

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

LAENA PERNOMIAN

Modulação promovida pelo peptídeo natriurético tipo C
sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em
aorta torácica e artéria mesentérica de resistência
isoladas de ratos submetidos ao choque séptico

Ribeirão Preto
2015

LAENA PERNOMIAN

Modulação promovida pelo peptídeo natriurético tipo C sobre a resposta
contrátil induzida pela fenilefrina em aorta torácica e artéria mesentérica
de resistência isoladas de ratos submetidos ao choque séptico

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor(a) em Farmacologia.

Área de concentração: Farmacologia
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Lusiane Maria Bendhack

Ribeirão Preto
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Pernomian, Laena. Modulação promovida pelo peptídeo natriurético tipo C (CNP) sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aorta torácica e artérias mesentéricas de resistência isoladas de ratos submetidos ao choque séptico / Laena Pernomian; orientadora Prof.^a Dr.^a Lusiane Maria Bendhack, Ribeirão Preto, 2011.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Área de Concentração: Farmacologia) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Palavras-chave: Peptídeo natriurético tipo C – resposta contrátil à fenilefrina – choque séptico – endotélio vascular – estresse oxidativo – disfunção cardíaca.

*“Você que habita ao amparo do Altíssimo,
e vive à sombra do Onipotente,
diga a Javé: ‘Meu refúgio, minha fortaleza,
meu Deus, eu confio em ti!’*

*Ele livrará você do laço do caçador,
e da peste destruidora.
Ele o cobrirá com suas penas,
e debaixo de suas asas você se refugiará.
O braço dele é escudo e armadura.
Você não temerá o terror da noite,
nem a flecha que voa de dia,
nem a epidemia que caminha nas trevas,
nem a peste que devasta ao meio-dia.
Caíam mil ao seu lado
e dez mil à sua direita,
a você nada atingirá.*

*‘Eu o livrarei, porque a mim se apegou.
Eu o protegerei, pois conhece o meu nome.
Ele me invocará, e eu responderei.
Na angústia estarei com ele.
Eu o livrarei e glorificarei.
Vou saciá-lo de longos dias
e lhe farei ver a minha salvação’.*

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Luiz Antônio Pernomian e Eli Conceição Paraizo Pernomian, por todo o amor e dedicação empenhados para a realização dessa difícil conquista, durante todos esses anos. A minha irmã, Larissa Pernomian, pelo amor, apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida, sendo sempre o meu exemplo e guia. Ao meu namorado, Alejandro Ferraz do Prado, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, me apoiando, acreditando em mim e me dando forças para continuar em frente. *In memoriam* de Luana Pernomian, luz que ilumina e guarda nossos caminhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça da vida e por todas as alegrias e experiências vividas ao longo desses anos. Por ter me dado paciência e sabedoria diante de todos os desafios.

Aos meus pais, Luiz Antônio e Eli, pelo amor, carinho, apoio, dedicação integral e ensinamentos que me proporcionaram, não medindo esforços para que eu conseguisse alcançar meus objetivos sempre com muita coragem e força para vencer os obstáculos que surgissem em meu caminho.

A minha irmã Larissa, que sempre esteve ao meu lado, sendo meu exemplo de vida, me protegendo quando era preciso, me ajudando nos momentos difíceis, compartilhando alegrias e tristezas, sendo minha companhia e por todos os ensinamentos durante toda a vida.

Ao meu namorado Alejandro, que por tantas vezes esteve ao meu lado trabalhando e me ensinando, compartilhando comigo medos e incertezas, pelo apoio nas horas desafiadoras, pelo abraço nos momentos difíceis, pelo amor e carinho ao longo de todos esses dias.

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Lusiane Maria Bendhack, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento pessoal e profissional, pela dedicação e confiança que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus grandes amigos Deidiane, Vitor, Vinícius, Bruno, Tiago, Mayara, Aline, Carol, Ana Carolina, Prycila e Fernanda que foram muito mais que companheiros de laboratório, foram grandes pessoas que estiveram comigo sempre, que eu pude contar em todas as horas, que realmente trouxeram alegria e tranquilidade em minha vida.

Aos colegas de laboratório e do Departamento de Farmacologia, aos funcionários do Departamento de Farmacologia da FMRP-USP e do Departamento de Física e Química da FCFRP-USP. Aos funcionários do biotério da FCFRP-USP. Ao Professor José Antunes Rodrigues e às suas técnicas de laboratório Milene e Val, do Departamento de Fisiologia da

FMRP-USP, que foram muito atenciosos e não mediram esforços para a realização dos experimentos de dosagem plasmática de CNP por radioimunoensaio. À Professora Munira M. A. Baqui que atendeu prontamente ao pedido de ajuda na padronização da separação de frações celulares. À Aline de Azevedo que participou dos experimentos de padronização e quantificação de RNAm por real-time PCR. Ao Lucas César Pinheiro que sempre esteve disposto a realizar as colaborações referentes à dosagem de metabólitos de NO e o ensaio de lucigenina. À técnica do Laboratório de Microscopia Confocal – LMMC (Processo FAPESP n° 2004/08868-0) Elizabete Rosa, que sempre esteve pronta para compartilhar seu conhecimento e ajudar nas padronizações que fossem necessárias. À técnica do Laboratório de Citometria de Fluxo (Processo FAPESP n° 04/09448-5) Fabiana, pela ajuda nos experimentos e também pela amizade de sempre. À Professora Raquel Fernanda Gerlach por ter aberto as portas do seu laboratório, permitindo a execução de inúmeros experimentos.

Aos Professores membros da banca, titulares e suplentes, Michele M. Castro, José Antunes Rodrigues, Cristina Antoniali, Roger Lyrio, Cibele Maria Prado Zinni, Fernando Carneiro, Fernando Morgan, David Malvar e Gerson J. Rodrigues pelas contribuições e disponibilidade.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2011/11.205-7. Ao CNPq e CAPES.

RESUMO

Laena Pernomian. **Modulação promovida pelo peptídeo natriurético tipo C sobre a resposta contrátil induzida pela fenilefrina em aorta torácica e artéria mesentérica de resistência isoladas de ratos submetidos ao choque séptico.** 2015. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

O choque séptico é uma síndrome inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso, no qual as disfunções das células endoteliais e do músculo liso vascular contribuem para suprimento sanguíneo insuficiente a órgãos vitais, com consequente hipotensão sistêmica, insuficiência múltipla de órgãos e morte. Em geral, nos pacientes com choque séptico, existe um desequilíbrio dos fatores hemodinâmicos, levando ao baixo débito cardíaco e vasodilatação, além da redução da resposta contrátil aos diferentes agonistas, nos quais a participação do óxido nítrico (NO), de NO-sintases (NOS) e do estresse oxidativo são evidentes. A contribuição do sistema de peptídeos natriuréticos é evidenciada nos pacientes e em animais submetidos à sepse severa ou ao choque séptico. O peptídeo natriurético tipo C (CNP) é um agente vasodilatador que leva ao relaxamento vascular pela produção de GMPc intracelular, NO, hiperpolarização de membrana das células do músculo liso vascular e redução da concentração citosólica de cálcio. O tratamento com antagonista de receptores NPR-A/B tornou os animais menos susceptíveis à sepse, com menor resposta hipotensora, melhora da contração a agonistas e redução do processo inflamatório e NO plasmático. Portanto, a hipótese do presente trabalho é que no modelo de choque séptico induzido por ligação e perfuração cecal (CLP) em ratos, ocorreria menor resposta vasoconstritora ao agonista seletivo α_1 -adrenérgico Fenilefrina (PE) e este efeito seria atenuado pela inibição da sinalização desencadeada pelo CNP e modulado pelo estresse oxidativo. A sobrevivência dos ratos CLP foi menor do que a observada em ratos controle-operados (Sham). Os parâmetros cardiovasculares foram mais prejudicados nos ratos CLP do que em ratos Sham. A PE apresentou efeito pressórico menor em ratos CLP comparados aos ratos Sham. O CNP induziu efeito hipotensor em ambos os grupos, porém com maior aumento de frequência cardíaca nos ratos CLP. A contração induzida pela PE foi menor em aorta e artéria mesentérica de resistência, isoladas de ratos CLP, cujo efeito foi modulado pelo endotélio vascular. A vasodilatação induzida pelo CNP foi menor em aorta de ratos CLP. Além disso, o CNP apresentou efeito modulador negativo sobre a contração da PE em aortas com ou sem endotélio, mas não em artérias mesentéricas de resistência isoladas de ratos Sham e CLP. A menor resposta contrátil induzida pela PE em aortas de ratos CLP foi aumentada pelo antagonista de receptor NPR-B, pela inibição das enzimas NOS, xantina oxidase e metaloproteinases da matriz extracelular (MMPs) em aortas com endotélio. O efeito modulador negativo do CNP sobre a contração da PE foi revertido pelo antagonista de receptor NPR-B, inibição de NOS, redução da disponibilidade de O_2^- e pela degradação de H_2O_2 , em ambos os grupos. Além disso, o estresse oxidativo e a concentração citosólica de H_2O_2 foram maiores no músculo liso vascular de ratos CLP. A expressão protéica de CNP endógeno foi menor no endotélio e maior no músculo liso da aorta de ratos CLP do que de Sham. Porém, a expressão protéica dos receptores α_1 -adrenérgicos e NPR-B não foram diferentes entre os grupos, mas a expressão protéica do receptor NPR-C foi menor na aorta de ratos CLP. A mobilização de cálcio intracelular foi menor no músculo liso da aorta de ratos CLP e a alta concentração de potássio extracelular não foi suficiente para despolarizar a membrana das células musculares da aorta de ratos CLP. A expressão protéica dos receptores NPR-B e NPR-C não foram diferentes no coração de ratos CLP. Entretanto, o potencial de membrana do ventrículo esquerdo (VE) dos ratos CLP foi menor que aquele de ratos Sham. Além disso, a concentração citosólica de cálcio no VE de ratos CLP foi menor que em ratos Sham, mas a redução de cálcio citoplasmático induzida pelo CNP foi maior no VE de ratos CLP comparada aquela em ratos Sham. Ocorreu disfunção cardíaca nos ratos CLP. No modelo de choque séptico induzido por cirurgia CLP em ratos, a participação do sistema de peptídeos natriuréticos, sobretudo do CNP, contribui para a menor resposta

contrátil à fenilefrina e representa potencial via de intervenção na sepse severa e no choque séptico.

Palavras-chave: Peptídeo natriurético tipo C – fenilefrina – choque séptico – endotélio vascular – estresse oxidativo – disfunção cardíaca.

ABSTRACT

Laena Pernomian. **C-type natriuretic peptide-induced modulation over the phenylephrine-induced contraction on thoracic aorta and resistance mesenteric arteries isolated from septic shock rats.** 2015. Thesis (PhD degree) – School of Medicine from Ribeirão Preto, Universidade of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Septic shock is a systemic inflammatory syndrome secondary to an infection which the vascular dysfunction leads to an insufficient blood flow to vital organs with systemic hypotension, multiple organ injury and death. Usually, in septic shock patients there is an imbalance on hemodynamic factors, leading to low cardiac output and vasodilation, with decrease on contractile responses to several agonists, which the contribution of nitric oxide (NO), NO-synthases (NOS) and oxidative stress are evident. The contribution of natriuretic peptide system is observed on patients and animals submitted to severe sepsis or septic shock. C-type natriuretic peptide (CNP) is a vasodilator that leads to vascular relaxation through cGMP, NO, vascular smooth muscle hyperpolarization and reduction in cytosolic calcium. Treatment of animals with NPR-A/B antagonist, as well as knockout mice to NPR-A receptor are less susceptible to sepsis, with less hypotension, enhanced contraction to different agonists and reduction in inflammation and plasma NO. Therefore, the hypothesis of the present work is in septic shock induced by cecal ligation and puncture (CLP) model in rats there is low vasoconstriction to the selective α_1 -adrenoceptor agonist Phenylephrine (PE) and this effect could be attenuated by the inhibition of CNP signaling, strongly modulated by the oxidative stress. CLP survival was lower than the control rats (Sham) and cardiovascular parameters were impaired in CLP compared to the Sham rats. PE had positive pressure effect lower in CLP than in Sham rats. CNP induced hypotension in both groups with greater increases of cardiac rate in CLP. PE-induced contraction was decreased in aorta and resistance mesenteric artery isolated from CLP rats and this effect was modulated by the vascular endothelium. CNP-induced vasodilation was lower in rat aorta of CLP. Moreover, CNP had a negative modulator effect over the PE contraction on aortas with or without endothelium, but not on resistance mesenteric artery isolated from Sham and CLP rats. The low contractile response induced by PE on CLP aortas was enhanced by NPR-B antagonist, and by NOS, xanthine oxidase or extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) inhibition on aortas with endothelium. The negative modulation induced by CNP over the PE contraction was reversed by the presence of NPR-B antagonist, NOS inhibition, and by the decrease on O_2^- availability and H_2O_2 degradation in both groups. Furthermore, oxidative stress and H_2O_2 intracellular content were greater on vascular smooth muscle of CLP rats. Protein expression of endogenous CNP was lower on endothelium and greater on smooth muscle of aortas isolated from CLP compared to Sham rats. However, the protein expression of α_1 -adrenoceptor and NPR-B were not different between the groups, but the protein expression of NPR-C was lower on smooth muscle of CLP aortas. Intracellular calcium mobilization was decreased on vascular smooth muscle of CLP aortas and extracellular high potassium solution was not able to depolarize smooth muscle layer of CLP aortas. Protein expression of NPR-B and NR-C were not different on CLP hearts. However, membrane potential of left ventricle (LV) of CLP was lower than in Sham rats. Besides, intracellular calcium content of LV of CLP was lower than Sham rats but the decrease on cytosolic calcium induced by CNP was greater on LV of CLP compared to the Sham rats. There was cardiac dysfunction on CLP rats. In rat CLP septic shock model, the role of natriuretic peptide, mainly CNP, is of great importance in the decreased α_1 -adrenoceptor contraction, representing a potential via of intervention on severe sepsis and septic shock.

Key-words: C-type natriuretic peptide – phenylephrine – septic shock – vascular endothelium – oxidative stress – cardiac dysfunction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sobrevida e pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (PAM) de ratos controle operados (Sham) e submetidos ao choque séptico (CLP).....	52
Figura 2 - Resposta pressora induzida pela fenilefrina (PE) em ratos Sham e CLP	53
Figura 3 - Efeito hipotensor <i>in vivo</i> induzido pelo CNP em ratos Sham e CLP.....	55
Figura 4 - Contração induzida pela PE em aortas de ratos Sham e CLP	56
Figura 5 - Contração induzida por solução de alta concentração extracelular de potássio em aortas de ratos Sham e CLP.....	57
Figura 6 – Efeito vasodilatador induzido pelo CNP em aorta de ratos Sham e CLP.....	58
Figura 7 – Efeito do CNP sobre a contração da PE em aorta de ratos.....	59
Figura 8 – Participação dos receptores NPR-B no efeito modulador negativo induzido pelo CNP sobre a contração da PE em aorta de ratos	61
Figura 9 – Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) da PE em presença de CNP, ou Anantin ou CNP+Anantin em aorta de ratos Sham e CLP	62
Figura 10 – Efeito contrátil induzido pela PE em ausência ou presença de Anantin em diferentes concentrações.....	64
Figura 11 – Contribuição de O_2^- no efeito modulador negativo induzido pelo CNP sobre a contração da PE em aorta de ratos.....	65
Figura 12 – Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) da PE em presença de CNP, ou Tiron ou CNP+Tiron em aorta de ratos Sham e CLP	67
Figura 13 – Contribuição de H_2O_2 no efeito modulador negativo induzido pelo CNP sobre a contração da PE em aorta de ratos.....	70

Figura 14 – Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) da PE em presença de CNP, ou PEG-Catalase ou CNP+PEG-Catalase em aorta de ratos Sham e CLP	71
Figura 15 – Efeito contrátil induzido pela PE em ausência ou presença de Alopurinol.....	73
Figura 16 – Efeito do inibidor de MMPs (GM6001) sobre a resposta contrátil induzida pela PE.....	74
Figura 17 – Efeito do inibidor não seletivo da enzima NOS (L-NAME) sobre a contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP com endotélio vascular (E+).....	76
Figura 18 – Participação da NOS1 sobre a contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP com endotélio vascular (E+).....	77
Figura 19 – Participação da NOS2 sobre a contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP com endotélio vascular (E+).....	78
Figura 20 – Contração induzida pela PE em artérias mesentéricas de resistência de ratos Sham e CLP, com endotélio vascular (E+).....	79
Figura 21 – Medida das concentrações citosólicas de NO, H_2O_2 ou da concentração intracelular de EROs, basais em células endoteliais isoladas a fresco de aorta de ratos Sham e CLP	81
Figura 22 – Medida da concentração plasmática de nitrato, nitrito e nitrosotióis em ratos Sham e CLP	81
Figura 23 – Concentração intracelular de EROs basal na camada do músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal	82
Figura 24 – Análise da concentração citosólica de H_2O_2 basal na camada do músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal	83
Figura 25 – Concentração citosólica de cálcio na camada do músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal.....	85

Figura 26 – Concentração citosólica de cálcio no ventrículo esquerdo (VE) de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal.....	86
Figura 27 – Análise do potencial de membrana basal ou estimulado nas células do músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Sham, por microscopia confocal.....	87
Figura 28 – Análise do potencial de membrana basal ou estimulado nas células do músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos CLP, por microscopia confocal.....	88
Figura 29 – Quantificação da alteração do potencial de membrana no músculo liso vascular (MLV) em aorta de ratos Sham e CLP	88
Figura 30 – Análise do potencial de membrana basal do ventrículo esquerdo (VE) de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal	89
Figura 31 – Análise da expressão protéica dos receptores α_1 -adrenérgico, NPR-B, NPR-C e de CNP endógeno em aorta de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal.....	92
Figura 32 – Quantificação da expressão protéica dos receptores α_1 -adrenérgicos, NPR-B e NPR-C, e CNP endógeno	92
Figura 33 – Análise da expressão protéica dos receptores NPR-B e NPR-C no ventrículo esquerdo (VE) de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal.....	93
Figura 34 – Expressão protéica de receptores NPR-B e NPR-C em extrato de aorta de ratos Sham e CLP	94
Figura 35 – Expressão protéica das isoformas eNOS (NOS3) e iNOS (NOS2) em extrato de aorta de ratos Sham e CLP.....	95
Figura 36 – Expressão protéica de Nox1 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP	96
Figura 37 – Atividade de NADPH oxidase em aortas E+ de ratos Sham e CLP.....	97
Figura 38 – Expressão protéica de MMP-2 e MMP-9 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP	98

Figura 39 – Atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP	99
Figura 40 – Ensaio da atividade de MMP-2 recombinante humana em presença de CNP em diferentes concentrações.....	101
Figura 41 – Exame de ecocardiografia nos corações de ratos Sham e CLP (“CLP 1” e “CLP 2”).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito pressórico <i>in vivo</i> da resposta induzida pela PE em ratos Sham e CLP ...	53
Tabela 2 – Tempo de duração da resposta pressórica <i>in vivo</i> induzida pela PE em ratos Sham e CLP	54
Tabela 3 – Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) induzidos pela PE em aortas de ratos Sham e CLP	57
Tabela 4 – Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) induzidos pela PE em ausência ou presença de exposição prévia ao CNP, em aortas de ratos Sham e CLP	60
Tabela 5 – Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) induzidos pela PE em presença de Anantin (Ana) ou CNP + Ana, em aortas de ratos Sham e CLP	63
Tabela 6 – Potência (pD_2) e efeito máximo da PE em presença de Tiron ou CNP+Tiron em aortas de ratos Sham e CLP	68
Tabela 7 – Potência (pD_2) e efeito máximo da PE em presença de PEG-Catalase ou CNP+PEG-Catalase em aortas de ratos Sham e CLP	72
Tabela 8 – Expressão protéica e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP	100
Tabela 9 – Análise morfofuncional do coração de ratos Sham e CLP (“CLP 1” e “CLP 2”) através do exame de ecocardiografia	102

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMPC: 3'-5'-monofosfato cíclico de adenosina
- Ana: Anantín
- Ang II: Angiotensina II
- ANP: Peptídeo natriurético atrial
- ASC: Área sob a curva
- BH₄: Tetrahydrobiopterina
- BK_{Ca}: Canal para potássio de ampla condutância ativado por cálcio
- BNP: Peptídeo natriurético tipo B (*Brain Natriuretic Peptide*)
- B.P.M.: Batimentos por minuto
- [Ca²⁺]_c: Concentração citosólica de cálcio
- CLP: Ligaçãõ e perfuraçãõ cecal
- CNP: Peptídeo natriurético tipo C
- CO: Controle
- DAG: Diacilglicerol
- DNP: Peptídeo natriurético tipo D
- E+: Com endotélio
- E-: sem endotélio
- E_{max}: Efeito máximo
- Erk: Quinase regulada por sinal extracelular
- EROs: Espécies reativas de oxigênio
- FAD: Flavina-adenina-mononucleotídeo
- FC: Frequência cardíaca
- FE: Fração de ejeção
- FMN: Flavina-mononucleotídeo
- FS: Fração de encurtamento
- GC-A: Guanilil ciclase A
- GC-B: Guanilil ciclase B
- GCp: Guanilil ciclase particulada
- GCs: Guanilil ciclase solúvel
- GMPc: 3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina
- HUVEC: Células endoteliais de veia umbilical humana
- H₂O₂: Peróxido de hidrogênio
- ICFEN: Insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal
- IF: Intensidade de fluorescência
- IL: Interleucina

IVS: Espessura do septo interventricular
K⁺: Potássio
KCl: cloreto de potássio
K_{ir}: Canal para potássio retificador de entrada
KO: *Knockout*
LVID: Espessura da cavidade ventricular esquerda
LVPW: Espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo
MAPK: proteína quinase associada a mitógeno
MLV: Músculo liso vascular
MMP: Metaloproteinase da matriz
mmHg: Milímetros de mercúrio
mN: Mili Newton
N^ω-propil: N^ω-propil-L-arginina
Na/K-ATPase: Sódio/potássio ATPase
NF-κB: Fator de transcrição nuclear *kappa* B
NO: Óxido nítrico
NPR: Receptor para peptídeo natriurético
NOS: Óxido nítrico sintase
NOx: Metabólitos de óxido nítrico
O₂⁻: Ânion superóxido
OH⁻: Radical hidroxila
ONOO⁻: Peroxinitrito
pD₂: Potência
PE: Fenilefrina
PEG: Polietilenoglicol
PKA: Proteína quinase dependente de AMPc
PKC: Proteína quinase C
PKG: Proteína quinase dependente de GMPc
PLB: Fosfolambam
PLC: Fosfolipase C
SERCA: Cálcio-ATPase do retículo sarcoplasmático
Sham: Ratos controle operados
TGF-β: Fator de crescimento transformador beta
TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa
Tpi: Troponina I
U: Unidades arbitrárias
URL: Unidades relativas de luminescência

VE: Ventrículo izquierdo

WT: *Wild type*

SUMÁRIO

1	Introdução.....	21
2	Objetivos.....	29
2.1	Objetivo Geral.....	29
2.2	Objetivos Específicos.....	29
3	Metodologia	32
3.1	Animais.....	32
3.2	Canulação de artéria femoral e veia femoral.....	32
3.3	Indução do modelo de choque séptico por ligação e perfuração cecal (CLP).....	33
3.4	Registro da pressão arterial em ratos não anestesiados e avaliação da sobrevivência dos animais	33
3.5	Estudos <i>in vivo</i> de variação da pressão arterial	33
3.5.1	Efeitos induzidos pela administração endovenosa de Fenilefrina (PE) ou do Peptídeo Natriurético tipo C (CNP).....	33
3.5.2	Análise Estatística	34
3.6	Estudos de reatividade vascular.....	35
3.6.1	Estudos de reatividade vascular em aorta torácica de ratos	35
3.6.2	Estudos de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência.....	36
3.6.3	Análise estatística.....	37
3.7	Estudos por citometria de fluxo	38
3.7.1	Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos	38
3.7.2	Medida da concentração citosólica de NO ([NO] _c) em células endoteliais isoladas da aorta	38
3.7.3	Medida de EROs em células endoteliais isoladas da aorta de ratos.....	39
3.7.4	Medida de H ₂ O ₂ em células endoteliais isoladas da aorta de ratos.....	39
3.7.5	Análise estatística.....	40
3.8	Dosagem plasmática de metabólitos do NO.....	41
3.8.1	Análise estatística.....	42
3.9	Estudos por Microscopia Confocal	42
3.9.1	Estudos de Fluorescência Emitida por Sondas Seletivas	42
3.9.2	Estudos por Imunofluorescência.....	43
3.9.3	Aquisição das imagens por microscopia confocal.....	44
3.9.4	Análise estatística.....	44
3.10	Estudos por <i>Western blotting</i>	44
3.10.1	Análise estatística	45
3.11	Estudos pelo Ensaio de Lucigenina.....	46

3.11.1 Análise estatística	46
3.12 Estudos por Zimografia em Gel.....	46
3.12.1 Análise estatística	47
3.13 Estudos por espectrofluorimetria.....	47
3.13.1 Análise estatística	48
3.14 Estudos por Ecocardiografia	48
3.14.1 Análise estatística	48
3.15 Drogas	49
3.16 Soluções	49
4 Resultados.....	51
5 Discussão dos Resultados.....	105
6 Conclusão.....	129
7 Referências Bibliográficas	131

Introdução

1. Introdução

Choque séptico é uma síndrome inflamatória sistêmica secundária a um processo infeccioso, no qual as disfunções das células endoteliais e do músculo liso vascular (MLV) contribuem para suprimento sanguíneo insuficiente a órgãos vitais, hipotensão sistêmica, insuficiência múltipla de órgãos e morte (Panayiotou et al., 2010).

Esta condição representa a maior causa de morte de pacientes em unidades de terapia intensiva (Fernandes et al., 2009). Estudos epidemiológicos estimam que a incidência de sepse severa nos Estados Unidos seja de 751.000 casos por ano, correspondendo a três casos a cada 1.000 pacientes internados, com taxa de mortalidade de 28,6% (Silva et al., 2004; Piechota et al., 2009). No Brasil, quatro estudos epidemiológicos realizados entre os anos de 2004 a 2007 demonstraram altas taxas de mortalidade decorrentes de sepse severa (34,4%) ou choque séptico (65,3%), sendo mais grave entre os pacientes internados nos hospitais públicos quando comparados àqueles nos hospitais privados (Teles et al., 2008).

Embora considerável progresso tenha sido alcançado no entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese do choque séptico, pouco se tem avançado em termos terapêuticos. Em geral, nos pacientes com choque séptico, existe um desequilíbrio dos fatores hemodinâmicos, como depleção de volume, baixo débito cardíaco e vasodilatação, resultando, como descrito acima, em hipotensão sistêmica que pode acarretar em hipoperfusão de órgãos. Desta forma, o objetivo das terapias de ressuscitação hemodinâmica é restaurar a pressão de perfusão adequada nos órgãos e a pressão arterial sistêmica, restabelecendo o fluxo sanguíneo para os órgãos (Leone, Martin, 2008). Para tanto, estratégias terapêuticas frequentemente adotadas incluem: administração de fluído para o aumento do volume intravascular; ativação do sistema nervoso simpático por administração de adrenalina ou noradrenalina; administração de vasopressina ou terlipressina (agonista seletivo para receptores V_1 , com tempo de meia-vida maior que a vasopressina) para casos de choque séptico resistente a catecolaminas; administração de proteína C ativada recombinante humana, embora tal estratégia ainda permaneça controversa. Para pacientes em choque séptico, que não respondem à terapia de fluídos e catecolaminas, utiliza-se tratamento com

hidrocortisona (Leone, Martin, 2008; Levy et al., 2010). Entretanto, tais terapias ainda não são suficientes para prevenir as mortes decorrentes do processo de sepse. Assim, a identificação e caracterização de novas vias que contribuem para a progressão da doença poderiam contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem reduzir a morbidade e mortalidade associadas à sepse.

É amplamente conhecido que embora os mecanismos subjacentes às disfunções cardiovasculares decorrentes no processo de sepse sejam complexos, estes envolvem a produção excessiva de óxido nítrico (NO) (Strunk et al., 2001). Embora haja mecanismos alternativos de geração de NO, como acidificação ou redução de nitritos, a maior parte do NO das células de mamíferos é enzimaticamente derivada de óxido nítrico sintases (NOS), que promovem a oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino do aminoácido L-arginina, sendo convertido em L-citrulina e NO, em um processo dependente de nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato (NADPH) e oxigênio molecular (Thomas et al., 2008). Até o momento, foram identificadas três isoformas de NOS: a NOS endotelial (eNOS ou NOS 3) e neuronal (nNOS ou NOS 1) e a NOS induzida por estímulo imunológico (iNOS ou NOS 2) (Moncada et al., 1991).

O NO produzido nas células endoteliais é capaz de difundir-se rapidamente para as células musculares lisas e para o lúmen vascular. Dentre suas várias ações fisiológicas, é capaz de produzir vasodilatação em diversos leitos vasculares, por mecanismos que envolvem redução da concentração citosólica de cálcio ($[Ca^{2+}]_c$) e da sensibilidade ao Ca^{2+} (Ignarro, 1989).

A NOS3 está envolvida na regulação da permeabilidade microvascular e interações entre endotélio vascular, leucócitos e plaquetas. Por outro lado, a NOS2 está constitutivamente presente em pequenas quantidades nos tecidos, sendo sua expressão protéica amplamente aumentada após indução por endotoxina ou por citocinas, em diversos tipos celulares como leucócitos, miócitos cardíacos, células do músculo liso vascular e células endoteliais (Strunk et al., 2001).

A produção sustentada de NO após indução de NOS2 está relacionada à vasodilatação prolongada do músculo liso vascular e à menor resposta vasoconstritora durante a sepse (Donaldson, Myers, 1996; Vromen et al., 1996; Strunk et al., 2001). Muitos estudos em modelos animais e em pacientes confirmaram a produção excessiva, em tecido vascular e sistêmica, de NO pela

NOS2 durante o desenvolvimento da sepse (Panayiotou et al., 2010). Neste contexto, o uso de inibidores seletivos de NOS2 restaura os níveis de pressão arterial média e reduz a mortalidade em animais sépticos (Rees et al., 1998; Strunk et al., 2001). Da mesma forma, camundongos *knockout* para NOS2 se apresentaram resistentes à disfunção vascular induzida pela administração de lipopolissacarídeo (LPS) (Rees et al., 1998; Chauhan et al., 2003b). Embora fortes evidências apontem para o envolvimento de NOS2 no desenvolvimento da sepse e que a inibição seletiva desta isoforma tenha resultado em melhora ou reversão do quadro de hipotensão decorrente da sepse em modelos animais, estudos clínicos utilizando inibidor não-seletivo de isoformas de NOS denominado 546C88, promoveu aumento da mortalidade de pacientes em choque séptico (López et al., 2004).

O estresse oxidativo é considerado como um dos fatores responsáveis pela menor resposta vasoconstritora durante a sepse (Szábo et al., 1995; Salvemine, Cuzzocrea, 2002; Wu et al., 2004). Neste contexto, Wu e colaboradores (2004) demonstraram que após a injeção *in bolus* de ácido ascórbico, 30 minutos antes da indução de sepse por cirurgia de ligação e perfuração cecal (CLP), ocorreu melhora na sobrevivência de camundongos, atenuação da hipotensão e reversão dos níveis aumentados de metabólitos de NO (NOx), reversão do estresse oxidativo, do RNAm de NOS2 e da menor resposta vasoconstritora à Ang II em arteríolas do músculo cremaster de camundongos CLP.

Diversos estudos em pacientes em choque séptico, com necessidade de terapia adrenérgica, demonstraram que a inibição da enzima Guanilil ciclase solúvel (GCs) com azul de metileno é capaz de restaurar a pressão arterial média e melhorar a contratilidade cardíaca (Fernandes et al., 2009). Por outro lado, a utilização do Azul de Metileno é questionável porque parece interferir com as ações desencadeadas pelo NO derivado de NOS constitutivas (NOS1 e NOS3), reduzindo o fluxo sanguíneo para os órgãos, além de contribuir para a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Marczin et al., 1995).

Além da importância do NO e das EROs no desenvolvimento do processo de sepse, os peptídeos natriuréticos tem grande participação nas respostas observadas em pacientes e em animais com choque séptico. O peptídeo natriurético tipo C (CNP) trata-se de um peptídeo natriurético cuja sequência de aminoácidos se mantém altamente conservada entre as espécies e foi identificado em humanos e

em várias espécies primitivas (Inoue et al., 2003). O CNP pode ser sintetizado, armazenado e liberado pelas células endoteliais. É encontrado em altas concentrações em condrócitos (Hagiwara et al., 1994), em células endoteliais expostas a LPS, citocinas e fatores de crescimento, como interleucina (IL)-1 α , IL-1 β , fator de necrose tumoral α (TNF- α) e fator de crescimento transformador β (TGF- β) (Suga et al., 1993), mas é encontrado em baixas concentrações no plasma de indivíduos saudáveis (Stingo et al., 1992). Del-Ry e colaboradores (2011) verificaram que o RNAm do CNP e o peptídeo CNP estão presentes constitutivamente em cardiomiócitos de ratos neonatos e em linhagem de células de coração de ratos (H9c2). O CNP atua como um neuropeptídeo e como um modulador vasoativo derivado do endotélio (Suga et al., 1993), que é liberado por agonistas que promovem relaxamento dependente do endotélio como acetilcolina e bradicinina.

O CNP é um potente fator vasodilatador do músculo liso de artérias e veias (Suga et al., 1992) e em alguns leitos vasculares esta vasodilatação depende do endotélio (Amin et al., 1996), mas independe de NO na elevação dos níveis de GMPc (Griffith, 2004). Este peptídeo promove hiperpolarização de membrana das células do músculo liso vascular de artérias isoladas, pela ativação do receptor NPR-C (Chauhan et al., 2003a; Garcha et al., 2006) e abertura de canais para potássio (K⁺) de ampla condutância ativados por cálcio (BK_{Ca}) (Brunner et al., 2001; Madhani et al., 2003). Em alguns leitos vasculares, o CNP é considerado como fator hiperpolarizante derivado do endotélio (Anand-Srivastava, 2005), embora existam controvérsias a este respeito (Garland et al., 2008).

A família dos peptídeos natriuréticos de mamíferos possui funções complementares na regulação do volume sanguíneo e no tônus vascular, sendo de grande valia para a manutenção da homeostase cardiovascular. O peptídeo natriurético atrial (ANP) e o peptídeo natriurético tipo B (*brain natriuretic peptide*, BNP) que são liberados predominantemente dos átrios e ventrículos, respectivamente, em resposta ao estiramento mecânico, possuem ações endócrinas análogas e exercem efeitos periféricos e centrais, ambos na tentativa de diminuir o volume sanguíneo e a pressão arterial (Ahluwalia et al., 2005). Outros membros da família dos peptídeos natriuréticos incluem a urodilatina, molécula semelhante ao ANP, mas que possui 32 resíduos de aminoácidos e atua exclusivamente na circulação renal; um peptídeo derivado do veneno da serpente *Dendroaspis*

angusticeps (peptídeo natriurético tipo D ou DNP) e o CNP identificado por Sudoh e colaboradores (1990).

Diversos estudos relatam que animais ou pacientes em quadro de sepse severa ou choque séptico, ou por endotoxemia induzida por exposição ao LPS, apresentam concentrações plasmáticas elevadas de ANP e BNP assim como de seus metabólitos amino-terminais NT-proANP e NT-proBNP, quando comparados a indivíduos normais. Estes peptídeos são utilizados como marcadores de sepse severa ou choque séptico (Piechota et al., 2009). Da mesma forma, Hama et al. (1994) detectaram níveis plasmáticos de CNP aumentados em pacientes em estado de choque séptico quando comparados a indivíduos saudáveis. Cabe ressaltar que os níveis plasmáticos de CNP quando detectáveis em indivíduos saudáveis, se encontram em concentrações baixas revelando, portanto, sua ação autócrina e/ou parácrina, contrariamente àquela exibida pelos peptídeos hormonais ANP e BNP.

Até o momento, três subtipos de receptores para peptídeos natriuréticos (NPR) foram clonados e caracterizados, sendo designados de NPR-A, NPR-B e NPR-C (Kone, 2001). ANP e BNP se ligam com igual afinidade ao NPR-A, enquanto que o CNP parece ser o ligante endógeno do NPR-B. Ambos receptores NPR-A e NPR-B são acoplados à enzima Guanilil ciclase particulada (GCp) de membrana, que gera o segundo mensageiro intracelular GMPc, assim que ocorre a ligação do peptídeo ligante no domínio de ligação extracelular e a consequente ativação de seu receptor. NPR-C apresenta afinidade semelhante aos três peptídeos natriuréticos, ANP, BNP e CNP, mas não é ligado a Guanilil- ciclases.

Recentemente, vários autores sugeriram a existência de dois subtipos de NPR-C, um receptor responsável pela depuração (*clearance*) destes peptídeos da circulação sanguínea e o outro receptor ativando uma via de sinalização particular (Anand-Srivastava, 2005). Este último encontra-se associado à inibição da enzima Adenilil ciclase, através de subunidade α da proteína G_i , e à ativação da fosfolipase C- β (PLC- β), através das subunidades $\beta\gamma_i$, com consequente hidrólise de fosfoinosítídeos (Matsukawa et al., 1999; Potter, 2005).

Neste contexto, o papel dos peptídeos natriuréticos parece ser de grande importância na regulação de processos inflamatórios, atuando como moduladores da expressão de citocinas e fatores de crescimento, assim como da atividade de enzimas. Estudos *in vitro* demonstraram aumento da expressão gênica de BNP e

pré-pró-ANP em cultura de cardiomiócitos estimulados com IL-1 β , assim como o aumento da liberação de ANP e BNP de cardiomiócitos estimulados com IL-6 (Witthaut, 2004). Em cultura de macrófagos de camundongos expostos ao LPS, ocorre aumento dos níveis de RNAm de ANP e CNP, intra e extracelularmente, enquanto ocorre diminuição de RNAm de BNP (Vollmar et al., 1995).

Kiemer e Vollmar (1998) demonstraram em cultura de macrófagos estimulados com LPS, que o bloqueio seletivo de NPR-A promove aumento do NO liberado. Isto evidencia um mecanismo induzido pelo ANP, de regulação inibitória da liberação de NO de NOS2, via inibição da ativação de fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B), o qual representa o principal estímulo para indução de NOS2, via 3'-5'-monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) e desestabilização de RNAm de NOS2 em macrófagos estimulados com LPS. Desta forma, o ANP seria capaz de controlar outras vias de transcrição gênica, como a inibição da via proteína quinase associada a mitógenos (MAPK) em células mesangiais glomerulares e em astrócitos pela ativação de NPR-C, independentemente de GMPc. Contudo, os efeitos induzidos pelo CNP sobre a indução de NOS2 e modulação de fatores de transcrição ainda não estão claros. Tais efeitos parecem ser dependentes do tipo celular e do estímulo. Em cultura de células do músculo liso vascular de aorta de ratos expostas a IL-1 ou ao TNF- α , a presença de ANP, BNP ou CNP promoveu aumento da produção de nitrito, enquanto a presença de L-NMA inibiu a resposta induzida pelo CNP, evidenciando o envolvimento da via L-arginina – NO nas respostas induzidas pelo CNP (Marumo et al., 1995).

Hinder e colaboradores (1997), utilizando-se de modelo de sepse induzida em ovelhas por administração de bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, observaram que após infusão contínua por 8h (40h após a administração de *P. aeruginosa* e indução do quadro de sepse) de antagonista NPR-A/B denominado de HS-142-1 (Matsuda e Morishita, 1993), ocorreu atenuação da resposta hipotensora relacionada à sepse, devido à combinação de respostas de aumento do volume intravascular, vasoconstrição e melhora da contratilidade cardíaca. Entretanto, não foi observada qualquer alteração significativa no índice de resistência vascular sistêmica após tratamento com HS-142-1. Esses resultados sugerem que o bloqueio dos receptores NPR-A/B leva ao aumento das pressões de enchimento cardíacas que mantém a

pressão arterial média na sepse induzida em ovelhas, mas que não é suficiente para reverter a vasodilatação generalizada observada no quadro de sepse.

Panayiotou e colaboradores (2010) demonstraram em modelo de camundongos *knockout* para NPR-A (NPR-A KO ou GC-A KO) e expostos ao LPS, a reversão do efeito hipotensor desencadeado pela endotoxemia, assim como diminuição dos níveis plasmáticos de metabólitos de NO (NOx), GMPc, IL-1 β , interferon γ (IFN- γ) e TNF- α e de expressão protéica de NOS2 em aorta. A menor resposta vascular ao agente contrátil análogo de tromboxano A₂ (U46619), assim como menor relaxamento dependente e independente do endotélio, foram revertidas em aorta de camundongos NPR-A KO.

Embora as respostas desencadeadas pela ativação das vias CNP – NPR-B e CNP – NPR-C representem pontos importantes, já que o choque séptico, assim como a exposição ao LPS e a diversas citocinas são fortes estímulos para a produção endógena de CNP, estes efeitos ainda não estão identificados. Com base nestes dados da literatura, a hipótese do presente estudo foi de que no modelo de choque séptico induzido por ligação e perfuração cecal (CLP) em ratos ocorreria menor resposta vasoconstritora ao agonista contrátil α_1 -adrenérgico Fenilefrina e este efeito seria atenuado pela inibição da sinalização desencadeada pelo CNP, sendo fortemente modulado pelo estresse oxidativo.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as respostas pressóricas e vasculares induzidas pela Fenilefrina (PE) ou CNP, em aorta torácica e artéria mesentérica de resistência, isoladas de ratos controle (Sham) e CLP. Determinar as principais vias de sinalização intracelular envolvidas nestes efeitos vasculares.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a sobrevivência e as possíveis alterações dos parâmetros cardiovasculares de ratos em choque séptico (CLP);
- Avaliar o perfil da resposta pressórica induzida pelo agonista seletivo de receptores α_1 -adrenérgicos, Fenilefrina (PE), e da resposta hipotensora induzida pelo CNP em ratos CLP;
- Avaliar as características da resposta vasoconstritora induzida pela PE em aorta torácica e mesentérica de resistência de ratos CLP, e do efeito vasodilatador induzido pelo CNP em aorta de ratos CLP;
- Avaliar o possível efeito do CNP como um agente modulador da contração α_1 -adrenérgica induzida pela PE em aorta e artéria mesentérica de resistência de ratos Sham e CLP;
- Estudar as vias de sinalização intracelular envolvidas na contração induzida pela PE, e no efeito do CNP como modulador da resposta contrátil da PE em aorta de ratos Sham e CLP;
- Avaliar a alteração da concentração plasmática de metabólitos de óxido nítrico (NO) em ratos CLP;
- Avaliar a produção de NO e estresse oxidativo em células endoteliais isoladas de aorta de ratos CLP, bem como o estresse oxidativo, mobilização de cálcio citosólico e alteração de potencial de membrana, de expressão protéica dos receptores NPR-B e NPR-C, e de CNP endógeno em anéis de aorta de ratos CLP;
- Avaliar as possíveis alterações de expressão protéica de receptores NPR-B e NPR-C, bem como a mobilização de cálcio citosólico e o potencial de membrana basal do ventrículo esquerdo de ratos CLP;

- Avaliar a expressão protéica e atividade de metaloproteinases da matriz (MMP-2 e MMP-9) em aorta de ratos CLP;
- Avaliar a expressão protéica das isoformas de NOS em aorta de ratos CLP;
- Avaliar a atividade de NADPH oxidase em aorta de ratos CLP.

Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* com aproximadamente 35 dias de idade (200g), provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais, Proc. No. 144/2011. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e alimento, em temperatura constante de 27°C e em ciclo de luz de 12 h (claro/escuro).

