

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VANESSA KOVALSKI SILVÉRIO

**EFEITO DO SILDENAFIL SOBRE ALTERAÇÕES VASCULARES E DANO
TECIDUAL INDUZIDOS PELO CHOQUE SÉPTICO**

PONTA GROSSA
2015

VANESSA KOVALSKI SILVÉRIO

**EFEITO DO SILDENAFIL SOBRE ALTERAÇÕES VASCULARES E DANO
TECIDUAL INDUZIDOS PELO CHOQUE SÉPTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Ponta Grossa como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes
Co-orientador: Prof. Dr. José Carlos
Rebuglio Velloso

PONTA GROSSA

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG

Silvério, Vanessa Kovalski
S587 Efeito do sildenafil sobre alterações
vasculares e dano tecidual induzidos pelo
choque séptico/ Vanessa Kovalski Silvério.
Ponta Grossa, 2015.
56f.

Dissertação (Mestrado em Ciências
Farmacêuticas - Área de Concentração:
Fármacos, Medicamentos e Biociências
Aplicadas à Farmácia), Universidade
Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes.
Coorientador: Prof. Dr. José Carlos
Rebuglio Velloso.

1.Sepse. 2.Óxido nítrico. 3.cGMP.
4.Sildenafil. I.Fernandes, Daniel. II.
Velloso, José Carlos Rebuglio. III.
Universidade Estadual de Ponta Grossa.
Mestrado em Ciências Farmacêuticas. IV. T.

CDD: 615



Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

Associação Ampla entre a
Universidade Estadual do Centro-Oeste e a
Universidade Estadual de Ponta Grossa



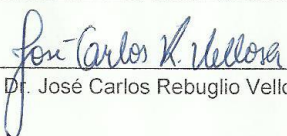
Ata nº. 07/2015

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO, DA PÓS-GRADUANDA VANESSA KOVALSKI, DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, REALIZADA NO DIA 26 DE FEVEREIRO DE 2015, NA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.

Ao vigésimo sexto dia do mês de fevereiro de dois mil e quinze, às 08h30min, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Sala M 115 da Universidade Estadual de Ponta Grossa, sob a presidência do Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso, em sessão pública, reuniu-se a banca examinadora para a defesa de dissertação da pós-graduanda Vanessa Kovalski. Área de concentração: Fármacos, medicamentos e biociências aplicadas à Farmácia. Linha de Pesquisa: Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos. A banca foi constituída pelos pesquisadores: Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso (Presidente) / UEPG, Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo / UEPG e Prof. Dr. Márcio Silva / UTFPR, indicados pelo egrégio colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas – nível de Mestrado Acadêmico, desta Universidade, em associação ampla com a Universidade Estadual do Centro-Oeste. Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e à candidata das normas que regem a defesa de dissertação e definiu-se a ordem a ser seguida pelos examinadores para a arguição. O trabalho analisado foi “**EFEITO DO SIDENAFIL SOBRE ALTERAÇÕES VASCULARES E DANO TECIDUAL INDUZIDOS PELO CHOQUE SÉPTICO**”. Encerrada a defesa de dissertação, procedeu-se o julgamento, tendo sido a candidata APROVADA (Aprovada/Reprovada). Foi dada ciência à mestranda que, de acordo com o Art. 34 do Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO/UEPG, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências aplicadas à Farmácia, o aluno tem o prazo de 30 (trinta) dias após esta defesa para entregar as cópias da versão definitiva, que devem ser aprovadas pelo orientador e homologadas pelo Colegiado de curso. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se à presente ata que vai assinada pelos membros da banca examinadora e por mim, Jessica Leme Cano, Jessica Leme Cano, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela UEPG.

Ponta Grossa, 26 de fevereiro de 2015

Observação (se necessária):


Prof. Dr. José Carlos Rebuglio Velloso – UEPG


Profa. Dra. Kátia Sabrina Paludo - UEPG


Prof. Dr. Márcio Silva - UTFPR

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Daniel Fernandes pela incansável dedicação, paciência e apoio em todos os momentos.

Ao Professor Doutor José Carlos Rebuglio Velloso pelo auxílio com os exames bioquímicos dos animais em estudo no Laboratório Escola da Universidade Estadual de Ponta Grossa (LUAC), e também por seu apoio e dedicação.

As funcionárias do Biotério, Maria e Marilene, pela disponibilidade em auxiliar no manejo e alimentação dos animais, e pela amizade construída.

A equipe de trabalho do Professor Doutor Daniel Fernandes, Luiz Renato Olchanheski Júnior e Ana Paula Prestes, pela incansável ajuda, apoio e amizade durante os dois anos de trabalho.

A todos meus colegas de mestrado, em especial as minhas amigas Tamara Nascimento Ferreira e Juliana Berton, pela amizade construída e troca de experiências tanto dentro como fora do mestrado.

A minha grande amiga e também colega do mestrado Thiana de Quadros, por estar sempre comigo em tantos momentos da minha vida, e agora dividindo comigo mais esta experiência.

A Marcia Venâncio Marcon, Josiane Padilha e Jeanine Margraf Bittencourt por disponibilizarem seu Laboratório para análise de alguns testes, e também pela amizade e apoio.

Ao Professor Doutor Jamill Assreuy e a Técnica Adriane Madeira pelo auxílio com a dosagem de NOx.

A Capes e CNPq pela bolsa e apoio financeiro.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas e a Universidade Estadual de Ponta Grossa pela oportunidade em realizar o Mestrado nesta Instituição.

Aos meus familiares e amigos que estiveram presentes, em especial meus pais Suzana e Eulério, meus irmãos Fernanda e Rafael e meu marido Marcelo que me incentivaram a realizar mais esta etapa profissional.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

E ao Senhor Deus, por nos dar a oportunidade da vida e proteção para a realização desse trabalho.

RESUMO

O choque séptico, que é desencadeado por produtos microbianos, é caracterizado principalmente por uma perfusão tecidual inadequada causada pela diminuição da pressão arterial, lesão vascular, hiporreatividade a vasoconstritores e coagulação intravascular disseminada, o que pode levar à disfunção de múltiplos órgãos e morte. O óxido nítrico (NO) tem um importante papel na patogênese da sepse e choque séptico, tendo efeitos tanto protetores como deletérios. Ensaios clínicos com inibidores não seletivos da NOS (óxido nítrico sintase) mostraram melhora nos níveis da pressão arterial média, porém houve também um aumento da pressão da artéria pulmonar e redução do débito cardíaco. Assim, apesar da investigação intensa, não houve progressos clínicos até agora. Talvez isso se deve à falta de compreensão do NO e suas vias de sinalização. Há por exemplo uma lacuna sobre o papel da enzima guanilato ciclase solúvel e do segundo mensageiro guanosina 3',5'- monofosfato cíclico (cGMP) durante os momentos iniciais da sepse. A maioria dos trabalhos tem estudado o papel do cGMP através da inibição da enzima responsável pela sua produção (guanilato ciclase), porém, neste trabalho optamos por tentar o aumento dos níveis de cGMP através da inibição de uma enzima responsável pela sua degradação, a fosfodiesterase 5 (PDE5). Nos primeiros estágios de choque ocorre uma intensa liberação de agentes vasoconstritores, o que pode levar a danos por isquemia. Neste cenário, o cGMP pode desempenhar um papel chave para contrabalançar esses agentes e impedir danos nos tecidos. O sildenafil, um inibidor de fosfodiesterase do tipo 5, aumenta cGMP em células do músculo liso promovendo vasodilatação. Assim, o propósito do presente estudo foi investigar o efeito do tratamento com sildenafil nas fases iniciais da sepse. Ratos Wistar machos foram divididos em 2 grupos de 16 animais cada e submetidos ao procedimento CLP (Cecal Ligation and Puncture) ou à falsa cirurgia (sham). Oito horas após o procedimento, os grupos CLP e sham foram aleatoriamente divididos para receber sildenafil (10 mg / kg por via oral) ou veículo. Vinte e quatro horas após o procedimento CLP ou sham, a pressão arterial média, sistólica e diastólica e reatividade vascular à fenilefrina foram avaliadas. Além disso, amostras de sangue foram coletadas para a dosagem de óxido nítrico (nitrato e nitrito), uréia, creatinina, AST, ALT, lactato e CK; análises hematológicas também foram realizadas. A significância estatística foi analisada por ANOVA de duas vias seguida de post hoc Bonferroni. Os resultados mostram que o modelo CLP foi capaz de reproduzir as principais características da sepse como inflamação sistêmica, hipotensão, redução da resposta ao vasoconstritores, hipóxia e dano tecidual. Interessantemente, o tratamento com sildenafil melhorou a hipoperfusão em estágios iniciais de sepse reduzindo a lesão de órgãos. Sendo assim, inibidores das fosfodiesterases, como o sildenafil, podem ser ferramentas terapêuticas úteis para o tratamento da sepse, desde que administrados na correta janela de oportunidade.

Palavras – chave: sepse, óxido nítrico, cGMP, Sildenafil

ABSTRACT

Septic shock, which is triggered by microbial products, is mainly characterized by an inadequate tissue perfusion caused by a decreased in blood pressure, vascular damage, hyporeactivity to vasoconstrictors and disseminated intravascular coagulation, which can lead to multiple organ dysfunction and death. Nitric oxide (NO) is an important player in the pathogenesis of sepsis and septic shock, having both protective and deleterious effects. Trials of nonselective NOS inhibitors have shown increased mean arterial pressure, but also increased pulmonary artery pressure and reduced cardiac output. Thus, despite the intense research, there was no clinical progress so far. Perhaps this is due to lack of comprehension of NO signaling pathways. There is a knowledge gap on the role of the NO-guanylate cyclase- guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate (cGMP) pathway during the early stages of sepsis. Most work has studied the role of cGMP by inhibiting the enzyme responsible for its production (guanylate cyclase), however, in this work we chose to try the increased cGMP levels by inhibiting an enzyme responsible for their degradation, phosphodiesterase 5 (PDE5). In the early stages of shock occurs an intense release of vasoconstrictors agents, which can lead to ischemia damage. In this scenario, cGMP could play a key role counterbalancing these agents and preventing tissue damage. Sildenafil, a type-5 cGMP phosphodiesterase inhibitor, increase GMP at smooth muscle cells and promotes vasodilation. Thus, the purpose of this study was to investigate the effect of treatment with sildenafil in the early stages of sepsis. Male Wistar rats were divided into 2 groups of 16 animals each and submitted to either Cecal Ligation and Puncture (CLP) or the sham procedure. Eight hours after the procedure, the CLP and sham groups were randomly assigned to receive sildenafil (10 mg/kg orally) or vehicle. Twenty-four hours after the CLP or sham procedure, the mean arterial blood pressure, systolic and diastolic blood pressure and vascular reactivity to phenylephrine were evaluated. Additionally, blood samples were collected for measurement of nitric oxide (nitrate and nitrite), urea, creatinine, AST, ALT, lactate and CK.; hematological analyzes were also performed. Statistical significance was analyzed by two-way ANOVA followed by post hoc Bonferroni. The results shows that the CLP was able to reproduce the main characteristics of humans sepsis like as, systemic inflammation, hypotension, reduced response to vasoconstrictors, hypoxia and tissue damage. Interestingly, treatment with sildenafil improved and the organ hypoperfusion at early stages of sepsis reducing organ injury. Thus, phosphodiesterase inhibition may be a useful therapeutic strategy if administered at the proper window of opportunity.

Keywords: sepsis, nitric oxide, cGMP, Sildenafil

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1.	Publicações (1988 - 2014) relacionadas a sepse/choque séptico e óxido nítrico.....	14
Figura 2.	Mecanismos de vasodilatação mediados pela via NO-sGC-cGMP.....	16
Figura 3	Esquema ilustrando as diferentes fases de produção de cGMP durante a sepse.....	19
Figura 4.	Representação esquemática do experimento.....	21
Figura 5.	Representação esquemática do modelo experimental de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	23
Figura 6.	Representação esquemática do procedimento realizado para avaliação dos parâmetros cardiovasculares.....	24
Figura 7.	Resultado da análise dos parâmetros cardiovasculares.....	30
Figura 8.	Resultado da reatividade vascular dos animais frente os vasoconstritor fenilefrina.....	31
Figura 9.	Avaliação dos marcadores plasmáticos de dano tecidual....	32
Figura 10.	Resultado das análises hematológicas.....	34
Figura 11.	Resultado da análise de Leucócitos.....	35
Figura 12.	Resultado da dosagem de nitrato e nitrito (NOx).....	36
Tabela 1.	A família das fosfodiesterases.....	17

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosina difosfato

ALT - Alanina aminotransferase

ANOVA - Análise de Variância

AST - Aspartato aminotransferase

ATP - Adenina trifosfato

CaM - Cálcio/calmodulina

cAMP - Adenosina 3,5-monofosfato cíclico

CASP - Perfuração do colo ascendente através de um stent

cGMP - Guanosina 3',5'- monofosfato cíclico

CK - Creatina quinase

CK-B - Isoenzima CK cerebral

CK-M - Isoenzima CK muscular

CLP - *Cecal ligation and puncture*; Ligadura e perfuração do ceco

CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

DBCA - Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos

DGKC - Sociedade Germânica de Química Clínica

DMSO - Disfunção de múltiplos órgãos

DPOC - Doença pulmonar obstrutiva crônica

EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético

EHNA - (eritro-9-(2-hidróxi-3-nonil) -adenina)

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima

eNOS - Enzima óxido nítrico sintetase endotelial

G6P-DH - Glicose-6-fosfato Dehidrogenase

GCs - Guanilato ciclase solúvel

GMP - Guanosina 5'- monofosfato

HK – Hexoquinase

IFCC - Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial

iNOS - Enzima óxido nítrico sintetase induzida

IP3 - Inositol trifosfato

LDH - Lactato desidrogenase

LPS – Lipopolissacarídeos

LTA - Ácido lipoteicóico

MDH - Malato desidrogenase

MLC - Cadeia leve de miosina

MLCK - Miosina quinase de cadeia leve

MODS - Síndrome de falência múltipla de órgãos

NAD - Nicotinamida Adenina Dinucleótido

NADH - Nicotinamida Adenina Dinucleótido reduzida

nNOS - Enzima óxido nítrico sintetase neuronal

NO - Óxido nítrico

NOS - Enzima óxido nítrico sintetase

(NO)-sGC-cGMP - Via do óxido nítrico

NOX - nitrato e nitrito

ODQ - [1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4, 3-a]quinoxalin-1-one], inibidor específico da guanilato ciclase solúvel

PAD - Pressão arterial diastólica

PAM - Pressão arterial média

PAS - Pressão arterial sistólica

PDEs – Fosfodiesterases

PE - Cânula de polietileno

PKG - Proteínas quinase dependentes de cGMP

SIRS - Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

$t_{1/2}$ - Meia vida de eliminação

TGO - Transaminase Glutâmica Oxalacética

TGP - Transaminase Glutâmica Pirúvica

TLR - Toll-like receptors

UEPG - Universidade Estadual de Ponta Grossa

UV – Ultravioleta

8-MeOM-IBMX - 8-metoximetil-3-isobutil-1-metil-xantina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	20
2.1 OBJETIVO GERAL.....	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	21
3.2 ANIMAIS.....	22
3.3 COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS.....	22
3.4 INDUÇÃO DE SEPSE POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP)....	22
3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E REATIVIDADE VASCULAR.....	23
3.6 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	24
3.6.1 Uréia.....	25
3.6.2 Creatinina.....	25
3.6.3 Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT).....	26
3.6.4 Creatina quinase (CK).....	26
3.6.5 Lactato.....	27
3.7 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	27
3.8 DOSAGEM DE NITRATO E NITRITO (NOx).....	27
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
4 RESULTADOS.....	29
4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E REATIVIDADE VASCULAR.....	29
4.2 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	31
4.3 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS.....	33
4.4 DOSAGEM DE NITRATO E NITRITO (NOX).....	35
5 DISCUSSÃO.....	37
6 CONCLUSÃO.....	47
7 REFERÊNCIAS.....	48

1 INTRODUÇÃO

A palavra sepse deriva do grego e se refere à decomposição de vegetais, animais e matéria orgânica, na presença de bactérias (GEROULANOS; DOUKA, 2006; FUNK et al., 2009). Durante muitas décadas os cientistas tentam desvendar os mistérios moleculares da sepse, buscando aperfeiçoamento no entendimento sobre a fisiopatologia da doença (FUNK et al., 2009).

