

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

**JUNIOR GARCIA DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO CILOSTAZOL SOBRE AS ALTERAÇÕES VASCULARES E DANO  
TECIDUAL INDUZIDOS POR MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

**PONTA GROSSA**

**2018**

**JUNIOR GARCIA DE OLIVEIRA**

**EFEITO DO CILOSTAZOL SOBRE AS ALTERAÇÕES VASCULARES E DANO  
TECIDUAL INDUZIDOS POR MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE**

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes  
Coorientadora: Profa. Dra. Regina Sordi

**PONTA GROSSA**

**2018**

O48 Oliveira, Junior Garcia de  
Efeito do cilostazol sobre as alterações vasculares e dano tecidual induzidos por modelo experimental de sepse / Junior Garcia de Oliveira. Ponta Grossa, 2018.

96 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes.

Coorientadora: Profa. Dra. Regina de Sordi.

1. Choque séptico. 2. Inibidores de fosfodiesterase. 3. cAMP e cGMP. 4. Disfunção múltipla orgânica. I. Fernandes, Daniel. II. Sordi, Regina de. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia. IV.T.

CDD: 615.321


ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS –  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: FÁRMACOS, MEDICAMENTOS E BIOCÊNCIAS  
APLICADAS À FARMÁCIA, NÚMERO DA ATA 06/2018, DO MESTRANDO JUNIOR  
GARCIA DE OLIVEIRA, REALIZADO NO DIA 27 DE FEVEREIRO DE 2018, NA  
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA.


Aos vinte e sete dias de fevereiro de dois mil e dezoito, às 9h00min no Auditório do Nutead – Central de Salas, da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) em seção pública sob a presidência do Professor Doutor Daniel Fernandes, reuniu-se a Banca Examinadora de defesa da Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do mestrando Junior Garcia de Oliveira na linha de pesquisa: Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicada à Farmácia / Avaliação Clínico/Laboratorial de Processos Fisiopatológicos, constituída pelos demais Doutores (membros titulares): Giovani Marino Fávero (UEPG/PR) e Jamil Assereuy Filho (UFSC). Iniciados os trabalhos, a presidência deu conhecimento aos membros da banca e ao candidato das normas que regem a defesa de dissertação de Mestrado e definiu - se a ordem a ser seguida pelos examinadores para arguição. O título do trabalho foi: EFEITO DO CILOSTAZOL SOBRE AS ALTERAÇÕES VASCULARES E DANO TECIDUAL INDUZIDOS POR MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE. Encerrado a defesa, a banca pronunciou-se APROVADO a dissertação, considerado como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. O aluno deverá entregar, no prazo de até 30 dias, a versão definitiva da dissertação de Mestrado, com as modificações sugeridas pelos membros da banca examinadora. Nada mais havendo a ser tratado, lavrou-se a presente ata que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Observações (se necessário): \_\_\_\_\_

Alteração de título: sim  não

Novo título: \_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
Daniel Fernandes 1 - (FARMACOLOGIA - UFSC) - Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Giovani Marino Fávero 2 - (DEBIO - UEPG) – Titular

  
\_\_\_\_\_  
Jamil Assereuy Filho 3 - ( FARMACOLOGIA - UFSC) – Titular

Ponta Grossa, 27 de Fevereiro de 2018.

*Aos meus pais, Misael e Marizete, por serem meus  
exemplos de dedicação e simplicidade.  
Aos meus irmãos, Elisangela e Guilherme, por sempre  
me apoiarem e torcerem pelo meu sucesso.*

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Daniel Fernandes pela excelente orientação, confiança e paciência ao longo do trabalho. Agradeço pela amizade, por todo o auxílio técnico e pelas conversas, foi um grande prazer poder trabalhar com você.

À Profa. Dra. Regina de Sordi pela dedicada coorientação. Por todo o auxílio e ensinamentos prestados ao longo dos diferentes experimentos e também pela amizade.

Ao Prof. Dr. Paulo Vitor Farago que gentilmente forneceu o fármaco cilostazol

Ao colega de laboratório e amigo Gustavo Ferreira Alves pelas conversas e amizade. Agradeço também aos amigos do mestrado, em especial Rosana Letícia da Rosa, Vanessa von Mühlen de Carvalho e Marina Delgobo.

Aos Professores, Dr. Jamil Assreuy e Dr. José Eduardo da Silva-Santos, pelo fornecimento de reagentes e equipamentos utilizados em alguns experimentos. Agradeço ainda pelo aceite em participar da banca de avaliação do trabalho.

Aos professores, Dr. Giovani Marino Favero e Dr. Leandro Cavalcante Lipinski pelo aceite em fazerem parte da banca de avaliação do trabalho e pelas contribuições.

Às funcionárias do biotério central da UEPG Marilene Barbosa e Maria Luz da Silva Pereira pela amizade e auxílio com os cuidados aos animais.

À Adriane Madeira, pelo apoio técnico e pela gentileza em auxiliar na determinação do NOx.

Aos funcionários do LAMEB/UFSC pelo auxílio e gentileza nas análises histológicas, em especial Dra. Chirle Ferreira, Ma. Emily Daiana dos Santos e Laise Orsi Becker.

À Profa. Dra. Márcia Regina Paes de Oliveira pelo auxílio nas análises histológicas e pela amizade.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais Misael de Oliveira e Marizete do Carmo Garcia de Oliveira, e irmãos Elisangela Garcia de Oliveira e Guilherme Garcia de Oliveira, por todo o carinho, amor e por sempre apoiarem minhas decisões. Muito obrigado, amo muito vocês.

A Deus acima de tudo, pelo fortalecimento em momentos difíceis e por sempre me mostrar o caminho a ser seguido.

*“Lute com determinação, abrace a vida com paixão,  
perca com classe e vença com ousadia,  
porque o mundo pertence a quem se atreve  
e a vida é muito bela para ser insignificante”*

**Charles Chaplin**



## RESUMO

A sepse caracteriza-se por um quadro de disfunção múltipla orgânica causada por uma resposta imunológica desregulada frente a uma infecção, associada à alta incidência e taxa de mortalidade. O avanço em novas abordagens terapêuticas permanece ainda um desafio devido à complexidade da síndrome. Estudos demonstram que embora deletério em fase tardia da síndrome, a produção basal do óxido nítrico (NO) no início da sepse apresenta um papel protetor de controle hemodinâmico e de perfusão aos tecidos. Os efeitos do NO, em destaque a vasodilatação são mediados pelo nucleotídeo cíclico cGMP que juntamente com o cAMP controla diversas respostas e sinalizações celulares. As fosfodiesterases (PDEs) atuam na inativação de nucleotídeos cíclicos, controlando assim a sinalização celular mediada por esses segundos mensageiros, sendo, portanto alvo de possíveis abordagens farmacológicas na sepse. O presente estudo avaliou o efeito do tratamento com cilostazol, um inibidor de PDE3, que controla a sinalização pelo cAMP e cGMP no início da sepse. Ratos *Wistar* machos foram submetidos ao procedimento de ligação e perfuração cecal (CLP) ou à falsa cirurgia (Sham). Seis horas após o procedimento os animais receberam cilostazol (15 mg/kg, por via oral) ou veículo (óleo de amendoim, 1 mL/kg, por via oral). Após 24 horas, os animais submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP reproduziram as características cardiovasculares da sepse como hipotensão, hiporreatividade a vasoconstritores, taquicardia, diminuição no fluxo sanguíneo renal (FSR), além das manifestações inflamatórias como o aumento na produção de NO, aumento na atividade de mieloperoxidase (MPO) em tecidos e alterações histopatológicas. O tratamento com cilostazol melhorou a reatividade vascular a vasoconstritores, observada *in vivo* e em anel de aorta isolado, além de restaurar a resposta na frequência cardíaca nos animais sépticos. Houve melhora na perfusão tecidual observado pelo aumento de FSR basal nos animais sépticos, demonstrando uma melhora hemodinâmica, além de o tratamento prevenir hemoconcentração nos animais sépticos. A migração de neutrófilos para o pulmão também foi reduzida com o tratamento comprovada pela análise de MPO e histopatologia, evidenciando melhora em reposta inflamatória tecidual. O tratamento com cilostazol ainda preveniu a elevação de lactato nos animais sépticos, sendo este um importante marcador de perfusão tecidual. Os resultados demonstram que o uso de inibidores de PDEs como o cilostazol, pode representar uma importante ferramenta farmacológica no tratamento da sepse, desde que administrados no correto do desenvolvimento da síndrome.

**Palavras-chave:** Choque séptico. Inibidores de fosfodiesterase. cAMP e cGMP. Disfunção múltipla orgânica.

## ABSTRACT

Sepsis is characterized by a multiple organ dysfunction caused by an unregulated immune response to infection, associated with high incidence and mortality rate. Advancing new therapeutic approaches remains a challenge because of the complexity of the syndrome. Studies show that, although deleterious in the late phase of the syndrome, the basal production of nitric oxide (NO) in the early sepsis presents a protective role of hemodynamic control and perfusion to the tissues. The effects of NO, in particular, vasodilation are mediated by the cGMP nucleotide which together with cAMP controls various cellular responses and signaling. Phosphodiesterases (PDEs) act in the inactivation of cyclic nucleotides, thus controlling the cellular signaling mediated by these second messengers, being, therefore, the target of possible pharmacological approaches in sepsis. The present study evaluated the effect of treatment with cilostazol, a PDE3 inhibitor, which controls cAMP and cGMP signaling in the early sepsis. Male Wistar rats were submitted to cecal ligation and puncture (CLP) or false surgery (Sham). Six hours after the procedure the animals received cilostazol (15 mg/kg, gavage) or vehicle (peanut oil, 1 mL/kg, gavage). After 24 hours, the animals submitted to the CLP surgical procedure reproduced the cardiovascular characteristics of sepsis, such as hypotension, hyporesponsiveness to vasoconstrictors, tachycardia, decreased renal blood flow (RBF), and inflammatory manifestations such as increased NO production, myeloperoxidase (MPO) activity in tissues and histopathological changes. The treatment with cilostazol improved vascular reactivity to vasoconstrictors, observed in vivo and in isolated aortic rings, and restored heart rate response in the septic animals. There was an improvement in the tissue perfusion observed by the increase of basal RBF in the septic animals, demonstrating a hemodynamic improvement, besides the treatment to prevent hemoconcentration in the septic animals. The neutrophil recruitment to the lung was also reduced with the treatment proven by MPO analysis and histopathology, evidencing an improvement in inflammatory tissue response. The treatment with cilostazol also prevented lactate elevation in septic animals, is this an important marker of tissue perfusion. The results demonstrate that the use of inhibitors of PDEs such as cilostazol may represent an important pharmacological strategy in the treatment of sepsis if administered at the right moment during the syndrome development.

**Keywords:** Septic shock. Phosphodiesterase inhibitors. cAMP and cGMP. Multiple organ dysfunction.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Diferentes mecanismos envolvidos na resposta imune do hospedeiro durante a sepse .....	21
Figura 2 –	Controle do cAMP sobre a estabilização da barreira endotelial .....	24
Figura 3 –	Efeitos PDE3 dependentes e independentes do cilostazol .....	28
Figura 4 –	Representação esquemática do modelo de indução de sepse por ligação e perfuração do ceco (CLP) .....	35
Figura 5 –	Registro típico do vasodilatador nitroprussiato de sódio na pressão arterial média .....	36
Figura 6 –	Registro típico do vasoconstritor angiotensina II no fluxo sanguíneo renal .....	37
Figura 7 –	Representação esquemática da avaliação dos parâmetros cardiovasculares e fluxo sanguíneo renal em animais anestesiados ....	38
Figura 8 –	Representação esquemática da avaliação da reatividade vascular de anel de aorta em sistema de órgão isolado .....	39
Figura 9 –	Representação esquemática do procedimento experimental geral .....	44
Figura 10 –	Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em parâmetros cardiovasculares e fluxo sanguíneo renal .....	46
Figura 11 –	Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação da pressão arterial média, área sob a curva e tempo de resposta após administração de vasoconstritores .....	48
Figura 12 –	Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação da pressão arterial média, área sob a curva e tempo de resposta após administração de vasodilatadores .....	49
Figura 13 –	Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação da frequência cardíaca e área sob a curva após administração de vasoconstritores e vasodilatadores .....	50
Figura 14 –	Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol no fluxo sanguíneo renal .....	52
Figura 15 –	Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação do fluxo sanguíneo renal, área sob a curva e tempo de resposta após administração de vasoconstritores sistêmicos .....	53

Figura 16 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação do fluxo sanguíneo renal, área sob a curva e tempo de resposta após administração de vasodilatadores sistêmicos .....	54
Figura 17 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na resposta contrátil para fenilefrina e cloreto de potássio (KCl) em anel de aorta torácica .....	56
Figura 18 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol nos níveis de nitrato e nitrito (NOx) plasmático .....	58
Figura 19 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol nos marcadores bioquímicos .....	59
Figura 20 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na glicemia .....	60
Figura 21 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol no hemograma e contagem de plaquetas .....	62
Figura 22 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol no leucograma .....	63
Figura 23 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão e rim .....	65
Figura 24 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em análise histopatológica de pulmão .....	67
Figura 25 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em análise histopatológica de pulmão através de escore .....	68
Figura 26 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em análise histopatológica de coração .....	69
Figura 27 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em análise histopatológica de rim .....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definições prévias e recentemente atualizadas sobre sepse e síndromes relacionadas .....	17
Tabela 2 – Critérios utilizados no escore SOFA ( <i>Sequential Organ Failure Assessment</i> ) .....	18
Tabela 3 – Família das diferentes fosfodiesterases .....	25
Tabela 4 – Escore semi-quantitativo para avaliação de alterações no pulmão associado ao modelo de CLP utilizado, em aumento de 200x .....	43
Tabela 5 – Efeito do procedimento cirúrgico CLP e do tratamento com cilostazol na reatividade vascular para fenilefrina e cloreto de potássio (KCl) em anel de aorta torácica .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

AMPK	Proteína quinase ativada por AMP (do inglês, <i>AMP-Activated Protein Kinase</i> )
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
bpm	Batimentos por minuto
CASP	Perfuração do colo ascendente por <i>stent</i> (do inglês, <i>Colon ascendens stent peritonitis</i> )
CE50	Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo
CKMB	Creatina quinase fração MB (do inglês, <i>Creatine kinase MB</i> ).
CLP	Ligação e perfuração do ceco (do inglês, <i>Cecal ligation and puncture</i> )
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase 2
DBCA	Diretriz brasileira para o cuidado e a utilização de animais para fins científicos e didáticos
EMax	Efeito máximo
FSR	Fluxo sanguíneo renal
GRKs	Cinases de receptores acoplados a proteína G (do inglês, <i>G Protein-coupled receptor kinases</i> )
HTAB	Brometo de hexadeciltrimetilamônio (do inglês, <i>Hexadecyltrimethylammonium bromide</i> )
LBP	Proteína ligante de LPS (do inglês, <i>LPS-binding protein</i> )
LPS	Lipopolissacarídeo
MLC	Cadeia leve da miosina (do inglês, <i>Myosin light chain</i> )
MLCK	Miosina quinase de cadeia leve (do inglês, <i>Myosin light chain kinase</i> )
mmHg	Milímetro de mercúrio
NF-kB	Fator nuclear Kappa B (do inglês, <i>Nuclear Factor Kappa B</i> )
NO	Óxido nítrico (do inglês, <i>Nitric oxide</i> )
NOS	Óxido nítrico sintase
PAM	Pressão arterial média
PAMP	Padrões moleculares associados aos patógenos (do inglês, <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> )
PAS	Pressão arterial sistólica

PDEs	Fosfodiesterases (do inglês, <i>Phosphodiesterases</i> )
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandina I <sub>2</sub>
PU	Unidades de perfusão (do inglês, <i>Perfusion units</i> )
qSOFA	Rápida avaliação sequencial de falência de órgãos (do inglês, <i>Quick sequential organ failure assessment</i> )
SARA	Síndrome da angústia respiratória aguda
SEM	Erro padrão da média (do inglês, <i>Standard error of the mean</i> )
sGC	Guanilato ciclase solúvel (do inglês, <i>soluble Guanylate cyclase</i> )
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês, <i>Systemic inflammatory response syndrome</i> )
SOFA	Avaliação sequencial de falência de órgãos (do inglês, <i>Sequential organ failure assessment</i> )
TMB	Tetrametilbenzidina
VSMC	Célula muscular lisa vascular (do inglês, <i>Vascular smooth muscle cells</i> )

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	32
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
4.1	ANIMAIS .....	33
4.2	COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS .....	33
4.3	INDUÇÃO DE SEPSE POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP)	33
4.4	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E REATIVIDADE VASCULAR .....	35
4.4.1	Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca por Método Invasivo em Animais Anestesiados .....	35
4.4.2	Avaliação do Fluxo Sanguíneo Renal .....	37
4.4.3	Avaliação da Reatividade Vascular de Aorta em Sistema de Órgão Isolado...	38
4.5	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	40
4.5.1	Nitrato e Nitrito (NOx) Plasmático .....	40
4.5.2	Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT) .....	40
4.5.3	Ureia .....	41
4.5.4	Lactato .....	41
4.6	DETERMINAÇÃO DE GLICEMIA .....	41
4.7	CONTAGENS HEMATOLÓGICAS .....	41
4.8	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO PULMÃO E RIM .....	41
4.9	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA ATRAVÉS DE ESCORE .....	42
4.10	PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	43
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>45</b>
5.1	PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E REATIVIDADE VASCULAR .....	45
5.2	FLUXO SANGUÍNEO RENAL .....	51
5.3	REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA EM SISTEMA DE ÓRGÃO ISOLADO .....	55



5.4	DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO (NOX) PLASMÁTICO .....	57
5.5	DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS .....	58
5.6	DETERMINAÇÃO DE GLICEMIA .....	60
5.7	CONTAGENS HEMATOLÓGICAS .....	61
5.8	DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) .....	64
5.9	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE TECIDOS .....	66
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A palavra sepse origina-se do grego e significa putrefação. Poemas de Homero (700 a.C.) já faziam citações ao termo sepse e Hipócrates o descreveu como sendo um perigoso e odorífero comprometimento biológico que poderia ocorrer no organismo (FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009).

As definições de sepse foram sendo atualizadas ao longo do tempo. Por muitos anos esforços foram feitos na tentativa de caracterizar o paciente com infecção grave, porém a não uniformidade nesses critérios limitavam a assistência em saúde e também avanços na pesquisa por limitar avaliações de eficácia de abordagens terapêuticas e comparação entre diferentes estudos.

Pela necessidade de padronização nos critérios diagnósticos de sepse, no ano de 1991, durante a reunião de consenso da *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine*, a sepse foi definida como sendo uma resposta inflamatória sistêmica associada a um quadro infeccioso. Nesse consenso ainda surgiram as diferentes denominações de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), sepse, sepse grave e choque séptico (BONE et al., 1992; ABRAHAM et al., 2000). Essas definições apesar de limitadas foram utilizadas por muitos anos, porém a diferenciação entre SIRS e sepse na clínica nem sempre se mostrava clara pela dificuldade em se identificar o foco infeccioso. Outra fragilidade nesses critérios diagnósticos era a alta sensibilidade e baixa especificidade na classificação e diagnóstico dos pacientes.

No ano de 2001 ocorreu novamente uma reunião das mesmas sociedades com o intuito de tornar mais claras e específicas essas definições, além de acrescentar na avaliação sinais e sintomas que são comumente encontrados nos pacientes sépticos (edema, balanço hídrico positivo e hiperglicemia). Assim a avaliação dos pacientes passou a levar em consideração, variáveis gerais, inflamatórias, hemodinâmicas, de disfunção orgânica e de perfusão tecidual (LEVY et al., 2001).

Recentemente, no ano de 2016 ocorreu a última atualização nos critérios diagnósticos de sepse e choque séptico pelos esforços da *Society of Critical Care Medicine* e *European Society of Intensive Care Medicine*. A sepse passou a ser definida como um quadro de disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imunológica desregulada associada a uma infecção e o choque séptico, sendo o quadro de sepse acompanhado por grandes anormalidades circulatórias e

celulares/metabólicas que são capazes de aumentar substancialmente a mortalidade (SINGER et al., 2016). A tabela 1 apresenta de forma resumida as alterações nas definições de sepse e síndromes relacionadas.

Tabela 1 – Definições prévias e recentemente atualizadas sobre sepse e síndromes relacionadas

CATEGORIA	DEFINIÇÃO
<b>DEFINIÇÕES PRÉVIAS</b>	
SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica)	Dois dos critérios a seguir: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Temperatura &gt; 38 °C ou &lt; 36 °C</li> <li>• Frequência cardíaca &gt; 90 bpm</li> <li>• Frequência respiratória &gt; 20 rpm ou PaCO<sub>2</sub> &lt; 32 mmHg</li> <li>• Contagem de leucócitos &gt; 12x10<sup>3</sup>/uL ou &lt; 4x10<sup>3</sup>/uL ou &gt; 10% DNND</li> </ul>
Sepse	SIRS com infecção (suspeita ou confirmada)
Sepse grave	Sepse com evidência de disfunção orgânica aguda (hipotensão, acidose láctica, reduzido débito, reduzida PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> , aumento de creatinina ou bilirrubina e trombocitopenia)
Choque séptico	Sepse com persistência de hipotensão após reanimação volêmica
<b>DEFINIÇÕES REVISADAS</b>	
Sepse	Disfunção orgânica com risco de vida causada por resposta imune desregulada frente a uma infecção
Choque séptico	Sepse + necessidade de vasopressor para elevar a pressão arterial média acima de 65 mmHg e lactato > 2 mmol/L (18 mg/dL) após reanimação volêmica

Fonte: Adaptada de Gotts; Matthay. 2016.

Sepse e choque séptico são identificados por pontuação nos escore qSOFA e SOFA.

PaO<sub>2</sub>, pressão parcial de oxigênio; FIO<sub>2</sub>, fração inspirada de oxigênio; bpm, batimentos por minuto; DNND, desvio nuclear de neutrófilos à direita.

De acordo com as novas atualizações, o quadro de sepse é identificado pelo aumento agudo de dois ou mais pontos no escore SOFA (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*) (SINGER et al., 2016). A utilização desse escore, embora muito adequada, apresenta como limitação a exigência de alguns exames complementares.

Pela exigência de análises laboratoriais que podem retardar o diagnóstico e ainda escassos recursos financeiros por parte de alguns países, desenvolveu-se o escore qSOFA (do inglês, *quick Sequential Organ Failure Assessment*), que permite uma triagem rápida dos pacientes com risco de desenvolverem sepse, tornando-se

assim muito útil à beira do leito. No escore qSOFA são utilizados 3 critérios: pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg, frequência respiratória maior que 22/min e alteração do nível de consciência (Escala de coma de Glasgow < 15). Cada critério conta um ponto, e ocorrendo uma pontuação de 2 ou mais indica-se o uso do escore SOFA para avaliação do paciente (SINGER et al., 2016) (Tabela 2).

Tabela 2 – Critérios utilizados no escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*)

SISTEMA	ESCORE				
	0	1	2	3	4
<b>Respiratório</b>					
PaO <sub>2</sub> /FIO <sub>2</sub> , mmHg (KPa)	≥400	<400	<300	<200	<100
<b>Coagulação</b>					
Plaquetas, x10 <sup>3</sup> /uL	≥150	<150	<100	<50	<20
<b>Fígado</b>					
Bilirrubina, mg/dL (umol/L)	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
<b>Cardiovascular</b>	MAP ≥70 mmHg	MAP <70 mmHg	Dopamina <5 ou dobutamina qualquer dose <sup>a</sup>	Dopamina 5.1-1.5 ou fenilefrina ≤0.1 ou noradrenalina ≤0.1 <sup>a</sup>	Dopamina >15 ou fenilefrina ≥0.1 ou noradrenalina ≥0.1 <sup>a</sup>
<b>Sistema nervoso Central</b>					
Escala de coma de Glasgow <sup>b</sup>	15	13-14	10-12	6-9	<6
<b>Renal</b>					
Creatinina, mg/dL (umol/L)	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5.0
Débito urinário, mL/d				<500	<200

Fonte: Adaptada de Singer et al., 2016.

PaO<sub>2</sub>, pressão parcial de oxigênio; FIO<sub>2</sub>, fração inspirada de oxigênio; SaO<sub>2</sub>, saturação arterial de oxigênio; MAP, pressão arterial média.

<sup>a</sup> Doses de catecolaminas dadas em µg/Kg/min por no mínimo 1 h.

<sup>b</sup> Escala de coma de Glasgow: pontuação de 3 a 15; alta pontuação indica melhor função neurológica.

A taxa de incidência e prevalência de sepse no mundo é elevada, apresentando crescimento na população ao longo das últimas décadas. Atualmente representa a segunda causa de morte em unidades de tratamento intensivo (UTIs) não cardiológicas em todo o mundo e a taxa de mortalidade se associa à disfunção múltipla orgânica comum no choque séptico. Dados sobre mortalidade ocasionada por sepse ao redor do mundo variam bastante, em média de 29 a 60% em diferentes países (MARTIN et al., 2003; DOMBROVSKIY et al., 2007; LAGU et al., 2012; ANGUS; VON DER POLL, 2013).

No ano de 2000, uma pesquisa realizada nos EUA apontou que no país, por ano, havia 650 mil novos casos de sepse, tendo uma mortalidade de 18% (ANGUS et al., 2001). Mais recentemente outros dados apontaram que a incidência de sepse em pacientes hospitalizados mais que dobrou na última década no país. No ano de 2000 a 2008 o número de pacientes internados com diagnóstico de sepse aumentou de 11,6 para 24,0 para cada 10.000 habitantes nos EUA (HALL et al., 2011).

