vasoconstritora da AVP nas aortas dos animais tratados com LPS 6 ou 24 horas antes do protocolo experimental, respectivamente. Em B, observa-se que o composto Y-27632 reduziu significativamente a resposta máxima da vasopressina nos três grupos experimentais (redução de 26,2, 63,6 e 30% nos grupos PBS, LPS 6 e LPS 24 horas, respectivamente). A Tabela 2 expressa a alteração na área total da contração induzida pela vasopressina na presença de Y-27632.

**Tabela 2: Efeito da inibição da ROCK na CCR da vasopressina**

	AVP	AVP + Y-27632	% redução
PBS	5,32	2,06	61,36
LPS 6 h	1,79	0,47	73,84
LPS 24 h	2,33	1,15	50,66

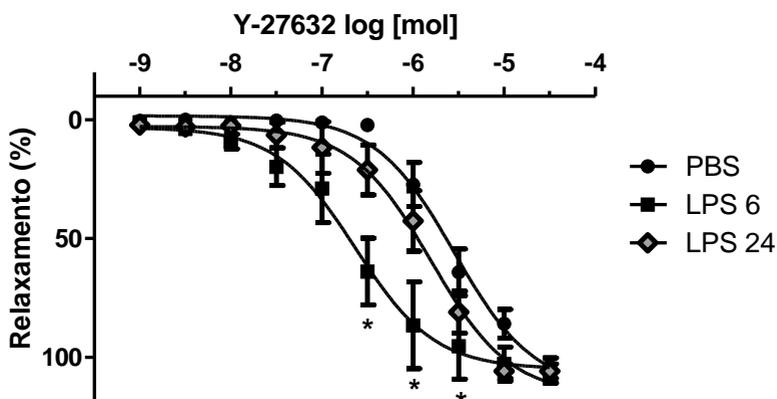
Efeito na inibição da enzima Rho-quinase, expresso em forma de área sob a curva e porcentagem de redução da área, na CCR da vasopressina em aortas de ratos tratados com PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (10 mg/kg, i.o.) 6 ou 24 horas antes do experimento.



**Figura 10: Hiporresponsividade e inibição da vasoconstrição à AVP mediada por Y-27632 em aortas de ratos endotoxêmicos.** Em A, CCR de AVP após incubação com veículo; e em B, CCR da AVP após incubação com Y-27632. Experimentos realizados em aortas de ratos tratados com PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (10 mg/kg, i.o.) 6 ou 24 horas antes do experimento. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do grupo PBS. ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

#### 4.8 Aumento do efeito causado pelo inibidor da enzima ROCK, Y-27632, em animais endotoxêmicos

A ação vasodilatadora do composto Y-27632, inibidor da enzima Rho-quinase, está demonstrada na figura 11. O tratamento com LPS 6 horas antes do experimento tornou a ação deste composto mais potente quando comparada à sua ação no grupo PBS. Isso é observado pelo deslocamento da  $CE_{50}$ , que no grupo controle foi de 2,83 (1,9 – 4,1  $\mu\text{mol}$ ) e passou para 0,23 (0,11 – 0,48  $\mu\text{mol}$ ) no grupo LPS 6.



**Figura 11: Aumento do relaxamento induzido pelo composto Y-27632 em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos 6 horas após administração de LPS.** CCR de Y-27632 em aorta pré-contraída com fenilefrina (1  $\mu\text{M}$ ) de ratos tratados com PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (10 mg/kg, i.o.) 6 ou 24 horas antes do experimento. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) quando comparado ao grupo controle. ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

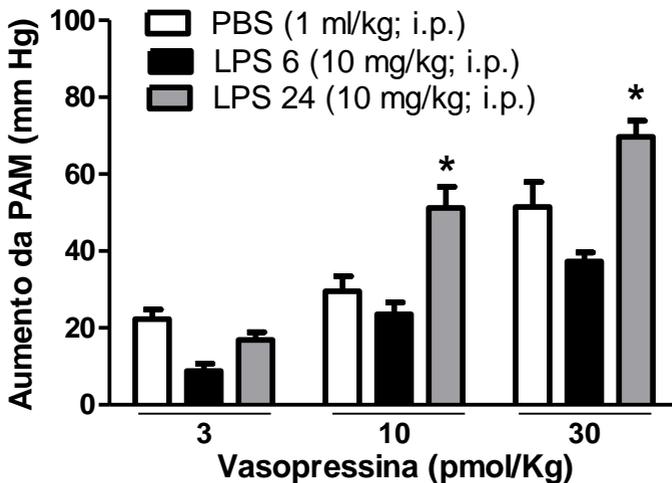
#### 4.9 Aumento do efeito da vasopressina na pressão arterial média de ratos endotoxêmicos

Apesar de não haver diferença estatística entre os grupos na resposta hipotensora da acetilcolina (Tabela 3), a resposta à vasopressina apresentou-se significativamente maior no grupo tratado com LPS 24 horas antes do experimento, semelhante ao que foi observado no modelo de rim isolado e perfundido. Nestes animais, as doses de 10 e 30 pmol/kg de AVP aumentaram a PAM em  $51,2 \pm 5,5$  e  $69,7 \pm 4,2$  mm Hg, respectivamente, enquanto no grupo controle foi de  $29,5 \pm 3,9$  e  $51,5 \pm 6,5$  mm Hg, respectivamente. O grupo tratado com LPS 6 horas antes do experimento apresentou respostas ligeiramente menores à AVP, porém sem alcançar valores significativos quando comparados ao grupo controle, tratado apenas com PBS (Figura 12).

**Tabela 3: Efeito hipotensor da acetilcolina na PAM em ratos anestesiados tratados com PBS ou LPS**

Ach (nmol/kg)	PBS	LPS 6 h	LPS 24 h
3	$-30,9 \pm 3,9$	$-25,4 \pm 4,5$	$-31,2 \pm 4,0$
10	$-34,6 \pm 3,7$	$-30,0 \pm 6,4$	$-35,3 \pm 4,4$
30	$-42,7 \pm 3,9$	$-40,9 \pm 4,6$	$-48,0 \pm 4,6$

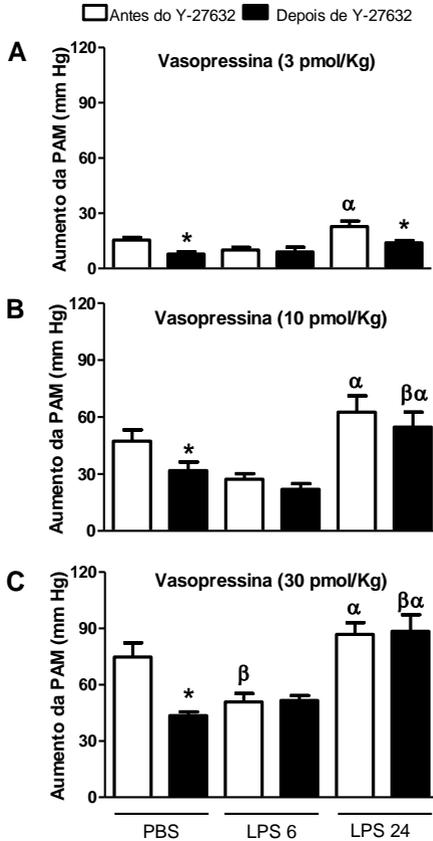
Valores expressos em mm Hg e foram obtidos em ratos anestesiados, 6 ou 24 horas após a administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou PBS (1 ml/kg, i.p.). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 7$ , por grupo). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.



**Figura 12: Alteração na responsividade à vasopressina na PAM de ratos endotoxêmicos.** Os efeitos pressores da vasopressina na PAM de ratos anestesiados foram avaliados 6 ou 24 horas após a administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou PBS (1 ml/kg, i.p.). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 7$ , por grupo). Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) do respectivo controle (barras brancas). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

#### 4.10 Avaliação *in vivo* da influência da inibição da Rho-quinase sobre a vasoconstrição induzida pela vasopressina.

Nestes experimentos foram avaliados os efeitos da vasopressina (3, 10 e 30 pmol/kg, i.v.) sobre a pressão arterial média de ratos anestesiados, antes e após a administração de uma dose única de Y-27632 (0,1 mg/kg, i.v.). Enquanto o tratamento com este inibidor da enzima ROCK foi capaz de reduzir significativamente tanto o efeito máximo como a amplitude do efeito pressórico da vasopressina em ratos do grupo controle, o mesmo não foi capaz de alterar o efeito vasoconstritor da AVP no grupo LPS 6 e reduziu apenas o efeito da menor dose de vasopressina no grupo LPS 24 (Figuras 13 e 14). Todos os dados numéricos estão resumidos nas tabelas 4 ( $\Delta$ ) e 5 (área sob a curva).

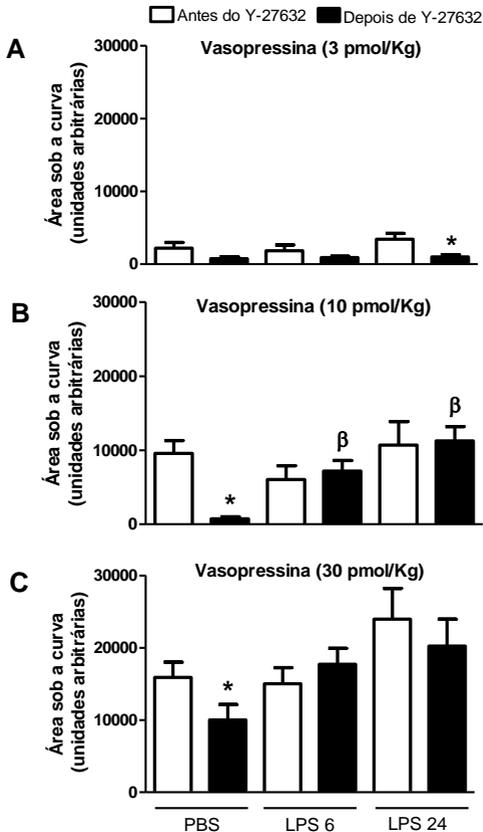


**Figura 13: Alteração na resposta pressórica à vasopressina na presença do composto Y-27632 em ratos endotoxêmicos.** A resposta à vasopressina foi avaliada antes e depois de uma dose única de Y-27632 (0,1 mg/kg, i.v.) em ratos anestesiados, 6 ou 24 horas após a administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou PBS (1 ml/kg, i.p.). Os gráficos expressam o aumento da PAM frente as doses de 3 (A), 10 (B) e 30 (C) pmol/kg de AVP. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \*,  $\alpha$  e  $\beta$  são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos seus respectivos controles (barras brancas), do grupo PBS e do grupo LPS 6, respectivamente. Para comparações intra-grupo foi utilizado teste *t* de Student. Para comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA de 1 via seguido de Bonferroni.