3.2 Canulação de artéria femoral e veia femoral

Ratos foram pesados em balança digital (Marte® AS1000C, Marte Balanças e Aparelhos de Precisão Ltda) e anestesiados com Tribromoetanol (25 mg/Kg, i.p.– Sigma Aldrich). Uma pequena incisão foi realizada na pele, na porção interna superior da perna direita, para que se pudesse observar a artéria femoral e a veia femoral. A artéria femoral foi cuidadosamente isolada com o auxílio de linha e um orifício foi realizado para introdução da cânula de polietileno (PE₁₀, Intramedic™ Clay Adams™ Brand CA™, Becton Dickison Co). Esta foi fixada com linha e a incisão suturada (Shalon® Sutures Seda 4-0 trançada, casse II, estéril, Sertix®). Esta cânula destinou-se ao registro da pressão arterial do animal. Da mesma forma, a veia femoral foi isolada e realizou-se um pequeno orifício para a introdução de outra cânula de polietileno (PE₁₀), sendo posteriormente fixada e a incisão suturada. A cânula presente na veia femoral destinou-se à administração de drogas. As extremidades das cânulas (PE₅₀, Tubo PE nº 10 com 50 metros, Lab-Líder Equipamentos e Produtos para Laboratório) foram exteriorizadas no dorso do animal. Todos os animais em estudo do grupo controle operado (Sham) e do grupo séptico (por ligação e perfuração cecal, CLP), foram submetidos à canulação da artéria femoral para a validação do modelo em estudo pelos valores de pressão arterial e também para excluir qualquer interferência exercida pela cirurgia de canulação. Os animais permaneceram em repouso para recuperação no próprio biotério de estadia por 24 h até o momento do experimento no dia seguinte.

3.3 Indução do modelo de choque séptico por ligação e perfuração cecal (CLP)

Vinte e quatro horas após a cirurgia de canulação, os ratos foram anestesiados com Tribromoetanol (25 mg/Kg, i.p.) para a realização de laparotomia mediana de 3 cm, com exposição do ceco. Este foi parcialmente obstruído (ligadura parcial) ao nível da válvula íleo-cecal. Posteriormente, realizou-se perfuração do ceco com agulha 16G (12 furos – grupo CLP) na borda anti-mesentérica (adaptado de Wichterman et al., 1980, Fernandes et al., 2009 e Araújo et al., 2011). Os animais controle operados (Sham) foram anestesiados e submetidos à laparotomia mediana com exposição do ceco, porém sem ligadura e perfuração cecal. Após a cirurgia, os animais foram mantidos em suas caixas de habitação, com livre acesso à água e alimento, para recuperação e foram utilizados após o período de 4 h.

3.4 Registro da pressão arterial em ratos não anestesiados e avaliação da sobrevida dos animais

Os animais dos grupos Sham e CLP tiveram suas pressões arteriais pulsátil (PAP, mmHg) e média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, batimentos por minuto – B.P.M.) continuamente registradas em sala com temperatura constante de 27°C, utilizando-se um transdutor de pressão (ADInstruments®) e um amplificador de pressão ligado à cânula da artéria femoral. Os registros das medidas de PAP, PAM e FC foram armazenados em um sistema computadorizado para posterior análise dos dados (Chart 4 – ADInstruments). Apenas foram considerados animais em estado de choque séptico aqueles do grupo CLP que apresentaram redução de PAP e PAM entre 30 e 40 mmHg em relação às pressões arteriais iniciais antes da cirurgia, ou quando a PAM foi inferior a 70 mmHg (Kotsovolis e Kallaris, 2010), 4 h após a cirurgia de indução de sepse.

3.5 Estudos *in vivo* de variação da pressão arterial

3.5.1 Efeitos induzidos pela administração endovenosa de Fenilefrina (PE) ou do Peptídeo Natriurético tipo C (CNP)

Nos ratos dos grupos Sham e CLP não anestesiados, após terem PAP e PAM registradas ao longo de 4 h após a cirurgia fictícia ou de indução do choque séptico, foi administrado endovenosamente, através da cânula da veia femoral, Fenilefrina (PE; 0,1 nmol/Kg a 10 nmol/Kg) diluída em solução salina estéril e as respostas

pressóricas foram registradas até se obter resposta estável. A cada nova administração de PE, aguardava-se o completo restabelecimento dos valores pressóricos basais (pressão arterial inicial). Aos ratos dos grupos CO e CLP, foram administrados endovenosamente, através da cânula da veia femoral, Fenilefrina (PE; 10 nmol/Kg) diluída em solução salina estéril e posteriormente, sobre a contração estável, foi administrado CNP (0,1 nmol/Kg) diluído em solução salina estéril. As respostas foram registradas até o efeito estável.

3.5.2 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.) de pelo menos 4 animais diferentes. Os registros dos dados de PAP e PAM (mmHg) foram realizados antes da cirurgia fictícia ou de indução do choque séptico (tempo zero), e posteriormente à cirurgia durante 4 h, com intervalos de 1 h para cada leitura, para que o animal pudesse se recuperar da anestesia e não houvesse interferência na leitura. Assim, dentro de cada momento, foi coletado o registro contínuo de 5 min por animal. Neste tempo, foram analisadas as médias de cada 20 seg, respeitando 6 leituras no intervalo de tempo para cada animal. Ao final, tínhamos 6 médias de 20 seg cada, por hora de análise, por animal. Os dados de FC respeitaram o mesmo tipo de coleta. Entretanto, utilizou-se o Filtro Digital da FC (tipo de filtro *Low-pass* com frequência de corte de 50 Hz) para excluir os possíveis ruídos da leitura.

Nos estudos com administração de PE ou CNP, utilizou-se a média da área de resposta estável (em mmHg ou duração de tempo em seg) obtida de PAP e PAM, seja de resposta de elevação ou redução da pressão arterial, em Sham ou CLP de diferentes animais (n experimental). Realizou-se apenas uma administração de CNP por animal, para evitar possível taquifilaxia induzida por peptídeos (Bauer et al., 1994). A análise dos dados foi realizada pelo programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00, 2001). A fim de analisarmos a interação entre os fatores dose *versus* tempo após a cirurgia (tempo zero, 4 h), ou ainda dose *versus* doença (Sham ou CLP) foi realizada análise de variância de dois fatores, *Two-way ANOVA* ($P < 0,01$), seguida de correção de Bonferroni ($P < 0,01$). A comparação entre quatro ou mais médias, supondo distribuições normais para a mesma população, foi realizada pela análise de variância, *One-way ANOVA* ($P < 0,05$) com pós-teste de

Newman-Keuls ($P < 0,05$). Quando realizada a comparação entre duas médias, supondo distribuições normais para a mesma população, foi realizado Teste *t* de Student ($P < 0,05$).

3.6 Estudos de reatividade vascular

Preparações de anéis de artéria aorta torácica ou artéria mesentérica de resistência, isoladas de ratos Sham e CLP, foram utilizadas para registro de tensão isométrica. Os ratos foram anestesiados com Isoflurano (Forane® Abbott), sacrificados por decapitação, a aorta torácica e o intestino foram isolados e dissecados de tecidos adjacentes.

3.6.1 Estudos de reatividade vascular em aorta torácica de ratos

A artéria aorta torácica foi isolada e dissecada de tecidos adjacentes e posteriormente foi cortada em anéis de 4 mm de comprimento. O endotélio vascular foi removido mecanicamente ou não, dependendo do protocolo a ser realizado. Os anéis de aorta foram montados entre dois ganchos de metal inseridos no lúmen da artéria para produzir tensão. Um dos ganchos permaneceu conectado a um suporte fixo ajustável e o outro a um transdutor de registro de força. O sistema foi montado em câmara para órgão isolado contendo 10 mL de solução fisiológica de Krebs com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 130; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; CaCl_2 1,6; NaHCO_3 14,9; glicose 5,5; pH 7,4, sob aeração constante com mistura carbogênica (95% O_2 e 5% CO_2), a 37°C. As preparações de aorta permaneceram em repouso por 60 min, sob tensão basal constante de 1,5 g para estabilização. A tensão isométrica para a aorta foi registrada através de transdutor acoplado a um polígrafo. Os anéis de aorta foram estimulados com solução de alta concentração extracelular de cloreto de potássio (KCl, 60 mmol/L), seguido de estímulo com Fenilefrina (PE, 100 nmol/L) até que as contrações se reproduzissem, dando início aos protocolos específicos. A efetividade da manutenção ou da remoção do endotélio foi demonstrada pela presença ou ausência, respectivamente, de relaxamento à Acetilcolina (ACh, 1 $\mu\text{mol/L}$) em anéis previamente contraídos com PE (100 nmol/L). Para o estudo da resposta contrátil induzida pela PE, foram construídas curvas concentração-efeito cumulativas para PE (0,1 nmol/L a 10 $\mu\text{mol/L}$), em ausência ou presença de incubação por 30 min com CNP (10 nmol/L),

Anantin (antagonista de receptores NPR-B: 0,1 $\mu\text{mol/L}$ ou 1 $\mu\text{mol/L}$), CNP (10 nmol/L) + Anantin (0,1 $\mu\text{mol/L}$); Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$, agente sequestrador de O_2^-), CNP (10 nmol/L) + Tiron (100 $\mu\text{mol/L}$); polietilenoglicol-catalase (250 U/mL PEG-catalase, agente de degradação intracelular de H_2O_2); CNP (10 nmol/L) + PEG-catalase (250 U/mL); Alopurinol (100 $\mu\text{mol/L}$, inibidor de xantina oxidase), GM6001 (1 $\mu\text{mol/L}$, inibidor não seletivo de MMPs) em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular. Em aortas com endotélio, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para PE (0,1 nmol/L a 10 $\mu\text{mol/L}$), em ausência ou presença de L-NAME (inibidor não seletivo de NOS); CNP (10 nmol/L) + L-NAME (100 $\mu\text{mol/L}$); N^ω -propil-L-arginina (50 nmol/L, inibidor seletivo de NOS1); CNP (10 nmol/L) + N^ω -propil-L-arginina (50 nmol/L); 1400W (10 nmol/L, inibidor seletivo de NOS2); ou CNP (10 nmol/L) + 1400W (10 nmol/L). Nas curvas concentração-efeito cumulativas para PE em presença de Anantin (1 $\mu\text{mol/L}$), PEG-catalase E- ou Alopurinol (100 $\mu\text{mol/L}$) a faixa de concentração de PE estudada foi de 1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$. Para o estudo da resposta vasodilatadora induzida pelo CNP, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (0,1 pmol/L a 0,5 $\mu\text{mol/L}$) em aorta de ratos, previamente contraídas com PE (1 $\mu\text{mol/L}$), em artérias E+ e E-.

3.6.2 Estudos de reatividade vascular em artérias mesentéricas de resistência

O intestino removido foi colocado imediatamente em béquer contendo solução de Krebs-Henseleit a 4°C com a seguinte composição (em mmol/L): NaCl 119,0; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,2; CaCl_2 2,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1,2; NaHCO_3 25; glicose 11,0; pH 7,4. A partir do intestino, foi realizado o isolamento das artérias mesentéricas de resistência, que foram dissecadas e cortadas em anéis com 2 mm de comprimento com auxílio de um microscópio de dissecação (Nikon, SMZ 645, USA). Um fio de tungstênio (40 μm de diâmetro) foi preso em uma das suas extremidades a um miógrafo para vasos de resistência (Danish Myo Tech, modelo 610M, JP-Trading I/S, Aarhus, Dinamarca) e posteriormente foi adicionado à cuba 5 mL de Krebs-Henseleit a 4°C. A artéria foi inserida no fio e este teve sua outra extremidade presa ao miógrafo. Um segundo fio de tungstênio foi inserido no lúmen da artéria e preso ao miógrafo para estudo de tensão. O endotélio vascular não foi removido das preparações de artérias mesentéricas de resistência. O miógrafo, por sua vez, manteve-se conectado a um sistema para aquisição de dados (PowerLab/8SP,

ADInstruments, Austrália) e este a um computador. Após a montagem das preparações, a solução de Krebs-Henseleit a 4° foi substituída por 5 mL de solução de Krebs-Henseleit a 37°C, pH 7,4, sob aeração constante com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂). Após o período de estabilização de 20 min, a artéria foi estirada a uma tensão de repouso considerada ótima em relação ao seu diâmetro interno. Para isso, em cada segmento arterial, a relação tensão/diâmetro foi calculada a uma circunferência interna que corresponde à pressão transmural de 100 mmHg para um vaso relaxado *in situ* (L100). Para a realização dos experimentos, as artérias foram mantidas com uma circunferência interna L1, calculada por meio da fórmula $L1=0,90 \times L100$, na qual o desenvolvimento de força é máximo. O diâmetro luminal efetivo foi determinado de acordo com a equação $l=L/\pi$, utilizando o software específico para normalização de artérias de resistência (DMT Normalization Module, ADInstruments, Austrália). Após o processo de normalização, as artérias foram contraídas com solução de alta concentração extracelular de KCl (120 mmol/L), com a finalidade de se avaliar sua integridade funcional. A efetividade da manutenção ou da remoção do endotélio foi demonstrada pela presença ou ausência, respectivamente, de relaxamento à Acetilcolina (ACh, 10 µmol/L) em anéis previamente contraídos com PE (10 µmol/L). Para o estudo da resposta vasoconstritora da PE, foram realizadas curvas concentração-efeito cumulativas para a PE (0,1 nmol/L – 0,1 mmol/L), em ausência ou presença de CNP (10 nmol/L, 30 minutos), em artérias com endotélio vascular (E+).

3.6.3 Análise estatística

Os dados foram apresentados como as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.) de pelo menos 4 preparações obtidas de diferentes animais. Todos os valores de contração para a PE em aorta de ratos foram apresentados como gramas de tensão (g), corrigidos pelo valor de peso seco (g) dos anéis de aorta (24h em estufa, a 37°C). As determinações de EC₅₀ (concentração que produz 50% da resposta máxima) e de efeito máximo (Emax) foram realizadas utilizando o método de regressão não-linear dos mínimos quadrados, utilizando-se o programa GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00, 2001). Para a análise da potência do agonista, foi utilizado o valor de pD₂ (-log EC₅₀), que assume distribuição normal, compatível com manipulações e comparações estatísticas. O fator interação foi

avaliado utilizando-se a análise de variância de dois fatores, *Two-way ANOVA* ($P < 0,01$), seguida de correção de Bonferroni ($P < 0,01$) para identificação do(s) fator(es) de interação. A comparação entre quatro ou mais médias, supondo distribuições normais para a mesma população, foi realizada pela análise de variância, *One-way ANOVA* ($P < 0,05$) com pós-teste de *Newman-Keuls* ($P < 0,05$).

3.7 Estudos por citometria de fluxo

3.7.1 Isolamento de células endoteliais de aorta de ratos

Após o período de 4 h da cirurgia fictícia ou de indução do choque séptico, os animais dos grupos Sham e CLP foram anestesiados com Isoflurano (Forane® Abbott) e sacrificados por decapitação. Segmentos de aorta torácica dos ratos (2 cm) foram dissecados dos tecidos adjacentes, isolados, cortados longitudinalmente e mantidos em solução de Hanks completa modificada (em mmol/L) (CaCl₂ 1,6; MgCl₂ 1,0; NaCl 120,0; KCl 5,0; NaH₂PO₄ 0,5; glicose 10,0; HEPES 10,0; pH 7,4). A remoção das células endoteliais foi feita mecanicamente com o auxílio de uma haste plástica plana (rodinho). A suspensão de células obtida foi centrifugada a 200 x g por 5 min e concentrada em 500 µL de solução de Hanks contida em tubos de poliestireno para citometria de fluxo. Após esta etapa, as células permaneceram acondicionadas em incubadora de CO₂ a 37°C, até o momento do experimento. Cada *n* experimental representa um animal. A análise por citometria de fluxo foi realizada em Citômetro de Fluxo (FACS Canto, BD; Processo FAPESP n° 04/09448-5). A marcação positiva para células endoteliais de ratos foi confirmada pela utilização do anticorpo anti-CD31 (1:250, 60 min, a 37°C), com marcação positiva de 87 ± 3% (n=4) das células em estudo.

3.7.2 Medida da concentração citosólica de NO ([NO]_c) em células endoteliais isoladas da aorta

Para a realização da medida da [NO]_c pela técnica de citometria de fluxo, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos Sham e CLP, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura para verificar a emissão de auto-florescência (Branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 min com a sonda fluorescente 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2/DA, 10 µmol/L, excitada com laser 488

nm, com emissão em 530/30, utilizando detector D), que após ter sua porção diacetato clivada por esterases da membrana plasmática, reage com o produto de oxidação do NO, o trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), produzindo o composto fluorescente estável DAF-2T (Nakatsubo et al., 1998). A seguir, nova leitura da amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DAF-2/DA. Foi realizada a aquisição de 5.000 eventos em 500 μ L de suspensão de células para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o software DIVA.

3.7.3 Medida de EROs em células endoteliais isoladas da aorta de ratos

Para a realização da medida de EROs pela técnica de citometria de fluxo, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos Sham e CLP, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura, para verificar a emissão de auto-florescência (Branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 min com a sonda fluorescente Dihidroetidina (DHE - 2,5 μ mol/L – excitada com laser 488 nm, com emissão em 585/42, utilizando detector C). A sonda DHE permeia as membranas celulares, onde é oxidada a 2-hidroxi-etídio (2-OHET⁺) por O_2^- , ou a etídio (Et⁺) por outras EROs, que por sua vez, são então intercalados ao DNA celular sob a forma de brometo de etídio responsável pela emissão de fluorescência (De luliis et al., 2006). A seguir, nova leitura da amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DHE no interior das células endoteliais. A suspensão de células endoteliais foi avaliada em presença e incubação por 30 min com os seguintes inibidores: Tiron (100 μ mol/L), PEG-catalase (3000 U/ μ L) ou Apocinina (inibidor de NADPH oxidase, 100 μ mol/L) e submetida à leitura para verificar a emissão de fluorescência basal. Foi realizada a aquisição de 5.000 eventos em 500 μ L de suspensão de células para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o software DIVA.

3.7.4 Medida de H_2O_2 em células endoteliais isoladas da aorta de ratos

Para a realização da medida de H_2O_2 pela técnica de citometria de fluxo, a suspensão de células endoteliais de aorta de ratos Sham e CLP, sem qualquer estímulo, foi submetida à leitura, para verificar a emissão de auto-florescência

(Branco). A suspensão de células foi então incubada por 20 min com a sonda fluorescente DCFH-DA (100 $\mu\text{mol/L}$, excitada com laser 488 nm, com emissão em 585/42, utilizando detector C) (Carter; Narayanan, Robinson, 1994; Hempel et al., 1999; Drouin et al., 2007). A seguir, nova leitura da amostra foi realizada para obtenção dos valores basais de fluorescência emitidos pelo DCFHDA no interior das células endoteliais. Foi realizada a aquisição de 2500 eventos em 250 μL de suspensão de células para cada protocolo realizado. A mediana da intensidade de fluorescência foi medida em todas as amostras usando o software DIVA. Como controle negativo do experimento, foram utilizadas marcações de fluorescência para a sonda DCFHDA em presença de PEG-catalase (1500 U/ μL). A produção de H_2O_2 também foi avaliada em ausência ou presença de estímulo com CNP (1 $\mu\text{mol/L}$, 30 minutos).

3.7.5 Análise estatística

Nos estudos de citometria de fluxo, foram analisados os traçados citofluorográficos (histogramas) gerados pelo programa DIVA (Software DIVA) após leitura pelo citômetro de fluxo. Os histogramas obtidos descrevem fenômenos de dispersão do laser que incide sobre as células, de absorção da luz e de emissão de fluorescência. Os histogramas biparamétricos correlacionam a luz dispersa lateralmente (*Side-scattered light*, SSC), proporcional à complexidade ou granulosidade interna da célula, em função da luz dispersa para frente (*Forward-scattered light*, FSC), proporcional à área da superfície celular. A correlação das medidas de SSC e FSC permitem diferenciar os tipos celulares em populações celulares heterogêneas, agrupadas em *gates* (fronteiras gráficas que definem as características de uma população celular). Logo, os histogramas biparamétricos gerados pela análise citofluorográfica foram utilizados para analisar a homogeneidade da população de células endoteliais empregada na leitura. Já histogramas monoparamétricos relacionam o número de eventos celulares adquiridos por leitura em função da intensidade de fluorescência emitida pela sonda fluorescente em análise e foram utilizados para analisar a biodisponibilidade de NO, EROs ou H_2O_2 intracelular nas amostras empregadas durante a leitura.

Os resultados foram apresentados como a média das medianas da intensidade de fluorescência (IF) das células com marcação positiva (P3) \pm E.P.M.

para as sondas fluorescentes DAF-2/DA, DHE ou DCFHDA. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). Os métodos estatísticos utilizados foram o Teste *t* de *Student* não pareado ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo dois grupos experimentais ou Análise de Variância de um fator (*One-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais apresentando apenas um fator.

3.8 Dosagem plasmática de metabólitos do NO

A medida de nitrato, nitrito e S-nitrosotióis foi realizada no plasma de ratos Sham e CLP como descrita por Pinheiro et al. (2012). Para tanto, os ratos Sham e CLP, 4 h após a cirurgia fictícia ou de indução de sepse, e avaliação da pressão artéria e frequência cardíaca, foram sacrificados e amostra de sangue coletada em tubo contendo heparina, NEM (8 mmol/L) e DTPA (0,1 mmol/L). O sangue foi centrifugado durante 5 min a 3.000 rpm. O plasma foi coletado e congelado a -70°C . Para medir o conteúdo de nitrito, 50 μL de amostra foi injetado na solução de triiodeto acidificado, borbulhado com nitrogênio em fase gasosa de quimioluminescência do *NO analyzer* (Sievers Model 280 NO analyzer; Boulder, CO, USA). Para medida de S-nitrosotióis, 400 μL de amostras foram tratadas com sulfanilamida ácida (5% de sulfanilamida em HCl 1 mol/L) na solução de triiodeto acidificado com borbulhamento de nitrogênio no *NO analyzer*. Para diferenciar o S-nitrosotiol de outras espécies relacionadas ao NO, as amostras foram tratadas com ou sem HgCl_2 (5 mmol/L) por 2 min, seguido de tratamento com sulfanilamida ácida por 3 min antes da injeção das amostras na solução de triiodeto acidificado. Entretanto, o sinal das amostras tratadas com HgCl_2 foi abaixo do limite de detecção, não sendo portanto detectado espécies de NO estáveis relacionadas com HgCl_2 . Aproximadamente 8 mL de solução de triiodeto (2 g de iodeto de potássio e 1,3 g de iodo diluído em 40 mL de água com 40 mL de ácido acético) foi colocado na câmara de borbulhamento, na qual as amostras eram injetadas. Os dados foram analisados com o software Origin Lab 6.1.

A dosagem de NO_x (nitrato + nitrito) foi realizada pela reação de Griess. Em resumo, as amostras foram incubadas com o mesmo volume de solução tampão nitrato-redutase (0,1 mol/L de fosfato de potássio pH 7,5, contendo 1 mmol/L de β -

nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato e 2U de nitrato redutase/mL) em microplaca. As amostras foram incubadas *overnight*, a 37°C, no escuro. Posteriormente, 8 µL de reagente Griess (1% sulfanilamida, 0,1% hidrocloreto de naftiletileno-diamina em 5% ácido fosfórico) preparado no momento da utilização foi adicionado em cada poço da placa e incubado por 5 min em temperatura ambiente. A curva padrão de nitrato foi obtida por incubação de nitrato de sódio (0,2 a 200 mmol/L) com o mesmo tampão nitrato-redutase. A seguir, foi determinado o valor de NOx (nitrato + nitrito), que foi subtraído do valor de nitrito isolado, resultando no valor de nitrato isolado.

3.8.1 Análise estatística

Os dados foram apresentados como as médias \pm erro padrão da média (E.P.M.) de no mínimo 4 amostras diferentes. A análise estatística utilizada foi teste *t* de Student ($P < 0,05$).

3.9 Estudos por Microscopia Confocal

Os estudos por microscopia confocal foram divididos em estudos de fluorescência emitida por sondas e estudos por imunofluorescência. Para tanto, anéis de aorta com endotélio ou coração, foram isolados de ratos Sham e CLP, 4 h após a cirurgia fictícia ou de indução da sepse. Estes foram limpos e dissecados dos tecidos aderentes e imediatamente congelados em líquido de crioproteção (Tissue Tek - OCT). Os blocos contendo os anéis de aorta ou corações foram armazenados em freezer a -70°C até o momento do preparo das lâminas, no criostato (-25°C, sem iluminação; lâminas de 10 µm de espessura). As lâminas foram armazenadas em freezer a -20°C até o momento dos experimentos.

3.9.1 Estudos de Fluorescência Emitida por Sondas Seletivas

Para os estudos de fluorescência emitida por sondas seletivas, os cortes de aorta E+ de ratos Sham e CLP foram lavados com solução PBS ou solução de Hanks completa modificada (em mmol/L: CaCl₂ 1,6; MgCl₂ 1,0; NaCl 120,0; KCl 5,0; NaH₂PO₄ 0,5; glicose 10,0; HEPES 10,0; pH 7,4). A seguir, os cortes foram incubados com as seguintes sondas fluorescentes seletivas para a medida dos parâmetros basais: DHE (seletiva para EROs, 10 µmol/L por 30 min em temperatura

ambiente), DCFHDA (seletiva para H_2O_2 , 100 $\mu\text{mol/L}$ por 30 min a 37°C), Rhod-2AM (seletiva para cálcio citosólico, 10 $\mu\text{mol/L}$ por 20 min em temperatura ambiente), ou Di-4-anepps (seletiva para potencial de membrana, 1 $\mu\text{mol/L}$ por 10 min em temperatura ambiente). Após o tempo de incubação específico para cada sonda fluorescente, foi realizada a lavagem dos cortes, utilização de lamínulas (Knittel Glaser, 24x50 mm) e visualização no microscópio confocal. A solução de PBS foi utilizada para os experimentos com as sondas DHE ou DCFHDA. A solução de Hanks completa modificada foi utilizada para os experimentos com as sondas Rhod-2AM ou Di-4-anepps. Para as sondas Rhod-2AM e Di-4-anepps foram realizados estímulos específicos com CNP (1 $\mu\text{mol/L}$, 5 min) ou solução KCl (120 mmol/L , 5 min), respectivamente, em diferentes cortes de aorta E+.

3.9.2 Estudos por Imunofluorescência

Para os estudos por imunofluorescência, as amostras nas lâminas foram fixadas com paraformaldeído 4% por 15 min e então incubadas com solução de albumina de soro bovino 1% + soro normal de cabra 10% + glicina 0,3 mol/L e PBS-Tween 0,1% por 60 min para permeabilizar as células e bloquear as ligações não específicas. Então, os cortes foram incubados com os seguintes anticorpos: anticorpo primário policlonal produzido em coelho anti-NPR-B (1:200; aorta e coração) ou anticorpo primário policlonal produzido em coelho anti-NPR-C (1:800; aorta e coração), anticorpo primário policlonal produzido em cabra anti-CNP (1:100; para aorta), anticorpo primário policlonal produzido em coelho anti-receptor α_1 adrenérgico (1:1000; para aorta), anticorpo monoclonal produzido em camundongo anti- α -actina do músculo liso vascular FITC (1:100; para aorta), anticorpo primário produzido em camundongo anti-CD31 Phycoerythrina (1:100; marcação de células endoteliais; para aorta) por 12 h, a 4°C . Os anticorpos secundários foram: anticorpo produzido em ovelha anti-coelho Alexafluor 647 (1:1000, 60 min de incubação) e anticorpo produzido em camundongo anti-cabra Alexafluor 647 (1:1000; 60 min de incubação). Utilizou-se o Fluoroshield® com DAPI com incubação a 4°C , protegido da luz, *overnight* para marcação dos núcleos celulares. Posteriormente, as lâminas foram seladas em suas bordas com esmalte incolor hipoalergênico e mantidas a 4°C até completa secagem do esmalte.

3.9.3 Aquisição das imagens por microscopia confocal

As imagens foram adquiridas em microscópio confocal (Leica TSC SP5; Laboratório de Microscopia Confocal – LMMC, Processo FAPESP n° 2004/08868-0), focadas usando objetiva de imersão em óleo (aumento de 63x). O *software* de análise *Leica Application Suite – Advanced Fluorescence Lite 2.3.0 (LAS-AF Lite, Leica Microsystems, 1997-2010)* foi utilizado para capturar as imagens dos cortes no modo xyz, com análise sequencial, em 200 Hz no formato de 1024x1024, com zoom de 1x, no modo de aquisição *TCS SP5*.

3.9.4 Análise estatística

As imagens foram analisadas com o *software ImageJ (1.46r, Wayne Rasband, NIH, USA)*, pela utilização da área integral do endotélio vascular ou de áreas do mesmo tamanho para o músculo liso vascular (MLV) ou adventícia das aortas (retângulos de 100 x 50, de 20 regiões diferentes no MLV e de retângulos de 40 x 27, de 8 regiões diferentes na camada adventícia), ou ainda áreas do mesmo tamanho para o ventrículo esquerdo (retângulos de 100 x 50, de 20 regiões diferentes do miocárdio) nos estudos por imunofluorescência ou apenas a quantificação da camada do MLV das aortas para os estudos por sondas fluorescentes seletivas (retângulos de 110 x 70, de 10 regiões diferente no MLV) nas aortas de ratos Sham e CLP. Tais valores foram plotados no programa de análise estatística *GraphPad Prism (graphPad software, versão 3.00, 2001)*, e analisados como média ± E.P.M. de 4 fotomicrografias diferentes (de animais diferentes, *n* experimental). Os métodos estatísticos utilizados foram o Teste *t* de *Student* não pareado ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo dois grupos experimentais ou Análise de Variância de um fator (*One-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais apresentando apenas um fator.

3.10 Estudos por *Western blotting*

Para os estudos por *Western blotting*, aortas torácicas (2 cm) foram isoladas de ratos Sham e CLP 4 h após a cirurgia fictícia ou de indução de sepse, limpas e armazenadas em microtubos (sem solução), em freezer a -70°C. A seguir, essas amostras foram homogeneizadas em tampão RIPA. O volume destes extratos

correspondente a 30 µg de proteínas foi misturado a igual volume de tampão contendo o detergente SDS (Tris-HCl 100 mmol/L, SDS 4%, azul de bromofenol 0,1%, glicerol 20%), a fim de carregar negativamente as proteínas das amostras para a corrida eletroforética. Esta mistura foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%. Em seguida, as proteínas separadas no gel de eletroforese foram transferidas para membranas de nitrocelulose (GE Healthcare). Após etapa de bloqueio com solução de leite (5%), durante 60 min, as membranas foram incubadas ou com anticorpo anti-NPR-C (1:800), anticorpo anti-NPR-B (1:5000), anti-Nox1 (1:2000), anti-NOS2 (1:2500), anti-NOS3 (1:2500), anti-MMP-2 (1:1000), ou anti-MMP-9 (1:1000), *overnight*, a 4°C. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (HRP), produzidos em cabra anti-coelho ou anti-camundongo, por 60 min em temperatura ambiente e foram reveladas por quimioluminescência com o sistema ECL Millipore. As mesmas membranas, depois de reveladas, passaram por uma etapa de retirada dos anticorpos outrora ligados por meio da incubação com tampão específico (β -mercaptoethanol 100 mmol/L, SDS 2%, Tris-HCl 62,5 mmol/L; pH 6,8) e procedeu-se a imunomarcagem da proteína constitutiva β -actina, que serve como normalizador das proteínas teciduais. Para tanto, as membranas foram incubadas com o anticorpo monoclonal produzido em camundongos anti- β -actina (1:2000) por 60 min em temperatura ambiente e reveladas, conforme descrito. A intensidade das bandas foi quantificada por densitometria utilizando o Programa *ImageJ* (1.46r, Wayne Rasband, NIH, USA).

3.10.1 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm E.P.M. de no mínimo 4 amostras diferentes. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). Os métodos estatísticos utilizados foram o Teste *t* de *Student* não pareado ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo dois grupos experimentais ou Análise de Variância de um fator (*One-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais apresentando apenas um fator.

3.11 Estudos pelo Ensaio de Lucigenina

A produção de EROs dependente de NADPH oxidase vascular foi medida em anéis de aorta E+ de ratos Sham e CLP, previamente estimulados ou não (basal), no ensaio de reatividade vascular em banho de órgão isolado, com PE (0,1 $\mu\text{mol/L}$) em ausência ou presença de CNP (10 nmol/L , 30 min). As aortas E+ estimuladas ou não, foram congeladas em microtubos a -70°C até o momento do ensaio. Para tanto, as aortas E+ congeladas foram transferidas para os tubos de luminescência contendo 1 mL de solução de Hanks completa, pH 7,4 e lucigenina (5 $\mu\text{mol/L}$). Após estabilização do sinal, adicionou-se aos tubos NADPH (300 $\mu\text{mol/L}$) e a luminescência foi medida continuamente até estabilização do sinal, em Luminômetro de Tubo Único Berthold FB12, a 37°C . Os sinais derivados dos anéis de aorta foram subtraídos daqueles após a adição de NADPH, e os resultados foram normalizados pelo peso das aortas, e apresentados como unidades relativas de luminescência (URL)/mg/min. O software utilizado para aquisição dos dados foi o FB Sirius.

3.11.1 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm E.P.M. de no mínimo 4 amostras diferentes. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). Os métodos estatísticos utilizados foram o Teste *t* de *Student* não pareado ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo dois grupos experimentais ou Análise de Variância de um fator (*One-way ANOVA*), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais apresentando apenas um fator.

3.12 Estudos por Zimografia em Gel

Para os estudos por zimografia, aortas torácicas (2 cm) foram isoladas de ratos Sham e CLP, 4 h após a cirurgia fictícia ou de indução de sepse, limpas e armazenadas em microtubos (sem solução), em freezer a -70°C . Posteriormente, essas amostras foram homogeneizadas. As atividades de MMP-2 e MMP-9 foram determinadas em extrato de aorta E+, por meio da técnica de zimografia (Gerlach et al., 2005). Zimografia consiste em um gel de eletroforese ao qual é co-polimerizado o substrato para as enzimas em estudo. Neste caso, utilizamos gelatina, uma vez que a MMP-2 e a MMP-9 são gelatinases. As amostras de aorta foram trituradas e

homogeneizadas em tampão de extração (CaCl₂ 10 mmol/L, Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7,4; contendo os inibidores de proteases fenantrolina 1 mmol/L, PMSF 1 mmol/L, NEM 1 mmol/L) e incubadas por 16 h em geladeira. Do sobrenadante destes extratos, aplicou-se volume correspondente a 30 µg de proteína misturados em igual volume de tampão contendo SDS em géis de poliacrilamida a 12%, com 1% de gelatina. Após eletroforese, estes géis foram submetidos a dois banhos de 30 min, com Triton, para remover o SDS e para ocorrer a renaturação das proteínas e ativação enzimática. Em seguida, os géis foram incubados em tampão Tris-CaCl₂ pH 7,4 por 16 h, a 37 °C. Os géis foram então fixados e corados com solução de Coomassie Blue 0,05%, que cora todo o gel em azul por sua afinidade por proteína (gelatina). Para visualização das bandas referentes às MMPs, os géis foram descorados em solução de metanol a 30%/ácido acético 10%. Observou-se a formação de bandas claras devido à degradação da gelatina incorporada ao gel, contra o fundo azul escuro do Coomassie Blue. A quantificação das bandas das MMPs foi feita usando o programa ImageJ (1.46r, Wayne Rasband, NIH, USA). As formas da MMP-2 foram identificadas pelas bandas de 64, 75 e 72 kDa; e as formas da MMP-9 com as bandas de 230, 135, 92 e 87 kDa.

3.12.1 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média ± E.P.M. de no mínimo 4 amostras diferentes. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). O método estatístico utilizado foi o Teste *t* de *Student* não pareado ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo dois grupos experimentais.

3.13 Estudos por espectrofluorimetria

Para avaliar se o CNP altera a atividade da MMP-2, medidas da atividade da MMP-2 recombinante humana, na ausência ou presença de CNP (10 nmol/L ou 1 µmol/L) foram realizadas utilizando o Substrato Peptídeo I (10 µmol/L). A atividade foi avaliada em espectrofluorímetro de microplaca (excitação a 320 nm e emissão de 405 nm; Gemini EM, Molecular devices, Sunnyvale, CA, USA) durante 6 horas, a 37°C. O inibidor não seletivo de MMPs, fenantrolina (PHE, 100 µmol/L), foi utilizado como controle positivo da inibição da MMP-2.

3.13.1 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm E.P.M. de no mínimo 4 amostras diferentes. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). O método estatístico utilizado foi a Análise de Variância de um fator (*One-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais apresentando apenas um fator.

3.14 Estudos por Ecocardiografia

Ratos Sham e CLP foram anestesiados com mistura de 1,5% de isoflurano e 1% de oxigênio medicinal, permitindo ao animal manter a respiração espontânea durante o exame. O animal foi colocado em placa aquecida (37°C a 40°C) e as quatro patas conectadas a eletrodos de eletrocardiograma. Os pelos da região anterior do tórax foram retirados com o auxílio de creme depilatório Veet®. O equipamento de ecocardiografia utilizado foi o Vevo 2100® High-Resolution Imaging System (Visual Sonics, Toronto, ON, Canadá) (Processo FAPESP n° 2009/54010-1), com transdutor de frequência de 30 MHz. As medidas diastólicas foram realizadas na região de maior dimensão da cavidade ventricular, e as medidas sistólicas na região de menor dimensão da cavidade ventricular, de acordo com as diretrizes da Sociedade Americana de Ecocardiografia. As frações de ejeção e de encurtamento foram calculadas e utilizadas como determinantes da função cardíaca do ventrículo esquerdo.

3.14.1 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm E.P.M. de no mínimo 4 amostras diferentes. A análise estatística foi feita pelo programa GraphPad Prism (GraphPad Software Corporation, versão 3.02, 2001). Os métodos estatísticos utilizados foram o Teste *t* de *Student* não pareado ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo dois grupos experimentais ou Análise de Variância de um fator (*One-way* ANOVA), seguida pelo pós-teste de Newman-Keuls ($P < 0,05$), para protocolos envolvendo três ou mais grupos experimentais apresentando apenas um fator.

3.15 Drogas

Fenilefrina, Acetilcolina, L-NAME, 1400W, PEG-catalase, Alopurinol, GM6001, Apocinina, Tribromoetanol, PBS, DAF-2/DA, DHE, DCFHDA, anti- β -actina, anti-Nox1 e Fluoroshield[®] com DAPI foram adquiridos de Sigma Aldrich. CNP foi adquirido da American Peptide Company. Anantin foi adquirido de Bachem. Tiron foi adquirido de Riedel-deHaën. N^ω-propil-L-arginina foi adquirido de Tocris. Rhod-2AM e DAPI foram adquiridos de Molecular Probes Invitrogen[™] Life Technologies. Di-4-anepps foi adquirido de Life Technologies. Isoflurano foi adquirido de Abbott. Substrato peptídico I foi adquirido de R&D Systems. Anticorpos anti-NPR-B, anti-NPR-C, anticorpo anti-receptor α_1 -adrenérgico e anti- α actina do músculo liso foram adquiridos de Abcam. Anticorpo anti-CNP foi adquirido de Santa Cruz. Anticorpos anti-NOS2, anti-NOS3, anti-CD31, mouse anti-rabbit Alexafluor 647, goat anti-rabbit Alexafluor 647 foram adquiridos de BD Pharmingen[™]. Anticorpos anti-MMP2 e anti-MMP9 foram adquiridos de Millipore. Anticorpos secundários conjugados à peroxidase (HRP) cabra anti-camundongo e cabra anti-coelho foram adquiridos de GE Healthcare. Tissue Tek foi adquirido de Sakura.

3.16 Soluções

Fenilefrina, Acetilcolina, L-NAME, 1400W, N^ω-propil-L-arginina, PEG-catalase, PBS, Tiron e DAPI foram diluídos em água miliQ. Alopurinol foi diluído em solução de 1 mol/L de NaOH. CNP foi diluído em 5% de ácido acético e as demais séries em água miliQ. Anantin foi diluído em solução de 50 mmol/L de ácido acético. DAF-2/DA, DHE, DCFH-DA, Di-4-anepps, Rhod-2AM e GM6001 foram diluídos em 100% DMSO. Apocinina foi diluída em etanol 70%. Os anticorpos primários e secundários utilizados foram diluídos conforme as especificações dos fabricantes.

Resultados

4. Resultados

Para validação do modelo de indução do choque séptico por cirurgia de ligação e perfuração cecal (CLP) foi avaliada a porcentagem (%) de sobrevivência dos ratos CLP comparados aos ratos Sham, bem como os parâmetros cardiovasculares pelas medidas das PAP e PAM, como mostrado na figura 1. A sobrevivência dos ratos do grupo Sham foi de 100% no período de 24h após a cirurgia fictícia. Entretanto, a sobrevivência dos ratos do grupo CLP foi reduzida ao longo do tempo, atingindo 37% em 4h e apenas 2% em 24h após a cirurgia de indução do choque séptico (figura 1A). Nenhum rato do grupo CLP sobreviveu 24h após a cirurgia.

Como mostram as figuras 1B e 1C, a PAP e PAM dos ratos antes do momento da cirurgia fictícia (tempo zero, Sham) ou após a indução do choque séptico (tempo zero, CLP) não foram diferentes entre os grupos Sham (PAP: $85,8 \pm 0,49$ mmHg; PAM: $84,8 \pm 0,5$ mmHg) e CLP (PAP: $85,2 \pm 0,3$ mmHg; PAM: $84,2 \pm 0,3$ mmHg). Quatro horas após as cirurgias, ambos os grupos tiveram redução dos valores de PAP (Sham: $74,3 \pm 0,3$ mmHg; CLP: $40,7 \pm 0,8$ mmHg) e PAM (Sham: $73,3 \pm 0,3$ mmHg; CLP: $39,5 \pm 0,8$ mmHg). Esta redução foi maior no grupo de ratos CLP. Os valores de PAP e PAM, 4h após a cirurgia de indução do choque séptico, representaram os menores valores quando comparados aos demais tempos (1h, 2h ou 3h) no grupo CLP.

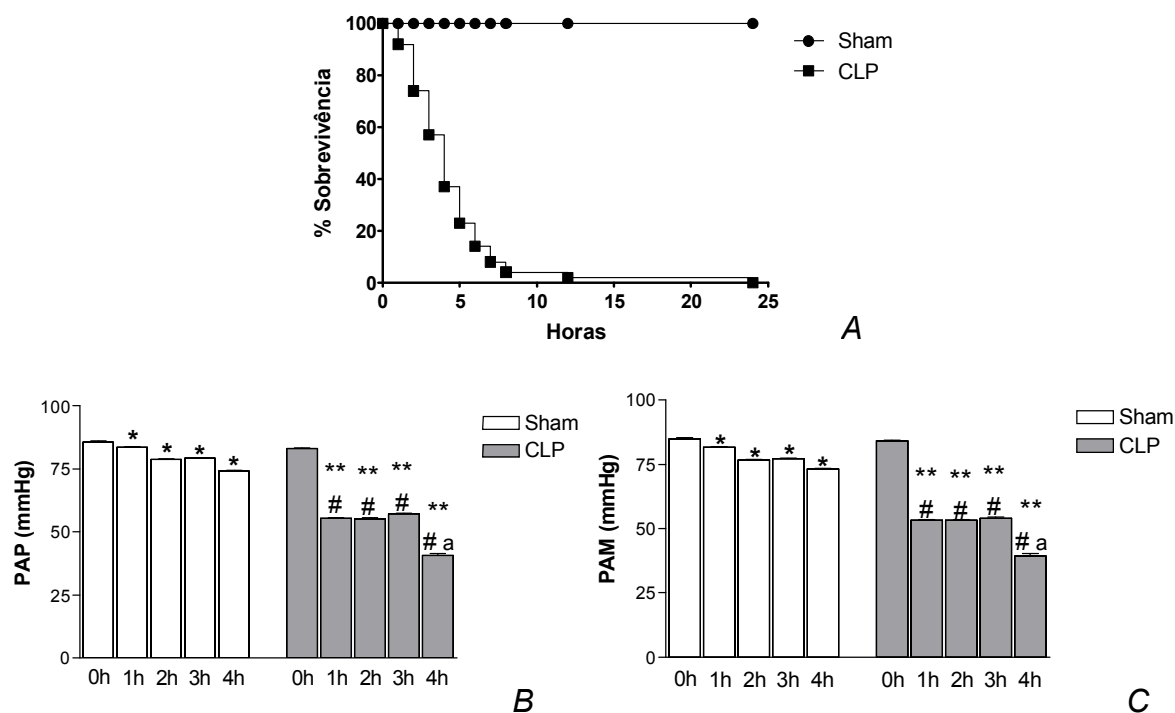


Figura 1. Sobrevivência, pressão arterial pulsátil (PAP) e pressão arterial média (PAM) de ratos submetidos à cirurgia fictícia (Sham) ou ao choque séptico (CLP). A, porcentagem de sobrevivência dos ratos Sham (n=20) ou CLP (n=30). B, PAP (mmHg) de ratos Sham e CLP antes e após as cirurgias. Tempo zero (0h) representa o momento antes da cirurgia. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. Diferente de 0h (* Sham, # CLP); ** diferente de Sham no respectivo tempo; ^a diferente de CLP 1h, 2h ou 3h (n=6), $P < 0,05$.