O tempo de permanência em UTIs de pacientes com diagnóstico de sepse é sempre maior se comparado a outros diagnósticos, além do custo do tratamento que é bastante oneroso ao redor do mundo. Nos EUA, por exemplo, em 2008 estima-se que o custo anual de internamento e tratamento desses pacientes tenha sido de US\$ 14,6 bilhões. Mesmo com um alto custo, o tratamento atual não apresenta nenhuma nova abordagem terapêutica, baseando-se assim as intervenções em terapia de suporte hemodinâmico, utilização de antimicrobianos e quando possível remoção cirúrgica do foco infeccioso (ANGUS, 2011). Os cuidados com a sepse se mostram ainda mais complexos uma vez que os pacientes sobreviventes de quadros mais graves da síndrome permanecem muito propensos a desenvolverem sérios problemas de saúde em longo prazo (IWASHYNA et al., 2010).

Existe uma clara desigualdade de informações sobre sepse no mundo, por exemplo, poucos são os dados sobre a epidemiologia ou tendências relacionadas à síndrome em países em desenvolvimento (TANIGUCHI et al., 2014).

Taniguchi et al. (2014) desenvolveram um trabalho de levantamento de dados sobre a sepse no Brasil de 2002 a 2010. Foram avaliados dados de desfecho clínico a partir do registro nacional de mortalidade. O resultado encontrado mostrou que o número de mortes ocasionadas por sepse cresceu durante todo o período avaliado, passando de 9,77% para 16,46%. Em um estudo anterior, avaliando-se UTIs de

hospitais públicos brasileiros, identificou-se que dentre a totalidade de pacientes admitidos nas unidades, 47% apresentavam sepse (KAUSS et al., 2010).

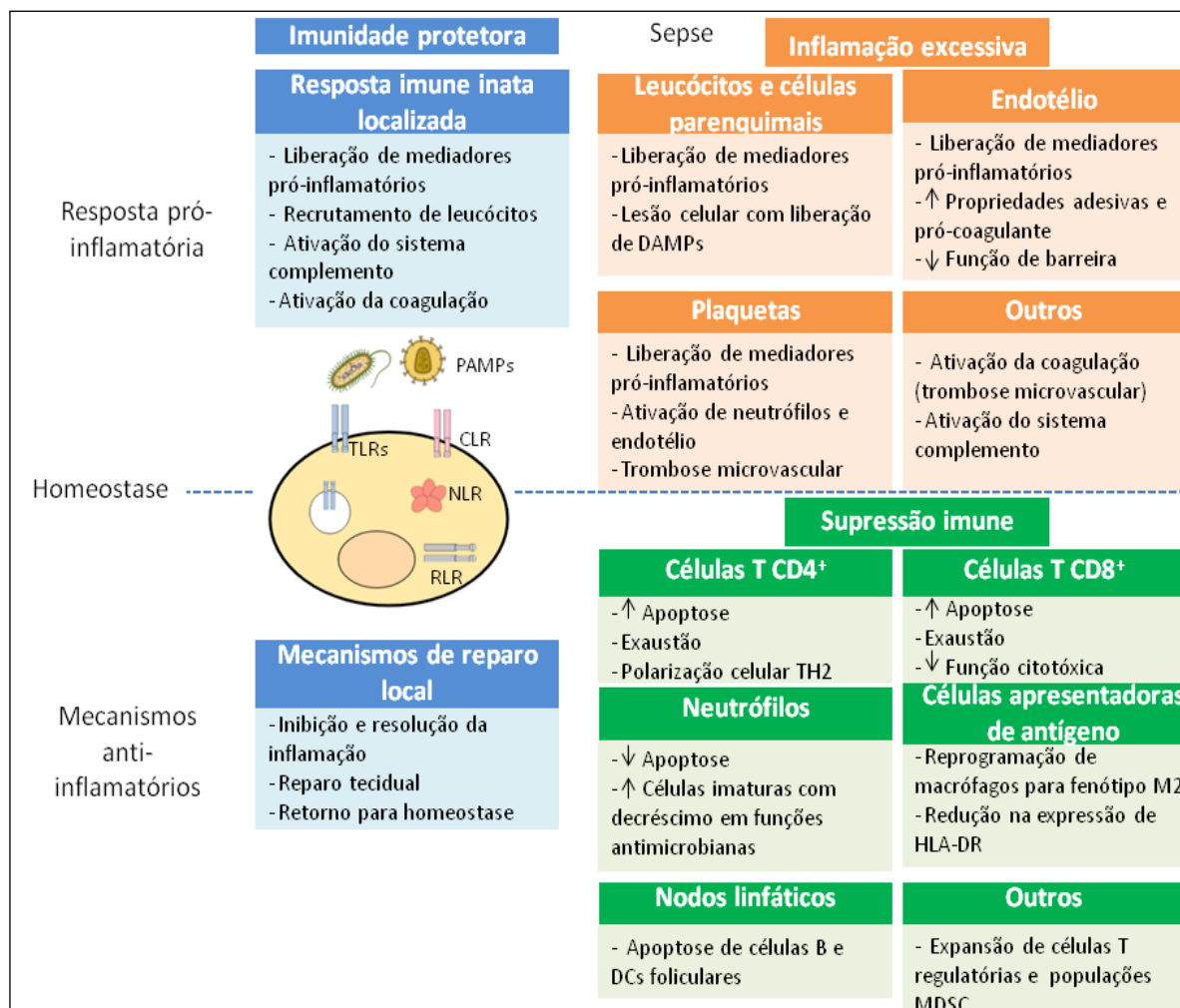
A sepse apresenta uma fisiopatologia bastante complexa. Logo após a infecção o sistema imunológico é ativado pelas células do sistema imune inato que reconhecem o patógeno através de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) e esse reconhecimento ocorre através de receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) (TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

O processo infeccioso pode ser causado por vírus, fungos, parasitas, porém comumente são causados por bactérias, tendo em vista a grande capacidade intrínseca de estimular o sistema imunológico do hospedeiro (LEVY et al., 2003). Dentre os principais componentes bacterianos capazes de desencadear o processo inflamatório na sepse como peptidoglicanos, ácido lipoteicoico, flagelina, destaca-se o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias Gram-negativas (COHEN, 2002). O LPS é reconhecido pelas células do hospedeiro através de sua ligação à proteína ligante de LPS (LBP, do inglês, *LPS-Binding Protein*) junto ao co-receptor CD14 que permite o reconhecimento pelo complexo de receptor do tipo *Toll* (TLR-4, do inglês, *Toll Like receptor-4*) e proteína MD-2. Entretanto o reconhecimento do LPS pode ainda ocorrer através de outras moléculas de superfície, como o MSR (do inglês, *Macrophage Scavenger Receptor*), CD11b/CD1 e canais iônicos (COHEN, 2002).

Em muitos casos, a resposta imune inata elimina o patógeno invasor, porém o micro-organismo pode prevalecer e assim a resposta imune tornar-se desequilibrada e prejudicial. É comum que os pacientes admitidos com sepse em hospitais apresentem quebra da homeostase em duas direções opostas, apresentando sinais excessivos de inflamação e supressão imune. A extensão desse perfil varia de acordo com a resposta imunológica em cada paciente (VAN DER POLL et al., 2017) (Figura 1).

Durante o quadro clínico da sepse, ocorre um aumento na produção de óxido nítrico (NO, do inglês, *Nitric Oxide*) que é um importante mediador desempenhando um papel central na fisiopatologia da doença, sendo um dos principais fatores envolvidos na vasodilatação e dano tecidual observado na síndrome.

Figura 1 – Diferentes mecanismos envolvidos na resposta imune do hospedeiro durante a sepse



Fonte: Adaptada de van der Poll et al., 2017.

Após a infecção, o patógeno invasor encontra o sistema imune inato do hospedeiro. Células imunes estão envolvidas na resposta imune local precoce a agentes patogênicos. Essas células detectam agentes patogênicos ao PAMPs através de receptores TLRs, NLR, RLRs e CLR. Na maioria dos casos, o sistema imunológico inato é eficiente na montagem de uma resposta protetora e equilibrada às infecções, o que resulta na eliminação do patógeno. No entanto, durante algumas infecções, o patógeno prevalece e consegue se multiplicar apesar de uma resposta imune ativada, que então se torna desequilibrada e prejudicial para o hospedeiro. PAMPs, padrões moleculares associados aos patógenos; TLRs, receptores tipo Toll; NLR, receptores semelhantes a domínio de oligomerização de ligação a nucleótidos; RLRs, receptores de genes semelhantes induzíveis ao ácido retinóico; CLR, receptores de lectina de tipo C; DAMPs, padrões moleculares associados a danos; DCs, células dendríticas e MDSC, células supressoras derivadas de mielóides.

O NO é produzido através da oxidação de sua molécula precursora L-arginina em L-citrulina pela óxido nítrico sintase (NOS, do inglês, *Nitric Oxide Sintase*). Existem três diferentes isoformas de NOS, óxido nítrico sintase 1 (NOS-1), óxido nítrico sintase 3 (NOS-3), ambas sendo expressas em condições fisiológicas, além da óxido nítrico sintase 2 (NOS-2) cuja expressão está aumentada em condições patológicas. Existem

ainda diferenças na distribuição tecidual e na atividade dessas enzimas, NOS-1 e NOS-3 apresentam uma produção constante, porém baixa de NO, enquanto NOS-2 quando aumentada sua expressão mantém uma elevada e longa produção de NO gerando hipotensão, hiporreatividade a vasoconstritores, comprometimento na função miocárdica, entre outros efeitos deletérios (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1989; FÖRSTERMANN; BOISSEL; KLEINERT, 1998). Atualmente, já se sabe que existe o envolvimento das demais isoformas de NOS na sepse, podendo elas atuar em conjunto levando ao aumento da expressão de NOS-2 (SCHESCHOWITSCH et al., 2015). Porém ainda é aceito que a grande maioria do NO produzido na síndrome séptica seja mesmo decorrente da atividade de NOS-2 (DUMA et al., 2011; NARDI et al., 2014).

A partir da clara associação entre aumento na produção de NO e a patogênese observada na sepse, foi proposta a utilização de inibidores de NOS como ferramenta terapêutica. Porém, ainda não se tem um completo entendimento das vias de sinalização operadas pelo NO. Devemos ainda lembrar que o NO apresenta importantes ações na defesa contra micro-organismos e há uma ausência de seletividade dos inibidores de NOS testados até o momento. Tudo isso pode justificar um estudo de Fase III com um inibidor de NOS na sepse humana que foi interrompido por acarretar em aumento da mortalidade (LÓPEZ et al., 2004).

O NO pode atuar em diferentes alvos, isso depende muito da sua concentração e do local de sua produção, porém um dos seus principais efeitos biológicos é estimular guanilato ciclase solúvel (sGC, do inglês, *soluble Guanylate Cyclase*) a produzir guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP) (HUSSAIN; HOBBS; MACALLISTER, 1999).

O cGMP por sua vez ativa proteína quinase G (PKG, do inglês, *Protein Kinase G*). As ações de PKG incluem redução no cálcio citosólico por aumento de exportação e diminuição na sua mobilização por inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>), defosforilação da cadeia leve da miosina (MLC, do inglês, *Myosin Light Chain*) por fosfatases ou preservação na fosforilação da miosina quinase de cadeia leve (MLCK, do inglês, *Myosin Light Chain Kinase*). A fosforilação da miosina impede a interação com a actina, assim ocorre relaxamento muscular, conseqüentemente gerando vasodilatação e permitindo o controle sobre o tônus vascular (DENNINGER; MARLETTA, 1999).

Além da PKG o cGMP pode atuar sobre canais iônicos e fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs, do inglês, *Phosphodiesterases*). O cGMP é inativado a



5'-GMP por PDEs, da mesma forma outra importante molécula a adenosina 3',5' monofosfato cíclico (cAMP) é inativada a 5'-AMP pela atividade dessas enzimas.

Os segundos mensageiros cAMP e cGMP medeiam a resposta das células para vários hormônios e neurotransmissores e modulam muitos processos fisiológicos, incluindo contração cardíaca e de musculatura lisa, ação de hormônios esteroidais, agregação plaquetária, apoptose, migração de leucócitos, entre outros efeitos (HOUSLAY, 1998; O'NEILL et al. 2008; ZACCOLO; MOVSESIAN 2007).

A sinalização do cAMP e cGMP *in vivo* envolve três tipos de alvos conhecidos: ciclases, PDEs e proteínas quinases dependentes de nucleotídeos cíclicos (HENGMING; HUANCHEN; MENGCHUN, 2011).

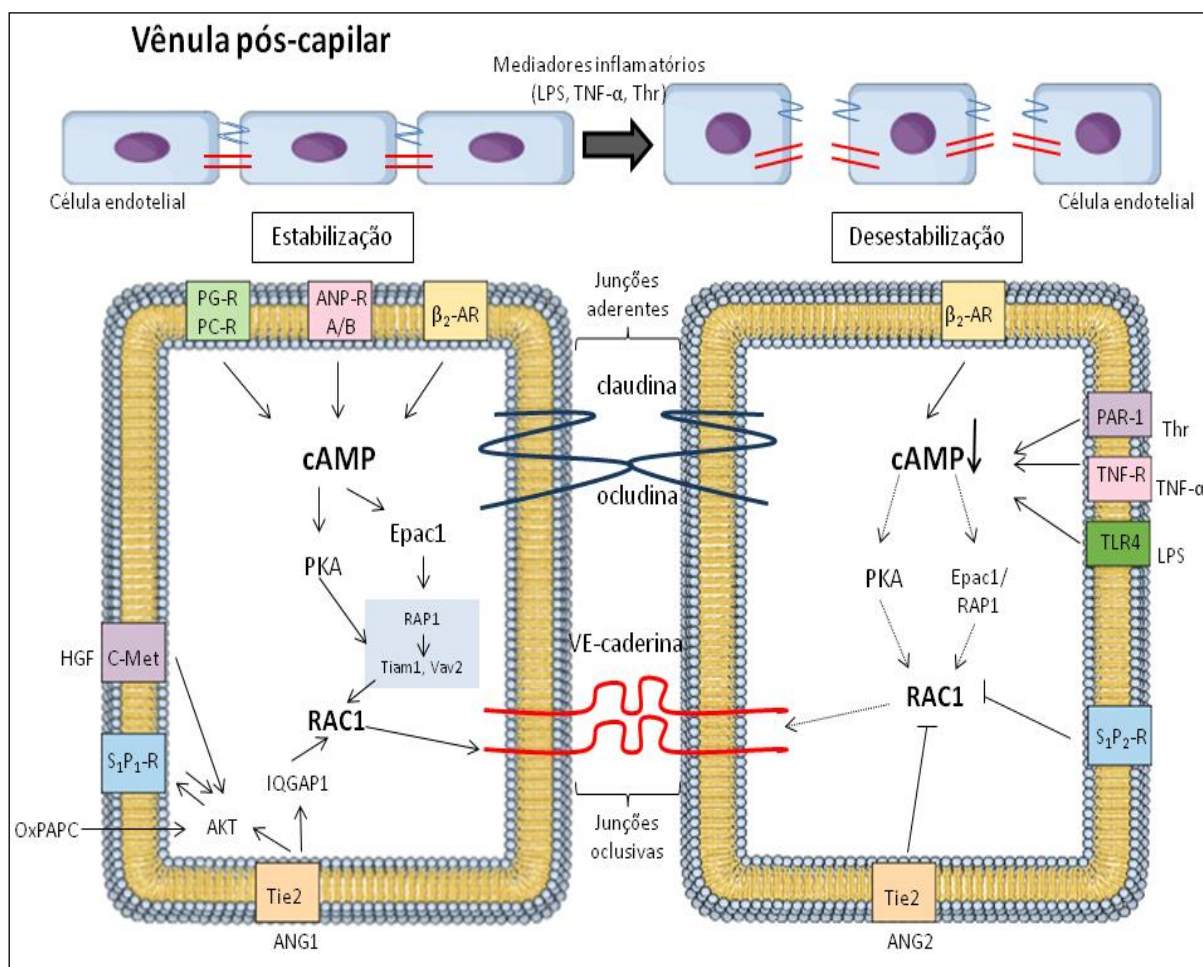
Atualmente tem-se estudado bastante o papel do cAMP na barreira endotelial e em geral tem sido demonstrado que cAMP melhora a função da barreira endotelial diminuindo a permeabilidade em experimentos *in vitro* e *in vivo*. A barreira endotelial atua como uma barreira física entre o sangue circulante e a parede dos vasos e tecidos (MEHTA; MALIK, 2006). O cGMP também atua na estabilização endotelial, porém seu papel não está tão claro. Por mediar os efeitos do NO, diversas pesquisas demonstraram em experimentos *in vivo* e *in vitro* resultados opostos, ocorrendo aumento e diminuição na permeabilidade vascular (para revisão ver SURAPISITCHAT; BEAVO, 2011).

A estabilização endotelial promovida pelo cAMP ocorre basicamente por duas vias. A primeira envolve proteína quinase A (PKA, do inglês, *Protein Kinase A*) e a fosforilação de seus substratos, MLCK, proteínas quinase 1 e 2 reguladas por sinal extracelular (ERK1 e 2, do inglês, *Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2*) e RhoA GTPase. Já a segunda via é PKA independente, ocorrendo a ligação direta do cAMP a proteína Epac e ambas as vias ativando Rac 1 que é crucial para a estabilização das junções VE-caderina entre as células endoteliais (CURRY; ADAMSON, 2013; SCHLEGEL; WASCHKE, 2014).

As funções da barreira endotelial podem ser afetadas por várias condições patológicas, como acidente vascular cerebral, má formação de vasos, aterosclerose, formação de tumor e em destaque inflamação aguda e a resposta inflamatória na sepse (DEJANA et al., 2009). Em condições inflamatórias, o colapso na barreira endotelial é predominantemente causado pela abertura de junções paracelulares entre as células endoteliais na região de vênulas pós-capilares, com formação de

edema em tecido subcutâneo e cavidades (MEHTA; MALIK 2006; LEE; SLUTSKY 2010; GOLDENBERG et al., 2011) (Figura 2).

Figura 2 – Controle do cAMP sobre a estabilização da barreira endotelial



Fonte: Adaptada de Schlegel; Waschke, 2014.

A atividade de Rac 1 é crucial para os mediadores envolvidos na regulação da barreira endotelial em condições normais e na inflamação. A regulação da barreira endotelial ocorre predominantemente em nível de vênulas pós-capilares. Mediadores inflamatórios como lipopolissacarídeo (LPS), fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ou tromбина causam a abertura das junções intercelulares. Vários mediadores estabilizam a barreira endotelial através de mecanismos dependentes de cAMP. Prostaglandinas, peptídeo natriurético atrial (ANP) ou agonista de receptor  $\beta$  através de seus receptores aumentam os níveis de cAMP nas células endoteliais. O cAMP promove ativação de Rac1/Cdc42 via GEFs Tiam1 e Vav2 através de PKA e Epac1/Rap1. De forma similar, angiopoetina 1 (Ang1), fator de crescimento de hepatócitos (HGF) e esfingosina -1-fosfato (S1P) através de seus receptores, da mesma forma OxpAPC causa ativação de Rac 1, um processo envolvendo AKT e IQGAP1. Assim, o nível de Rac 1 e a sinalização pelo cAMP se convergem sinalizando fortalecimento na barreira endotelial. O rompimento na barreira endotelial por mediadores inflamatórios como LPS, TNF- $\alpha$ , ou tromбина, assim como pela perda na estimulação  $\beta$  adrenérgica e Ang 2 é mediado pela redução do cAMP e atividade de Rac 1.

A superfamília de PDEs que atua na inativação e controle de cAMP e cGMP é extremamente complexa, compreendendo atualmente 12 famílias distintas. Dentro de algumas famílias existem ainda diferentes isoformas dessas enzimas. Pela importância da sinalização controlada pela atividade de PDEs, existem inibidores farmacológicos, alguns deles sendo utilizados na clínica para o tratamento de diferentes condições patológicas. Os inibidores de PDEs aumentam os níveis de cAMP e cGMP de acordo com a seletividade pelo substrato da PDE que tem sua atividade bloqueada (BENDER; BEAVO, 2006; CONTI; BEAVO 2007; KOHNO; YAMAGUCHI; HAKOSHIMA, 2010; POULSEN et al., 2012; MAURICE et al., 2014) (Tabela 3).

Tabela 3 – Família das diferentes fosfodiesterases

(continua)

<b>PDE</b>	<b>Isoformas</b>	<b>Substrato</b>	<b>Distribuição tecidual</b>	<b>Funções</b>	<b>Inibidores</b>
<b>PDE1</b>	PDE1A , PDE1B e PDE1C	cAMP, cGMP	Cérebro, coração, fígado, músculo vascular e visceral	Perda de memória e olfato	Vinpocetina Nicardipina 8-MeOM- IBMX Nimodipina EHNA
<b>PDE2</b>	PDE2A	cAMP, cGMP	Coração, cérebro, músculo esquelético e visceral, corpo cavernoso e córtex adrenal	Produção de adrenocorticoides, olfato e perda de memória	
<b>PDE3</b>	PDE3A e PDE3B	cAMP, cGMP	Corpo cavernoso, coração, cérebro, músculo vascular e visceral, plaquetas, fígado, rim e tecido adiposo	Contratilidade miocárdica, secreção de insulina, lipólise, gliconeogênese, agregação plaquetária	Lixazinona Cilostamida Milrinona Cilostazol Dihydro- pyridazinona
<b>PDE4</b>	PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D	cAMP	Cérebro, testículos, leucócitos, músculo esquelético, visceral e vascular	Inflamação, tônus do músculo vascular e visceral, depressão e reprodução	Rolipram Denbufyllina Cilomilast Roflumilast
<b>PDE5</b>	PDE5A	cGMP	Corpo cavernoso, plaquetas, músculo visceral e vascular, ouvido, placenta, pâncreas, cérebro, fígado, pulmão e retina	Ereção, agregação plaquetária e tônus muscular	Sildenafil Zaprinast Dipiridamol Ariflo Vardenafil Tadalafil
<b>PDE6</b>	PDE6A, PDE6B e PDE6C	cGMP	Retina	Transdução de sinal na visão	Zaprinast Dipiridamol Vardenafil Tadalafil

(conclusão)

PDE	Isoformas	Substrato	Distribuição tecidual	Funções	Inibidores
PDE7	PDE7A e PDE7B	cAMP	Músculo esquelético, coração e linfócitos	Ativação de linfócitos T e músculo esquelético	Dipiridamol Thiadiazol
PDE8	PDE8A e PDE8B	cAMP	Testículos, ovários e intestino	Ativação de linfócitos T	Dipiridamol
PDE9	PDE9A	cGMP	Baço, intestino delgado e cérebro	Déficit de memória, morte de células tumorais	Zaprinast
PDE10	PDE10A	cAMP, cGMP	Cérebro, testículos, glândula tireoide	Transdução de sinal da dopamina	Dipiridamol Papaverina
PDE11	PDE 11	cAMP, cGMP	Músculo esquelético, coração, músculo vascular e visceral, glândula pituitária, testículos, fígado e rins	Motilidade de espermatozóides, fertilidade, depressão	Tadalafil Zaprinast Dipiridamol
PDE12	PDE 12	cAMP	Mitocôndrias	Turnover de RNA mitocondrial	-----

Fonte: Adaptada de Boswell-Smith; Spina; Page, 2009; Ghosh et al., 2009; Poulsen et al., 2012; Maurice et al., 2014; Moustafa; Feldman, 2014.

As PDEs geralmente estão expressas em baixa concentração nas células, mas podem ser altamente expressas em determinados tecidos ou regiões de células para a regulação de fatores fisiológicos ou efeitos específicos através da regulação da concentração intracelular de cAMP e cGMP (CASTRO et al., 2006; HOUSLAY, 2010; AHMAD; DEGERMAN; MANGANIELLO, 2012).

A maioria das células contém múltiplas PDEs que apresentam sobreposição de especificidade e afinidade para cAMP e cGMP. No entanto, até onde se sabe, parece claro que, embora possa haver algum grau de redundância na função, cada PDE fornece controle regulatório importante de um nucleotídeo cíclico em uma determinada célula ou região de uma célula (FRANCIS; HOUSLAY; CONTI, 2011).

Evidenciando a importância da sinalização operada por nucleotídeos cíclicos, foi demonstrado através de um modelo de endotoxemia induzido por LPS que a atividade de sGC está comprometida nos momentos iniciais da síndrome, afetando assim a produção de cGMP (FERNANDES et al., 2006). Na sequência em outro trabalho foi demonstrado de forma clara que a inibição na atividade de sGC no início da sepse, com consequente diminuição do cGMP foi deletéria e culminou no aumento da mortalidade observada nos animais. Isso demonstra que o cGMP no início da sepse apresenta um papel protetor, por melhorar aspectos hemodinâmicos

(FERNANDES et al., 2009). Esses achados suportam a proposta de que a utilização de ferramentas farmacológicas que controlam a sinalização operada por cGMP e/ou cAMP, por exemplo, através do uso de inibidores de PDEs no início da sepse podem refletir em uma melhora hemodinâmica, prevenindo o desenvolvimento de disfunção orgânica e trazendo ganhos na fase tardia da síndrome.