**Tabela 4: Efeito hipertensor da vasopressina (AVP) na ausência e presença do composto Y-27632 na pressão arterial média (PAM) de ratos controle e endotoxêmicos.**

	AVP	$\Delta$ PAM	
			AVP + Y-27632
		<u>3 <math>\mu</math>mol/kg</u>	
PBS	15,5 $\pm$ 1,4		7,8 $\pm$ 1,3*
LPS 6 h	10,0 $\pm$ 1,4		8,9 $\pm$ 2,6
LPS 24 h	22,7 $\pm$ 2,9		13,9 $\pm$ 1,2*
		<u>10 <math>\mu</math>mol/kg</u>	
PBS	47,4 $\pm$ 5,9		31,8 $\pm$ 4,5*
LPS 6 h	27,3 $\pm$ 2,8		21,9 $\pm$ 2,9
LPS 24 h	62,6 $\pm$ 8,5		54,7 $\pm$ 7,9
		<u>30 <math>\mu</math>mol/kg</u>	
PBS	74,8 $\pm$ 7,5		43,5 $\pm$ 2,0*
LPS 6 h	50,9 $\pm$ 4,5		51,6 $\pm$ 2,6
LPS 24 h	86,8 $\pm$ 6,2		88,5 $\pm$ 8,9

Valores referentes à variação ( $\Delta$ ) da PAM, em mm Hg e indicam o efeito vasoconstritor da vasopressina antes (AVP) e depois de uma dose única de Y-27632 (AVP + Y-27632, 0,1 mg/kg), em ratos anestesiados, 6 ou 24 horas após a administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou PBS (1 ml/kg, i.p.). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ , por grupo). Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos seus respectivos controles. Para comparações intra-grupo foi utilizado teste *t* de *Student* e entre os grupos, ANOVA de uma via seguida de Bonferroni.



**Figura 14: Alteração da área sob a curva da resposta à vasopressina causada por Y-27632 em ratos endotoxêmicos.**

Resposta à vasopressina antes e depois de uma dose de Y-27632 (0,1 mg/kg, i.v.) em ratos anestesiados, 6 ou 24 horas após a administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou PBS (1 ml/kg, i.p.). Os gráficos expressam o aumento da PAM frente as doses de 3 (A), 10 (B) e 30 (C) pmol/kg de AVP. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 6$ , por grupo). Dados seguidos de \* e  $\beta$  são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos seus respectivos controles (barras brancas) e do grupo LPS 6, respectivamente. Para comparações intra-grupo foi utilizado teste *t* de Student. Para comparações entre os grupos foi utilizado ANOVA de 1 via seguido de Bonferroni.

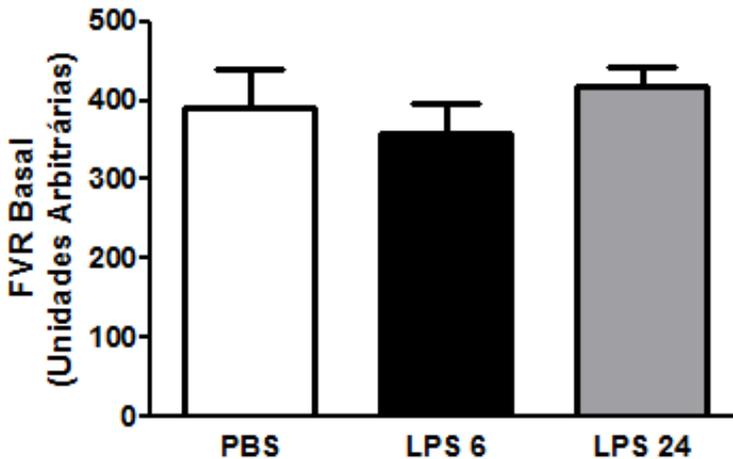
**Tabela 5: Efeito da vasopressina (AVP) na ausência e presença do composto Y-27632 na pressão arterial média (PAM) de ratos controle e endotoxêmicos.**

Área Sob a Curva		
	AVP	AVP + Y-27632
		<u>3 pmol/kg</u>
PBS	2177 ± 786,7	739,9 ± 284,4
LPS 6 h	1846 ± 786	896,6 ± 156,3
LPS 24 h	3406 ± 802,3	991,2 ± 291*
		<u>10 pmol/kg</u>
PBS	9568 ± 1735	739,9 ± 284,4*
LPS 6 h	6047 ± 1858	7192 ± 1422
LPS 24 h	10676 ± 3178	11273 ± 1903
		<u>30 pmol/kg</u>
PBS	15876 ± 2137	10007 ± 2132*
LPS 6 h	15002 ± 2246	17720 ± 2185
LPS 24 h	23962 ± 4240	20250 ± 3710

Valores referentes à variação (área sob a curva) da PAM, em mm Hg e indicam o efeito vasoconstritor da vasopressina antes (AVP) e depois de uma dose única de Y-27632 (AVP + Y-27632, 0,1 mg/kg), em ratos anestesiados, 6 ou 24 horas após a administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou PBS (1 ml/kg, i.p.). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média ( $n = 6$ , por grupo). Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos seus respectivos controles. Para comparações dentro dos grupos foi utilizado teste *t* de Student e entre os grupos, ANOVA de uma via seguida de Bonferroni.

#### 4.11 Avaliação do fluxo microvascular do córtex renal *in vivo* de ratos endotoxêmicos.

Após análise dos resultados anteriormente descritos, os próximos experimentos foram realizados com o intuito de avaliar as alterações no fluxo microvascular do córtex renal de animais controle e endotoxêmicos. A Figura 15 expressa os valores basais do fluxo vascular renal (FVR) dos animais endotoxêmicos. Nota-se a similaridade no FVR basal, não havendo diferença estatística entre os grupos. Quando expostos a concentrações crescentes de Phe e Ach, houve redução dependente da dose no fluxo sanguíneo renal dos animais em todos os grupos experimentais. No entanto, esta redução não foi estatisticamente significativa entre eles (Tabela 6).



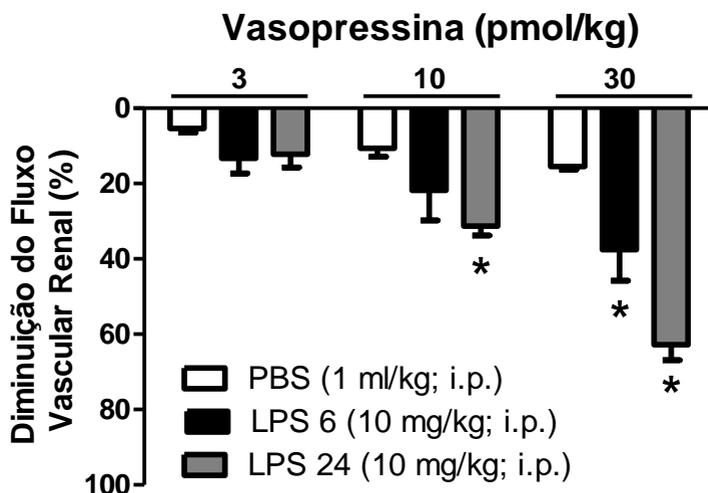
**Figura 15: Avaliação do fluxo vascular renal (FVR) basal em animais endotômicos.** Ratos machos receberam PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (10 mg/kg, i.p.) 6 ou 24 antes da realização dos experimentos *in vivo* de pressão arterial e fluxo microvascular renal. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n$  entre 6 e 7 animais por grupo). ANOVA de uma via seguida de Bonferroni.

**Tabela 6: Redução do fluxo microvascular do córtex renal causadas pela administração de fenilefrina e acetilcolina em ratos controle e endotoxêmicos.**

Redução do Fluxo Vascular Renal (%)			
(nmol/kg)	PBS	LPS 6 h	LPS 24 h
<i>Fenilefrina</i>			
3	6,9 ± 1,6	5,9 ± 0,7	7,7 ± 1,5
10	10,3 ± 1,7	9,7 ± 1,6	13,5 ± 1,7
30	24,6 ± 3,4	20,5 ± 5,4	23,7 ± 2,8
<i>Acetilcolina</i>			
3	11,7 ± 0,9	10,6 ± 0,9	12,2 ± 3,6
10	14,0 ± 2,8	8,9 ± 6,3	14,7 ± 1,8
30	22,5 ± 2,7	27,3 ± 4,8	26,3 ± 3,5

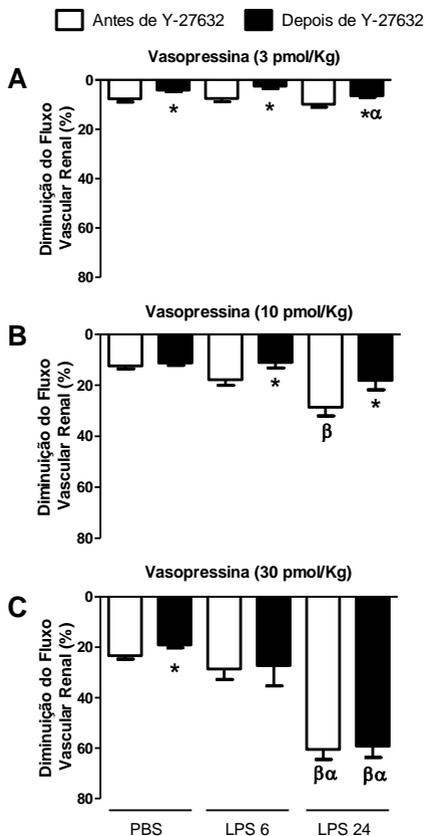
Efeitos das administrações de fenilefrina (Phe) e acetilcolina (Ach), nas doses crescentes de 3, 10 e 30 nmol/kg no fluxo microvascular do córtex renal de ratos anestesiados, 6 ou 24 horas após administração de PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (10 mg/kg, i.p.). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (*n* de 6 a 7 animais por grupo). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

Por sua vez, a vasopressina na dose de 30 pmol/kg, causou redução significativamente maior no fluxo microvascular renal dos animais endotoxêmicos (37,6 ± 8,3 e 62,9 ± 4,1%, LPS 6 e 24 horas, respectivamente), quando comparados ao grupo controle (15,6 ± 0,8%). Na dose de 10 pmol/kg, somente o grupo LPS 24 apresentou redução significativa quando comparado ao PBS (31,4 ± 2,5 e 10,8 ± 2,2%, respectivamente) (Figura 16).