A sepse é uma síndrome complexa que resulta de uma resposta do hospedeiro à patógenos invasores, principalmente bactérias, causando alterações cardiovasculares, imunológicas, metabólicas e hemodinâmicas, com liberação de diversos mediadores inflamatórios, evoluindo nos casos desfavoráveis para o choque séptico, culminando com a disfunção de múltiplos órgãos (DMSO) - (XING et al., 2012; AZIZ et al., 2013; SMEDING et al., 2012; RANGEL-FRAUSTO et al, 2005). Devido à complexidade da doença, a definição da sepse se torna muitas vezes confusa.

Em 1991, na Conferência de Consenso feita pela *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine*, foram estabelecidos critérios para a classificação da sepse e doenças similares, as quais foram enquadradas como síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (BONE et al., 1992). A SIRS é um conjunto de manifestações clínicas associadas à agressão orgânica, definida pela presença de pelo menos dois dos seguintes achados clínicos e laboratoriais:

- Temperatura: superior a 38,3 °C ou inferior a 36 °C;
- Frequência cardíaca: superior a 90 bpm;
- Frequência respiratória: superior a 20 ipm ou PaCO₂ inferior a 32 mmHg;
- Leucócitos: mais de 12.000/mm³ ou menos de 4.000/mm³ ou ≥ 10% de bastões

Além disso, ficou estabelecido que o termo sepse deverá ser utilizado apenas nos casos onde a infecção é documentada, pois a SIRS pode ser causada por diversas outras injúrias, tais como trauma, queimaduras, choque hemorrágico e pancreatite aguda. Portanto, a sepse pode ser definida como a resposta inflamatória sistêmica (SIRS) associada a um quadro infeccioso.

A sepse pode ser classificada de acordo com sua apresentação clínica em: sepse, sepse grave e choque séptico. Sepse grave é definida por sepse associada à disfunção de órgãos, hipoperfusão ou hipotensão. As anormalidades de perfusão podem incluir acidose láctica, oligúria ou alteração da consciência, mas não estão limitadas somente a esses sinais (DAVID, 2007). Choque séptico está associado à

falência circulatória aguda caracterizada pela persistência de hipotensão arterial não explicada, sendo definida como pressão arterial sistólica inferior a 90 mmHg ou redução de mais de 40 mmHg dos valores basais, com hipotensão irresponsiva à reposição volêmica adequada e disfunção de órgãos (LEVI et al., 2003), frequentemente evoluindo para síndrome de falência múltipla de órgãos (MODS) (CASTELLHEIM et al., 2009).

A sepse tem sido historicamente uma condição de difícil identificação e diagnóstico (MARTIN, 2012). É um problema de saúde pública emergente com alta incidência e altas taxas de mortalidade.

A incidência da população acometida pela sepse tem aumentado ao longo das últimas décadas. Isso se deve em parte ao aumento da expectativa de vida de idosos e pacientes com enfermidades graves, associado ao emprego descontrolado da antibioticoterapia (responsável pelo aumento do número de bactérias resistentes), ao número de procedimentos invasivos e de pacientes imunodeprimidos e à elevada frequência de infecções hospitalares (DUMA, 2005; RANGEL-FRAUSTO, 2005; MOHAJER et al., 2012). É a principal causa de morte em pacientes admitidos em unidades de terapia intensiva (DAVID et al, 2007; ANDRADES et al., 2011).

Anualmente, em todo mundo, ocorrem cerca de 18 milhões de casos de sepse grave (DAVID, 2007). Nos Estados Unidos, cerca de 750.000 pacientes desenvolvem sepse grave todos os anos, com um índice de mortalidade média de 40% (ANGUS et al., 2001). No Brasil, dados do *Brazilian Sepsis Epidemiological Study* apontam que a sepse apresenta uma taxa de mortalidade de aproximadamente 34%, sepse grave 47% e choque séptico 52% (SILVA et al., 2004). Em outro estudo feito em unidades de terapia intensiva brasileiras a mortalidade dos pacientes sépticos foi em média de 46,6%, sendo 34,4% na sepse grave e 65,3 % no choque séptico (SALES JÚNIOR et al., 2006).

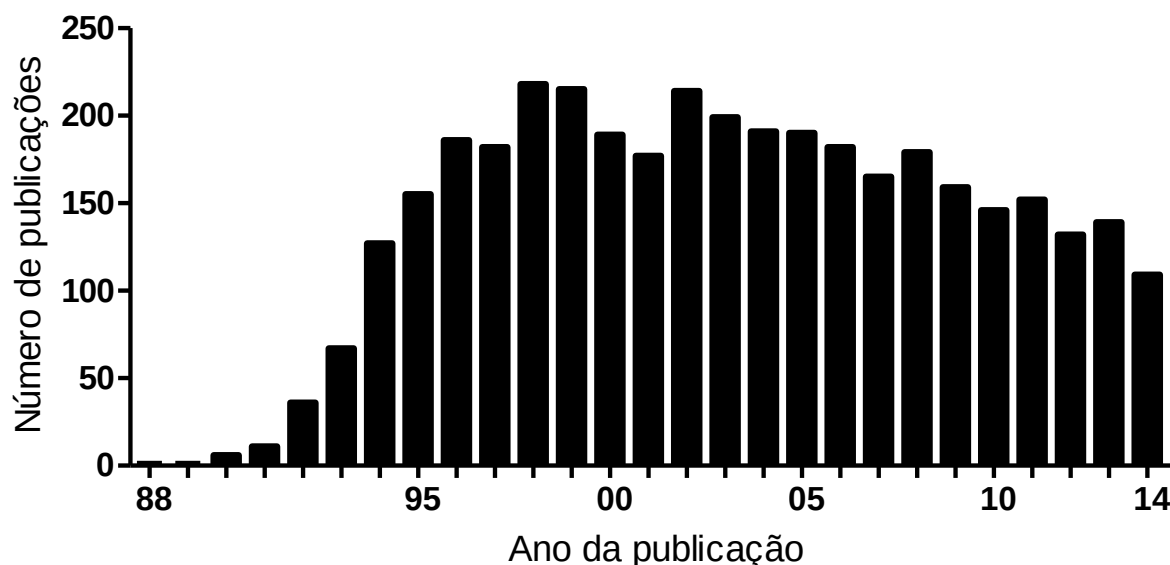
A maior causa da infecção na sepse é por bactérias, mas a resposta inflamatória também pode ser desencadeada por fungos e vírus (NDUKA; PARRILLO, 2009). As bactérias gram-positivas mais comumente isoladas são *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Entre as gram-negativas, destacam-se *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e *Pseudomonas aeruginosa* (VAN DER POLL et al, 2008). As fontes de infecção mais frequentes são pulmonar, abdominal, urinária, cutânea e cateteres vasculares (DAVID, 2007).

Estudos sugerem uma complexa interação entre inflamação, coagulação e diminuição da fibrinólise decorrentes da resposta imune induzida pela infecção bacteriana (OPAL; ESMON, 2003). A ativação da resposta imune ocorre a partir da liberação de “padrões moleculares associados ao patógeno”, ou seja, componentes da parede celular de microorganismos tais como endotoxinas de bactérias gram-negativas, conhecidos como lipopolissacarídeos (LPS), e exotoxinas derivadas de bactérias gram-positivas, os peptideoglicanos e o ácido lipoteicóico (LTA) (OPAL, 2007). Esses componentes bacterianos são liberados na corrente circulatória e interagem com receptores específicos na superfície de monócitos, denominados “toll-like receptors” (TLR), resultando em uma complexa cascata de eventos, envolvendo ativação de neutrófilos, macrófagos e linfócitos e a liberação de mediadores inflamatórios e químicos para a circulação (DUMA, 2005).

Durante o choque séptico, é essa complexa interação entre os diferentes mediadores inflamatórios e as alterações hemodinâmicas que dificulta o tratamento desta patologia, sendo este um dos motivos pelos quais o manejo do paciente em choque não sofreu alterações substanciais nas duas últimas décadas. A manobra terapêutica prioritária tem sido a manutenção da pressão arterial e do débito cardíaco, através de reposição de líquido e utilização de agentes inotrópicos e vasopressores (WHEELER; BERNARD, 1999). Em seguida, busca-se a identificação e eliminação do foco infeccioso através da utilização de antibióticos e em casos extremos, a remoção cirúrgica (HOLLENBERG et al., 2004).

O óxido nítrico (NO) está sendo cada vez mais implicado em processos fisiológicos e patológicos, tanto como um elemento benéfico quanto maléfico. A sepse e o choque séptico são condições em que o óxido nítrico desempenha um papel central na fisiopatologia (DAVID et al, 2007). Ele é considerado um dos principais fatores envolvidos na vasodilatação e no dano tecidual observado no desenvolvimento desta síndrome. Isto pode ser observado pelo aumento no número de publicações envolvendo sepse e NO, após a descoberta deste importante mediador em 1987 (Figura 1).

Figura 1 - Publicações (1988 - 2014) relacionadas a sepse/choque séptico e óxido nítrico.



Fonte: PubMed

O óxido nítrico é sintetizado pela reação de conversão da L-arginina em L-citrulina através da atividade catalítica da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Há três isoformas identificadas dessa enzima: neuronal (nNOS ou tipo 1), induzida (iNOS ou tipo 2) e endotelial (eNOS ou tipo 3). A expressão da isoforma induzida (iNOS) é regulada por citocinas, interleucinas e produtos bacterianos (LPS, por exemplo) (CLEMENTI, 2003; JANG et al, 2013). Embora alguns trabalhos mostrem o envolvimento da nNOS (DUMA et al., 2011; NARDI et al., 2014) e eNOS na fisiopatologia da sepse (CONNELLY et al., 2005; VO et al., 2005), é aceito que a maioria do NO relevante nesta condição é proveniente da isoforma induzida (DAVID, 2007).

Um dos principais efeitos biológicos apresentados pelo NO é a estimulação da guanilato ciclase solúvel (GCs), pois a partir da ativação da GCs ocorre a produção de guanosina 3',5'- monofosfato cíclico (cGMP) que é o responsável por muitos dos efeitos biológicos mediados pelo NO, como a vasodilatação (COLLINS et al., 1986), inibição da agregação plaquetária (RADOMSKI et al., 1987) e inibição da migração de leucócitos (AHLUWALIA et al., 2004). A importância da guanilato ciclase é revelada pelo amplo espectro de eventos biológicos regulados pelo cGMP, que incluem respostas da retina a estímulos luminosos, olfato, formação de esteróides, transporte iônico nos rins e no intestino, regulação da concentração intracelular de cálcio livre

(importante para a agregação plaquetária), regulação da contratilidade do músculo cardíaco, do músculo liso não-vascular e também do vascular (base para o desenvolvimento de drogas revolucionárias como o citrato de sildenafil – Viagra®). Além disso, disfunções na produção ou respostas ao cGMP estão associadas a situações patológicas, como no choque endotóxico, na diarreia secretória e na hipertensão, dentre outras. (para revisão ver SCHMIDT et al., 1993; BRIONI et al., 2002; SHARMA, 2002).

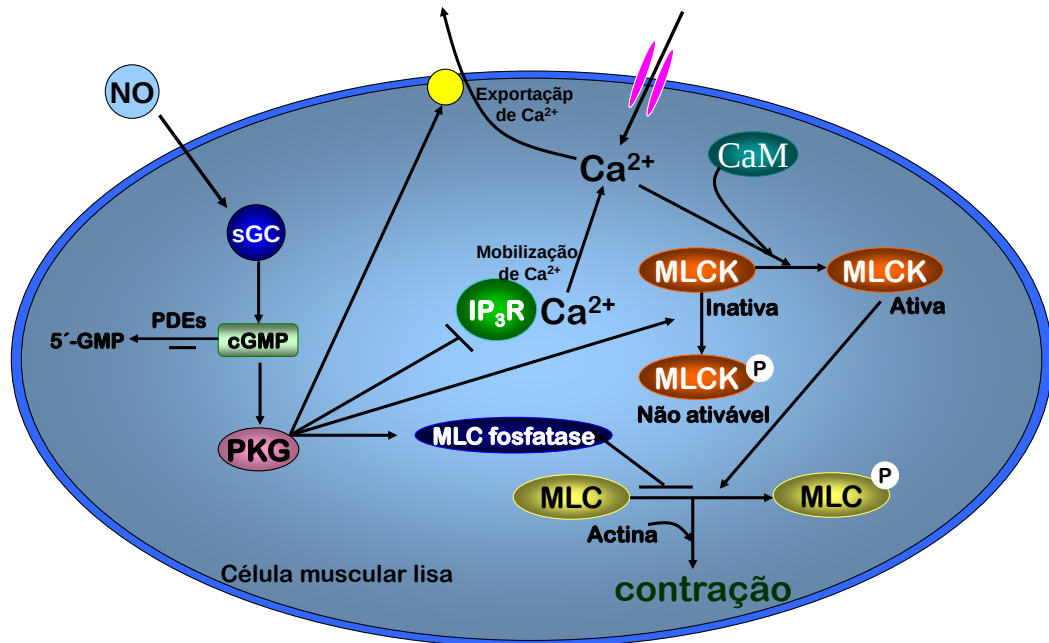
Existem pelo menos três proteínas intracelulares receptoras para o cGMP, as fosfodiesterases (PDEs), os canais de cátions abertos por cGMP e proteínas quinase dependentes de cGMP (PKG) que pertencem a uma família de proteínas quinases serina/treonina, responsáveis por grande parte dos efeitos do cGMP (para revisão detalhada ver HOFMANN et al., 2000; LUCAS et al., 2000).

O tônus da musculatura lisa é regulada pelo cálcio celular, o qual ativa a miosina quinase de cadeia leve (MLCK, do inglês *myosin light chain kinase*) dependente de cálcio/calmodulina (CaM), levando à fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC, do inglês, *myosin light chain*) com consequente contração. A via do NO causa relaxamento por estimular a guanilato ciclase, aumentando a produção de cGMP e ativando a PKG. A PKG gera relaxamento por mecanismos que ainda não são totalmente definidos, e que podem incluir: a) redução na concentração de cálcio citosólico, tanto por um aumento na exportação de cálcio como por reduzir a mobilização de cálcio mediada por inositol trifosfato (IP3), b) a desfosforilação da cadeia leve da miosina, por ativação de fosfatases ou pela manutenção da MLCK em uma forma fosforilada que não é passível de ativação pela cálcio-calmodulina (Figura 2; para revisão ver LUCAS et al., 2000).

O cGMP é inativado por hidrólise a guanosina 5'- monofosfato (GMP) através de enzimas da família das fosfodiesterases (PDEs). As fosfodiesterases constituem uma família com 11 diferentes membros (Tabela 1), distintas por características enzimáticas, estruturais, perfil de inibição farmacológica e distribuição tecidual (MAURICE et al., 2014). Entre as fosfodiesterases expressas principalmente em tecidos vasculares podemos citar as fosfodiesterases 2, 3, 4 e 5 (SURAPISITCHAT et al., 2007). Cada uma destas enzimas apresenta inibidores farmacológicos seletivos, alguns inclusive usados na clínica como é o caso dos inibidores da fosfodiesterase 5 (MAURICE et al., 2014). Os inibidores de PDEs podem elevar os níveis intracelulares do cAMP e cGMP, de acordo com a especificidade do substrato da PDE em particular

que é bloqueada. O Sildenafil é um inibidor potente e seletivo da PDE5, responsável pela modulação da atividade do cGMP, regulando, desta forma, sua degradação. Esta droga estimula a via do óxido nítrico (NO)-sGC-cGMP e, por conseguinte, promove efeitos de relaxamento e vasodilatação (DU PLESSIS et al., 2004).

Figura 2 - Mecanismos de vasodilatação mediados pela via NO-sGC-cGMP.