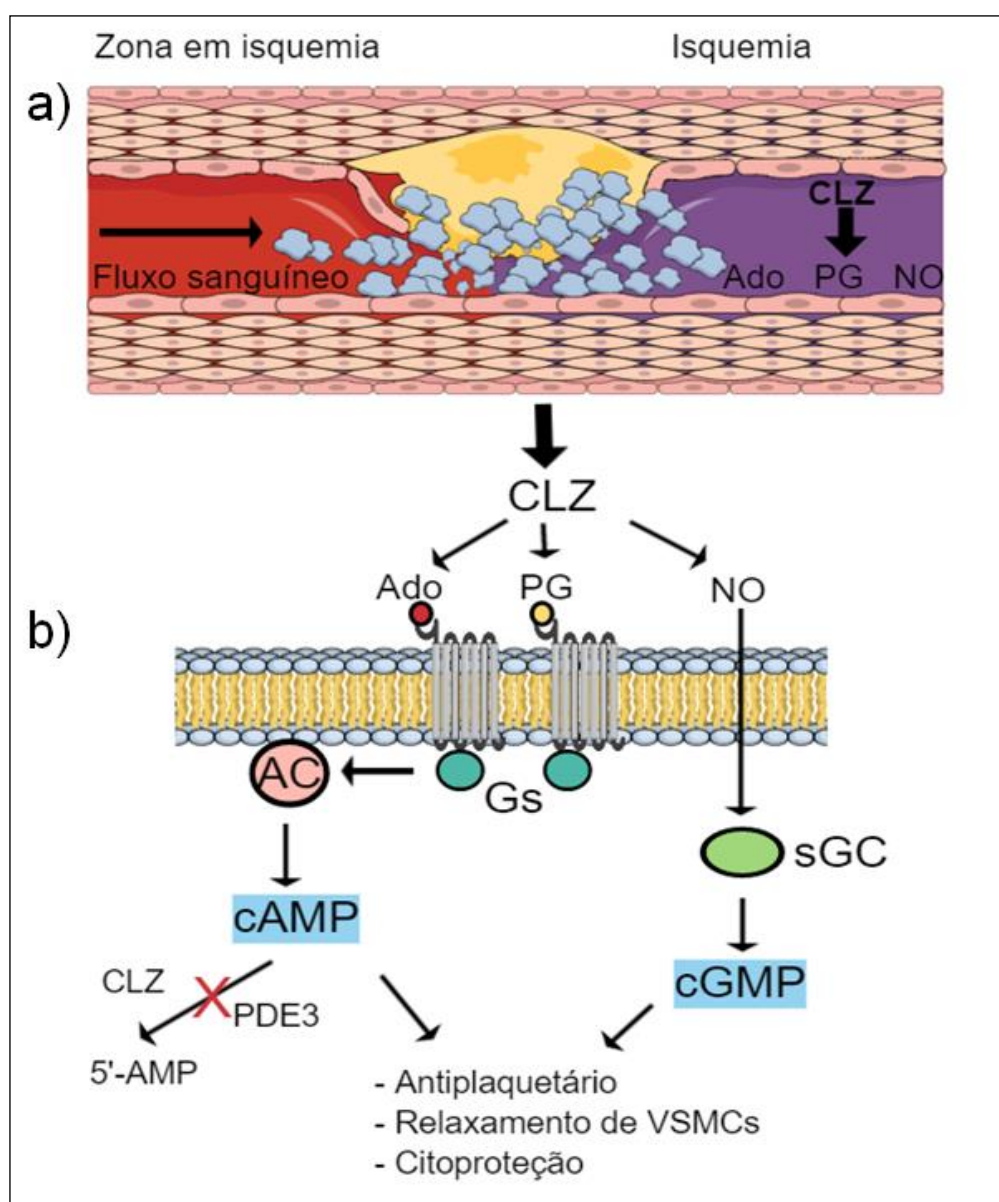
O cilostazol é um inibidor seletivo de PDE3 sintetizado no ano 1983, no Japão, sendo desde seu lançamento um fármaco referência para o tratamento da claudicação intermitente, que é a principal manifestação da doença arterial obstrutiva periférica (HONG; MACKEY, 2014). Existem duas isoformas de PDE3, PDE3A e PDE3B em diferentes tecidos, sendo PDE3A mais abundante em plaquetas, vias aéreas, músculo liso vascular e nos tecidos cardiovasculares, enquanto PDE3B está relativamente mais expressa em tecidos que são importantes na regulação do metabolismo energético, incluindo fígado, células  $\beta$  pancreáticas e tecidos adiposos (SHAKUR et al., 2000). A existência das diferentes isoformas, entretanto não afeta a inibição pelo cilostazol, porém os mecanismos exatos envolvendo todos os efeitos do fármaco não foram completamente esclarecidos.

Sabe-se que o cilostazol apresenta múltiplos efeitos, alguns deles mediados pela inibição de PDE3, enquanto outros são causados por diferentes mecanismos. Os efeitos antiplaquetários e vasodilatador do fármaco ocorrem pela inibição de PDE3 e elevação na concentração de nucleotídeos cíclicos. Entre outros efeitos já descritos estão inibição da captação de adenosina, que possui várias atividades biológicas que são mediadas pela ativação de receptores de adenosina acoplados à proteína G; aumento na liberação de prostaglandinas ( $PGE_1$  e  $PGI_2$ ) pelas células endoteliais, que promovem aumento de cAMP ao se ligarem a receptores acoplados a proteína G, favorecendo vasodilatação; e estudos ainda tem demonstrado a habilidade do cilostazol em aumentar a liberação de NO pelas células endoteliais (IGAWA et al., 1990; NAKAMURA et al., 2001; GOTO, 2005; MANICKAVASAGAM et al., 2007; ITO et al., 2010) (Figura 3).

O cilostazol é bem absorvido após administração oral, ocorrendo o pico de concentração plasmática entre 2 a 4 horas após administração. Apresenta alta taxa de ligação a proteínas plasmáticas, principalmente albumina, porém a biodisponibilidade absoluta não é conhecida. O metabolismo ocorre extensivamente via citocromo P 450 (CYP), principalmente CYP3A4 (PARK et al., 2011). A eliminação do cilostazol e seus metabólitos ocorrem majoritariamente através da excreção renal,

com 20% aproximadamente de excreção nas fezes. O fármaco apresenta uma meia vida de eliminação entre 11 e 13 horas, sendo clinicamente administrada uma nova dose a cada 12 horas para o tratamento da claudicação intermitente (SCHROR, 2002).

Figura 3 – Efeitos PDE3 dependentes e independentes do cilostazol



Fonte: Adaptada de Liu; Shakur; Kambayashi, 2011.

Ações independentes de PDE pelo cilostazol em zona isquêmica (a) e ações relacionadas à inibição de PDE3 em células afetadas, como células musculares lisas vasculares (VSMCs), plaquetas e endotélio (b). Em uma região isquêmica com má perfusão sanguínea, o cilostazol pode aumentar a adenosina extracelular (Ado), prostaglandinas (PG) E1 e I2 e a concentração de óxido nítrico (NO) (a). Ao ativar receptores de Ado (A2A) e de prostaglandinas, ocorre ativação de adenilato ciclase (AC) que aumenta cAMP, que pode ainda sofrer maior aumento pela inibição da PDE3. O NO estimula guanilato ciclase solúvel (sGC) em que gera o cGMP. O cAMP e o cGMP apresentam efeitos antiagregante nas plaquetas, promovem a vasodilatação e possuem propriedades citoprotetoras. Esses efeitos provavelmente funcionam em conjunto para produzir os benefícios clínicos observados com o uso do cilostazol.



Em termos hemodinâmicos e cardiovasculares a sepse se divide em duas fases distintas. A primeira fase é a hiperdinâmica, com diminuição da resistência vascular periférica e aumento no débito cardíaco. Já a segunda fase é a hipodinâmica, com queda no débito cardíaco, aumento da resistência vascular periférica e diminuição no fluxo sanguíneo (FLYNN; MANI; MATHER, 2010).

Logo nos estágios iniciais da sepse ocorre uma intensa estimulação do sistema nervoso simpático com aumento na liberação de catecolaminas, além de estimulação do sistema renina-angiotensina (MADDENS; SOWERS, 1987). Isso ocorre como uma resposta adaptativa inicial frente à liberação de NO, visando manutenção da homeostase, através de aumento na frequência cardíaca, volume e na pressão arterial média, buscando-se um balanço na inflamação e perfusão tecidual, porém ao longo do tempo essa liberação elevada e sustentada de catecolaminas gera desequilíbrio nesta função regulatória e piora a disfunção múltipla orgânica (DE MONTMOLLIN et al., 2009). Tardamente o quadro de hiporreatividade observada na sepse não se aplica a todos os leitos vasculares, o leito renal, por exemplo, apresenta preservada resposta vasoconstritora como demonstrado em modelo experimental de endotoxemia, o que agrava ainda mais a disfunção orgânica nesse órgão (GUARIDO et al., 2014). Levando-se em consideração as duas fases distintas da sepse, há indícios que a instauração de tratamento ainda na fase hiperdinâmica aumenta a chance de recuperação do paciente, podendo prevenir o desenvolvimento da disfunção orgânica tardia.

Diante de todas essas características uma boa abordagem terapêutica pode ser o aumento dos níveis de nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) nos momentos iniciais da sepse, visando diminuição na vasoconstrição, resistência vascular, isquemia e assim melhorar perfusão microvascular tecidual. A fisiopatologia da disfunção orgânica durante o choque séptico é multifatorial e ainda não totalmente compreendida. Porém dando suporte a essa proposta há uma crescente apreciação da importância da falência microcirculatória no desenvolvimento dos quadros de lesões orgânicas, sendo a disfunção microvascular um importante preditor clínico de mortalidade em pacientes com sepse (TRZECIAK et al., 2007; DE BACKER et al., 2013).

Recentemente, foi demonstrado que o uso de sildenafil, um inibidor seletivo de PDE5 no início da sepse melhorou aspectos hemodinâmicos comprovados por aumento no fluxo sanguíneo renal e redução em marcadores de lesão e inflamação

tecidual (KOVALSKI et al., 2017). E outro trabalho demonstrou que o cilostazol foi capaz de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias e marcadores de dano tecidual em um modelo de endotoxemia (PARK et al., 2010).

De acordo com os achados na literatura e da complexidade na abordagem terapêutica da sepse, o propósito deste trabalho foi avaliar o efeito do cilostazol na sepse, através de aspectos cardiovasculares, hemodinâmicos, inflamatórios e de disfunção orgânica.



## 2 HIPÓTESE

O aumento dos níveis de cAMP e cGMP pelo uso do cilostazol, um inibidor de fosfodiesterase 3, no início da sepse, apresenta um papel protetor em aspectos hemodinâmicos, inflamatórios ou prevenção do desenvolvimento de lesão múltipla orgânica observada em fase tardia da sepse?

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar o papel do cilostazol sobre as alterações vasculares e danos teciduais induzidos por um modelo de sepse por ligação e perfuração cecal (CLP) em ratos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- I. Padronizar o modelo de sepse induzida por ligação e perfuração cecal (CLP, do inglês, *Cecal Ligation and Puncture*) em ratos;
- II. Avaliar o efeito do cilostazol sobre as alterações hemodinâmicas em animais sépticos;
- III. Avaliar o efeito do cilostazol na reatividade vascular em animais sépticos;
- IV. Avaliar o efeito do cilostazol sobre as alterações bioquímicas e hematológicas em animais sépticos;
- V. Avaliar histopatologicamente o efeito do cilostazol sobre os danos teciduais em animais sépticos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos da linhagem *Wistar* machos, de 2 a 3 meses de idade, pesando entre 200-300 g, fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura de  $22 \pm 2$  °C e ciclo de claro/escuro (12/12h), controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso à alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UEPG) sob o processo de número 006/2017 e os animais foram manipulados conforme as 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).

### 4.2 COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS

As seguintes substâncias foram utilizadas nesse estudo: Cilostazol (IPCA Laboratories Limited, Mumbai, Índia); fenilefrina, angiotensina II, acetilcolina, nitroprussiato de sódio e isoprenalina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); cloridrato de cetamina e xilazina (Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil); heparina sódica (Cristália Produtos Farmacêuticos, São Paulo, SP, Brasil); reativo de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA); brometo de hexadeciltrimetilamônio, tampão fosfato de sódio, tetrametilbenzidina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); ácido acético glacial, álcool etílico absoluto e formaldeído (Labsynth, Diadema, SP, Brasil); peróxido de hidrogênio 10V (Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil).

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

A indução de sepse foi através do modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP, do inglês, *Cecal Ligation and Puncture*) descrito inicialmente por Baker et al. (1983) e Wichtermann et al. (1980). Esse modelo foi escolhido pelo fato de se

assemelhar bastante ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou ainda peritonite pós-operatória.

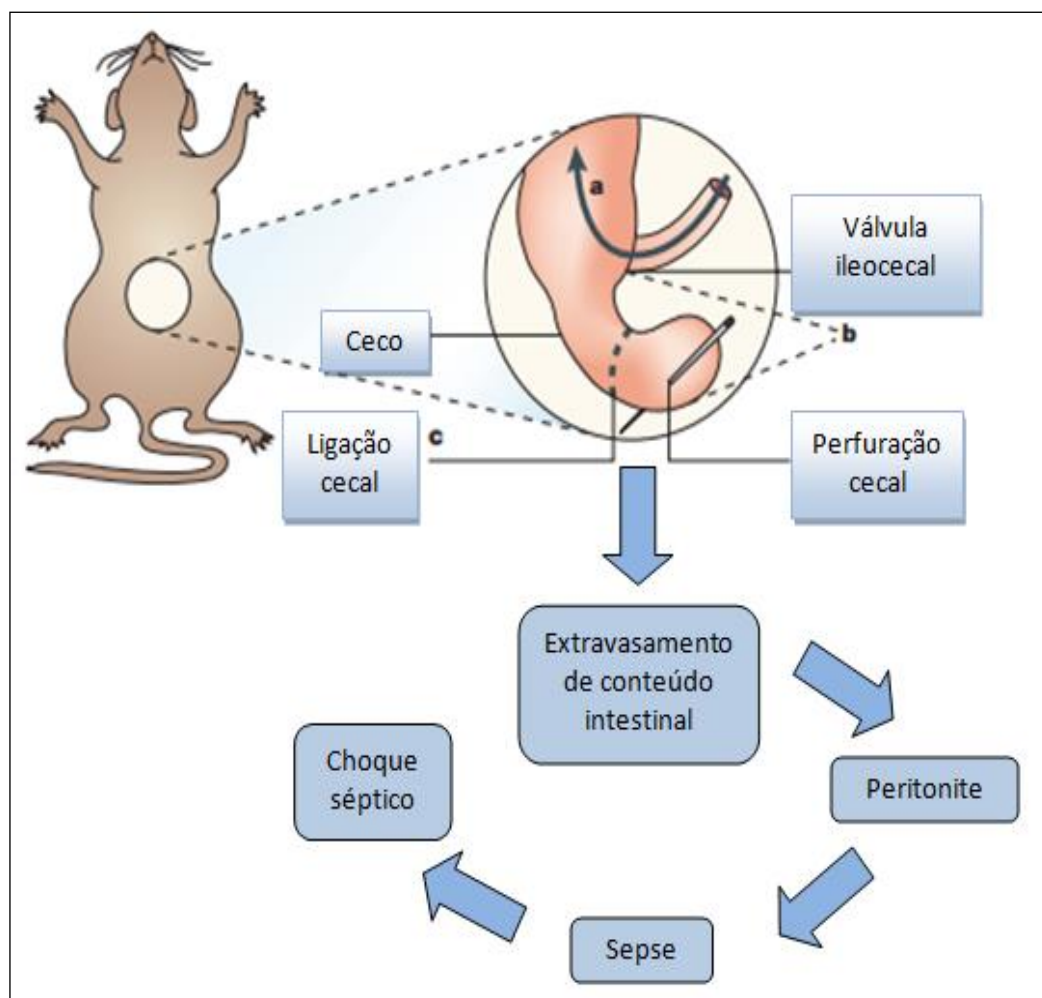
Para realização do procedimento, os ratos foram anestesiados com uma solução anestésica composta por cetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) administrada por via intraperitoneal (i.p.). Na sequência, realizou-se a tricotomia de pelos na região abdominal nos animais, sendo estes posicionados em mesa cirúrgica. Realizou-se antissepsia local com álcool 70°GL e em seguida os animais foram submetidos a uma laparotomia com incisão longitudinal de aproximadamente 1 cm e subsequente exposição do ceco. Realizou-se uma semi-oclusão do mesmo com fio de seda, próxima à válvula íleocecal. O ceco foi perfurado uma vez com agulha estéril 18G (40 x 1.2) na sequência comprimido objetivando o extravasamento do conteúdo fecal.

Na sequência, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal, sendo musculatura e pele suturadas com fio de seda e a região abdominal antissepsiada com álcool 70°GL. Ao término, procedeu-se a reposição fluídica nos animais com solução fisiológica (5 mL/ 100g) por via subcutânea (s.c.) como descrito por Rittirsch et al. (2009).

Em relação aos cuidados de pós-operatório, os animais foram mantidos em uma caixa sobre manta de aquecimento para o completo retorno da anestesia, o qual levou em média entre 60 a 120 min. O grupo controle foi composto por animais Sham ou “falso” operados. Estes foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos que os animais CLP, não sendo submetidos somente à etapa de semi-oclusão e perfuração do ceco.

A instalação do quadro de sepse nos animais submetidos à cirurgia de CLP pôde ser observada pela instalação de alguns sinais clínicos decorrentes de uma resposta inflamatória sistêmica como piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular e ainda diminuição da movimentação.

Figura 4 – Representação esquemática do modelo de indução de sepse por ligação e perfuração do ceco (CLP)



Fonte: Adaptada de Buras; Holzmann; Sitkovsky, 2005.

#### 4.4 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E REATIVIDADE VASCULAR

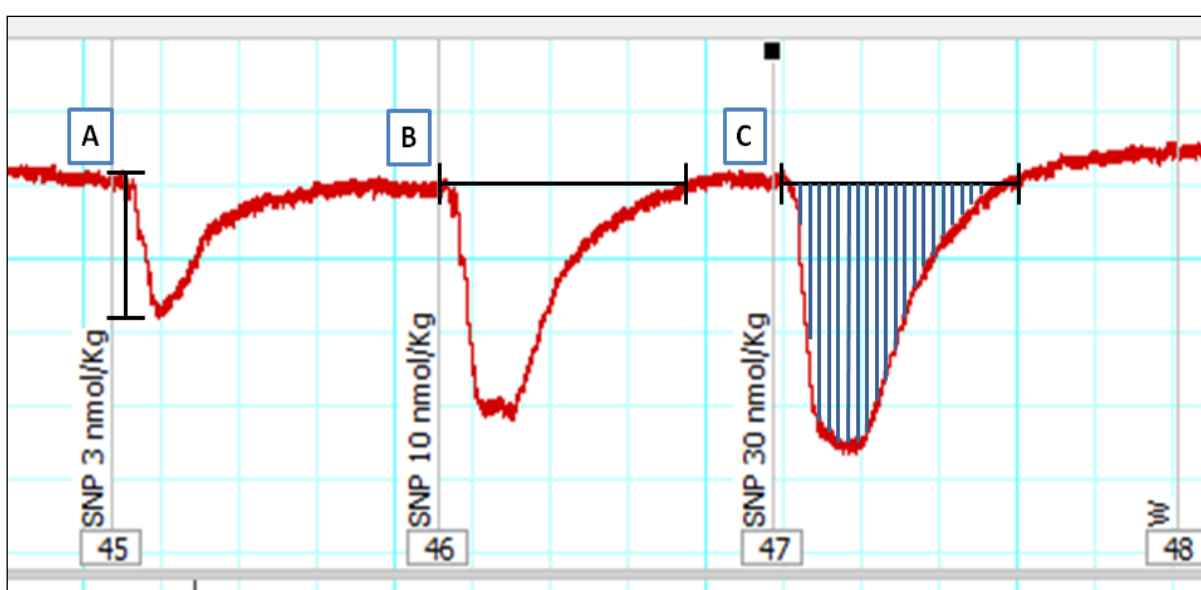
##### 4.4.1 Avaliação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca Por Método Invasivo em Animais Anestesiados

Os animais foram anestesiados com uma solução anestésica composta por quetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via intramuscular (i.m.). Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura entre 35-36 °C). Após localização e isolamento da veia jugular, foi inserido de uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. O objetivo

desse acesso venoso foi a administração de fenilefrina, angiotensina II, acetilcolina, nitroprussiato de sódio e isoprenalina. Na sequência, a artéria carótida esquerda foi localizada, e de forma rápida e cuidadosa separada do nervo vago e tecidos adjacentes. Foi inserido um cateter de polietileno (Angiocath® número 19), devidamente heparinizado, sendo este amarrado com linha cirúrgica na artéria e conectado a um transdutor de pressão acoplado ao PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). O local da incisão cirúrgica foi coberto com uma gaze embebida com solução salina estéril. 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 (LabChartPro7®). Após um período de 30 minutos de estabilização avaliou-se a reatividade vascular para fenilefrina (3; 10 e 30 nmol/kg), angiotensina II (3; 10 e 30 pmol/kg), acetilcolina (0,1; 1 e 10 nmol/kg), nitroprussiato de sódio (3; 10 e 30 nmol/kg) e isoprenalina (0,1; 0,3; 1 e 3 nmol/kg). Ao término do experimento os animais foram mortos por sobredosagem anestésica.

Os resultados da reatividade vascular foram avaliados através da variação na pressão arterial média, duração da resposta e área sob a curva resultante da amplitude e duração da resposta como demonstrado na Figura 5.

Figura 5 – Registro típico do vasodilatador nitroprussiato de sódio na pressão arterial média



Fonte: O autor.

Varição na pressão arterial média (A), tempo de resposta (B) e área sob a curva da resposta (C).

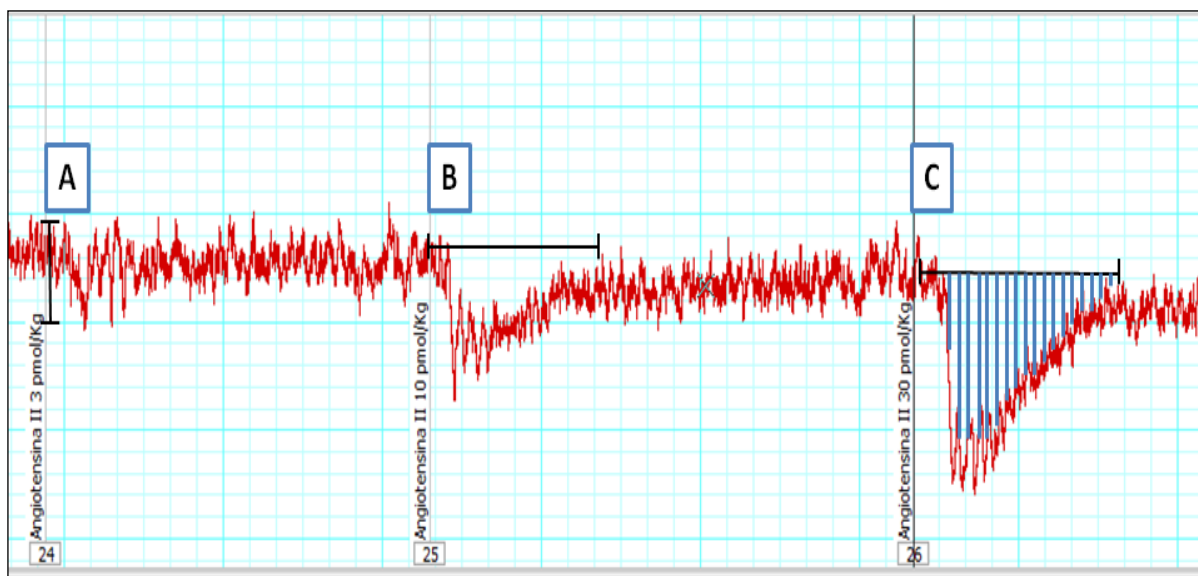
#### 4.4.2 Avaliação do Fluxo Sanguíneo Renal

Concomitantemente ao procedimento de avaliação da pressão arterial, o fluxo sanguíneo renal (FSR) foi avaliado através de uma incisão unilateral no abdômen dos animais, em que o intestino foi movido permitindo a localização do rim esquerdo do animal logo abaixo do baço.

Na sequência, uma probe laser (modelo VP1) conectado ao laser Doppler de monitoramento de fluxo sanguíneo (moorVMS-LDF2, Moor Instruments, Inglaterra) foi cuidadosamente colocado diretamente sobre o rim. A probe foi mantida nessa posição e a incisão cirúrgica foi coberta com uma gaze embebida com solução salina estéril. O FSR foi registrado usando o software moorVMS-PC V2.0 (Moor Instruments, Inglaterra). Ao término do experimento os animais foram sacrificados por sobredosagem anestésica.

Os resultados do fluxo sanguíneo renal foram avaliados através da variação no fluxo sanguíneo renal, duração da resposta e área sob a curva resultante da amplitude e duração da resposta como demonstrado na Figura 6.