**Figura 16: Redução do fluxo microvascular do córtex renal frente à administração de vasopressina em animais anestesiados e previamente tratados com PBS ou LPS.** Doses crescentes de vasopressina foram administradas em animais que receberam PBS ou LPS 6 ou 24 horas antes da realização do experimento. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos \* apresentam diferenças estatisticamente significativas ( $p < 0,05$ ) quando comparados ao respectivo controle (barras brancas). ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

Para avaliar a atividade da via Rho-A/Rho-quinase no fluxo cortical renal, e uma possível participação dessa via nos efeitos aumentados da AVP na PAM, na PPRV e no próprio fluxo microvascular renal, uma única dose de Y-27632 (0,1 mg/kg) foi administrada, por via endovenosa, nos animais, sendo o efeito da vasopressina avaliado antes e após esse tratamento. Na figura 17, nota-se que nas menores doses de AVP, o composto Y-27632 reduz significativamente a resposta vasoconstritora desta substância em todos os grupos. No entanto, na maior dose (AVP 30 pmol/kg), o mesmo composto não interfere na resposta da vasopressina nos grupos pré-tratados com LPS, mas ainda reduz a resposta no grupo controle (PBS).

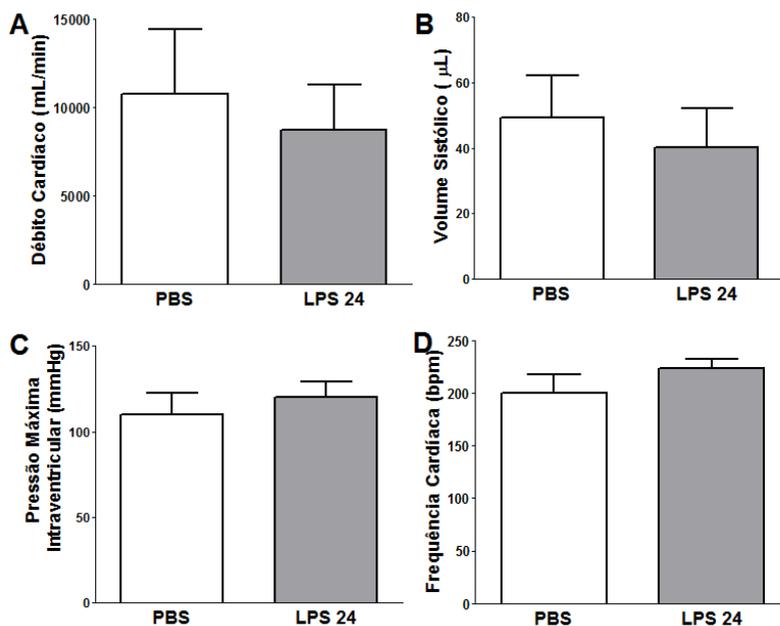


**Figura 17: Influência da inibição da Rho-quinase pelo composto Y-27632 na redução do fluxo microvascular do córtex renal em animais tratados com PBS ou LPS.** Os gráficos A, B e C expressam a porcentagem de diminuição no fluxo sanguíneo cortical renal causada por doses de vasopressina (3, 10 e 30 pmol/kg, respectivamente) antes e após administração de Y-27632 (0,1 mg/kg) em ratos pré-tratados, 6 ou 24 horas, com LPS (10 mg/kg, i.p.) ou PBS (1 ml/kg, i.p.). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes dos seus respectivos controles (barras brancas). Dados seguidos de  $\beta$  são estatisticamente diferentes do grupo PBS. Dados seguidos de  $\alpha$  são estatisticamente diferentes do grupo LPS 6 ( $p < 0,05$ ). Para comparação intra-grupo utilizou-se teste *t* de Student e entre os grupos, ANOVA de uma via seguida de Bonferroni.

#### 4.12 Avaliação *in vivo* de parâmetros intracardíacos em ratos controle e endotoxêmicos.

Os resultados descritos anteriormente a respeito do aumento da responsividade vascular encontrada nos experimentos *in vivo* e *in vitro* à vasopressina nos ratos do grupo LPS 24, motivaram a realização dos experimentos utilizando o cateter intracardíaco. Em uma comparação do débito cardíaco, volume sistólico, pressão intraventricular e frequência cardíaca, registrados entre os grupos PBS e LPS 24, mostrou que não existem diferenças estatisticamente significativas em quaisquer dos parâmetros avaliados (Figura 18).

Uma vez que os valores basais apresentaram-se semelhantes entre os grupos PBS e LPS 24, um segundo conjunto de experimentos priorizou a avaliação da resposta à vasopressina na pressão intraventricular e frequência cardíaca. A AVP causou um aumento dependente da dose na pressão intraventricular dos animais dos grupos PBS e LPS 24. Além disto, a frequência cardíaca também foi influenciada pela administração de AVP, sendo reduzida de maneira dependente da dose. Entretanto, em ambos os parâmetros mensurados, não houve diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (Tabela 7).



**Figura 18: Parâmetros mensurados a partir do cateter intraventricular em ratos tratados com PBS ou LPS.** Um cateter intraventricular foi inserido em ratos anestesiados 24 horas após administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou PBS (1 ml/kg, i.p.) (para detalhes metodológicos ver item 3.6). Débito cardíaco (A), volume sistólico (B), pressão intraventricular (C) e frequência cardíaca (D). Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 9$  animais por grupo). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. Teste *t* de *Student* para amostras não pareadas.

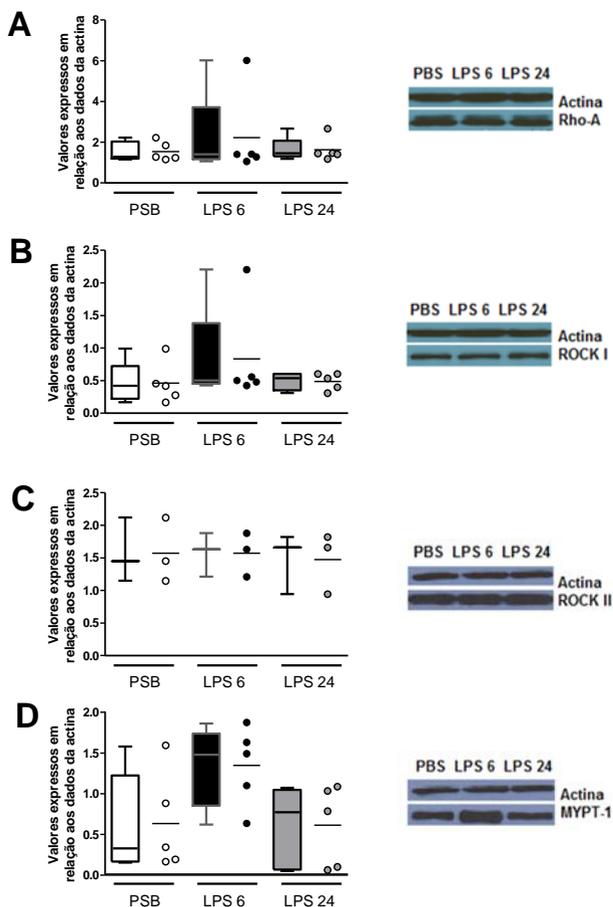
**Tabela 7: Parâmetros de função cardíaca alterados significativamente pela vasopressina em animais controle e endotoxêmicos, avaliados *in situ* por cateter intracardíaco.**

<b>Responsividade à vasopressina</b>		
VPN (pmol/kg, i.v.)	PBS	LPS 24
	<i>Δ Pressão Intraventricular Máxima (mm Hg)</i>	
3	10,3 ± 1,8	11,5 ± 4,5
10	18,5 ± 3,4	24,5 ± 9,1
30	58,0 ± 6,9	61,8 ± 10,8
	<i>Δ Frequência Cardíaca (bpm)</i>	
3	-6,3 ± 1,3	-6,5 ± 1,6
10	-13,9 ± 3,8	-11,3 ± 3,2
30	-30,1 ± 5,4	-36,6 ± 4,5

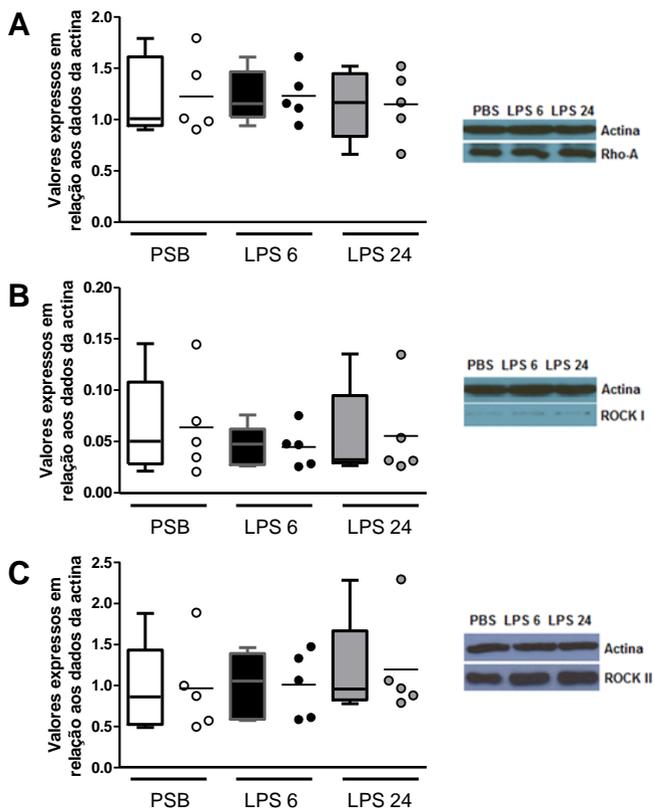
Os animais receberam PBS (1 ml/kg, i.p.) ou LPS (10 mg/kg, i.p.) 24 horas antes da realização dos experimentos. Resultados expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.

#### 4.13 Western Blot

Com o propósito de correlacionar os resultados *in vitro* e *in vivo*, a análise de expressão das proteínas da via Rho-A/Rho-quinase no sistema renal e em aorta de ratos previamente tratados com PBS ou LPS foi realizada. As figuras 19 e 20 demonstram as expressões da proteína Rho-A, das enzimas ROCK I e ROCK II, e da subunidade regulatória MYPT-1, no córtex e na medula renal, respectivamente. O tratamento com LPS (10 mg/kg, i.p.) não foi capaz de alterar a expressão de nenhuma das proteínas analisadas, tanto no córtex quanto na medula renal, quando estes foram comparados ao grupo PBS. Também não houve diferença estatística entre os grupos experimentais nos resultados em aorta (dados não mostrados).