Fonte: Adaptado de BEAVO; BRUNTON, 2002

Tabela 1 - A família das fosfodiesterases

PDE	Substrato	Distribuição tecidual	Inibidores	Aplicações clínicas
PDE 1	cAMP/cGMP	Cérebro, músculo esquelético do coração, fígado, músculos vasculares e viscerais	Vinpocetina Nicardipina 8-MeOM-IBMX Nimodipina	Demência, perda de memória
PDE 2	cAMP/cGMP	Cérebro, coração, fígado, músculos viscerais e esqueléticos, corpo cavernoso, córtex adrenal, endotélio e plaquetas	EHNA	Síndrome da angústia respiratória aguda, perda de memória
PDE 3	cAMP/cGMP	Coração, cérebro, fígado, rim, tecido adiposo, células β pancreáticas, endotélio, epitélio, oócitos, plaquetas, corpo cavernoso, músculos viscerais e vasculares	Lixazinona Cilostamida Milrinona Cilostazol Dihydro-pyridazinona	Glomerulonefrite, insuficiência cardíaca congestiva, claudicação intermitente, trombose, hipertensão pulmonar
PDE 4	cAMP	Cérebro, testículos, leucócitos, músculos viscerais e vasculares	Rolipram Denbufyllina Cilomilast Roflumilast	Glomerulonefrite asma, DPOC, depressão bipolar, encefalomielite auto-imune
PDE 5	cGMP	Corpo cavernoso, plaquetas, músculos viscerais e vasculares, placenta, pâncreas, cérebro, fígado, pulmão	Sildenafil (Viagra) Zaprinast Dipiridamol Ariflo Vardenafil Tadalafil	Insuficiência renal crônica, hipertensão pulmonar, disfunção erétil, transplante de órgãos
PDE 6	cGMP	Fotorreceptores (retina) e glândula pineal	Zaprinast Dipiridamol Vardenafil Tadalafil	Os inibidores seletivos da PDE6 são poucos e tem pequenas aplicações devido a efeitos adversos sobre a visão.
PDE 7	cAMP	Tecidos incluindo o baço, cérebro, pulmão e rim, coração, músculo esquelético, células linfóides e mielóides	Dipiridamol Thiadiazol	Vias aéreas e doenças imunológicas
PDE 8	cAMP	Testículos, ovários, intestino e tireóide	Dipiridamol	Aplicações imunológicas
PDE 9	cGMP	Baço, cérebro, baço e células intestinais	Zaprinast	Possível efeito hipoglicêmico
PDE 10	cAMP/cGMP	Cérebro, testículos e tireóide	Dipiridamol Papaverina	Tratamento de esquizofrenia e outros distúrbios neuropsiquiátricos
PDE 11	cAMP/cGMP	Músculos esqueléticos, coração, músculos viscerais e vasculares, glândula salivar e pituitária, próstata, testículos, fígado e rins	Tadalafil Zaprinast Dipiridamol	Melhora das funções testiculares

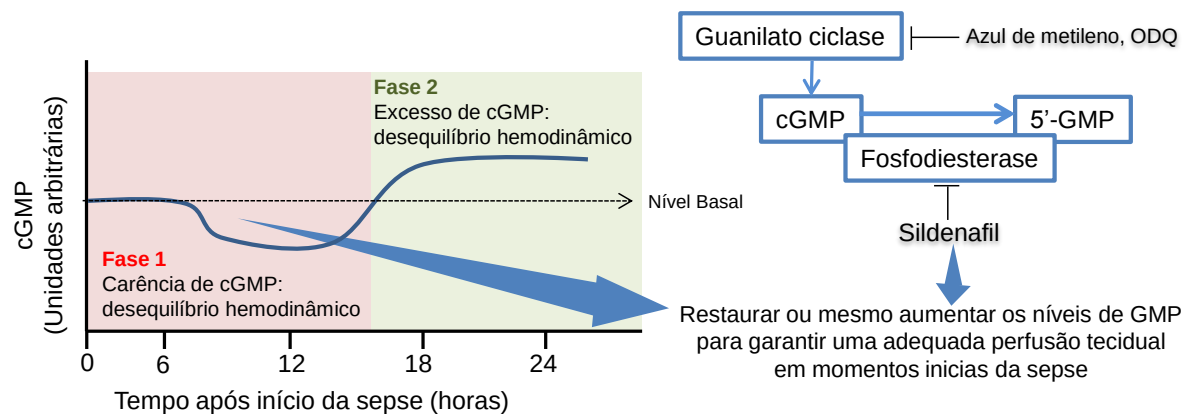
Muito já se estudou sobre o envolvimento do óxido nítrico na sepse, mas muito pouco se sabe sobre o papel da enzima guanilato ciclase solúvel e do segundo mensageiro cGMP durante a sepse. A maioria dos trabalhos relaciona a superprodução de NO com a patogênese de várias formas de choque, tais como a sepse e a anafilaxia, caracterizada por vasodilatação arteriolar, hipotensão e má resposta a vasoconstritores (JANG et al, 2013). Apesar da clara importância deste mediador, não houve um grande sucesso. Inclusive a tentativa de utilização de um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (NOS) na sepse foi frustrada (LOPEZ et al., 2004). Talvez isso seja devido à falta de compreensão do NO e suas vias de sinalização.

Recentemente, pesquisadores têm tentado demonstrar o papel da GCs e cGMP na sepse. Paula-Neto et al (2011) demonstraram que a inibição da GCs é benéfica na sepse através da recuperação da funcionalidade dos neutrófilos. Fernandes et al (2009) demonstraram que a inibição da GCs melhorou aspectos hemodinâmicos e reduziu a mortalidade, mas somente nos estágios tardios da sepse, pois quando inibida nos primeiros estágios ocorreu aumento da mortalidade. Cadirci et al (2011) afirmam através de seus resultados que o uso do Sildenafil protege contra danos nos pulmões e rins na sepse induzida em ratos pela inibição da degradação do cGMP.

A elevada produção de óxido nítrico durante a sepse gera uma excessiva ativação da enzima guanilato ciclase e aumento de cGMP. O cGMP tem sido implicado na queda de pressão arterial e hiporeatividade a vasoconstritores gerando prejuízo na perfusão tecidual. Concordando com isso, tem sido mostrado que a inibição da produção da cGMP através da utilização de inibidores da guanilato ciclase gera melhora hemodinâmica. Por outro lado, também tem sido mostrado que a inibição da guanilato ciclase na sepse pode gerar diminuição da oxigenação arterial e aumento da mortalidade. Esta controvérsia pode ser consequência das diferentes fases de produção de cGMP durante a sepse. Enquanto tem sido claramente demonstrado que em fases tardias da sepse ocorre aumento da expressão da enzima guanilato ciclase e excessiva produção de cGMP (Figura 3 - Fase 2), alguns dados mostram que a atividade da guanilato ciclase, e portanto a produção de cGMP, pode estar comprometida em momentos iniciais (Figura 3 - Fase 1) – (FERNANDES, 2006, 2009; NARDI, 2014). Portanto a inibição da guanilato ciclase neste momento pode privar o paciente de um mediador fundamental para a manutenção de um tônus vascular que

proporcione uma adequada perfusão tecidual. É importante salientar que nos momentos iniciais do choque ocorre uma intensa ativação do sistema simpático bem como do sistema renina-angiotensina, e que embora a sepse gere hiporeatividade a vasoconstritores, alguns leitos vasculares, como o leito renal, por exemplo, continuam respondendo normalmente ou até mesmo de forma acentuada (GUARIDO et al, 2014). Portanto a redução de cGMP nestes momentos pode levar a intensa vasoconstrição em alguns tecidos, que associada a baixa pressão arterial sistêmica, pode gerar intensa isquemia e dano tecidual.

Figura 3 - Esquema ilustrando as diferentes fases de produção de cGMP durante a sepse.



Fonte: A autora.

Diante destas evidências, o propósito deste trabalho é restaurar os níveis de cGMP através da inibição da fosfodiesterase em momentos iniciais, através do uso do Sildenafil, um inibidor potente e seletivo da PDE 5. Esta estratégia pode gerar uma melhora na perfusão tecidual, reduzindo a falência de órgãos durante a sepse. Isto pode prover um tempo vital para que os antimicrobianos e demais terapias de suporte usadas durante o tratamento da sepse/choque séptico possa fazer seu papel.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o efeito do Sildenafil sobre alterações vasculares e dano tecidual induzidos pelo choque séptico, através de um modelo de sepse induzida por ligação e perfuração cecal (CLP) em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar o modelo de sepse induzida por ligação e perfuração cecal (Cecal Ligation and Puncture - CLP);
- Avaliar o efeito do Sildenafil sobre as alterações vasculares e hemodinâmicas em animais sépticos;
- Avaliar o efeito do Sildenafil sobre as alterações hematológicas, bioquímicas e mediadores inflamatórios em animais sépticos.

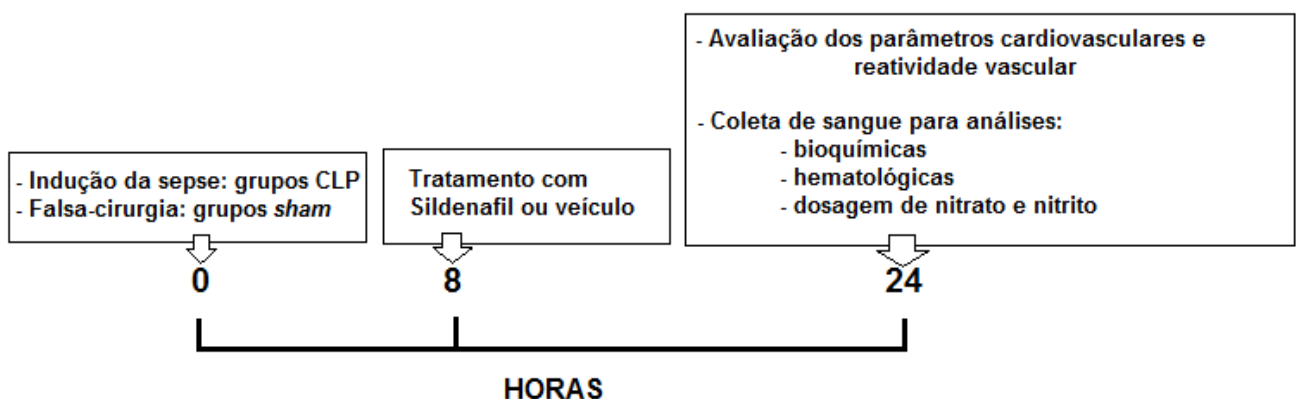
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em 4 grupos: dois grupos sham, um sem tratamento e outro com tratamento com Sildenafil; e dois grupos CLP, um sem tratamento e outro com tratamento com Sildenafil. Foram utilizados 8 animais por grupo. Depois de realizada a cirurgia nos grupos CLP e *sham* (falso-operados), os animais dos grupos com tratamento receberam Sildenafil (10 mg/Kg) por via oral através de gavagem, e os do grupo sem tratamento receberam água destilada por via oral, também por gavagem, 8 horas após a cirurgia. A dose de sildenafil foi escolhida com base em diversos trabalhos que avaliam aspectos tanto farmacocinéticos como farmacodinâmicos desse fármaco (CARDICI et al, 2011; MOUSTAFA et al, 2013; GOKAKIN et al, 2013, SHIH et al, 2013; SAMILLAN et al, 2013).

Os animais foram constantemente monitorados para avaliar os sinais clínicos e a mortalidade. Após 24 horas da cirurgia, foi feita a avaliação dos parâmetros cardiovasculares, o sangue e os tecidos foram coletados para serem feitas as demais análises, e por fim os animais foram sacrificados

Figura 4 - Representação esquemática do experimento



Fonte: A autora.

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar adultos, machos, de 3 meses de idade, pesando entre 200 a 300g. Os animais foram fornecidos pelo biotério central da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os mesmos foram mantidos, durante todo o período do experimento, em ambiente com temperatura de 21 ± 2 °C e ciclo de claro/escuro (12/12h) controlado automaticamente, bem como tiveram livre acesso à água e comida (ração Nuvilab CR-1, Quimtia S.A., Canguiri, Colombo, Paraná). Os animais somente permaneceram em jejum no período entre a cirurgia e a administração do Sildenafil, para que a absorção do medicamento não sofresse interferência do alimento. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UEPG (número do protocolo de aprovação 3578/2014) e os animais foram manipulados conforme recomendações da diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos (DBCA) do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.3 COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: Citrato de Sildenafil (Pfizer®), Cloridrato de Fenilefrina (Sigma-Aldrich, São Paulo, SP); heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP); cloridrato de quetamina (Sepso indústria e comércio Ltda, Paulínia, SP, Brasil); xilazina (Bayer; São Paulo, SP, Brasil). Os reagentes utilizados para preparo de soluções foram dissolvidos em água Milli-Q.

3.4 INDUÇÃO DE SEPSE POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP)

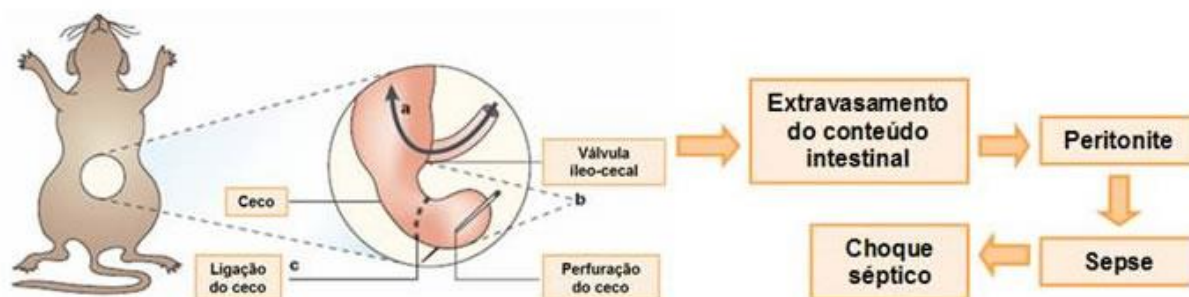
A indução de sepse foi realizada pelo modelo CLP (*Cecal Ligation and Puncture*), descrito inicialmente por Wichtermann et al., (1980) e Baker et al., (1983). A Figura 5 traz uma representação esquemática deste modelo. Os ratos foram anestesiados com uma solução anestésica de quetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intramuscular.

Após a realização de tricotomia na região abdominal, os ratos foram colocados em mesa cirúrgica e foi realizada assepsia local com álcool a 70%. Os ratos foram, em seguida, submetidos a uma laparotomia com incisão longitudinal de, aproximadamente, 1 cm e subsequente exposição do ceco. Este foi semi-ocluído com

fio de seda, na região próxima à válvula íleocecal. O ceco foi perfurado duas vezes com agulha estéril (40 x 12) e, logo após, levemente comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. Em seguida, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal, a qual foi suturada com fio de seda. Posteriormente, a musculatura e pele também foram suturadas e feita a assepsia da região abdominal com álcool. Os ratos “falso” operados ou *Sham* foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos não sofrendo, contudo, semi-oclusão e perfurações no ceco. Os ratos receberam hidratação com solução fisiológica (5mL/ 100g) por via subcutânea, para reposição de fluido (RITTIRSCH et al, 2009).

Durante a recuperação da anestesia, a qual levou em torno de 60 a 120 minutos, os ratos foram colocados em uma caixa devidamente aquecida. Além disso, foram observados os sinais clínicos de instalação de uma resposta inflamatória sistêmica como piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação.

Figura 5 - Representação esquemática do modelo experimental de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP).