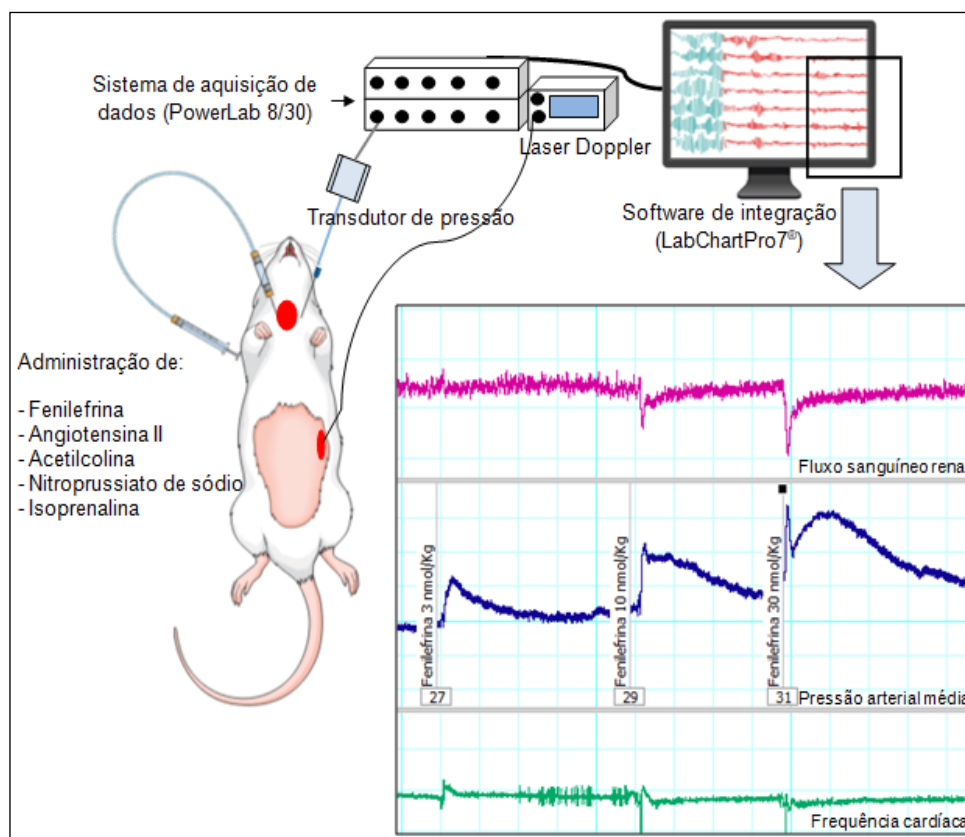
Figura 6 – Registro típico do vasoconstritor angiotensina II no fluxo sanguíneo renal



Fonte: O autor.

Variação no fluxo sanguíneo renal (A), tempo de resposta (B) e área sob a curva da resposta (C).

Figura 7 – Representação esquemática da avaliação dos parâmetros cardiovasculares e fluxo sanguíneo renal em animais anestesiados



Fonte: O autor.

#### 4.4.3 Avaliação da Reatividade Vascular de Aorta em Sistema de Órgão Isolado

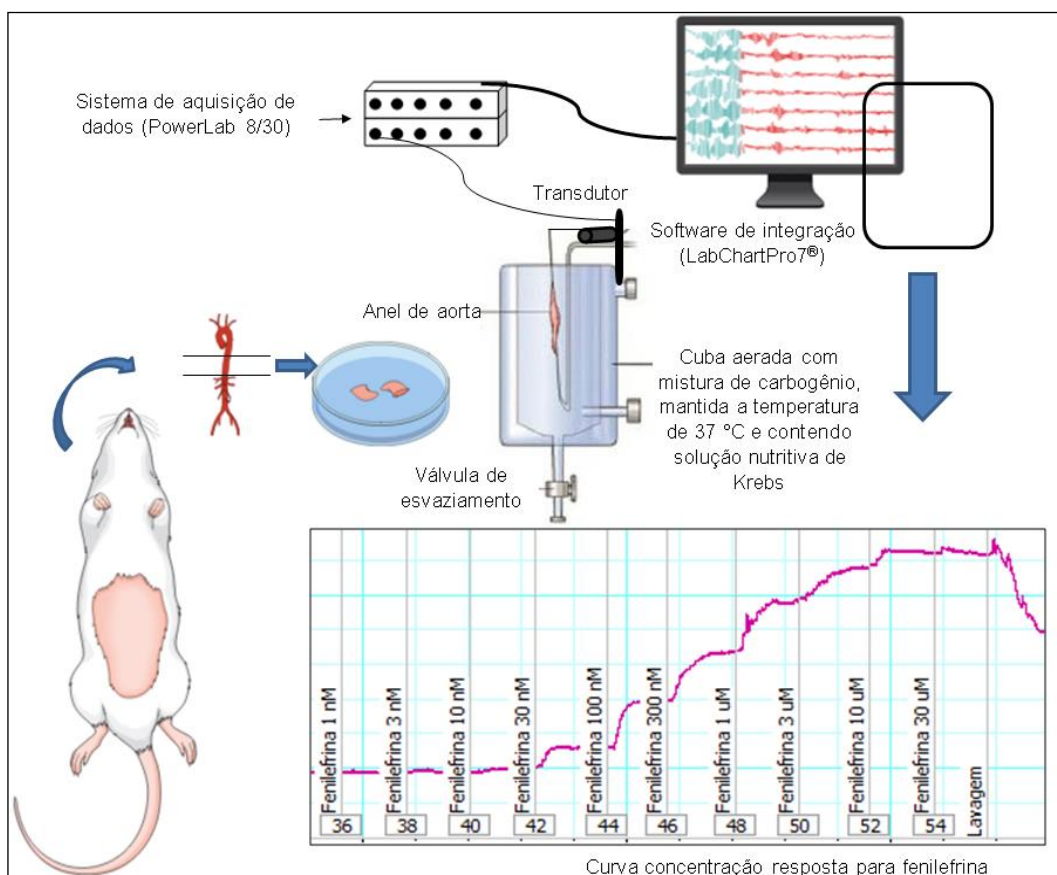
Os animais foram receberam heparina (200 UI/Kg i.p.) e após 10 minutos anestesiados com uma solução anestésica composta por quetamina (75 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg) por via i.p.. Os animais foram mortos por decaptação em guilhotina, posicionados em decúbito dorsal para abertura do tórax e a aorta torácica foi cuidadosamente removida e colocada em placa de petri contendo solução nutritiva de Krebs (em mM, NaCl, 118; KCl, 4,6; MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1,2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,2; NaHCO<sub>3</sub>, 25; C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub>, 11,1 e CaCl<sub>2</sub>, 25) para a retirada visual do tecido perivascular e secção em anéis de 3 a 4 mm de comprimento. Duas hastes metálicas foram inseridas na luz do vaso, sendo, em seguida transferidos para cubas de vidro do sistema de banho de órgãos isolados (AVS projetos, Belo Horizonte-MG, Brasil). Uma haste permaneceu fixa nas cubas enquanto a outra foi conectada a um transdutor de tensão isométrica acoplado ao sistema de aquisição de dados PowerLab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd.,



Castle Hill, Australia) e registrados em um computador por um software de integração (LabChartPro8®). A tensão basal utilizada foi de 1 g durante todo o protocolo experimental, sendo os anéis mantidos em solução nutritiva a 37 °C, pH 7,4 e com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>) borbulhada constantemente.

Após 60 minutos de estabilização, os anéis foram contraídos duas vezes como cloreto de potássio (KCl) 60 mM para avaliar a viabilidade do tecido, sendo que a última contração foi utilizada como referência para as curvas realizadas na sequência. Os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina (10<sup>-6</sup>M) e relaxados com acetilcolina (10<sup>-5</sup>M) para avaliar-se a integridade endotelial, onde se considerou endotélio íntegro quando acetilcolina promoveu um relaxamento de no mínimo 80% da pré-contração da fenilefrina. Somente os anéis com integridade endotelial foram utilizados no experimento. Foram realizadas curvas de contração concentração resposta para fenilefrina (10<sup>-9</sup> a 3x10<sup>-5</sup> M) e KCl (10 a 90 mM).

Figura 8 – Representação esquemática da avaliação da reatividade vascular de anel de aorta em sistema de órgão isolado



Fonte: O autor.

## **4.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS**

Ao término da avaliação dos parâmetros cardiovasculares os animais foram sacrificados e realizou-se a coleta de sangue através de acesso feito na artéria carótida. Foram determinados os níveis de nitrato e nitrito (NOx), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), ureia e lactato.

### **4.5.1 Nitrato e Nitrito (NOx) Plasmático**

Os níveis de NO plasmático foram quantificados indiretamente através da determinação de nitrato e nitrito (NOx), utilizando o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q), como descrito por Granger et al. (1990). O plasma foi diluído na proporção de 1:1 em água de Milli-Q e desproteínizado pela adição de sulfato de zinco 2% (1 h em banho de gelo). As amostras foram incubadas a 37 °C durante 2 horas, em presença de nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose para promover a conversão enzimática do nitrato em nitrito. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção da bactéria, na sequência 100 µL do sobrenadante foram misturados com o mesmo volume de reagente de Griess em placa de 96 poços, produzindo coloração lilás. A leitura foi realizada em 540 nm em multileitora de microplacas (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, CA, EUA). 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 foram realizadas correções dos resultados. Os valores plasmáticos foram calculados por meio de regressão linear e expressos como µM de NOx.

### **4.5.2 Aspartato Aminotransferase (AST) e Alanina Aminotransferase (ALT)**

AST e ALT plasmáticas foram determinadas através de kits comercialmente disponíveis (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. As leituras foram realizadas em 505 nm em multileitora de microplacas (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, CA, EUA). Os resultados foram calculados através de curva de calibração e expressos em U/L.

### **4.5.3 Ureia**

Ureia plasmática foi determinada através de kit comercialmente disponível (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em 600 nm em multileitora de microplacas (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, CA, EUA). Os resultados foram calculados através de fator de calibração e expressos em mg/dL.

### **4.5.4 Lactato**

Lactato plasmático foi determinado através de kit comercialmente disponível (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil) seguindo as instruções do fabricante. A leitura foi realizada em 340 nm em multileitora de microplacas (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices, CA, EUA). Os resultados foram calculados através de fator de calibração e expressos em U/L.

## **4.6 DETERMINAÇÃO DE GLICEMIA**

A glicose foi eletroquimicamente determinada através de um glicosímetro para monitoramento de glicemia Accu-Chek® Active (Roche, Alemanha). Para a determinação foi utilizada uma gota de sangue obtida da cauda dos animais. Os resultados de glicemia foram obtidos em mg/dL.

## **4.7 CONTAGENS HEMATOLÓGICAS**

As contagens de global de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas, contagem global e diferencial de leucócitos em amostras de sangue total foram feitas em contador hematológico automatizado (Horiba Abx Micros 60, Shandong, China).

## **4.8 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) NO PULMÃO E RIM**

Pulmão e rim foram homogeneizados em solução de tampão fosfato de sódio (20 mM; pH 7,4) no gelo. O homogenato resultante foi centrifugado (13.000 g, 10 min,

4 °C) e o sobrenadante descartado. O pellet formado foi então ressuspenso em tampão fosfato 50 mM (pH 6,0), contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5 %, p/v). As amostras foram novamente centrifugadas (13.000 g, 10 min, 4 °C) e agora o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de determinação da atividade da enzima MPO. Para o ensaio enzimático foi utilizada uma alíquota de 30 µL do sobrenadante. A reação enzimática foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (TMB; 1,6 mM) e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM (em solução tampão fosfato 80 mM; pH 5,4). A placa foi incubada por 2 minutos a 37 °C na própria leitora, realizando-se uma leitura a cada 2 minutos (5 leituras). A absorbância foi medida no leitor de placas a 650 nm (Ultra microplate reader EL 808, BiotTek Instruments, Winooski, VT, EUA). A quantidade de proteína total foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e os valores foram apresentados na forma de unidades de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

#### **4.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA ATRAVÉS DE ESCORE**

Ao término da avaliação dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram mortos e perfundidos com solução salina (NaCl 0,9% a 4 °C) por 3 minutos. Na sequência foram coletados rim, coração e pulmão para análise histopatológica. Os órgãos foram fixados em solução de ALFAC (etanol 80%, formaldeído 40% e ácido acético glacial na proporção de 17:2:1, respectivamente) por 16h à temperatura ambiente e na sequência a solução foi substituída por álcool etílico 70%. Os órgãos foram desidratados em álcool etílico, incluídos em parafina e seccionados em micrótomo rotativo (Leica RM 2255, Alemanha) com 5 µm de espessura. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) em sistema automatizado de coloração (Leica Autostainer XL, Alemanha), analisados em microscópio invertido (Olympus IX83, Japão) em objetivas de 10x, 20x e 40x. Os cortes foram fotografados com câmera de 17 mpixel (Olympus DP73, Japão) através do programa de captura de imagens CellSens Dimension 1.12 (Olympus, Japão). Foram analisados 3 cortes histológicos de cada animal, havendo 5 animais para cada grupo experimental.

As fotomicrografias do pulmão foram analisadas através de escore por dois pesquisadores e de forma semi-quantitativa baseando-se no grau e extensão da inflamação no tecido, utilizando-se aumento de 200x. O escore de avaliação utilizado está representado na tabela 4.

Tabela 4 – Escore semi-quantitativo para avaliação de alterações no pulmão associado ao modelo de CLP utilizado, em aumento de 200x

ESCORE	EXTENSÃO DA LESÃO
0	Ausência de inflamação ou apenas presença de células inflamatórias ao redor de pequenos vasos
1	Inflamação leve (presença de infiltrado inflamatório em até 25% da área total do corte)
2	Inflamação moderada (presença de infiltrado inflamatório em mais de 25% ou até 50% da área total do corte)
3	Inflamação severa (presença de infiltrado inflamatório em mais de 50% ou até 75% da área total do corte)
4	Extensa inflamação (presença de infiltrado inflamatório na totalidade da área do corte)

Fonte: Adaptada de Beck et al., 2001.

#### 4.10 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram randomicamente submetidos ao procedimento de CLP ou ao falso procedimento. Seis horas após o procedimento os animais foram novamente randomizados para receber cilostazol (15 mg/kg, v.o.) ou veículo (óleo de amendoim, 1 mL/kg, v.o.). Portanto, o protocolo apresenta 4 grupos distintos:

- Sham veículo
- Sham cilostazol
- CLP veículo
- CLP cilostazol

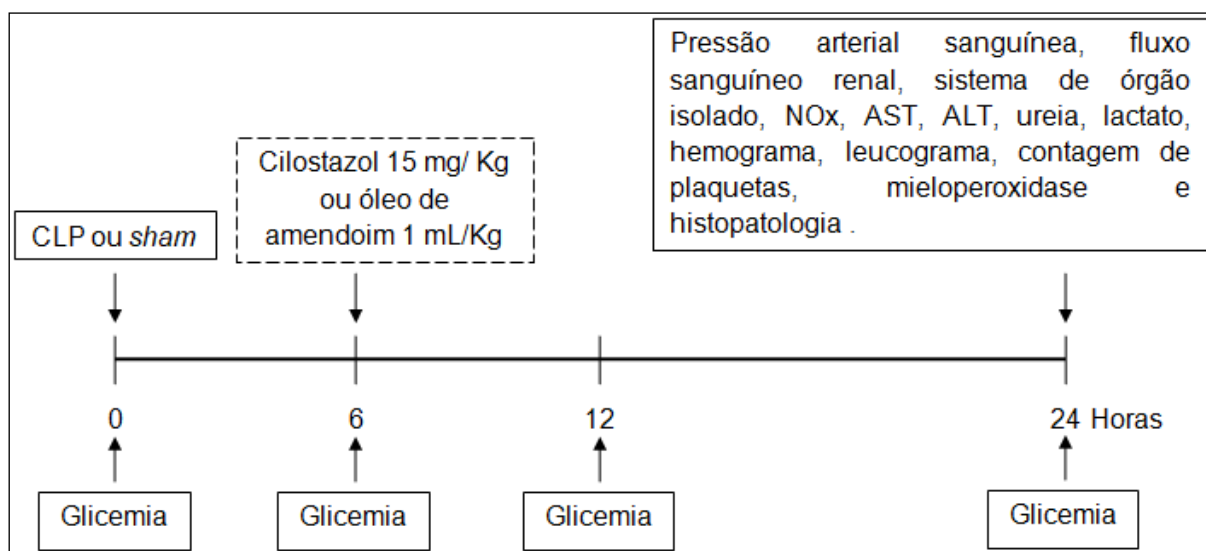
Foram utilizados 10 animais por grupo para análise de atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) e determinação de nitrato e nitrito (NOx); 8 animais por grupo para análise dos parâmetros cardiovasculares, AST, ALT, ureia, lactato, análise hematológica e glicemia; e 5 animais por grupo para análise histopatológica.

A dose do cilostazol foi escolhida de acordo com cálculo de conversão de dose de humanos para ratos (REAGAN-SHAW; NIHAL; AHMAD, 2008), bem como baseado em trabalhos na literatura que utilizaram ratos e camundongos (ABDELSAMEEA et al., 2016; PARK et al., 2010).

Os animais foram constantemente monitorados para avaliar os sinais clínicos de instalação do quadro séptico e mortalidade. Após 24 horas da cirurgia, foram avaliados os parâmetros cardiovasculares, em seguida o sangue foi coletado, por fim

os animais foram sacrificados e os tecidos coletados para demais análises, como mostrado na Figura 9.

Figura 9 - Representação esquemática do procedimento experimental geral



Fonte: O autor.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como  $\pm$  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 *post-hoc* de Bonferroni. Quando necessário os resultados foram transformados em logaritmos para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância, verificados pelos testes de Shapiro-Wilk e Bartlett respectivamente.

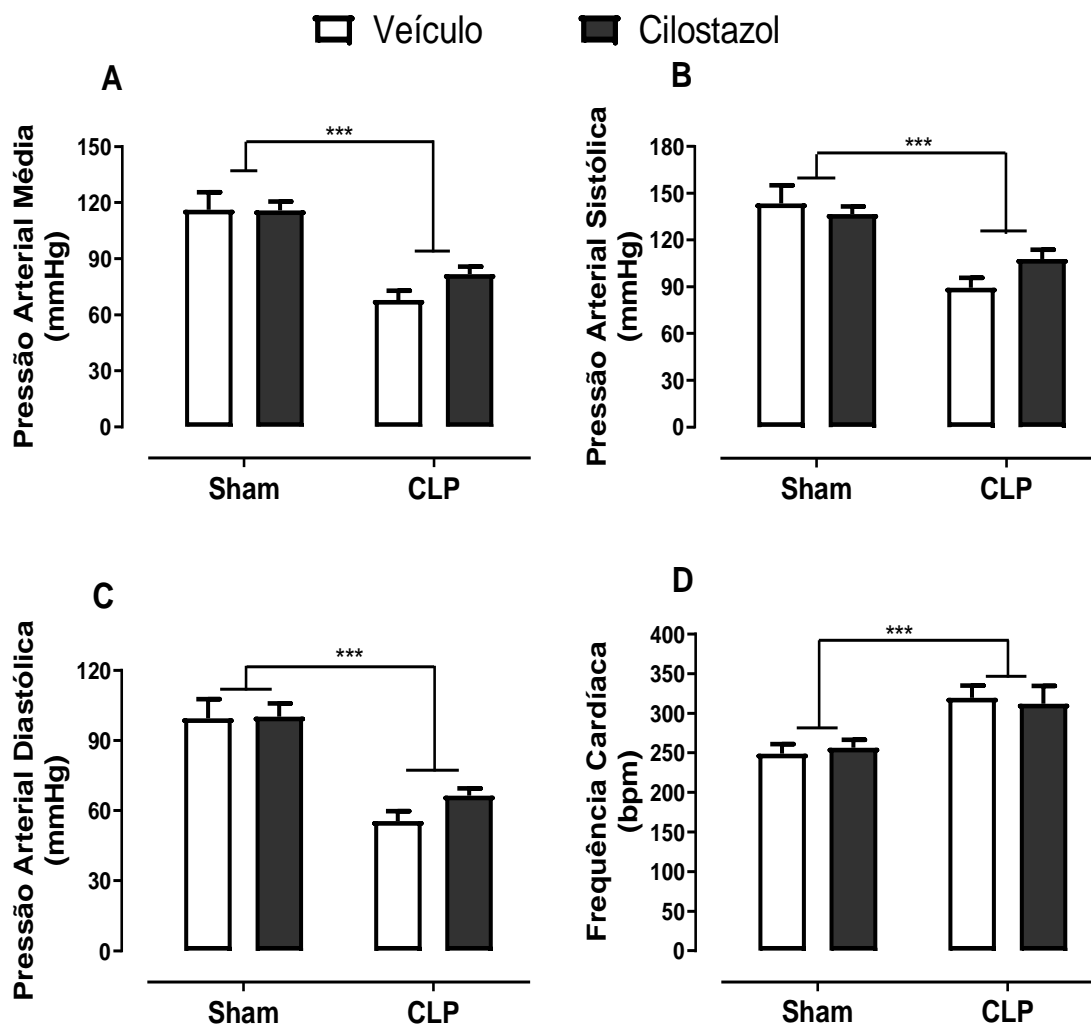
Na análise histológica do pulmão, cada amostra foi representada por um ponto e a linha horizontal representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo *post-hoc* de Dunn. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Todos os testes estatísticos foram realizados com o software estatístico GraphPad Prism (versão 5.01, San Diego, CA, EUA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E REATIVIDADE VASCULAR

Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais dos grupos CLP apresentaram redução nos valores da pressão arterial média (PAM, em mmHg), sistólica (PAS) e diastólica (PAD) quando comparados aos animais dos grupos Sham como mostrado na Figura 10 (painéis A-C). Por outro lado, houve aumento na frequência cardíaca (FC, em bpm) nos animais dos grupos CLP quando comparado aos animais dos grupos Sham (painel D). O tratamento com cilostazol não preveniu a redução na PAM, PAS, PAD e o aumento na FC nos animais dos grupos CLP (painéis A-D).

Figura 10 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em parâmetros cardiovasculares



Realizou-se o procedimento CLP (do inglês, *Cecal ligation and puncture*) para indução de sepse nos animais dos grupos CLP e a falsa-cirurgia nos animais dos grupos Sham. Após 6 horas da cirurgia os animais receberam veículo (óleo de amendoim, 1 mL/Kg) ou cilostazol (15 mg/Kg) por gavagem. Vinte quatro horas após o procedimento, os animais foram preparados para o registro da pressão arterial e do fluxo sanguíneo renal. Após um período de estabilização de 30 minutos foram avaliados pressão arterial média (painel A), pressão arterial sistólica (painel B), pressão arterial diastólica (painel C) e frequência cardíaca (painel D). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. \*\*\*p < 0,001 (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).



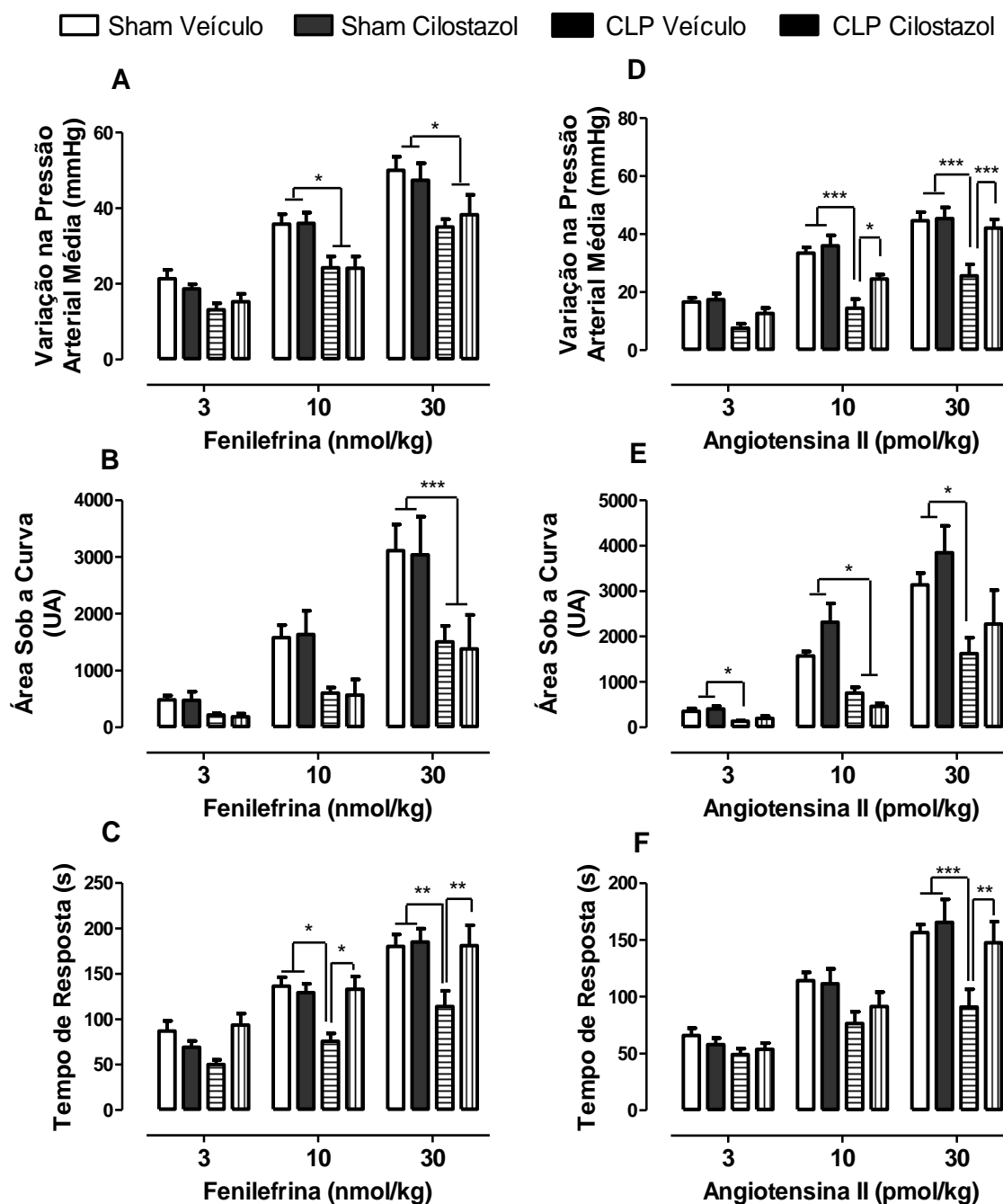
A resposta pressórica induzida por diferentes agentes vasoativos foi avaliada através da variação na pressão arterial média (PAM, em mmHg), tempo de resposta (em segundos) e área sob a curva (ASC, em UA).