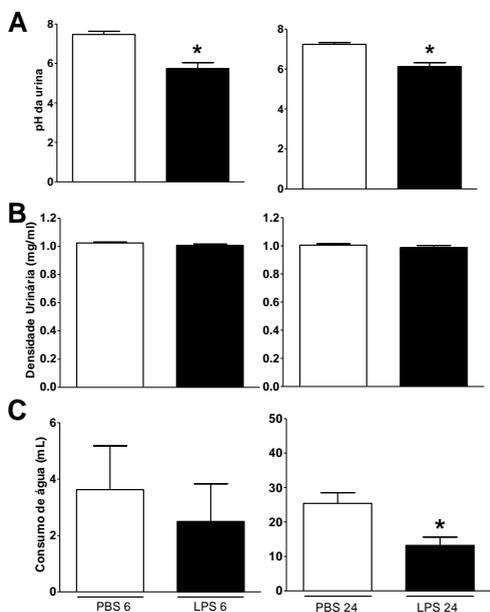
**Figura 19: Representações de imunoeletroforese e suas correspondentes análises de densitometria (em relação à actina) da proteína Rho-A, ROCK I, ROCK II e da MYPT-1 na medula renal de ratos endotoxêmicos.** As amostras da medula renal foram obtidas de rins de ratos previamente tratados com PBS (1 ml/kg) ou LPS (1 mg/kg) 6 ou 24 horas. Em A, expressão de Rho-A; em B, expressão de ROCK I; em C, expressão de ROCK II; e em D, expressão de MYPT-1. Dados expressos em mediana  $\pm$  valor mínimo e máximo e em média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$ , por grupo). ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni.



**Figura 20: Representações de imunoeletroforese e suas correspondentes análises de densitometria (em relação à actina) da proteína Rho-A, ROCK I e ROCK II no córtex renal de ratos endotoxêmicos.** As amostras do córtex renal foram obtidas de rins de ratos previamente tratados com PBS (1 ml/kg) ou LPS (1 mg/kg) 6 ou 24 horas. Em A, expressão de Rho-A; em B, expressão de ROCK I; e em C, expressão de ROCK II. Dados expressos em mediana  $\pm$  valor mínimo e máximo e em média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 5$ , por grupo). ANOVA de uma via, seguida de Bonferroni.

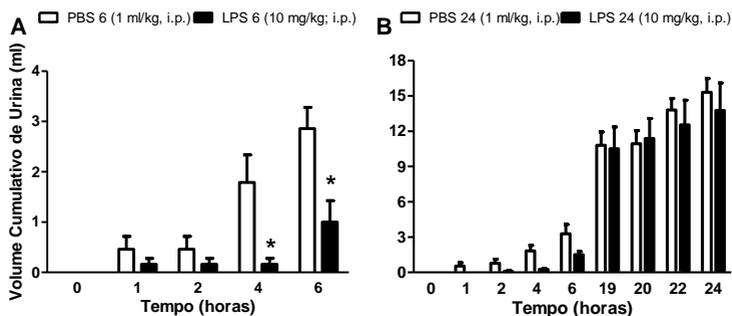
## 4.14 Avaliação da diurese

O funcionamento renal foi mensurado pela quantidade de urina coletada a cada tempo determinado e por parâmetros bioquímicos. As Figuras 21A, B e C representam os valores de pH, densidade e consumo de água, respectivamente. Os valores de densidade da urina e o consumo de água não foram diferentes estatisticamente dentre os grupos. No entanto, o valor do pH urinário dos animais tratados com LPS, 6 e 24 horas antes da análise, apresentou-se significativamente mais ácido, quando comparado ao grupo PBS.



**Figura 21: Análise da ingestão de água e de parâmetros de urina em animais controle e endotoxêmicos.** Em A, pH urinário; em B, densidade urinária (em mg/mL); e em C, consumo de água (em mL). Parâmetros mensurados em ratos tratados com PBS (1 ml/kg) ou LPS (10 mg/kg), 6 ou 24 horas antes da análise. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 8$ , por grupo). Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos seus respectivos controles (barras brancas). Teste *t* de Student para amostras não pareadas.

A quantidade de urina produzida pelos animais controles e endotoxêmicos está demonstrada na Figura 22. Nota-se que nas primeiras duas horas de coleta, não há diferença estatística entre os grupos. No entanto, nas análises da 4ª e da 6ª hora, os animais dos grupos tratados com LPS, 6 e 24 horas, apresentaram oligúria, quando comparados aos grupos PBS. No entanto, quando a análise é realizada nas últimas 6 horas do grupo LPS 24, a quantidade de urina torna-se similar à encontrada no grupo PBS 24 (Figura 19B).



**Figura 22: Avaliação da diurese de animais controle e endotoxêmicos.** Análise da quantidade de urina produzida após 6 ou 24 horas da injeção de LPS ou PBS, conforme legenda da figura. Os valores cumulativos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média ( $n = 8$ , por grupo). Dados seguidos de \* são estatisticamente diferentes ( $p < 0,05$ ) dos seus controles (barras brancas). ANOVA de duas vias, seguida de Bonferroni.





O quadro séptico é caracterizado por uma infecção, acompanhada da síndrome da resposta inflamatória sistêmica, que pode ou não evoluir para sepse severa e, posteriormente, para o choque séptico (Dellinger *et al.*, 2004). Apesar do aumento gradativo das pesquisas relacionadas à septicemia, a taxa de mortalidade associada a esta patologia não se encontra em declínio, o que intriga e instiga pesquisadores a buscarem novas táticas de estudo para melhor compreendê-la. Modelos animais que mimetizam a septicemia e o desenvolvimento do quadro de sepse têm sido muito utilizados para a compreensão de sua fisiopatologia, e principalmente, para a busca de novas estratégias terapêuticas que controlem a evolução de uma simples infecção à disfunção múltipla de órgãos e à morte.

Neste trabalho, nós utilizamos o modelo de endotoxemia induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias gram-negativas em ratos machos. Após padronizarmos a dose de 10 mg de LPS por quilograma de animal, fomos avaliar nosso modelo, de acordo com as características já descritas na literatura. Em um primeiro momento, a pressão arterial média e a frequência cardíaca de ratos anestesiados foram mensuradas. Na sexta hora após a administração de LPS, a pressão arterial média (PAM) basal encontrou-se diminuída e a frequência cardíaca aumentada, quando comparadas ao grupo controle. Por outro lado, as análises destes mesmos parâmetros 24 horas após a administração de LPS, não se mostraram alteradas, revelando o caráter agudo do modelo utilizado. Outro resultado importante, que nos ajudou a padronizar o modelo, foi a hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, como a fenilefrina, um agonista de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos. Novamente, o grupo LPS 6 horas mostrou-se menos responsivo a todas as doses de fenilefrina testadas, enquanto no grupo LPS 24, somente na dose de 30 nmol/kg esta mesma hiporresponsividade foi encontrada.

A administração de LPS de bactérias gram-negativas tem sido reportada como modelo experimental de endotoxemia e sepse em estudos básicos pré-clínicos. As principais características cardiovasculares presentes em ratos com endotoxemia induzida por este modelo são pressão arterial média e índice cardíaco diminuídos, e frequência cardíaca e

resistência vascular periférica aumentadas (Brackett *et al.*, 1985). Outra característica marcante é a hiporresponsividade à agentes vasoconstritores decorrente, principalmente, dos altos níveis de óxido nítrico, proveniente da NOS II, presente na sepse (Hollenberg, Cunnion & Zimmerberg, 1993). Desta maneira, nossos resultados iniciais confirmam o que a literatura descreve, tornando nosso modelo adequado para o estudo e correlação com o choque séptico.

A dosagem do NO de forma indireta pelo método de Griess, também foi utilizada como parâmetro para padronização do modelo em nosso laboratório. Nossos resultados revelaram um aumento significativo de NO<sub>2</sub> e NO<sub>3</sub> plasmáticos em ambos os grupos tratados com LPS quando comparados aos níveis encontrados no plasma dos animais do grupo controle. Estes dados corroboram com as evidências descritas na literatura por Kilbourn *et al.* (1990), que demonstraram que a hipotensão existente no choque séptico é decorrente do excesso de NO produzido durante esta patologia. No entanto, apesar do aumento de nitrato encontrado no plasma dos animais do grupo LPS 24, este não pode ser correlacionado com a hipotensão, uma vez que os animais deste grupo apresentaram a PAM semelhante à observada nos animais do grupo PBS. Isto nos leva a supor que sendo a endotoxemia induzida por LPS um modelo experimental agudo, os altos valores de nitrato encontrados 24 horas após injeção de LPS são decorrentes do acúmulo de NO produzido nas fases iniciais da endotoxemia e que análises mais tardias tendem a revelar concentrações próximas dos níveis basais nestes mesmos animais.

A avaliação da função renal, proposta neste trabalho para análise de danos funcionais renais causados pela administração de LPS, foi realizada através das dosagens plasmáticas de creatinina e uréia. A creatinina, constantemente produzida a partir da creatina, foi dosada pela primeira vez em 1886 por Jaffe e desde então tem sido utilizada como um marcador confiável de dano renal (Tsikas *et al.*, 2010). A uréia também é considerada um marcador renal, no entanto menos utilizado que a creatinina (Sodre *et al.*, 2007). As concentrações plasmáticas de creatinina e uréia encontraram-se aumentadas no grupo LPS 6 quando comparado ao grupo controle. No entanto, na 24<sup>a</sup> hora pós-

indução de endotoxemia, os valores tinham sido reestabelecidos aos basais. Em 2008, Chvojka *et al.* haviam evidenciado que a hipoperfusão renal, mesmo em um curto intervalo de tempo, pode levar ao desenvolvimento de falência renal aguda (FRA), patologia associada ao comprometimento da função renal, principalmente à taxa de filtração glomerular. Já em 2010, Boussekey *et al.* demonstraram que a endotoxemia induzida por LPS está associada à diminuição da perfusão renal e hipóxia microvascular. Estes achados nos sugerem que a administração de LPS, na dose de 10 mg/kg, em ratos machos causa hipotensão sistêmica, que é acompanhada pela diminuição da perfusão sanguínea para os rins, levando a danos teciduais agudos capazes de serem revertidos em curto espaço de tempo.