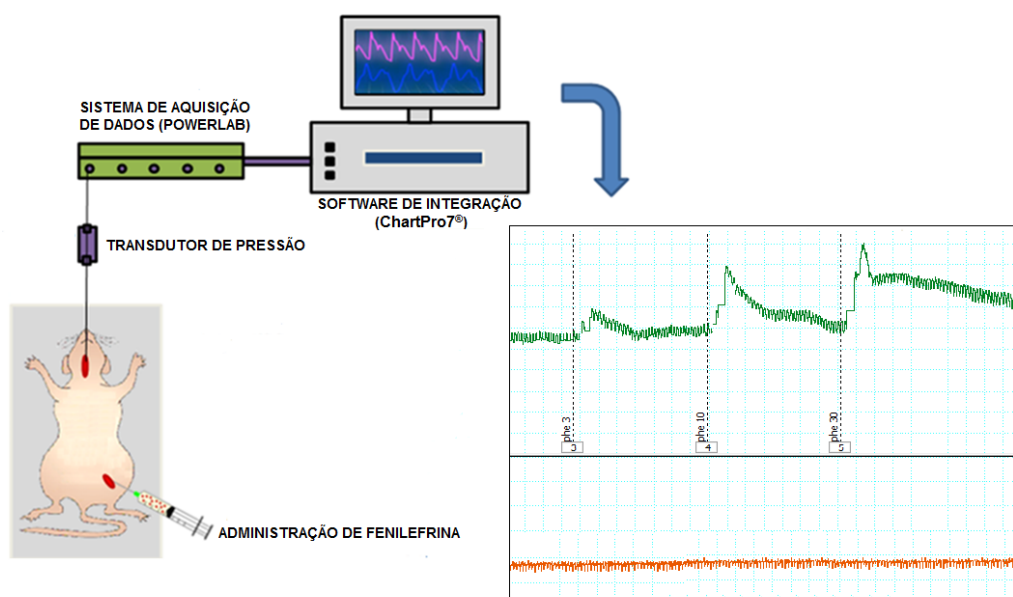
Fonte: Adaptado de BURAS et al., 2005.

3.5 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E REATIVIDADE VASCULAR

Os animais foram anestesiados com uma solução anestésica de quetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intramuscular. Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35 e 36°C). Após a localização da veia femoral foi feito a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso venoso tem por objetivo a administração do vasoconstritor fenilefrina. Depois disso, a

artéria carótida esquerda foi localizada, e de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. Foi feito então a inserção de um cateter de polietileno (Angiocath® número 19), devidamente heparinizado, o qual foi amarrado na artéria e conectado a um transdutor de pressão acoplado ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Os valores de pressão arterial média, sistólica e diastólica (em mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados em um computador por um software de integração (ChartPro7®). Após um período de 30 minutos de estabilização, a reatividade vascular para fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg) foi avaliada. A Figura 6 mostra de maneira mais clara o procedimento realizado. Ao final do experimento os animais foram sacrificados por sobredosagem anestésica.

Figura 6 - Representação esquemática do procedimento realizado para avaliação dos parâmetros cardiovasculares



Fonte: A autora.

3.6 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

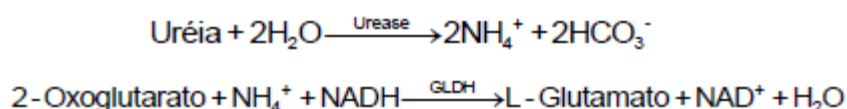
A coleta de sangue dos animais foi realizada logo após a avaliação dos parâmetros cardiovasculares. Foi utilizado o acesso feito na artéria carótida para coleta do sangue. Foram dosados os níveis de uréia, creatinina, aspartato

aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), creatina quinase (CK) e lactato, utilizando kits comercialmente disponíveis.

3.6.1 Uréia

A Uréia é o produto final nitrogenado proveniente do catabolismo das proteínas. Estados associados com elevados níveis de uréia no sangue são referidos a hiperuremia ou azotemia.

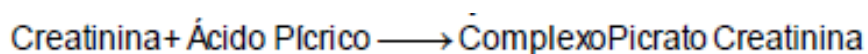
A uréia foi dosada através do kit Uréia UV (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ), no equipamento Selectra Júnior automatizado. O princípio deste kit é a hidrólise da uréia à amônia pela urease. A amônia reage com 2-Cetoglutarato e NADH em reação catalisada pela glutamato dehidrogenase promovendo a oxidação do NADH a NAD. A consequente redução da absorbância medida a 340nm é proporcional a concentração de uréia.



3.6.2 Creatinina

A creatinina é um produto de degradação da creatina, excretada pelos rins, principalmente pela filtração glomerular. O aumento dos valores de creatinina no plasma sempre indica diminuição da excreção, ex. função renal prejudicada.

A creatinina foi dosada através do kit Creatinina (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ), no equipamento Selectra Júnior automatizado. O método utilizado por este kit é cinético sem desproteinização de acordo com o método Jaffé. De acordo com este método, a creatinina forma um complexo colorido laranja-avermelhado em uma solução picrato alcalino. A diferença de absorbância em tempo fixo durante a conversão é proporcional a concentração da creatinina na amostra.



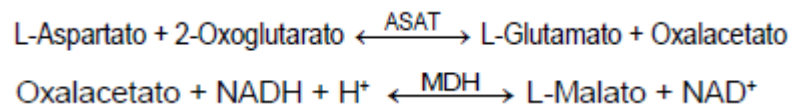
3.6.3 Aspartato aminotransferase (AST) e Alanina aminotransferase (ALT)

Alanina Aminotransferase (ALAT/ALT) formalmente chamada Transaminase Glutâmica Pirúvica (TGP) e Aspartato Aminotransferase (ASAT/AST), formalmente chamada Transaminase Glutâmica Oxalacética (TGO) são as mais importantes enzimas representativas do grupo de enzimas, de Aminotransferase ou Transaminase, o qual catalisa a conversão dos ácidos α -ceto em amino pela transferência do grupo amino.

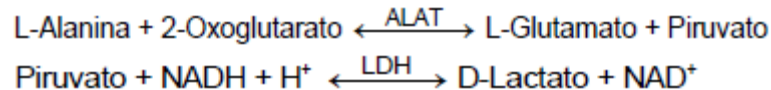
A AST e ALT foram dosadas através dos kits TGO (AST) e TGP (ALT), respectivamente (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ), no equipamento Selectra Júnior automatizado. É um método UV otimizado de acordo com IFCC (Federação Internacional de Química Clínica e Medicina Laboratorial).

Princípio dos testes:

➤ AST



➤ ALT

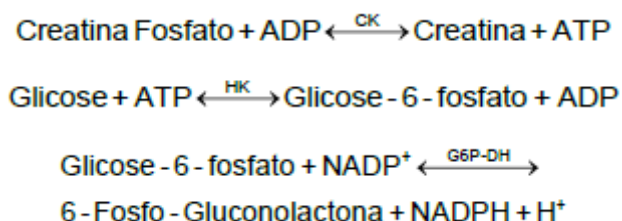


3.6.4 Creatina quinase (CK)

Creatina quinase (CK) é uma enzima que consiste de isoenzimas principalmente do músculo (CK-M) e o cérebro (CK-B). CK existe no soro na forma de dímero como CK-MM, CK-MB, CK-BB e como macroenzima. Valores elevados de CK são observados em danos ao músculo cardíaco e doenças do músculo esquelético.

A CK foi dosada através do kit CK-NAC (Siemens Healthcare Diagnostics Inc. - Estados Unidos), no equipamento Advia® 1200. É um teste UV otimizado de acordo com DGKC (Sociedade Germânica de Química Clínica) e IFCC (Federação Internacional de Química Clínica).

Princípio do teste:

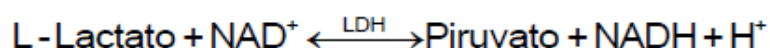


3.6.5 Lactato

Lactato é o produto final da glicólise anaeróbica e é utilizada como indicador para o estado de oxigenação em tecidos celulares.

O lactato foi dosado através do kit Lactato (Kovalent do Brasil Ltda., São Gonçalo – RJ), no equipamento Selectra Júnior automatizado. O método é UV enzimático utilizando Lactato Desidrogenase (LDH).

Princípio do teste:



3.7 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

A contagem hematológica das amostras de sangue total (EDTA) foi realizada no contador hematológico automatizado Cell-Dyn 1400 (Abbott Diagnostics, Abbott Park, Illinois, EUA), e a contagem diferencial de leucócitos através da leitura de lâmina corada pelo método de May-Grünwald-Giemsa em microscópio óptico.

3.8 DOSAGEM DE NITRATO E NITRITO (NO_x)

A metodologia utilizada para a dosagem dos valores de NO_x já foi descrita detalhadamente (GRANGER et al., 1990). Basicamente, o plasma foi diluído 1:1 com água de Milli-Q e desproteínizado pela adição de sulfato de zinco (2%). Para a conversão do nitrato para nitrito, as amostras foram incubadas a 37° C durante 2 horas, em presença da nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria, sendo 100 µl do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q) em placas de 96 poços para leitura a 540 nm num leitor de placas. Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas

simultaneamente. Como, nestas condições, a conversão de nitrato para nitrito foi sempre maior que 90%, não foi realizada nenhuma correção dos resultados. Finalmente, por meio de regressão linear, os valores foram expressos como μM de NO_x (nitrato e nitrito).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (S.E.M). A análise estatística foi realizada pela Análise de Variância de duas vias (ANOVA de duas vias) seguida pelo teste post-hoc de Bonferroni. Os dados apresentaram distribuição normal e variâncias homogêneas, estas condições foram verificadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett, respectivamente. O nível de significância aceito para os testes foi de $P < 0,05$. Todos os testes foram realizados utilizando o software estatístico GraphPadPrism (versão 5.01, San Diego, Califórnia, EUA).

4 RESULTADOS

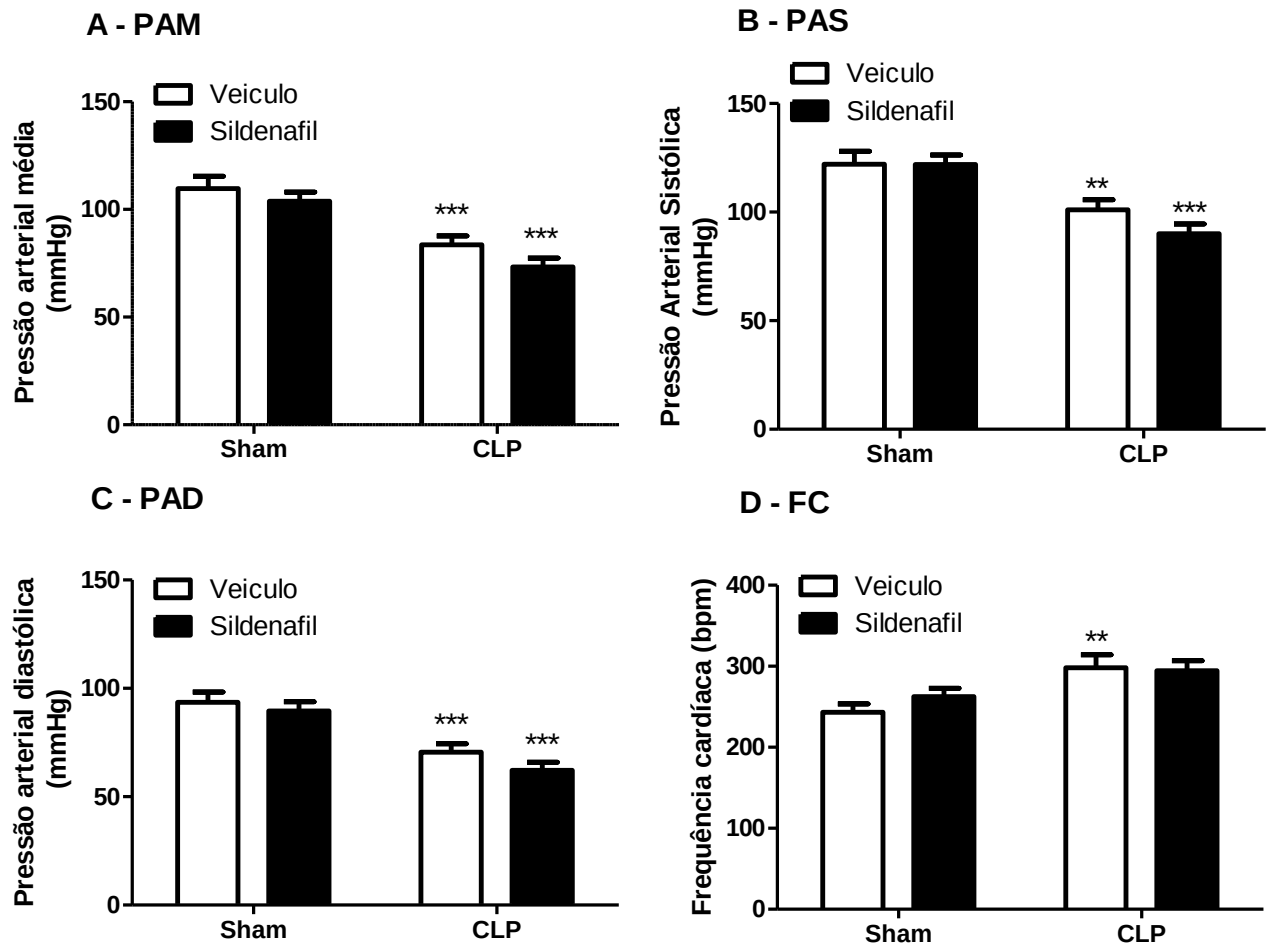
4.1 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E REATIVIDADE VASCULAR

Foram analisados os seguintes parâmetros cardiovasculares: pressão arterial média (PAM), pressão arterial sistólica (PAS), pressão arterial diastólica (PAD), frequência cardíaca e reatividade vascular ao vasoconstritor fenilefrina.

Houve uma redução significativa na pressão arterial média, sistólica e diastólica nos animais sépticos (grupos CLP veículo e CLP sildenafil) como mostrado na Figura 7, painéis A-C. Além disso, os animais do grupo CLP veículo tiveram um aumento da frequência cardíaca em relação ao grupo *sham* veículo (Figura 7, painel D). O tratamento com sildenafil não alterou os valores de pressão arterial e frequência cardíaca do grupo Sham ou CLP (Figura 7, painéis A-D).

A Figura 8 mostra um aumento dose resposta da pressão arterial gerado pela fenilefrina. O CLP gerou uma redução na resposta à fenilefrina. Este efeito é mais evidente nas doses maiores (10 e 30 nmol/kg). O tratamento com sildenafil não alterou a variação na pressão arterial gerada pela fenilefrina.

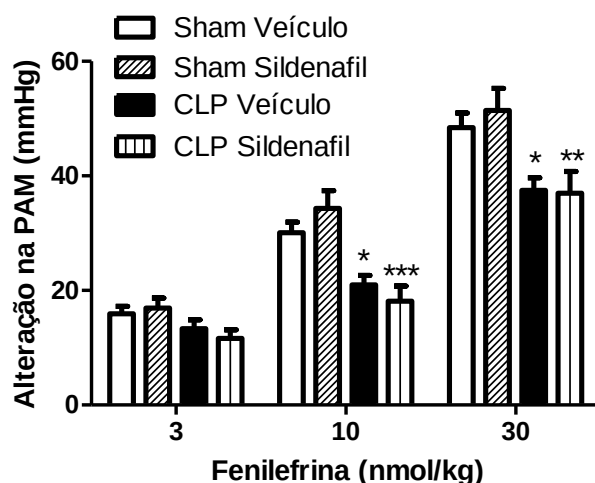
Figura 7 - Resultado da análise dos parâmetros cardiovasculares.



Fonte: A autora

Nota: O procedimento CLP (*Cecal ligation and puncture*) para indução da sepse foi realizado nos animais dos grupos CLP e a falsa-cirurgia nos animais sham. Após 8 horas da cirurgia os animais receberam veículo (água, 1 mL/Kg) ou sildenafil (10 mg/Kg) por gavagem. A pressão arterial média (painel A), pressão arterial sistólica (painel B), pressão arterial diastólica (painel C) e frequência cardíaca (painel D) foram avaliados 24 horas após a realização das cirurgias. Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 8 animais. (**p < 0,01, grupo CLP veículo em relação ao grupo sham veículo; ***p < 0,001, comparado com o respectivo grupo controle)

Figura 8 - Resultado da reatividade vascular dos animais frente os vasoconstritor fenilefrina.



Fonte: A autora

Nota: O procedimento CLP (*Cecal ligation and puncture*) para indução da sepse foi realizado nos animais dos grupos CLP e a falsa-cirurgia nos animais *sham*. Após 8 horas da cirurgia os animais receberam veículo (água, 1 mL/Kg) ou sildenafil (10 mg/Kg) por gavagem. A reatividade vascular foi avaliada 24 horas após a realização das cirurgias. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. (* $p < 0,05$, grupo CLP veículo em relação ao grupo sham veículo; ** $p < 0,01$, grupo CLP sildenafil em relação ao grupo sham sildenafil, *** $p < 0,001$, grupo CLP sildenafil em relação ao grupo sham sildenafil).