Observamos na Figura 11, que os animais dos grupos CLP apresentaram um comprometimento na resposta vasoconstritora promovida por fenilefrina e angiotensina II. Ocorreu uma diminuição significativa na variação, área sob a curva e tempo de resposta na PAM nos animais dos grupos CLP quando comparados aos animais dos grupos Sham (painéis A-F). O tratamento com cilostazol promoveu um aumento significativo na variação da PAM em resposta à angiotensina II (painel D) e no tempo de vasoconstrição para fenilefrina e angiotensina II nos animais dos grupos CLP (painéis C e F).

Na Figura 12, observamos que os animais dos grupos CLP apresentaram um comprometimento nas respostas vasodilatadoras promovidas por acetilcolina, nitroprussiato de sódio e isoprenalina. Os animais dos grupos CLP apresentaram uma redução significativa na variação e área sob a curva da resposta na PAM quando comparados aos animais dos grupos Sham (painéis A, B, D, E, G e H). Os animais do grupo CLP veículo apresentaram uma redução significativa no tempo de resposta promovido por acetilcolina na maior dose quando comparados aos animais do grupo Sham veículo (painel C).

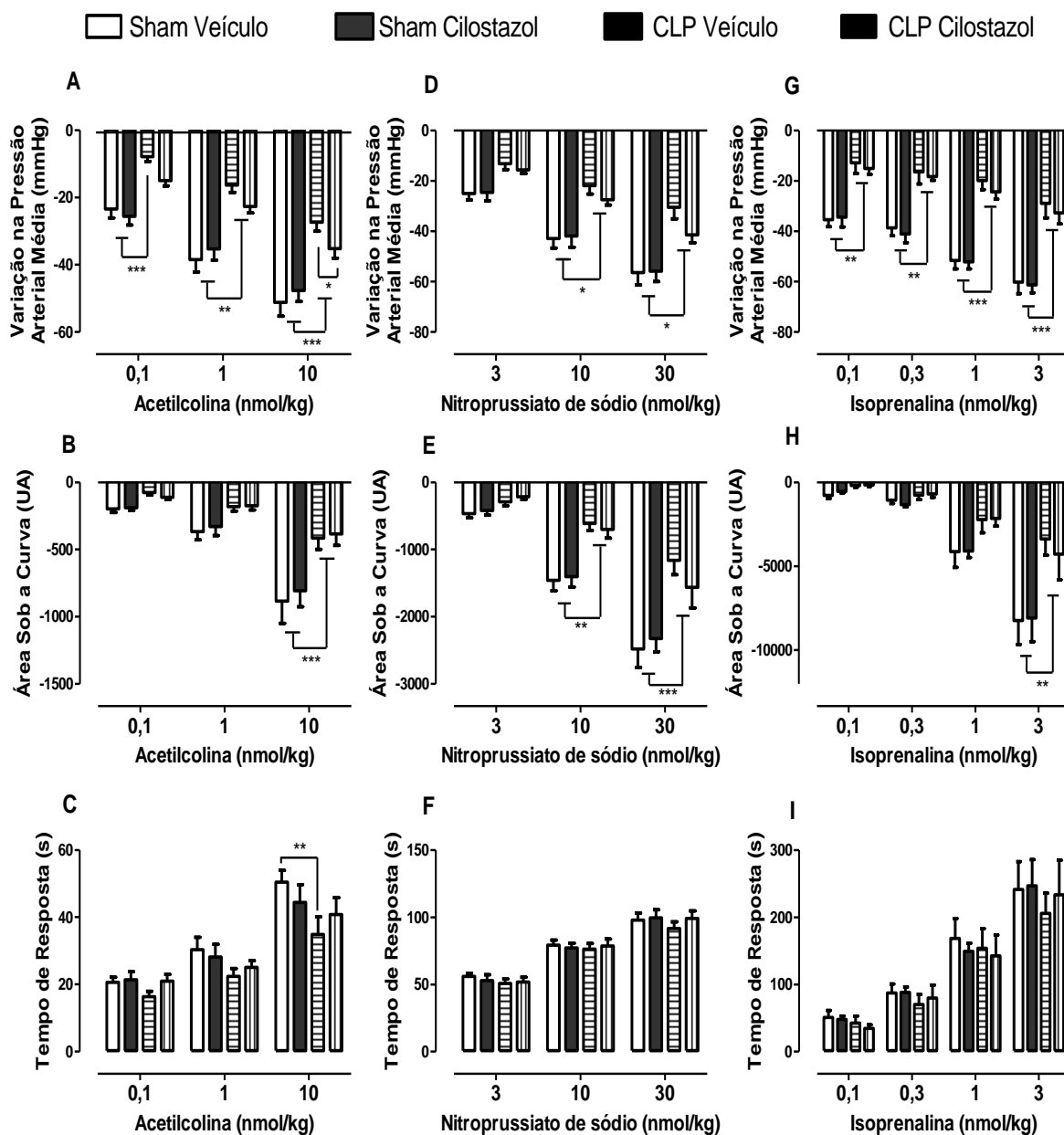
A Figura 13 demonstra a variação da resposta obtida na FC frente aos vasoconstritores e vasodilatadores (painéis A-E). Podemos observar uma baixa variação promovida por fenilefrina, angiotensina II, acetilcolina e nitroprussiato de sódio; e uma alta variação em resposta à isoprenalina (painéis A-E). Ao analisarmos a resposta da acetilcolina, os animais do grupo CLP veículo apresentaram uma redução significativa na variação da FC quando comparados aos animais dos grupos Sham (painel C) e o tratamento com cilostazol não alterou o resultado nos diferentes grupos. Na resposta promovida pela isoprenalina, os animais dos grupos CLP veículo apresentaram nas maiores doses uma redução significativa na variação da FC quando comparados aos animais dos grupos Sham, e o tratamento com cilostazol aumentou de forma significativa a variação na FC nesses animais (painel E).

Figura 11 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação da pressão arterial média, área sob a curva e tempo de resposta após administração de vasoconstritores



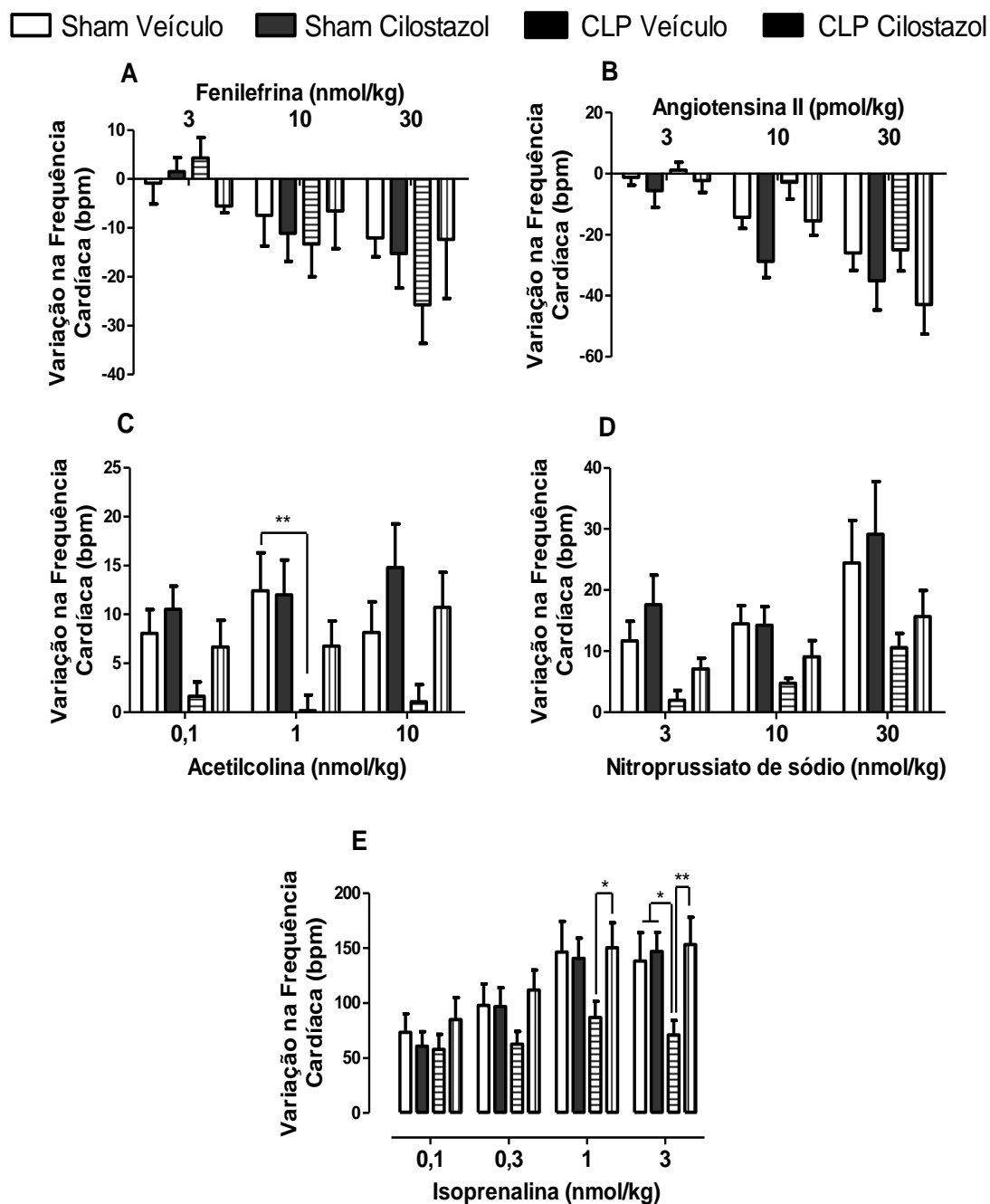
A reatividade vascular para vasoconstritores foi realizada 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, através da variação na pressão arterial média (painéis A e D), área sob a curva da resposta (painéis B e E) e tempo de vasoconstrição (painéis C e F). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

Figura 12 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação da pressão arterial média, área sob a curva e tempo de resposta após administração de vasodilatadores



A reatividade vascular para vasodilatadores foi realizada 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, através da variação na pressão arterial média (painéis A, D e G), área sob a curva da resposta (painéis B, E e H) e tempo de vasodilatação (painéis C, F e I). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

Figura 13 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação da frequência cardíaca e área sob a curva após administração de vasoconstritores e vasodilatadores



A variação na frequência cardíaca foi realizada 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, avaliando-se fenilefrina (painel A), angiotensina II (painel B), acetilcolina (painel C), nitroprussiato de sódio (painel D) e isoprenalina (painel E) a fim de obter a variação na frequência cardíaca. As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

## 5.2 FLUXO SANGUÍNEO RENAL

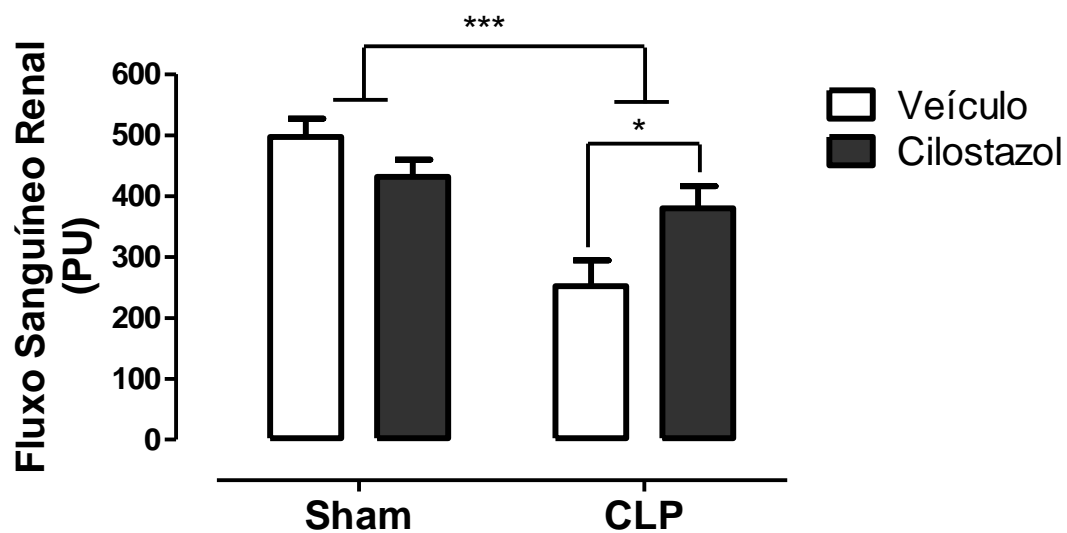
O choque séptico se caracteriza por um quadro de hipotensão não responsiva ao aporte volêmico ou à administração de vasopressores, gerando hipoperfusão tecidual e consequente lesão múltipla orgânica.

Diante da importância de se avaliar a perfusão sanguínea na sepse, a Figura 14 apresenta o fluxo sanguíneo renal (FSR, em unidades de perfusão - PU, do inglês, *Perfusion units*) nos animais. Observamos que os animais dos grupos CLP apresentaram redução no FSR basal quando comparados aos animais dos grupos Sham e o tratamento com cilostazol promoveu aumento no FSR nos animais dos grupos CLP.

A Figura 15 apresenta a variação, área sob a curva e tempo de resposta no fluxo sanguíneo renal (FSR) aos vasoconstritores sistêmicos fenilefrina e angiotensina II (painéis A-F). Podemos observar que os animais dos grupos CLP apresentaram uma redução significativa na variação e área sob a curva da resposta no FSR quando comparados aos animais dos grupos Sham (painéis A, B, D e E). O tempo de resposta não mostrou alteração pelo procedimento cirúrgico (painéis C e F). O tratamento com cilostazol não alterou os resultados nos diferentes grupos.

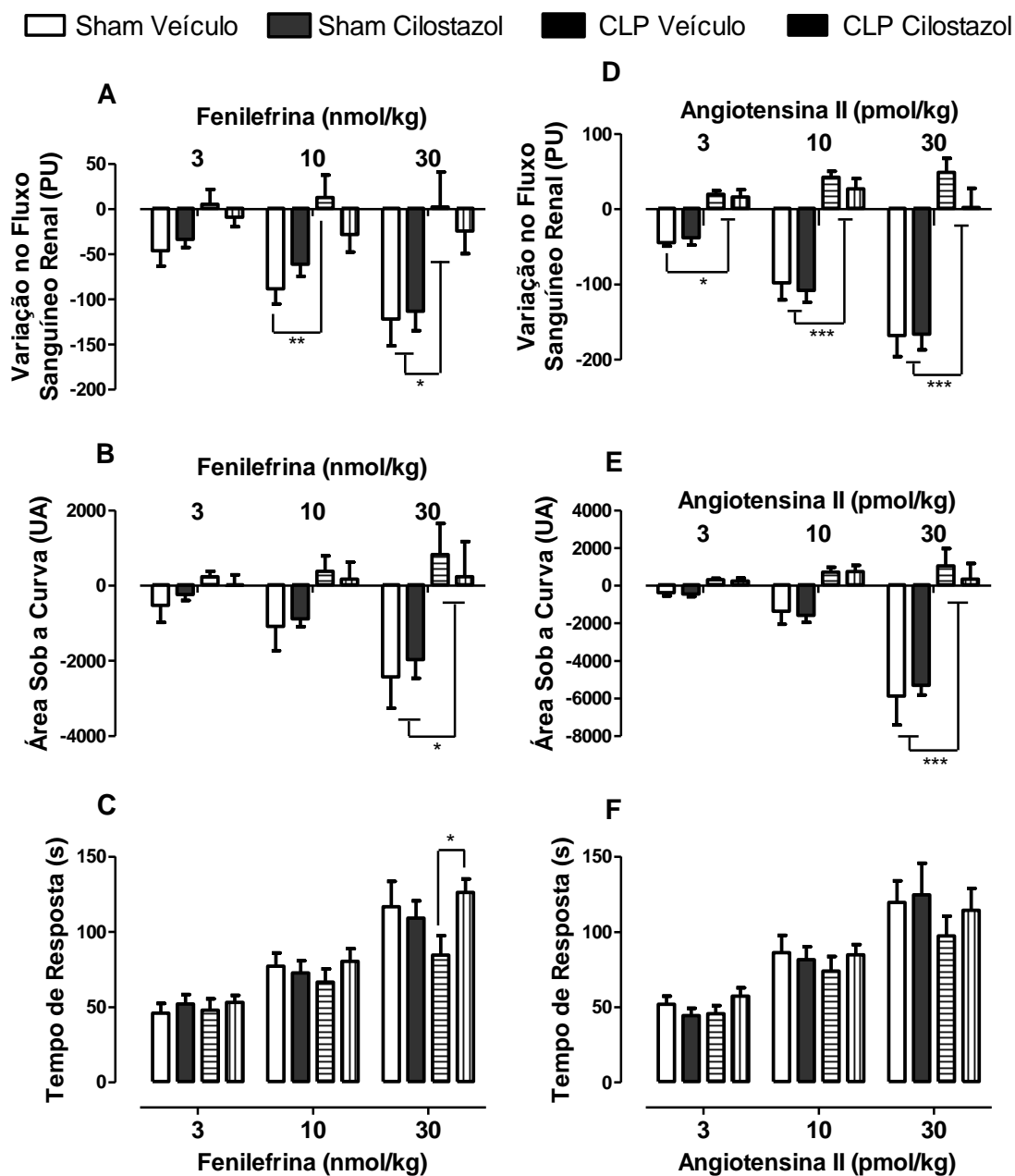
A Figura 16 apresenta a variação, área sob a curva e tempo de resposta no FSR aos vasodilatadores sistêmicos acetilcolina, nitroprussiato de sódio e isoprenalina (painéis A-I). Os animais dos grupos CLP apresentaram uma diminuição significativa na variação e área sob a curva da resposta no FSR quando comparados aos animais dos grupos Sham. A área sob a curva da resposta no FSR para isoprenalina não apresentou diferenças entre os diferentes grupos (painel H). O tempo de resposta não mostrou muita diferença em função do procedimento, porém o tratamento com cilostazol aumentou o tempo de resposta obtida para acetilcolina (painel C). O tratamento com cilostazol não alterou os demais resultados nos diferentes grupos.

Figura 14 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol no fluxo sanguíneo renal



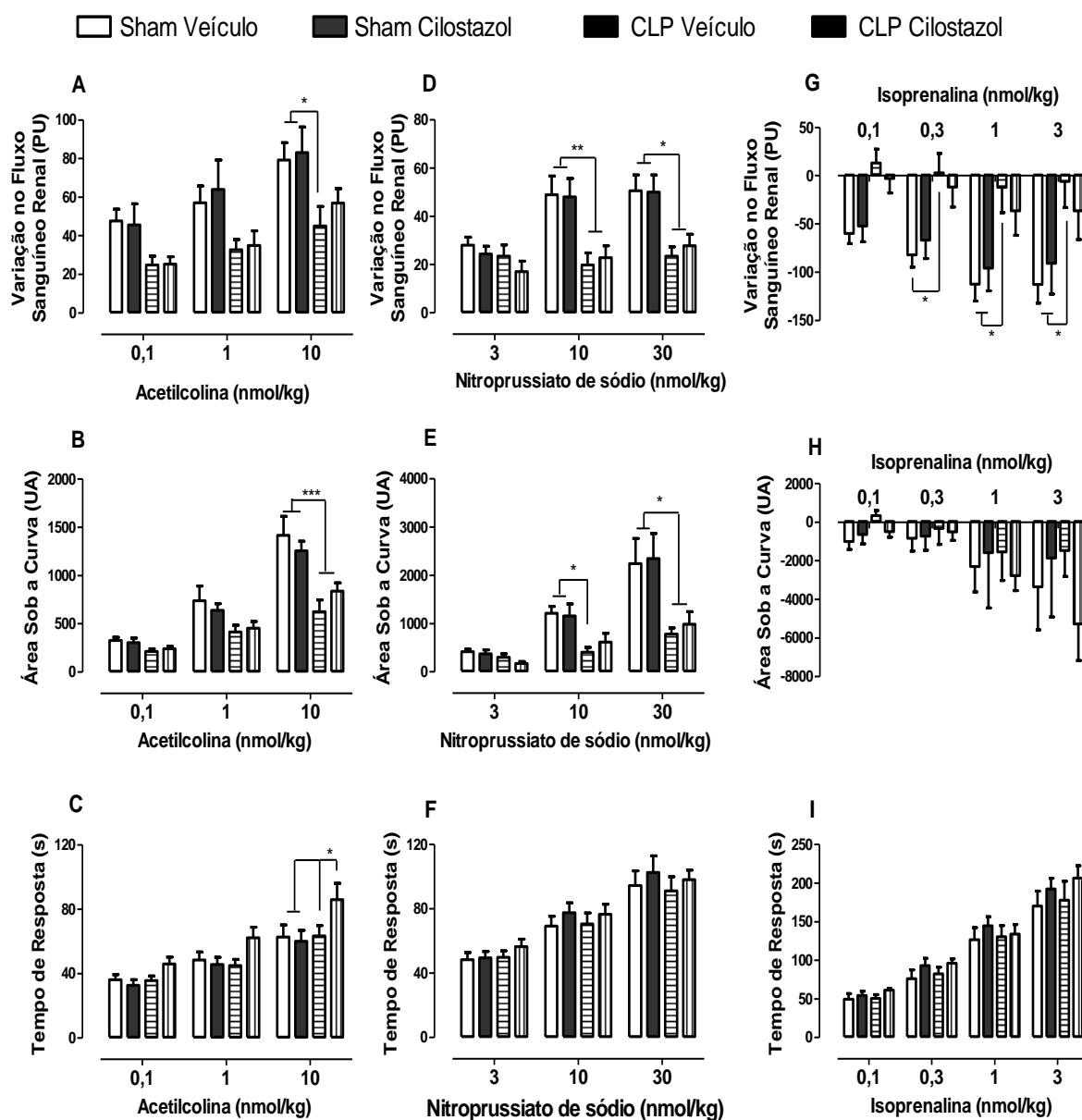
O fluxo sanguíneo renal basal foi analisado 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham. As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

Figura 15 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação do fluxo sanguíneo renal, área sob a curva e tempo de resposta após administração de vasoconstritores sistêmicos



O fluxo sanguíneo renal foi analisado 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, após administração de vasoconstritores, através da variação do fluxo sanguíneo renal (painéis A e D), área sob a curva da resposta (painéis B e E) e tempo de resposta (painéis C e F). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

Figura 16 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na variação do fluxo sanguíneo renal, área sob a curva e tempo de resposta após administração de vasodilatadores sistêmicos



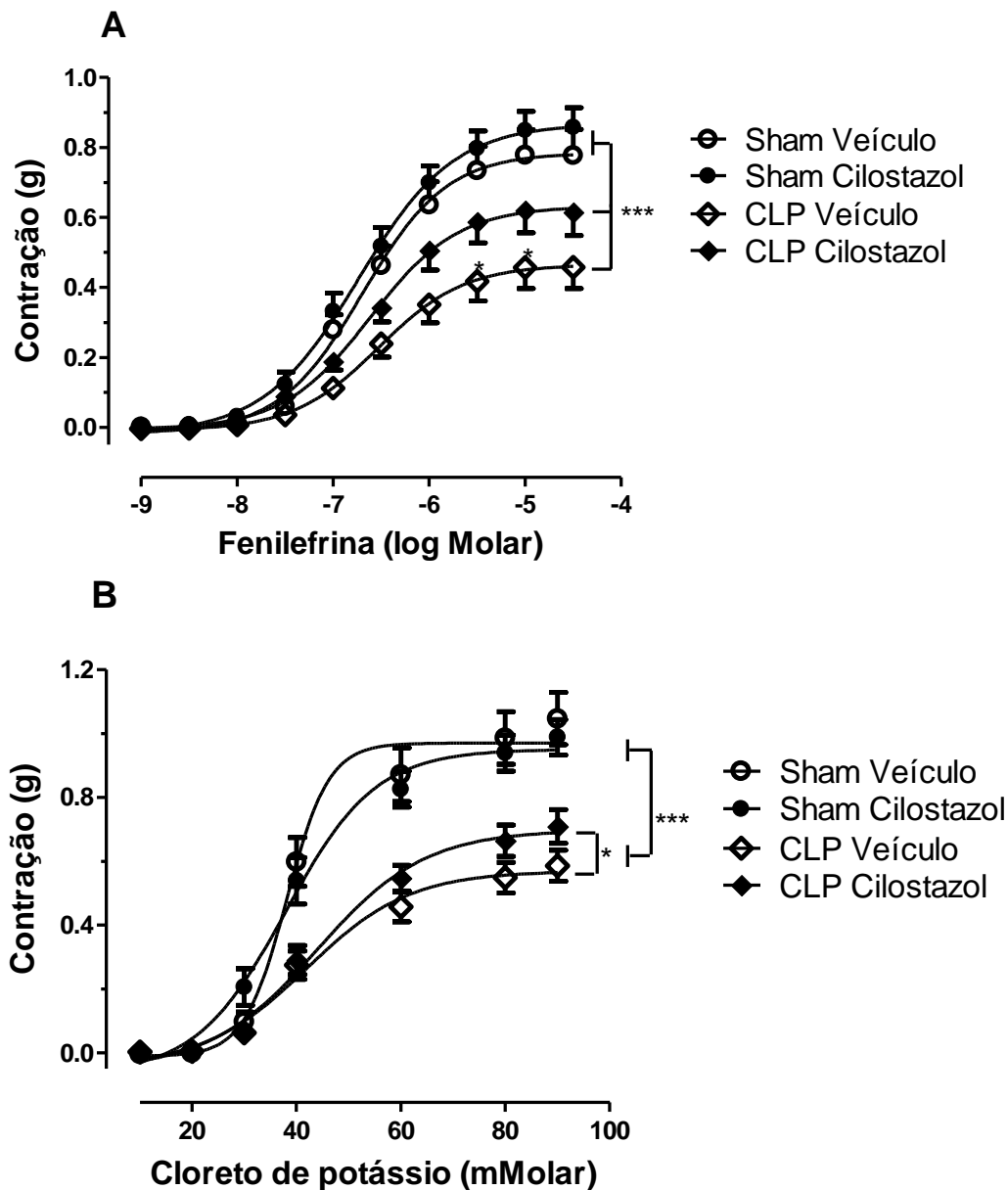
O fluxo sanguíneo renal foi analisado 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, após administração de vasodilatadores, através da variação no fluxo sanguíneo renal (painéis A, D e G), área sob a curva (painéis B, E e H) e tempo de resposta (painéis C, F e I). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).