Após a padronização e validação dos modelos de endotoxemia induzida por LPS e de rim isolado e perfundido no nosso laboratório, fomos avaliar a reatividade vascular renal dos animais tratados com LPS 6 ou 24 horas antes dos experimentos. Os rins dos animais endotoxêmicos do grupo 24 horas apresentaram um aumento significativo na pressão de perfusão vascular renal basal, quando comparados aos rins dos animais tratados com PBS, demonstrando uma possível elevação do tônus vascular basal neste órgão. Alguns estudos já haviam evidenciado que a hipotensão sistêmica causada pela administração de LPS induz um aumento na resistência vascular renal, levando à sua vasoconstrição (Boffa *et al.*, 2004). Em conjunto com evidências da literatura, estes resultados com leito renal reforçam nossa premissa inicial de que os rins apresentam características peculiares durante o choque endotoxêmico, diferentes dos demais leitos periféricos quando analisados separadamente ou do organismo avaliado como um todo. Para avaliar a reatividade vascular renal utilizamos primeiramente a fenilefrina, pois esta também foi empregada na padronização do modelo de endotoxemia. A administração aguda (dose única de 30 nmol) deste agonista  $\alpha_1$  adrenérgico não revelou hiporreatividade nos rins dos animais endotoxêmicos. No entanto, quando expostas a doses crescentes e cumulativas desta mesma substância, as preparações renais do grupo LPS 24 horas mostraram-se hiporreativas às doses de 30 e 100 nmol, quando comparadas aos rins dos animais do grupo controle. Por sua vez, mesmo quando expostos à fenilefrina de forma

cumulativa, os rins dos animais do grupo LPS 6 horas não apresentaram qualquer hiporreatividade quando comparados ao grupo controle. Alguns estudos já haviam demonstrado esta manutenção da reatividade no leito vascular renal com a utilização de outros agentes vasoconstritores. Por exemplo, experimentos com noradrenalina não demonstraram diferenças estatisticamente significativas na reatividade vascular de rins de camundongos e coelhos que receberam LPS, quando comparados aos rins de animais controle (Boffa *et al.*, 2004; Li, Croce & Winquist, 1992; respectivamente).

Na clínica, muitas vezes o uso de doses elevadas de agentes vasoconstritores como a noradrenalina, não é eficaz no reestabelecimento da pressão arterial média durante um quadro de sepse severa, resultando no desenvolvimento de choque refratário às catecolaminas. Neste contexto, a vasopressina vem emergindo como fármaco de segunda opção no tratamento destes pacientes (Delmas *et al.*, 2005). No entanto, pouco se sabe sobre seu efeito, benéfico ou não, em leitos periféricos durante a sepse. Isso nos levou a avaliar a ação vascular desta substância no leito renal após indução de endotoxemia. A administração de doses crescentes e cumulativas de vasopressina nos rins dos animais do grupo LPS 24 demonstrou uma hiper-reatividade a este agente quando os efeitos foram comparados àqueles de rins dos animais do grupo PBS. Além disto, quando os rins foram expostos a doses crescentes e não-cumulativa, este aumento na responsividade à AVP tornou-se ainda mais evidente, além da pronunciada hiper-reatividade também presente no grupo LPS 6 horas (ver figura 6D). O aumento da reatividade sistêmica à vasopressina em pacientes sépticos vem sendo investigado há algum tempo. Uma provável correlação pode estar na variação da concentração plasmática de AVP durante a evolução da sepse. Nos estágios iniciais do quadro séptico, foi evidenciado tanto em humanos (Sharshal *et al.*, 2003) quanto em animais experimentais (Brackett *et al.*, 1985), um aumento da concentração plasmática de AVP. No entanto, após este estágio agudo inicial, o nível de vasopressina retorna ao basal em decorrência, principalmente, da depleção de seus estoques ou por inibição da síntese e liberação deste hormônio. É durante este estágio tardio que ocorre uma sensibilização dos receptores para a vasopressina, causando o

aumento da sua ação vascular, que segundo Reid (1994), pode ser explicada pela modulação exercida pelo NO, que em níveis elevados, como no caso da sepse, inibe a liberação de AVP. Entretanto, o aumento da reatividade renal à vasopressina ainda não havia sido demonstrado, sugerindo a necessidade de investigação dos mecanismos relacionados a este evento.

Para aproximar o nosso estudo com aquilo que ocorre na prática clínica, os rins obtidos de animais de todos os grupos experimentais foram perfundidos com Phe ou com AVP durante 30 minutos. Os resultados obtidos revelaram que os rins dos animais dos grupos LPS 6 e 24 não foram capazes de sustentar a contração máxima induzida pela fenilefrina. No entanto, quando o estímulo contrátil foi induzido pela vasopressina, os rins dos animais destes grupos apresentaram uma contração máxima maior do que do grupo controle, além de mantê-la sustentada após os 30 minutos de análise. Estes resultados aproximam nossos achados de dados de estudos já publicados, especialmente no que se refere à dessensibilização de receptores e hiporreatividade sistêmica à catecolaminas.

Recentemente a literatura vem expandindo a busca de vias moleculares envolvidas nas características clínicas da sepse. Neste contexto, a participação da via Rho-A/Rho-quinase vem sendo investigada em estudos utilizando leitos não-renais, como por exemplo artérias mesentéricas (Da Silva-Santos *et al.*, 2009; McGown *et al.*, 2011). No entanto, ainda são escassos os trabalhos que avaliam a reatividade vascular e a participação da via Rho-A/Rho-quinase no leito vascular renal durante o choque séptico. A partir destas evidências, juntamente com nossos achados de aumento da reatividade vascular renal à vasopressina, fomos investigar um possível envolvimento da via Rho-A/Rho-quinase. Após perfundir, durante 30 minutos as preparações renais com fenilefrina ou vasopressina diluídas em Krebs modificado, doses crescentes do composto Y-27632, um inibidor da enzima ROCK, foram administradas nas preparações. No entanto, não houve diferença estatística quando a resposta vasodilatadora ao composto Y-27632 foi analisada e comparada entre os grupos experimentais, tanto para a pré-constricção com fenilefrina quanto para vasopressina. Estes resultados nos levaram a realização de outro experimento, uma vez que o delta

da contração máxima induzida por Phe e AVP não apresentavam similaridade quando os grupos experimentais eram comparados. Este experimento extra foi realizado com o objetivo de nivelar estes deltas e refazer a CDR para o inibidor da Rho-quinase. Porém, os resultados obtidos foram semelhantes aos iniciais, demonstrando que a diferença na contração máxima obtida nos diferentes grupos não interfere no resultado final quanto a porcentagem de relaxamento induzida por doses crescentes do composto Y-27632.

Um segundo conjunto de experimentos também foi realizado para investigar o papel da via Rho-A/Rho-quinase na hiper-reatividade renal à AVP. A perfusão do leito vascular renal com 0,3  $\mu\text{mol/L}$  de composto Y-27632 reduziu a ação vasoconstritora da AVP apenas no grupo LPS 6 horas, sem causar quaisquer alterações nas preparações obtidas dos grupos LPS 24 e controle.

Este conjunto de resultados no leito renal pode ser explicado não somente pela variação nos níveis plasmáticos de vasopressina, mas também por intermédio da via Rho-A/Rho-quinase. Vinte e quatro horas após a administração de LPS, há um aumento na responsividade renal à AVP, quando comparamos com a resposta nos rins dos animais do grupo controle, creditada, principalmente, aos níveis plasmáticos reduzidos de AVP (Bucher *et al.*, 2002), e uma provável sensibilização de receptores do tipo V1. No entanto, o grupo LPS 6 horas também apresenta hiper-reatividade vascular renal à AVP, mesmo com elevados níveis plasmáticos desta substância, o que poderia levar a uma dessensibilização dos receptores V1 e uma diminuição da sua resposta vasopressora. Além disto, nota-se que neste grupo experimental (LPS 6 horas), a perfusão com o composto Y-27632 (em uma dose que foi inefetiva em preparações do grupo controle) reduziu a resposta à AVP. Cavarape *et al.* (2003) descreveram que os vasos de grande calibre do leito renal, quando estimulados com vasopressina, contraem através da ativação da enzima Rho-quinase, o que sugere uma possível correlação da hiper-reatividade observada no grupo LPS 6 horas com o aumento da ação ou da participação da via Rho-A/Rho-quinase.

A fim de comparar nossos achados em rins com outro leito vascular, avaliamos a reatividade da vasopressina e a influência da via Rho-A/Rho-quinase em aorta de ratos endotoxêmicos. Nossos resultados revelaram que diferentemente do leito renal, as aortas dos ratos tratados com LPS apresentam hiporreatividade tanto à contração mediada por receptores  $\alpha 1$  adrenérgicos, quanto por receptores do tipo V1 de vasopressina, bem como a contração mediada por solução nutritiva despolarizante (KCl 60 mM). Além disto, o efeito do composto Y-27632, avaliado através de sua CCR, é mais potente em anéis de aorta dos animais do grupo LPS 6 horas, quando comparados ao PBS. A redução da reatividade em aorta de animais endotoxêmicos já foi demonstrada em vários estudos, principalmente utilizando o agonista  $\alpha 1$  fenilefrina. Sun e Guo (1996) demonstraram que um dos fatores relacionados a redução da responsividade é o GMPc, demonstrando mais uma vez a influência da via do NO na sepse. No entanto, o mecanismo que envolve a hiporreatividade à AVP ainda não foi elucidado. A literatura nos mostra que um dos principais mecanismos de contração de músculo liso vascular induzido pela vasopressina é por ativação da via da Rho-A/Rho-quinase. Desta maneira, o deslocamento da CCR de Y-27632 nas aortas dos animais do grupo LPS 6 horas pode indicar uma redução na atividade da via Rho-A/Rho-quinase nesses vasos, devido a diminuição da concentração de composto necessária pra atingir 50% da resposta máxima.

Além da reatividade vascular renal *in vitro*, neste trabalho nos propomos a investigar os efeitos da vasopressina em protocolos *in vivo*. A vasopressina causou um aumento significativamente maior na pressão arterial média sistêmica de animais do grupo LPS 24, quando comparados aos efeitos obtidos no grupo controle. Entretanto, no grupo LPS 6 horas, não houve alteração significativa na ação da AVP em relação ao grupo PBS, nos mostrando a existência de diferenças nos diversos leitos vasculares quanto à resposta à AVP durante a sepse.