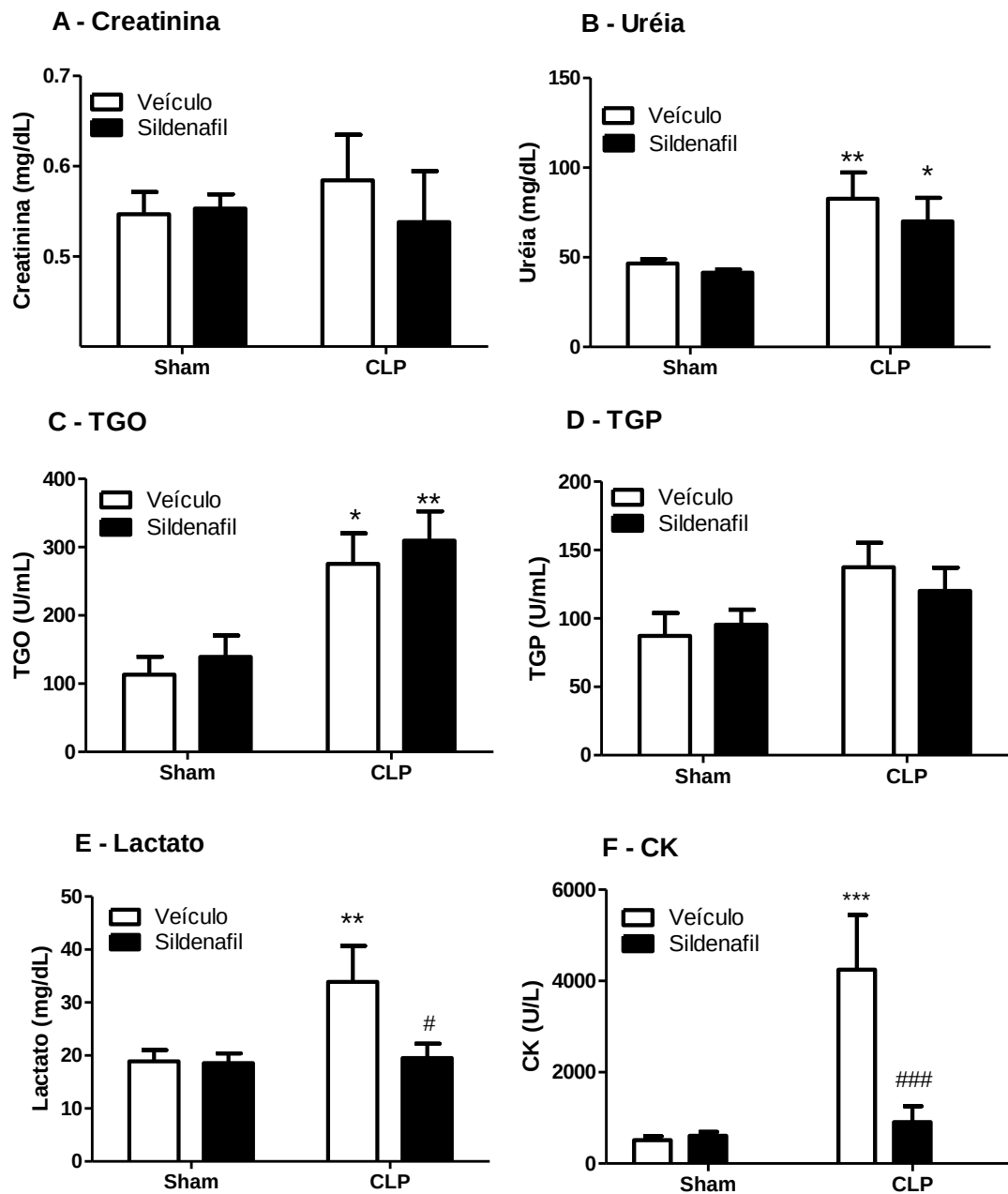
4.2 AVALIAÇÕES BIOQUÍMICAS

A dosagem de creatinina não apresentou diferença significativa entre os grupos (Figura 9, painel A). Já os grupos CLP apresentaram aumento dos valores de uréia em relação aos grupos *sham* (Figura 9, painel B). O tratamento com sildenafil não preveniu o aumento da uréia nos animais.

Os níveis de TGP (Figura 9, painel D) não foram alterados pelo procedimento CLP ou pelo tratamento com sildenafil. Por outro lado, o CLP gerou um aumento nos níveis de TGO (Figura 9, painel C). O tratamento com sildenafil não alterou os níveis de TGO.

Observando o gráfico dos níveis de lactato (Figura 9, painel E) e CK (Figura 9, painel F), podemos perceber que os animais do grupo CLP veículo tem um aumento significativo de lactato e CK quando comparado aos animais *sham*. O tratamento com sildenafil preveniu o aumento destes dois marcadores, já que os níveis de lactato e CK do grupo CLP sildenafil estão próximos dos níveis dos grupos *sham*.

Figura 9 - Avaliação dos marcadores plasmáticos de dano tecidual.



Fonte: A autora

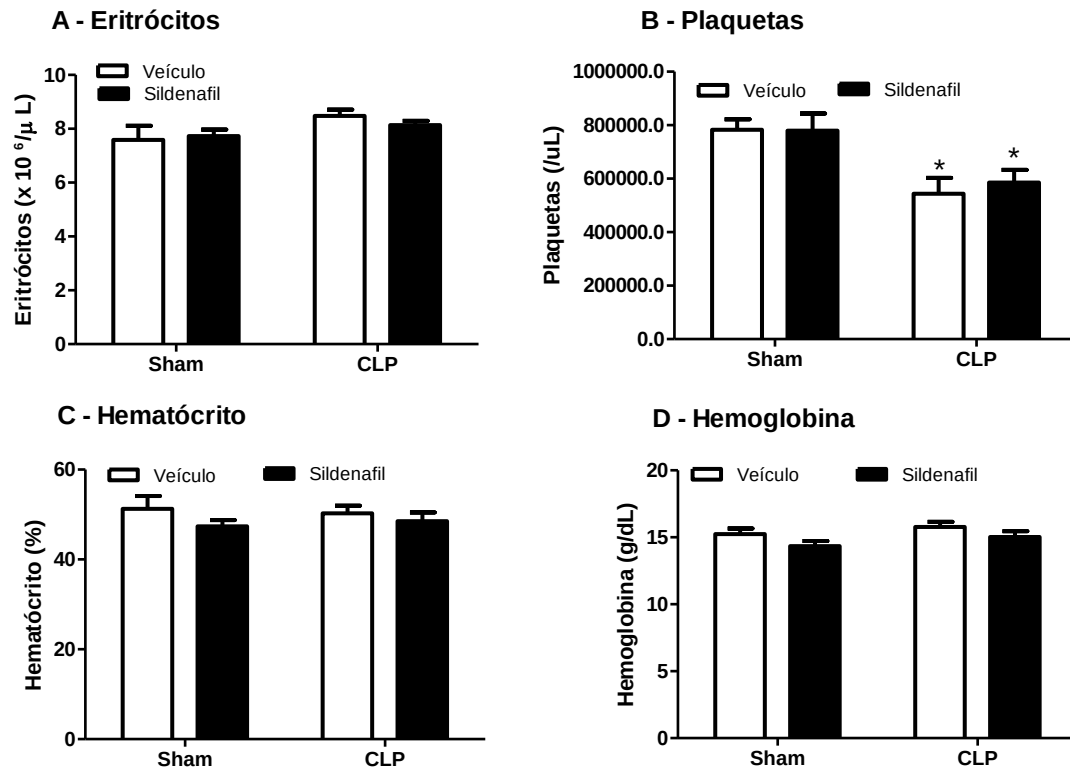
Nota: O procedimento CLP (*Cecal ligation and puncture*) para indução da sepse foi realizado nos animais dos grupos CLP e a falsa-cirurgia nos animais sham. Após 8 horas da cirurgia os animais receberam veículo (água, 1 mL/Kg) ou sildenafil (10 mg/Kg) por gavagem. O sangue dos animais foi coletado 24 horas após a realização das cirurgias para quantificação dos níveis plasmáticos de creatinina (painel A), uréia (painel B), TGO (painel C), TGP (painel D), lactato (painel E) e CK (painel F). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. (* $p < 0,05$, comparado com o respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$, comparado com o respectivo grupo controle; # $p < 0,05$, grupo CLP sildenafil em relação ao grupo CLP veículo).

4.3 ANÁLISES HEMATOLÓGICAS

Foram analisados os seguintes parâmetros no hemograma dos animais: contagem de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, hematócrito, hemoglobina e contagem diferencial de neutrófilos e linfócitos, como mostra a Figura 10.

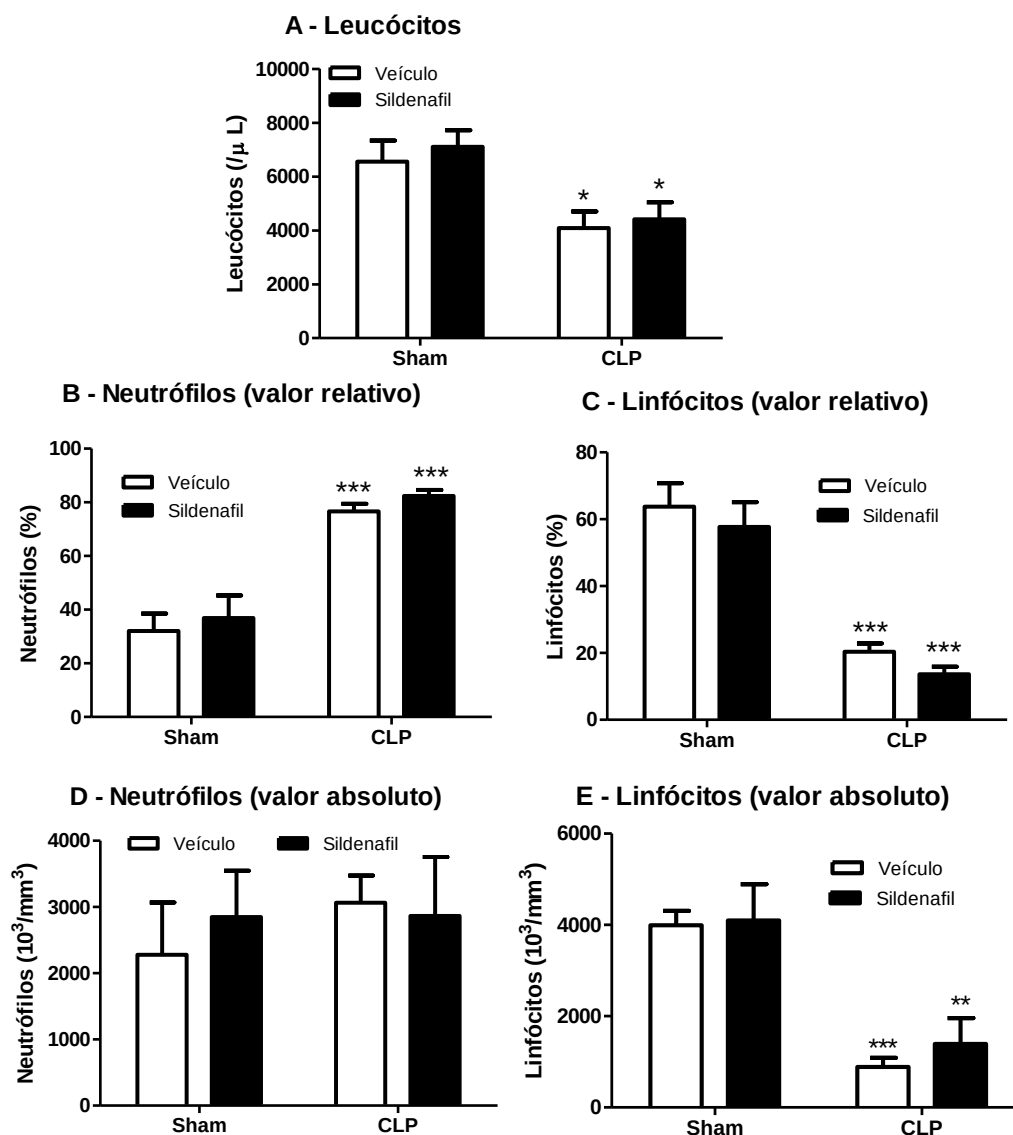
A contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina (Figura 10, painéis A, C e D) não apresentou diferença significativa entre os grupos. Porém, houve uma redução na contagem de plaquetas (Figura 10, painel B) nos grupos CLP comparado aos animais dos grupos *sham*. Observando-se a contagem de leucócitos (Figura 11, painel A), percebe-se que os animais dos grupos CLP tem contagem de leucócitos menor do que os animais dos grupos *sham*. Em relação à contagem diferencial dos leucócitos, os animais sépticos apresentam aumento do valor relativo de neutrófilos, com valor absoluto normal, ou seja, semelhante aos animais *sham* (Figura 11, painéis B e D). Os animais CLP apresentaram diminuição do valor relativo e absoluto de linfócitos (Figura 11, painéis C e E). Em todos os parâmetros hematológicos analisados, o tratamento com sildenafil não apresentou diferença significativa.

Figura 10 - Resultado das análises hematológicas.



Fonte: A autora

Nota: O procedimento CLP (*Cecal ligation and puncture*) para indução da sepse foi realizado nos animais dos grupos CLP e a falsa-cirurgia nos animais sham. Após 8 horas da cirurgia os animais receberam veículo (água, 1 mL/Kg) ou sildenafil (10 mg/Kg) por gavagem. O sangue dos animais foi coletado 24 horas após a realização das cirurgias e foram analisados eritrócitos (painel A), plaquetas (Painel B), hematócrito, (painel C) e hemoglobina (painel D). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. (* $p < 0,05$, comparado com o respectivo grupo controle; *** $p < 0,001$, comparado com o respectivo grupo controle).

Figura 11 - Resultado da análise de Leucócitos.

Fonte: A autora

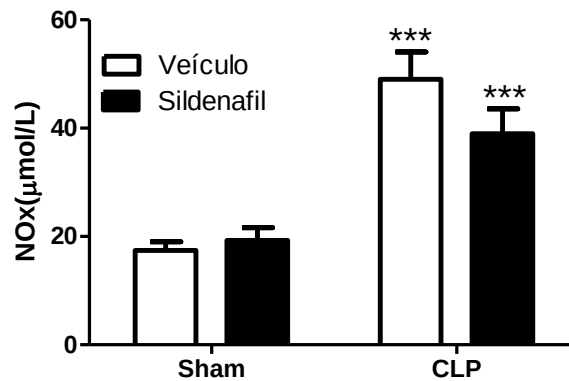
Nota: O procedimento CLP (*Cecal ligation and puncture*) para indução da sepse foi realizado nos animais dos grupos CLP e a falsa-cirurgia nos animais *sham*. Após 8 horas da cirurgia os animais receberam veículo (água, 1 mL/Kg) ou sildenafil (10 mg/Kg) por gavagem. O sangue dos animais foi coletado 24 horas após a realização das cirurgias e foram analisados leucócitos (painel A), neutrófilos (Painéis B e D) e linfócitos (painéis C e E). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. (* $p < 0,05$, comparado com o respectivo grupo controle; ** $p < 0,01$, comparado com o respectivo grupo controle, *** $p < 0,001$, comparado com o respectivo grupo controle).

4.4 DOSAGEM DE NITRATO E NITRITO (NOX)

Os níveis de nitrato e nitrito (NO_x), que servem como indicadores da produção de óxido nítrico, foram determinados e estão apresentados na Figura 12.

Houve um aumento significativo dos níveis de NOx nos grupos CLP quando comparado aos grupos *sham*. O tratamento com sildenafil não alterou os níveis de NOx.

Figura 12 - Resultado da dosagem de nitrato e nitrito (NOx).



Fonte: A autora

Nota: O procedimento CLP (*Cecal ligation and puncture*) para indução da sepse foi realizado nos animais dos grupos CLP e a falsa-cirurgia nos animais *sham*. Após 8 horas da cirurgia os animais receberam veículo (água, 1 mL/Kg) ou sildenafil (10 mg/Kg) por gavagem. O sangue dos animais foi coletado 24 horas após a realização das cirurgias para realização da dosagem de nitrato e nitrito (NOx). Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão da média de 8 animais. (***) $p < 0,001$, comparado com o respectivo grupo controle).