### 5.3 REATIVIDADE VASCULAR DE AORTA EM SISTEMA DE ÓRGÃO ISOLADO

A reatividade vascular foi testada *in vivo* avaliando-se a PAM e o FSR. Além disso, analisou-se a reatividade vascular para fenilefrina e cloreto de potássio (KCl) em vaso isolado em anel de aorta torácica. Observa-se na Figura 17 (painel A), que os animais dos grupos CLP apresentaram uma diminuição significativa na resposta vasoconstritora na curva concentração resposta para fenilefrina quando comparados aos animais dos grupos Sham. O tratamento com cilostazol aumentou significativamente a resposta nos animais dos grupos CLP. No painel B, observou-se um resultado semelhante, em que ocorreu uma diminuição significativa na curva concentração resposta para KCl nos animais dos grupos CLP quando comparados aos animais dos grupos Sham e o tratamento com cilostazol aumentou significativamente a resposta nos animais dos grupos CLP.

Figura 17 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na resposta contrátil para fenilefrina e cloreto de potássio (KCl) em anel de aorta torácica



Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP e Sham, a aorta foi coletada para análise da resposta contrátil e após 60 minutos de estabilização, a resposta contrátil para fenilefrina (Painel A) e cloreto de potássio (KCl) (Painel B) foi analisada. Os pontos representam a média e as linhas acima ou abaixo o erro padrão da média de 10 animais. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

Como mostrado na tabela 5, os animais dos grupos CLP apresentaram um quadro de hiporreatividade à fenilefrina e KCl quando comparados aos animais dos

grupos Sham. A hiporreatividade é comprovada pela diminuição dos valores do logaritmo negativo da concentração efetiva 50% (log CE<sub>50</sub>) do efeito máximo produzido, área sob a curva (ASC) e efeito máximo (EMax) da resposta contrátil. O tratamento com cilostazol aumentou significativamente os valores de Log CE<sub>50</sub> e a ASC nos animais do grupo CLP.

Tabela 5 – Efeito do procedimento cirúrgico CLP e do tratamento com cilostazol na reatividade vascular para fenilefrina e cloreto de potássio (KCl) em anel de aorta torácica

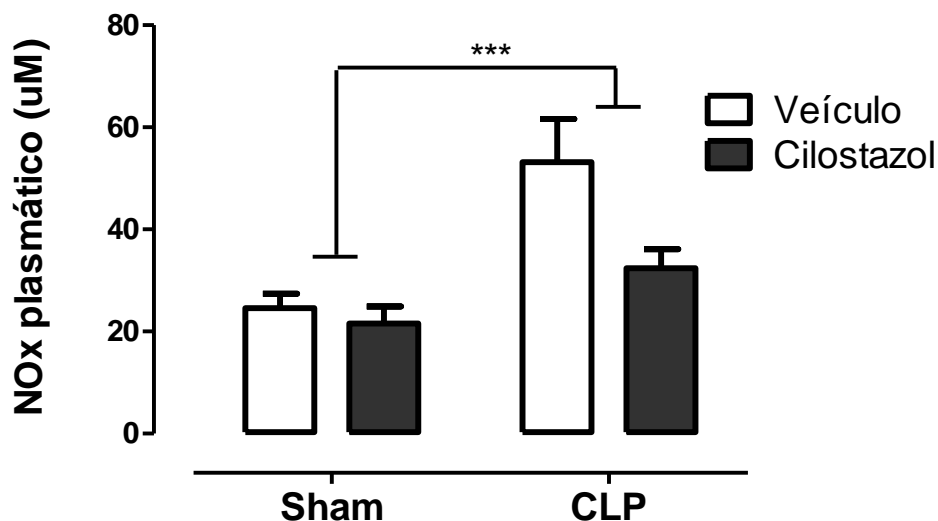
		Veículo		Cilostazol	
		Sham	CLP	Sham	CLP
Fenilefrina	log CE <sub>50</sub>	-6.686±0.057	-6.468±0.062*	-6.726±0.073	-6.658±0.064 <sup>#</sup>
	ASC	1.68±0.172	0.927±0.126**	1.895±0.155	1.429±0.138 <sup>#</sup>
	EMax (g)	0.786±0.073	0.468±0.061**	0.857±0.051	0.664±0.058
KCL	log CE <sub>50</sub>	-1.391±0.012	-1.363±0.02	-1.409±0.023	-1.354±0.02
	ASC	0.392±0.038	0.218±0.026***	0.393±0.034	0.254±0.022 <sup>&amp;&amp;</sup>
	EMax (g)	1.05±0.081	0.585±0.047***	0.981±0.055	0.714±0.069 <sup>&amp;</sup>

Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP e Sham avaliou-se a resposta contrátil para fenilefrina e cloreto de potássio (KCl). Os resultados representam a média ± erro padrão da média de 8 animais. \*p< 0,05 comparado com Sham veículo, \*\*p< 0,01 comparado com Sham veículo, \*\*\*p< 0,001 comparado com Sham veículo, <sup>#</sup>p< 0,05 comparado com CLP veículo, <sup>&</sup>p< 0,05 comparado com Sham cilostazol, <sup>&&</sup>p< 0,01 comparado com Sham cilostazol (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO (NOx) PLASMÁTICO

Os níveis de nitrato e nitrito (NOx) plasmático formam um importante marcador na sepse, pois se correlacionam com a produção de óxido nítrico (NO) pelas diferentes isoformas de óxido nítrico sintase (NOS). A análise de NOx no plasma dos animais foi realizada no tempo de 24 horas. Como observado na Figura 18, os animais dos grupos CLP apresentaram um aumento significativo de NOx plasmático quando comparados aos animais dos grupos Sham. O tratamento com cilostazol não alterou os níveis de NOx plasmático nesses animais.

Figura 18 - Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol nos níveis de nitrato e nitrito (NOx) plasmático



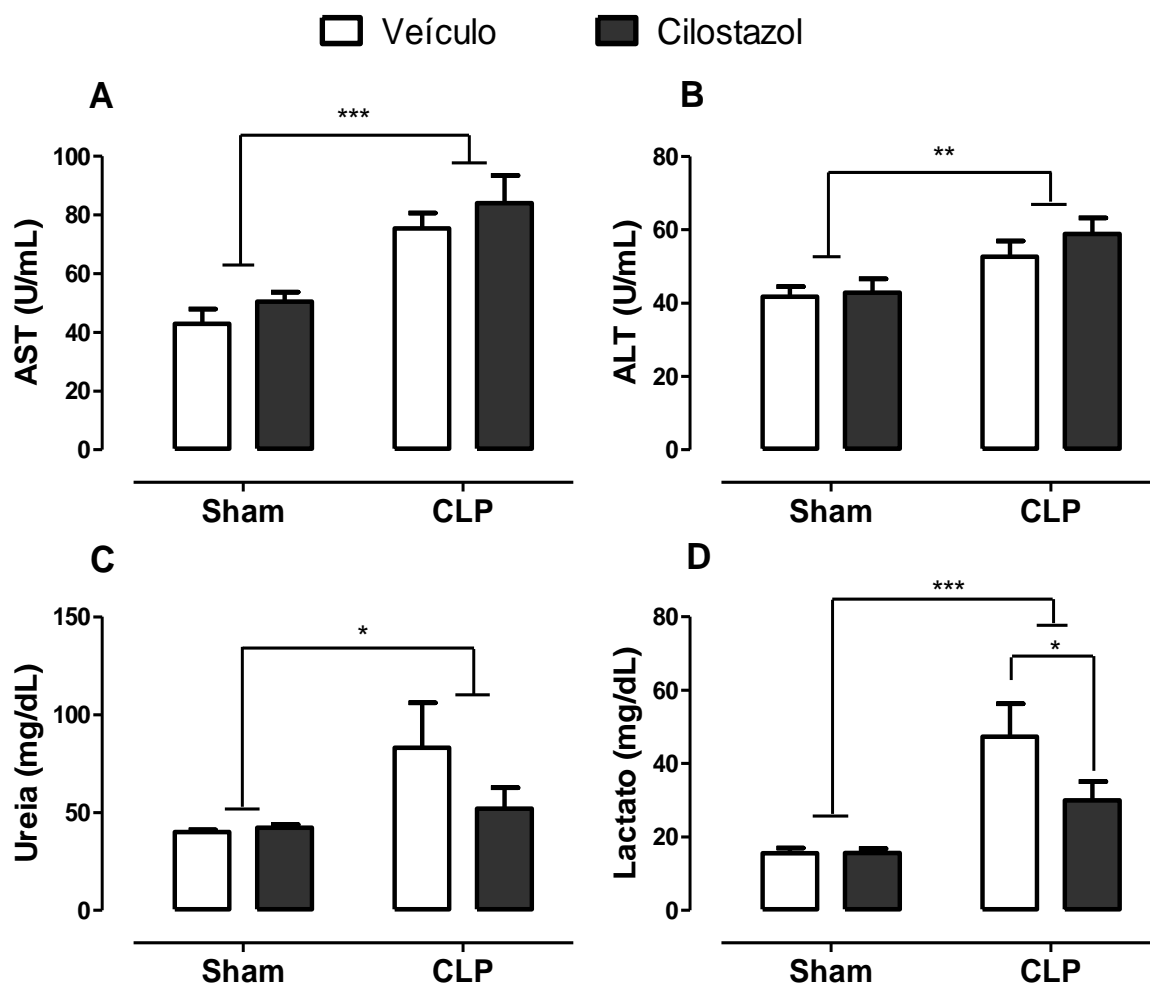
O plasma foi obtido 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, determinando-se os níveis de nitrato e nitrito (NOx). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 10 animais. Para a análise estatística os dados foram transformados como descrito na seção 4.13 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

## 5.5 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

O agravamento do quadro séptico leva a um comprometimento perfusional aos tecidos e ao desenvolvimento de disfunção múltipla orgânica. Portanto, a análise de marcadores de dano tecidual é de grande importância no quadro séptico.

A Figura 19 apresenta diferentes marcadores bioquímicos de lesão tecidual ocasionada pela sepse (painéis A-D). Podemos observar que os animais dos grupos CLP desenvolveram lesão hepática pelo aumento nos níveis de aspartato aminotransferase (ALT, painel A) e alanina aminotransferase (ALT, painel B). Houve ainda comprometimento na função renal comprovado pela elevação na concentração de ureia (painel C). Um dado interessante foi encontrado na determinação do lactato (painel D), um importante marcador de perfusão tecidual. Podemos observar que os animais dos grupos CLP apresentaram prejuízo na perfusão sanguínea constatada pela elevação na concentração de lactato sérico e que o tratamento com cilostazol preveniu a elevação desse marcador nos animais do grupo CLP.

Figura 19 - Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol nos marcadores bioquímicos

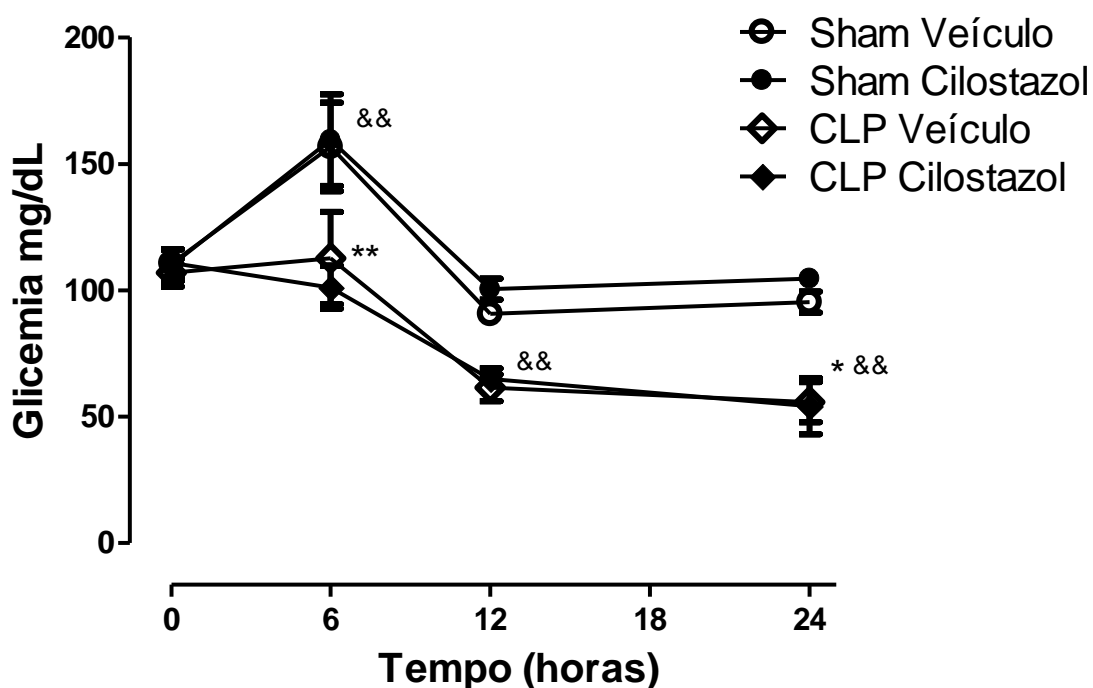


O plasma foi obtido 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, determinando-se os níveis de aspartato aminotransferase (AST) (painel A), alanina aminotransferase (ALT) (painel B), ureia (painel C) e lactato (painel D). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 10 animais. Para a análise estatística os dados foram transformados como descrito na seção 4.13 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

## 5.6 DETERMINAÇÃO DE GLICEMIA

A molécula de cAMP atua na sinalização do metabolismo da glicose, atuando na glicogenólise e inibição da glicogênese, assim investigamos se o tratamento com cilostazol ao inibir PDE3 e possivelmente elevando a concentração de cAMP plasmático poderia alterar a glicemia no quadro séptico. Podemos observar que os animais dos grupos CLP apresentaram um quadro de hipoglicemia a partir de 12 horas que se manteve no tempo de 24 horas. Já os animais dos grupos Sham apresentaram um quadro de hiperglicemia no tempo de 6 horas e normalização glicêmica nos tempos posteriores como mostrado na Figura 20.

Figura 20 - Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na glicemia



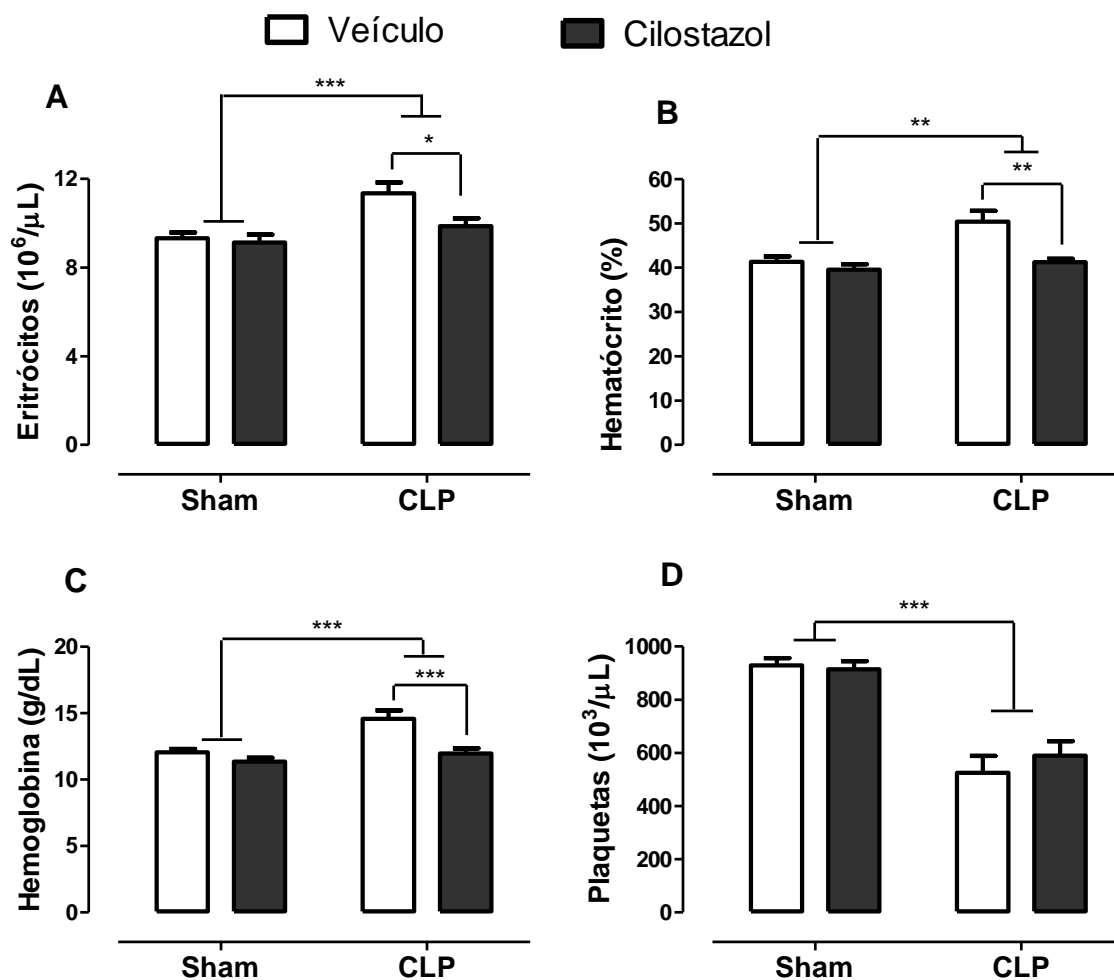
Verificou-se a glicemia basal dos animais momentos antes da administração dos anestésicos, em seguida, realizou-se a cirurgia de CLP e Sham. Seis, 12 e 24 horas após o procedimento cirúrgico a glicemia dos animais foi verificada novamente. Os pontos representam a média e as linhas acima e abaixo o erro padrão da média de 8 animais. \* $p < 0,05$  comparado com Sham veículo e Sham cilostazol; \*\* $p < 0,01$  comparado com Sham veículo e Sham cilostazol; && $p < 0,01$  comparado ao tempo zero (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

## 5.7 CONTAGENS HEMATOLÓGICAS

Como demonstrado na Figura 21, os animais do grupo CLP veículo apresentaram um aumento significativo na contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina e uma diminuição significativa na contagem de plaquetas quando comparados aos animais dos grupos Sham (painéis A-D) no tempo de 24 horas. O tratamento com cilostazol preveniu de forma significativa a elevação na contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina nos animais do grupo CLP (painéis A-C), porém não preveniu a diminuição na contagem de plaquetas nesses animais (painel D).

Avaliou-se também o leucograma desses animais no tempo de 24 horas como demonstrado na Figura 22 (painéis A-G). Ao analisarmos a contagem relativa dos leucócitos, notamos que os animais dos grupos CLP apresentaram uma diminuição significativa na contagem de linfócitos (painel B) e um aumento significativo na contagem de granulócitos (painel D) e de monócitos (F), quando comparados aos animais dos grupos Sham. O tratamento com cilostazol não alterou o resultado dessas análises. Já na contagem absoluta de leucócitos, podemos observar que não houve diferença entre os animais dos grupos CLP e Sham no total de leucócitos (painel A), porém os animais do grupo CLP veículo apresentaram uma diminuição significativa na contagem de linfócitos quando comparado aos animais dos grupos Sham e o tratamento com cilostazol aumentou significativamente a contagem de linfócitos nos animais do grupo CLP (painel C). Os animais dos grupos CLP ainda apresentaram um aumento significativo na contagem total de granulócitos quando comparado aos animais dos grupos Sham (painel E).

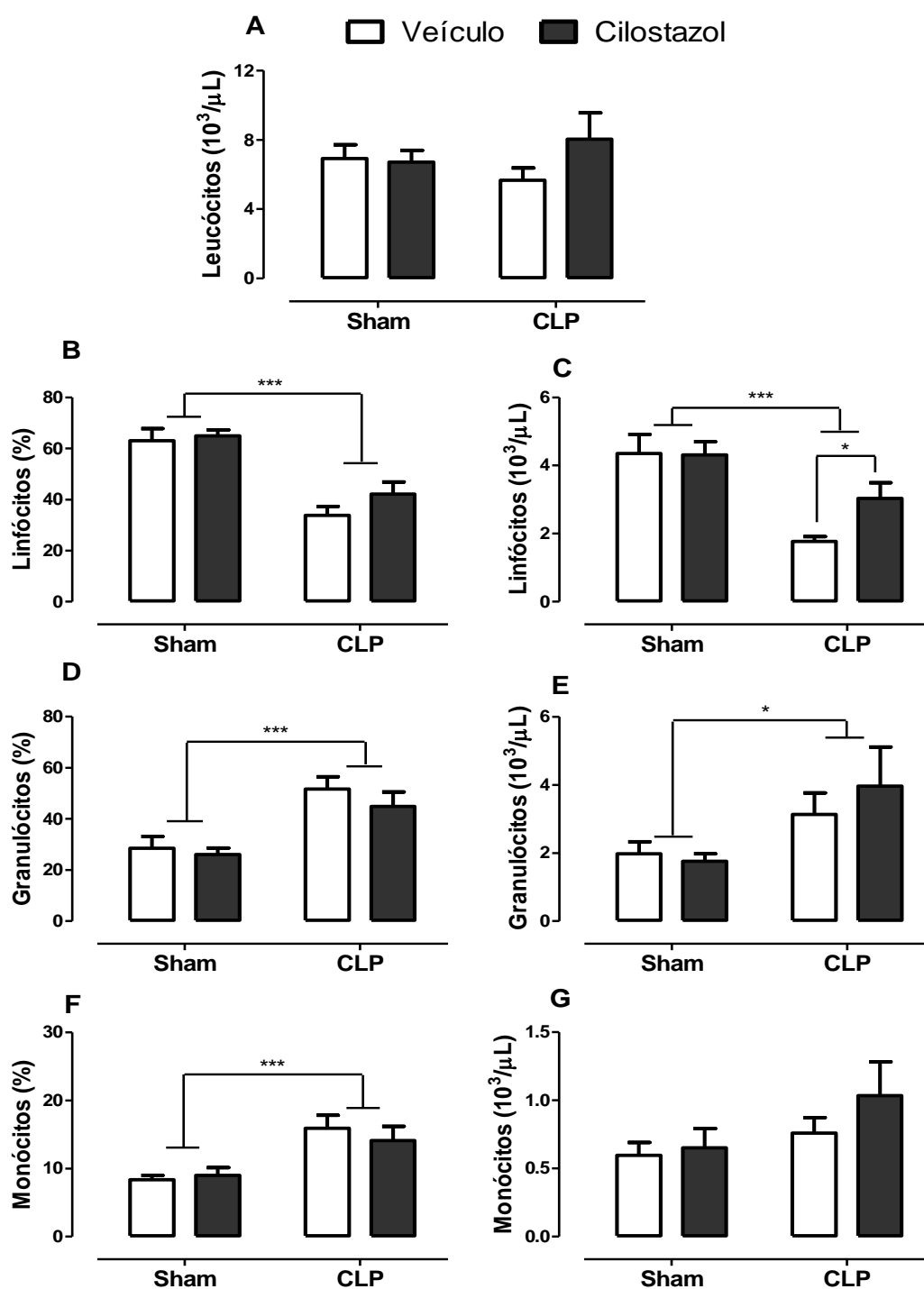
Figura 21 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol no hemograma e contagem de plaquetas



O sangue foi obtido 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, analisando-se os eritrócitos (painel A), hematócrito (painel B), hemoglobina (painel C) e plaquetas (painel D). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).