Por sua vez, os efeitos da acetilcolina sobre a PAM destes mesmos animais não diferiu entre os grupos experimentais, revelando que, sejam quais forem as alterações

envolvidas na hiper-reatividade à vasopressina, tais eventos não envolvem mudanças generalizadas em respostas celulares à agentes vasoativos.

A avaliação do fluxo sanguíneo cortical por laser doppler não revelou diferenças no fluxo basal entre os grupos tratados com LPS e o grupo controle. Diferente dos nossos resultados, Nitescu *et al.* (2008) encontraram uma diminuição significativa no fluxo cortical basal em ratos, 16 h após o tratamento com LPS. Também já foi demonstrado que 4 horas após infusão contínua de LPS por 30 minutos, o fluxo sanguíneo renal, macro e microvascular, encontra-se diminuído (Aksu *et al.*, 2011). A diferença do protocolo utilizado nos trabalhos citados pode ter sido crucial para a divergência de resultados obtidos (para mais detalhes ver Langenberg *et al.*, 2005).

Em seguida, avaliamos o efeito de substâncias vasoativas sobre o fluxo microvascular do córtex renal. Tanto a fenilefrina quanto a acetilcolina reduziram o fluxo microvascular do córtex renal de maneira dose dependente, porém sem diferença significativa entre os grupos experimentais. Entretanto, a vasopressina reduziu de forma significativamente maior o fluxo cortical dos animais tratados com LPS, tanto 6 quanto 24 horas, quando comparados ao grupo controle, sugerindo que a hiper-reatividade renal *in vivo* à vasopressina não é suprimida por mecanismos compensatórios, como pode acontecer com seus efeitos na PAM dos animais do grupo LPS 6 horas. Portanto, nossos resultados demonstram que também *in vivo* ocorrem alterações importantes na reatividade microvascular renal à vasopressina nos animais tratados com LPS, tanto nos tempos iniciais quanto nos mais avançados da endotoxemia. Um estudo recente, publicado em 2011, demonstrou que possíveis disfunções na microcirculação renal de animais tratados com LPS podem ser causadas por aumento da resposta inflamatória sistêmica e local (Legrand *et al.*, 2011). Apesar do nosso estudo não ter especulado qualquer relação entre a hiper-reatividade à vasopressina e a resposta inflamatória, este pode ser um dos caminhos que levariam à explicação destes achados.

Para avaliarmos se a potencialização dos efeitos da vasopressina sobre a pressão arterial e sobre o fluxo sanguíneo

dos rins teria correlação com alterações cardíacas, utilizamos um cateter intraventricular de medida pressão-volume. Observamos que, além dos valores basais, as respostas cardíacas frente à administração de vasopressina não se mostraram alteradas quando comparados os grupos experimentais. Os estudos que existem acerca da ação da vasopressina no coração utilizando cateter intraventricular ainda são escassos e contraditórios. Um estudo em cães saudáveis demonstrou que a infusão de baixas doses de vasopressina causa aumento da pressão ventricular, da resistência sistêmica e elastância arterial, uma diminuição na frequência cardíaca e do volume sistólico (Cheng *et al.*, 1993). Apesar de serem espécies diferentes, nosso trabalho também encontrou estes resultados, e além de ratos controles, também avaliamos a ação da AVP nos ratos endotoxêmicos. Nossos dados sugerem que a hiper-reatividade vascular à AVP observada nos animais tratados com LPS não é decorrente de mecanismos cardíacos, mas sim de alterações vasculares.

Nós também avaliamos a importância da via Rho-A/Rho-quinase para a hiper-reatividade à vasopressina *in vivo*. Em animais do grupo controle (PBS), a administração intravenosa do composto Y-27632 (um inibidor da enzima Rho-quinase, na dose de 0,1 mg/kg), foi capaz de reduzir parcialmente o aumento da PAM provocado por todas as doses de vasopressina utilizadas. Entretanto, no grupo LPS 6 esse mesmo tratamento não influenciou a resposta à nenhuma das doses de AVP, enquanto no grupo LPS 24 somente a menor dose de vasopressina (3 pmol/kg) teve seu efeito diminuído pelo Y-27632. De forma muito semelhante ao observado na pressão arterial sistêmica, a inibição da Rho-quinase não foi capaz de diminuir a redução de fluxo sanguíneo renal causado pela maior dose de vasopressina, tanto no grupo LPS 6 como no grupo LPS 24, embora tenha sido efetiva contra as menores doses de vasopressina (3 e 10 pmol/kg). É importante destacar que, em animais do grupo PBS, o composto Y27632 reduziu significativamente (~40 e 20%) a redução de fluxo causada por 3 e 30 nmol/kg de vasopressina, respectivamente.

Bauer e Parekh (2003) demonstraram que no leito vascular renal, em condições fisiológicas, a ativação da ROCK é fundamental para a contração vascular mediada por agonistas

como a vasopressina, angiotensina II e noradrenalina. Este estudo juntamente com os achados do nosso trabalho podem indicar que alterações na ação da vasopressina no leito vascular renal podem estar relacionadas à mudanças na atividade na via da Rho-A-Rho-quinase. A menor eficácia do composto Y-27632 em reduzir a ação da vasopressina sobre o fluxo renal pode indicar um aumento da atividade da via Rho-A/Rho-quinase no leito vascular renal, contribuindo, ao menos em parte, para o maior efeito sistêmico da AVP sobre a PAM durante o choque endotoxêmico. Diversos estudos têm mostrado que tanto a redução crônica como aguda do fluxo sanguíneo renal, ainda que de regional, pode estar associada a elevação da pressão arterial sistêmica (Mattson *et al*, 1994; Guild *et al.*, 2002).

O aumento na expressão renal de algumas das proteínas presentes na cascata de sinalização da via Rho-A/Rho-quinase poderia explicar o efeito reduzido do composto Y-27632 no fluxo sanguíneo renal dos animais tratados com LPS. Para checar essa possibilidade, avaliamos os níveis de expressão das proteínas Rho-A, ROCK I, ROCK II e MYPT-1 tanto no córtex quando na medula renal dos animais previamente tratados com PBS ou LPS. Apesar de não haver diferença estatística na expressão das proteínas acima mencionadas, amostras do córtex renal de vários animais do grupo LPS 6 horas apresentaram índices aumentados na expressão da subunidade funcional da enzima miosina fosfatase (MYPT-1), que pode indicar que nas fases iniciais do choque endotoxêmico há um aumento na atividade da via Rho-A/ROCK, enzima responsável pela fosforilação da MYPT-1, resultando na redução da atividade da miosina fosfatase e facilitando a manutenção da contração da vasculatura, ao menos em resposta à vasopressina. Embora não tenha sido possível avaliar a expressão da MYPT-1 na medula renal, encontramos índices aumentados na expressão da enzima ROCK II na medula renal de amostras de vários animais. Novos experimentos devem ser realizados para avaliar a importância desses achados para a reatividade vascular renal à vasopressina.

Baseado em publicações que relatam variações na concentração plasmática de vasopressina (Holmes *et al.*, 2001) e na importância desta substância na hemodinâmica renal, nós

avaliamos a diurese dos animais tratados com LPS e PBS. A fim de analisarmos os diferentes estágios do nosso modelo, a urina foi coletada durante as 6 primeiras horas após a administração de LPS e nas 6 últimas horas, quando a diurese foi mensurada nos animais do grupo LPS 24 horas. Demonstramos que ao final das 6 primeiras horas de coleta, os animais endotoxêmicos apresentam diminuição na produção de urina. No entanto, quando a análise se prolonga pelas 24 horas, nota-se que a diurese se reestabelece, com valores similares aos encontrados nos animais do grupo controle.

A ação da vasopressina sobre a regulação da volemia e controle da diurese é mediada por receptores denominados V2. Estes receptores são do tipo acoplado à proteína G e estão presentes principalmente nos ductos coletores e nas células endoteliais (Orloff & Handler, 1967). O excesso de vasopressina produzida na fase inicial da sepse pode ser o responsável pela diminuição na produção de urina neste período, uma vez que a estimulação dos receptores do tipo V2 ativa a adenilato ciclase e consequentemente aumenta os níveis celulares de AMPc, que por ativação de proteínas quinases levam à produção e à fusão de canais de reabsorção de água, denominados aquaporinas, no ducto coletor (Delmas *et al.*, 2005). No entanto, sabemos que na fase tardia do choque endotoxêmico, os níveis plasmáticos de AVP diminuem, o que pode explicar o retorno da diurese a valores normais no período próximo às 24 h pós LPS. Este resultado, associado aos resultados de uréia e creatinina plasmáticas, nos permite propor que o choque endotoxêmico induzido por LPS causa uma disfunção renal aguda durante as primeiras horas pós administração de LPS, que ao longo das 24 horas tende a retornar à normalidade. A relevância dos efeitos vasculares da AVP na redução ou no reestabelecimento da diurese durante as fases inicial e tardia da endotoxemia, bem como participação de componentes da via Rho-A/Rho-quinase nesse processo, permanecem por ser investigadas.



Em resumo, os principais achados deste trabalho foram:

- ✗ o modelo de endotoxemia induzida por LPS, apesar de suas limitações, causou hipotensão e hiporreatividade vascular, além do aumento na produção de NO, demonstrando ser um modelo de alta reprodutibilidade;
- ✗ assim como nos experimentos *in vivo* de pressão arterial média e fluxo microvascular do córtex renal, os rins isolados dos animais endotoxêmicos também apresentam hiporreatividade à fenilefrina e aumento da responsividade à vasopressina;
- ✗ a administração de Y-27632, um inibidor da enzima ROCK, em quantidade insuficiente para influenciar a reatividade à vasopressina em preparações controle, reduziu a ação da vasopressina nos rins dos animais LPS 6 horas, demonstrando possíveis modificações na ativação desta via no leito vascular renal;
- ✗ ao contrário do rim isolado e perfundido, anéis de aorta de ratos endotoxêmicos apresentaram hiporeatividade à vasopressina, além de maior sensibilidade ao efeito relaxante do composto Y-27632;
- ✗ a análise *in vivo*, sugeriu um possível aumento na ativação da via Rho-A/Rho-quinase pela vasopressina em animais endotoxêmicos, uma vez que a administração de doses efetivas de Y-27632 não inibiu a ação vasoconstritora da vasopressina como ocorreu nos animais do grupo controle;
- ✗ o aumento da responsividade à vasopressina não foi influenciada por alterações cardíacas causadas pela administração de LPS, pois não houve diferença estatística entre os grupos experimentais nos parâmetros avaliados pelo cateter intracardíaco;
- ✗ a análise da expressão renal das proteínas da via Rho-A/Rho-quinase não revelou diferença estatística entre os grupos experimentais, embora diversos animais tenham apresentado índices aumentados de MYPT-1 no córtex (LPS 6 h) ou de ROCK II (LPS 24 h), na medula renal;
- ✗ a indução de choque endotoxêmico reduziu a diurese dos animais durante as seis primeiras horas, no entanto ao final da análise, tempo de 24 horas, a produção de urina foi normalizada.