O efeito pressórico *in vivo* induzido pela PE foi avaliado em ratos Sham e CLP 4h após as cirurgias. A administração do veículo (solução salina 0,9%) não alterou a PAM basal dos ratos Sham e CLP. A PE induziu aumento da variação de PAM (Δ PAM) de ratos Sham e CLP de maneira dependente da concentração (figura 2A). Este efeito não foi diferente em baixas concentrações de PE (0,1 ou 0,3 nmol/Kg) entre Sham e CLP. Entretanto, em altas concentrações de PE (1; 3 ou 10 nmol/Kg) o efeito de aumento da PAM foi maior no grupo CLP comparado ao grupo Sham. Contudo, a análise da duração da resposta pressórica da PE mostrou que o tempo de efeito induzido pela PE foi menor no grupo CLP do que no grupo Sham (figura 2B). A tabela 1 apresenta os valores de PAM e a tabela 2 mostra os valores de duração de tempo da resposta pressórica induzida pela PE em ratos Sham e CLP.

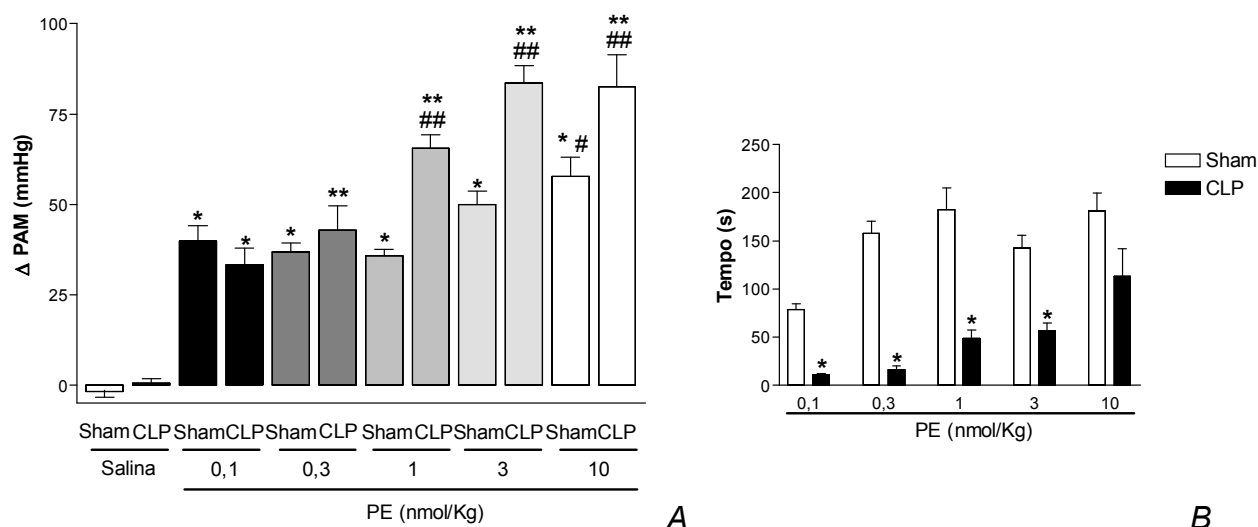


Figura 2. Resposta pressora induzida pela PE em ratos Sham e CLP. A, variação de PAM (Δ PAM, em mmHg) induzida pela PE (0,1 a 10 nmol/Kg) em ratos Sham e CLP. B, duração de tempo (em segundos) da resposta pressórica induzida pela PE em ratos Sham e CLP. Os ratos permaneceram não-anestesiados durante todo o estudo. * diferente de Salina Sham/Sham; ** diferente de Salina CLP; # diferente de 0,1; 0,3 ou 1 nmol/Kg de PE em Sham; ## diferente de 0,1 ou 0,3 nmol/Kg de PE em CLP; $n=5-7$ ($P<0,05$).

Tabela 1: Efeito pressórico *in vivo* da resposta induzida pela PE em ratos Sham e CLP.

		Δ PAM (mmHg)				
	Salina	PE (nmol/Kg)				
		0,1	0,3	1	3	10
Sham	1,82±1,51	39,96±4,07*	36,94±2,31*	35,83±1,84*	50,06±3,67*	57,73±5,30*#
CLP	0,61±1,23	33,28±4,70**	42,80±6,73**	65,56±3,68**###	83,68±4,80**###	82,57±8,92**###

* diferente de Salina Sham; ** diferente de Salina CLP; # diferente de 0,1; 0,3 ou 1 nmol/Kg de PE em Sham; ## diferente de 0,1 ou 0,3 nmol/Kg de PE em CLP; $n=5-7$ ($P<0,05$).

PE: Fenilefrina;

CLP: Ligação e perfuração cecal;

PAM: Pressão arterial média;

mmHg: milímetros de mercúrio.

Tabela 2: Tempo de duração da resposta pressórica *in vivo* induzida pela PE em ratos Sham e CLP.

Resposta Pressórica PE - Tempo (segundos)					
	PE (nmol/Kg)				
	0,1	0,3	1	3	10
Sham	78,44±6,11	157,50±13,12	182,68±22,36	142,70±13,20	180,94±18,57
CLP	10,62±1,65*	16,40±3,42*	48,38±9,07*	56,83±7,63*	113,42±11,52*

* diferente de Sham nas respectivas doses de PE; $n=5-7$ ($P<0,05$).

PE: Fenilefrina;

CLP: Ligação e perfuração cecal.

O efeito hipotensor induzido pelo CNP foi avaliado *in vivo* em ratos Sham e CLP. CNP reduziu o valor de PAM em ambos os grupos Sham e CLP de maneira semelhante (Δ PAM: Sham $-41,5\pm 8,3$ mmHg; CLP $-32,1\pm 1,4$ mmHg), como apresentado na figura 3. Além disso, após a administração de CNP houve aumento da variação de FC em ambos os grupos Sham (Salina: $-1,1\pm 0,7$ B.P.M.; CNP: $20,0\pm 2,8$ B.P.M.) e CLP (Salina: $1,1\pm 0,7$ B.P.M.; CNP: $39,7\pm 3,7$ B.P.M.) em relação ao veículo, e este aumento de FC foi maior em ratos CLP comparados aos ratos Sham (figura 3).

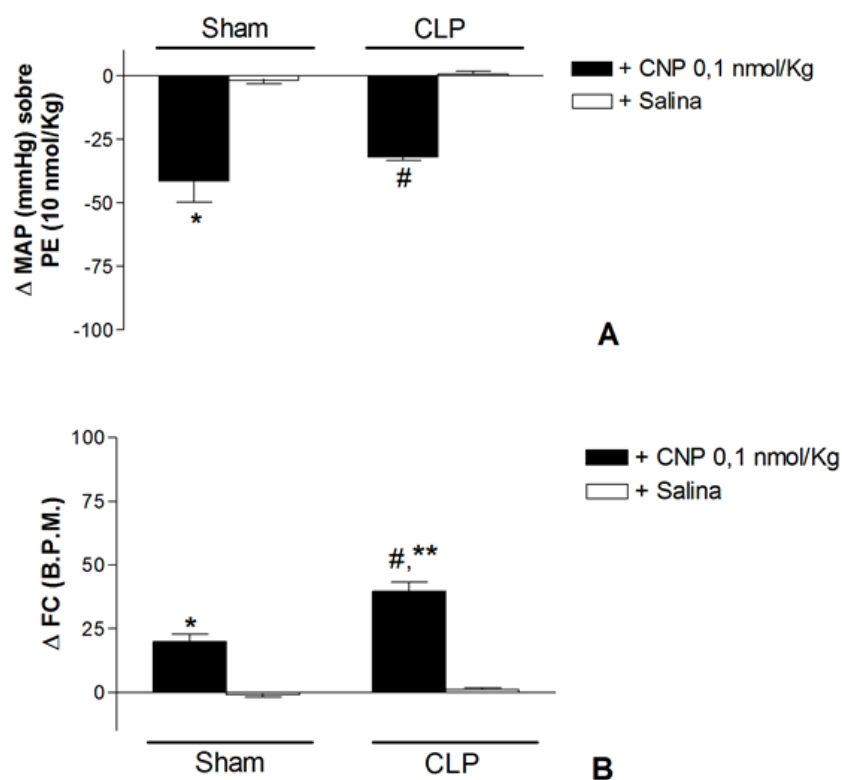


Figura 3. Efeito hipotensor *in vivo* induzido pelo CNP em ratos Sham e CLP. Variações de PAM (Δ PAM) e de FC (Δ FC) induzidas pelo CNP (0,1 nmol/Kg) ou veículo (salina) em ratos Sham (A) ou em ratos CLP (B). * diferente de Salina Sham; # diferente de Salina CLP; ** diferente de CNP Sham; $n=5-7$ ($P<0,05$).

Os efeitos vasculares *in vitro* induzidos pela PE ou CNP foram também analisados em aorta e artéria mesentérica de resistência de ratos Sham e CLP. A PE induziu contração das aortas de ratos Sham e CLP, sendo esta contração modulada negativamente pelo endotélio vascular. Como mostra a figura 4, a remoção do endotélio (E-) potencializou a contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham. Em relação às aortas de ratos CLP, a contração induzida pela PE foi menor, em potência e efeito máximo da PE, em aortas com endotélio (E+) comparadas às aortas E+ de ratos Sham. Porém, a remoção endotelial (E-) potencializou a contração e aumentou o E_{max} da PE em ratos CLP, mas o valor de pD_2 permaneceu menor que aquele observado em aorta E- ratos Sham. A tabela 3 sumariza os valores de pD_2 e E_{max} da PE em aortas de ratos Sham e CLP. Os valores de contração induzidos pela PE foram normalizados pelo peso seco das artérias em função dos valores de contração (g/g). Tais valores não foram diferentes

entre os grupos Sham e CLP (peso seco: Sham E+ $0,0011 \pm 0,00005$ g; E- $0,0012 \pm 0,00006$ g; CLP E+ $0,0012 \pm 0,00005$ g; E- $0,0011 \pm 0,00005$ g).

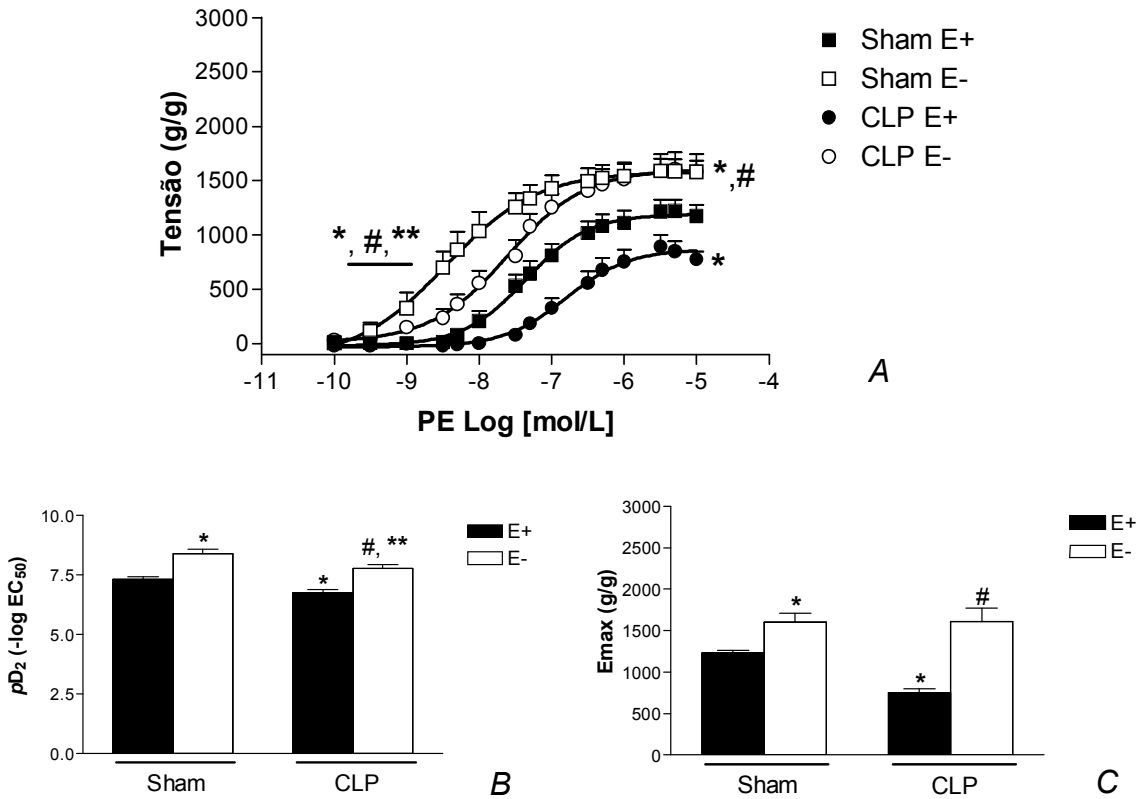


Figura 4. Contração induzida pela PE em aortas de ratos Sham e CLP. A, curva concentração-efeito cumulativa para PE (0,1 nmol/L – 10 µmol/L) em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (quadrados) ou CLP (círculos) 4h após as cirurgias fictícia (Sham) ou de indução do choque séptico (CLP), respectivamente. B, valores de pD_2 das curvas concentração-efeito cumulativas para PE. C, valores de efeito máximo (Emax; em g/g) induzido pela PE. Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham E+; ** diferente de Sham E-; # diferente de CLP E+; $n=10-11$ ($P<0,05$).

Tabela 3. Potência (pD_2) e efeito máximo (Emax) induzidos pela PE em aortas de ratos Sham e CLP.

Grupos	Sham		CLP	
	E+	E-	E+	E-
pD_2	7,32±0,10	8,40±0,17*	6,74±0,14*	7,76±0,16 ^{#*}
Emax (g/g)	1232±30	1601±109*	753±47*	1612±159 [#]

* diferente de Sham E+; ** diferente de Sham E-; # diferente de CLP E+; $n=10-11$ ($P<0,05$).

PE: Fenilefrina;

CLP: Ligação e perfuração cecal;

pD_2 : Potência do agonista PE;

Emax: Efeito máximo do agonista PE;

E+: Aorta com endotélio;

E-: Aorta sem endotélio.

A contração induzida por alta concentração extracelular de potássio (K^+) foi avaliada em aortas de ratos Sham e CLP. Como mostrado na figura 5, KCl 60 mmol/L induziu contração em aortas de ratos Sham e CLP, que foi menor apenas no grupo CLP E+ comparado ao Sham E+ ou CLP E- (KCl: Sham E+ 1075±96 g/g; E- 957±94 g/g; CLP E+ 666±61 g/g; E- 846±132 g/g).

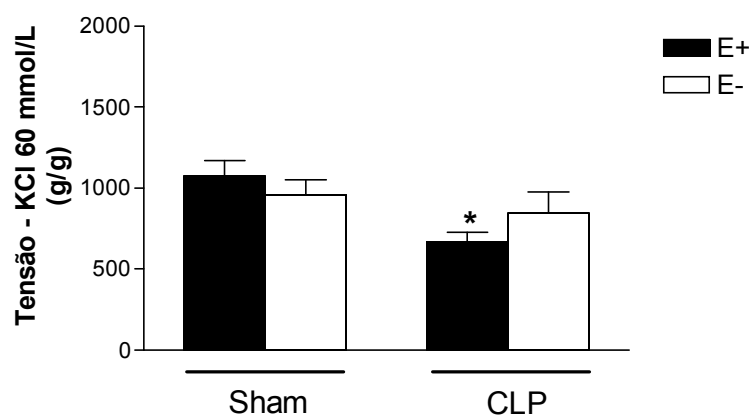


Figura 5. Contração induzida por solução de alta concentração extracelular de potássio em aortas de ratos Sham e CLP. As aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular foram estimuladas com solução de KCl 60 mmol/L e a tensão isométrica foi avaliada (gramas de tensão; g). Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham E+; $n=8-12$ ($P<0,05$).

Para avaliar o relaxamento vascular induzido pelo CNP, curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP foram realizadas em aortas de ratos Sham e CLP. A figura 6 mostra o efeito vasodilatador induzido pelo CNP em aorta de ratos. O CNP induziu o relaxamento vascular em aortas de ratos de maneira independente do endotélio vascular (E_{max} CNP: Sham E⁺: $-1,69 \pm 0,18$ g; E⁻: $-1,96 \pm 0,14$ g; CLP E⁺: $-0,90 \pm 0,07$ g; E⁻: $-1,20 \pm 0,17$ g). Entretanto, o relaxamento induzido pelo CNP em aortas de ratos CLP foi menor, em E_{max} , que o observado em aorta de ratos Sham, mas os valores de pD_2 não foram diferentes entre os grupos (Sham E⁺: $8,08 \pm 0,26$; E⁻: $7,69 \pm 0,08$; CLP E⁺: $8,29 \pm 0,38$; E⁻: $7,46 \pm 0,24$).

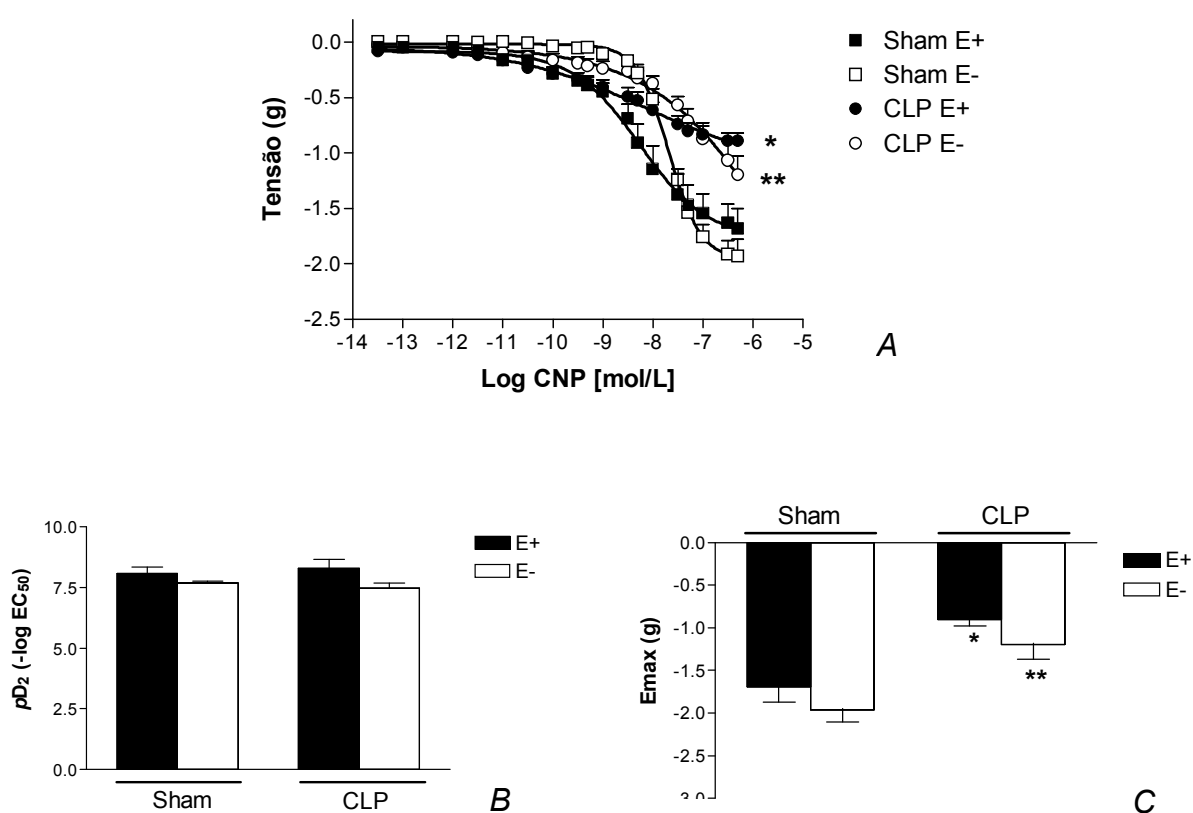


Figura 6. Efeito vasodilatador induzido pelo CNP em aorta de ratos Sham e CLP. A, curvas concentração-efeito cumulativas para o CNP (0,1 pmol/L – 0,5 μ mol/L) sobre contração induzida por PE (1 μ mol/L) em aortas com (E⁺) ou sem (E⁻) endotélio isoladas de ratos Sham ou CLP, 4h após as cirurgias. B, valores de pD_2 para CNP em aortas de ratos Sham e CLP. C, valores de efeito máximo (E_{max}) em aorta de ratos Sham e CLP. Dados são apresentados como gramas de tensão (g). * diferente de Sham E⁺; ** diferente de Sham E⁻; $n=7-12$ ($P<0,05$).

Para determinar se o CNP era capaz de modular a resposta contrátil da PE, curvas concentração-efeito cumulativas para PE foram realizadas na presença de

CNP (10 nmol/L) em aortas de ratos Sham e CLP. Verificamos que o CNP produziu um efeito modulador negativo sobre a contração induzida pela PE e este efeito foi maior em aortas de ratos CLP comparado ao Sham (figura 7). A tabela 4 sumariza os valores de pD_2 e E_{max} da PE em presença do CNP.

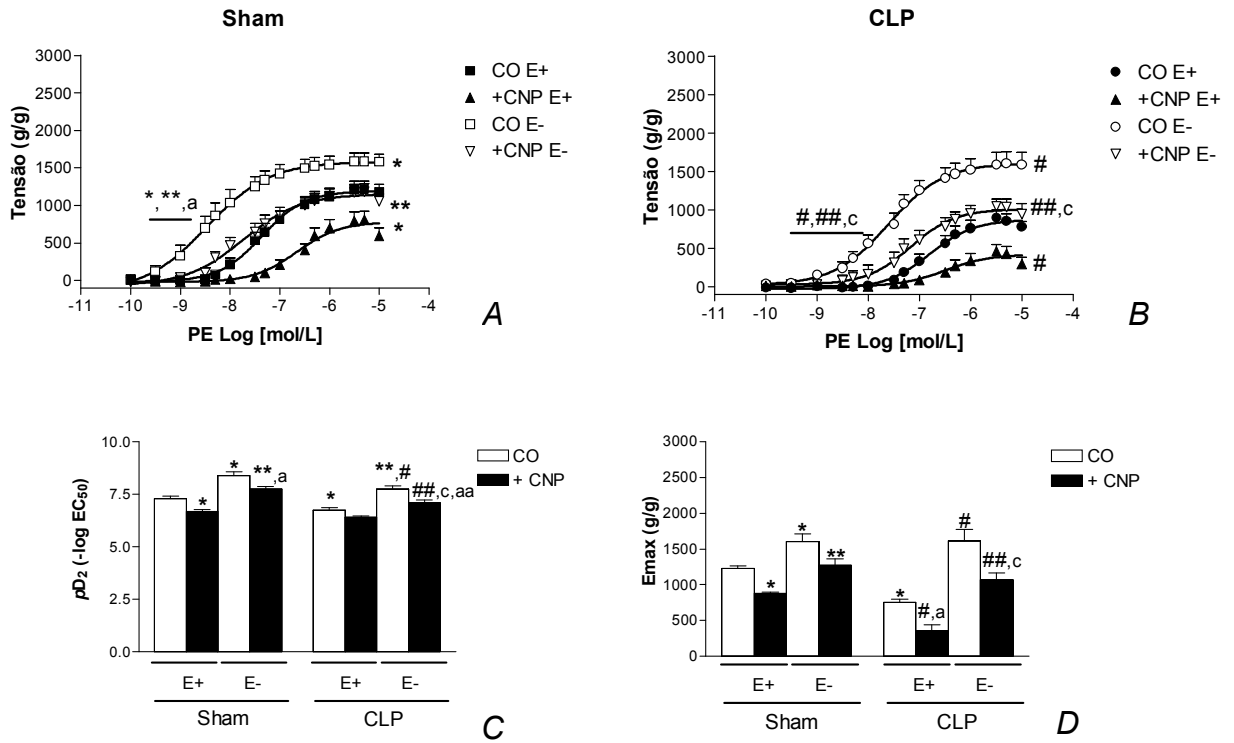


Figura 7. Efeito do CNP sobre a contração da PE em aorta de ratos. A, curvas concentração-efeito cumulativas para PE (0,1 nmol/L – 10 μ mol/L) em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular, isoladas de ratos Sham, em ausência (CO) ou presença de exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min). B, curva concentração-efeito cumulativa para PE em aortas E+ ou E- isoladas de ratos CLP, em ausência (CO) ou presença de exposição prévia ao CNP. C, valores de pD_2 das curvas concentração-efeito cumulativas para PE em ausência ou presença de CNP. D, valores de efeito máximo (E_{max} ; em g/g) induzido pela PE em ausência ou presença de CNP. Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^{aa} diferente de Sham E- CNP; ^c diferente de CLP E+ CNP; $n=10-11$ ($P<0,05$).

Tabela 4: Potência (pD_2) e efeito máximo (Emax) induzidos pela PE em ausência ou presença de exposição prévia ao CNP, em aortas de ratos Sham e CLP.

Grupos	Sham			
	E+		E-	
	CO	+ CNP	CO	+ CNP
pD_2	7,32±0,10	6,68±0,10*	8,40±0,17*	7,74±0,13** ^a
Emax (g/g)	1232±30	877±25*	1601±109*	1272±87**
Grupos	CLP			
	E+		E-	
	CO	+ CNP	CO	+ CNP
pD_2	6,74±0,14*	6,42±0,06	7,76±0,16 ^{###}	7,10±0,14 ^{###,c,aa}
Emax (g/g)	753±47*	365±74 ^{#,a}	1612±159 [#]	1065±102 ^{###,c}

* diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^{aa} diferente de Sham E- CNP; ^c diferente de CLP E+ CNP; $n=10-11$ ($P<0,05$).

PE: Fenilefrina;

CNP: Peptídeo natriurético tipo C;

CO: Condição controle sem incubação prévia ou tratamento;

CLP: Ligação e perfuração cecal;

pD_2 : Potência do agonista PE;

Emax: Efeito máximo do agonista PE;

E+: Aorta com endotélio;

E-: Aorta sem endotélio.

Uma vez observado que o CNP induziu efeito modulador negativo sobre a contração da PE, procurou-se determinar se este efeito era decorrente da ativação do receptor NPR-B. Para tanto, a contração induzida pela PE foi avaliada em ausência ou presença do antagonista de receptores NPR-A/B, Anantin (Ana), em duas concentrações diferentes, isoladamente ou em combinação com o CNP, em aortas de ratos Sham e CLP.

A figura 8 mostra a contração da PE em presença de Anantin, com ou sem exposição prévia ao CNP, em aorta de ratos Sham e CLP. Anantin na concentração mais baixa (0,1 $\mu\text{mol/L}$, 30 min) não alterou a potência da PE em ambos os grupos. Em relação ao Emax, não houve diferença no grupo Sham, mas ocorreu aumento do

Emax nas aortas E+ de ratos CLP, quando comparadas à ausência do Anantín em aortas E+ de ratos CLP. Não foram observadas diferenças nas aortas E- de ambos os grupos. O Anantín reverteu o efeito modulador negativo promovido pelo CNP, em parâmetros de potência e Emax, em ambos os grupos Sham e CLP em aortas E+, mas não de aortas E- de ratos Sham ou CLP, como mostram as figuras 8 e 9. A tabela 5 mostra os valores de pD_2 e Emax da PE, em presença de Anantín ou CNP e Anantín.

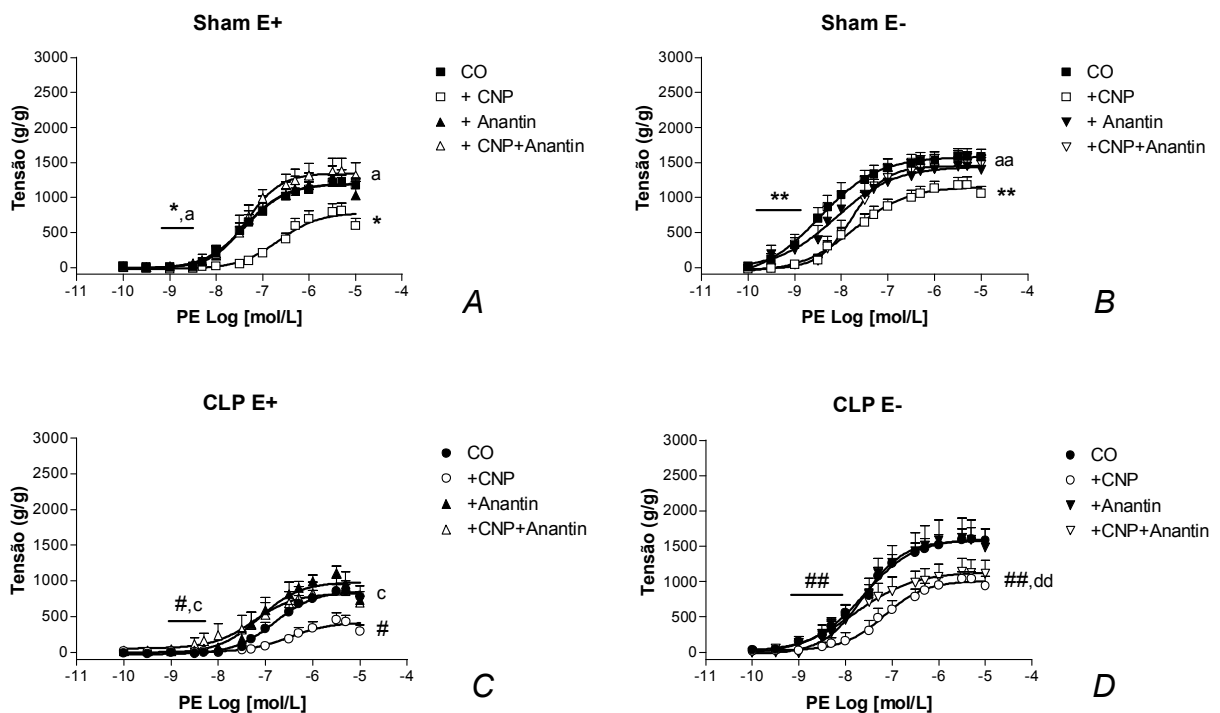


Figura 8. Participação dos receptores NPR-B no efeito modulador negativo induzido pelo CNP sobre a contração da PE em aorta de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para PE (0,1 nmol/L – 10 μ mol/L) em aortas com (E+) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A); ou em aortas sem (E-) endotélio isoladas de ratos Sham (B); ou em aortas E+ de ratos CLP (C) ou em aortas E- de ratos CLP (D), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min), ou presença de Anantín (0,1 μ mol/L, 30 min), ou dupla exposição CNP (10 nmol/L) + Anantín (0,1 μ mol/L). Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^c diferente de CLP E+ CNP; ^{aa} diferente de CLP E- inibidor (Anantín); ^{dd} diferente de CLP E- inibidor (Anantín); $n=8-13$ ($P<0,05$).

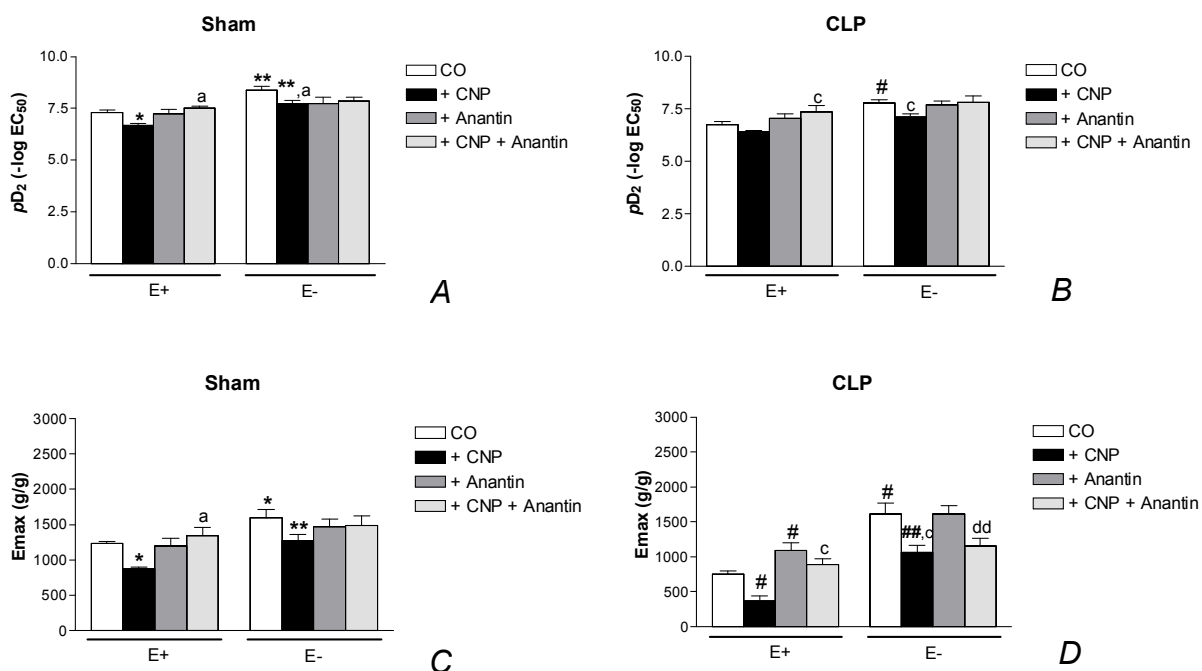


Figura 9. Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) da PE em presença de CNP, ou Anantin ou CNP+Anantin em aorta de ratos Sham e CLP. Valores de pD_2 da PE em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A), ou de ratos CLP (B), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min), ou presença de Anantin (0,1 μ mol/L, 30 min), ou dupla exposição CNP (10 nmol/L) + Anantin (0,1 μ mol/L). Valores de efeito máximo (E_{max}) da PE em aortas E+ ou E- isoladas de ratos Sham (C) ou CLP (D), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP, ou presença de Anantin ou dupla exposição CNP + Anantin. Dados de E_{max} foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^a diferente de Sham CNP E+; ^c diferente de CLP CNP E+; ^{dd} diferente de CLP E- inibidor (Anantin); $n=8-13$ ($P<0,05$).

Tabela 5: Potência (pD_2) e efeito máximo (Emax) induzidos pela PE em presença de Anantin (Ana) ou CNP + Ana, em aortas de ratos Sham e CLP.

Grupos	Sham			
	E+		E-	
	Ana	CNP + Ana	Ana	CNP + Ana
pD_2	7,23±0,23	7,50±0,10	7,75±0,30	7,85±0,18
Emax (g/g)	1198±114	1345±115	1471±109	1489±138
Grupos	CLP			
	E+		E-	
	Ana	CNP + Ana	Ana	CNP + Ana
pD_2	7,05±0,19	7,35±0,30	7,68±0,18	7,80±0,32
Emax (g/g)	1093±107	891±86	1618±118 ^d	1154±110 ^{dd}

^d diferente de CLP E+ inibidor (Anantin); ^{dd} diferente de CLP E- inibidor (Anantin); $n=8-13$ ($P<0,05$).

PE: Fenilefrina;

CNP: Peptídeo natriurético tipo C;

Ana: Anantin;

CLP: Ligação e perfuração cecal;

pD_2 : Potência do agonista PE;

Emax: Efeito máximo do agonista PE;

E+: Aorta com endotélio;

E-: Aorta sem endotélio.

Para determinar se o CNP produzido endogenamente poderia participar da redução da resposta contrátil à PE em aortas isoladas de ratos CLP, curvas concentração-efeito cumulativas para PE foram construídas em presença do antagonista Anantin em maior concentração (1 $\mu\text{mol/L}$). Verificamos que o antagonista em maior concentração não alterou o efeito máximo, mas potencializou a resposta contrátil da PE em aortas E+ ou E- de ratos Sham (pD_2 E+: 8,49±0,30; E-: 9,49±0,11), sendo ainda mais potente nas aortas E- de ratos Sham (figura 10). Em aortas isoladas de ratos CLP, a presença do antagonista na maior concentração induziu o aumento do valor de pD_2 da PE em presença ou ausência de endotélio (pD_2 E+: 8,06±0,80; E-: 9,54±0,39), sendo esta potencialização maior nas aortas E-

de ratos CLP. Ainda em relação à potência da PE, observou-se que os valores de pD_2 são maiores nos grupos em presença de Anantin, na maior concentração (1 $\mu\text{mol/L}$), comparado à menor concentração (0,1 $\mu\text{mol/L}$), em aortas E+ ou E- de ratos Sham ou CLP. O efeito máximo da PE não foi alterado em aortas E+ de ratos CLP na presença de Anantin na maior concentração, mas ocorreu a diminuição da contração máxima induzida pela PE em aortas E- de ratos CLP (E+: 968 ± 94 g/g; E-: 733 ± 71 g/g). Apenas nas aortas E- de ratos CLP, o efeito máximo induzido pela PE foi menor quando em presença de Anantin em maior concentração comparado à menor concentração deste. Além disso, os valores de E_{max} observados na presença de Anantin (1 $\mu\text{mol/L}$) em aortas E+ ou E- de ratos CLP foram menores que aqueles observados também na presença de Anantin (1 $\mu\text{mol/L}$) em aortas E+ ou E- de ratos Sham (Anantin Sham E+: 1425 ± 135 g/g; E-: 1289 ± 68 g/g).

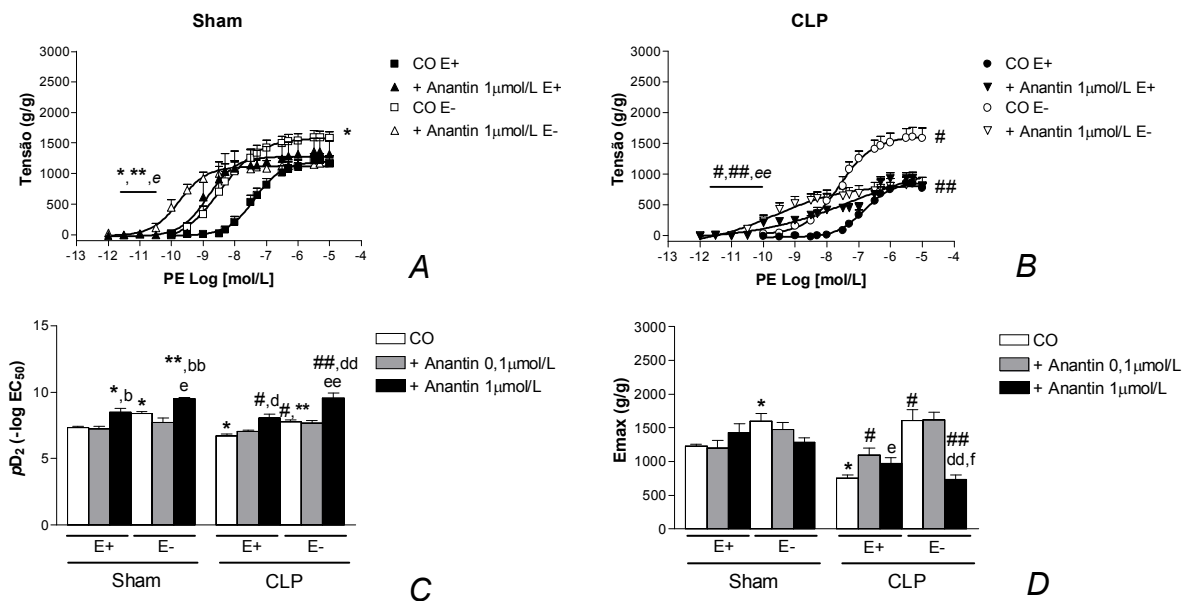


Figura 10. Efeito contrátil induzido pela PE em ausência ou presença de Anantin em diferentes concentrações. Curvas concentração-efeito cumulativas para PE (1 $\mu\text{mol/L}$ – 10 $\mu\text{mol/L}$) em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (B), em ausência (CO) ou presença de Anantin (1 $\mu\text{mol/L}$, 30 min). C, valores de pD_2 das curvas concentração-efeito cumulativas para PE em ausência ou presença de Anantin (0,1 $\mu\text{mol/L}$ ou 1 $\mu\text{mol/L}$; 30 min). D, valores de efeito máximo (E_{max} ; em g/g) induzido pela PE em ausência ou presença de Anantin. Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; b diferente de Sham E+ inibidor (Ana 0,1 $\mu\text{mol/L}$); bb diferente de Sham E- inibidor (Ana 0,1 $\mu\text{mol/L}$); d diferente de CLP E+ inibidor (Ana 0,1 $\mu\text{mol/L}$); dd diferente de CLP E- inibidor (Ana 0,1 $\mu\text{mol/L}$); e diferente de Sham E+ Ana 1 $\mu\text{mol/L}$; ee diferente de CLP E+ Ana 1 $\mu\text{mol/L}$; f diferente de Sham E- Ana 1 $\mu\text{mol/L}$; $n=5-11$ ($P<0,05$).

A participação de O_2^- na contração induzida pela PE foi avaliada em aortas de ratos Sham e CLP. A presença do agente sequestrador de O_2^- , Tiron, diminuiu a potência da PE em aortas E+ e em aortas E- de ratos Sham (figuras 11 e 12). Entretanto, o valor de pD_2 observado em aortas E- de ratos Sham foi maior que aquele em aorta E+ de ratos Sham. O Tiron não alterou a potência da PE em aortas de ratos CLP comparadas à condição em ausência de Tiron. Porém, o valor de potência da PE nas aortas E- foi maior que aquele das aortas E+ de ratos CLP. Em relação ao Emax, a presença de Tiron aumentou a contração máxima induzida pela PE apenas em aortas E- de ratos Sham, e este valor foi maior do que aquele apresentado em aortas E+ de ratos Sham em presença de Tiron. Em aortas de ratos CLP, Tiron apresentou efeito oposto dependendo da presença ou não do endotélio, ou seja, Tiron aumentou o Emax da PE em aortas E+ e diminuiu o efeito máximo da PE em aortas E-.

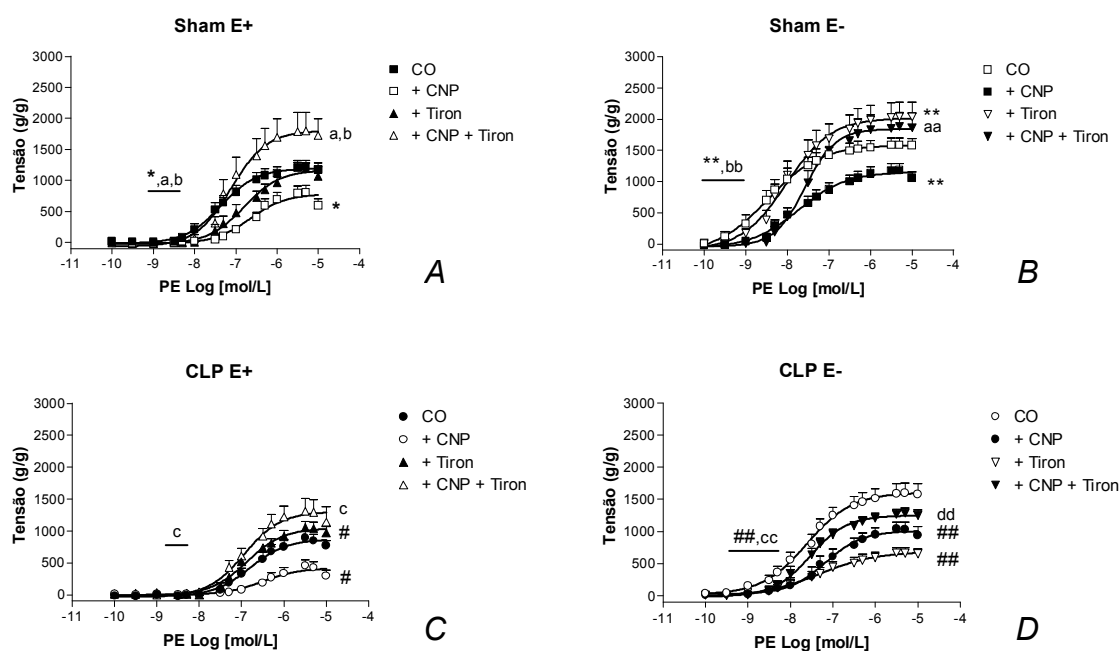


Figura 11. Contribuição de O_2^- no efeito do CNP sobre a contração da PE em aorta de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para PE (0,1 nmol/L – 10 μ mol/L) em aortas com (E+) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A), ou em aortas sem (E-) endotélio isoladas de ratos Sham (B), ou aortas E+ de ratos CLP (C) ou aortas E- de ratos CLP (D), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min), ou presença de Tiron (100 μ mol/L, 30 min), ou dupla exposição CNP (10 nmol/L) + Tiron (100 μ mol/L). Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^{aa} diferente de Sham E- CNP; ^b diferente de Sham E+ inibidor (Tiron); ^{bb} diferente de Sham E- inibidor (Tiron); ^c diferente de CLP E+ CNP; ^{cc} diferente de CLP E- CNP; ^{dd} diferente de CLP E- inibidor (Tiron); $n=6-11$ ($P<0,05$).