5 DISCUSSÃO

As alternativas terapêuticas na sepse permanecem um desafio devido principalmente à complexidade desta síndrome. Embora muito tenha sido pesquisado, pouca coisa tem sido aplicada com sucesso na prática clínica. Atualmente o que é feito na clínica são intervenções básicas preconizadas nos hospitais, como antibioticoterapia, remoção do foco infeccioso quando possível, administração de corticoides, reposição de volume, entre outros, sem nenhum tratamento específico para a sepse.

Nos estudos de sepse, são utilizados modelos animais que podem ser divididos em três categorias principais: a) administração exógena de uma toxina, como LPS ou zimosan, modelos de endotoxemia; b) administração exógena de patógenos viáveis, principalmente de bactérias; e c) rompimento das barreiras protetoras endógenas dos animais, como os modelos CLP (ligação e perfuração do ceco) e CASP (perfuração do colo ascendente através de um *stent*).

O modelo CLP, escolhido para indução da sepse no nosso estudo, é um dos modelos que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (BROOKS et al., 2007). Modelos como injeção de LPS, por exemplo, são altamente reprodutíveis, permitindo administrar com precisão a mesma carga de toxina em todos os animais. Mas embora reproduzam algumas características da sepse humana, como a hiporreatividade a vasoconstritores e o aumento da produção de NO, não representam um processo infeccioso, sendo portanto, mais distante da condição observada na clínica (BURAS et al., 2005). Neste sentido, o modelo CLP apresenta maior relevância para a compreensão da evolução da doença comparado à outros modelos de indução de sepse.

Utilizando um modelo experimental de choque séptico Fernandes et al. (2009) demonstrou que a inibição da guanilato ciclase em momentos tardios melhora a hemodinâmica e reduz a mortalidade. Porém a inibição em momentos precoces do choque séptico aumenta a mortalidade. Estes dados sugerem um papel protetor do cGMP no momentos iniciais e deletério em momentos tardios (FERNANDES E ASSREUY, 2008). Cabe salientar que em momentos tardios da sepse ocorre um

aumento da expressão da enzima guanilato ciclase com consequente aumento da produção de cGMP (FERNANDES et al., 2009; NARDI et al., 2014). O excesso de cGMP nos momentos tardios contribui para a redução na pressão de arterial e para hiporreatividade a vasoconstritores (FERNANDES et al., 2006, 2009). Porém nos momentos iniciais do choque a produção de cGMP ainda se encontra em uma faixa de concentração basal (FERNANDES et al., 2009), e provavelmente a inibição da guanilato ciclase neste momento priva o indivíduo de um mediador fundamental para a manutenção de um tônus vascular que proporcione uma adequada perfusão tecidual. É importante salientar que nos momentos iniciais do choque ocorre uma intensa ativação do sistema simpático bem como do sistema renina-angiotensina. Portanto, diante da liberação intensa de agentes vasoconstritores, o cGMP pode desempenhar um papel fundamental para contrabalancear estes agentes evitando isquemia e dano tecidual.

Enquanto os trabalhos da literatura (GALILI et al, 1997; DEMIRBILEK et al, 2006; FERNANDES et al., 2006, 2009), tem estudado o papel do cGMP através da inibição da enzima responsável pela sua produção (guanilato ciclase), neste trabalho optamos por tentar o aumento do níveis de cGMP por inibir uma das enzimas responsáveis pela sua degradação, a fosfodiesterase 5 (PDE5). O Sildenafil é um inibidor potente e seletivo da PDE5, responsável pela modulação da atividade do cGMP, regulando, desta forma, sua degradação. Esta droga estimula a via do óxido nítrico (NO)-cGMP e, por conseguinte, promove efeitos de relaxamento e vasodilatação (CORBIN et al., 2003; DU PLESSIS; JONGH; FRANKEN, 2004).

O sildenafil foi resultado de um programa que iniciou em 1985 na Sede de Investigação Européia Pfizer em Sandwich, UK, com finalidade de desenvolver um inibidor de PDE5 para estimular a via NO-GMPc para o tratamento de angina pectoris em pacientes com doença arterial coronária. Esta droga foi patenteada em 1996, e aprovada para o uso terapêutico na disfunção erétil em 1998 (BALLARD et al., 1996; BOOLELL et al., 1996; SCHWARZ et al., 2007). Atualmente, esta droga vem revolucionando o tratamento da hipertensão pulmonar (ZHAO et al, 2001), mostrou eficácia contra a disfunção endotelial em transplantados do coração (BREMER et al, 2005), e há um estudo mostrando efeito protetor na isquemia renal (LLEDO-GARCIA et al., 2007).

O sildenafil é um potente inibidor da PDE5 com alta seletividade (>1000 vezes) para esta isoenzima humana em comparação à PDE2, PDE3 e PDE4, e moderada seletividade (>80 vezes) sobre a PDE1 (GUPTA et al, 2005).

A PDE5 é encontrada em uma variedade de tecidos, incluindo a vasculatura arterial e venosa, células endoteliais, plaquetas, rins, pulmão, músculo, cérebro, retina, timo, coração, fígado, esôfago, estômago, pâncreas e intestino delgado (IMPENS et al, 2011).

A dose de sildenafil foi escolhida com base no estudo de sua farmacocinética em ratos (SHIN et al, 2006), e em diversos trabalhos que utilizaram a mesma faixa de dose (CARDICI et al, 2011; MOUSTAFA et al, 2013; GOKAKIN et al, 2013; SHIH et al, 2013; SAMILLAN et al, 2013).

Estudos sobre farmacocinética indicam que doses orais únicas (25-100mg) de sildenafil administradas em jejum a voluntários sadios do sexo masculino são rapidamente absorvidas, com concentrações plasmáticas máximas alcançadas 0,5-2 horas após sua administração e meia vida de eliminação ($t_{1/2}$) de 3-5 horas (LABORATÓRIOS PFIZER, 1998).

Com base nos resultados dos animais do grupo sham sildenafil (Figura 9, painéis A-D) observamos que a dose escolhida não apresentou efeito tóxico nos animais, pois não houve dano hepático ou renal pelo uso da dose de 10 mg/Kg.

No nosso estudo observamos que os animais CLP apresentaram diversas características encontradas no choque séptico como hipotensão (Figura 7, painéis A-C), hiporreatividade a vasoconstritores (Figura 8), dano tecidual (Figura 9, painéis B, C e F) e hipóxia (Figura 9, painel E). Isto indica que o modelo reproduz várias características da sepse humana. Além disso, foram observados sinais clínicos de instalação de uma resposta inflamatória sistêmica como piloereção, sangramento ocular, prostração e diminuição da movimentação.

A sepse é uma patologia bastante estudada e o envolvimento do rim nesta síndrome é consenso geral (THIJS & THIJS, 1998). As alterações renais que ocorrem durante a sepse são decorrentes do processo inflamatório e das abruptas mudanças hemodinâmicas. Os danos em vários órgãos, como os rins, ainda é uma realidade com alta incidência. Portanto, tais órgãos devem ser alvo de estudos com o propósito, não só de garantir a sobrevivência do paciente à sepse, mas também de aumentar a sua sobrevida e a sua qualidade de vida.

De acordo com Bonventre & Yang (2011) o mecanismo de isquemia/reperfusão renal é a principal causa de lesão renal aguda associada à sepse. A redução do fluxo sanguíneo renal e hipoperfusão resultam em baixas demandas de oxigênio que induzem a lesão. A falência renal ocorre com o comprometimento da funcionalidade do órgão, apresentando uma redução da excreção de produtos nitrogenados do metabolismo, como a uréia e creatinina por exemplo (PINTO et al., 2012).

Paralelamente a determinação da uréia e creatinina são utilizadas na diferenciação entre azotemia pré-renal e pós-renal. Azotemia pré-renal é causada, por exemplo, pela desidratação, aumento do catabolismo da proteína, tratamento com cortisol ou diminuição da perfusão renal, e induz ao aumento dos níveis de uréia, enquanto os valores de creatinina permanecem dentro da faixa de referência. Já a azotemia pós-renal é causada pela obstrução do trato urinário, e os níveis de ambos uréia e creatinina elevam-se, mas a creatinina em menor extensão. Isso pode explicar os níveis aumentados de uréia (Figura 9, painel B) e normais de creatinina (Figura 9, painel A) nos animais sépticos do nosso estudo, pois na sepse ocorre a diminuição da perfusão renal, que caracteriza uma azotemia pré-renal. O tratamento com sildenafil não preveniu o aumento da uréia nos animais.

A elevação das transaminases é relativamente comum na sepse, podendo ser resultado de lesão hepática isquêmica ou pós re-perfusional, de toxicidade medicamentosa, de inflamação sistêmica ou de ação patogênica direta do agente infeccioso, sendo um sinal de sofrimento celular dos hepatócitos e, em alguns casos, de disfunção mitocondrial (MACRI et al., 2009). A TGP é encontrada praticamente apenas em células do fígado, portanto, é mais específica do que a enzima TGO, que pode ser encontrada também em outros órgãos do corpo como coração, pâncreas, além de hemácias e músculos esqueléticos. No nosso estudo observamos o aumento de TGO (Figura 9, painel C) nos animais CLP, enquanto que os níveis de TGP não apresentaram diferença entre os grupos. De acordo com nossos dados, o aumento de TGO pode indicar principalmente lesão muscular e cardíaca. O tratamento com sildenafil não preveniu o aumento de TGO nos animais.

Nos animais CLP veículo do nosso estudo, observamos o aumento da creatina quinase (Figura 9, painel F). A CK é uma enzima magnésio-ativada da classe das transferases e desempenha um papel fundamental no metabolismo energético

principalmente em tecidos como o cérebro, músculo esquelético e coração, onde funciona como uma fonte auxiliar na produção de ATP celular.

A utilização do oxigênio mitocondrial, a síntese de ATP e o transporte de Ca^{2+} são significativamente deprimidos 24h após indução da sepse (MELA, 1981). O aumento da enzima creatina quinase na sepse é uma resposta aguda à septicemia, um mecanismo de defesa contra a diminuição de ATP. O aumento desta enzima também pode ocorrer em consequência da rabdomiólise causada pela sepse. Os mecanismos propostos de rabdomiólise, devido à sepse são (1) invasão direta do músculo pelo agente patogênico, (2) geração de toxinas, (3) toxicidade das células musculares mediada por citocinas, e (4) isquemia muscular devido ao choque (KUMAR et al, 2009)

A lesão orgânica que ocorre na sepse também se faz sentir no miocárdio, local onde a CK também se encontra presente. O aporte diminuído de oxigênio, o NO, as espécies reativas de oxigênio, derivadas da síntese de NO e da ação das células inflamatórias a nível sistêmico, e outros fatores circulantes depressores do miocárdio (como as citocinas) levam a disfunção mitocondrial nos cardiomiócitos, com diminuição da contratilidade e dilatação das câmaras cardíacas (PRICE et al, 1999; COURT et al, 2002).

Interessantemente, o tratamento com sildenafil preveniu o aumento da CK (Figura 9, painel F), provavelmente por evitar a lesão em órgãos como o músculo esquelético e coração.

A hipóxia tecidual global que ocorre na sepse grave e choque séptico é decorrência da associação entre distribuição heterogênea do fluxo sanguíneo microvascular, baixo fluxo sistêmico (hipóxia isquêmica) e falência no metabolismo celular (hipóxia citopática). Consequentemente, há anaerobiose e aumento dos níveis de lactato sérico, sendo este último decorrente de múltiplos fatores. O aumento do lactato é muito rápido e proporcional ao defeito oxidativo do metabolismo e à gravidade do choque (MIZOCK; FALK, 1992). Vários estudos estabeleceram o uso do lactato como marcador diagnóstico, terapêutico e prognóstico da hipóxia tecidual global no choque hipovolêmico (NGUYEN et al, 2004). Hiperlactatemia é um marcador da resposta ao estresse metabólico, sendo sua intensidade e duração relacionadas com mortalidade em muitas situações (REVELLY et al, 2005). Contudo, aumento do

lactato com má perfusão tecidual parece estar associado a piores evoluções (SMITH et al, 2001).

No nosso estudo, os animais do grupo CLP veículo tiveram um aumento significativo nos níveis de lactato (Figura 9, painel E) em relação aos animais controle. Interessantemente, o tratamento com sildenafil preveniu este aumento, já que os níveis de lactato do grupo CLP sildenafil estão próximos dos níveis de lactato dos grupos *sham*. Este é um dos resultados mais importantes do nosso estudo, já que o aumento de lactato em pacientes com sepse está associado com o aumento da mortalidade (POEZE et al, 2005; SHAPIRO et al, 2005). A eliminação rápida do lactato está associada a um melhor resultado no tratamento de pacientes sépticos (NGUYEN et al, 2004; JONES et al, 2010).

Alguns trabalhos mostram que o Sildenafil é capaz de reduzir o estresse oxidativo por diminuir eventos inflamatórios (MUZAFFAR et al, 2005; RODRIGUEZ-ITURBE et al, 2005). Talvez esta capacidade antioxidante e antiinflamatória pudesse ser a resposta dos níveis de CK e lactato não se elevarem em animais tratados com Sildenafil. Por outro lado, em um estudo feito em nosso laboratório utilizando um modelo clássico de inflamação, o edema de pata induzido por carragenina, o tratamento com Sildenafil não reduziu o edema dos animais (dados não publicados), indicando que neste caso o Sildenafil não está tendo efeito antiinflamatório. Considerando que agentes antioxidantes são capazes de reduzir, pelo menos parcialmente, o edema de pata induzido por carragenina (VIRCHEVA et al, 2012; BAG et al, 2013; FAIDALLAH et al, 2014), podemos sugerir que estes efeitos de proteção tecidual gerada pelo Sildenafil não se deve a um efeito antioxidante, mas sim a inibição da fosfodiesterase 5. Ao inibir esta enzima, o Sildenafil permitiu que os níveis de cGMP se elevassem, causando vasodilatação, melhorando o aporte de sangue para os tecidos, reduzindo a hipóxia, evitando a geração de lactato e o aumento da CK.

Observando-se a Figura 11, painel A, percebe-se que os animais sépticos apresentam leucopenia. A presença de leucocitose ou leucopenia é um dos achados laboratoriais que definem a presença da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (BONE et al., 1992). A leucopenia que ocorre na sepse é resultado de migração maciça de leucócitos para o foco infeccioso.

Em relação à contagem diferencial dos leucócitos, os animais sépticos apresentam aumento da contagem relativa de neutrófilos (Figura 11, painel B) e

diminuição da contagem relativa e absoluta de linfócitos (Figura 11, painéis C e E). A neutrofilia relativa, observada nos animais sépticos do nosso estudo, é a resposta usual a uma infecção bacteriana e algumas vezes podem ser observadas bactérias dentro dos neutrófilos. A linfopenia relativa observada é consequência da neutrofilia relativa, ou seja, se ocorre aumento na proporção de neutrófilos, a proporção de linfócitos será menor.

Os animais sépticos apresentaram diminuição na contagem absoluta de linfócitos. A linfopenia é um marcador da imunossupressão persistente em pacientes com sepse. Estudos anteriores demonstraram que uma contagem baixa de linfócitos absolutos ocorre na sepse pós-operatória e são um melhor preditor de bacteremia do que marcadores de infecção convencionais em unidades de atendimento de emergência (DREWRY et al, 2014). Estudos com modelos de sepse em animais, bem como em pacientes que morreram de sepse e falência de múltiplos órgãos demonstraram que a sepse induz extensa perda de linfócitos por apoptose. Uma vez que os linfócitos produzem citocinas pró-inflamatórias e ativam macrófagos, a perda de linfócitos pode ser benéfico para a sobrevivência por diminuir a resposta inflamatória excessiva. Por outro lado, a perda de linfócitos na sepse pode ser prejudicial, ao alterar a capacidade do sistema imunológico em combater organismos patogênicos (HOTCHKISS et al, 2001).

O tratamento com sildenafil parece não estar alterando a resposta inflamatória sistêmica, pois não houve diferença significativa entre o grupo CLP veículo e CLP sildenafil (Figura 11).