Nossos resultados demonstram que durante o choque endotoxêmico os efeitos da vasopressina sobre a pressão arterial estão aumentados o que pode decorrer, pelo menos em parte, de uma maior responsividade do leito vascular renal. As alterações produzidas podem ter correlação com mudanças nas vias de sinalização intracelular envolvidas na manutenção do tônus vascular, como a via Rho-A/Rho-quinase. Esta via parece influenciar tanto a reatividade vascular renal, quanto as alterações sistêmicas e o fluxo microvascular renal.



---

## **7. Referências bibliográficas**

AMANO, M., CHIHARA, K., NAKAMURA, N., KANEKO, T., MATSUURA, Y., KAIBUCHI, K. The COOH terminus of Rho-kinase negatively regulates rho-kinase activity, **J. Biol. Chem.** 274, 32418–32424, 1999.

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. **Crit Care Med.**, v. 29, n. 7, 2001.

AKSU, U., BEZEMER, R., DEMIRCI, C., INCE, C. Acute effects of balanced vs unbalanced colloid resuscitation on renal macro- and microcirculatory perfusion during endotoxemic shock. **Shock**, 2011. Artigo aceito para publicação. DOI: 10.1097/SHK.0b013e31823ca89c.

BAUER, J., PAREKH, N. Variations in cell signaling pathways for different vasoconstrictor agonists in renal circulation of the rat. **Kidney International**, v. 63, pp. 2178–2186, 2003.

BENJAMIM, C. F. **Present understanding of mediators and experimental models of sepsis.** Ribeirão Preto In: Simpósio: MEDICINA INTENSIVA - 3ª PARTE 34: 18-26, jan./mar. 2001.

BLANCO, J., MURIEL-BOMBÍN, A., SAGREDO, V., TABOADA, F., GANDÍA, F., TAMAYO, L., COLLADO, J., GARCÍA-LABATTUT, A., CARRIEDO, D., VALLEDOR, M., DE FRUTOS, M., LÓPEZ, M.-J., CABALLERO, A., GUERRA, J., ÁLVAREZ, B., MAYO, A., VILLAR, J. Incidence, organ dysfunction and mortality in severe sepsis: a Spanish multicentre study. **Critical Care.**, v. 12, n. 6, dec. 2008.

BOFFA, J.-J., ARENDSHORST, W. J. Maintenance of Renal Vascular Reactivity Contributes to Acute Renal Failure during Endotoxemic Shock. **J Am Soc Nephrol**, 16: 117–124, 2005.

BOFFA, J.-J., JUST, A., COFFMAN, T. M., ARENDSHORST, W. J. Thromboxane receptor mediates renal vasoconstriction and contributes to acute renal failure in endotoxemic mice. **J Am Soc Nephrol.**, 15: 2358–2365, 2004.

BOUSSEKEY, N., DARMON, R., LANGLOIS, J., ALFANDARI, S., DEVOS, P., MEYBECK, A., CHICHE, A., GEORGES, H., LEROY, O. Resuscitation with low volume hydroxyethylstarch 130 kDa/0.4 is not associated with acute kidney injury. **Crit Care** 14:R40, 2010.

BRACKETT, D. J., SCHAEFER, C. F., TOMPKINS, P., FAGRAEUS, L., PETERS, L. J., WILSON, M. F. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. **Circ Shock.**, 17(4):273-84, 1985.

BRYAN, N. S., GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med.**, 1;43(5):645-57, sep 2007.

BUCHER, M., HOBBAHN, J., TAEGER, K., KURTZ, A. Cytokine-mediated downregulation of vasopressin V1A receptors during acute endotoxemia in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 282, R979-R984, 2002.

BURRIDGE, K., WENNERBERG, K. Rho and Rac take center stage. **Cell** 116: 167–179, 2004.

CAVARAPE, A., BAUER, J., BARTOLI, E., ENDLICH, K., PAREKH, N. Effects of angiotensin II, arginine vasopressin and tromboxane A2 in renal vascular bed: role of rho-kinase. **Nephrol Dial Transplant**, 18, 1764-1769, 2003.

CHENG, C. P., IGARASHI, Y., KLOPFENSTEIN, H. S., APPLGATE, R.J., SHIHABI, Z., LITTLE, W. C. Effect of

vasopressin on left ventricular performance. **Am J Physiol.**, 264(1 Pt 2):H53-60, jan 1993.

CHITALEY, K., WEBB, R. C. Nitric oxide induces dilation of rat aorta via inhibition of rho-kinase signaling. **Hypertension** 39: 438–442, 2002.

CHVOJKA, J., SYKORA, R., KROUZECKY, A., RADEJ, J., VARNEROVA, V., KARVUNIDIS, T., HES, O., NOVAK, I., RADERMACHER, P., MATEJOVIC, M. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. **Crit Care** 12:R164, 2008.

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**, v. 17, n. 1, p. 70–76, 2002.

DA SILVA-SANTOS, J. E., CHIAO, C.-W., LEITE, R., WEBB, R. C. The Rho-A/Rho-kinase pathway is up-regulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphate-dependent mechanisms during endotoxemia in small mesenteric arteries. **Crit Care Med**, v. 37, n. 5, 2009.

DELLINGER, R. P., CARLET, J. M., MASUR, H., GERLACH, H., CALANDRA, T., COHEN, J., GEA-BANACLOCHE, J., KEH, D., MARSHALL, J. C., PARKER, M. M., RAMSAY, G., ZIMMERMAN, J. L., VINCENT, J. L., LEVY, M. M. Surviving Sepsis Campaign guidelines for the management of severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med**, 32:858–873, 2004.

DELMAS, A., LEONE, M., ROUSSEAU, S., ALBANÈSE, J., MARTIN, C. Clinical review: Vasopressin and terlipressin in septic shock patients. **Critical Care**, v. 9, n. 2, p. 212-222, abr 2005.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, 112: 321S-329S, 1997.

DOI, K., LEELAHAVANICHKUL, A., YUEN, P. S. T., STAR, R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 10, Oct. 2009.

ETIENNE-MANNEVILLE, S., HALL, A. Rho GTPases in cell biology, **Nature**, 420: 629–635, 2002.

ETO, M., KITAZAWA, T., BRAUTIGAN, D. L. Phosphoprotein inhibitor CPI-17 specificity depends on allosteric regulation of protein phosphatase-1 by regulatory subunits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 101: 8888–8893, 2004.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B.. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 46, n. 3, Sept. 2000.

FLYNN, A., MANI, B. C., MATHER, P. J. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. **Heart Fail Rev**, 15:605–611, 2010.

FURCHGOTT, R. F., ZAWADZKI, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature (Lond.)** 288: 373-376, 1980.

GUILD, S. J., EPPEL, G. A., MALPAS, S. C., RAJAPAKSE, N. W., STEWART, A., EVANS, R.G. Regional responsiveness of renal perfusion to activation of the renal nerves. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.**, 283(5):R1177-86, nov 2002.

GUYTON, A. C. Blood pressure control--special role of the kidneys and body fluids. **Science**, 28;252(5014):1813-6, jun 1991.

HERON, M. Deaths: leading causes for 2007. **Natl Vital Stat Rep.** 26, 59(8):1-95, aug. 2011.

HIRATA, K., KIKUCHI, A., SASAKI, T., KURODA, S., KAIBUCHI, K., MATSUURA, Y., SEKI, H., SAIDA, K., TAKAI, Y. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. **J Biol Chem**, 267: 8719–8722, 1992.

HOLLENBERG, S. M., CUNNION, R. E., ZIMMERBERG, J. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. **Am J Physiol.**, 264 (2 Pt 2):H660-3. feb 1993.

HOLMES, C. L., PATEL, B. M., RUSSELL, J. A., WALLEY, K. R. Physiology of Vasopressin Relevant to Management of Septic Shock. **Chest**, 120, 989-1002, 2001.

HONG, F., HALDEMAN, B. D., JACKSON, D., CARTER, M., BAKER, J. E., CREMO, C. R. Biochemistry of smooth muscle myosin light chain kinase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 510, Issue 2, 135-146, jun 2011.

HUTCHINSON, P. J., PALMER, R. M., MONCADA, S. Comparative pharmacology of EDRF and nitric oxide on vascular strips. **Eur J Pharmacol.**, 23;141(3):445-51, sep 1987.

ISHIZAKI, T., MAEKAWA, M., FUJISAWA, K., OKAWA, K., IWAMATSU, A., FUJITA, A., WATANABE, N., SAITO, Y., KAKIZUKA, A., MORII, N., NARUMIYA, S. The small GTP-binding protein Rho binds to and activates a 160 kDa Ser/Thr protein kinase homologous to myotonic dystrophy kinase, **EMBO J.** 15: 1885–1893, 1996.

JAFFE, M. Z. Methods determining creatinine. **Physiol Chem**, v. 10, p. 39-40, 1886.

KILBOURN, R. G., GROSS, S. S., JUBRAN, A., ADAMS, J., GRIFFITH, O. W., LEVIS, R., LODATO, R. F.  $N^G$ -Methyl-L-

arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: Implications for the involvement of nitric oxide. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 87, pp. 3629-3632, may. 1990.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, n.259, p.680-5, 1970.

LANGENBERG, C., BELLOMO, R., MAY, C., WAN, L., EGI, M., MORGERA, S. Renal blood flow in sepsis. **Crit Care.**, 9(4):R363-74, aug 2005.

LEGRAND, M., BEZEMER, R., KANDIL, A., DEMIRCI, C., PAYEN, D., INCE, C. The role of renal hypoperfusion in development of renal microcirculatory dysfunction in endotoxemic rats. **Intensive Care Med.**, 37, 1534–1542, 2011.

LEVER, A., MACKENZIE, I. Sepsis: definition, epidemiology and diagnosis. **BMJ**, v.335, n.27, p. 879-83, 2007.