A presença de CNP juntamente com Tiron potencializou a curva da PE e aumentou o seu efeito máximo em relação à exposição prévia ao CNP ou Tiron, isoladamente, em aortas E+ de ratos Sham. Em aortas sem endotélio, de ratos Sham, a dupla exposição CNP e Tiron diminuiu a potência da PE em relação à exposição isolada com Tiron, e aumentou o Emax da PE em relação à exposição prévia ao CNP. Já nas aortas de ratos CLP E+ ou E-, a dupla exposição CNP e Tiron potencializou a resposta da PE apenas quando comparadas à exposição prévia ao CNP. Além disso, o valor de pD_2 das aortas E- com dupla exposição CNP e Tiron é maior que aquele observado sob as mesmas condições de incubação nas aortas E+ de ratos CLP. A contração máxima induzida pela PE foi maior em aortas E+ sob dupla exposição CNP + Tiron (comparada à exposição prévia ao CNP em ratos CLP. Entretanto, esta condição de dupla exposição apenas aumentou o efeito máximo da PE em relação à presença isolada de Tiron em aortas E- de ratos CLP. A figura 12 apresenta os gráficos de pD_2 e Emax da PE em presença de exposição prévia ao CNP, ou Tiron ou dupla exposição CNP + Tiron, em aortas de ratos Sham e CLP. A tabela 6 apresenta os valores de pD_2 e Emax da PE em presença de Tiron ou CNP+Tiron em aortas de ratos Sham e CLP.

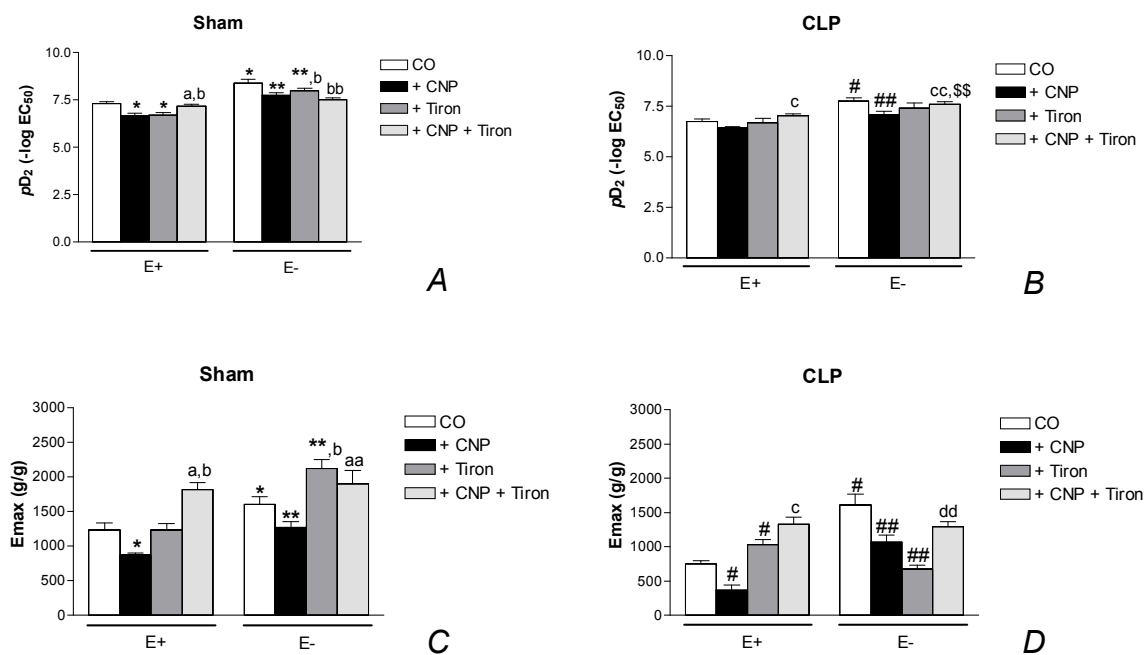


Figura 12. Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) da PE em presença de CNP, ou Tiron ou CNP+Tiron em aorta de ratos Sham e CLP. Valores de pD_2 da PE em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A), ou CLP (B), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min), ou presença de Tiron (100 μ mol/L, 30 min), ou dupla exposição CNP (10 nmol/L) + Tiron (100 μ mol/L). Valores de efeito máximo (E_{max}) da PE em aortas E+ ou E- isoladas de ratos Sham (C) ou CLP (D), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP, ou presença de Tiron ou dupla exposição CNP + Tiron. Dados de E_{max} foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^{aa} diferente de Sham E- CNP; ^b diferente de Sham E+ inibidor (Tiron); ^{bb} diferente de Sham E- inibidor (Tiron); ^c diferente de CLP E+ CNP; ^{cc} diferente de CLP E- CNP; ^{dd} diferente de CLP E- inibidor (Tiron); ^{\$\$} diferente de CLP E+ CNP+inibidor (Tiron); $n=6-11$ ($P<0,05$).

Tabela 6: Potência (pD_2) e efeito máximo da PE em presença de Tiron ou CNP+Tiron em aortas de ratos Sham e CLP.

Grupos	Sham			
	E+		E-	
	Tiron	CNP+Tiron	Tiron	CNP+Tiron
pD_2	6,70±0,15	7,18±0,10	7,97±0,15 ^b	7,50±0,12
E _{max} (g/g)	1232±99	1822±101 ^b	2123±134 ^b	1904±190
Grupos	CLP			
	E+		E-	
	Tiron	CNP+Tiron	Tiron	CNP+Tiron
pD_2	6,69±0,20	7,01±0,13	7,42±0,24 ^d	7,59±0,14
E _{max} (g/g)	1034±70	1328±104 [§]	671±62 ^{bb}	1293±79 ^{dd&}

^b diferente de Sham E+ inibidor (Tiron); ^{bb} diferente de Sham E- inibidor (Tiron); ^d diferente de CLP E+ inibidor (Tiron); ^{dd} diferente de CLP E- inibidor; [§] diferente de Sham E+ CNP+inibidor (Tiron); [&] diferente de Sham E- CNP+inibidor (Tiron); $n= 6-11(P<0,05)$.

PE: Fenilefrina;

CNP: Peptídeo natriurético tipo C;

CLP: Ligação e perfuração cecal;

pD_2 : Potência do agonista PE;

E_{max}: Efeito máximo do agonista PE;

E+: Aorta com endotélio;

E-: Aorta sem endotélio.

A participação de H₂O₂ na resposta contrátil induzida pela PE foi avaliada em aorta de ratos Sham e CLP (figura 13 e figura 14). A presença de PEG-Catalase não alterou a potência da PE em aortas E+ ou E- de ratos Sham em relação à ausência da enzima. Contudo, o valor de pD_2 da PE para as aortas E- em presença de PEG-Catalase foi maior que aquele em aortas E+ isoladas de ratos Sham. O efeito máximo da PE não foi alterado pela presença de PEG-Catalase em aortas E+ ou E- de ratos Sham. Porém, este valor foi maior em aortas E- comparado às aortas E+ de ratos Sham. Nas aortas de ratos CLP, PEG-Catalase aumentou a potência da PE em aortas E- comparadas à situação de ausência da enzima, mas não modificou o valor de pD_2 em aortas E+ de ratos CLP. Novamente, o valor de pD_2 da PE,

encontrado para aortas E-, foi maior que o valor de pD_2 das aortas E+ de ratos CLP. A potência da PE foi maior em aortas E- de ratos CLP em presença de PEG-Catalase comparada aquela em aortas E- de ratos Sham. A presença de PEG-Catalase não modificou a contração máxima induzida pela PE em aortas E+ ou E- de ratos CLP.

A dupla exposição CNP e PEG-Catalase potencializou a resposta contrátil da PE em aortas E+ ou E- comparadas apenas à presença de CNP, isoladamente, em ratos Sham (figura 13 e figura 14). Além disso, o valor de pD_2 das aortas E- sob dupla exposição CNP e PEG-Catalase foi maior que em aortas E+ sob a mesma condição, isoladas de ratos Sham. A contração máxima induzida pela PE também foi aumentada na presença da dupla exposição CNP+PEG-Catalase em aortas E+ ou E- em relação à presença isolada de CNP, em ratos Sham. Nas aortas isoladas de ratos CLP, a dupla exposição CNP+PEG-Catalase aumentou o valor de pD_2 da PE em aortas E+ ou E- comparadas à presença isolada de CNP. Além disso, a potência da PE foi maior em aortas E- comparadas às aortas E+, ambas sob a dupla exposição CNP+PEG-Catalase, isoladas de ratos CLP. O valor de pD_2 da PE observado para as aortas E- sob dupla exposição CNP+PEG-Catalase foi maior que aquele em aortas E- na mesma condição, isolada de ratos Sham. O valor de E_{max} da PE foi aumentado pela dupla exposição CNP+PEG-Catalase em aortas E+ comparado à presença de CNP, embora tenha diminuído pela dupla exposição CNP+PEG-Catalase em aortas E- comparado apenas à presença de PEG-Catalase, em ratos CLP. Contudo, o efeito máximo induzido pela PE permaneceu menor em aortas E- em presença da dupla exposição CNP+PEG-Catalase isoladas de ratos CLP, comparado ao valor de E_{max} das aortas E-, sob a mesma condição, de ratos Sham. A figura 14 apresenta os gráficos de pD_2 e E_{max} da PE em ausência ou presença de CNP, PEG-Catalase ou CNP+PEG-Catalase, em aortas de ratos Sham e CLP. A tabela 7 mostra os valores de pD_2 e E_{max} da PE em presença de PEG-Catalase ou CNP+PEG-Catalase em aortas de ratos Sham e CLP.

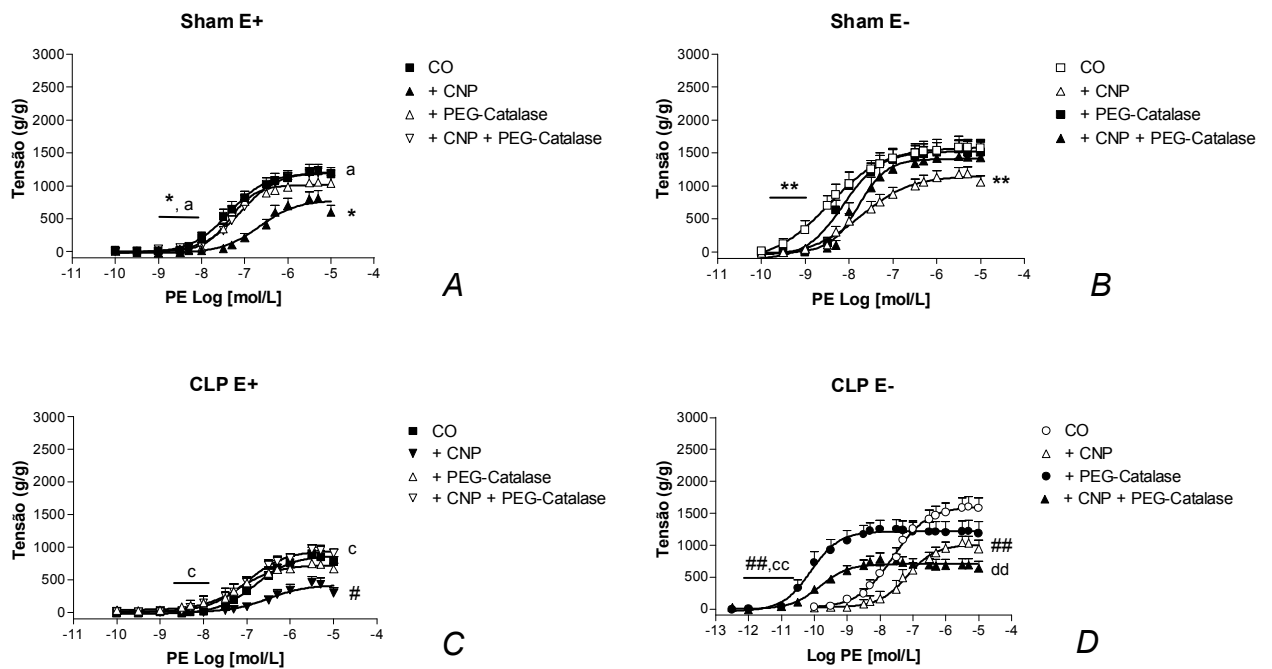


Figura 13. Contribuição de H_2O_2 para o efeito do CNP sobre a contração da PE em aorta de ratos. Curvas concentração-efeito cumulativas para PE (0,1 nmol/L – 10 μ mol/L) em aortas com (E+) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A), ou aortas sem (E-) endotélio isoladas de ratos Sham (B), ou aortas E+ de ratos CLP (C) ou aortas E- de ratos CLP (D), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min), ou presença de PEG-Catalase (250 U/mL, 30 min), ou dupla exposição CNP (10 nmol/L) + PEG-Catalase (250 U/mL). Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^c diferente de CLP E+ CNP; ^{cc} diferente de CLP E- CNP; ^{dd} diferente de CLP E- inibidor (PEG-Catalase); $n=5-13$ ($P<0,05$).

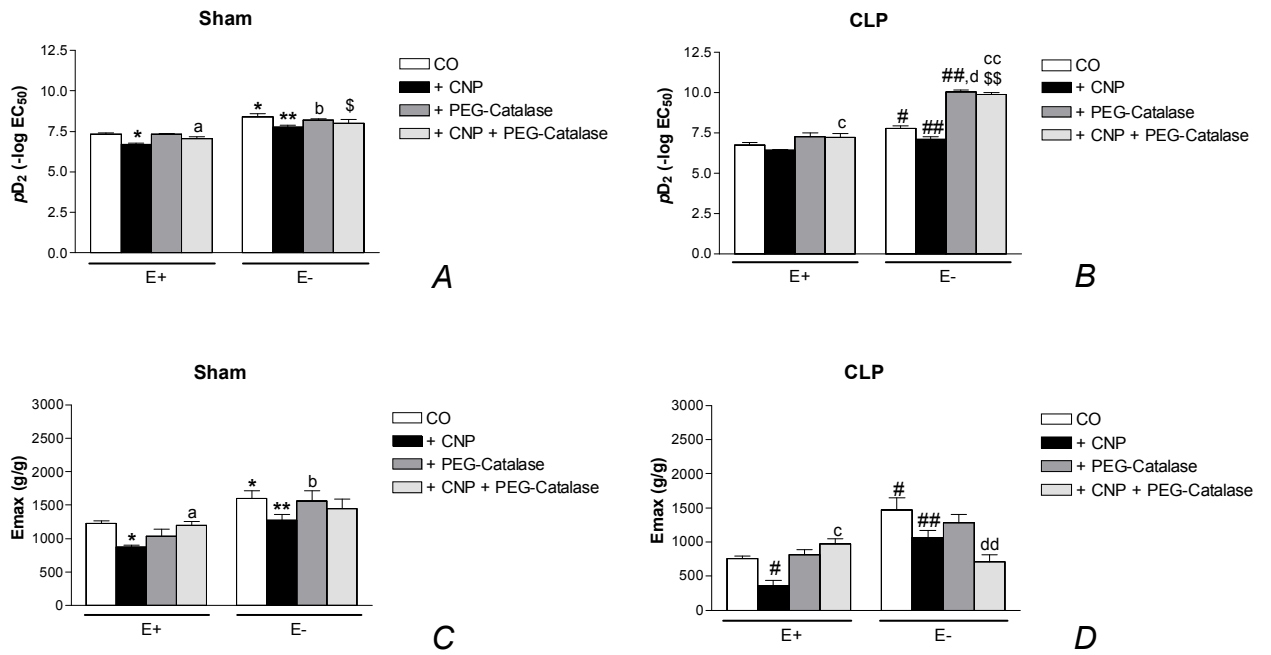


Figura 14. Potência (pD_2) e efeito máximo (E_{max}) da PE em presença de CNP, ou PEG-Catalase ou CNP+PEG-Catalase em aorta de ratos Sham e CLP. Valores de pD_2 da PE em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (B), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min), ou presença de PEG-Catalase (250 U/mL, 30 min), ou dupla exposição CNP (10 nmol/L) + PEG-Catalase (250 U/mL). Valores de efeito máximo (E_{max}) da PE em aortas E+ ou E- isoladas de ratos Sham (C) ou CLP (D), em ausência (CO), ou presença de exposição prévia ao CNP, ou presença de PEG-Catalase ou dupla exposição CNP + PEG-Catalase. Dados de E_{max} foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^b diferente de Sham E+ inibidor (PEG-Catalase); ^c diferente de CLP E+ CNP; ^{cc} diferente de CLP E- CNP; ^d diferente de CLP E+ inibidor (PEG-Catalase); ^{dd} diferente de CLP E- inibidor (PEG-Catalase); ^{\$} diferente de Sham E+ CNP+inibidor (PEG-Catalase); ^{\$\$} diferente de CLP E+ CNP+inibidor (PEG-Catalase); $n=5-13$ ($P<0,05$).

Tabela 7: Potência (pD_2) e efeito máximo da PE em presença de PEG-Catalase ou CNP+PEG-Catalase em aortas de ratos Sham e CLP.

Grupos	Sham			
	E+		E-	
	PEG-Catalase	CNP+PEG-Catalase	PEG-Catalase	CNP+PEG-Catalase
pD_2	7,32±0,06	7,07±0,10	8,21±0,08 ^b	7,99±0,23 [§]
E _{max} (g/g)	1039±100	1199±60	1562±152 ^b	1451±140
Grupos	CLP			
	E+		E-	
	PEG-Catalase	CNP+PEG-Catalase	PEG-Catalase	CNP+PEG-Catalase
pD_2	7,24±0,24	7,20±0,25	10,04±0,11 ^{d,bb}	9,88±0,12 ^{§§,&}
E _{max} (g/g)	810±78	970±80	1283±120	715±98 ^{dd,&}

^b diferente de Sham E+ inibidor (PEG-Catalase); ^{bb} diferente de Sham E- inibidor (PEG-Catalase); ^d diferente de CLP E+ inibidor (PEG-Catalase); ^{dd} diferente de CLP E- inibidor (PEG-Catalase); [§] diferente de Sham E+ CNP+inibidor (PEG-Catalase); ^{§§} diferente de CLP E+ CNP+inibidor (PEG-Catalase); [&] diferente de Sham E- CNP+inibidor (PEG-Catalase); n=5-13 (P<0,05).

PE: Fenilefrina;

CNP: Peptídeo natriurético tipo C;

PEG-Catalase: Polietilenoglicol-Catalase;

CLP: Ligação e perfuração cecal;

pD_2 : Potência do agonista PE;

E_{max}: Efeito máximo do agonista PE;

E+: Aorta com endotélio;

E-: Aorta sem endotélio.

A participação da enzima Xantina oxidase na resposta contrátil induzida pela PE foi estudada em aortas de ratos Sham e CLP é mostrada na figura 15. A presença de Alopurinol potencializou a curva da PE em aortas E+ ou E- de ratos Sham (pD_2 : E+ 8,53±0,36; E- 10,25±0,16), comparada à ausência do inibidor. Além disso, o valor de pD_2 da PE em aortas E- em presença de Alopurinol foi maior que aquele observado em aortas E+ na mesma condição, isoladas de ratos Sham. A contração máxima induzida pela PE foi aumentada pelo Alopurinol apenas nas aortas E+ de ratos Sham (E_{max}: E+ 1400±67 g/g; E- 1416±62). Nas aortas de ratos CLP, o Alopurinol potencializou a contração da PE em presença ou ausência de

endotélio vascular (pD_2 : E+ $7,43 \pm 0,23$; E- $8,97 \pm 0,49$). Entretanto, os valores de potência da PE observados em presença de Alopurinol em aortas de ratos CLP E+ ou E- são menores que aqueles observados em aortas de ratos Sham E+ ou E-, sob as mesmas condições, respectivamente. Em relação ao efeito máximo induzido pela PE em aortas de ratos CLP, a presença do Alopurinol aumentou o valor de E_{max} em artérias E+ (E_{max} : 1027 ± 91 g/g), mas reduziu este valor em artérias E- (E_{max} : 959 ± 95 g/g). Contudo, os valores de contração máxima da PE em aortas E+ ou E- isoladas de ratos CLP em presença de Alopurinol foram menores que aqueles encontrados em aortas E+ ou E- de ratos Sham, sob as mesmas condições, respectivamente.

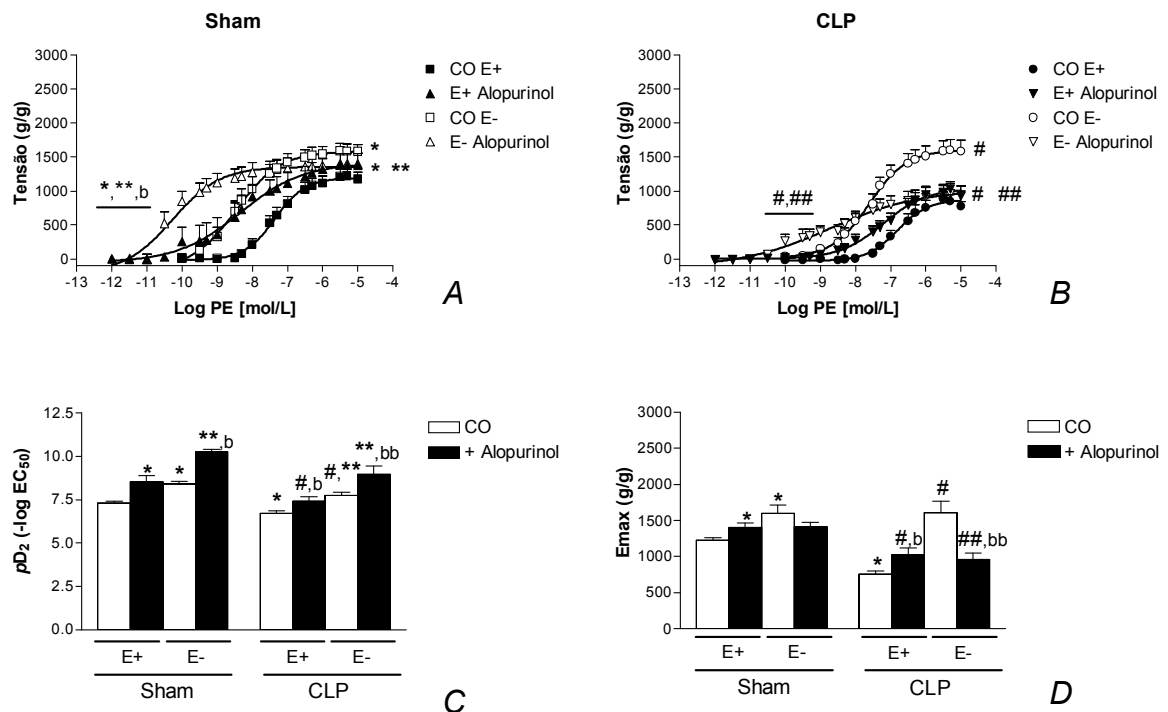


Figura 15. Efeito contrátil induzido pela PE em ausência ou presença de Alopurinol. Curva concentração-efeito cumulativa para PE (1 pmol/L – 10 μ mol/L) em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (B), em ausência (CO) ou presença de Alopurinol (100 μ mol/L, 30 min). C, valores de pD_2 das curvas concentração-efeito cumulativas para PE em ausência ou presença de Alopurinol. Em D, valores de efeito máximo (E_{max} ; em g/g) induzido pela PE em ausência ou presença de Alopurinol. Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ### diferente de CLP CO E-; b diferente de Sham E+ inibidor (Alopurinol); bb diferente de Sham E- inibidor (Alopurinol); $n=6-11$ ($P<0,05$).

A participação das MMPs foi avaliada na contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP (figura 16). O inibidor não seletivo de MMPs, GM6001, não

alterou a potência da PE em aortas de ratos Sham (pD_2 : E+ 7,08±0,13; E- 8,05±0,12). Contudo, o valor de pD_2 das aortas E- em presença de GM6001 manteve-se maior que aquele encontrado em aortas E+, sob as mesmas condições, de ratos Sham. O E_{max} da PE foi aumentado em presença de GM6001 em aortas E+ ou E- (E+ 1494±110 g/g; E- 1879±119 g/g), sendo maiores nas aortas E- comparadas às aortas E+. Em relação à resposta obtida em aortas de ratos CLP, apenas na condição de remoção endotelial, GM6001 potencializou a contração induzida pela PE (pD_2 : E+ 7,08±0,21; E- 8,34±0,19), em comparação com a condição em ausência do inibidor. Entretanto, o valor de pD_2 da PE em aortas E- na presença de GM6001 foi maior que aquele em aortas E+, sob as mesmas condições, de ratos CLP. O efeito máximo induzido pela PE em presença de GM6001, por sua vez, apenas foi maior em aortas E+ (E+ 1138±92 g/g; E- 1495±91 g/g), comparado às aortas E- de ratos CLP.

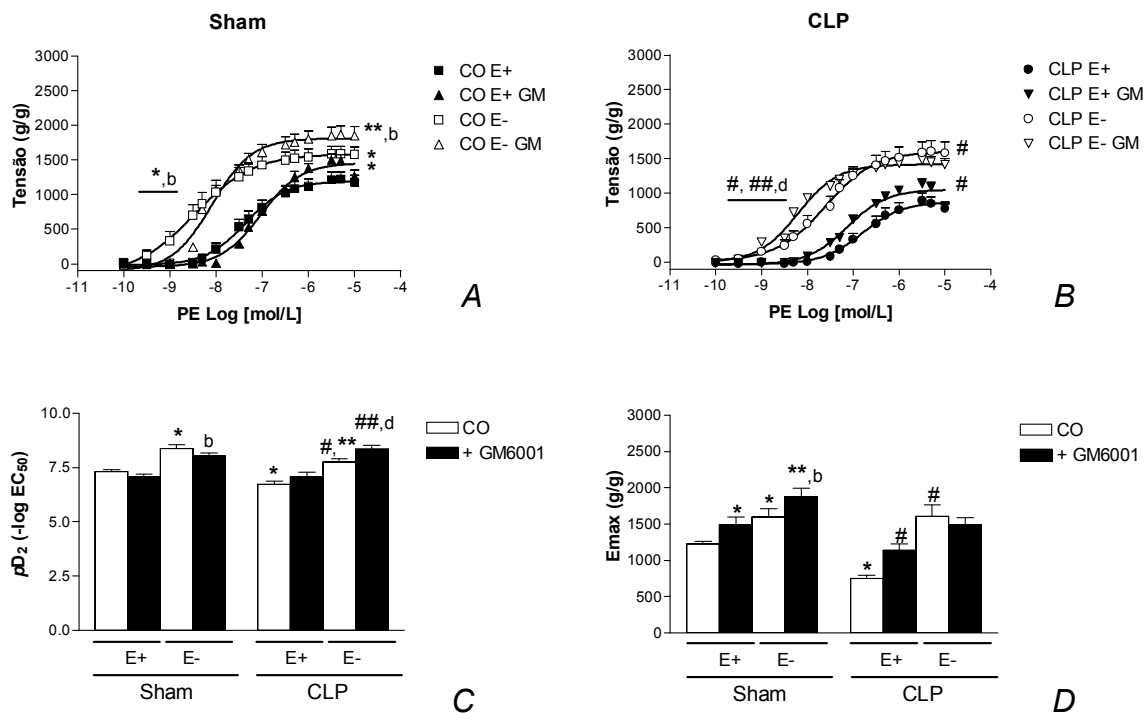


Figura 16. Efeito do inibidor de MMPs (GM6001) sobre a resposta contrátil induzida pela PE. Curvas concentração-efeito cumulativas para PE (1 pmol/L – 10 µmol/L) em aortas com (E+) ou sem (E-) endotélio vascular isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (B), em ausência (CO) ou presença de GM6001 (1 µmol/L, 30 min). C, valores de pD_2 das curvas concentração-efeito cumulativas para PE em ausência ou presença de GM6001. Em D, valores de efeito máximo (E_{max} ; em g/g) induzido pela PE em ausência ou presença de GM6001. Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; ** diferente de Sham CO E-; # diferente de CLP CO E+; ## diferente de CLP CO E-; ^b diferente de Sham E+ inibidor (GM6001); ^d diferente de CLP E+ inibidor (GM6001); $n=6-11$ ($P<0,05$).

A participação das isoformas da enzima NOS na contração induzida pela PE foi avaliada em aortas E+ de ratos Sham e CLP (figuras 17, 18 e 19). A inibição não seletiva das isoformas de NOS com L-NAME, não alterou a potência da PE em aortas de ratos Sham (pD_2 : $7,27 \pm 0,13$). A dupla exposição CNP e L-NAME (pD_2 : $7,58 \pm 0,16$) potencializou a contração da PE apenas quando comparada à presença de CNP, isoladamente, em aortas de ratos Sham. Em ratos CLP, o L-NAME aumentou o valor de pD_2 da PE ($7,30 \pm 0,09$). A dupla exposição CNP+L-NAME (pD_2 : $7,10 \pm 0,28$) potencializou a contração da PE quando comparada com a exposição prévia com CNP, em aortas de ratos CLP. Em relação à contração máxima induzida pela PE, em ambos os grupos Sham e CLP, a inibição não seletiva de isoformas de NOS aumentou o valor de E_{max} (Sham 2097 ± 97 g/g; CLP 1365 ± 116 g/g). Entretanto, este valor foi menor nas aortas de ratos CLP em presença de L-NAME comparada às aortas de ratos Sham, sob as mesmas condições. Além disso, a dupla exposição CNP+L-NAME aumentou o E_{max} da PE em aortas de ambos os grupos Sham e CLP (Sham 1876 ± 83 g/g; CLP 1936 ± 82 g/g) comparados à presença de CNP isoladamente, ou ainda, no grupo CLP esta diferença também foi encontrada em relação à presença de L-NAME.

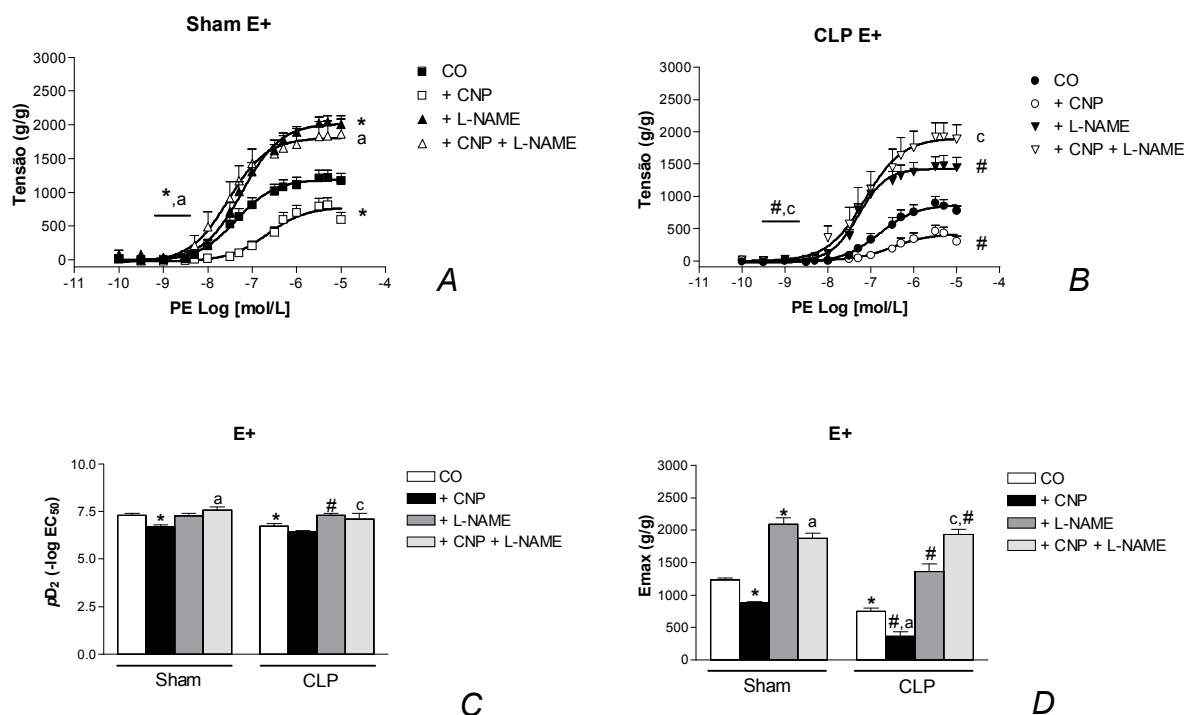


Figura 17: Efeito do inibidor não seletivo da enzima NOS (L-NAME) sobre a contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP com endotélio vascular (E+). Curvas concentração-efeito cumulativas para PE (1 pmol/L – 10 μ mol/L) em aortas isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (B), em ausência (CO), ou presença de CNP (10 nmol/L, 30 min), ou L-NAME (100 μ mol/L, 30 min), ou de CNP (10 nmol/L) + L-NAME (100 μ mol/L). C, valores de pD_2 das curvas concentração-efeito cumulativas para PE em ausência ou presença de CNP, ou L-NAME ou CNP+L-NAME. D, valores de efeito máximo (E_{max} ; em g/g) induzido pela PE em ausência ou presença de CNP, ou L-NAME, ou CNP+L-NAME. Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; # diferente de CLP CO E+; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^c diferente de CLP E+ CNP; $n=11-12$ ($P<0,05$).

Uma vez determinada a participação das isoformas da enzima NOS, não seletivamente, foi avaliada a contribuição específica de NOS1 e NOS2 sobre a contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP em presença de endotélio (E+). A figura 18 apresenta a participação da NOS1 na resposta contrátil induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP. A figura 19 apresenta a participação da NOS2 na resposta contrátil da PE em aorta de ratos Sham e CLP.

A inibição seletiva de NOS1, com N^{ω} -propil-L-arginina (N^{ω} -propil) não modificou a potência da PE em aortas Sham ou CLP (pD_2 : Sham $7,20 \pm 0,10$; CLP $7,05 \pm 0,20$). Entretanto, a dupla exposição CNP+ N^{ω} -propil potencializou a contração da PE em aortas de ratos Sham (pD_2 : $7,08 \pm 0,09$) em comparação à presença de CNP, mas não modificou em ratos CLP (pD_2 : $6,71 \pm 0,21$). Já o efeito máximo da PE

apenas foi aumentado em aortas de ratos CLP, em presença do inibidor seletivo de NOS1 (Emax: 1109±79 g/g), não sendo diferente em aorta de ratos Sham (Emax: 1349±53). Contudo, a dupla exposição CNP+N^ω-propil aumentou os valores de Emax da PE em aortas de ratos Sham ou CLP (Emax: Sham 1342±67 g/g; CLP 1060±126 g/g), comparados à exposição isolada de CNP. Além disso, o valor de contração máxima da PE observado nas aortas de ratos CLP sob dupla exposição CNP+N^ω-propil foi menor que aquele de aortas Sham, nas mesmas condições.

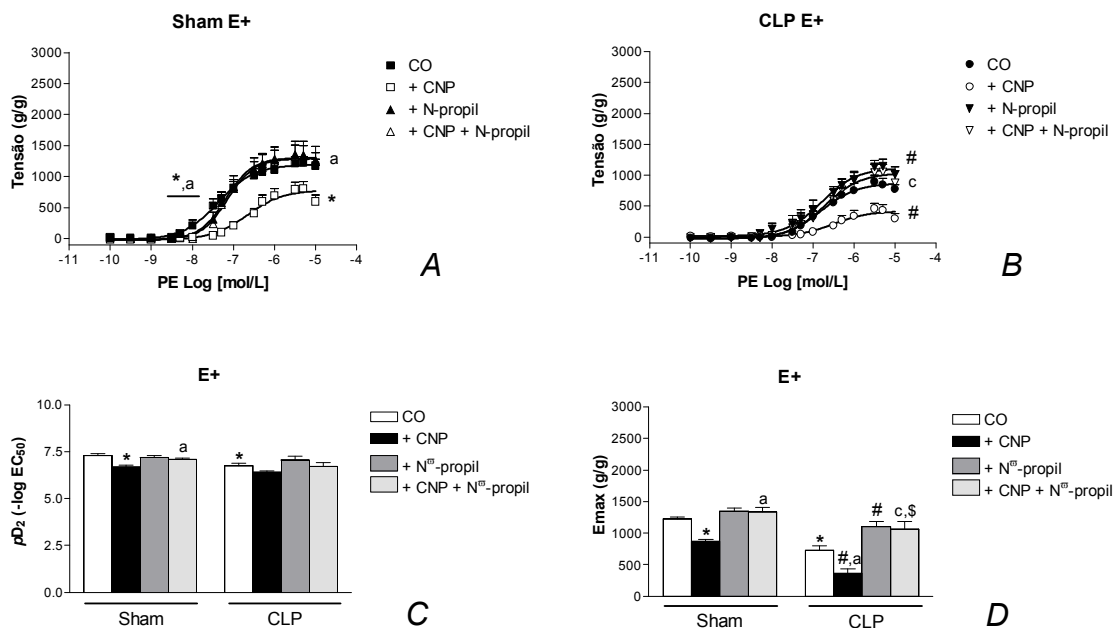


Figura 18. Participação da NOS1 sobre a contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP com endotélio vascular (E+). Curvas concentração-efeito cumulativas para PE (1 pmol/L – 10 μmol/L) em aortas isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (B), em ausência (CO), ou presença de CNP (10 nmol/L, 30 min), ou N^ω-propil-L-arginina (N^ω-propil; 50 nmol/L, 30 min), ou de CNP (10 nmol/L) + N^ω-propil (50 nmol/L). C, valores de pD₂ das curvas concentração-efeito cumulativas para PE em ausência ou presença de CNP, ou N^ω-propil ou CNP+ N^ω-propil. Em D, valores de efeito máximo (Emax; em g/g) induzido pela PE em ausência ou presença de CNP, ou N^ω-propil, ou CNP+ N^ω-propil. Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; # diferente de CLP CO E+; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^b diferente de Sham E+ inibidor (N^ω-propil); ^c diferente de CLP E+ CNP; ^d diferente de Sham E+ CNP+inibidor (N^ω-propil); n=5-11 (P<0,05).

A inibição seletiva de NOS2, com 1400W, não alterou a potência da PE (pD₂: 7,21±0,09) em aortas de ratos Sham. Contudo a exposição dupla CNP+1400W potencializou a contração induzida pela PE (pD₂: 7,19±0,15) quando comparada à presença de CNP, em aortas de ratos Sham. Em relação ao Emax da PE, 1400W aumentou este valor (1427±65 g/g) comparada à ausência de inibidor em aorta de

ratos Sham. Além disso, a dupla incubação CNP+1400W reduziu a contração máxima da PE (941 ± 57 g/g) comparada a presença de 1400W em aortas de ratos Sham. Nas aortas de ratos CLP, a inibição seletiva de NOS2 potencializou a resposta induzida pela PE (pD_2 : $8,04 \pm 0,34$). Já a dupla exposição CNP+1400W aumentou o valor de pD_2 da PE (pD_2 : $7,63 \pm 0,34$) quando comparado a presença de CNP, isoladamente. O E_{max} da PE foi aumentado em presença de 1400W em aortas de ratos CLP (954 ± 52 g/g); a dupla exposição CNP+1400W elevou o valor da contração máxima induzida pela PE (E_{max} : 789 ± 86 g/g) comparado ao CNP. Além disso, os valores de pD_2 e de E_{max} da PE observado em ratos CLP em presença de 1400W foi maior que em aortas de ratos Sham, sob as mesmas condições.

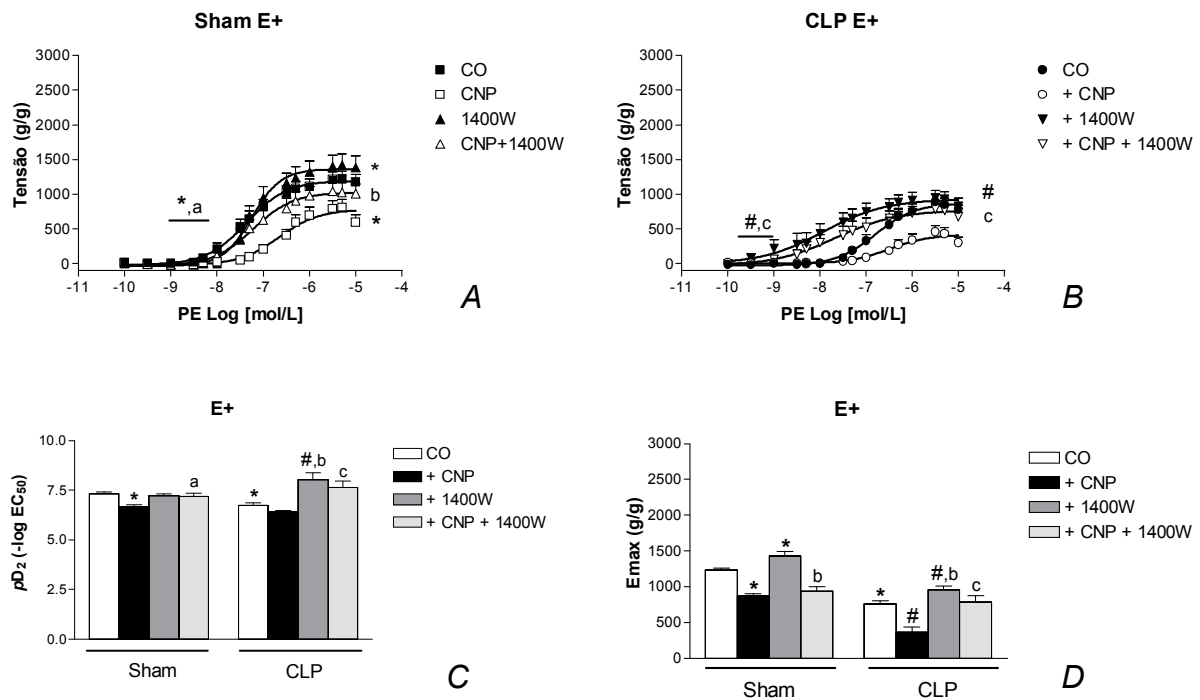


Figura 19. Participação da NOS2 sobre a contração induzida pela PE em aorta de ratos Sham e CLP com endotélio vascular (E+). Curvas concentração-efeito cumulativas para PE (1 pmol/L – 10 μ mol/L) em aortas isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (B), em ausência (CO), ou presença de CNP (10 nmol/L, 30 min), ou 1400W (10 nmol/L, 30 min), ou de CNP (10 nmol/L) + 1400W (10 nmol/L). C, valores de pD_2 das curvas concentração-efeito cumulativas para PE em ausência ou presença de CNP, ou 1400W ou CNP+1400W. D, valores de efeito máximo (E_{max} ; em g/g) induzido pela PE em ausência ou presença de CNP, ou 1400W, ou CNP+1400W. Dados foram normalizados pelo peso seco das artérias (g/g). * diferente de Sham CO E+; # diferente de CLP CO E+; ^a diferente de Sham E+ CNP; ^b diferente de Sham E+ inibidor (1400W); ^c diferente de CLP E+ CNP; $n=6-11$ ($P<0,05$).

A contração induzida pela PE foi avaliada nas artérias mesentéricas de resistência de ratos Sham e CLP, com endotélio (E+). A curva concentração-efeito cumulativa para a PE não resultou em uma sigmoide, não sendo analisada como regressão não-linear dos mínimos quadrados. Portanto, sem valores teóricos de pD_2 ou E_{max} da PE. Desta forma, foram analisados os valores de contrações máximas induzidas pela PE e a área sob a curva (ASC). A figura 20 apresenta a contração induzida pela PE nas artérias mesentéricas de resistência de ratos Sham e CLP. A contração da PE foi menor em artérias mesentéricas de resistência de ratos CLP comparados aos ratos Sham, tanto nos parâmetros de E_{max} (Sham: $9,15 \pm 0,39$ mN/mm; CLP: $5,49 \pm 0,56$ mN/mm), quanto na ASC (Sham: $20,52 \pm 2,42$; CLP: $7,22 \pm 0,55$). Para avaliar se o CNP poderia induzir modulação negativa nas artérias mesentéricas de resistência de ratos, utilizou-se a exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min), semelhante aos estudos realizados em aorta. Não houve alteração na contração induzida pela PE em presença de exposição prévia ao CNP, em artérias mesentéricas de ratos Sham ou CLP (Sham: contração máxima $9,68 \pm 1,30$ mN/mm e ASC $24,27 \pm 2,75$; CLP: contração máxima $4,73 \pm 0,52$ mN/mm e ASC $9,55 \pm 0,86$). Contudo, os valores de contração máxima e ASC da PE em presença de exposição ao CNP foram menores que aqueles observados em ausência do peptídeo.