A contagem de plaquetas se apresentou menor entre os animais dos grupos CLP comparado aos animais dos grupos *sham* (Figura 10, painel B). A maioria dos pacientes críticos com resposta inflamatória sistêmica tem distúrbios de coagulação, e a trombocitopenia é a alteração mais encontrada como resposta a esse desequilíbrio. A causa principal da trombocitopenia em pacientes sépticos é o consumo plaquetário, visto que a ativação do sistema de coagulação está exacerbada, gerando deposição de microtrombos na microcirculação sistêmica, o que consome grandes quantidades de plaquetas e fatores de coagulação (BOECHAT et al, 2012).

Apesar do óxido nítrico, através de vias cGMP-dependentes, atuar sobre as plaquetas inibindo adesão, ativação e agregação, assim como o recrutamento plaquetário (BREDT; SNYDER, 1994), o tratamento com sildenafil não reverteu o consumo plaquetário, pois o grupo CLP sildenafil apresenta valores de plaquetas

similares aos animais do grupo CLP veículo (Figura 10, painel B). Talvez o uso de apenas uma dose de sildenafil, como é o caso do nosso estudo, não seja capaz de apresentar efeito sobre as plaquetas.

A contagem de eritrócitos, hematócrito e hemoglobina não apresentou diferença significativa entre os grupos. O tratamento com sildenafil não causou nenhuma alteração nesses parâmetros (Figura 10, painéis A, C e D).

Foi verificada uma redução significativa na pressão arterial média, sistólica e diastólica nos animais sépticos (Figura 7, painéis A-C). A hipotensão arterial é o primeiro critério a ser avaliado na sepse. É definida como pressão sistólica inferior a 90 mmHg ou pressão arterial média inferior a 70 mmHg ou uma descida na pressão sistólica habitual superior a 40 mmHg. A vasodilatação, a perda de volume intravascular e a depressão da função cardíaca verificadas na sepse explicam a hipotensão. No entanto, devido à ação de mecanismos de compensação simpáticos, a hipotensão pode não ser documentada numa fase inicial e já haver sofrimento orgânico por hipoperfusão (LEDOUX et al, 2000). Os sinais de hipoperfusão orgânica, juntamente com a saturação venosa mista, são importantes na avaliação do doente séptico. O tratamento com sildenafil não apresentou alteração na pressão dos animais.

Os animais do grupo CLP veículo tiveram um aumento da frequência cardíaca em relação ao grupo *sham* veículo (Figura 7, perfil D). Este resultado já é esperado, pois a taquicardia (frequência cardíaca superior a 90 bpm) também é um dos achados laboratoriais que definem a presença da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) (BONE et al., 1992). O aumento da frequência cardíaca na fase inicial da sepse ocorre devido ao aumento reflexo do trabalho cardíaco em resposta à hipotensão. Com o tempo, a resposta inflamatória vai gerando danos ao coração devido à isquemia, fazendo com que a atividade cardíaca reduza, agravando ainda mais o quadro.

A hiporreatividade vascular a agentes vasopressores é definida por uma diminuição do efeito do agente vasopressor quando comparado à resposta normal, devido à uma falha na constrição do músculo liso vascular. A hiporreatividade vascular pode ser observada tanto experimentalmente em órgão isolado, expondo segmentos dos vasos para agentes vasoconstritores, ou na prática clínica, estabelecendo curvas dose-resposta a um agonista alfa-adrenérgico puro tal como a fenilefrina. Neste caso, a hiporreatividade vascular é definida por um pequeno aumento na pressão arterial

dos pacientes quando comparada à resposta para uma dose semelhante do agente vasopressor em voluntários saudáveis.

A evidência clínica confirmou a hiporeatividade vascular no choque séptico, uma vez que pacientes sépticos em choque após reanimação volêmica permanecem hipotensos apesar dos níveis endógenos e exógenos elevados de catecolaminas e ativação máxima do sistema renina-angiotensina. A administração de grandes doses de catecolaminas é necessária para aumentar a pressão arterial. Num estudo experimental, Bellissant & Annane (2000) compararam 20 pacientes com choque séptico com 12 indivíduos saudáveis. As curvas de dose-resposta a fenilefrina foram estabelecidas e mostraram uma diminuição da resposta à estimulação de alfa-adrenérgicos nos pacientes com choque séptico.

No nosso trabalho, os animais CLP tiveram uma menor resposta ao vasoconstritor fenilefrina nas doses de 10 e 30 nmol/Kg se comparado com seu respectivo grupo *sham* (Figura 8). O tratamento com sildenafil não apresentou melhora na resposta à fenilefrina. Na verdade, o que temos notado em nosso trabalho, é que o sildenafil não está alterando o curso da resposta inflamatória sistêmica, nem as alterações tardias causadas por esta resposta, como a hiporreatividade vascular. O que percebemos é que o sildenafil está gerando proteção em alguns tecidos e órgãos nos momentos iniciais da sepse.

Nos últimos anos, inúmeros trabalhos foram publicados demonstrando o envolvimento de uma elevada produção de NO durante a sepse. É considerado como um dos principais fatores envolvidos na vasodilatação e no dano tecidual observado no desenvolvimento desta síndrome (KNOWLES et al., 1992), tanto em animais de experimentação quanto em humanos (TSUNEYOSHI et al., 1996).

Admite-se que a contínua e excessiva produção de NO pela indução da iNOS seja a causa da hipotensão e da hiporresponsividade a vasoconstritores observada no choque séptico. Pacientes sépticos apresentam níveis elevados de cGMP, nitrito e nitrato (metabólitos do NO) (BEISHUIEN et al., 1999). Isso foi observado no nosso trabalho, os animais sépticos apresentaram níveis de nitrato e nitrito maiores que os animais *sham* (Figura 12). O tratamento com sildenafil não preveniu este aumento. Como já foi citado, o sildenafil não está prevenindo a resposta inflamatória sistêmica, mas sim conferindo proteção em alguns órgãos por aumentar a perfusão tecidual.

Estudos experimentais evidenciam que, mesmo na presença de uma vasodilatação sistêmica, existe uma redução da resposta vasodilatadora na

microcirculação a diversos estímulos, assim como uma diminuição da resposta vasoconstritora a uma série de drogas vasopressoras. Esta alteração constitui a base para um entendimento das anormalidades fisiopatológicas que caracterizam a sepse grave (KNOBEL, 1996).

Na sepse, acredita-se que apesar de uma acentuada vasodilatação sistêmica com reduzida resposta a estímulos vasoconstritores, existe em termos de microcirculação, focos de vasoconstrição inapropriada, levando a hipóxia regional, mesmo na presença da referida vasodilatação sistêmica e de hipotensão (KNOBEL, 1996).

Alguns vasoconstritores potentes, como a endotelina, ou fator de ativação plaquetária estão presentes e aumentados na sepse. O que se observa, portanto, é uma situação onde existe interação entre vasodilatação sistêmica e vasoconstrição regional, acarretando hipoperfusão tecidual (AKAMINE et al, 1994).

Ao observarmos os resultados do nosso estudo percebemos que o tratamento com sildenafil melhorou um dos aspectos mais críticos durante os primeiros momentos de instalação da sepse, que é hipoperfusão tecidual e orgânica, que pode estar ocorrendo antes mesmo da hipotensão ser documentada (LEDOUX et al, 2000). O sildenafil, por melhorar a perfusão tecidual e orgânica, impediu a geração de lactato e o aumento da CK, mostrando proteção em órgãos como o coração e músculo esquelético.

6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados neste trabalho nos permitem concluir que:

- O modelo CLP, utilizado neste estudo para indução da sepse nos animais, reproduziu os sinais clínicos de instalação de uma resposta inflamatória sistêmica como piloereção, sangramento ocular, prostração e diminuição da movimentação; e também as características da sepse em humanos, como hipotensão, hipoperfusão e hiporreatividade a vasoconstritores;

- O Sildenafil, por impedir o aumento de creatina quinase (CK) nos animais, pode estar protegendo órgãos como o coração e músculo esquelético;

- O Sildenafil impediu a geração de lactato, que é o principal marcador de hipóxia tecidual.

Sendo assim, inibidores das fosfodiesterases, como o Sildenafil, podem ser ferramentas terapêuticas úteis para o tratamento da sepse, desde que administrados na correta janela de oportunidade.

7 REFERÊNCIAS

- AHLUWALIA, A.; FOSTER, P.; SCOTLAND, R.S.; MCLEAN, P.G.; MATHUR, A.; PERRETTI, M.; MONCADA, S.; HOBBS, A.J. Anti-inflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. **Proceedings of the National Acadademy of sciences**. v.101, p.1386-1391, 2004.
- AKAMINE, N.; FERNANDES, Jr. C.J.; WEY, S.B.; KNOBEL, E. - Choque séptico. In: Knobel E, ed- **Condutas no Paciente Grave**. São Paulo: Atheneu, 1994.
- ANDRADES, M.E.; MORINA, A.; SPASIC, S.; SPASOJEVIC, I. Bench-to-bedside review: Sepsis - from the redox point of view. **Critical Care**. v.15, n.5, p.230, 2011.
- ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**. v.29, n.7, p.1303-1310, 2001.
- AZIZ, M.; JACOB, A.; YANG, W.L.; MATSUDA, A.; WANG, P. Current trends in inflammatory and immunomodulatory mediators in sepsis. **J Leukoc Biol**. v.93, n. 3, p.329-342, 2013.
- BAKER, C. C.; CHAUDRY, I. H.; GAINES, H. O.; BAUE, A. E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**. v.94, n.2, p.331- 335, 1983.
- BALLARD, S. A. et al. Sildenafil, an inhibitor of Phosphodiesterase type 5, enhances nitric oxide mediated relaxation of human corpus cavernosum. **Int. J. Impot. Res.**, London, v.8, p.103, 1996.
- BEAVO, J.A.; BRUNTON, L.L. Cyclic nucleotide research-still expanding after half a century. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol**. v.3, p.710-718, 2002.
- BEISHUIZEN, A; VERMES, I.; HAANEN, C. Endogenous mediators in sepsis and septic shock. **Adv. Clin. Chem**. v.33, p.55-131, 1999.
- BELLISSANT, E.; ANNANE, D. Effect of hydrocortisone on phenylephrine--mean arterial pressure dose-response relationship in septic shock. **Clin Pharmacol Ther**. v.68, n.3, p.293-303, 2000.
- BOECHAT, T.O.; SILVEIRA, M.F.B.B.; FAVIERE, W.; MACEDO, G.L. Trombocitopenia na sepse: um importante marcador prognóstico. **Rev. bras. ter. intensiva**. v.24, n.1, 2012.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUSS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians /Society of Critical Care Medicine. **Chest**. v.10, n.6, p.1644-1655, 1992.

BONVENTRE, J.V.; YANG, L. Cellular pathophysiology of ischemic acute kidney injury. **J Clin Invest**. v.121, n.11, p.4210-21, 2011.

BOOLELL, M.; ALLEN, M.J.; BALLARD, S.A.; GEPI-ATTEE, S.; MUIRHEAD, G.J.; NAYLOR, A.M.; OSTERLOH, I.H.; GINGELL, C. Sildenafil: an orally active type 5 cyclic GMP-specific phosphodiesterase inhibitor for the treatment of penile erectile dysfunction. **Int J Impot Res**. v.8, n.2, p.47-52, 1996.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger molecule. **Ann Rev Biochem**. v. 63, p. 175-95, 1994.

BREMER, Y.A.; SALLOUM, F.; OCKAILI, R.; CHOU, E.; MOSKOWITZ, W.B.; KUKREJA, R.C. Sildenafil citrate (viagra) induces cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury in infant rabbits. **Pediatr Res**. v.57, n.1, p.22-7, 2005.

BRIONI, J. D.; NAKANE, M.; HSIEH, G. C.; MORELAND, R. B.; KOLASA, T.; SULLIVAN, J. P. Activators of soluble guanylate cyclase for the treatment of male erectile dysfunction. **Int. J. Impot. Res**. v.14, p.8-14, 2002.

BROOKS, H. F.; OSABUTEY, C.; MOSS, R. F.; ANDREWS, P. L.; DAVIES, D. C. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. **Metab Brain Dis**. v. 22, n.3, p.353-73, 2007.

BURAS, J.A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat. Rev. Drug. Discov**. v.4, p.854-865, 2005.

CARDICI, E.; HALICI, Z.; OBADASOGLU, F.; ALBAYRAK, A.; KARAKUS, E.; UNAL, D.; ATALAY, F.; FERAH, I.; UNAL, B. Sildenafil treatment attenuates lung and kidney injury due to overproduction of oxidant activity in a rat model of sepsis: a biochemical and histopathological study. **Clin Exp Immunol**. v.166, n.3, p.374-384, 2011.

CASTELLHEIM, A.; BREKKE, O.L.; ESPEVIK, T.; HARBOE, M.; MOLLNES, T.E. Innate immune responses to danger signals in systemic inflammatory response syndrome and sepsis. **Scand J Immunol**. v.69, n.6, p.479-491, 2009.

CLEMENTI, E. The contribution of Salvador Moncada to our understanding of the biology of nitric oxide. **IUBMB Life**. v.55, n.10-11, p.563-565, 2003.

COLLINS, P.; GRIFFITH, T.M.; HENDERSON, A.H.; LEWIS, M.J. Endothelium-derived relaxing factor alters calcium fluxes in rabbit aorta: a cyclic guanosine monophosphate-mediated effect. **J Physiol**. v.381, p.427-37, 1986.

CONNELLY, L.; MADHANI, M.; HOBBS, A.J. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric-oxide synthase (eNOS) knock-out mice: a pro-inflammatory role for eNOS-derived no in vivo. **J Biol Chem**. v.280, n.11, p.10040-6, 2005.

CORBIN, J.D.; BLOUNT, M.A.; WEEKS, J.L.; BEASLEY, A.; KUHN, K.P.; HO, Y.S.; SAIDI, L.F.; HURLEY, J.H.; KOTERA, J.; FRANCIS, S.H. [3H]sildenafil binding to phosphodiesterase-5 is specific, kinetically heterogeneous, and stimulated by cGMP. **Mol Pharmacol**. v.63, n.6, p.1364-72, 2003.

COURT, O.; KUMAR, A.; PARRILLO, J.E. Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. **Crit Care**. v. 6, n.6, p. 500-8, 2002.

DAVID, C.M.; FARIA NETO, H.C. **Sepse da Bancada a Beira do Leito**. 1.ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2007, 376 p.

DEMIRBILEK, S.; SIZANLI, E.; KARADAG, N.; KARAMAN, A.; BAYRAKTAR, N.; TURKMEN, E.; ERSOY, M.O. The effects of methylene blue on lung injury in septic rats. **Eur Surg Res**. v.38, n.1, p.25-41, 2006.

DREWRY, A.M.; SAMRA, N.; SKRUPKY, L.P.; FULLER, B.M.; COMPTON, S.M.; HOTCHKISS, R.S. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. **Shock**. v.42, n.5, p.383-91, 2014.

DU PLESSIS, S.S.; DE JONGH, P.S.; FRANKEN, D.R. Effect of acute in vivo sildenafil citrate and in vitro 8-bromo-cGMP treatments on semen parameters and sperm function. **Fertil Steril**. v.81, n.4, p.1026-1033, 2004.

DUMA, D. **Óxido nítrico e glicocorticoides: interação na seps e na inflamação**. 2005. 135 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) - Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

DUMA, D.; FERNANDES, D.; BONINI, M.G.; STADLER, K.; MASON, R.P.; ASSREUY, J. NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. **Eur J Pharmacol**. v.668, n.1-2, p.285-92, 2011.

FERNANDES, D.; SILVA-SANTOS, J.E.; DUMA, D.; VILLELA, C.G.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Mol Pharmacol**. v.69, n.3, p.983-90, 2006.

FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock**. v.1, p.10-3, 2008.

FERNANDES, D.; SORDI, R.; PACHECO, L.K.; NARDI, G.M.; HECKERT, B.T.; VILLELA, C.G.; LOBO, A.R.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **J Pharmacol Exp Ther.** v.328, n.3, p.991-999, 2009.