LEVY, M. M., FINK, M. P., MARSHALL, J. C., ABRAHAM, E., ANGUS, D., COOK, D., COHEN, J., OPAL, S. M., VINCENT, J. L., RAMSAY, G. 2001 SCCM/ ESICM/ ACCP/ ATS/ SIS international sepsis definitions conference. **Intensive Care Med.**, 29:530–538, 2003.

LEVY, E. M., VISCOLI, C. M., HORWITZ, R. I. The effect of acute renal failure on mortality. A cohort analysis. **JAMA** 275:1489, 1996.

LEVY, R. J., DEUTSCHMAN, C. S. Evaluating myocardial depression in sepsis. **Shock**, 22, pp. 1–10, 2004.

LI, T., CROCE, K., WINQUIST, R. J. Regional Differences in the Effects of Septic Shock On Vascular Reactivity in the Rabbit. **THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS**, v. 261, n. 3, 959-63, 1992.

LUCAS, K. A., PITARI, G. M., KAZEROUNIAN, S., RUIZ-STEWART, I., PARK, J., SCHULZ, S., CHEPENIK, K. P., WALDMAN, S. A. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP, **Pharmacol. Rev.** 52: 375–414, 2000.

MADAULE, P., AXEL, R. A novel ras-related gene family. **Cell**, 41, 31-40, 1985.

MARTINS E SILVA, J. From the discovery of the circulation of the blood to the first steps in hemorheology: part 1. **Rev Port Cardiol.**, 28(11):1245-68, nov. 2009a.

MARTINS E SILVA, J. From the discovery of the circulation of the blood to the first steps in hemorheology: part 2. **Rev Port Cardiol.**, 28(12):1405-39, dec. 2009b.

MATTSON, D. L., LU, S., NAKANISHI, K., PAPANЕК, P. E., COWLEY, A. W. JR. Effect of chronic renal medullary nitric oxide inhibition on blood pressure. **Am J Physiol.**, ;266(5 Pt 2):H1918-26, may 1994.

McGOWN, C. C., BROWN, N. J., HELLEWELL, P. G., BROOKES, Z. L. S. ROCK induced inflammation of the microcirculation during endotoxemia mediated by nitric oxide synthase. **Microvascular Research**, 81, 281–288, 2011.

MEMBERS OF THE AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/ SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE COMMITTEE. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Crit Care Med.**, 20: 864–874, 1992.

MONCADA, S., PALMER, R. M., HIGGS, E. A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochem Pharmacol.**, 1, 38(11), 1709-15, jun 1989.

NAKAGAWA, O., FUJISAWA, K., ISHIZAKI, T., SAITO, Y., NAKAO, K., NARUMIYA, S. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/ threonine kinase in mice. **FEBS Lett.**, 392, 189–193, 1996.

NARUMIYA, S. The Small GTPase Rho: Cellular Functions and Signal Transduction. **J. Biochem.**, 120, 215-228, 1996.

NETEA, M.G., MEER, J. W. M., DEUREN, M., KULBERG, B. J. Proinflammatory cytokines and sepsis syndrome: not enough, or too much of a good thing? **Trends Immunol**, 24(5): 254-258, 2003.

NEVEU, H., KLEINKNECHT, D., BRIVET, F., LOIRAT, P., LANDAIS, P. Prognostic factors in acute renal failure due to sepsis. Results of a prospective multicentre study. The French Study Group on Acute Renal Failure. **Nephrol Dial Transplant** 11: 293–299, 1996.

NITESCU, N., GRIMBERG, E., GURON, G. Low-dose candesartan improves renal blood flow and kidney oxygen tension in rats with endotoxin-induced acute kidney dysfunction. **Shock**, 30(2):166-72, aug 2008.

OPPERT, M., ENGEL, C., BRUNKHORST, F. M. ET AL. Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock—a significant independent risk factor for mortality: Results from the German Prevalence Study. **Nephrol Dial Transplant**; 23:904, 2008.

ORLOFF, J., HANDLER, J. The role of adenosine 3,5-phosphate in the action of antidiuretic hormone. **Am J Med.**, 42:757–768, 1967.

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.**, 1, 113(3):227-42, aug. 1990.

PUETZ, S., LUBOMIROV, L. T., PFITZER, G. Regulation of smooth muscle contraction by small GTPases. **Physiology**, v. 24, 342-356, dec. 2009.

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. **JAMA**, 273:117–123, 1995.

RANGEL-FRAUSTO, M.S. Sepsis: Still Going Strong. **Archives of Medical Research**. 36: 672–681, 2005.

REID, I. A. Role of nitric oxide in the regulation of renin and vasopressin secretion. **Front Neuroendocrinol**, 15, 351–383, 1994.

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.

ROBERTSON, C. M., COOPERSMITH, G. M. The systemic inflammatory response syndrome. **Microbes and Infection**, 8: 1382-1389, 2006.

SALVO, I., DE CIAN, W., MUSICCO, M., LANGER, M., PIADENA, R., WOLFLER, A., MONTANI, C., MAGNI, E. The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. **Intensive Care Med.**, 21 Suppl 2:S244-9, nov. 1995.

SCHOTTMUELLER, H. Wesen und Behandlung der Sepsis. *In*: VINCENT, J.-L. Clinical sepsis and septic shock—definition, diagnosis and management principles. **Langenbecks Arch Surg.**, 393:817–824, 2008.

SEBBAGH, M., RENVOIZE, C., HAMELIN, J., RICHE, N., BERTOGLIO, J., BREARD, J. Caspase-3- mediated cleavage of ROCK I induces MLC phosphorylation and apoptotic membrane blebbing, **Nat. Cell Biol.** 3, 346–352, 2001.

SILVA, E. ET AL. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care.**, v.8, n.4, p.R251-60, aug. 2004.

SHARSHAR T., BLANCHARD, A., PAILLARD, M., ET AL. Circulating vasopressin levels in septic shock. **Crit Care Med**, 31,1752–1758, 2003.

SMITH, P. K., KROHN, R. I., HERMANSON, G. T., MALLIA, A. K., GARTNER, F. H., PROVENZANO, M. D., FUJIMOTO, E. K., GOEKE, N. M., OLSON, B. J., KLENK, D. C. Measurement of protein using bicinchoninic acid. **Analytical Biochemistry**, v. 150, Issue 1, p. 76-85, oct. 1985.

SODRE, F. L., COSTA, J. C. B., LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 5, oct. 2007.

STUEHR, D. J., CHO, H. J., KWON, N. S., WEISE, M. F., NATHAN, C. F. Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD- and FMN-containing flavoprotein. **Proc Natl Acad Sci USA**, 88: 7773-7777, 1991.

SUN, Y., GUO, H. Possible mechanisms for reduced endothelium dependent responsiveness to norepinephrine in isolated aorta of rats with peritonitis shock. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, 18(3):224-8, jun 1996.

SURKS, H. K., MOCHIZUKI, N., KASAI, Y., GEORGESCU, S. P., TANG, K. M., ITO, M., LINCOLN, T. M., MENDELSON, M. E. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with

cGMP- dependent protein kinase I $\alpha$ , **Science** 286: 1583–1587, 1999.

TAVARES-MURTA, B. M., CUNHA, F. Q., FERREIRA, S. H. The intravenous administration of tumor necrosis factor  $\alpha$ , interleukin 8 and macrophage-derived neutrophil chemotactic factor inhibits neutrophil migration by stimulating nitric oxide production. **Br J Pharmacol** 124:1369-1374. 1998.

TSIKAS, D., WOLF, A., MITSCHKE, A., GUTZKI, F. M., WILL, W., BADER, M. GC-MS determination of creatinine in human biological fluids as pentafluorobenzyl derivative in clinical studies and biomonitoring: Inter-laboratory comparison in urine with Jaffé, HPLC and enzymatic assays. **J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.**, 1;878(27):2582-92, oct 2010.

TÖLLE, M., SCHUCHARDT, M., WIEDON, A., HUANG T., KLÖCKEL, L., JANKOWSKI, J., JANKOWSKI, V., ZIDEK, W., VAN DER GIET. M. Differential effects of uridine adenosine tetraphosphate on purinoceptors in the rat isolated perfused kidney. **British Journal of Pharmacology**, v.161: 530–540, 2010.

UEHATA, M., ISHIZAKI, T., SATOH, H., ONO, T., KAWAHARA, T., MORISHITA, T., TAMAKAWA, H., YAMAGAMI, K., INUI, J., MAEKAWA, M., NARUMIYA, S. Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. **Nature**. 30; 389 (6654):990-4, oct. 1997.

UMEGAKI, T., IKAI, H., IMANAKA, Y. The impact of acute organ dysfunction on patients' mortality with severe sepsis. **J Anaesthesiol Clin Pharmacol.**, 27(2): 180–184, jun. 2011.

VINCENT, J.-L., NELSON, D. R., WILLIAMS, M. D. Is worsening multiple organ failure the cause of death in patients with severe sepsis? **Crit Care Med.**, v. 39, n. 5, 2011.

VINCENT, J.-L., SAKR, Y., SPRUNG, C. L., RANIERI, V. M., REINHART, K., GERLACH, H., MORENO, R., CARLET, J., LE GALL, J.-L., PAYEN, D. Sepsis in European intensive care units: Results of the SOAP Study. **Crit Care Med.**, v. 34, n. 2, 2006.

WANG, Y., YOSHIOKA, K., AZAM, M. A., TAKUWA, N., SAKURADA, S., KAYABA, Y., SUGIMOTO, N., INOKI, I., KIMURA, T., KUWAKI, T., TAKUWA, Y. Class II phosphoinositide 3-kinase  $\alpha$ -isoform regulates Rho, myosin phosphatase and contraction in vascular smooth muscle. **Biochem J.**, 394:581–592, 2006.

WENNERBERG, K., ROSSMAN, K. L., DER, C. J. The Ras superfamily at a glance. **J Cell Sci** 118: 843–846, 2005.

WICHTERMANN, 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.

WIRTH, A. Rho kinase and hypertension. **Biochim. Biophys. Acta**, 1802(12):1276-84, dec 2010.

ZHANG, J., DAWSON, T. M., SNYDER, S. H. Nitric oxid activation of poly(ADP-ribose) synthase in Neurotoxicity. **Science**, 263: 687-689, 1994.

ZHOU, Q., GENSCHE, C., LIAO, J. K. Rho-associated coiled-coil-forming kinases (ROCKs): potential targets for the treatment of atherosclerosis and vascular disease. **Trends Pharmacol Sci.**, 32(3):167-73, mar 2011.