Figura 22 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol no leucograma

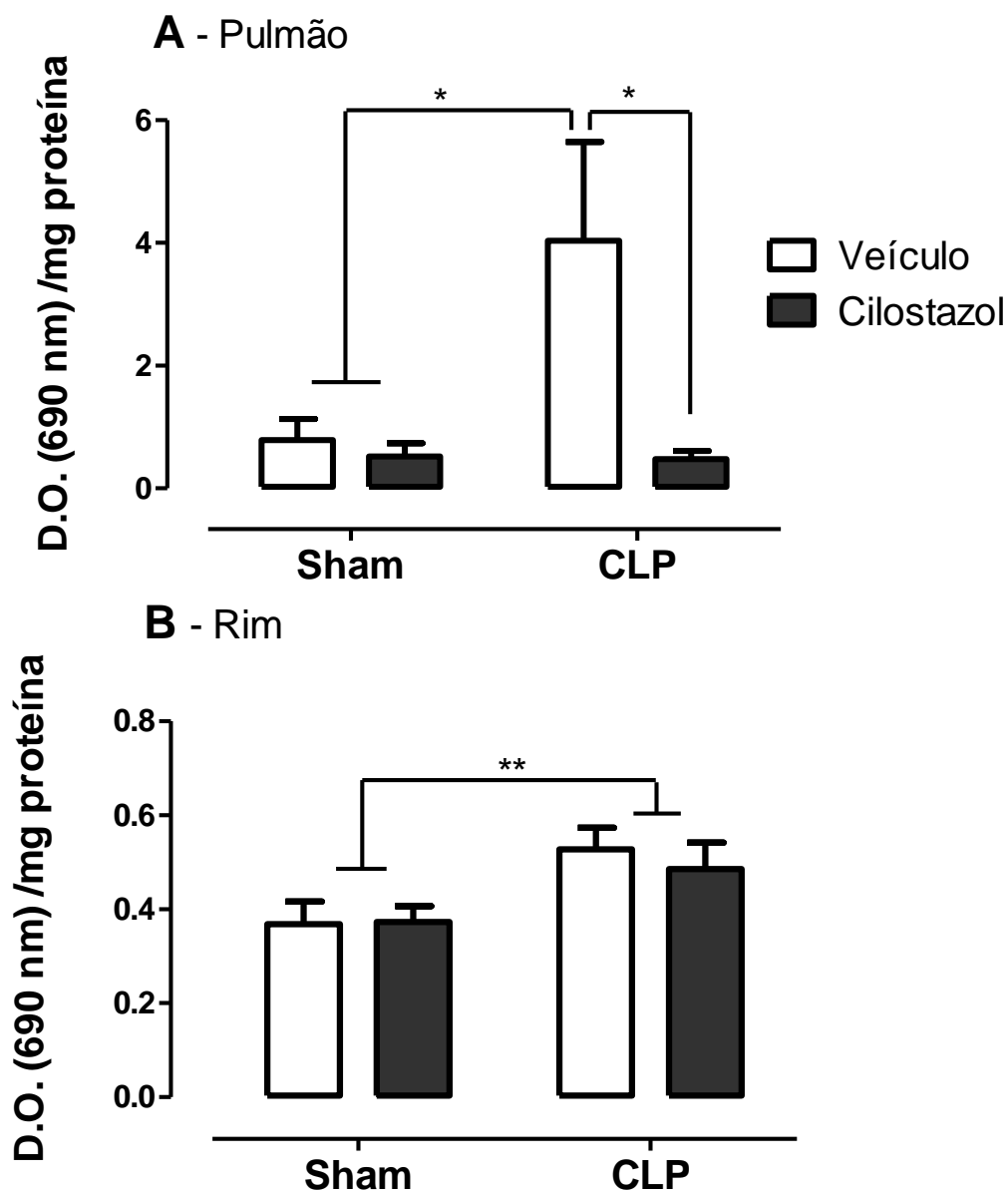


O sangue foi obtido 24 horas após a cirurgia de CLP e Sham, analisando-se a contagem absoluta de leucócitos (painel A), contagem diferencial de linfócitos (painel B), granulócitos (painel C), monócitos (painel D) e contagem absoluta de linfócitos (painel E), granulócitos (painel F) e monócitos (painel G). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 8 animais. Para a análise estatística os dados foram transformados como descrito na seção 4.13 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância \* $p < 0,05$  e \*\*\* $p < 0,001$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

## **5.8 DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO)**

O recrutamento de granulócitos para o pulmão e rim foi avaliado de forma indireta através do ensaio de quantificação da atividade enzimática de mieloperoxidase (MPO) nesses tecidos. Pode-se observar na Figura 23 (painel A) que os animais do grupo CLP veículo apresentaram um aumento significativo na atividade de MPO no pulmão no tempo de 24 horas. O tratamento com cilostazol reduziu de forma significativa a atividade de MPO no pulmão em animais do grupo CLP. Já no rim, ocorreu um aumento de atividade de MPO nos animais dos grupos CLP quando comparados aos animais dos grupos Sham e o tratamento com cilostazol não alterou o resultado nos animais dos diferentes grupos (painel B).

Figura 23 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão e rim



Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP e Sham, os animais foram mortos e os tecidos coletados para avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no pulmão (painel A) e rim (painel B). As barras representam a média e as linhas acima o erro padrão da média de 10 animais. Para a análise estatística os dados foram transformados como descrito na seção 4.13 para alcançarem normalidade e homogeneidade de variância. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  (ANOVA de duas vias seguida pelo *post hoc* de Bonferroni).

## 5.9 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE TECIDOS

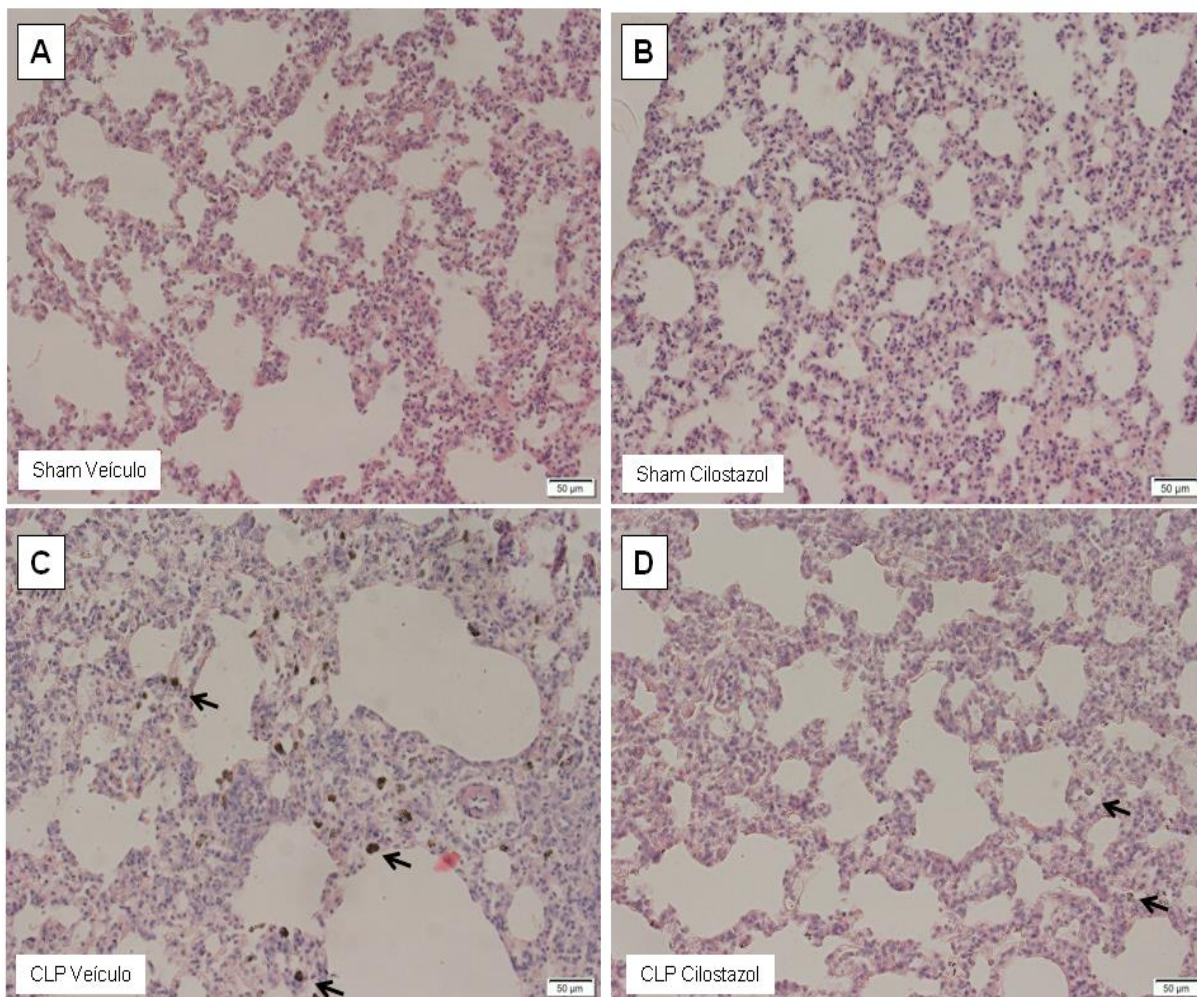
Para avaliar a infiltração de leucócitos e danos teciduais induzidos pela sepse em tecidos, foi realizada análise histopatológica de pulmão, coração e rim nos animais dos diferentes grupos no tempo de 24 horas.

Como evidenciado na Figura 24, os animais dos grupos CLP apresentaram um aumento na espessura de septos alveolares e presença de infiltrado de leucócitos no tecido pulmonar, enquanto os animais dos grupos Sham apresentaram uma preservada morfologia de septos e ausência de infiltrado (painéis A-D). Já na análise através de escore de lesão, os animais dos grupos CLP apresentaram aumento significativo na pontuação do escore quando comparados aos animais dos grupos Sham. O tratamento com cilostazol diminuiu de forma significativa a pontuação do grupo CLP, prevenindo infiltração leucocitária no tecido (Figura 25).

Na Figura 26 (painéis A-D), observamos o tecido cardíaco, nele os animais dos grupos CLP não apresentaram alterações estruturais evidentes no tecido cardíaco quando comparados aos animais dos grupos Sham. Entretanto houve infiltração de leucócitos no tecido cardíaco dos animais sépticos, porém em pontos isolados e em baixo número, o que histologicamente não evidencia diferenças entre os grupos em função do procedimento cirúrgico.

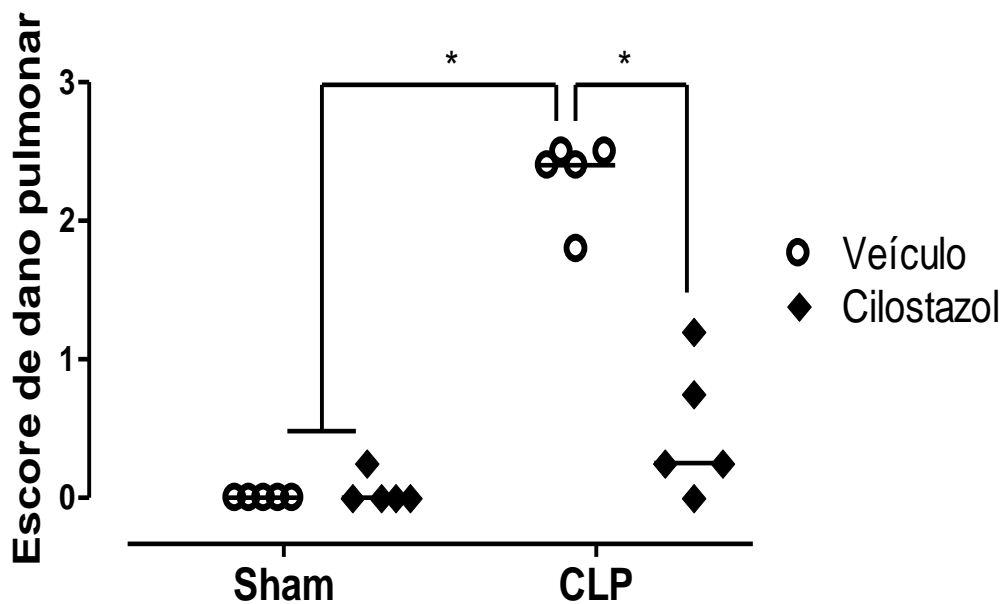
Já na Figura 27 (painéis A-D), podemos observar que os animais dos grupos CLP também não apresentaram alterações histológicas evidentes no tecido renal quando comparados aos animais dos grupos Sham. Os animais sépticos apresentam aumento no número de hemácias em capilares glomerulares e peritubulares, porém também de forma sutil não apontando alterações entre os diferentes grupos em função do procedimento.

Figura 24 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em análise histopatológica de pulmão



Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP e Sham, os animais foram mortos e o pulmão coletado. O tecido foi processado pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) e as fotomicrografias realizadas em ampliação de 200x. Os animais Sham (painéis A e B) apresentaram aspecto normal na morfologia de septos alveolares e ausência de infiltrado leucocitário. Os animais sépticos (painel C) apresentaram alterações de aumento na espessura de septo e intenso infiltrado leucocitário apontado pelas setas. O tratamento com cilostazol diminuiu a intensidade do infiltrado leucocitário nos animais sépticos (painel D), como apontado pelas setas.

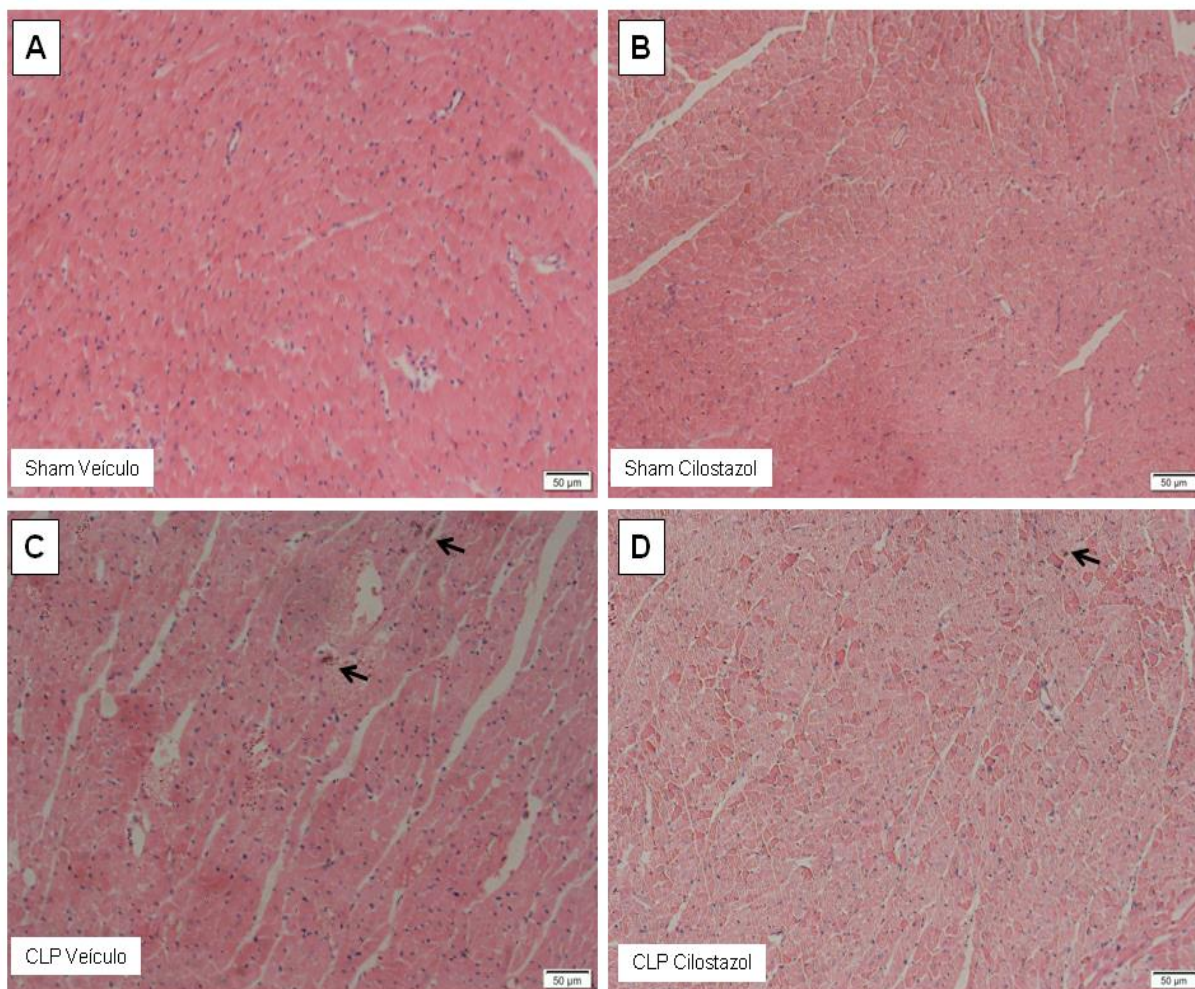
Figura 25 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em análise histopatológica de pulmão através de escore



Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP e Sham, os animais foram mortos e o pulmão coletado. O tecido foi processado pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) e as fotomicrografias realizadas em ampliação de 200x. Os símbolos representam 5 diferentes animais de cada grupo experimental e a linha horizontal representa a mediana. \* $p < 0,05$  (teste de Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* de Dunn).

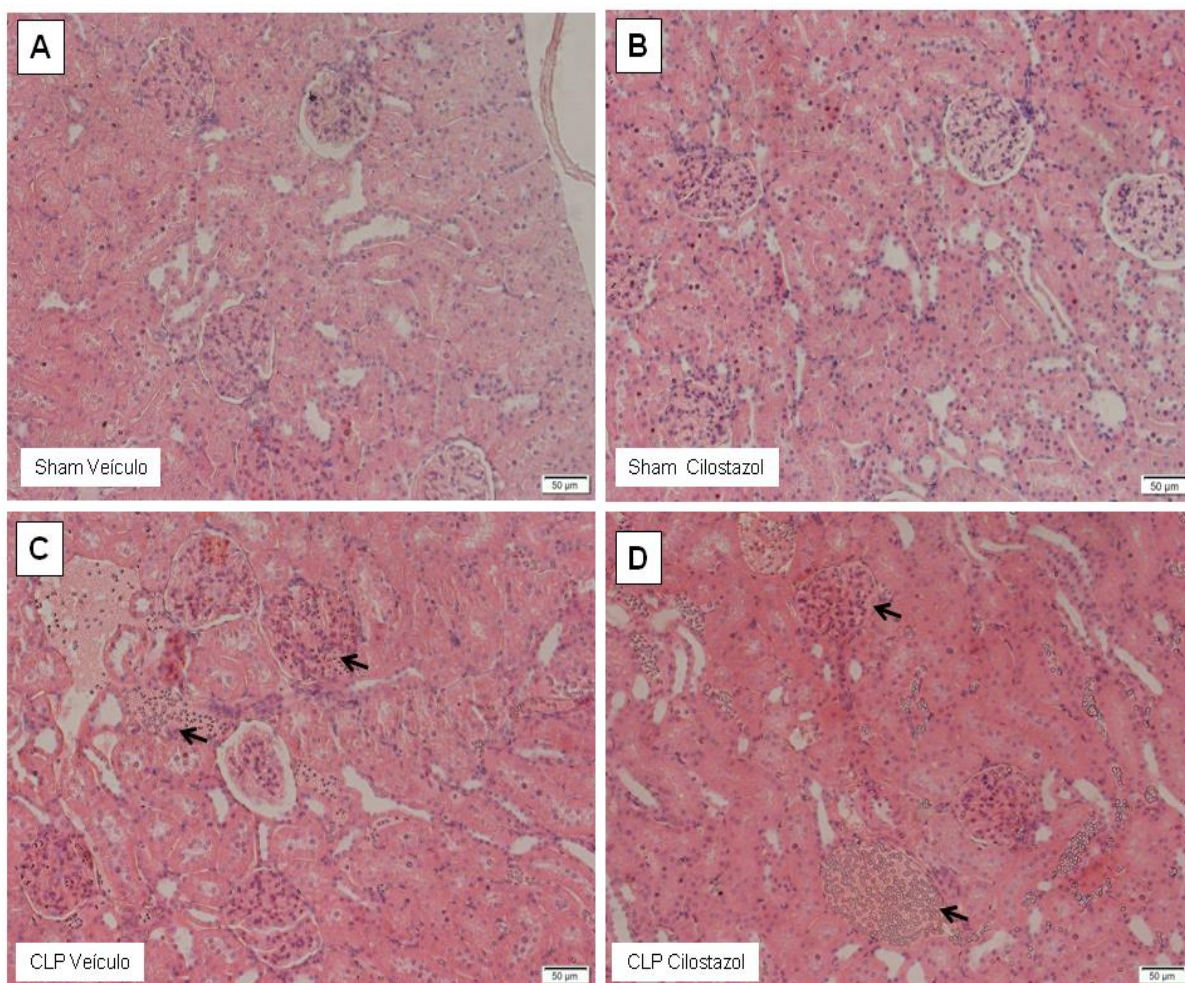


Figura 26 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em análise histopatológica de coração



Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP e Sham, os animais foram mortos e o coração coletado. O tecido foi processado pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) e as fotomicrografias realizadas em ampliação de 200x. Os animais Sham apresentaram aspecto normal na morfologia de cardiomiócitos (painéis A e B). Os animais sépticos apresentaram infiltrados de leucócitos no tecido (painéis C e D), como apontado pelas setas, porém em pontos isolados não se diferenciando histologicamente dos animais dos grupos Sham.

Figura 27 – Efeito do procedimento cirúrgico (CLP) e do tratamento com cilostazol em análise histopatológica de rim



Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP e Sham, os animais foram mortos e o rim coletado. O tecido foi processado pela técnica de coloração de hematoxilina-eosina (HE) e as fotomicrografias realizadas em ampliação de 200x. Os animais Sham apresentaram aspecto normal na morfologia de túbulos e corpúsculo renal na região cortical (painéis A e B). Os animais sépticos apresentaram aumento do número de hemácias em capilares glomerulares e peritubulares (painéis C e D), como apontado pelas setas, porém em áreas limitadas, não se diferenciando histologicamente dos animais dos grupos Sham.



## 6 DISCUSSÃO

A sepse é uma das mais antigas e complicadas síndromes na medicina. Desde suas primeiras citações feitas por Hipócrates, passando pela descoberta e evolução da antibioticoterapia, ainda representa um grande problema de saúde pública ocasionando a morte de muitos pacientes. Com a chegada dos antibióticos ficou claro que somente a ação microbiana não era capaz de induzir tamanho dano observado na síndrome, surgindo os primeiros indícios de que a resposta imunológica do hospedeiro também contribui nas diversas manifestações da sepse (CERRA, 1985; FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009).

Os avanços no tratamento para sepse esbarram na grande complexidade dessa síndrome, justificando a pouca mudança na abordagem terapêutica ao paciente ao longo dos anos. Em geral, o tratamento consiste na administração de antibióticos de amplo espectro de ação, reposição volêmica adequada em casos de hipotensão ou elevação dos níveis de lactato, utilização de vasopressores para manutenção da pressão arterial média acima de 65 mmHg e remoção do foco infeccioso.

Buscando-se avanços na terapêutica, muitos estudos experimentais são realizados e representam uma importante ferramenta para investigação e entendimento da síndrome. Segundo descrito por Doi et al. (2009), os principais modelos animais para o estudo da sepse podem ser divididos em três categorias: (1) administração de endotoxina, como LPS ou zimosan (endotoxemia); (2) administração exógena de bactérias viáveis; e (3) rompimento da barreira de proteção interna dos animais, por exemplo, os modelos de CLP e perfuração do colo ascendente por *stent* (CASP, do inglês, *Colon Ascendens Stent Peritonitis*).

O modelo de indução de sepse por CLP adotado no presente estudo é um dos modelos mais comumente utilizados, sendo considerado um “padrão ouro” na sepse experimental (RITTIRSCH et al., 2009). Caracteriza-se pela gênese do quadro séptico a partir de um foco infeccioso polimicrobiano com translocação das bactérias para o compartimento sanguíneo, configurando, portanto um modelo de peritonite (POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008; RITTIRSCH et al., 2009). Esse modelo é amplamente utilizado por ocasionar alterações cardiovasculares similares às observadas em humanos, tendo como causa, traumas com perfurações intestinais, colite ou peritonite pós-operatória (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; NEMZEK et al., 2008). Por esse método ainda é possível determinar a intensidade na indução da sepse pela

proporção de conteúdo cólico extravasado para a cavidade peritoneal. Logo no início dos experimentos foi realizada a padronização do modelo, onde foram observados sinais da instalação da sepse, além da análise de mortalidade (dados não mostrados), sendo essa etapa muito importante para garantir reprodutibilidade nos resultados dos experimentos.

O desenvolvimento da sepse pode ser dividido em duas fases em termos hemodinâmicos e cardiovasculares. Primeiramente ocorre a fase hiperdinâmica caracterizada pela baixa resistência vascular periférica e elevação no débito cardíaco, nessa mesma fase ocorre uma intensa liberação de catecolaminas na circulação sanguínea. A segunda fase é a hipodinâmica, com marcante hiporreatividade a catecolaminas, diminuição no débito cardíaco e comprometimento no fluxo sanguíneo (MADDENS; SOWERS, 1987; FLYNN; MANI; MATHER, 2010).

Fernandes et al. (2006) demonstraram através de modelo de endotoxemia induzida por LPS que a atividade de sGC está comprometida nos momentos iniciais da síndrome, assim por consequência a produção de cGMP também diminui. Mais tarde demonstrou-se de forma muito clara a importância do cGMP nos momentos iniciais da sepse, uma vez que a inibição da atividade de sGC no início da síndrome ocasionou aumento da mortalidade nos animais (FERNANDES et al., 2009).

Isso ocorreu porque no início da sepse a atividade da sGC não está aumentada e o cGMP produzido atua na manutenção do tônus vascular, perfusão sanguínea trazendo assim melhora hemodinâmica. Um perfil bem diferente ao observado em momentos tardios, em que a atividade de sGC está aumentada pela sinalização do NO e a intensa produção de cGMP se associa ao quadro de hipotensão e hiporreatividade observada na síndrome. A proposta de inibição de sGC no início da sepse, portanto priva os animais desse equilíbrio hemodinâmico, favorecendo vasoconstrição pela alta concentração plasmática de catecolaminas com consequente agravamento de isquemia e disfunção orgânica (MADDENS; SOWERS, 1987; FERNANDES et al., 2009, 2008, 2006; NARDI et al., 2010).

Portanto, nesse trabalho optamos por utilizar o fármaco cilostazol como ferramenta farmacológica para promover aumento na concentração de cAMP e cGMP no início da sepse, baseando-se em trabalhos prévios e resultados encontrados na literatura.