FUNK, D.J.; PARRILLO, J.E.; KUMAR, A. Sepsis and septic shock: a history. **Crit Care Clin.** v.25, n.1, p.83-101, 2009.

GALILI, Y.; KLUGER, Y.; MIANSKI, Z.; IAINA, A.; WOLLMAN, Y.; MARMUR, S.; SOFFER, D.; CHERNIKOVSKY, T.; KLAUSNER, J.P.; ROBAU, M.Y. Methylene blue- a promising treatment modality in sepsis induced by bowel perforation. **Eur Surg Res.** v.29, n.5, p.390-5, 1997.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word "sepsis". **Intensive Care Medicine.** v.32, n.12, p.2077, 2006.

GHOSH, R.; SAWANT, O.; GANPATHY, P.; PITRE, S.; KADAM, V.J. Phosphodiesterase inhibitors: their role and implications. **International Journal of PharmTech Research.** v.1, n.4, p.1148-1160, 2009.

GOKAKIN, A.K.; DEVECI, K.; KURT, A.; KARAKUS, B.C.; DUGER, C.; TUZCU, M.; TOPCU, O. The protective effects of sildenafil in acute lung injury in a rat model of severe scald burn: A biochemical and histopathological study. **Burns.** v.39, n.6; p.1193-9, 2013.

GRANGER, D.L.; HIBBS, J.B.; PERFECT, J.R.; DURACK, D.T. Metabolic fate of Larginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. **J. Clin. Invest.** v.85, n.1, p.264-273, 1990.

GUARIDO, K.L.; GONÇALVES, R.P.; JÚNIOR, A.G.; DA SILVA-SANTOS, J..E. **Crit Care Med.** v. 42, n. 6, p. 461-71, 2014.

GUPTA, M.; KOVAR, A.; MEIBOHM, B. The clinical pharmacokinetics of phosphodiesterase-5 inhibitors for erectile dysfunction. **J. Clin. Pharmacol.** v.45, p.987-1003, 2005.

HOFMANN, F.; AMMENDOLA, A.; SCHLOSSMANN, J. Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. **J Cell Sci.** v.113, p.1671-1676, 2000.

HOLLENBERG, S. M.; AHRENS, T. S.; ANNANE, D.; ASTIZ, M. E.; CHALFIN, D. B.; DASTA, J. F.; HEARD, S. O.; MARTIN, C.; NAPOLITANO, L. M.; SUSLA, G. M.; TOTARO, R.; VINCENT, J. L.; ZANOTTI-CAVAZZONI, S. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. **Crit. Care Med.** v.32, p.1928-1948, 2004.

HOTCHKISS, R.S.; TINSLEY, K.W.; SWANSON, P.E.; SCHMIEG, R.E.Jr.; HUI, J.J.; CHANG, K.C.; OSBORNE, D.F.; FREEMAN, B.D.; COBB, J.P.; BUCHMAN, T.G.; KARL, I.E. Sepsis-Induced Apoptosis Causes Progressive Profound Depletion of B and CD4T Lymphocytes in Humans. **J Immunol.** v.166, n.11, p.6952-63, 2001.

IMPENS, A.J.; PHILLIPS, K.; SCHIOPU, E. PDE-5 Inhibitors in Scleroderma Raynaud Phenomenon and Digital Ulcers: Current Status of Clinical Trials. **Int J Rheumatol.** 2011.

JANG, D.H.; NELSON, L.S.; HOFFMAN, R.S. Methylene Blue for Distributive Shock: A Potential New Use of an Old Antidote. **J. Med. Toxicol.** 2013.

JANG, D.H.; NELSON, L.S.; HOFFMAN, R.S. Methylene Blue for Distributive Shock: A Potential New Use of an Old Antidote. **J. Med. Toxicol.** v.9, n.3, p.242-9, 2013.

JONES, A.E.; SHAPIRO, M.I.; TRZECIAK, S.; ARNOLD, R.C.; CLAREMONT, H.A.; KLINE, J.A. Lactate clearance vs. central venous oxygen saturation as goals of early sepsis therapy: a randomized clinical trial. **JAMA**, v.303, n.8, p.739–46, 2010.

KNOBEL, E. Óxido Nítrico e Seps. **Arq Bras Cardiol.** v.67, n.4, 1996.

KNOWLES, R.G.; MONCADA, S. Nitric oxide as a signal in blood vessels. **Trends Biochem Sci.** v.17, n.10, p.399-402, 1992.

KUMAR, A.A.; BHASKAR, E.; SHANTHA, G.P.S.; SWAMINATHAN, P.; ABRAHAM, G. Rhabdomyolysis in community acquired bacterial sepsis--a retrospective cohort study. **PLoS One.** v.4, n.9, 2009.

LABORATORIOS PFIZER. **Viagra: monografia do produto.** São Paulo: Pfizer, 1998.

LEDOUX, D.; ASTIZ, M.E.; CARPATI, C.M.; RACKOW, E.C. Effects of perfusion pressure on tissue perfusion in septic shock. **Crit Care Med.** v.28, n.8, p.2729-32, 2000.

LEVY, M.M.; FINK, M.P.; MARSHALL, J.C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S.M.; VINCENT, J.L.; RAMSAY, G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med.** v.31, n.4, p.1250-1256, 2003.

LLEDO-GARCIA, E.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, D.; CABELLO-BENAVENTE, R.; MONCADA-IRIBARREN, I.; TEJEDOR-JORGE, A.; DULIN, E.; HERNANDEZ-FERNANDEZ, C.; DEL CANIZO-LOPEZ, J.F. Sildenafil improves immediate posttransplant parameters in warm-ischemic kidney transplants: experimental study. **Transplant Proc.** v.39, n.5, p.1354-6, 2007.

LOPEZ, A.; LORENTE, J.A.; STEINGRUB, J.; BAKKER, J.; MCLUCKIE, A.; WILLATTS, S.; BROCKWAY, M.; ANZUETO, A.; HOLZAPFEL, L.; BREEN, D.; SILVERMAN, M.S.; TAKALA, J.; DONALDSON, J.; ARNESON, C.; GROVE, G.; GROSSMAN, S.; GROVER, R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Crit. Care Med.** v.32, p.21-30, 2004.

LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S.; RUIZ-STEWART, I.; PARK, J.; SCHULZ, S.; CHEPENIK, K.P.; WALDMAN, S.A. Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. **Pharmacol. Rev.** v.52, p.375-413, 2000.

MACRI, M.M.; MATIAS, J.E.F.; SOUZA, C.J.F.; NICOLUZZI, J.E.L.; CARON, P.E.; REPKA, J.C.D. Influência do pneumoperitônio nas funções hepática e renal e na liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo experimental de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. **Arq Bras Cir Dig.** v.22, n.4, p.206-11, 2009.

MARTIN, G.S. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v.10, n.6, p.701-706, 2012
MAURICE, D.H.; KE, H.; AHMAD, F.; WANG, Y.; CHUNG, J.; MANGANIELLO, V. C. Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature Reviews Drug Discovery.** v. 13, p.290–314, 2014.

MELA, L. Direct and indirect effects of endotoxin on mitochondrial function. **Progress in Clinical and Biological Research.** v.62, p.5-21, 1981.

MIZOCK, B.A.; FALK, J.L. Lactic acidosis in critical illness. **Crit Care Med.** v.20, n.1, p.80-93, 1992.

MOHAJER, M.A.; DAROUICHE, R.O. Sepsis syndrome, bloodstream infections, and device-related infections. **Med Clin North Am.** v.96, n.6, p.1203-1223, 2012.

MOUSTAFA, F.; FELDMAN, S.R. A review of phosphodiesterase-inhibition and the potential role for phosphodiesterase 4-inhibitors in clinical dermatology. **Dermatol Online J.** v.20, n.5, 2014.

MOUSTAFA, Y.M.; KHODER, D.M.; EL-AWADY, E.E.; ZAITONE, S.A. Sildenafil citrate protects against gastric mucosal damage induced by indomethacin in rats. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v.17, p.179-88, 2013.

MUZAFFAR, S.; SHUKLA, N.; SRIVASTAVA, A.; ANGELINI, G.D; JEREMY, J.Y. Sildenafil citrate and sildenafil nitrate (NCX 911) are potent inhibitors of superoxide formation and gp91phox expression in porcine pulmonary artery endothelial cells. **Br J Pharmacol.** v.146, n.1, p. 109-17, 2005.

NARDI, G.M.; SCHESCHOWITSCH, K.; AMMAR, D.; OLIVEIRA, S.K.; ARRUDA, T.B.; ASSREUY, J. Neuronal nitric oxide synthase and its interaction with soluble guanylate cyclase is a key factor for the vascular dysfunction of experimental sepsis. **Crit Care Med.** v.42, n.6, p.391-400, 2014.

NDUKA, O.O.; PARRILLO, J.E. The pathophysiology of septic shock. **Crit Care Clin.** v.25, n.4, p.677-702, 2009.

NGUYEN, H.B.; RIVERS, E.P.; KNOBLICH, B.P.; JACOBSEN, G.; MUZZIN, A.; RESSLER, J.A.; TOMLANOVICH, M.C. Early lactate clearance is associated with improved outcome in severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med.** v.32, n.8, p.1637-42, 2004.

OPAL, S.M. The host response to endotoxin, antilipopolysaccharide strategies, and the management of severe sepsis. **Int J Med Microbiol.** v.297, n.5, p.365-377, 2007.

OPAL, S.M.; ESMON, C.T. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. **Crit Care.** v.7, n.1, p.23-38, 2003.

PAULA-NETO, H.A.; ALVES-FILHO, J.C.; SOUTO, F.O.; SPILLER, F.; AMÊNDOLA, R.S.; FREITAS, A.; CUNHA, F.Q.; BARJA-FIDALGO, C. Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis. **Shock.** v.35, n.1, p.17-27, 2011.

PINTO, C.F.; WATANABE, M.; FONSECA, C.D.; OGATA, C.I.; VATTIMO, M.F. The sepsis as cause of acute kidney injury: an experimental model. **Rev Esc Enferm USP.** n.86-90, 2012.

POEZE, M.; SOLBERG, B.C.; GREEVE, J.W.; RAMSAY, G. Monitoring global volume-related hemodynamic or regional variables after initial resuscitation: what is the better predictor of outcome in critically ill septic patients? **Crit Care Med.** v.33, n.11, p.2494-500, 2005.

PRICE, S.; ANNING, P.B.; MITCHELL, J.A.; EVANS, T.W. Myocardial dysfunction in sepsis: mechanisms and therapeutic implications. **Eur Heart J.** v. 20, n.10, p. 715-24, 1999.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.148, n.13, p.1482-1489, 1987.

RANGEL-FRAUSTO, M.S. Sepsis: Still Going Strong. **Arch Med Res.** v.36, n.6, p.672-681, 2005.

REVELLY, J.P.; TAPPY, L.; MARTINEZ, A.; BOLLMANN, M.; CAYEUX, M.C.; BERGER, M.M.; CHIOLÉRO, R.L. Lactate and glucose metabolism in severe sepsis and cardiogenic shock. **Crit Care Med.** v.33, n.10, p.2235-40, 2005.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M.S.; FLIERL, M.A.; WARD, P.A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc.** v.4, n.1, p.31-36, 2009.

RODRÍGUEZ-ITURBE, B.; FERREBUZ, A.; VANEGAS, V.; QUIROZ, Y.; ESPINOZA, F.; PONS, H.; VAZIRI, N.D. Early treatment with cGMP phosphodiesterase inhibitor ameliorates progression of renal damage. **Kidney Int.** v.68, n.5, p.2131-42, 2005.

SALES JÚNIOR, J.A.L.; DAVID, C.M.; HATUM, R.; SOUZA, P.C.S.P.; JAPIASSÚ, A.; PINHEIRO, C.T.S.; FRIEDMAN, G.; SILVA, O.B.; DIAS, M.D.; KOTERBA, E.; DIAS, F.S.; PIRAS, C.; Grupo de Estudo de Sepse do Fundo AMIB; LUIZ, R.R. Sepse Brasil: Estudo Epidemiológico da Sepse em Unidades de Terapia Intensiva Brasileiras. **Revista Brasileira Terapia Intensiva.** v.18, n.1, p.9-17, 2006.

SAMILLAN, V.; HAIDER, T.; VOGEL, J.; LEUENBERGER, C.; BROCK, M.; SCHWARZWALD, C.; GASSMANN, M.; OSTERGAARD, L. Combination of erythropoietin and sildenafil can effectively attenuate hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. **Pulm Circ.** v.4, n.4, p.898-907, 2013.

SCHMIDT, H.H.; LOHMANN, S. M.; WALTER, U. The nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and mechanism of action. **Biochim. Biophys. Acta.** v.1178, p. 153-175, 1993.

SCHWARZ, E. R.; KAPUR, V.; RODRIGUEZ, J.; RASTOGI, S.; ROSANIO, S. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. **Int. J. Impot. Res.** v.19, n.2, p.139-148, 2007.

SHAPIRO, N.I.; HOWELL, M.D.; TALMOR, D. et al. Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. **Ann Emerg Med.** v.45, p.524-8, 2005.

SHARMA, R.K. Evolution of the membrane guanylate cyclase transduction system. **Mol. Cell. Biochem.** v.230, p.3-30, 2002.

SHIH, P.K.; CHENG, C.M.; LI, H.P.; HUANG, M.F.; CHIU, C.W.; CHEN, J.X.; CHEN, N.W.; CHOU, S.H. Pretreatment with sildenafil alleviates early lung ischemia-reperfusion injury in a rat model. **J Surg Res.** v.185, n.2, p.77-83, 2013.

SILVA, E.; PEDRO, M. A.; SOGAYAR, A.C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C.L.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R.G.; SOUSA, E.F.; ABE, T.P.; ANDRADE, J.; MATOS, J.D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P.C.; MATOS, G.F.; BENTO,

A.M.; CORRÊA, A.D.; VIEIRA, P.C.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**. v.8, n.4, p.251-260, 2004.

SMEDING, L.; PLÖTZ, F.B.; GROENEVELD, A.B.J.; KNEYBER, M.C.J. Structural changes of the heart during severe sepsis or septic shock. **Shock**. v.37, n.5, p. 449-456, 2012.

SMITH, I.; KUMAR, P.; MOLLOY, S.; RHODES, A.; NEWMAN, P.J.; GROUNDS, R.M.; BENNETT, E.D. Base excess and lactate as prognostic indicators for patients admitted to intensive care. **Intensive Care Med**. v.27, n.1, p.74-83, 2001.

SURAPISITCHAT, J.; JEON, K.I.; YAN, C.; BEAVO, J.A. Differential regulation of endothelial cell permeability by cGMP via phosphodiesterases 2 and 3. **Circ Res**. v.101, p.811–818, 2007.

THIJS, A.; THIJS, L. G. Pathogenesis of renal failure in sepsis. **Kidney International**. v.53, n.66, p.S34-S37, 1998.

TSUNEYOSHI, I.; KANMURA, Y.; YOSHIMURA, N. Nitric oxide as a mediator of reduced arterial responsiveness in septic patients. **Crit Care Med**. v.24, n.6, p.1083-6, 1996.

VAN DER POLL, T.; OPAL, S.M. Host-pathogen interactions in sepsis. **Lancet Infect Dis**. v.8, n.1, p.32-43, 2008.

VO, P.A.; LAD, B.; TOMLINSON, J.A.; FRANCIS, S.; AHLUWALIA, A. Autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. **J Biol Chem**. v.280, n.8, p.7236-43, 2005.

WHEELER, A.P.; BERNARD, G.R. Treating patients with severe sepsis. **N. Eng. J. Med**. v.340, p. 207-214, 1999.

WICHTERMANN, K. A; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**. v.29, n.2, p.189-201, 1980.

XING, K.; MURTHY, S.; LILES, W.C.; SINGH, J.M. Clinical utility of biomarkers of endothelial activation in sepsis-a systematic review. **Critical Care**. v.16, n.1, 2012.

ZHAO, L.; MASON, N.A.; MORRELL, N.W.; KOJONAZAROV, B.; SADYKOV, A.; MARIPOV, A.; MIRRAKHIMOV, M.M.; ALDASHEV, A.; WILKINS, M.R. Sildenafil inhibits hypoxia-induced pulmonary hypertension. **Circulation**. v.24, n.4, p.424-8, 2001.