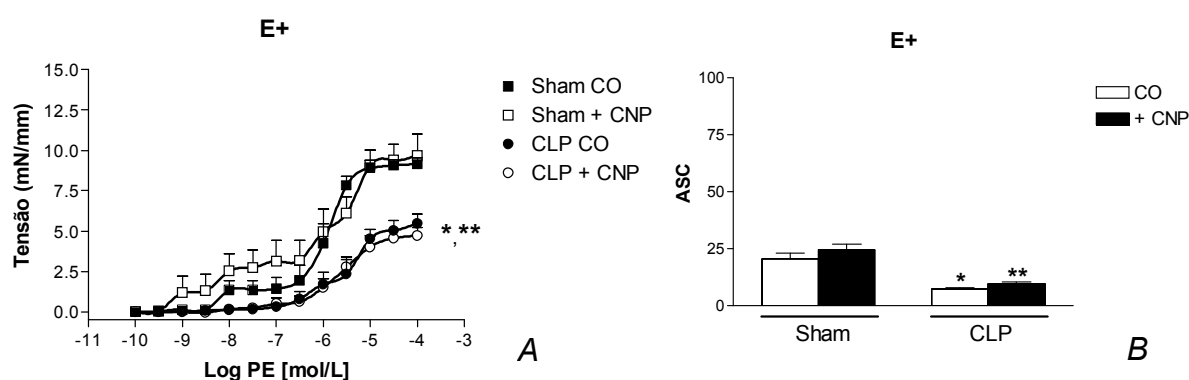


Figura 20. Contração induzida pela PE em artérias mesentéricas de resistência de ratos Sham e CLP, com endotélio vascular (E+). A, curvas concentração-efeito cumulativas para a PE (0,1 nmol/L – 100 μmol/L), em ausência (CO) ou presença de exposição prévia ao CNP (10 nmol/L, 30 min), em artéria mesentérica de resistência isoladas de ratos Sham ou CLP. B, área sob a curva (ASC) da PE analisada a partir das curvas concentração-efeito cumulativas para a PE em artéria mesentérica de ratos. Dados das curvas concentração-efeito cumulativa para a PE apresentados como mN/mm. * diferente de Sham CO; ** diferente de Sham+CNP; n=6-7 (P<0,05).

As concentrações basais de NO $[NO]_c$, ou H_2O_2 basal, $[H_2O_2]_c$, ou concentração intracelular de EROs, $[EROs]_i$, ou ainda $[H_2O_2]_c$ após estimulação com CNP, foram avaliadas em células endoteliais isoladas a fresco de ratos Sham e CLP. $[NO]_c$ foi maior em células endoteliais de aorta de ratos CLP (1795 ± 39 U) do que em células de aorta de ratos Sham (2706 ± 226 U). Contudo, as $[H_2O_2]_c$ ou $[EROs]_i$ basais não foram diferentes entre os grupos ($[H_2O_2]_c$: Sham 5455 ± 530 U; CLP 4755 ± 467 U; $[EROs]_i$: Sham 28223 ± 1727 U; CLP 28060 ± 2231 U). CNP reduziu a $[H_2O_2]_c$ em células endoteliais isoladas de aorta de ratos Sham e CLP de maneira semelhante ($[H_2O_2]_c$ + CNP: Sham 3565 ± 172 U; CLP 3121 ± 312 U). A PEG-Catalase reduziu a fluorescência basal emitida pela sonda DCFH/DA em ambos os grupos ($[H_2O_2]_c$: Sham 1636 ± 70 U; CLP 1969 ± 62 U).

Além da medida da concentração citosólica de NO nas células endoteliais de aorta, foi realizada a medida da concentração plasmática de nitrato, nitrito e nitrosotióis em ratos Sham e CLP (figura 22). A concentração plasmática de nitrato foi maior em ratos CLP ($69,12 \pm 10,58$ $\mu\text{mol/L}$) comparada aos ratos Sham ($21,97 \pm 2,38$ $\mu\text{mol/L}$). De maneira semelhante, a concentração de nitrito observada no plasma de ratos CLP ($4,16 \pm 0,79$ $\mu\text{mol/L}$) foi maior que aquela em ratos Sham ($0,69 \pm 0,09$ $\mu\text{mol/L}$). Por fim, a concentração plasmática de nitrosotióis foi maior em ratos CLP ($58,40 \pm 21,54$ nmol/L) que em ratos Sham ($7,96 \pm 1,82$ nmol/L).

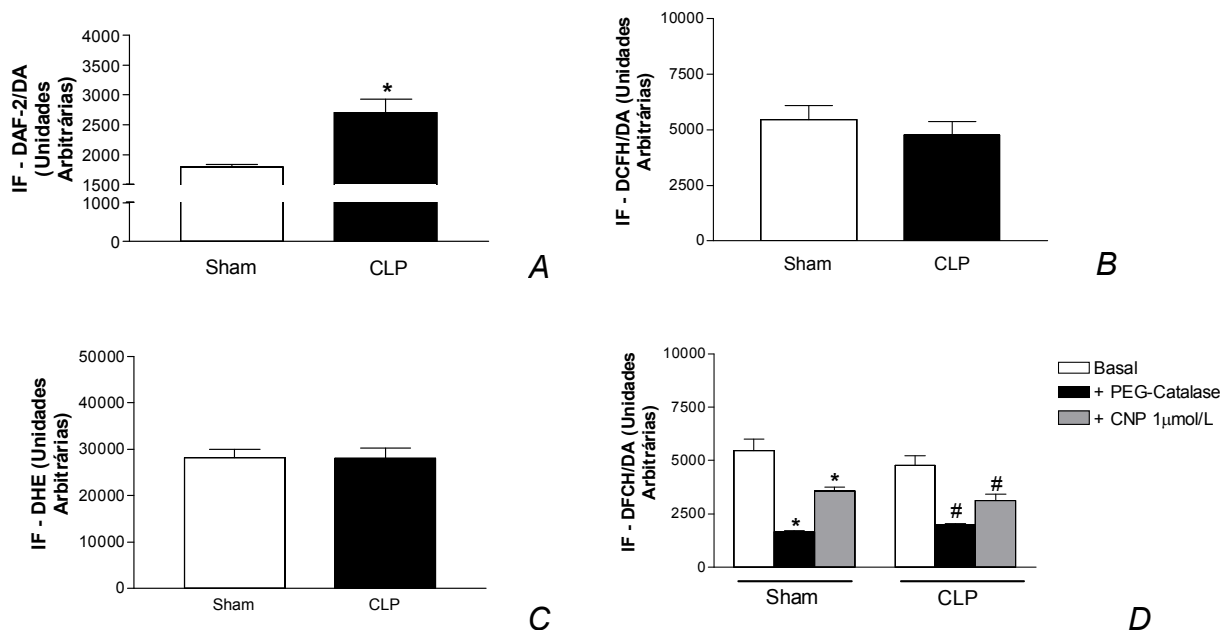


Figura 21. Medida das concentrações citosólicas de NO, H₂O₂ ou da concentração intracelular de EROs em células endoteliais de aorta de ratos Sham e CLP. Medida da intensidade de fluorescência (IF) emitida pela sonda DAF-2/DA (em unidades arbitrárias; U), sensível ao produto de oxidação do NO (N₂O₃) (A), ou da IF emitida pela sonda DCFH/DA, sensível ao H₂O₂ (B), ou da IF emitida pela sonda DHE, sensível às EROs (C), em células endoteliais isoladas a fresco de ratos Sham e CLP. D, medida da IF emitida pela sonda DCFH/DA em células endoteliais em ausência (basal) ou presença de CNP (1 μmol/L, 30 min), ou PEG-Catalase (1500 U/uL, 30 min). * diferente de Sham basal; # diferente de CLP basal; n=4-6 (P<0,05).

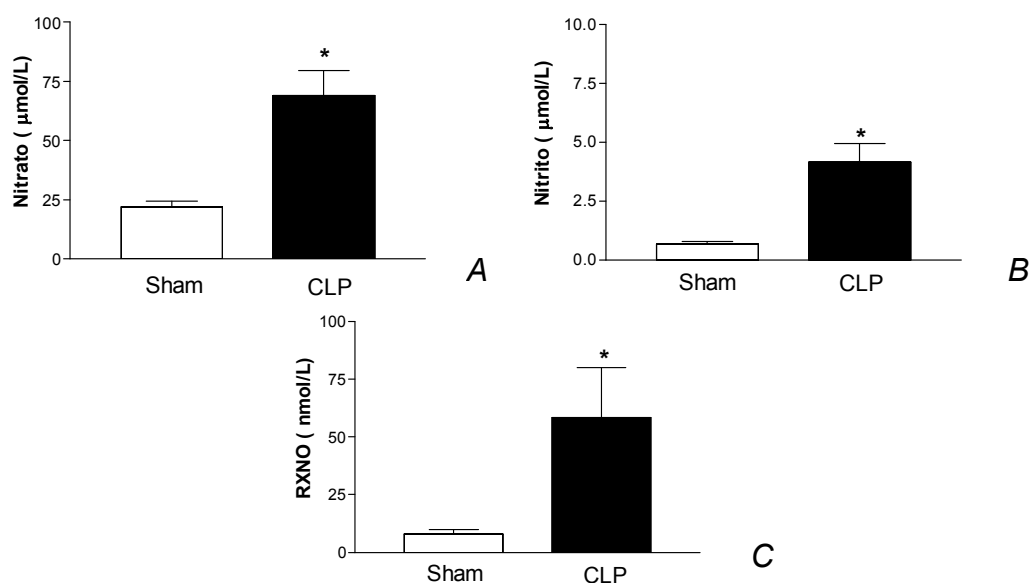


Figura 22. Medida da concentração plasmática de nitrato, nitrito e nitrosotiois em ratos Sham e CLP. Medida da concentração plasmática de nitrato (A), nitrito (B) e nitrosotiois (C) em ratos Sham e CLP. * diferente de Sham; n=4-7 (P<0,05).

As medidas da $[EROs]_i$ no músculo liso vascular (MLV) de aortas de ratos CLP mostraram-se maiores que aquelas em MLV de ratos Sham, como mostra a figura 23. Assim, a medida da $[EROs]_i$ basal em MLV de Sham foi de 12081 ± 820 U e em MLV de CLP foi de 19636 ± 1200 U.

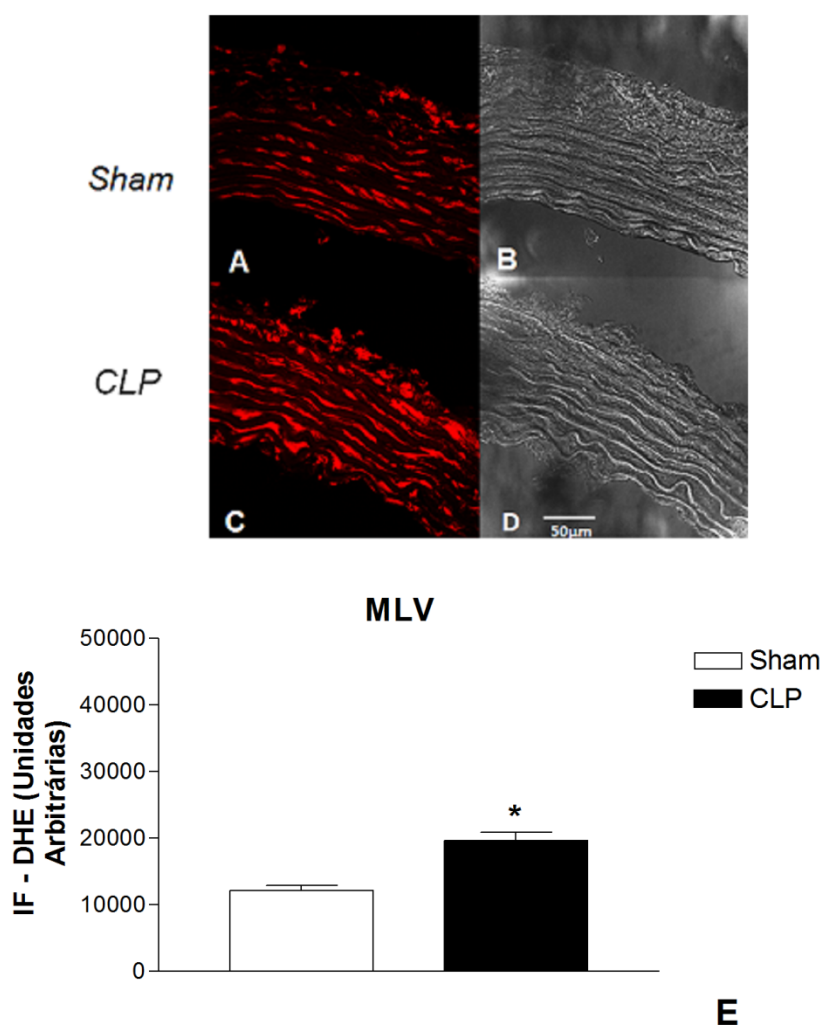


Figura 23. Concentração intracelular de EROs basal no músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Sham e CLP. A e C representam as fotomicrografias de aortas isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (C), com marcação positiva para a sonda seletiva para EROs, DHE (10 $\mu\text{mol/L}$, 30 min), evidenciando a condição basal, por microscopia confocal (SP5 Leica). B e D representam as fotomicrografias de campo claro (Scan-DIC) de aortas de ratos Sham (B) ou CLP (D), por microscopia confocal (SP5 Leica). E, quantificação da intensidade de fluorescência emitida (IF) da sonda DHE no MLV de aorta de ratos Sham e CLP. Barra representa 50 μm . *diferente de Sham; $n=4$ ($P<0,05$).

As medidas da $[H_2O_2]_c$ na camada do MLV de aortas de ratos CLP mostraram-se maiores que aquelas em MLV de ratos Sham, como observado pela

figura 24. Desta forma, o valor da IF emitida pela sonda DCFH/DA no MLV de aorta de ratos Sham foi de 6672 ± 660 U e de ratos CLP foi de 12774 ± 1207 U.

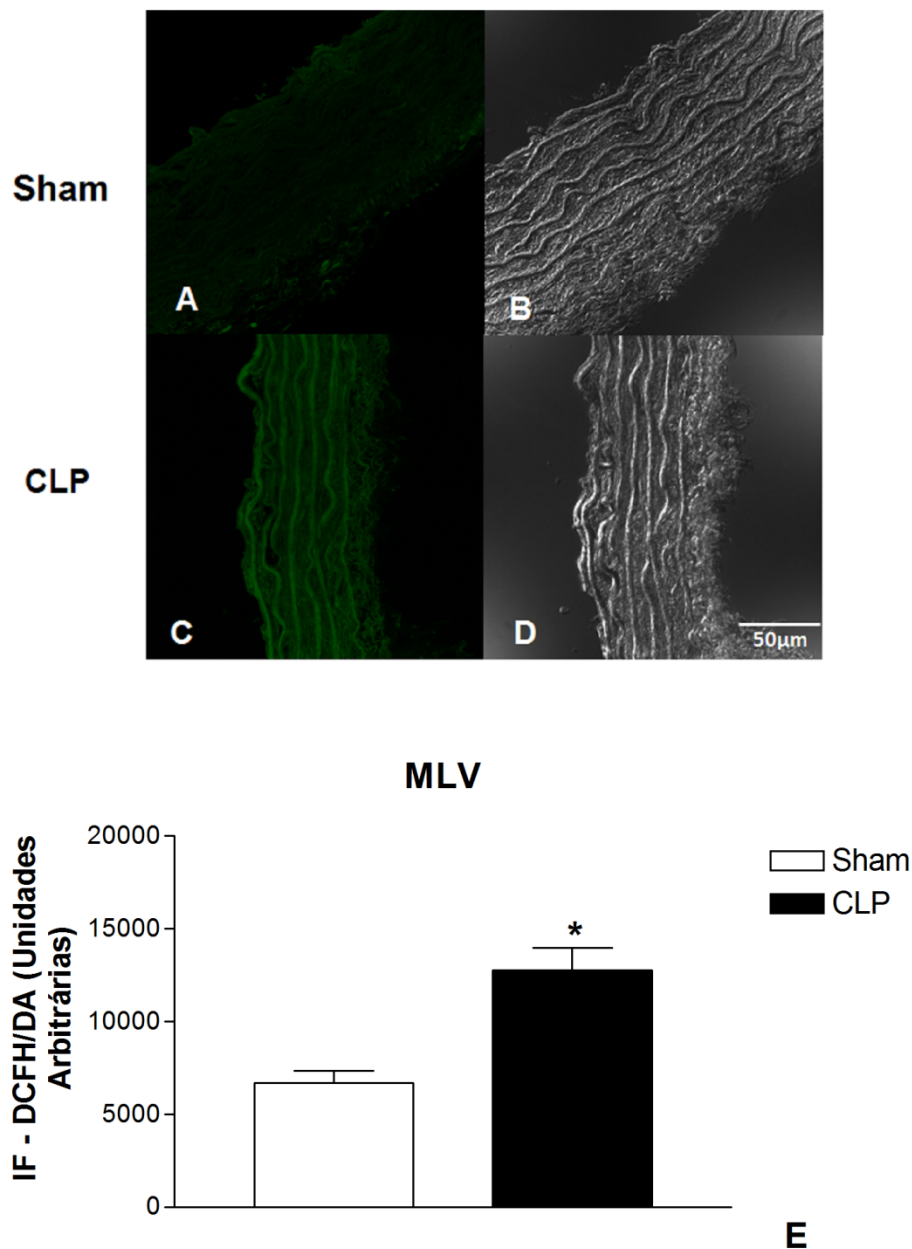


Figura 24. Análise da concentração citosólica de H_2O_2 basal no músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Sham e CLP. A e C representam as fotomicrografias de aortas isoladas de ratos Sham (A) ou CLP (C), com marcação positiva para a sonda seletiva para H_2O_2 , DCFH/DA (100 $\mu\text{mol/L}$, 30 min), evidenciando a condição basal, por microscopia confocal (SP5 Leica). B e D representam as fotomicrografias de campo claro (Scan-DIC) de aortas de ratos Sham (B) ou CLP (D), por microscopia confocal (SP5 Leica). E, quantificação da intensidade de fluorescência emitida (IF) da sonda DCFH/DA no MLV de aorta de ratos Sham e CLP. Barra representa 50 μm . * diferente de Sham; $n=4$ ($P<0,05$).

As medidas da concentração citosólica de cálcio, $[Ca^{2+}]_c$, basal no MLV de aortas de ratos Sham e CLP mostraram-se semelhantes entre os grupos (Sham: $40,35 \pm 4,01$ U; CLP: $35,43 \pm 3,52$ U), como mostra a figura 25. Após a estimulação com CNP, ocorreu redução da $[Ca^{2+}]_c$ em relação ao basal, em ambos os grupos Sham ($-51,78 \pm 5,10\%$) e CLP ($-25,00 \pm 2,50\%$), sendo esta redução menor no grupo CLP.

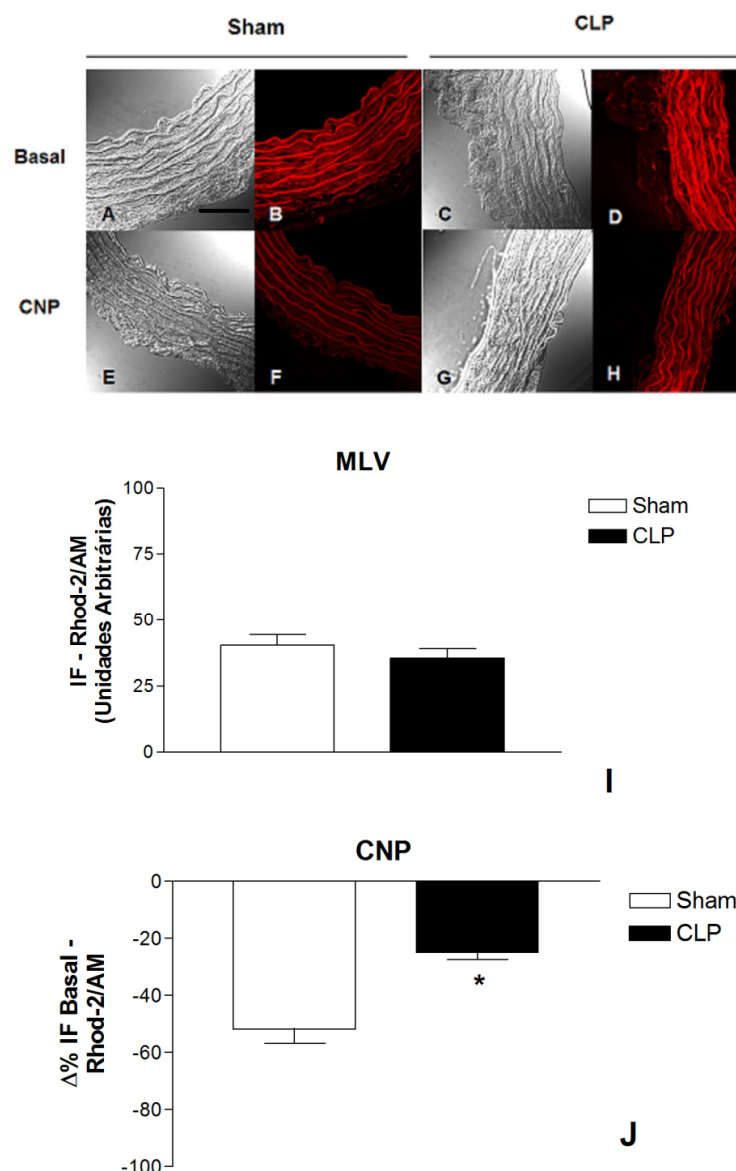


Figura 25. Concentração citosólica de cálcio no músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Sham e CLP. A, C, E e G representam as fotomicrografia de campo claro (Scan-DIC) de aortas de ratos Sham (A e E) ou CLP (C e G), por microscopia confocal (SP5 Leica). B, D, F e H representam as fotomicrografia de aortas de ratos Sham (B e F) ou CLP (D e H), com marcação positiva para a sonda seletiva para cálcio citosólico, Rhod-2/AM (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 min), por microscopia confocal (SP5 Leica). E, F, G e H representam as fotomicrografia de aortas de ratos Sham (E e F) ou CLP (G e H) após estímulo com CNP (1 $\mu\text{mol/L}$, 5 min). I, quantificação da intensidade de fluorescência emitida (IF) da sonda Rhod-2/AM no MLV de aorta de ratos Sham e CLP. J, delta da porcentagem da mobilização de cálcio induzida pelo CNP em função da concentração basal de cálcio citosólico ($\text{IF}_{\text{CNP}} - \text{IF}_{\text{Basal}}/\text{IF}_{\text{Basal}} \times 100$) no MLV de aorta de ratos Sham e CLP. Barra representa 50 μm . * diferente de Sham; $n=5-6$ ($P<0,05$).

A concentração de cálcio também foi avaliada no ventrículo esquerdo (VE) de ratos Sham e CLP (figura 26). A $[\text{Ca}^{2+}]_c$ basal no VE de ratos Sham foi maior

(11910,50±756,37 U) quem em ratos CLP (8900,67±602,56 U). Contudo, a redução do cálcio induzida pelo CNP foi maior em CLP quando comparada ao Sham (+CNP Sham: -52,96±2,85 U; CLP: -84,84±2,96 U).

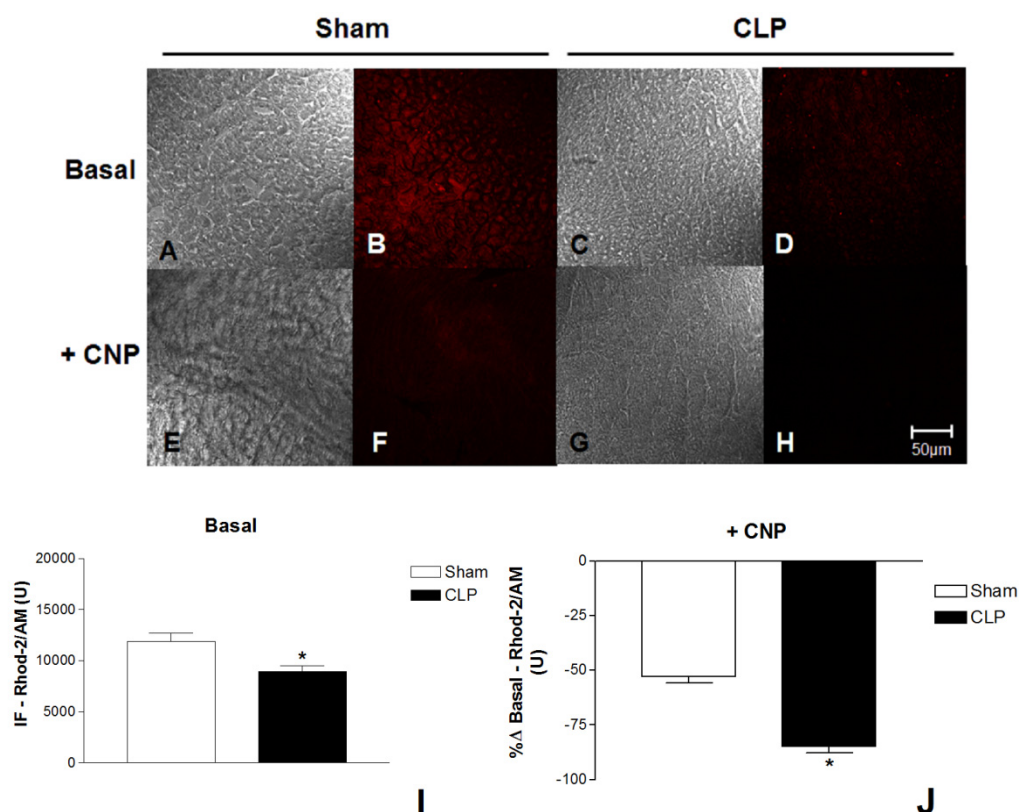


Figura 26. Concentração citosólica de cálcio no ventrículo esquerdo (VE) de ratos Sham e CLP. A, C, E e G representam as fotomicrografia de campo claro (Scan-DIC) de VE de rato Sham (A e E) ou CLP (C e G), por microscopia confocal (SP5 Leica). B, D, F e H representam as fotomicrografia de VE de rato Sham (B e F) ou CLP (D e H), com marcação positiva para a sonda seletiva para cálcio citosólico, Rhod-2/AM (10 $\mu\text{mol/L}$, 20 min), por microscopia confocal (SP5 Leica). E, F, G e H representam as fotomicrografia de VE de rato Sham (E e F) ou CLP (G e H) após estímulo com CNP (1 $\mu\text{mol/L}$, 5 min). I, quantificação da intensidade de fluorescência emitida (IF) da sonda Rhod-2/AM no VE de ratos Sham e CLP. J, delta da porcentagem da mobilização de cálcio induzida pelo CNP em função da concentração basal de cálcio citosólico ($(IF_{\text{CNP}} - IF_{\text{Basal}})/IF_{\text{Basal}} \times 100$) no VE de ratos Sham e CLP. Barra representa 50 μm . * diferente de Sham; $n=4$ ($P<0,05$).

As medidas do potencial de membrana basal nas células do MLV de aortas de ratos Sham e CLP foram semelhantes entre os grupos (Sham: 2,88±0,28U; CLP: 2,38±0,21 U), como mostram as figuras 27, 28 e 29. Contudo, após a estimulação com KCl 120 mmol/L por 5 min, ocorreu o aumento da razão $IF_{450/510}$ no grupo Sham (6,69±0,31 U), mas não no grupo CLP(2,34±0,13 U).

O potencial de membrana basal do VE também foi avaliado (figura 30). O potencial de membrana basal do VE de ratos CLP foi menor comparado aquele em ratos Sham (Sham: $6,27 \pm 0,32$ U; CLP: $4,12 \pm 0,23$ U).

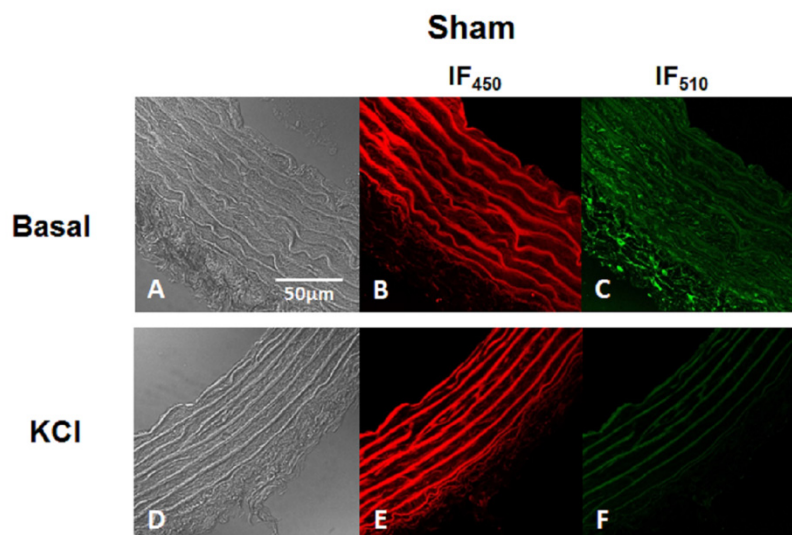


Figura 27. Potencial de membrana basal ou estimulado nas células do músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos Sham. A e D representam as fotomicrografia de campo claro (Scan-DIC) de aorta de rato Sham, por microscopia confocal (SP5 Leica). B, C, E e F representam as fotomicrografia de aorta isolada de rato Sham, com marcação positiva para a sonda seletiva para potencial de membrana, Di-4-annepps ($1 \mu\text{mol/L}$, 10 min), evidenciando a condição basal (B e C) ou estimulado com KCl (E e F), em IF₄₅₀ (B e E) ou IF₅₁₀ (C e F), por microscopia confocal (SP5 Leica). Barra representa 50 μm .

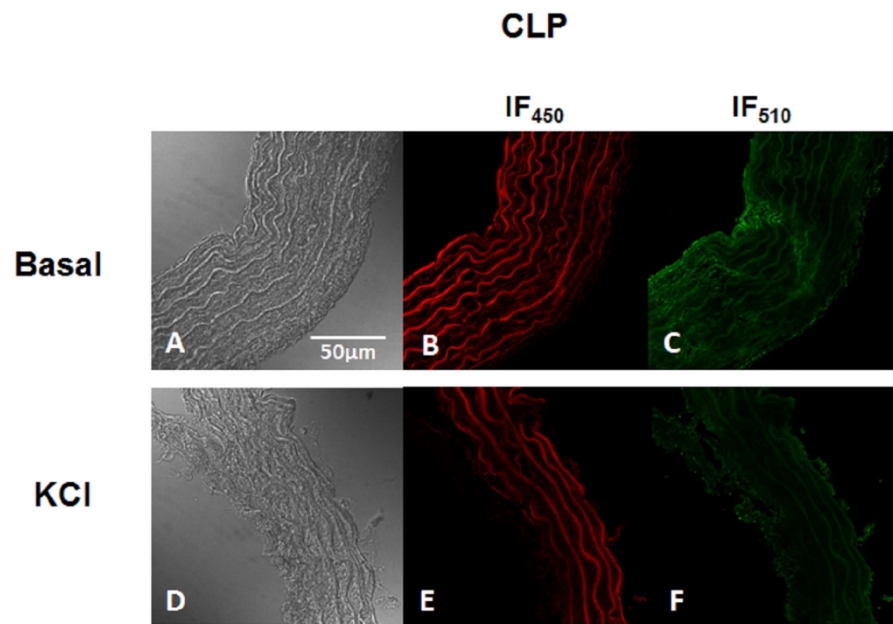


Figura 28. Potencial de membrana basal ou estimulado nas células do músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos CLP, por microscopia confocal. A e E representam as fotomicrografia de campo claro (Scan-DIC) de aorta de rato CLP, por microscopia confocal (SP5 Leica). B, C, E e F representam as fotomicrografia de aorta isolada de rato CLP, com marcação positiva para a sonda seletiva para potencial de membrana, Di-4-annepps (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 min), evidenciando a condição basal (B e C) ou estimulado com KCl (E e F), em IF₄₅₀ (B) ou IF₅₁₀ (C e F), por microscopia confocal (SP5 Leica). Barra representa 50 μm .

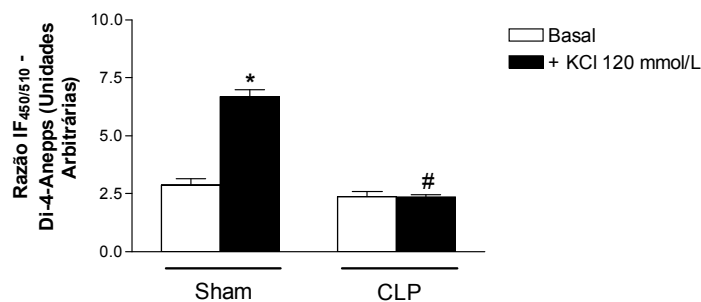


Figura 29. Quantificação da alteração do potencial de membrana no músculo liso vascular (MLV) em aorta de ratos Sham e CLP. Razão da IF_{450/510} da sonda fluorescente seletiva para potencial de membrana, Di-4-annepps (1 $\mu\text{mol/L}$, 10 min), na condição basal ou após estímulo com KCl (120 mmol/L , 5min), em aorta de ratos Sham e CLP. * diferente de Sham basal; # diferente de Sham+KCl 120 mmol/L ; $n=4$ ($P<0,05$).

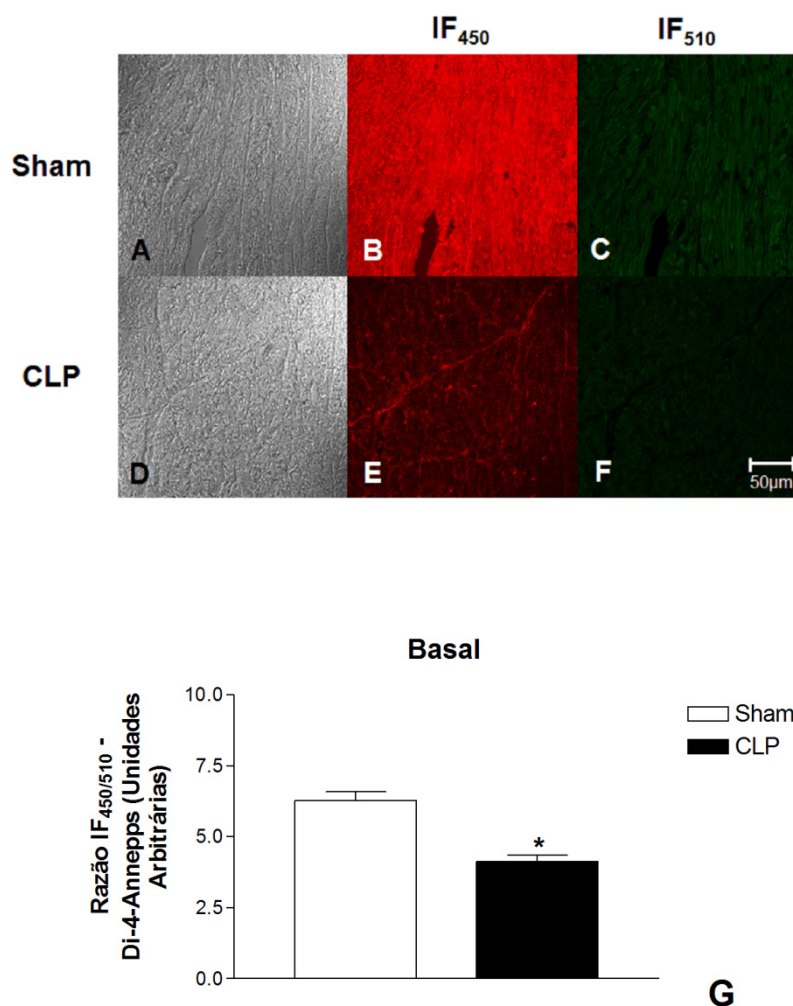
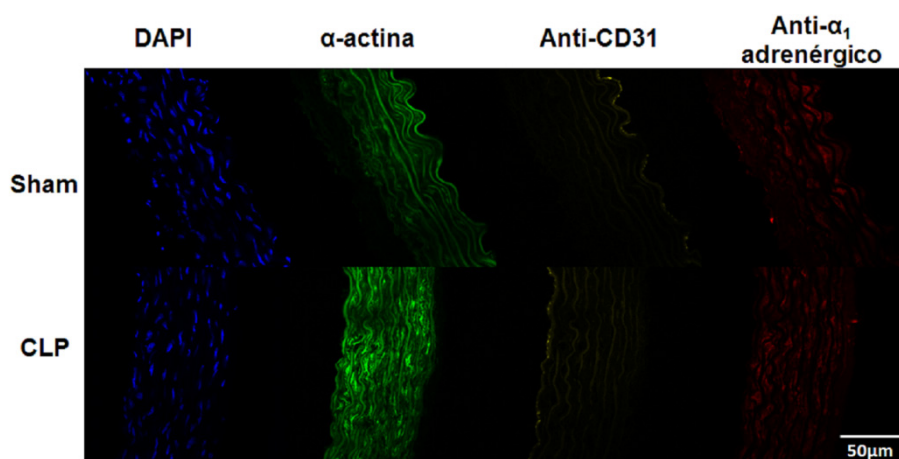


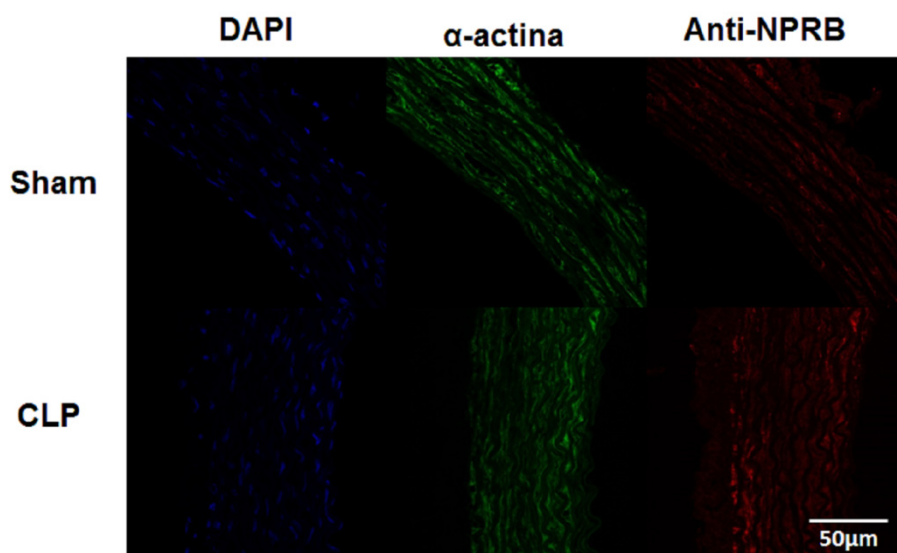
Figura 30. Potencial de membrana basal do ventrículo esquerdo (VE) de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal. A e D representam as fotomicrografia de campo claro (Scan-DIC) de VE de rato Sham (A) ou CLP (D), por microscopia confocal (SP5 Leica). B, C, E e F representam as fotomicrografia de VE de rato Sham (B e C) ou CLP (E e F), com marcação positiva para a sonda seletiva para potencial de membrana, Di-4-annepps (1 μmol/L, 10 min), evidenciando a condição basal, em IF₄₅₀ (B e E) ou IF₅₁₀ (C e F) por microscopia confocal (SP5 Leica). G, quantificação da alteração do potencial de membrana do VE de ratos Sham e CLP. Razão da IF_{450/510} da sonda fluorescente seletiva para potencial de membrana, Di-4-annepps (1 μmol/L, 10 min), na condição basal. * diferente de Sham basal; $n=4$ ($P<0,05$).

As expressões protéicas e localizações teciduais dos receptores α_1 -adrenérgico, NPR-B e NPR-C, bem como de CNP endógeno, foram avaliadas em aorta de ratos Sham e CLP, como apresentado pelas figuras 31 e 32. As expressões protéicas de receptores α_1 -adrenérgicos no endotélio vascular (Sham: $2,11 \pm 0,21$ U; CLP: $1,83 \pm 0,15$ U) ou MLV (Sham: $7,46 \pm 0,70$ U; CLP: $5,89 \pm 0,62$ U) não foram diferentes entre os grupos Sham e CLP. Além disso, a expressão protéica destes receptores no MLV foi maior que aquela no endotélio, em ambos os grupos. A

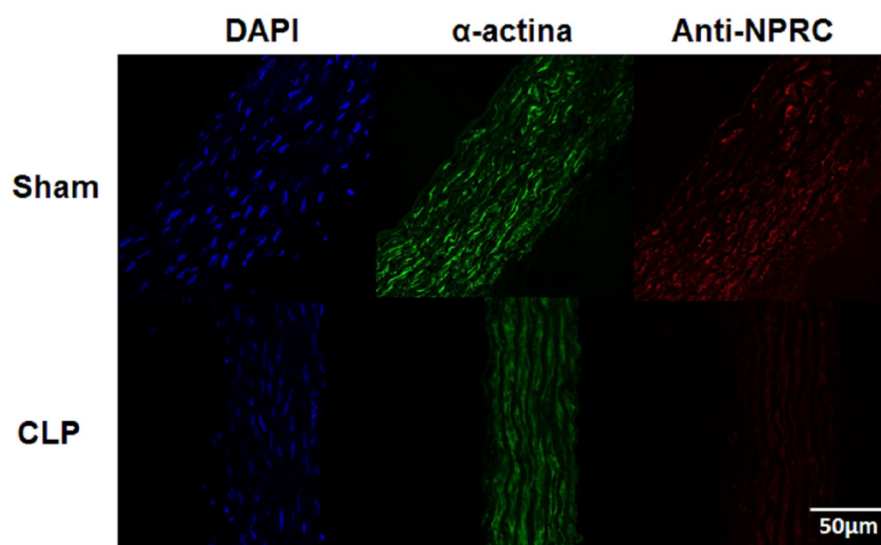
expressão protéica de receptores NPR-B no MLV não foi diferente entre os grupos Sham ($6,71 \pm 0,63$ U) e CLP ($7,70 \pm 0,61$ U). Entretanto, a expressão protéica de receptores NPR-C no MLV foi menor em aortas de ratos CLP ($4,35 \pm 0,46$ U) comparada às aortas dos ratos Sham ($7,81 \pm 0,80$ U). Por fim, a expressão de CNP endógeno no endotélio foi menor em ratos CLP ($6,50 \pm 0,66$ U) comparada ao Sham ($9,78 \pm 0,50$); no MLV foi maior em ratos CLP ($9,72 \pm 0,60$ U) comparada ao Sham ($7,32 \pm 0,11$ U), e na camada adventícia não foi diferente entre os grupos Sham ($13,35 \pm 1,00$ U) e CLP ($15,02 \pm 1,20$ U). Ainda em relação à análise do CNP endógeno, nota-se que maior expressão protéica na camada adventícia, seguida do endotélio e por último a camada do MLV e aortas de ratos Sham, e a ordem de camada adventícia, MLV e endotélio para as aortas de ratos CLP.



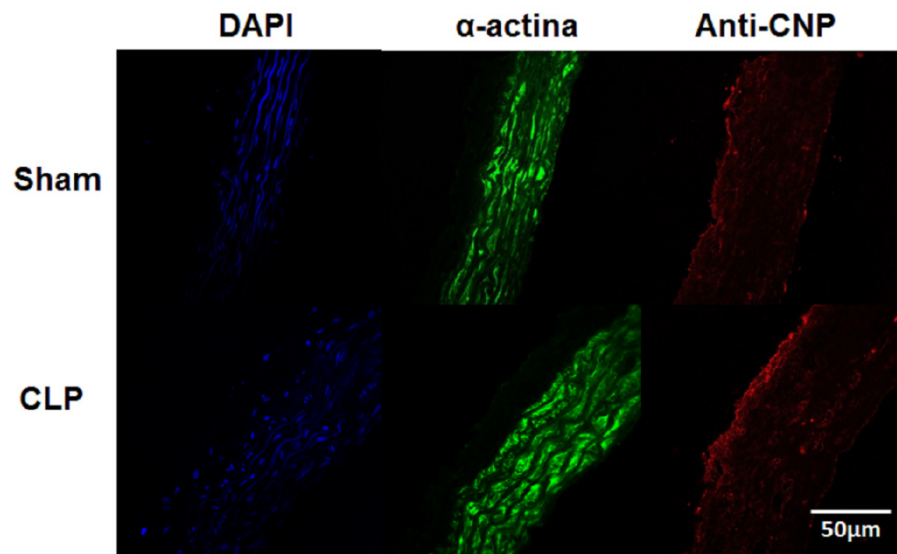
A



B



C



D

Figura 31: Análise da expressão protéica dos receptores α_1 -adrenérgico, NPR-B, NPR-C e de CNP endógeno em aorta de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal. A, painel de fotomicrografias com marcação para receptores α_1 -adrenérgicos em aorta de ratos Sham e CLP. B, painel de fotomicrografias com marcação positiva para receptores NPR-B em aorta de ratos Sham e CLP. C, fotomicrografias com marcação positiva para receptores NPR-C. D, fotomicrografias com marcação positiva para CNP endógeno. Barra representa 50 μ m.

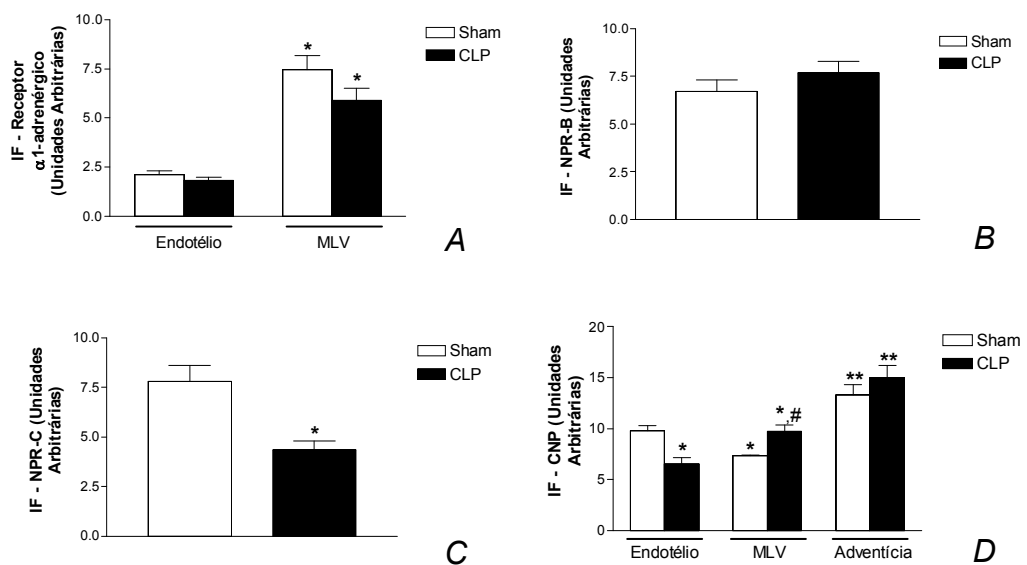


Figura 32. Quantificação da expressão protéica dos receptores α_1 -adrenérgicos, NPR-B e NPR-C, e CNP endógeno. A, quantificação dos receptores α_1 -adrenérgicos no endotélio e MLV de aorta de ratos Sham e CLP. B, quantificação da expressão protéica dos receptores NPR-B no MLV de aorta de ratos Sham e CLP. C, quantificação da expressão protéica dos receptores NPR-C no MLV de aorta de ratos Sham e CLP. D, quantificação da expressão de CNP endógeno no endotélio, MLV e adventícia de aorta de ratos Sham e CLP. * diferente de Sham/Sham endotélio; ** diferente de endotélio/MLV; # diferente CLP endotélio; $n=4-6$ ($P<0,05$).

A expressão protéica dos receptores NPR-B e NPR-C também foram avaliadas no VE de ratos Sham e CLP (figura 33). Não foi observada qualquer alteração da expressão protéica dos receptores NPR-B ou NPR-C em ambos os grupos (NPR-B Sham: $6,72 \pm 0,67$ U; CLP: $6,43 \pm 0,20$ U; NPR-C Sham: $5,44 \pm 0,55$ U; CLP: $5,13 \pm 0,51$ U).

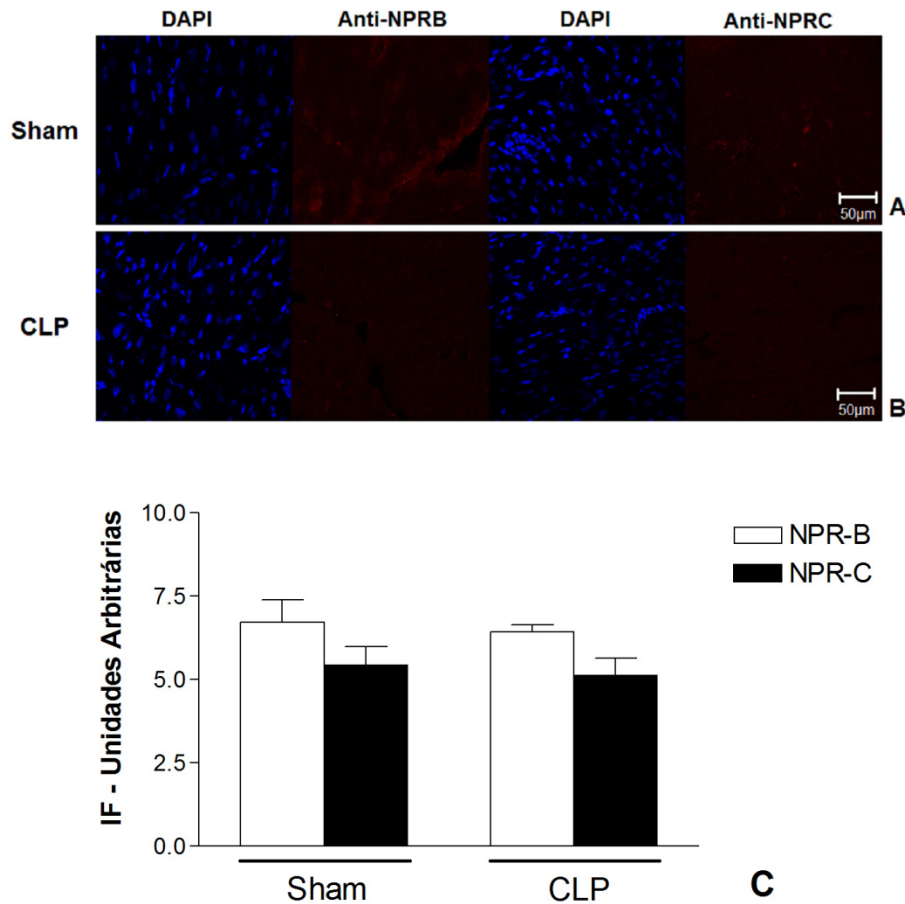


Figura 33: Análise da expressão protéica dos receptores NPR-B e NPR-C no ventrículo esquerdo (VE) de ratos Sham e CLP, por microscopia confocal. A, painel de fotomicrografias com marcação para DAPI (núcleos; azul) ou receptores NPR-B e NPR-C, respectivamente (vermelho), no VE de ratos Sham. B, painel de fotomicrografias com marcação positiva para DAPI (núcleos; azul) ou receptores NPR-B e NPR-C, respectivamente (vermelho), no VE de ratos CLP. Barra representa 50µm. C, quantificação da expressão protéica dos receptores NPR-B e NPR-C no VE de ratos Sham e CLP; $n=4$ ($P>0,05$).

A expressão protéica dos receptores NPR-B e NPR-C também foi avaliada pela técnica de *Western Blotting*, em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. Como apresentado pela figura 34, a expressão protéica de NPR-B ou NPR-C não foi diferente entre os grupos Sham (NPR-B: $0,79 \pm 0,07$ U; NPR-C: $0,57 \pm 0,06$ U) e CLP (NPR-B: $0,92 \pm 0,06$ U; NPR-C: $0,54 \pm 0,06$ U).

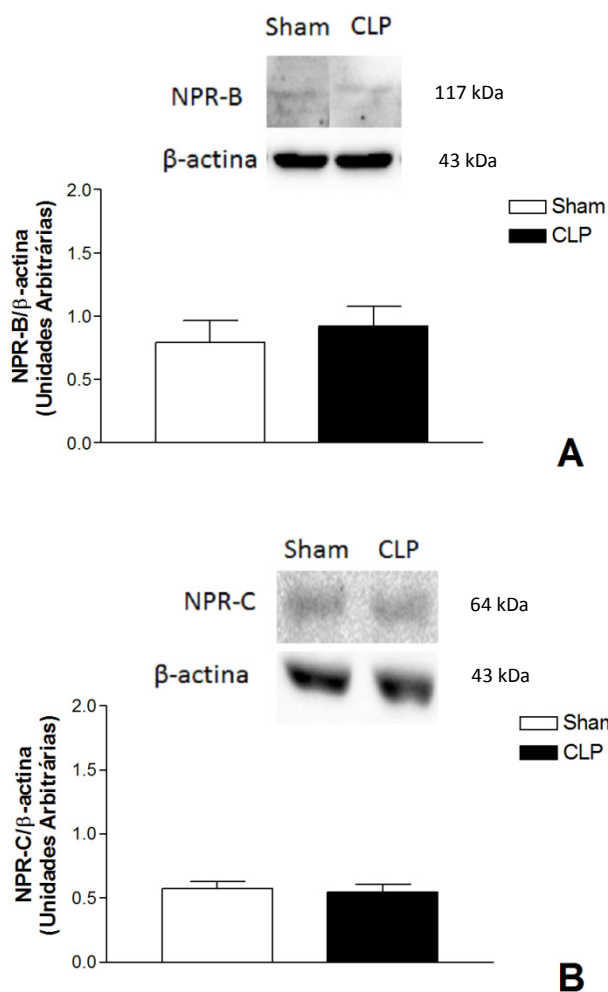


Figura 34. Expressão protéica de receptores NPR-B e NPR-C em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. A, quantificação (gráfico) e *blot* (superior) da expressão protéica de NPR-B em extrato de aorta de ratos Sham e CLP, normalizados pela expressão protéica de β -actina. B, quantificação (gráfico) e *blot* (superior) da expressão protéica de NPR-C em extrato de aorta de ratos Sham e CLP, normalizados pela expressão protéica de β -actina; $n=4-6$ ($P>0,05$).

A expressão protéica das isoformas NOS2 e NOS3 foi avaliada em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. No grupo CLP, a expressão protéica de ambas as enzimas NOS2 (Sham: $0,0266 \pm 0,0013$ U; CLP: $0,0642 \pm 0,0018$ U) e NOS3 (Sham: $0,10 \pm 0,01$ U; CLP: $0,20 \pm 0,02$ U) foram maiores quando comparada com o grupo Sham (figura 35).

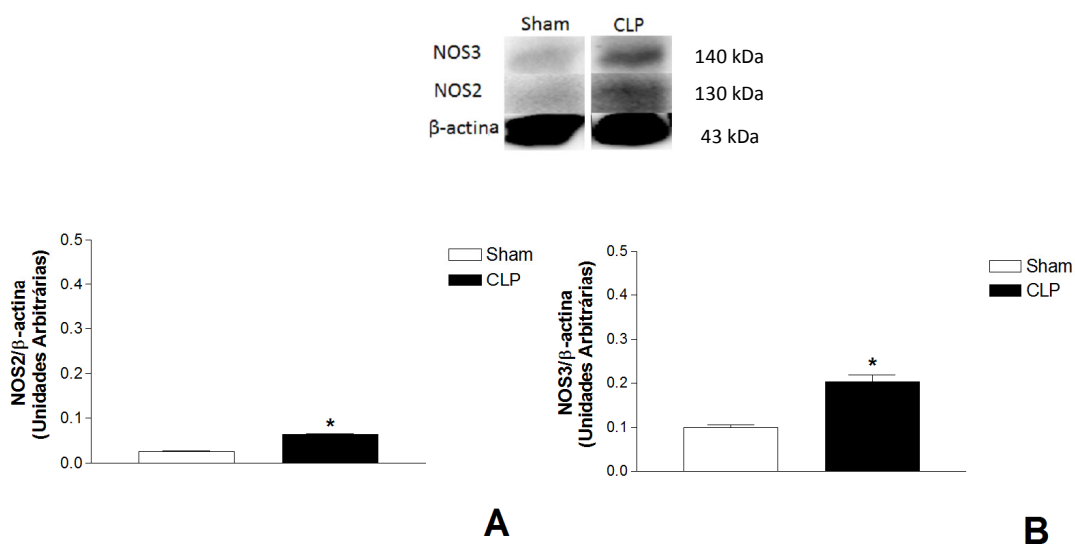


Figura 35. Expressão protéica das isoformas eNOS (NOS3) e iNOS (NOS2) em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. A, quantificação da expressão protéica de NOS3 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP, normalizados pela expressão protéica de β -actina. B, quantificação da expressão protéica de NOS2 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP, normalizados pela expressão protéica de β -actina. Superior: blot representativo da expressão protéica de NOS3 e NOS2, normalizados pela expressão protéica de β -actina. * diferente de Sham; $n=4$ ($P<0,05$).

A expressão protéica de Nox1 foi avaliada em extrato de aorta de ratos Sham e CLP, como apresentado na figura 36. Assim, foi observada que a expressão protéica de Nox1 foi maior em extrato de aorta de ratos CLP ($1,61 \pm 0,17$ U) comparada aquela em ratos Sham ($0,73 \pm 0,08$ U).

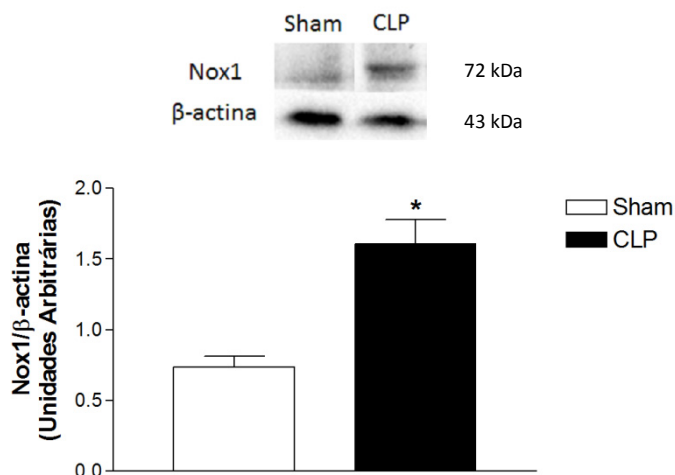


Figura 36. Expressão protéica de Nox1 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. Quantificação da expressão protéica de Nox1 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP, normalizados pela expressão protéica de β -actina. Superior: blot representativo da expressão protéica de Nox1, normalizados pela expressão protéica de β -actina. * diferente de Sham; $n=4$ ($P<0,05$).

A produção de EROs dependente de NADPH oxidase foi avaliada em aortas E+ de ratos Sham e CLP, em ausência (basal) ou presença de estímulos como PE ou PE+CNP, pelo ensaio de lucigenina. Na figura 37, observou-se que a presença de DPI, inibidor não seletivo de proteínas que contém flavina em sua estrutura, inibiu a formação de EROs mediada pela NADPH oxidase em relação ao Sham. A produção de EROs basal (em ausência de estímulos) foi menor nas aortas de ratos CLP comparadas aquelas de ratos Sham. PE aumentou a formação de EROs dependente de NADPH oxidase em ambos os grupos Sham e CLP, sendo este valor menor em aortas de ratos CLP. A dupla exposição PE+CNP aumentou ainda mais em relação à PE a produção de EROs em ambos os grupos Sham e CLP; porém este valor foi menor em aortas de ratos CLP.

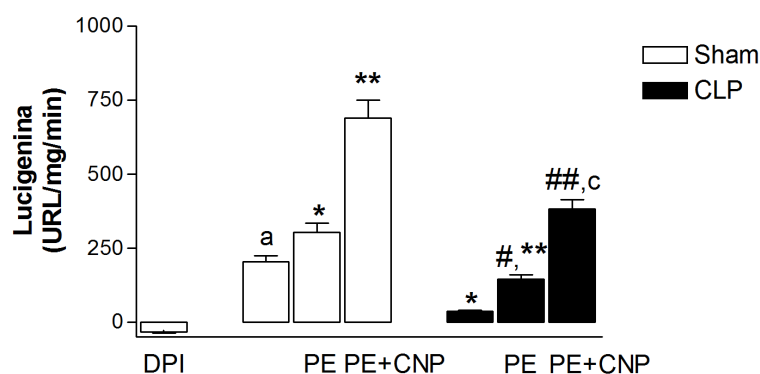


Figura 37. Atividade de NADPH oxidase em aortas E+ de ratos Sham e CLP. A presença de DPI inibiu a produção de EROs dependente de NADPH oxidase. A formação de EROs basal, dependente de NADPH oxidase, em aortas de ratos CLP foi menor que em aortas de ratos Sham. PE ou dupla exposição CNP+PE aumentaram a produção de EROS em ambos os grupos Sham e CLP, sendo menor no grupo CLP. ^a diferente de Sham DPI; ^{*} diferente de Sham basal; ^{**} diferente de Sham PE; [#] diferente de CLP basal; ^{##} diferente de CLP PE; ^c diferente de Sham PE+CNP; *n*=5-8 (*P*<0,05).

A expressão protéica e a atividade gelatinolítica de MMP-9 e MMP-2 foram avaliadas em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. Na figura 38, verificou-se que a expressão protéica de MMP-9 (87kDa e 92kDa) e de MMP-2 (72kDa) não foram diferente entre os grupos Sham e CLP. Contudo, a avaliação da atividade gelatinolítica (figura 39) da MMP-9 mostrou que sua atividade em 87kDa ou 92kDa não foi diferente entre os grupos Sham e CLP, porém sua atividade em 135kDa e 230kDa foram maiores em extrato de aorta de ratos CLP comparada ao grupo Sham. A atividade da MMP-2 apenas foi maior no extrato de aorta de ratos CLP em 64 kDa, mas não em 72kDa ou 75kDa, comparada ao grupo Sham. A tabela 8 apresenta os valores, em unidades arbitrárias, de expressão protéica e atividade gelatinolítica de MMP-9 e MMP-2 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP.

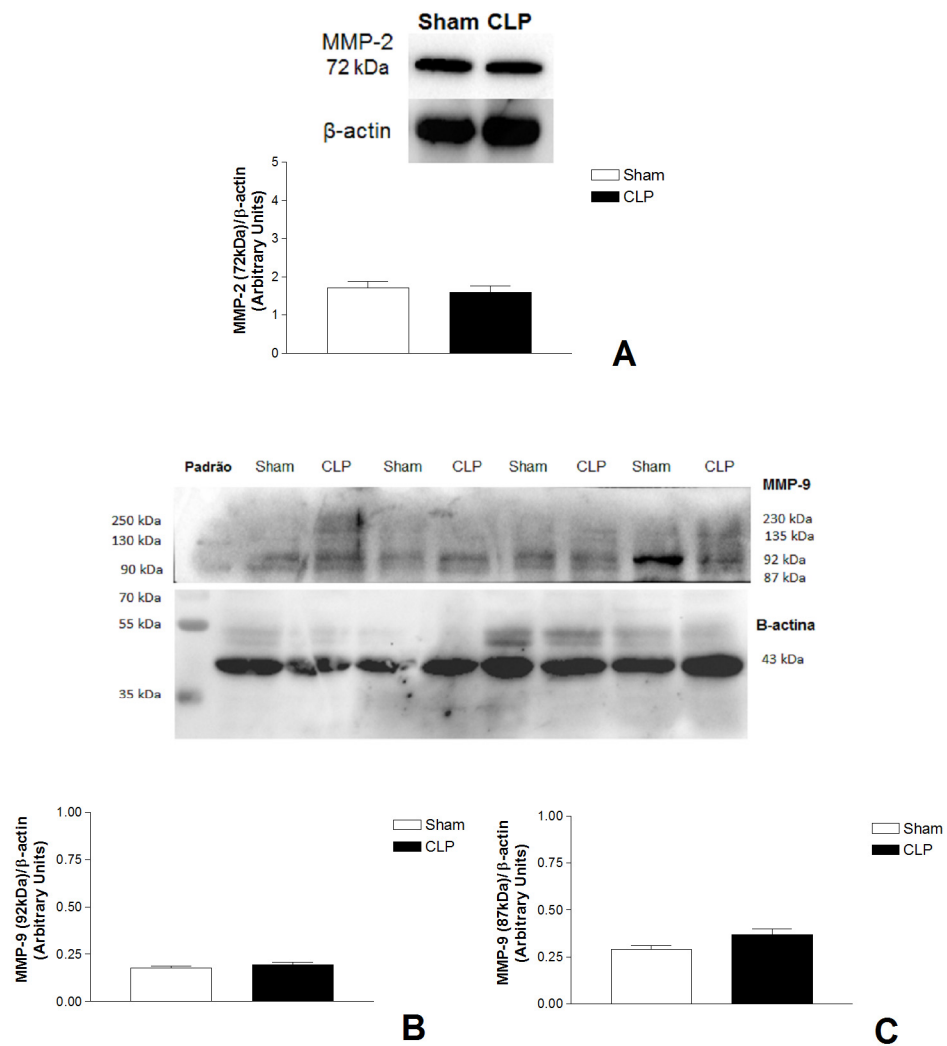


Figura 38. Expressão protéica de MMP-2 e MMP-9 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. A, quantificação da expressão protéica de MMP-2 de 72 kDa em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. Superior: *blot* de MMP-2 de 72 kDa normalizado pela β -actina, em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. B, quantificação da expressão protéica de MMP-9 de 92kDa em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. C, quantificação da expressão protéica de MMP-9 de 87kDa em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. Superior: *blot* de MMP-9 de 230 kDa, 135 kDa, 92 kDa e 87 kDa normalizado pela β -actina, em extrato de aorta de ratos Sham e CLP; $n=5-7$ ($P>0,05$).

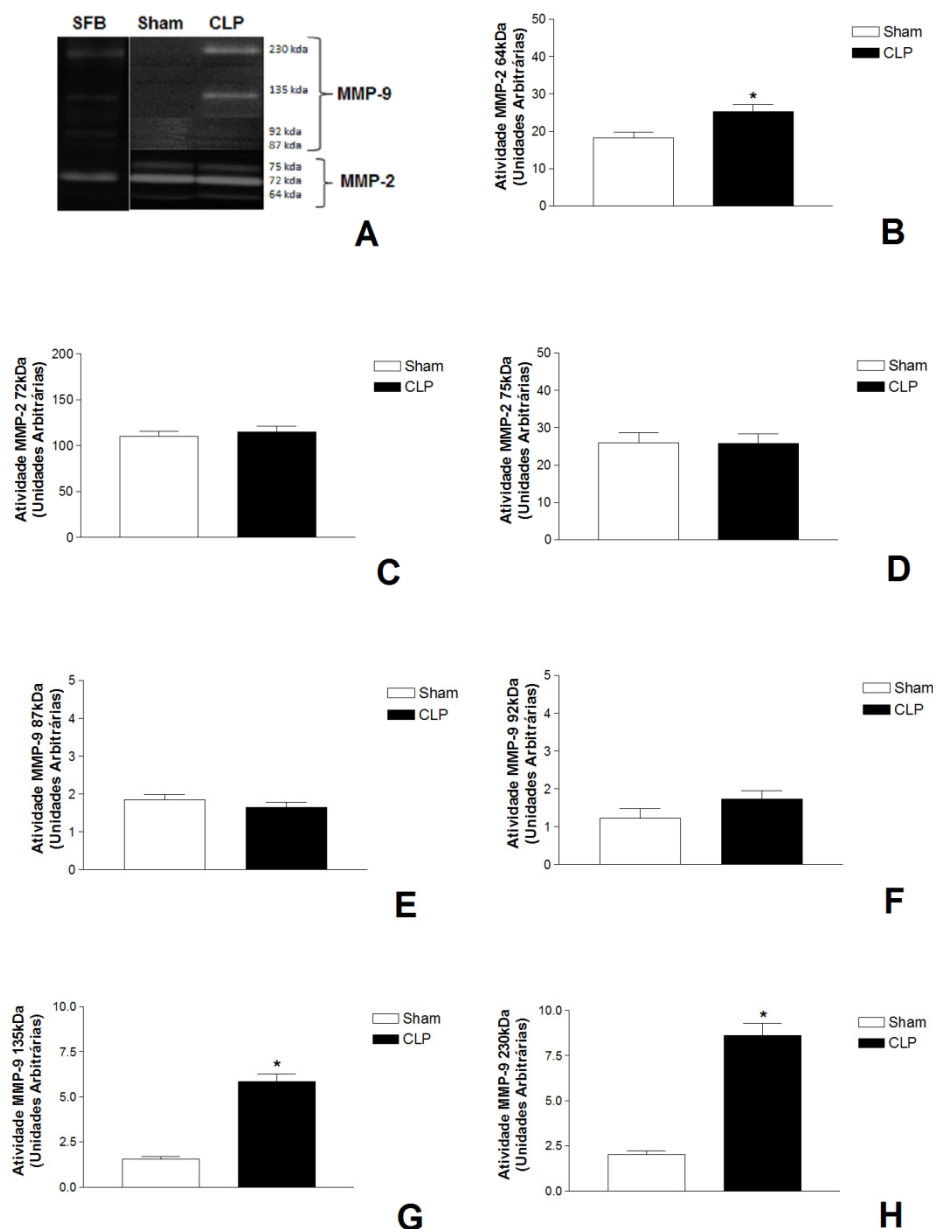


Figura 39. Atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. A, zimograma de MMP-2 (64, 72 e 75kDa) e MMP-9 (87, 92, 135 e 230kDa) em extrato de aorta de ratos Sham e CLP; a coluna do lado esquerdo do zimograma representa o marcador soro fetal bovino (SFB). Atividade gelatinolítica de MMP-2 64kDa (B; em unidades arbitrárias); ou de MMP-2 72kDa (C); ou de MMP-2 75kDa (D); ou de MMP-9 87kDa (E); ou de MMP-9 92kDa (F); ou de MMP-9 135kDa (G), ou de MMP-9 230kDa, em extrato de aorta de ratos Sham e CLP. * diferente de Sham; $n=5-9$ ($P<0,05$).

Tabela 8: Expressão protéica e atividade gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 em extrato de aorta de ratos Sham e CLP.

Expressão protéica (U)	MMP-2			MMP-9			
	64 kDa	72 kDa	75 kDa	87 kDa	92 kDa	135 kDa	230 kDa
<i>Sham</i>	-	1,71±0,18	-	0,29±0,02	0,12±0,01	-	-
<i>CLP</i>	-	1,60±0,16	-	0,37±0,03	0,19±0,02	-	-
Atividade gelatinolítica (U)	MMP-2			MMP-9			
	64 kDa	72 kDa	75 kDa	87 kDa	92 kDa	135 kDa	230 kDa
<i>Sham</i>	18,21±1,54	110,20±5,38	26,00±2,65	1,85±0,15	1,22±0,26	1,55±0,15	2,01±0,20
<i>CLP</i>	25,20±2,00*	114,80±6,70	25,84±2,51	1,65±0,13	1,74±0,21	5,85±0,41*	8,61±0,70*

* diferente de Sham.

CLP: Ligação e perfuração cecal;

MMP: Metaloproteinase da matriz.

A atividade da MMP-2 recombinante humana foi avaliada em presença de CNP em duas concentrações diferentes, 10 nmol/L e 1 µmol/L (figura 40). A presença de CNP não promoveu alteração significativa da atividade da MMP-2 recombinante humana. Apenas o inibidor não seletivo de MMPs, Fenantrolina, foi capaz de inibir a atividade da MMP-2 recombinante humana a partir de 10 minutos, permanecendo assim até o final do ensaio.

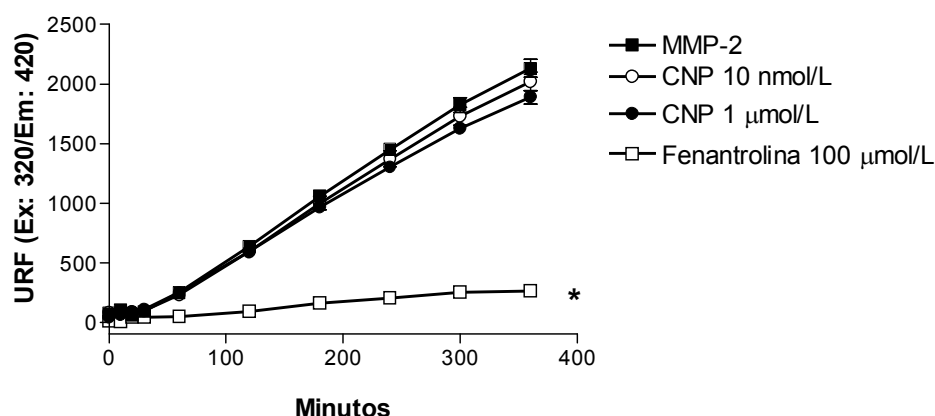


Figura 40. Ensaio da atividade de MMP-2 recombinante humana em presença de CNP em diferentes concentrações. CNP foi testado em presença de MMP-2 recombinante humana. CNP (10 nmol/L ou 1 μmol/L) não alterou a atividade da MMP-2 recombinante humana. Fenantrolina inibiu a atividade da MMP-2 recombinante humana durante todo o ensaio (10 min a 360 min). * diferente de MMP-2; $n=4$ ($P<0,05$).

Os aspectos morfofuncionais cardíacos foram avaliados nos ratos Sham e CLP pelo exame de ecocardiografia. Em relação aos parâmetros cardíacos, como mostrado na tabela 9 e figura 41, observou-se a divisão de dois grupos de ratos em choque sépticos de acordo com a frequência cardíaca (FC, em B.P.M) avaliada pelo exame de ecocardiografia. O grupo de ratos CLP que apresentou FC semelhante aquela do grupo Sham foi denominado de “CLP 1” (FC CO: 419 ± 10 B.P.M.; “CLP 1”: 442 ± 9 B.P.M.); enquanto que o grupo de ratos CLP que apresentou FC menor em relação ao grupo Sham foi denominado de “CLP 2” (“CLP 2”: 231 ± 18 B.P.M.). Contudo, ambos os ratos CLP dos grupos “1” e “2” foram submetidos às mesmas condições de cirurgia de indução do choque séptico por ligação e perfuração cecal, como explicado na sessão de metodologia.

Tabela 9: Análise morfofuncional do coração de ratos Sham e CLP (“CLP 1” e “CLP 2”) através do exame de ecocardiografia.

<i>Grupos</i>	<i>Sham</i>	<i>“CLP 1”</i>	<i>“CLP 2”</i>
<i>FC (B.P.M.)</i>	419 ± 10	442 ± 9	231 ± 18 ^{*,#}
<i>Volume de sístole (μL)</i>	201,38 ± 18,24	101,33 ± 10,47 [*]	29,57 ± 2,70 ^{*,#}
<i>Fração de ejeção (%)</i>	63,26 ± 1,34	57,72 ± 3,90	74,27 ± 3,06 ^{*,#}
<i>Débito cardíaco (mL/min)</i>	83,76 ± 7,04	44,50 ± 4,19 [*]	6,79 ± 0,51 ^{*,#}
<i>Fração de encurtamento (%)</i>	36,43 ± 0,92	33,86 ± 3,10	57,11 ± 7,85 ^{*,#}
<i>IVS_d (mm)</i>	1,19 ± 0,05	1,33 ± 0,11	2,14 ± 0,07 ^{*,#}
<i>IVS_s (mm)</i>	1,87 ± 0,07	1,98 ± 0,18	2,67 ± 0,05 ^{*,#}
<i>LVID_d (mm)</i>	6,38 ± 0,14	4,78 ± 0,22 [*]	2,27 ± 0,27 ^{*,#}
<i>LVID_s (mm)</i>	4,06 ± 0,13	3,28 ± 0,27 [*]	0,94 ± 0,08 ^{*,#}
<i>LVPW_d (mm)</i>	1,49 ± 0,04	1,54 ± 0,07	2,51 ± 0,18 ^{*,#}
<i>LVPW_s (mm)</i>	2,25 ± 0,05	2,14 ± 0,14	3,16 ± 0,33 ^{*,#}

FC representa frequência cardíaca; *IVS_d* representa espessura do septo interventricular na diástole; *IVS_s* representa espessura do septo interventricular na sístole; *LVID_d* representa espessura da cavidade ventricular esquerda na diástole; *LVID_s* representa espessura da cavidade ventricular esquerda na sístole; *LVPW_d* representa espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na diástole; *LVPW_s* representa espessura da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole. Dados são representados como média ± E.P.M. ^{*} diferente de Sham, [#] diferente de “CLP 1” ($P < 0,05$). *mmHg* significa milímetro de mercúrio; *B.P.M.* significa batimentos por minuto; *μL* significa microlitros; *mm* significa espessura em milímetros; $n = 8-10$ ($P < 0,05$).

O grupo “CLP 1” não apresentou diferenças nos parâmetros funcionais de fração de ejeção e fração de encurtamento quando comparado ao grupo Sham. Entretanto, ocorreu a redução do volume de sístole e do débito cardíaco. Já nos

parâmetros morfológicos, apenas as espessuras da cavidade do ventrículo esquerdo na sístole ou diástole foram menores que aquelas observadas no grupo Sham. O grupo “CLP 2” apresentou alteração em todos os parâmetros funcionais e morfológicos avaliados, tanto em comparação ao grupo Sham como em comparação ao grupo “CLP 1”, sugerindo a maior severidade da condição de sepse no segundo grupo. Assim, podemos observar que ocorreram reduções nos parâmetros funcionais de volume de sístole e débito cardíaco, aumento de fração de ejeção e de encurtamento, e diminuição nos valores dos parâmetros morfológicos de espessuras da cavidade ventricular esquerda na sístole ou diástole, e aumentos dos valores de espessuras do septo interventricular e da parede posterior do ventrículo esquerdo na sístole ou diástole comparados aqueles do grupo Sham ou “CLP 1” (tabela 9). A figura 40 mostra as fotos dos corações dos ratos Sham, “CLP 1” e “CLP 2”, respectivamente.

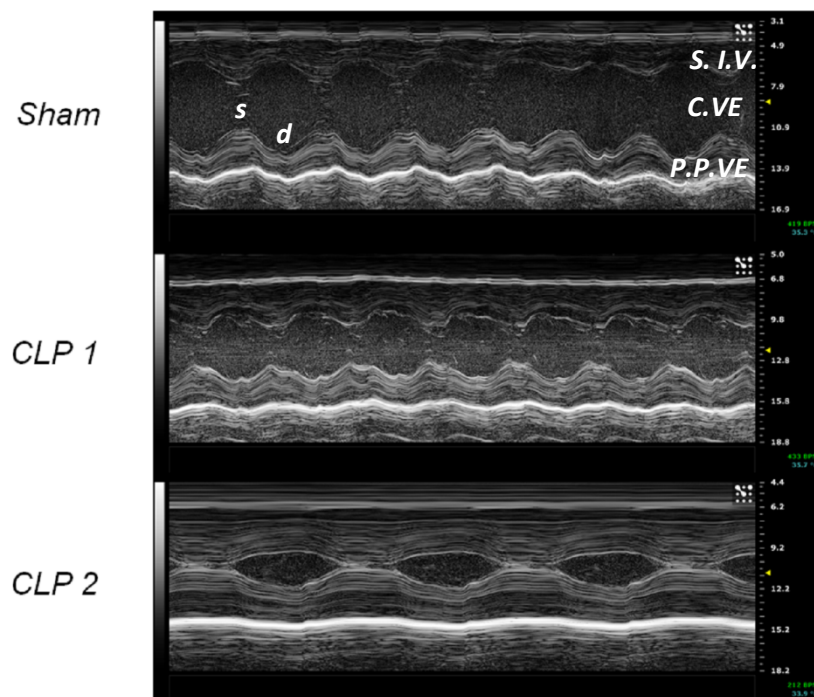


Figura 41. Exame de ecocardiografia nos corações de ratos Sham e CLP (“CLP 1” e “CLP 2”). As imagens mostram o septo interventricular, cavidade do ventrículo esquerdo, parede posterior do ventrículo esquerdo e cavidade do ventrículo esquerdo na sístole e diástole dos ratos Sham e CLP. *Vevo 2100[®]* High-Resolution Imaging System (Visual Sonics, Toronto, ON, Canadá). *S.I.V.* representa Septo interventricular; *C.VE* representa Cavidade do ventrículo esquerdo; *P.P.VE* representa Parede posterior do ventrículo esquerdo; *s* representa Sístole; *d* representa Diástole.

Discussão dos Resultados

5 Discussão dos Resultados

Uma das principais características clínicas da sepse envolve a menor resposta contrátil vascular a diversos agonistas (Donaldson, Myers, 1996; Vromen et al., 1996; Strunk et al., 2001; Levy et al., 2010) e esta representa uma condição de grande importância para a manutenção da sobrevivência dos pacientes. Diversas estratégias terapêuticas têm por objetivo melhorar as funções dos órgãos vitais (Leone, Martin, 2008). Entretanto, pouco se tem avançado no tratamento de tal condição que representa grande parcela de mortes de pacientes internados em hospitais públicos e privados do Brasil (Teles et al., 2008).

O modelo de sepse induzida por ligação e perfuração cecal (CLP) representa uma situação observada em pacientes que apresentam perfuração intestinal, desenvolvendo sepse severa multibacteriana, com agravamento da situação clínica dentro de algumas horas ou até mesmo em alguns dias (Lundblad; Sandven; Giercksky, 1995). Em nosso estudo, os animais submetidos à cirurgia para indução do choque séptico por CLP apresentaram baixa sobrevivência, acompanhada de pronunciada queda da PAM e PAP 4 horas após o procedimento cirúrgico. Estes resultados corroboram com os achados de Tymi et al. (1998), Liaw et al. (2005) e Tsao et al. (2010) em ratos CLP. No grupo de ratos controle-operados (Sham), embora a sobrevivência dos animais deste grupo tenha sido total, os registros das PAM e PAP evidenciaram reduções. De acordo com Jong e colaboradores (2002), anestésicos gerais como o Tribromoetanol, podem alterar os parâmetros cardiovasculares. Portanto, o efeito hipotensor evidenciado no grupo Sham pode ser devido ao efeito anestésico nestes animais. Estes parâmetros pressóricos foram extremamente importantes para a validação do modelo utilizado, sendo adaptado das descrições experimentais de Wichterman et al. (1980); Fernandes et al. (2009) e Araújo et al. (2011) e dos valores padronizados por Kotsovolis e Kallaris (2010).

Em relação ao estudo da FC por meio de exame de ecocardiografia, observamos a instalação de dois grupos de animais em sepse: o grupo "CLP 1" e o grupo "CLP 2", sendo que este último apresentou parâmetros cardíacos mais prejudicados em relação ao grupo Sham e ao grupo "CLP 1". Os dados de FC, débito cardíaco, volume de sístole, fração de ejeção e fração de encurtamento indicaram a presença de disfunção ventricular esquerda nos ratos em sepse,

diferenciando entre os dois grupos apenas a severidade do prejuízo cardíaco, maior no grupo “CLP 2”. Além disso, os parâmetros de espessura do septo interventricular, da cavidade ventricular esquerda e da parede posterior do ventrículo esquerdo (VE) foram indicativos de alteração morfológica do VE induzido pela sepse. Contudo, observou-se que o grupo “CLP 2” apresentou aumento das frações de ejeção e de encurtamento, sugerindo a alteração da função diastólica, determinando o quadro de insuficiência cardíaca com fração de ejeção normal (ICFEN), que é caracterizada pela fração de ejeção $\geq 50\%$. A presença de ICFEN pode estar associada com as disfunções sistólicas de alteração do débito cardíaco, volume de sístole e contratilidade do VE (Roscani; Matsubara, Matsubara, 2010), que foram observadas nos ratos CLP. Sand e colaboradores (2015) utilizando o modelo de sepse induzida por CLP ou endotoxemia induzida pela administração de LPS em camundongos, observaram que os animais do grupo CLP apresentaram aumento da fração de ejeção após 24h em relação ao Sham, e que os animais submetidos ao LPS tiveram a redução da fração de ejeção 6h e 24h após a endotoxemia em relação ao Sham. Isto nos permite sugerir que dependendo do estímulo inflamatório/infeccioso o desenvolvimento da disfunção cardíaca induzida pela sepse apresenta alterações características de cada modelo experimental.

Alterações na matriz extracelular com o aumento do depósito de produtos finais de glicação avançada, bem como alteração do perfil do colágeno, apoptose, rigidez e hipertrofia do cardiomiócito foram demonstradas no remodelamento concêntrico, mesmo na ausência da hipertrofia do VE na ICFEN (Borbély et al, 2009; Roscani; Matsubara, Matsubara, 2010; Mesquita et al, 2014). Além disso, a anormalidade do relaxamento e o aumento da rigidez ventricular levam ao aumento das pressões de enchimento do VE, que são marcadores da presença de disfunção diastólica. Alterações na rigidez arterial e na função endotelial estão presentes nos pacientes portadores de ICFEN, contribuindo para o agravamento da disfunção diastólica, com aumento da pós-carga e acarretando ou intensificando a isquemia miocárdica (Borbély et al, 2009; Roscani; Matsubara, Matsubara, 2010; Mesquita et al, 2014). Desta forma, as alterações observadas no sistema vascular, como menor resposta contrátil à PE e modulação negativa induzida pelo CNP mais pronunciada em ratos CLP, podem estar relacionadas às alterações cardíacas observadas nos ratos CLP.

A função cardíaca avaliada em pacientes com sepse severa ou choque séptico em UTI, em geral, mostra a redução dos parâmetros funcionais como fração de ejeção e de encurtamento, sugerindo a presença de disfunção sistólica do VE nestes pacientes (Fried et al, 2006; Vieillard-Baron et al, 2008; Guarracino; Baldassarri, Pinsky, 2013; Antonucci et al, 2014). Entretanto, De Schryver e colaboradores (2015) relataram o caso de uma paciente com espessamento do VE decorrente de microangiopatia trombótica induzida pela sepse, levando ao edema intersticial. Além disso, Antonucci e colaboradores (2014) apresentam uma revisão de cardiomiopatia associada à sepse/choque séptico, evidenciando o aparecimento de disfunção miocárdica sistólica e também diastólica, comprometendo o funcionamento cardíaco. Em modelos de sepse experimental, frequentemente observa-se disfunção sistólica, associada à hipertrofia do VE (Feng et al., 2011; Gonçalves et al., 2014; Sand et al., 2015). Tais diferenças poderiam ser explicadas pelo menor tempo de exposição ao insulto séptico (4 horas) no presente estudo, em comparação aos estudos com maior tempo de exposição (6h, 24h ou dias), além das diferenças evidenciadas por Sand e colaboradores (2015) referentes ao tipo de estímulo inflamatório/infeccioso, ou seja, estimulação via LPS ou por cirurgia CLP.

Fernandes e colaboradores (2009) mostraram que ratas submetidas à sepse por CLP apresentaram menor resposta à PE 12h após o procedimento, sendo que esta resposta pressórica tornava-se menor ao longo do tempo. Este fato também foi observado por Liaw e colaboradores (2005), após administração endovenosa de noradrenalina em ratos submetidos ao CLP. Annane e colaboradores (1998) mostraram que pacientes em choque séptico comparados aos indivíduos saudáveis (controles) não apresentaram diferença de amplitude da resposta pressórica induzida pela noradrenalina (NA). Entretanto, nas doses iniciais de NA, observou-se um deslocamento para a direita da curva dose-resposta para a NA, sugerindo um prejuízo na sinalização desencadeada por esta catecolamina nos indivíduos em choque séptico. Além disso, os autores destacaram que dentro do grupo de pacientes em choque séptico, uma parte desenvolveu prejuízo da função adrenal, apresentando menores concentrações plasmáticas de cortisol após a estimulação com corticotropina. No grupo com redução da função adrenal, o efeito pressórico da NA foi reduzido, comparado ao grupo com a função adrenal adequada. Após a administração de hidrocortisona, em ambos os grupos de pacientes em choque

séptico, a resposta pressórica induzida pela NA não foi mais reduzida no grupo com insuficiência adrenal. No presente estudo, a amplitude do efeito pressórico induzido pelo agonista seletivo α_1 -adrenérgico fenilefrina (PE), em baixas doses (0,1 ou 0,3 nmol/Kg), não foi diferente entre os grupos Sham e CLP. Entretanto, a duração deste efeito induzido pela PE, em todas as doses administradas, foi significativamente menor no grupo CLP, evidenciando o prejuízo da sinalização α_1 -adrenérgica cardiovascular sistêmica na sepse.

Sharshar e colaboradores (2003) mostraram a disfunção de núcleos autonômicos cardiovasculares, como núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo, amígdala, *locus coeruleus*, e núcleos autonômicos medulares como núcleo do trato solitário, ambíguo e núcleo parabraquial; em pacientes que morreram devido ao choque séptico. Além disso, avaliando cinco áreas cerebrais passíveis de isquemia, como *Cornus Ammonis* (CA), córtex juncional frontal, núcleo lenticular, giro denteado e corpos olivares, os autores observaram a presença de isquemia nessas regiões cerebrais em todos os pacientes que morreram em decorrência da sepse. Assim, foi possível sugerir a associação entre o choque séptico e isquemia e necrose neuronal e de células da glia. Portanto, a disfunção cardiovascular presente na sepse severa e no choque séptico constitui alterações conjuntas nos centros autonômicos, bem como no sistema vascular e cardíaco.

Estudos apontam que animais ou pacientes em quadro de sepse severa, choque séptico ou endotoxemia induzidos por exposição ao LPS, apresentam concentrações plasmáticas elevadas de ANP e BNP assim como de seus metabólitos amino-terminais NT-proANP e NT-proBNP, quando comparados a indivíduos normais. Hama et al. (1994) detectaram concentração plasmática de CNP aumentada em pacientes em choque séptico quando comparados a indivíduos saudáveis. Neste contexto, tem sido investigado o papel do CNP como promissor biomarcador para sepse em pacientes que sofreram traumas múltiplos sem dano cerebral (Suttner; Boldt, 2010). Além disso, vários autores demonstraram que além da menor resposta contrátil a diferentes agonistas, existe um prejuízo de respostas vasodilatadoras em modelos de sepse (Auclair et al., 1983; Vromen et al., 1996; Tymi et al., 1998; Tsao et al., 2010). Entretanto, poucos são os trabalhos que demonstram o efeito cardiovascular *in vivo* do CNP (Igaki et al., 1998; Nir et al., 2001; Langenickel et al., 2006; Obata et al., 2007; Del Ry et al., 2008; Springer et al.,

2012; Del Ry, 2013; Moltzau et al., 2014), sobretudo em animais submetidos à sepse.

CNP produziu efeito hipotensor semelhante entre os grupos de ratos Sham e CLP do presente estudo. Contudo, o efeito induzido pelo CNP sobre a FC foi maior nos ratos em sepse comparados aos ratos Sham. Wu e colaboradores (2001) mostraram que a fosforilação da fosfolamban (PLB) é maior na fase aguda da sepse em corações isolados e perfundidos de ratos CLP comparados aos ratos Sham, sugerindo a maior atividade de captação de cálcio pela Ca^{2+} -ATPase do retículo sarcoplasmático (SERCA) durante a fase aguda, levando ao aumento da contratilidade máxima. Contudo, na fase tardia da sepse, os autores observaram a redução da fosforilação da PLB, com a diminuição da contratilidade máxima, da pressão desenvolvida pelo VE e do transiente de cálcio, sugerindo o prejuízo da atividade da SERCA nesta fase. Del-Ry e colaboradores (2008) apresentaram uma correlação entre a concentração plasmática de CNP e a contratilidade máxima cardíaca em pacientes com insuficiência cardíaca, sendo: quanto maior a concentração plasmática de CNP, menor a contratilidade máxima cardíaca, e vice-versa. Além disso, Koesters, Engisch e Rich (2014) mostraram que em músculo papilar cardíaco isolado de ratos em sepse pelo modelo CLP, a excitabilidade cardíaca está reduzida devido à redução da corrente de sódio.

No presente estudo, os valores de FC em CLP 4h após a cirurgia, observados por derivação da PAP (medida direta pela canulação da artéria femoral), foram maiores que no momento anterior à cirurgia (tempo 0h; dados não apresentados). Contudo, a análise da FC no estudo por ecocardiografia evidenciou a presença de dois grupos distintos de ratos CLP. Tal discrepância pode ser devida à necessidade de anestesia dos animais para o desenvolvimento do exame (Jong et al., 2002). Além disso, devido o grupo “CLP 2” ter apresentado parâmetros funcionais cardíacos mais prejudicados que o grupo “CLP 1” isto poderia ser um indicativo de que este grupo resultou em alterações moleculares que contribuíram para a menor resposta de mobilização cardíaca de cálcio, seja pelo prejuízo da função de captação do cálcio intracelular ou extrusão deste íon pela membrana dos cardiomiócitos, ou ainda menor fosforilação de proteínas intracelulares importantes para o mecanismo de contração cardíaca. De fato, as medidas da concentração

citosólica de cálcio basal e do potencial de membrana basal no VE de ratos CLP foram menores que as observadas em ratos Sham.

De acordo com Hirose et al. (1998), o CNP mas não ANP ou BNP, induziu efeito inotrópico e cronotrópico positivos em preparações de átrio direito e de ventrículo esquerdo de cães. Além disso, o efeito inotrópico positivo foi maior que o efeito cronotrópico positivo, induzidos pelo CNP. Tais efeitos foram mediados pelo receptor NPR-B. De maneira semelhante, Pierkers et al. (2002) mostraram que o CNP produziu efeito bifásico no coração de camundongos *Wild Type* (WT) ou *knockout* para receptor NPR-A/GC-A (GC-A/KO): CNP induziu o aumento imediato dos efeitos inotrópicos positivo e lusitrópicos. Posteriormente, apresentou efeito inotrópico negativo lento e em GC-A/KO o aumento do efeito inotrópico positivo induzido pelo CNP foi mais evidente do que em camundongos WT. Moltzau e colaboradores (2014) observaram que o CNP foi capaz de induzir resposta lusitrópica e efeito inotrópico negativo em VE isolado de corações de ratos com insuficiência cardíaca. Estes efeitos foram acompanhados do aumento da produção de GMPc, bem como das fosforilações de PLB e Troponina I (Tpi), com aumento da amplitude do transiente de cálcio, captação de cálcio pelo retículo sarcoplasmático e extrusão de cálcio pela ativação de canais para cálcio voltagem dependente tipo L. No presente estudo, a mobilização de cálcio induzida pelo CNP foi maior no VE de ratos CLP comparados ao CO. Entretanto, o perfil fosforilativo de proteínas contráteis cardíacas não foi avaliado. Além disso, a análise da expressão protéica de receptores NPR-B e NPR-C no VE não foi diferente entre ratos CO e CLP, sugerindo que o maior efeito de mobilização de cálcio induzido pelo CNP no VE de ratos CLP deve-se, provavelmente, a alterações na via de sinalização intracelular desencadeada pelo CNP na sepse.

Obata e colaboradores (2007) mostraram que ratos com miocardite, tratados por 14 dias com CNP, apresentaram melhora das funções cardíacas, como aumento da contratilidade máxima e do relaxamento diastólico do coração, redução da pressão diastólica final do VE e aumento da fração de encurtamento, além de efeitos antiinflamatórios e angiogênicos, com regeneração endotelial via GMPc, mas com mínimos efeitos sobre a pressão arterial média. Canaan-Kühl et al. (1998) após tratamento por 7 dias com CNP, não observaram efeito hipotensor induzido pelo peptídeo sobre a pressão arterial sistólica de ratos. Por outro lado, Igaki e

colaboradores (1998), administrando CNP em indivíduos saudáveis, mostraram seu efeito hipotensor, com redução das pressões sistólica e diastólica, acompanhado de aumento da FC, bem como de efeito diurético, natriurético e de supressão da secreção de aldosterona. Moyes e colaboradores (2014) mostraram que camundongos machos *knockout* especificamente para CNP endotelial não apresentaram alteração de PAM. Entretanto, as fêmeas *knockout* para CNP endotelial apresentaram perfil hipertensivo, evidenciando a participação do CNP endógeno no sistema cardiovascular. Além disso, a administração de CNP induziu efeito hipotensor em camundongos machos WT, que foi reduzido em camundongos machos *knockout* para receptor NPR-C (NPR-C/KO), sugerindo a regulação da pressão arterial pelo CNP exógeno. Neste contexto, Hinder e colaboradores (1997) e Stubbe et al. (2004) já haviam demonstrado que no modelo de sepse induzido em ovelhas, por administração de *Pseudomonas aeruginosa*, o tratamento com antagonista de receptores NPR-A/B, durante 8h após a indução da sepse, impediu o maior decaimento da pressão arterial sistêmica em decorrência da sepse. Contudo, o tratamento com o antagonista de receptores NPR-A/B não reverteu o quadro de hipotensão característico da sepse. No presente estudo, o efeito hipotensor induzido pelo CNP foi semelhante entre os grupos Sham e CLP. Tais estudos, em conjunto com os nossos dados, evidenciam o efeito hipotensor/modulador da pressão arterial sistêmica induzida pelo CNP.

Paralelamente aos estudos *in vivo* de resposta pressórica ao agonista α_1 -adrenérgico PE, foram conduzidos estudos de reatividade vascular em aorta torácica e artéria mesentérica de resistência de ratos Sham e CLP. Embora a artéria aorta seja um vaso de grande calibre, que não contribui efetivamente para a regulação tônica da pressão arterial, já que são as artérias mesentéricas de resistência as principais responsáveis pela regulação da pressão arterial sistêmica, a artéria aorta trata-se de um vaso de condutância cujo relaxamento endotélio dependente é predominantemente dado pelo NO. Uma vez que na sepse existe uma produção excessiva de NO (Vromen et al., 1996; Panayiotou et al. 2010), procuramos avaliar qual seria a contribuição deste mediador na contração induzida pela PE, além da investigação da possível participação do CNP como um agente modulador negativo da contração α_1 -adrenérgica, via NO (Costa et al., 2007). Desta forma, de maneira semelhante ao encontrado por Wang et al. (2004), os anéis de aorta isolados de

ratos CLP apresentaram menor resposta contrátil à PE, tanto em presença quanto em ausência de endotélio, comparados ao Sham. Este efeito pareceu não ser decorrente de alteração da expressão protéica de receptores α_1 -adrenérgicos no MLV da aorta de ratos, sugerindo a alteração na via de sinalização intracelular do receptor α_1 -adrenérgico induzido pelo choque séptico. Por outro lado, nas aortas sem endotélio dos ratos Sham a resposta contrátil à PE foi potencializada, evidenciando um mecanismo endógeno de modulação da contração α_1 -adrenérgica induzido pelo endotélio vascular. Quando a contração da PE foi avaliada em artéria mesentérica de resistência, observou-se a redução da resposta contrátil da PE nos vasos de ratos CLP, sugerindo o prejuízo da sinalização vascular α_1 -adrenérgica nos vasos controladores da pressão arterial. Desta forma, o presente modelo apresentou disfunções no sistema vascular, em artérias de condutância e de resistência, bem como disfunção cardíaca, todos estes eventos sendo decorrentes do choque séptico.

Vromen et al. (1996) e Wang et al. (2004) mostraram a menor resposta contrátil induzida pela NA, bem como menor resposta contrátil induzida por solução de alta concentração extracelular de K^+ em aorta de ratos CLP (Wang et al., 2004). Silva-Santos, Terluk e Assreuy (2002) observaram que aortas expostas ao LPS por 12h, em banho de órgão isolado, apresentaram menor resposta contrátil induzida pela PE. Panayiotou e colaboradores (2010) mostraram que camundongos expostos à exdotoxemia apresentam menor resposta contrátil ao análogo do TXA_2 , U46619, comparados ao controle. Sand e colaboradores (2015) observaram o menor fluxo sanguíneo subcutâneo na orelha e no primeiro, segundo e terceiro ramos do leito mesentérico de ratos CLP ou expostos ao LPS, 6h e 24h após o insulto séptico. Em geral, tais efeitos de menor resposta contrátil a diferentes agonistas tem sido relacionados com a maior produção de NO a partir de iNOS (Vromen et al., 1996; Silva-Santos; Terluk, Assreuy, 2002; Wang et al., 2004; Panayiotou et al., 2010; Tsao et al., 2010; Sand et al., 2015) e ativação diferenciada de canais para potássio (Silva-Santos; Terluk, Assreuy, 2002; Wang et al., 2004), bem como estresse oxidativo (Tsao et al., 2010; Chen et al., 2014), aumento da produção de mediadores inflamatórios (Panayiotou et al., 2010; Chen et al., 2014) e infiltração de células inflamatórias (Obata et al., 2007). Neste contexto, nossos resultados mostraram o aumento plasmático de metabólitos de NO (nitrito, nitrato, S-nitrosotióis), aumento

da produção endógena do NO em células endoteliais isoladas de aorta, aumento da expressão protéica de eNOS e iNOS, além de presença de estresse oxidativo (H_2O_2 e maior expressão protéica de Nox1) nas aortas isoladas de ratos CLP, corroborando com os dados da literatura.

A contribuição dos canais para potássio para a menor resposta a agonistas adrenérgicos é relatada na sepse (Pickkers et al., 2006; Sordi; Fernandes, Assreuy, 2010). Neste contexto, Sordi, Fernandes e Assreuy (2010) mostraram que na fase inicial da sepse experimental, a menor resposta contrátil induzida pela PE é revertida pelo tratamento com bloqueador seletivo de canais para potássio de baixa condutância ativados pelo cálcio (SK_{Ca}), enquanto que na sepse tardia os canais para potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) parecem ser de maior importância. Embora a ativação de canais para potássio pareça estar aumentada na sepse, contribuindo para a menor resposta contrátil a agonistas adrenérgicos, nossos resultados mostraram que, semelhante aos achados de Wang e colaboradores (2004), a contração induzida por solução de alta concentração extracelular de K^+ estava reduzida em aorta e artéria mesentérica de resistência de ratos CLP comparados aos ratos Sham, bem como a alteração do potencial de membrana induzido pela solução de KCl na aorta de ratos CLP mostrou-se prejudicada em comparação aquela de ratos CO, e também o potencial de membrana basal no VE de ratos CLP foi menor que em ratos Sham. Esses achados nos permitem sugerir uma redução da atividade de canais para potássio no sistema cardiovascular de ratos CLP.

Diversos autores apontam o CNP como um peptídeo vasodilatador de diferentes leitos arteriais e venosos. Neste contexto, Andrade e colaboradores (2014) mostraram que o CNP induz relaxamento de aorta de ratos de maneira dependente do endotélio, levando ao aumento do cálcio endotelial e produção de NO endógeno, provavelmente, via receptores NPR-C. Além disso, Moyes et al. (2014) identificaram que o relaxamento induzido pelo CNP em artéria de resistência isolada de humanos era abolido na presença de antagonista de NPR-C. Além disso, Hobbs e colaboradores (2004) mostraram que o CNP reduzia a pressão de perfusão coronariana via receptores NPR-C. A produção de NO (Costa et al., 2007; Rautureau et al., 2010), presença de receptor NPR-B e a formação de GMPc independente de GCs tem sido confirmada em extrato de aorta de ratos (Costa et al., 2007) e células endoteliais em cultura (Rautureau et al., 2010). Villar e

colaboradores (2007) mostraram que o relaxamento induzido pelo CNP envolve a participação de canais para potássio em artéria mesentérica de ratos.

Auclair e colaboradores (1983) já haviam descrito que o efeito hipotensor induzido pela isoprenalina era menor em ratos expostos à endotoxina de *Escherichia coli*. Tyml, Yu e McCormack (1998) observaram que arteríolas de ratos CLP apresentavam menor relaxamento para acetilcolina, nitroprussiato de sódio (NPS) e para o análogo de adenosina (NECA). Panayiotou e colaboradores (2010) evidenciaram o menor efeito vasodilatador dependente do endotélio, bem como estimulado pelo ANP, em aorta de camundongos expostos ao LPS. No presente trabalho verificamos menor relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos CLP comparado ao Sham. Este efeito foi independente do endotélio vascular, uma vez que não houve alteração de potência ou efeito máximo do agonista.

Osterbur, Yu e DeClue (2013), avaliando a secreção de NT-proCNP no meio de cultura de células endoteliais de aorta canina, observaram que IL-1 β , TNF- α e LPS foram capazes de aumentar a produção e secreção do peptídeo N-terminal. Além disso, células endoteliais expostas a citocinas e fatores de crescimento, como IL-1 α e TGF- β também apresentam secreção aumentada de CNP (Suga et al., 1993). Rahmutula e Gardner (2005) identificaram que o CNP promove a redução da atividade, expressão protéica, expressão de RNAm e expressão do gene NPR2 do receptor NPR-B, via GMPc em cultura de células de aorta de ratos neonatos. De maneira semelhante, Kishimoto e colaboradores (1993) haviam demonstrado que após a estimulação de células do MLV com ANP, BNP ou CNP, ocorria a diminuição da expressão de RNAm e protéica do receptor NPR-C, sendo este efeito mimetizado pelo análogo permeável à membrana e não-hidrolizável do GMPc (8-bromoguanosina-3',5'-monofosfato cíclico), sugerindo que a sub-regulação dos receptores NPR-C poderia ocorrer após ativação de receptores NPR-B. Embora os dados de expressão protéica avaliados por *Western blotting* não tenham demonstrado qualquer alteração nos receptores NPR-B e NPR-C, a expressão protéica de CNP endógeno foi reduzida no endotélio e aumentada no músculo liso vascular (MLV) de aorta de ratos CLP, sugerindo um possível fluxo de CNP do endotélio para o MLV nesses ratos, já que nos ratos CO, a presença de CNP endotelial foi maior que de CNP no músculo liso vascular. Além disso, os dados de

expressão protéica e localização de receptores NPR-C no músculo liso vascular da aorta foram menores em ratos CLP.

De acordo com os achados da literatura nos quais a secreção do CNP das células endoteliais é estimulada por fatores inflamatórios e que no plasma de indivíduos em choque séptico há maior concentração de CNP, podemos sugerir que o choque séptico levou à maior secreção de CNP vascular. Associado a este fato, observou-se que o relaxamento induzido pelo CNP (exógeno) foi menor nas aortas de ratos CLP, o que nos leva a sugerir a possível dessensibilização dos receptores NPR-B e/ou NPR-C envolvidos na vasodilatação induzida pelo CNP, no choque séptico. Contudo, não podemos descartar a hipótese de que a atividade dos receptores NPR-B e/ou NPR-C poderiam continuar normais, mas apenas as vias de sinalização intracelular relacionadas com a vasodilatação, como a mobilização de cálcio intracelular e a ativação de canais para potássio na membrana plasmática do MLV, poderiam estar comprometidas. De fato, a avaliação da alteração do potencial de membrana do MLV de aorta de ratos CLP induzida por solução de KCl mostrou-se prejudicada em relação aos ratos CO, assim como a mobilização de cálcio induzida pelo CNP foi menor no MLV de aorta de ratos CLP.

Puggina e Sellitti (2004) identificaram que a estimulação da produção de AMPc via Forscolina (ativador de enzima Adenilil ciclase) ou pelo análogo estável do AMPc (dibutilil-cAMP) aumentava a expressão de RNAm do receptor NPR-C, via PKA e também do receptor NPR-B por uma via independente de PKA, em células do músculo liso vascular de aorta humana. Por sua vez, Li, Madiraju e Anand-Srivastava (2012) demonstraram que a sub-regulação de receptores NPR-A (GC-A), utilizando *antissense* para NPR-A, promoveu o aumento da expressão de NPR-C, que envolveu o aumento da fosforilação de Erk1/2. Além disso, a inibição de Adenilil ciclase mediada por NPR-C e a expressão protéica de $G_{i\alpha}$ foram aumentadas pelo tratamento com o *antissense* para NPR-A, sugerindo a interação entre os receptores NPR-A e NPR-C, mediada pela via de MAP quinases. Alli e Gower Jr (2010) observaram a presença de um resíduo de treonina e vários resíduos de serina que podem ser fosforilados no domínio intracelular do receptor NPR-C, sendo identificados cinco sítios passíveis de fosforilação pela PKA em resíduo de serina e um de treonina, Thr⁵⁰⁵. Além disso, Arejian, Li e Anand-Srivastava (2009) observaram que a exposição da cultura de células de MLV A10 ao NO promovia a

redução da expressão protéica de NPR-C e diminuição da atividade de Adenilil ciclase por uma via intracelular independente do NO e PKG, mas dependente de MAP quinases. Considerando o aumento da produção de NO induzido pelo choque séptico, é provável que a expressão protéica dos receptores NPR-C no MLV tenha diminuído devido essa sub-regulação descrita por Arejian, Li e Anand-Srivastava (2009). A alteração da atividade do receptor NPR-C pode ter contribuído para o menor relaxamento induzido pelo CNP em aorta de ratos CLP.

Steinmetz e colaboradores (2004) demonstraram que camundongos GC-A/KO global e GC-A/KO seletivamente para células do músculo liso vascular possuem menor resposta vasodilatadora para o CNP em artéria renal de resistência comparada aos camundongos WT. Por outro lado, Langenickel et al. (2006) relataram que cardiomiócitos de camundongos *knockout* para receptor NPR-B (NPR-B/KO) produzem menos GMPc em resposta ao CNP que de camundongos WT. Além disso, de acordo com Chun e colaboradores (2000), a produção de CNP é estimulada pelo estresse oxidativo, sobretudo pelo H₂O₂, em cultura de células endoteliais de aorta bovina. De fato, nossos resultados mostraram a presença de estresse oxidativo, bem como de H₂O₂ no músculo liso vascular de aorta de ratos CLP. Os dados funcionais mostraram que o H₂O₂ não contribuiu significativamente para a contração da PE em aorta de ratos CO, mas o H₂O₂ inibiu a contração da PE na aorta de ratos CLP, uma vez que a presença do agente de degradação de H₂O₂ intracelular (PEG-Catalase) potencializou a resposta contrátil α_1 -adrenérgica. Neste contexto, a menor resposta vasodilatadora induzida pelo CNP poderia ser devido à sua maior liberação para o músculo liso vascular, decorrente do estímulo inflamatório presente no modelo, bem como do estresse oxidativo, que levaria à dessensibilização dos receptores e/ou de vias de sinalização celular para o CNP, culminando com a menor resposta relaxante do peptídeo na aorta de ratos CLP.

A ativação do domínio citoplasmático do receptor NPR-C leva à inibição da atividade de Adenilil-ciclase via proteína G sensível à toxina *Pertussis* (Anand-Srivastava, Sehl e Lowe, 1996). Pouco tempo mais tarde, Murthy e Makhoulouf (1999) descreveram que associada à atividade inibitória da Adenilil-ciclase, os peptídeos natriuréticos poderiam ativar o receptor NPR-C desencadeando uma sequência de eventos celulares que culminaria com a mobilização citosólica de cálcio, via ativação de enzima fosfolipase C- β_3 , aumentando a contração de músculo liso não-vascular.

Neste contexto, diversos autores demonstraram a participação de vias ativadas pelo receptor NPR-C que não incluem apenas a redução da formação de AMPc pela inibição de Adenilil-ciclase, mas também a formação de IP₃ e DAG, mobilização de cálcio, ativação de canais para K⁺ retificadores de entrada (K_{ir}), ativação da NOS ou ainda ativação de PKC, como apresentado na revisão de Anand-Srivastava (2005). Considerando estes possíveis efeitos induzido pelos peptídeos natriuréticos, avaliamos a participação do CNP como um agente modulador da contração α_1 -adrenérgica. Devido aos relatos da literatura de aumento do cálcio citosólico induzido pelo CNP, propusemos que este peptídeo poderia aumentar a concentração citosólica de cálcio nas células endoteliais levando à produção de mediadores vasodilatadores e produção de fatores contráteis, como endotelina 1 e prostanóides, que poderiam contribuir para a melhora da menor resposta contrátil à PE nas aortas de ratos CLP. Contudo, nossos resultados mostraram que o CNP apresentou efeito contrário àquele esperado: apresentou-se como modulador negativo da contração α_1 -adrenérgica em aorta de ratos. Este efeito mostrou que as vias de sinalização celular desencadeadas pelo CNP apresentam maior importância para os fatores que culminam com respostas relaxantes do peptídeo, ou seja, além da formação de GMPc intracelular por ativação de receptor NPR-B, a possível formação de NO e demais mediadores endoteliais vasodilatadores relacionados com a mobilização de cálcio na célula endotelial, bem como com a ativação de canais para K⁺ levando à hiperpolarização de membrana das células do músculo liso vascular adjacente, extrusão e captação do cálcio citosólico e alteração fosforilativa de proteínas relacionadas à contração vascular.

O CNP apresentou-se como modulador negativo da contração da PE em aorta de ratos em presença ou ausência de endotélio vascular, sugerindo a ativação de receptores musculares que contribuem para o relaxamento induzido pelo peptídeo, podendo ser receptores NPR-B e/ou NPR-C. Além disso, o efeito anti-contrátil induzido pelo CNP foi mais evidente em aortas com endotélio, isoladas de ratos CLP quando comparado aquele em ratos Sham. Considerando que a resposta contrátil da PE já era menor em aortas de ratos CLP, este efeito poderia estar relacionado com a presença de maior concentração basal de mediadores vasodilatadores induzidos pelo choque séptico, como o NO e H₂O₂. Porém, o CNP não alterou a contração induzida pela PE em artéria mesentérica de resistência de

ambos os grupos Sham e CLP. Esta falta de efeito anti-contrátil do CNP na artéria mesentérica de resistência pode ser devida à concentração de CNP utilizada nos experimentos de reatividade vascular em vasos de pequeno calibre, uma vez que utilizamos a mesma concentração de CNP utilizada em aorta. Isto não exclui o CNP como um agente anti-contrátil neste vaso, já que outras concentrações de CNP não foram avaliadas.

Webber e colaboradores (1991) identificaram o Anantin como o primeiro antagonista competitivo de receptores NPR associados à formação de GMPc, ou seja, NPR-A e NPR-B, derivado de *Streptomyces coeruleus*. Desde então, este tem sido utilizado como antagonista de NPR-A/B nos estudos envolvendo peptídeos natriuréticos. Assim, temos que o efeito modulador negativo induzido pelo CNP sobre a contração da PE foi revertido em presença do antagonista de receptor NPR-B, Anantin, apenas em aortas com endotélio, isoladas de ratos Sham ou CLP, sugerindo a ativação de NPR-B induzida pelo CNP. De acordo com Madhani et al. (2003), o relaxamento induzido pelo CNP é inibido pelo antagonista seletivo de receptor NPR-B em aorta de camundongos WT. Rautureau e colaboradores (2010) mostraram que o CNP aumentou a produção de GMPc independente de GCs em células endoteliais em cultura, bem como aumentou a formação de NO. Simon et al. (2009) mostraram que o CNP promoveu a hiperpolarização de membrana das células endoteliais pela ativação de canais de cloreto via PKG. Contudo, nos resultados obtidos em aortas sem endotélio vascular, o efeito modulador negativo do CNP pareceu não ser mediado diretamente por receptor NPR-B em ratos Sham e permaneceu reduzido em ratos CLP, sugerindo que outra via de sinalização estaria relacionada com a modulação negativa induzida pelo CNP sobre o músculo liso vascular (MLV) na sepse. Neste contexto, Kun e colaboradores (2008) mostraram o relaxamento induzido pelo CNP dependente de hiperpolarização do MLV, pela ativação de IK_{Ca} , SK_{Ca} , K_{ir} e Na^+/K^+ -ATPase de membrana em artéria peniana de resistência de humanos. De fato, a expressão protéica de receptores NPR-B e NPR-C foi confirmada em aorta de ratos Sham e CLP.

A produção de CNP endógena pode ser estimulada por diversos fatores. De acordo com os achados de Hama e colaboradores (1994), a sepse constitui um desses fatores que aumentam a produção e liberação de CNP. Desta forma, procuramos avaliar o possível efeito do CNP endógeno sobre os receptores NPR-B

na contração induzida pela PE. Para tanto, foram utilizadas duas concentrações de Anantin: 0,1 $\mu\text{mol/L}$ e 1 $\mu\text{mol/L}$. Com a menor concentração do antagonista, apenas a contração máxima da PE foi aumentada em aortas E+ de ratos CLP, sugerindo que a ativação de receptores NPR-B endoteliais induzida pelo CNP endógeno parece ser uma das responsáveis pela menor resposta contrátil à PE nos ratos CLP. Contudo, a maior concentração do antagonista foi determinante para efeitos mais evidentes: ocorreu a potencialização da contração da PE em aortas com ou sem endotélio vascular, sendo maior essa potencialização em ausência do endotélio, em ambos os grupos Sham e CLP. Entretanto, nos ratos Sham, a contração máxima da PE não foi alterada em presença do antagonista na maior concentração. Esses resultados nos permitem sugerir a contribuição do CNP endotelial como um agente modulador do tônus vascular em ambos controle e CLP. Além disso, mesmo na ausência de endotélio, a sensibilidade dos receptores NPR-B musculares pareceu suficiente para continuar exercendo o efeito modulador endógeno do tônus vascular em ambos os grupos Sham e CLP. Este fato não pode ser associado com a diferente expressão de receptores NPR-B no MLV de aorta entre ratos Sham e CLP, uma vez que tal quantificação mostrou-se semelhante entre os grupos. Contudo, a presença de CNP no MLV de ratos em sepse foi maior que em MLV de ratos Sham, embora isso não tenha determinado respostas mais evidentes de potencialização da contração induzida pela PE em aortas de ratos CLP. Em relação à contração máxima da PE, não houve alteração nas aortas isoladas de ratos Sham, mas que apenas em aortas sem endotélio, o Anantin na maior concentração, reduziu a contração máxima da PE em aortas de ratos CLP. Este resultado pode indicar uma via de sinalização celular que contribui para a contração induzida pela PE como uma maneira compensatória à sepse, uma vez que isso não ocorreu nas aortas de ratos Sham. Embora a potência da PE tenha sido aumentada na presença do antagonista na maior concentração em ambos os grupos de aortas Sham e CLP sem endotélio, sugerindo uma via que se opõe à contração vascular. Fica evidente que nos ratos CLP, o mecanismo modulador do tônus vascular apresenta duas vias distintas, pelo menos em relação ao efeito final, na qual existe aquela “original” de modulação negativa endógena exercida pelos receptores NPR-B musculares, suficientes para o controle normal do tônus vascular e uma “adaptativa” de modulação positiva da

contração vascular, como um mecanismo de proteção contra a menor resposta vascular, desencadeado pela sepse.

A potencialização da resposta contrátil induzida pela PE também foi observada em presença de agente de degradação de H_2O_2 intracelular, PEG-Catalase, em aortas sem endotélio, isoladas de ratos CLP o que não ocorreu em aorta de ratos Sham. Considerando a maior medida de H_2O_2 no MLV de aorta de ratos CLP, bem como a potencialização da contração induzida pela PE pelo Anantin nas aortas sem endotélio, de ratos CLP e a potencialização da resposta da PE pela PEG-Catalase em aortas sem endotélio de ratos CLP, sugerimos que estas vias de sinalização poderiam estar relacionadas ao choque séptico. Pfeffer, Huecksteadt e Hoidal (1994) demonstraram que algumas citocinas inflamatórias aumentam a atividade de xantina oxidase. Silva et al. (2013) mostraram que xantina oxidase pode levar à produção de H_2O_2 em aorta de ratos em determinadas condições. Além disso, Sakuma e colaboradores (2015) observaram que os efeitos induzidos pela xantina oxidase eram decorrentes da produção de H_2O_2 em linhagem celular de câncer colo-retal. Neste contexto, Tai e Hwang (2011) descreveram que a adenosina poderia servir como substrato para xantina oxidase em determinadas condições, levando à ativação da enzima de uma maneira menos eficiente que a xantina. Considerando que a ativação de receptores NPR-B leva à produção de GMPc intracelular e que a ativação de receptores NPR-B e a formação de H_2O_2 parecem pertencer a vias de sinalização conjuntas, resolvemos investigar a possível contribuição da enzima xantina oxidase na modulação da resposta contrátil induzida pela PE.

Da mesma forma que obtivemos com o Anantin na maior concentração, observamos que o inibidor de xantina oxidase, Alopurinol, potencializou a contração induzida pela PE tanto em presença quanto em ausência do endotélio vascular, sendo neste último grupo a potencialização mais evidente, em ratos Sham e CLP. Além disso, a presença de Alopurinol promoveu aumento da contração máxima da PE em aortas com endotélio, de ratos Sham e CLP, mas não em aortas sem endotélio, sugerindo a participação de produtos derivados da atividade de xantina oxidase endotelial que se opõem à contração da PE. Contudo, em aortas sem endotélio de ratos CLP, ocorreu redução da contração máxima da PE, semelhante

àquela observada em presença de Anantin na maior concentração, sugerindo, novamente, a relação entre essas vias e também a contribuição de fatores contráteis derivados da atividade de xantina oxidase muscular, desempenhando papel protetor contra a menor resposta contrátil α_1 -adrenérgica em decorrência do choque séptico.

Em relação ao fator contrátil produzido no MLV de aorta de ratos CLP citado acima, foi possível observar que o sequestrador de O_2^- , Tiron, reduziu a contração máxima da PE nas aortas sem endotélio, de ratos CLP. Em conjunto com os resultados apresentados anteriormente, podemos sugerir que o aumento da sensibilidade dos receptores NPR-B musculares, seja pelo aumento de CNP endógeno ou por atividade intrínseca do receptor, leva à formação de seu produto intracelular, provavelmente o GMPc. Este poderia servir como substrato para a enzima xantina oxidase a qual levaria à produção de H_2O_2 e O_2^- simultaneamente, sendo que a produção de H_2O_2 seria responsável pelo efeito modulador negativo sobre a resposta da PE, enquanto que a produção de O_2^- seria responsável pelo efeito modulador positivo, aumentando a contração máxima da PE em aortas de ratos CLP. Isso tudo, sendo decorrente do processo de choque séptico, determinando tais modificações de atividade de receptores e sistemas enzimáticos.

Em relação à produção de O_2^- em aortas de ratos Sham, observamos que embora a presença de PEG-Catalase não tenha alterado a potência ou o efeito máximo da PE, a presença de Tiron foi suficiente para reduzir a potência da PE, indicando a contribuição de O_2^- na contração α_1 -adrenérgica, mas aumentou a contração máxima da PE no MLV de ratos Sham, semelhante ao tratamento com Alopurinol em presença de endotélio. É provável que a produção de O_2^- no MLV de aorta de ratos Sham seja suficientemente dismutada pela ação da enzima SOD muscular, levando à formação de H_2O_2 , que por sua vez, contribuiria como um modulador negativo da contração da PE. Além disso, quando observadas as alterações presentes nas aortas E+ de ratos CLP, foi possível identificar que a produção de O_2^- endotelial na sepse estaria relacionada com a modulação negativa da contração da PE, provavelmente devido à dismutação desta EROs por enzimas SOD, porém agora endoteliais e não do MLV como nos ratos Sham.

Em relação à modulação negativa induzida pelo CNP sobre a contração da PE, a produção de EROs pareceu contribuir para este efeito. Assim, quando em presença de CNP e Tiron ocorreu reversão do efeito negativo induzido pelo CNP

sobre a contração da PE, tanto em presença quanto em ausência de endotélio em aorta de rato Sham, bem como em presença de endotélio em aorta de ratos CLP. Isso nos permitiu sugerir a produção de EROs dependente de O_2^- que contribui para a redução da contração da PE induzida pelo CNP. Além disso, os resultados apresentados em presença de CNP e PEG-Catalase mostraram perfil semelhante de resposta: reversão da modulação negativa do CNP em aortas E+ de ratos Sham e CLP. Portanto, parece que tal efeito modulador negativo induzido pelo CNP é decorrente da produção de H_2O_2 , a partir de O_2^- , provavelmente devido à dismutação exercida pela SOD, levando à redução da contração da PE em aorta E+ de ratos Sham e CLP. Associado a estes efeitos, a presença de CNP e Anantin também se mostrou suficiente para a reversão do efeito negativo induzido pelo CNP, sugerindo a participação dos receptores NPR-B nesta via. Contudo, a resposta negativa induzida pelo CNP sobre a contração da PE não foi revertida em aortas E- de ratos CLP, sugerindo que outra via diferente daquela de ativação NPR-B/ O_2^- e H_2O_2 , provavelmente via xantina oxidase, é responsável por este efeito.

Saha et al. (2008) mostraram que a ativação do receptor NPR-C leva à redução do estresse oxidativo em células do MLV de aorta de ratos geneticamente hipertensos (SHR). Este efeito é acompanhado de redução da expressão protéica de proteína $G_{i\alpha}$, Nox4 e $p47^{phox}$. Neste contexto, o tratamento com CNP de células endoteliais de veia umbilical humana (HUVEC) reduziu a produção de EROs induzida pelo LPS e a expressão protéica de diferentes moléculas de adesão (ICAM-1, VCAM-1, P-selectina e E-selectina), fosforilação de Erk1/2, p38 MAPK e subunidade p65 do fator de transcrição nuclear- κB (NF- κB), assim como sua ativação (Chen et al., 2014). Além disso, Marty e colaboradores (2006) mostraram que a subunidade α da proteína G_i é capaz de interagir com as subunidades $p67^{phox}$ e $p47^{phox}$ de NADPH oxidase, associada à diminuição de AMPc intracelular. A análise do conteúdo basal de EROs ou de H_2O_2 em células endoteliais de aorta de ratos não foi diferente entre os grupos Sham e CLP. Entretanto, após a estimulação com CNP, ocorreu a redução dos níveis de H_2O_2 nas células endoteliais isoladas de aorta de ambos os grupos Sham e CLP. Tais efeitos podem ser decorrentes da ativação do receptor NPR-C endotelial mediado pelo CNP, como aquele encontrado por Chen e colaboradores (2014) em HUVEC ou ainda via subunidade $G_{\alpha i}$ do receptor NPR-C (Marty et al., 2006).

Em homogenato de aorta, verificamos que o estímulo com PE ativou a NADPH oxidase e a dupla exposição CNP+PE foi suficiente para aumentar ainda mais este efeito em ambos os grupos Sham e CLP. Contudo, a amplitude de efeito sobre a atividade de NADPH oxidase mostrou-se menor em CLP comparado ao Sham. Considerando que PE e CNP podem levar à ativação de PKC por vias distintas, ou seja, receptor α_1 -adrenérgico e NPR-C respectivamente, e que esta proteína quinase é uma das responsáveis pela ativação de NADPH oxidase (Brandes; Weissmann, Schröder, 2014), bem como a interação entre subunidade $G_{\alpha i}$ e p67^{phox}/p47^{phox} de NADPH oxidase levando a alterações na atividade da proteína G_i , nossos resultados podem sugerir não só uma possível diminuição da atividade de PKC, mas também a redução da ativação dos eixos CNP/NPR-C/PKC e/ou CNP/NPR-C/NADPH oxidase na sepse. Jao e colaboradores (2001) demonstraram que a expressão protéica de PKC α associada à membrana era menor em ratos CLP em ambas as fases inicial e tardia da sepse, comparados aos ratos Sham. Além disso, Tsai et al. (2014) mostraram que na fase inicial da sepse induzida por CLP, ocorreu a diminuição da razão de translocação membrana/citosol de PKC ϵ em cardiomiócitos de ratos. Desta forma, é possível que a atividade da PKC esteja diminuída nos ratos CLP. Entretanto, a expressão protéica ou translocação de PKC não foram avaliadas no presente trabalho.

A participação da enzima xantina oxidase foi descrita na sepse (Galley; Davies, Webster, 1996; Devrim et al., 2008). A enzima xantina oxidase (ou xantina oxirredutase) pertence à família de metaloflavo proteínas, que se apresenta como homodímero responsável pelo catabolismo de purinas, transformando a hipoxantina em xantina e esta, posteriormente, em ácido úrico. Essa reação envolve a formação de duas moléculas de O_2^- e duas moléculas de H_2O_2 (Battelli; Bolognese, Polito, 2014). Luchtemberg e cols. (2008) observaram que pacientes não sobreviventes de sepse severa ou choque séptico apresentavam maior atividade de xantina oxidase plasmática comparada aos pacientes que sobreviveram. De fato, embora a expressão protéica de Nox1 tenha aumentado em aorta de ratos CLP, a medida basal da atividade de NADPH oxidase não se mostrou aumentada em extrato de aorta de ratos CLP, embora o estresse oxidativo tenha sido detectado. Isso nos fez pensar em outra possível fonte de EROs que poderia contribuir para o estresse oxidativo evidenciado nos ratos CLP. Os dados funcionais em aorta mostraram a

intensa participação de xantina oxidase tanto em ratos Sham como em ratos CLP. A presença do endotélio vascular pareceu contribuir como um modulador negativo da contração da PE, ou seja, fonte adicional de produtos formados pela xantina oxidase endotelial (Phan et al., 1989) foram contrários à contração α_1 -adrenérgica. Entretanto, no MLV de ratos CLP, a atividade de xantina oxidase pareceu ser a favor da contração da PE, uma vez que a inibição desta enzima nas aortas E- promoveu a redução do efeito contrátil α_1 -adrenérgico. Phan e colaboradores (1989) sugeriram a produção de EROs diferente de radical hidroxil (OH^\cdot), provavelmente sendo O_2^\cdot , decorrente da ativação de xantina oxidase. Silva e colaboradores (2013) mostraram que a NADPH oxidase e xantina oxidase podem ser fontes produtoras de H_2O_2 em determinadas condições. Pfeffer, Huecksteadt e Hoidal (1994) mostraram que após estimulação com TNF- α , interferon γ (INF γ), IL-1 ou IL-6 ocorreu o aumento da expressão de RNAm e da atividade de xantina oxidase em células epiteliais renais bovina. Brandes et al. (1999) determinaram que após exposição ao LPS, ocorreu maior expressão protéica de NADPH oxidase e de xantina oxidase na aorta de ratos, além de aumento da produção de O_2^\cdot e de H_2O_2 , nitração de proteína-tirosina e formação de ONOO $^\cdot$. Devrim et al. (2008) identificaram que, amostras de íleo de ratos submetidos à sepse não letal por cirurgia CLP, apresentaram maior atividade de xantina oxidase, mas não de atividade de SOD na fase tardia da sepse. Além disso, Trujillo e cols (1998) mostraram que em meio aeróbico, xantina oxidase em presença de purinas como xantina ou hipoxantina, pode decompor formas de baixo peso molecular de S-nitrosotióis como S-nitrosoglutationa ou S-nitrosocisteína, levando à liberação de NO. O NO reage rapidamente com O_2^\cdot formando ONOO $^\cdot$, principalmente em condições em que a concentração de S-nitrosotióis está aumentada. Os autores também observaram que esta reação foi dependente de O_2^\cdot , uma vez que a enzima Cobre-Zinco-SOD inibe a decomposição de S-nitrosotióis.

No presente estudo, a concentração plasmática de S-nitrosotióis está aumentada nas amostras de ratos CLP comparadas aos ratos Sham. Os S-nitrosotióis são formas de armazenamento e transporte de NO, tanto em condições fisiológicas como patológicas (Stamler et al., 1992). Uma vez detectada a presença de EROs no tecido vascular, além da maior produção de NO tecidual (células endoteliais) e aumento plasmático de S-nitrosotióis, pode-se sugerir que em presença de xantina oxidase vascular (Adachi et al., 1993; White et al., 1996),

haveria a maior decomposição de S-nitrosotióis e rápida formação de ONOO⁻, que contribuiria ainda mais para o dano oxidativo tecidual nos animais CLP.

Metaloproteinases da matriz (MMPs) são endopeptidases dependentes de zinco envolvidas em vários processos fisiológicos e patológicos (Cena et al., 2008). As MMPs são sintetizadas como zimógenos inativos e podem ser ativadas por remoção proteolítica do domínio pró-peptídeo, revelando seu sítio catalítico ou por oxidação da cisteína-sulfidrila no domínio pró-peptídeo pelo ONOO⁻ (Okamoto et al., 2001; Schulz, 2007; Cena et al., 2008). MMP-2 e MMP-9, também chamadas de gelatinases A e B respectivamente, estão envolvidas na fisiopatologia de várias doenças cardiovasculares (Chow et al., 2007; Mandal et al., 2003). A MMP-2 é constitutivamente ativa, enquanto que a MMP-9 é uma enzima induzida por citocinas e particularmente encontrada em neutrófilos e macrófagos. A inibição de MMPs parece ser benéfica na menor resposta vascular induzida por LPS ou IL-1 β (Lalu et al., 2006). Além disso, a MMP-2 está mais ativa em células HUVEC após tratamento com LPS (Kim; Koh, 2000). Estudos analisando amostras de sangue humano revelaram que os neutrófilos respondem à secreção de MMP-9 após estímulo com LPS (Pugin et al., 1999). Alguns autores sugerem que a MMP-9 pode ser um importante marcador para doenças inflamatórias, inclusive na sepse grave em humanos (Nakamura et al., 1998; Teng et al., 2012). Considerando que a expressão protéica das MMP-2 e MMP-9 não foram diferentes entre os grupos Sham e CLP, procurou-se avaliar a atividade gelatinolítica destas metaloproteinases. Verificamos o aumento da atividade da MMP-2 de 64 kDa. Essa forma pode ser ativada por citocinas, outras MMPs e ainda por estresse oxidativo, que pode levar à auto-clivagem do seu pró-peptídeo. Entretanto, as atividades gelatinolíticas da MMP-2 de 72 kDa (forma com o pró-peptídeo ou inativa) e de 75 kDa (forma inativa, encontrada em roedores) não foram diferentes entre os grupos. As atividades gelatinolíticas da MMP-9 de 135 kDa (MMP associada à lipocalina) e de 230 kDa (MMP dimérica de neutrófilos) foram maiores apenas no grupo CLP comparado ao grupo Sham, cuja atividade basal foi mínima, sugerindo um papel inflamatório desta isoforma de MMP na sepse. Entretanto, as atividades gelatinolíticas da MMP-9 de 87 kDa (forma ativa) e de 92 kDa (forma inativa) não foram diferentes entre os grupos.

Cena e colaboradores (2008) mostraram em modelo de endotoxemia induzida por administração de LPS em ratos, redução da resposta contrátil à PE em aortas

com endotélio vascular, cujo efeito foi revertido pela inibição não seletiva de MMPs. Nas artérias em que o endotélio foi removido, o efeito da inibição não seletiva de MMPs não alterou a contração da PE. Nesta condição, a atividade gelatinolítica da MMP-2 também está aumentada em extrato de aorta com endotélio de ratos submetidos à endotoxemia por LPS. Além disso, a atividade de MMP-9 plasmática de ratos submetidos ao LPS foi maior que em ratos Sham, efeito revertido após tratamento *in vivo* com o inibidor não seletivo de MMPs, doxiciclina (Cena et al., 2010). Nossos resultados foram semelhantes àqueles relatados por Cena e cols. (2008), uma vez que em presença do inibidor não seletivo de MMPs, GM6001, ocorreu o aumento da contração máxima induzida pela PE em aortas E+ de ratos Sham e CLP. Além disso, em ausência de endotélio, também houve melhora da resposta contrátil à PE em ambos os grupos, Sham e CLP. De fato, a atividade de MMPs no MLV de aorta de ratos CLP pareceu contribuir para a menor potência da contração da PE, uma vez que em presença do inibidor GM6001 houve a potencialização desta resposta que não foi mais diferente em ratos Sham. O mesmo ocorreu em presença de endotélio, ou seja, a atividade de MMPs endoteliais contribui para a menor resposta contrátil induzida pela PE no choque séptico e a inibição da atividade destas metaloproteinases foi suficiente para reverter o efeito.

Tsuruda e cols (2002) mostraram que a atividade gelatinolítica da MMP-2 era aumentada após estímulo com BNP em cultura de fibroblastos cardíacos humanos. Por outro lado, verificamos em nosso trabalho que a atividade gelatinolítica da MMP-2 recombinante humana avaliada *in vitro* não foi alterada após estímulo com CNP em diferentes concentrações e foi inibida pelo inibidor não seletivo de MMPs, Fenantrolina. Desta forma, parece que as MMPs participam do desenvolvimento do choque séptico, resultando em diminuição da resposta contrátil α_1 -adrenérgica, mas apresenta pouca relação com o sistema de peptídeos natriuréticos.

A contribuição das enzimas NOS tem sido enfaticamente apresentada como um dos principais fatores responsáveis pela menor resposta contrátil a diversos agonistas na sepse. Neste contexto, nossos resultados mostraram a intensa participação das isoformas de NOS na contração induzida pela PE. Verificamos que o inibidor não seletivo de NOS, L-NAME e o inibidor seletivo de NOS2, 1400W, potencializaram a contração da PE e o efeito máximo em aortas E+ de ratos CLP. Porém, em aorta de ratos Sham, apenas ocorreu o aumento do Emax da PE. Já em

presença do inibidor seletivo de NOS1, N^ω-propil, em aortas E+ de ratos CLP ocorreu o aumento da contração máxima da PE. Esses dados sugerem a maior atividade das enzimas NOS1 e NOS2, bem como por meio indireto, de NOS3 nas aortas de ratos CLP, sendo estas enzimas responsáveis pela redução da contração α_1 -adrenérgica no choque séptico. Os dados de expressão protéica de NOS2 e NOS3 também suportam esta hipótese, uma vez que estas enzimas estão aumentadas em aortas de ratos CLP. Em relação ao efeito modulador negativo induzido pelo CNP, foi mediado pela atividade das NOS, uma vez que em presença do L-NAME e CNP, o efeito negativo do CNP sobre a potência e o efeito máximo da PE foi revertido em ambos os grupos Sham e CLP. Em presença do inibidor seletivo de NOS1, N^ω-propil e CNP, o efeito negativo do CNP sobre a potência e efeito máximo da PE foi revertido em aorta de ratos Sham, e apenas observou-se a melhora do efeito máximo da PE, sem a reversão completa ao nível do Sham, em aorta de ratos CLP. Em presença do inibidor seletivo de NOS2 (1400W) e CNP ocorreu a reversão do efeito negativo do CNP apenas sobre a potência da PE em aorta de ratos Sham, e sobre a potência e melhora do efeito máximo da PE em aorta de ratos CLP. Esses dados sugerem que o efeito modulador negativo do CNP sobre a resposta contrátil da PE envolve a participação de NOS1, NOS2 e NOS3 em aorta de ratos CLP, sendo provavelmente a NOS3 a de maior contribuição. Em aorta de ratos Sham, apenas NOS1 e NOS3 parecem contribuir para o efeito anti-contrátil induzido pelo CNP sobre a PE, já que a inibição seletiva de NOS2 não modificou a resposta contrátil da PE em presença do CNP.

Em conjunto, os dados funcionais nos permitem sugerir que a menor resposta contrátil induzida pela PE nas aortas de ratos CLP parece ser em parte, devido ao aumento da ativação dos receptores NPR-B endoteliais e do MLV, de xantina oxidase e produção de O₂⁻ e H₂O₂, bem como da contribuição de MMPs e NOS. O efeito modulador negativo induzido pelo CNP sobre a contração da PE é principalmente mediado pelos receptores NPR-B, levando à formação de O₂⁻ e H₂O₂, provavelmente via NADPH oxidase e xantina oxidase, havendo a contribuição das NOS para esta resposta. O efeito anti-contrátil induzido pelo CNP no MLV de aorta de ratos CLP parece ser mediado por outra via independente de receptores NPR-B musculares, provavelmente, envolvendo os receptores NPR-C.

Conclusão

6 Conclusão

O presente trabalho apresenta um modelo efetivo de indução cirúrgica do choque séptico em ratos, os quais desenvolveram disfunção cardíaca e vascular, tanto em artéria de condutância quanto em artéria de resistência e prejuízo das respostas pressóricas induzidas pelo agonista seletivo, Fenilefrina. A mortalidade e os parâmetros cardiovasculares dos ratos CLP foram indicativos da severidade do modelo.

A contração vascular induzida pela Fenilefrina foi fortemente modulada pelo endotélio e mostrou a contribuição do receptor NPR-B e o CNP endógeno, estresse oxidativo, MMPs e NOS. O estudo mostrou alterações na mobilização de cálcio e de alteração do potencial de membrana vascular, que contribuem para a redução da resposta contrátil no choque séptico. O CNP foi capaz de induzir efeito hipotensor sistêmico e também efeito vasodilatador arterial e modulador negativo da contração induzida pela fenilefrina em aorta de ratos de ambos os grupos. O efeito modulador negativo do CNP foi dependente de receptor NPR-B, O_2^- e H_2O_2 , NOS1, NOS2 e NOS3 em aortas E+ de ratos CLP. Portanto, fica evidente a contribuição do sistema de peptídeos natriuréticos, sobretudo o CNP, no desenvolvimento da menor resposta vasoconstritora à PE em decorrência do choque séptico. Maiores estudos sobre a participação do CNP na disfunção do sistema cardiovascular podem contribuir para novos avanços terapêuticos no estudo da sepse severa e do choque séptico.

Referências Bibliográficas

7 Referências Bibliográficas

ADACHI, T.; FUKUSHIMA, T.; USAMI, Y.; HIRANO, K. Binding of human xanthine oxidase to sulphated glycosaminoglycans on the endothelial-cell surface. **Biochem. J.**, 289: 523-27, 1993.

AHLUWALIA, A; HOBBS, A.J. Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor. *Trends in Pharmacological Sciences*, 26 (3): 164-166, 2005.

ALLI, A. A.; GOWER, W. R. Jr. Molecular approaches to examine the phosphorylation state of the C type natriuretic peptide receptor. **Journal of Cellular Biochemistry**, 110 (4): 985-94, 2010.

AMIN, J.; CARRETERO, O.A., ITO, S. Mechanisms of action of atrial natriuretic factor and C-type natriuretic peptide. *Hypertension*, 27: 684-87, 1996.

ANAND-SRIVASTAVA, M. B.; SEHL, P. D.; LOWE, D. G. Cytoplasmic domain of natriuretic peptide receptor-C inhibits adenylyl cyclase. **The Journal of Biological Chemistry**, 271 (32): 19324-329, 1996.

ANAND-SRIVASTAVA, M.B. Natriuretic peptide receptor-C signaling and regulation. **Peptides**, 26: 1044-1059, 2005.

ANDRADE, F. A.; RESTINI, C. B. A.; GRANDO, M. D.; RAMALHO, L. N. Z.; BENDHACK, L. M. Vascular relaxation induced by C-type natriuretic peptide involves the Ca²⁺/NO-synthase/NO pathway. **Plos One**, 9 (5): e9544, 2014.

ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; SEBILLE, V.; LESIEUR, O.; MATHIEU, B.; RAPHAEL, J.C.; GAJDOS, P. Impaired pressor sensitivity to noradrenaline in septic shock patients with and without impaired adrenal function reserve. **Br J Clin Pharmacol.**, 46: 589-97, 1998.

ANTONUCCI, E.; DONADELLO, K.; TACCONE, F.S.; FRANCHI, F.; SCOLLETTA, S. Myocardial depression in sepsis: From pathogenesis to clinical manifestations and treatment. **Journal of Critical Care**, 29: 500-11, 2014.

ARAÚJO, A.V.; FERREZIN, C.V.; RODRIGUES, G.J. et al. Prostacyclin, not only nitric oxide, is a mediator of the vasorelaxation induced by acetylcholine in aortas from rats submitted to cecal ligation and perforation (CLP). **Vascular Pharmacology**, 54 (1-2): 44-51, 2011.

AREJIAN, M.; LI, Y.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Nitric oxide attenuates the expression of natriuretic peptide receptor C and associated adenylyl cyclase signaling in aortic vascular smooth muscle cells: role of MAPK. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, 296: H1859-H1867, 2009.

AUCLAIR, M-C; VERNIMMEN, C.; CARLI, A.; LECHAT, P. Depressed isoprenaline vascular response in endotoxic rats. **European Journal of Pharmacology**, 90: 143-45, 1983.

BATTELLI, M. G.; BOLOGNESE, A.; POLITO, L. Pathophysiology of circulating xanthine oxidoreductase: New emerging roles for a multi-tasking enzyme. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1842: 1502-17, 2014.

BAUER, W.R.; NEUBAUER, S.; OBITZ, G.; ERTL, G. Interrelation of coronary effects of atrial natriuretic peptide and the renin-angiotensin system in the isolated perfused rat heart. **J Mol Cell Cardiol**, 26: 527-37, 1994.

BORBÉLY, A.; PAPP, Z.; ÉDES, I.; PAULUS, W.J. Molecular determinants of heart failure with normal left ventricular ejection fraction. **Pharmacological Reports**, 61: 139-45, 2009.

BRANDES, R. P.; KODDENBERG, G.; GWINNER, W.; KIM, D. Y.; KRUSE, H. J.; BUSSE, R.; MÜGGE, A. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. **Hypertension**, 33: 1243-49, 1999.

BRANDES, R. P.; WEISSMANN, N.; SCHRÖDER, K. Redox-mediated signal transduction by cardiovascular Nox NADPH oxidases. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 73: 70-79, 2014.

BRUNNER, F., WÖLKART, G. Relaxant effect of C-type natriuretic peptide involves endothelium and nitric oxide-cGMP system in rat coronary microvasculature. **Cardiovascular Research**, 51: 577-84, 2001.

CANAAN-KÜHL, S.; OSTENDORF, T.; ZANDER, K.; KOCH, K. M.; FLOEGE, J. C-type natriuretic peptide inhibits mesangial cell proliferation and matrix accumulation in vivo. **Kidney International**, 53: 1143-51, 1998.

CENA, J.; LALU, M. M.; ROSENFELT, C. et al. Endothelial dependence of matrix metalloproteinase-mediated vascular hyporeactivity caused by lipopolysaccharide. **European Journal of Pharmacology**, 582: 116-22, 2008.

CENA, J.; LALU, M. M.; CHO, W. J. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase activity in vivo protects against vascular hyporeactivity in endotoxemia. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, 298: H45-H51, 2010.

CHAUHAN, S.D.; NILSSON, H.; AHLUWALIA, A. et al. Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 100: 1426-31, 2003a.

CHAUHAN, S.D.; SEGGARA, G.; VO, P.A. et al. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. **The FASEB Journal**, 17 (6): 773-75, 2003b.

CHEN, G.; ZHAO, J.; YIN, Y.; WANG, B.; LIU, Q.; LI, P.; ZHAO, L.; ZHOU, H. C-type natriuretic peptide attenuates LPS-induced endothelial activation: involvement of p38, Akt, and NF- κ B pathways. **Amino Acids**, 46 (12): 2653-63, 2014.

CHOW, A.K., CENA, J., EL-YAZBI, A.F. et al. Caveolin-1 inhibits matrix metalloproteinase-2 in the heart. *J. Mol. Cell. Cardiology*, 42: 896-901, 2007.

CHUN, T. H.; ITOH, H.; SAITO, T.; YAMAHARA, K. I.; DOI, K.; MORI, Y.; OGAWA, Y.; YAMASHITA, J.; TANAKA, T.; INOUE, M.; MASATSUGU, K.; SAWADA, N.; FUKUNAGA, Y.; NAKAO, K. Oxidative stress augments secretion of endothelium-derived relaxing peptides, C-type natriuretic peptide and adrenomedullin. **Journal of Hypertension**, 18: 575-80, 2000.

COLLIER, J., VALLANCE, P. Second messenger role for NO widens to nervous and immune systems. **Trends in Pharmacological Sciences**, 10 (11): 427-31, 1989.

CONNELLY, L.; MELANIE MADHANI, M.; HOBBS, A.J. Resistance to Endotoxic Shock in Endothelial Nitric-oxide Synthase (eNOS) Knock-out Mice. **The Journal of Biological Chemistry**, 280 (11 – Issue 18): 10040-46, 2005.

COSTA, M. A.; ELES GARAY, R.; CANIFFI, C.; FELLET, A.; ARRANZ, C. Role of cardiovascular nitric oxide system in C-type natriuretic peptide effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 359: 180–86, 2007.

DE IULIIS, G.N.; WINGATE, J.K.; KOPPERS, A.J.; MCLAUGHLIN, E.A.; AITKEN, R.J. Definitive evidence for the non-mitochondrial production of superoxide anion by human spermatozoa. **J Clin Endocrinol Metab**, 91(5): 1968-75, 2006.

DE SCHRYVER, N.; HOTON, D.; CASTANARES-ZAPATERO, D.; HANTSON, P. Acute ventricular wall thickening: sepsis, thrombotic microangiopathy, or myocarditis? **Case Reports in Cardiology**, 2015: 4 pages, 2015.

DEL-RY, S.; MALTINTI, M.; CABIATI, M.; EMDIN, M.; GIANNESI, D.; MORALES, M. A. C-type natriuretic peptide and its relation to non-invasive indices of left ventricular function in patients with chronic heart failure. **Peptides**, 29: 79-82, 2008.

DEL-RY, S.; CABIATI, M.; VOZZI, F.; BATTOLLA, B.; CASELLI, C.; FORINI, F.; SEGNANI, C.; PRESCIMONE, T.; GIANNESI, D.; MATTII, L. Expression of C-type natriuretic peptide and its receptor NPR-B in cardiomyocytes. **Peptides**, 32 (8): 1713-18, 2011.

DEL-RY, S. C-type natriuretic peptide: a new cardiac mediator. **Peptides**, 40: 93–98, 2013.

DEVIRIM, E.; AVCI, A.; ERGÜDER, I. B.; KARAGENÇ, N.; KÜLAH, B.; DURAK, I. Activities of xanthine oxidase and superoxide dismutase enzymes in rat intestinal tissues in sepsis. **The Journal of Trauma**, 64 (3): 733-35, 2008.

DONALDSON, L.L.; MYERS, A.K. Effect of pharmacological agonists on contractile responses in aortic rings derived from endotoxaemic rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, 19 (5): 389-96, 1996.

FENG, Y.; ZOU, L.; ZHANG, M.; LI, Y.; CHEN, C.; CHAO, W. MyD88 and Trif signaling play distinct roles in cardiac dysfunction and mortality during endotoxin shock and polymicrobial sepsis. **Anesthesiology**, 115 (3): 555-67, 2011.

FERNANDES, D.; SORDI, R.; PACHECO, L.K. et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 328 (3): 991-99, 2009.

FRIED, I.; BAR-OZ, B.; ALGUR, N.; FRIED, E.; GAVRI, S.; YATSIV, I.; PERLES, Z.; REIN, A.J.; ZONIS, Z.; BASS, R.; NIR, A. Comparison of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide levels in critically ill children with sepsis versus acute left ventricular dysfunction. **Pediatrics**, 118 (4): e1165-68, 2006.

GALLEY, H. F.; DAVIES, M. J.; WEBSTER, N. R. Xanthine oxidase activity and free radical generation in patients with sepsis syndrome. **Critical Care Medicine**, 24 (10): 1649-53, 1996.

GARCHA, R.S.; HUGHES, A.D. CNP, but not ANP or BNP, relax human isolated subcutaneous resistance arteries by an action involving cyclic GMP and BKCa channels. **Journal of Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, 7 (2): 87-91, 2006.

GARLAND, C.J., DORA, K.A. Evidence against C-type natriuretic peptide as an arterial 'EDHF'. **British Journal of Pharmacology**, 153 (1): 4-5, 2008.

GIRALDO, J.; VIVAS, N.M.; VILA, E. et al. Assessing the (a)symmetry of concentration-effect curves: empirical versus mechanistic models. **Pharmacology and Therapeutics**, 95: 21-45, 2002.

GOCAN, N.C.; SCOTT, J.A., TYML, K. Nitric oxide produced via neuronal NOS may impair vasodilatation in septic rat skeletal muscle. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 278: H1480–H1489, 2000.

GONÇALVES, R.P.M.; GUARIDO, K.L.; ASSREUY, J.; SILVA-SANTOS, J.E. Gender-specific differences in the in situ cardiac function of endotoxemic rats detected by pressure-volume catheter. **Shock**, 42 (5): 415-23, 2014.

GRIFFITH, T.M. Endothelium-dependent smooth muscle hyperpolarization: do gap junctions provide a unifying hypothesis? **British Journal of Pharmacology**, 141 (6): 881-903, 2004.

GUARRACINO, F.; BALDASSARRI, R.; PINSKY, M.R. Ventriculo-arterial decoupling in acutely altered hemodynamic states. **Critical Care**, 17: 213-19, 2013.

HAGIWARA, H.; SAKAGUCHI, H.; ITAKURA, M. et al. Autocrine regulation of rat chondrocyte proliferation by natriuretic peptide C and its receptor, natriuretic peptide receptor-B. **Journal of Biological Chemistry**, 269: 10729-33, 1994.

HAMA, N.; ITOH, H.; SHIRAKAMI, G.; SUGA, S. I.; KOMATSU, Y.; YOSHIMASA, T.; TANAKA, I.; MORI, K.; NAKAO, K. Detection of C-type natriuretic peptide in human circulation and marked increase of plasma CNP levels in septic shock patients. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 198 (3): 1177-82, 1994.

HINDER, F.; BOOKE, M.; TRABER, L.D. et al. The atrial natriuretic peptide receptor antagonist HS 142-1 improves cardiovascular filling and mean arterial pressure in a hyperdynamic ovine model of sepsis. **Critical Care Medicine**, 25 (5): 820-26, 1997.

HIROSE, M.; FURUKAWA, Y.; KUROGOUCHI, F.; NAKAJIMA, K.; MIYASHITA, Y.; CHIBA, S. C-type natriuretic peptide increases myocardial contractility and sinus rate mediated by guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors in isolated, blood-perfused dog heart preparations. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 286: 70-76, 1998.

HOBBS, A.; FOSTER, P.; PRESCOTT, C.; SCOTLAND, R.; AHLUWALIA, A. Natriuretic peptide receptor-C regulates coronary blood flow and prevents myocardial ischemia/reperfusion injury: novel cardioprotective role for endothelium-derived C-type natriuretic peptide. **Circulation**, 110 (10): 1231-35, 2004.

IGAKI, T.; ITOH, H.; SUGA, S.; HAMA, N.; OGAWA, Y.; KOMATSU, Y.; YAMASHITA, J.; DOI, K.; CHUN, T.; NAKAO, K. Effects of intravenously administered C-type natriuretic peptide in humans: comparison with atrial natriuretic peptide. **Hypertension Research**, 21: 7-13, 1998.

IGNARRO, L.J. Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein. **Circulation Research**, 65:1-21, 1989.

INOUE, K.; NARUSE, K.; YAMAGAMI, S. et al. Four functionally distinct C-type natriuretic peptides found in fish reveal evolutionary history of the natriuretic peptide system. **PNAS**, 100 (17): 10079-84, 2003.

JAO, H. C.; YANG, R. C.; HSU, H. K.; HSU, C. The decrease of PKC alpha is associated with hepatic apoptosis at early and late phases of polymicrobial sepsis. **Shock**, 15 (2): 130-34, 2001.

JONG, W.M.; ZUURBIER, C.J.; DE WINTER, R.J. et al. Fentanyl-fluanisone-midazolam combination results in more stable hemodynamics than does urethane alpha-chloralose and 2,2,2-tribromoethanol in mice. **Contemp Top Lab Anim Sci**, 41(3):28-32, 2002.

KIM, H., KOH, G., 2000. Lipopolysaccharide activates matrix metalloproteinase-2 in endothelial cells through an NF-kappa B-dependent pathway. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 269: 401-05, 2000.

KISHIMOTO, I.; NAKAO, K.; SUGA, S.; HOSODA, K.; YOSHIMASA, T.; ITOH, H.; IMURA, H. Downregulation of C-receptor by natriuretic peptides via ANP-B receptor in vascular smooth muscle cells. **The American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**, 265 (4 Pt 2): H1373-79, 1993.

KOESTERS, A.; ENGISCH, K. L.; RICH, M. M. Decreased cardiac excitability secondary to reduction of sodium current may be a significant contributor to reduced contractility in a rat model of sepsis. **Critical Care**, 18: R54-R60, 2014.

KONE, B.C. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. **Cardiovascular Research**, 51(3): 429-41, 2001.

KOTSOVOLIS, G.; KALLARIS, K. The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. **Hippokratia**, 14 (2): 88-93, 2010.

KUN, A.; KIRALY, I.; PATARICZA, J.; MARTON, Z.; KRASSOI, I.; VARRO, A.; SIMONSEN, U.; PAPP, J. G.; PAJOR, L. C-type natriuretic peptide hyperpolarizes and relaxes human penile resistance arteries. **The Journal of Sexual Medicine**, 5 (5): 1114-25, 2008.

LALU, M.M., CENA, J., CHOWDHURY, R. et al. Matrix metalloproteinases contribute to endotoxin and interleukin-1beta induced vascular dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, 149: 31-42, 2006.

LANGENICKEL, T. H.; BUTTGEREIT, J.; PAGEL-LANGENICKEL, I.; LINDNER, M.; MONTI, J.; BEUERLEIN, K.; AL-SAAD, N.; PLEHM, R.; POPOVA, E.; TANK, J.; DIETZ, R.; WILLENBROCK, R.; BADER, M. Cardiac hypertrophy in transgenic rats expressing a dominant-negative mutant of the natriuretic peptide receptor B. **PNAS**, 103 (12): 4735-40, 2006.

LEONE, M.; MARTIN C. Vasopressor use in septic shock: an update. **Current Opinion in Anesthesiology**, 21: 141-47, 2008.

LEVY, B.; COLLIN, S.; SENNOUN, N. et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. **Intensive Care Medicine**, 36: 2019-29, 2010.

LI, Y.; MADIRAJU, P.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Knockdown of natriuretic peptide receptor-A enhances receptor C expression and signalling in vascular smooth muscle cells. **Cardiovascular Research**, 93: 350-59, 2012.

LIAW, W.-J.; CHEN, T.-H.; LAI, Z.-Z. et al. Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on intraperitoneal sepsis-induced organ injury in rats. **Shock**, 23 (1): 88–96, 2005.

LÓPEZ, A.; LORENTE, J.A.; STEINGRUB, J. et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Critical Care Medicine**, 32 (1): 21-30, 2004.

LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews**, 52 (3): 375-413, 2000.

LUCHTEMBERG, M. N.; PETRONILHO, F.; CONSTANTINO, L.; GELAIN, D. P.; ANDRADES, M.; RITTER, C.; MOREIRA, J. C. F.; STRECK, E. L.; DAL-PIZZOL, F. Xanthine oxidase activity in patients with sepsis. **Clinical Biochemistry**, 41: 1186-90, 2008.

LUNDBLAD, R.; SANDVEN, P., GIERCKSKY, K-E. The physical nature of a large bowel perforation predicts severity of the subsequent inflammatory response. **Shock**, 3(6): 455-61, 1995.

MADHANI, M.; SCOTLAND, R.S.; MacALLISTER, R.J.; HOBBS, A. J. Vascular natriuretic peptide receptor-linked particulate guanylate cyclases are modulated by nitric oxide-cyclic GMP signaling. **British Journal of Pharmacology**, 139: 1289-96, 2003.

MANDAL, M., MANDAL, A., DAS, S. et al. Clinical implications of matrix metalloproteinases. **Mol. Cell. Biochem.**, 252: 305-29, 2003.

MARCZIN, N.; TEKERES, M.; SALZMAN, A.L. et al. Methylene blue infusion in septic shock. **Critical Care Medicine**, 23 (11): 1936-38, 1995.

MARTY, C.; KOZASA, T.; QUINN, M. T.; YE, R. D. Activation state-dependent interaction between Gai and p67phox. **Molecular and Cellular Biology**, 26 (13): 5190-200, 2006.

MARUMO, T.; NAKAKI, T.; HISHIKAWA, K. et al. Natriuretic peptide-augmented induction of nitric oxide synthase through cyclic GMP elevation in vascular smooth muscle cells. **Endocrinology**, 136 (5): 2135-42, 1995.

MATSUDA, Y.; MORISHITA, Y. HS-142-1: a novel nonpeptide atrial natriuretic peptide antagonist of microbial origin. **Cardiovascular Drug Reviews**, 11 (1): 45-59, 1993.

MATSUKAWA, N.; GRZESIK, W.J.; TAKAHASHI, N. et al. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system. **PNAS**, 96: 7403-08, 1999.

MESQUITA, E.T.; JORGE, A.J.L.; SOUZA Jr, C.V.; CASSINO, J.P.P. Systems biology applied to heart failure with normal ejection fraction. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 102 (5): 510-17, 2014.

MOLTZAU, L.R.; ARONSEN, J.M.; MEIER, S.; SKOGESTAD, J.; ØRSTAVIK, Ø.; LOTHE, G. B.; SJAASTAD, I.; SKOMEDAL, T.; OSNES, J. B.; LEVY, F. O.; QVIGSTAD E. Different compartmentation of responses to brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide in failing rat ventricle. **J Pharmacol Exp Ther**, 350: 681-90, 2014.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, 43 (2): 109-142, 1991.

MOYES, A. J.; KHAMBATA, R. S.; VILLAR, I.; BUBB, K. J.; BALIGA, R. S.; LUMSDEN, N. G.; XIAO, F.; GANE, P. J.; REBSTOCK, A. S.; WORTHINGTON, R. J.; SIMONE, M. I.; MOTA, F.; RIVILLA, F.; VALLEJO, S.; PEIRÓ, C.; FERRER, C. F. S.; DJORDJEVIC, S.; CAULFIELD, M. J.; MACALLISTER, R. J.; SELWOOD, D. L.; AHLUWALIA, A.; HOBBS, A. J. Endothelial C-type natriuretic peptide maintains vascular homeostasis. **The Journal of Clinical Investigation**, 124 (9): 4039-51, 2014.

MURTHY, K. S.; MAKHLOUF, G. M. Identification of the G protein-activating domain of the natriuretic peptide clearance receptor (NPR-C). **The Journal of Biological Chemistry**, 274 (25): 17587-592, 1999.

NAKAMURA, T.; EBIHARA, I.; SHIMADA, N., et al. Modulation of plasma metalloproteinase-9 concentrations and peripheral blood monocyte mRNA levels in patients with septic shock: effect of fiber-immobilized polymyxin B treatment. **Am. J. Med. Sci.**, 316: 355-60, 1998.

NAKATSUBO, N.; KOJIMA, H.; KIKUCHI, K.; NAGOSHI, H.; HIRATA, Y.; MAEDA, D.; IMAI, Y.; IRIMURA, T.; NAGANO, T. Direct evidence of nitric oxide production from bovine aortic endothelial cells using new fluorescence indicators: diaminofluoresceins. **FEBS Letters**. 427 (2): 263-66, 1998.

NIR, A.; ZHANG, D. F.; FIXLER, R.; BURNETT, J. C. JR.; EILAM, Y.; HASIN, Y. C-type natriuretic peptide has a negative inotropic effect on cardiac myocytes. **European Journal of Pharmacology** 412: 195–201, 2001.

OBATA, H.; YANAGAWA, B.; TANAKA, K.; OHNISHI, S.; KATAOKA, M.; MIYAHARA, Y.; ISHIBASHI-UEDA, H.; KODAMA, M.; AIZAWA, Y.; KANGAWA, K.; NAGAYA, N. CNP infusion attenuates cardiac dysfunction and inflammation in myocarditis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 356: 60–66, 2007.

OKAMOTO, T.; AKAIKE, T.; SAWA, T., et al. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. **J. Biol. Chem.**, 276: 29596-602, 2001.

OSTERBUR, K.; YU, D. H.; DeCLUE, A. E. Interleukin-1 β , tumour necrosis factor- α and lipopolysaccharide induce C-type natriuretic peptide from canine aortic endothelial cells. **Research in Veterinary Science**, 94: 478-83, 2013.

PANAYIOTOU, C.M.; BALIGA, R.; STIDWILL, R. et al. Resistance to endotoxic shock in mice lacking natriuretic peptide receptor-A. **British Journal of Pharmacology**, 160: 2045-54, 2010.

PFEFFER, K. D.; HUECKSTEADT, T. P.; HOIDAL, J. R. Xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activity and gene expression in renal epithelial cells. Cytokine and steroid regulation. **Journal of Immunology**, 153 (4): 1789-97, 1994.

PHAN, S. H.; GANNON, D. E.; VARANI, J.; RYAN, U. S.; WARD, P. A. Xanthine oxidase activity in rat pulmonary artery endothelial cells and its alteration by activated neutrophils. **American Journal of Pathology**, 134 (6): 1201-11, 1989.

PICKKERS, P.; DORRESTEIJN, M. J.; BOUW, M. P.; VAN DER HOEVEN, J. G.; SMITS, P. In vivo evidence for nitric oxide-mediated calcium-activated potassium-channel activation during human endotoxemia. **Circulation**, 114 (5): 414-21, 2006.

PIECHOTA, M.; BARYLSKI, M.; HANNAM, S. et al. Natriuretic peptides in septic patients. **Current Medicinal Chemistry**, 16: 4020-31, 2009.

PIERKES, M.; GAMBARYAN, S.; BOKNÍK, P.; LOHMANN, S. M.; SCHMITZ, W.; POTTHAST, R.; HOLTWICK, R.; KUHN, M. Increased effects of C-type natriuretic peptide on cardiac ventricular contractility and relaxation in guanylyl cyclase A-deficient mice. **Cardiovascular Research**, 53: 852-61, 2002.

PINHEIRO, L. C.; MONTENEGRO, M. F.; AMARAL, J. H.; FERREIRA, G. C.; OLIVEIRA, A. M.; TANUS-SANTOS, J. E. Increase in gastric pH reduces hypotensive effect of oral sodium nitrite in rats. **Free Radical Biology and Medicine**, 53: 701-09, 2012.

POTTER, L.R. Domain analysis of human transmembrane guanylyl cyclase receptors: implications for regulation. **Frontiers in Bioscience**, 10:1205-20, 2005.

PUGIN, J., WIDMER, M.C., KOSSODO, S. et al. Human neutrophils secrete elatase B in vitro and in vivo in response to endotoxin and proinflammatory mediators. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, 20: 458-64, 1999.

PUGGINA, E.; SELLITTI, D. Cyclic adenosine monophosphate (cAMP) increases natriuretic peptide receptor C (NPR-C) expression in human aortic smooth muscle cells. **Molecular and Cellular Endocrinology**, 219: 161-69, 2004.

RAUTUREAU, Y.; GOWERS, I.; WHEELER-JONES, C.P. BAXTER, G. F. C-type natriuretic peptide regulation of guanosine-3',5'-cyclic monophosphate production in human endothelial cells. **Autonomic and Autacoid Pharmacology**, 30: 185-192, 2010.

RAHMUTULA, D.; GARDNER, D. G. C-type natriuretic peptide down-regulates expression of its cognate receptor in rat aortic smooth muscle cells. **Endocrinology**, 146 (11): 4968-74, 2005.

REES, D.D.; MONKHOUSE, J.E.; CAMBRIDGE, D. et al. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mice. **British Journal of Pharmacology**, 124: 540-46, 1998.

RIVERO-VILCHES, F.; de FRUTOS, S.; RODRIGUEZ-PUYOL, M. et al. Guanylate cyclases: physiological processes mediated by cyclic GMP. **Nefrologia**, 21: 233-39, 2001.

ROSCANI, M.G.; MATSUBARA, L.S.; MATSUBARA, B.B. Heart failure with normal ejection fraction. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 94 (5): 652-60, 2010.

SAHA, S.; LI, Y.; LAPPAS, G.; ANAND-SRIVASTAVA, M. B. Activation of natriuretic peptide receptor-C attenuates the enhanced oxidative stress in vascular smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats: Implication of Gi α protein. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 44: 336-44, 2008.

SAKUMA, S.; ABE, M.; KOHDA, T.; FUJIMOTO, Y. Hydrogen peroxide generated by xanthine/xanthine oxidase system represses the proliferation of colorectal cancer cell line Caco-2. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, 56: 15-19, 2015.

SALVEMINI, D.; CUZZOCREA, S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. **Free Radical Biology and Medicine**, 33 (9): 1173-85, 2002.

SAND, C.A.; STARR, A.; WILDER, C.D.E.; RUDYK, O.; SPINA, D.; THIEMERMANN, C.; TREACHER, D.F.; NANDI, M. Quantification of microcirculatory blood flow: a sensitive and clinically relevant prognostic marker in murine models of sepsis. **J Appl Physiol (1985)**, 118(3): 344-54, 2015.

SHARSHAR, T.; GRAY, F.; GRANDMAISON, G.L.; HOPKINSON, N.S.; ROSS, E.; DORANDEU, A.; ORLIKOWSKI, D.; RAPHAEL, J.C.; GAJDOS, P.; ANNANE, D. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Lancet**, 362: 1799-805, 2003.

SCHULZ, R. Intracellular targets of matrix metalloproteinase-2 in cardiac disease: rationale and therapeutic approaches. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, 47: 211-42, 2007.

SILVA, E.; PEDRO, M.A.; SOGAYAR, A.C.B. et al. Brazilian sepsis epidemiologic study (BASES study). **Critical Care**, 8 (4): R251-60, 2004.

SILVA, B. R.; PERNOMIAN, L.; GRANDO, M. D.; AMARAL, J. H.; TANUS-SANTOS, J. E.; BENDHACK, L. M. Hydrogen peroxide modulates phenylephrine-induced contractile response in renal hypertensive rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, 721: 193-200, 2013.

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

SIMON, A.; LIU, G. X.; KOREN, G.; CHOUDHARY, G. cANF causes endothelial cell hyperpolarization by activation of chloride channels. **Peptides**, 30: 2337-42, 2009.

SORDI, R.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Differential involvement of potassium channel subtypes in early and late sepsis-induced hyporesponsiveness to vasoconstrictors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, 56 (2): 184-89, 2010.

SPRINGER, J.; AZER, J.; HUA, R.; ROBBINS, C.; ADAMCZYK, A.; MCBOYLE, S.; BISSELL, M. B.; ROSE, R. A. The natriuretic peptides BNP and CNP increase heart rate and electrical conduction by stimulating ionic currents in the sinoatrial node and atrial myocardium following activation of guanylyl cyclase-linked natriuretic peptide receptors. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, 52: 1122-34, 2012.

STABILE, A.M.; MORETO, V.; ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Participation of the inducible nitric oxide synthase on atrial natriuretic plasma during endotoxemic shock. **Regulatory Peptides**, 140: 136-41, 2007.

STAMLER, J. S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D. I.; KEANEY, J.; VITA, J.; SINGELI, D.; VALERIT, C. R.; LOSCALZO, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 89: 7674-77, 1992.

STEINMETZ, M.; POTTHAST, R.; SABRANE, K., KUHN, M. Diverging vasorelaxing effects of C-type natriuretic peptide in renal resistance arteries and aortas of GC-A-deficient mice. **Regulatory Peptides**, 119: 31-37, 2004.

STINGO, A.J.; CLAVELL, A.L.; HEUBLEIN, D.M. et al. Presence of C-type natriuretic peptide in cultured human endothelial cells and plasma. **American Journal of Physiology**, 263: H1318–H1321, 1992.

STRUNK, V.; HAHNENKAMP, K.; SCHNEUING, M. et al. Selective iNOS inhibition prevents hypotension in septic rats while preserving endothelium-dependent vasodilation. **Anesthesia and Analgesia**, 92 (3): 681-87, 2001.

STUBBE, H. D.; TRABER, D. L.; BOOKE, M.; TRABER, L. D.; WESTPHAL, M.; VAN AKEN, H.; HINDER, F. Role of atrial natriuretic peptide in pulmonary permeability and vasoregulation in ovine sepsis. **Critical Care Medicine**, 32 (12): 2491-95, 2004.

SUDOH, T.; MINAMINO, N.; KANGAWA, K. et al. C-type natriuretic peptide (CNP): a new member of natriuretic peptide family identified in porcine brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 168 (2): 863-70, 1990.

SUGA, S.; NAKAO, K.; ITOH, H. et al. Endothelial production of C-type natriuretic peptide and its marked augmentation by transforming growth factor-beta. Possible existence of "vascular natriuretic peptide system". **Journal of Clinical Investigation**, 90: 1145-49, 1992.

SUGA, S.; ITOH, H.; KOMATSU, Y. et al. Cytokine-induced C-type natriuretic peptide (CNP) secretion from vascular endothelial cells-evidence for CNP as a novel autocrine/paracrine regulator from endothelial cells. **Endocrinology**, 133: 3038-41, 1993.

STEFAN SUTTNER, S.; BOLDT, J. Prediction of sepsis after multiple trauma: Does C-type natriuretic peptide do the trick? **Crit Care Med**, 38(1): 323-24, 2010.

SZÁBO, C.; SALZMAN, A.L.; ISCHIROPOULOS, H. Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta *in vivo*. **FEBS Letters**, 235-38, 1995.

TAI, L. A.; HWANG, K. C. Regulation of xanthine oxidase activity by substrates at active sites via cooperative interactions between catalytic subunits: Implication to drug pharmacokinetics. **Current Medicine Chemistry**, 18: 69-78, 2011.

TELES, J.M.M; SILVA, E.; WESTPHAL, G. et al. Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock**, 30 (Suppl. 1): 47-52, 2008.

TENG, L.; YU, M.; LI, J.M. et al. Matrix metalloproteinase-9 as new biomarkers of severity in multiple organ dysfunction syndrome caused by trauma and infection. **Mol Cell Biochem.**, 360: 271-77, 2012.

THOMAS, D.D.; RIDNOUR, L.A.; ISENBERG, J.S. et al. The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, 45 (1): 18-31, 2008.

TSAI, K. L.; LIANG, H. J.; YANG, Z. D.; LUE, S.I.; YANG, S. L.; HSU, C. Early inactivation of PKC ϵ associates with late mitochondrial translocation of Bad and apoptosis in ventricle of septic rat. **The Journal of Surgical Research**, 186: 278-86, 2014.

TSURUDA, T.; BOERRIGTER, G.; HUNTLEY, B. K. et al. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. **Circulation Research**, 91:1127-34, 2002.

TOUYZ, R.M. Apocynin, NADPH oxidase, and vascular cells: a complex matter. **Hypertension**, 51: 172-174, 2008.

TRUJILLO, M.; ALVAREZ, M. N.; PELUFFO, G.; FREEMAN, B. A.; RADI, R. Xanthine oxidase-mediated decomposition of S-nitrosothiols. **The Journal of Biological Chemistry**, 273 (14): 7828-34, 1998.

TSAO, C-M.; CHEN, S-J.; SHIH, M-C. et al. Effects of terbutaline on circulatory failure and organ dysfunction induced by peritonitis in rats. **Intensive Care Med**, 36: 1571-78, 2010.

TYML, K.; YU, J.; McCORMACK, D.G. Capillary and arteriolar responses to local vasodilators are impaired in a rat model of sepsis. **J Appl Physiol**, 84:837-844, 1998.

VAN DER GRAAF, P.H.; SCHOEMAKER, R.C. Analysis of asymmetry of agonist concentration-effect curves. **J Pharmacol Toxicol**, 41: 107-115, 1999.

VIEILLARD-BARON, A.; CAILLE, V.; CHARRON, C.; BELLIARD, G.; PAGE, B.; JARDIN, F. Actual incidence of global left ventricular hypokinesia in adult septic shock. **Critical Care Medicine**, 36 (6): 1701-6, 2008.

VILLAR, I. C.; PANAYIOTOU, C. M.; SHERAZ, A.; MADHANI, M.; SCOTLAND, R. S.; NOBLES, M.; KEMP-HARPER, B.; AHLUWALIA, A.; HOBBS, A. J. Definitive role for natriuretic peptide receptor-C in mediating the vasorelaxant activity of C-type natriuretic peptide and endothelium-derived hyperpolarising factor. **Cardiovascular Research**, 74: 515-25, 2007.

VOLLMAR, A.M.; SCHULZ, R. Expression and differential regulation of natriuretic peptides in mouse macrophages. **Journal of Clinical Investigation**, 95: 2442-50, 1995.

VROMEN, A.; ARKOVITZ, M.S.; ZINGARELLI, B.; SALZMAN, A. L.; GARCIA, V. F.; SZABÓ, C. Low-level expression and limited role for the inducible isoform of nitric oxide synthase in the vascular hyporeactivity and mortality associated with cecal ligation and puncture in the rat. **Shock**, 6 (4): 248-53, 1996.

WANG, C.; MANSARD, A.; GIUMMELLY, P.; ATKINSON, J. Decreased aortic smooth muscle contraction in a rat model of multibacterial sepsis. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, 18: 679-83, 2004.

WEBER, W.; FISCHLI, W.; HOCHULI, E.; KUPFER, E.; WEIBEL, E. K. Anantin - a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). **The Journal of Antibiotics**, 44 (2): 164-71, 1991.

WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. Sepsis and septic shock – a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgical Research**, 29 (2): 189-201, 1980.

WHITE, C. R.; DARLEY-USMAR, V.; BERRINGTON, W. R.; McADAMS, M.; GORE, J. Z.; THOMPSON, A.; PARKS, D. A.; TARPEY, M. M.; FREEMAN, B. A. Circulating plasma xanthine oxidase contributes to vascular dysfunction in hypercholesterolemic rabbits. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 93: 8745-49, 1996.

WITTHAUT, R. Science review: natriuretic peptides in critical illness. **Critical Care**, 8 (5): 342-49, 2004.

Wu, L. L.; Tang, C.; Dong, L. W.; Liu, M. S. Altered phospholamban-calcium ATPase interaction in cardiac sarcoplasmic reticulum during the progression of sepsis. **Shock**, 17 (5): 389-93, 2002.

WU, F.; WILSON, J.X.; TYML, K. Ascorbate protects against impaired arteriolar constriction in sepsis by inhibiting inducible nitric oxide synthase expression. **Free Radical Biology and Medicine**, 37 (8): 1282-89, 2004.