O cilostazol é um inibidor seletivo de PDE3 que teve sua aprovação para uso no Japão no ano de 1988 e nos Estados Unidos somente em 1999. Desde seu

lançamento é utilizado para o tratamento de sintomas relacionados à claudicação intermitente. Esse medicamento é um potente antiagregante plaquetário possuindo propriedades vasodilatadoras e antiproliferativas (HAYASHI et al., 2000; GRESELE; MOMI; FALCINELLI, 2011).

Apesar de ser um inibidor seletivo de PDE3, a farmacologia do cilostazol se mostra complexa e com um amplo espectro de ação. Sua principal ação de fato é a inibição de PDE3, porém entre outros efeitos encontram-se a inibição da captação de adenosina, efeitos antiproliferativos em célula muscular lisa de vasos, aumento na liberação de NO pelas células endoteliais, melhora em perfil lipídico, entre outros efeitos (para revisão ver SURAPISITCHAT; BEAVO, 2011; ROGERS et al., 2015).

A família da PDE3 apresenta duas isoformas distintas PDE3A e PDE3B, porém isso não afeta a inibição pelo cilostazol. A expressão das duas isoformas ocorre em diferentes tecidos, como plaquetas, tecido muscular cardíaco, fígado, rim, musculatura de vasos e vísceras, ocorrendo diferenças na distribuição de cada isoforma nesses tecidos (MAURICE et al., 2014).

Ao avaliarmos os parâmetros cardiovasculares, observamos que os animais submetidos ao procedimento CLP apresentaram manifestações da sepse, como diminuição na pressão arterial média, aumento na frequência cardíaca e diminuição no fluxo sanguíneo renal. Além desses dados mostrados, foram observados outros sinais como piloereção, prostração e diminuição da movimentação nos animais.

Os animais sépticos apresentaram quadro de hiporreatividade a vasoconstritores como demonstrado pelo comprometimento nos parâmetros cardiovasculares avaliados. Entretanto o tratamento com cilostazol trouxe melhora na variação da PAM para angiotensina II e no tempo de resposta para fenilefrina e angiotensina II. A ocorrência de hiporreatividade para vasoconstritores na sepse é um evento já bem descrito em diferentes estudos realizados com modelos de sepse e endotoxemia (SORDI et al., 2011; GUARIDO et al., 2014).

A hiporreatividade a vasoconstritores durante a sepse provavelmente é multifatorial. Entre as causas se destaca a produção de NO pela atividade aumentada de NOS-2. O NO produzido difunde-se para o músculo liso vascular e induz vasodilatação através da estimulação de sGC e resulta no aumento da concentração de cGMP (JULOU-SCHAEFFER et al., 1990). A produção de prostaglandinas (PGI<sub>2</sub>) via sinalização ciclooxygenase 2 (COX-2), também induz vasodilatação através da ligação de PGI<sub>2</sub> ao seu receptor acoplado a proteína G, aumentando o cAMP e

mediando vasodilatação em célula muscular lisa de vasos (CAUWELS, 2007). A excessiva ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP presentes na membrana dessas células musculares também gera vasodilatação ao causar hiperpolarização e inibição de canais de cálcio voltagem dependentes, induzindo hipotensão e hiporreatividade vascular (MACARTHUR et al., 2000). Na sepse ainda ocorre aumento na atividade de cinases de receptores acoplados a proteína G (GRKs, do inglês, *G Protein-Coupled Receptor Kinases*) sobre receptores adrenérgicos, que são fosforilados, ligam-se a  $\beta$ -arrestinas e são internalizados, gerando uma dessensibilização mais duradoura e profunda durante a síndrome (EICHEL; JULLIÉ; VON ZASTROW, 2016).

A melhora na reatividade vascular a vasoconstritores, como demonstrada parcialmente para angiotensina II e fenilefrina representa um avanço no quadro séptico. Dados clínicos mostram que um prolongado tempo de hipotensão contribui para o desenvolvimento do choque séptico. É possível ainda se estabelecer na clínica uma associação direta entre o tempo em que o paciente apresenta PAM inferior a 65 mmHg, desenvolvimento de disfunção orgânica, por exemplo comprometimento renal e aumento na taxa de mortalidade (VARPULA et al., 2005; ANGELE; SCHNEIDER; CHAUDRY, 2008). Pelo fato de alguns parâmetros terem apresentado melhora na reatividade, isso indica que os animais tratados com cilostazol apresentaram um menor grau de hiporreatividade a vasoconstritores.

O comprometimento na resposta vasodilatadora nos animais CLP foi evidente. Apesar de ser uma forma interessante de se analisar a resposta vascular, ela deve ser avaliada com cautela nesse ensaio experimental. Com a sepse, os animais apresentaram marcante quadro de hipotensão, assim a capacidade vasodilatadora nesses animais foi afetada fortemente, uma vez que esses já se apresentavam hipotensos. Isso pode ter justificado o comprometimento na resposta para todos os vasodilatadores testados, que induzem vasodilatação por diferentes mecanismos.

O comprometimento cardíaco ocorre precocemente na sepse e choque séptico, afetando principalmente ventrículo esquerdo. Ainda não são totalmente claros os fatores etiológicos, porém sabe-se que o coração é um alvo primário de diversos mediadores liberados durante o choque séptico, como citocinas pró-inflamatórias, espécies reativas de oxigênio, gerando inflamação local com migração leucocitária ao tecido (VINCENT et al., 1992; PRICE et al., 1999; SCHMITTINGER et al., 2013). O cilostazol melhorou a resposta na frequência cardíaca nos animais sépticos, podendo

representar algum ganho no trabalho cardíaco gerado por proteção com o tratamento no início da sepse. Esse resultado embora muito interessante deve ser associado à análise bioquímica, pois é muito importante avaliarmos se esse ganho em trabalho cardíaco não representou uma piora em marcadores de lesão tecidual, através da determinação de creatina quinase fração MB (CKMB, do inglês, *Creatine Kinase MB*).

O quadro de sepse pode evoluir para choque séptico, que apresenta extensa lesão múltipla orgânica, tendo uma associação causal entre o prejuízo na microcirculação e o aparecimento dessas lesões. A partir disso a análise de parâmetros como o FSR se mostra de grande importância na síndrome, pois fornece dados sobre a perfusão tecidual aos rins. O comprometimento da função renal se associa ao desenvolvimento de falência renal aguda que na sepse é causada pela marcante hipoperfusão, mesmo que por um curto intervalo de tempo (CHVOJKA et al., 2008).

Durante o desenvolvimento da sepse ocorre profunda alteração em aspectos macro e microvasculares que geram má distribuição sanguínea para os tecidos, entre eles o rim. Esse comprometimento renal ainda é mais evidente, pois se sabe que o leito renal mantém a capacidade de responder a catecolaminas durante a síndrome, se opondo ao que se observa em outros leitos vasculares que se apresentam hiporreativos. Esse perfil na clínica se associa a piora no quadro de disfunção orgânica no tecido, tendo em vista a administração de vasoconstritores para manutenção da PA que acabam gerando isquemia renal (SPRONK ET AL., 2002; DONATI ET AL., 2013; ZARBOKC, 2014; DE BACKER ET AL., 2016).

Em nosso modelo, encontramos que os animais sépticos apresentaram um importante prejuízo na reatividade do FSR a vasoconstritores e vasodilatadores sistêmicos. O tratamento com cilostazol, apesar de favorecer vasodilatação e melhorar fluxo sanguíneo não conseguiu apresentar nenhum efeito sobre a resposta vascular do FSR no tempo de 24 horas. Porém ocorreu nos animais um importante comprometimento no FSR basal e de forma interessante o cilostazol apresentou melhora nesse parâmetro. Um importante ponto que deve ser levado em consideração é que nesse período não se observa mais a ação do fármaco, portanto o valor de FSR basal mais elevado pode ser resultado de um reflexo na melhora hemodinâmica no início da sepse.

Boffa e Arendshorst (2004) demonstraram através de modelo de choque endotoxêmico que rins de camundongos sépticos não diferiram dos animais controle

em termos de reatividade vascular, se opondo ao resultado encontrado no trabalho. Um ponto importante a se considerar ao comparar com o prejuízo na resposta renal encontrada nos animais sépticos do presente trabalho foi que a análise realizada por esses pesquisadores se deu através do percentual de resposta, assim um valor menor de fluxo sanguíneo renal não impacta a análise, diferente da análise dos nossos dados feita através da variação no FSR e ASC.

Além da reatividade vascular *in vivo*, optamos por avaliar a reatividade de vasos em sistema de órgão isolado (*ex vivo*). O modelo de sepse gerou um comprometimento na reatividade vascular de aorta a vasoconstritores. Heesen et al. (1996) também demonstraram através do modelo CLP que os animais sépticos apresentam comprometimento na contração obtida para fenilefrina e KCl. Porém em seus experimentos não houve diferenças em CE50 entre os animais sépticos e controles. O comprometimento da resposta contrátil em anel de aorta na sepse também foi demonstrado por Kovalski et al. (2017), evidenciando-se diferença na potência entre os grupos representada por CE50. No presente trabalho também foram encontradas diferenças em CE50, ASC e efeito máximo entre animais sépticos e controles e o tratamento com cilostazol trouxe melhora nesses parâmetros. Esse resultado traz indícios de que o tratamento no início da sepse com cilostazol pode prevenir alterações vasculares, que mais tardiamente se reflete em melhora na reatividade a vasoconstritores. Esse pode representar um importante achado, uma vez que o quadro de hiporreatividade caracteriza o quadro de choque séptico e leva ao desenvolvimento da disfunção múltipla orgânica.

Segundo os parâmetros hematológicos, os animais sépticos apresentaram um importante aumento de permeabilidade vascular, ocorrendo hemoconcentração que pode ser justificado pelo aumento dos parâmetros do eritrograma. O tratamento com cilostazol preveniu a ocorrência de hemoconcentração, podendo representar uma melhora na permeabilidade vascular. De fato o cAMP está muito associado à diminuição de permeabilidade vascular. Um trabalho com modelo de sepse em ratos também demonstrou que a promoção de aumento nos níveis de cAMP resultou em redução na permeabilidade vascular (SCHICK et al., 2012).

Esse resultado, entretanto deve ser analisado de forma cautelosa. A utilização de parâmetros hematológicos para mensurar a permeabilidade vascular se mostra insuficiente. O ideal é a utilização de outros tipos de indicadores, como por exemplo,

avaliar a permeabilidade vascular através do extravasamento do corante azul de Evans para órgãos e tecidos (MARTIN; AVENDANO; PIEDRAS, 2010).

O perfil na contagem de plaquetas encontrado corrobora com os dados em literatura, ocorrendo uma queda no número de plaquetas nos animais sépticos e não havendo diferenças com o tratamento. Já está bem descrito a ativação dos sistemas de coagulação e fibrinolítico na sepse, isso ocorre pela intensa ativação do sistema imunológico com a liberação de diferentes mediadores na corrente sanguínea (LEVI; VAN DER POLL, 2017). A ativação descontrolada do sistema de coagulação acaba levando a piora do quadro de fluxo sanguíneo e perfusão tecidual. A contagem de plaquetas é muito importante na sepse, pois estudos demonstram uma associação direta entre diminuição na contagem de plaquetas no paciente, piora na resposta desregulada do hospedeiro e aumento na mortalidade (CLAUSHUIS et al., 2016). Outros estudos demonstraram prejuízo na resposta imune do hospedeiro durante trombocitopenia causada por pneumonia induzida por sepse em camundongos. Ao mesmo tempo, uma ativação excessiva de plaquetas tem se relacionado com a injúria orgânica durante a sepse, através de muitos mecanismos, incluindo recrutamento de células imune e inflamação, formação de trombos vaso-oclusivos, agravando disfunção endotelial e aumentando permeabilidade vascular. Dados da literatura ainda demonstram uma melhora na sobrevivência de animais sépticos com uso de antiagregantes, porém a inibição farmacológica da função plaquetária na sepse nunca foi avaliada em estudos clínicos (DE STOPPELAAR et al., 2014)

Está descrito a partir de diferentes ensaios experimentais que o procedimento de CLP gera um quadro de leucopenia no tempo de 24 horas, porém, não encontramos diferença na contagem global de leucócitos nos animais. Isso pode ser explicado pela ocorrência de quadros de leucocitose e leucopenia nos animais sépticos. A contagem relativa e global de leucócitos mostrou um perfil clássico de diminuição na contagem de linfócitos, aumento na contagem de neutrófilos e monócitos nos animais sépticos. A linfopenia é bem característica na sepse, ocorrendo na fase hipodinâmica da síndrome. Estudos demonstraram a associação de sepse com depleção de linfócitos e células dendríticas, como sendo resultado do aumento na apoptose dessas populações. Dados ainda sugerem o estabelecimento de uma relação direta entre a diminuição na contagem de linfócitos e o aumento da mortalidade observada na sepse (DOI et al., 2009; BOOMER et al., 2011; HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013).

Um dado bastante interessante foi encontrado na atividade da enzima MPO em tecidos. A enzima MPO está presente principalmente em neutrófilos, além da presença em monócitos, eosinófilos e basófilos, contribuindo para a capacidade de ataque e destruição de micro-organismos por essas células. Assim, ao determinarmos atividade de MPO também quantificamos principalmente o recrutamento de neutrófilos para o tecido de maneira indireta.

Ocorreu um aumento na atividade de MPO no pulmão e rim nos animais sépticos. O tratamento com cilostazol preveniu a elevação de MPO no pulmão indicando que a migração e infiltração de neutrófilos em nível tecidual foram reduzidas. Esse resultado é muito importante, pois o pulmão é extensivamente acometido na sepse, sendo a determinação de MPO considerada um importante marcador de recrutamento de neutrófilos para o tecido, inclusive tem sido sugerido que a chegada de neutrófilos no pulmão contribui para a injúria tecidual observada na sepse (PERL et al., 2011). Sildenafil, um inibidor de PDE5 também se mostrou capaz de reduzir a atividade de MPO no pulmão de animais sépticos no tempo de 24 horas, demonstrando um efeito protetor contra dano tecidual (KOVALSKI et al., 2017).

O acometimento do sistema respiratório durante o desenvolvimento da sepse ocorre pela inflamação difusa do parênquima, com desenvolvimento de disfunção pulmonar grave, que ao que tudo indica, é um dos primeiros passos para a ocorrência da disfunção múltipla orgânica observada na síndrome. Aproximadamente 50% dos pacientes com sepse desenvolvem lesão pulmonar aguda e sua forma mais grave, a síndrome da angústia respiratória aguda (SARA) (RUBENFELD et al., 2005; TAVARES; MALDONADO; MIÑANO, 2014). Apesar de avanços na compreensão da fisiopatologia no desenvolvimento da sepse, a ocorrência de insuficiência pulmonar aguda, principalmente por casos da síndrome sem origem pulmonar continua sendo um grande desafio clínico, com grave morbidade e mortalidade, dificultando o manejo do paciente séptico (MATTHAY; ZEMANS, 2011).

Na insuficiência pulmonar aguda ocorre um distúrbio na barreira entre alvéolos e capilares, o que resulta em elevação de mediadores inflamatórios, aumento da permeabilidade vascular com formação de edema e recrutamento de neutrófilos para o tecido (MATTHAY; ZEMANS, 2011; WU et al., 2013). Todos os mecanismos envolvidos não são claramente entendidos, porém atribui-se à infiltração de polimorfonucleares e à ativação de fatores de transcrição como o fator nuclear Kappa B (NF-kB, do inglês, *Nuclear Factor Kappa B*) como sendo os eventos iniciadores do



desenvolvimento da insuficiência pulmonar aguda (ABRAHAM; SINGER, 2007; GROMMES; SOEHNLEIN, 2011).

O resultado encontrado a partir da análise de MPO em tecido pulmonar e confirmado pela análise histopatológica se mostra de grande importância, uma vez que os animais sépticos tratados com cilostazol apresentaram diminuição de atividade de MPO e menor grau de infiltração leucocitária no tecido. Ao diminuir a chegada de polimorfonucleares ao pulmão o cilostazol pode ter prevenido a ocorrência de uma resposta inflamatória aguda exacerbada no tecido, prevenindo danos e podendo refletir em ganho de função do órgão tardiamente.

Há na literatura trabalhos que associam efeitos do cilostazol à inibição da expressão de várias citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão, diminuindo assim migração leucocitária para os tecidos. Isso ocorre porque o fármaco suprime a atividade de NF- $\kappa$ B via ativação de proteína quinase ativada por AMP (AMPK, do inglês, *AMP-Activated Protein Kinase*), e não via cAMP/PKA como era defendida por alguns autores (SUZUKI et al., 2008; AOKI et al., 2010; DA MOTTA; DE BRITO, 2016). Esses trabalhos sugerem que esse é o mecanismo pelo qual o cilostazol protege células endoteliais da inflamação e previne formação de infiltrado inflamatório tecidual. Portanto, esse efeito do cilostazol pode justificar a prevenção de danos e infiltração leucocitária observada no tecido pulmonar em nosso modelo.

O comprometimento cardíaco na sepse também é muito evidente, se associando ao aumento de morbidade e mortalidade observada na síndrome. Sabe-se que a imunidade inata e a resposta inflamatória, mediada por receptores do tipo Toll (TLRs) desempenham um papel crítico no desenvolvimento de disfunção cardíaca na sepse/choque séptico, mediante sinalização ativada predominantemente por NF- $\kappa$ B, que é um importante fator de regulação de mediadores pró-inflamatórios (ZHANG; GHOSH, 2001; WILLIAMS et al., 2003; ZOU et al., 2010).

Sabe-se que a infiltração de macrófagos e neutrófilos no miocárdio contribui para a disfunção no tecido, pois quando ativados, os macrófagos liberam quimiocinas que atraem neutrófilos e ainda liberam fator inibidor de macrófagos que contribui para a disfunção cardíaca e se correlaciona com severidade na sepse (CAVAILLON; ADIB-CONQUY, 2005; ALVES-FILHO et al., 2008; GAO et al., 2015).

No nosso modelo, observamos de forma sutil a presença de infiltrado leucocitário no tecido cardíaco nos animais sépticos. A presença dessas células no tecido pode, portanto se associar ao desenvolvimento de disfunção cardíaca, porém

pelo baixo número de leucócitos encontrados, histologicamente não podemos fazer tal afirmação. O uso de imuno-histoquímica com marcação específica para neutrófilos ou ainda macrófagos no tecido cardíaco poderia trazer o esclarecimento sobre o real envolvimento dessas células no comprometimento do órgão observado em nosso modelo.

Nas lesões renais ocasionadas pela sepse as células endoteliais se apresentam hiperativadas na presença de citocinas pró-inflamatórias e desenvolvem alterações funcionais que sustentam o desenvolvimento das lesões (VERMA; MOLITORIS, 2015). O aumento que ocorre na resistência vascular renal (RVR) é outro fator hemodinâmico chave associado com insuficiência renal aguda induzida pela sepse, uma vez que o aumento na RVR tem sido associado com alteração global e regional de fluxo sanguíneo (REDFORS et al., 2010). E como demonstrado na análise de FSR através de laser Doppler em nosso modelo, os animais sépticos apresentaram uma redução significativa no fluxo sanguíneo no rim. O aumento na RVR pode ainda induzir vasoconstrição, aumento de permeabilidade vascular, edema tecidual, adesão de leucócitos às células endoteliais e formação de microtrombos (BOUGLÉ; DURANTEAU, 2011).

Outro fator complicador na função renal é que diferentemente dos demais leitos vasculares, o rim ainda preserva resposta vasoconstritora, agravando ainda mais a disfunção orgânica no tecido (GUARIDO et al., 2014). Os achados histológicos no tecido renal em nosso modelo podem demonstrar o acometimento renal com o desenvolvimento da sepse reforçando a ocorrência de resposta inflamatória tecidual como apontado pelo aumento de atividade de MPO no tecido. O aumento ainda que sutil no número de hemácias encontrado em capilares glomerulares e peritubulares podem ter sido causados pelo aumento da RVR e favorecimento de permeabilidade vascular e geração de edema, muito associados à resposta inflamatória no tecido.

Durante a sepse ocorre o aumento na produção de NO, através do aumento na atividade de NOS-2, tendo sua produção associada com o desenvolvimento da síndrome séptica. O NO está envolvido em muitos processos da resposta do hospedeiro como inflamação, reatividade vascular, disfunção cardiovascular, aumento de migração leucocitária, entre outros (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; ASSREUY, 2006; FERNANDES; ASSREUY, 2008). Os níveis de NO<sub>x</sub> se correlacionam com a produção de NO, por se tratarem de seus metabólitos, assim o aumento na produção de NO acarreta em aumento de NO<sub>x</sub> plasmático. No modelo

experimental observamos um aumento de NOx nos animais sépticos e o tratamento não preveniu e elevação dos níveis. O aumento de NOx nos animais sépticos corrobora com dados da literatura que demonstram que a hiporreatividade observada na sepse se associa ao aumento na produção de NO durante o desenvolvimento da síndrome.

A variação da glicose sanguínea no modelo de sepse por CLP segue um comportamento característico de desenvolvimento de uma fase hiperglicêmica e posterior hipoglicêmica. Esse perfil foi confirmado por Maitra; Wojnar; Lang (2000), onde se demonstrou que animais sépticos apresentam um pico hiperglicêmico no tempo de 2 horas, normalização glicêmica em 6 horas e quadro hipoglicêmico em 24 horas. Nesse trabalho ainda determinou-se a concentração de hormônios circulantes, demonstrando que a partir de 2 horas já ocorria elevação nos níveis de glucagon e adrenalina, sendo o aumento crescente e sustentado até 24 horas. Outros trabalhos também demonstraram esse perfil glicêmico, associando a fase hiperglicêmica com a estimulação de glicogenólise e gliconeogênese hepática por sinalização operada por glucagon e estimulação adrenérgica. Já a hipoglicemia associada a uma produção prejudicada de glicose sob condições severas da sepse (LANG et al., 1993; LIAO et al., 2013).

Em nossos resultados observamos um aumento significativo na glicemia nos animais controles no tempo de 6 horas, podendo ser associado ao plano anestésico adotado com utilização de xilazina que ocasiona hiperglicemia transitória por inibição da liberação de insulina no pâncreas ao ativar receptores alfa 2 (GUARINO et al., 2007). Os animais sépticos não apresentaram alteração glicêmica no tempo de 6 horas, porém como já descrito com o modelo CLP, caracteristicamente os animais sépticos apresentam pico hiperglicêmico antes de 6 horas, estando nesse período com normalização glicêmica (MAITRA; WOJNAR; LANG, 2000). No tempo de 12 e 24 horas os animais controles apresentaram normalização glicêmica, enquanto os animais sépticos desenvolveram hipoglicemia sustentada.

O tratamento com cilostazol não alterou o comportamento glicêmico nos diferentes grupos. Pelo seu mecanismo de ação o fármaco ao inibir PDE3 promove aumento na concentração de cAMP que por sua vez poderia interferir na sinalização operada pelo glucagon, favorecendo elevação glicêmica, piorando o quadro de hiperglicemia. Porém, a administração do fármaco ocorreu em período de

normalização glicêmica, que antecede a fase hipoglicêmica. Isso justificar a não alteração na glicemia em função do tratamento com cilostazol.

Sabe-se que na sepse a liberação de diversos mediadores, como o NO e citocinas pró-inflamatórias altera o tônus e a permeabilidade vascular, resultando em hipovolemia e hipoperfusão tecidual, conduzindo ao desenvolvimento de disfunção múltipla orgânica (SHIH et al., 2008). Estudos também já demonstraram que níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias se correlacionam diretamente com severidade e mortalidade na sepse em humanos (MIRA et al., 1999).

A proposta do presente trabalho desenvolvido, foi promover uma melhora hemodinâmica no início da sepse com a utilização do cilostazol, pelas suas propriedades vasodilatadoras, podendo assim prevenir o desenvolvimento de disfunção orgânica tardia. Para avaliarmos tal proposta determinamos diferentes marcadores bioquímicos de lesão tecidual.

Os animais sépticos apresentaram comprometimento na função hepática pela elevação nos níveis de AST e ALT, na função renal pela elevação da ureia e apresentaram comprometimento em perfusão tecidual comprovado pela elevação na concentração sérica de lactato. O tratamento com cilostazol trouxe melhora somente nesse último parâmetro, muito associado ao seu mecanismo de ação vasodilatador, que no início da sepse possibilitaria uma melhora em perfusão tecidual e menor geração de lactato posteriormente.

A ocorrência de disfunção hepática precoce na sepse é caracterizada por níveis elevados de aminotransferases sinalizando degeneração hepatocelular e necrose. As lesões que ocorrem no tecido são multifocais, normalmente envolvendo células parenquimatosas do fígado, apresentando comumente infiltrados de neutrófilos em um padrão difuso espalhado por todo o parênquima hepático (CORRAL et al., 2005; TSAO et al., 2011).

Já o comprometimento renal na sepse pode ser identificado através da determinação da concentração sérica de ureia ou creatinina. Esses marcadores infelizmente sofrem influência de alguns fatores extrarrenais, como por exemplo, a produção de creatinina é influenciada por fatores como massa muscular, idade, sexo e secreção renal. A ureia também apresenta alguns interferentes como taxa de produção não constante e reabsorção tubular significativa, principalmente em situações de esgotamento de volume (BJORNSSON 1979; LEELAHAVANICHKUL et

al., 2014). Apesar disso, a utilização desses marcadores representa uma importante forma de avaliação de lesão renal.

O comprometimento renal na sepse é muito relevante, estudos sugerem que a sobrevivência de pacientes com sepse está intimamente relacionada com a melhora na função renal, e o desenvolvimento das lesões renais se associam a ocorrência de isquemia e resposta inflamatória tecidual (SCHRIER; WANG, 2004; LEVY et al., 2005).

Se a disfunção cardiovascular progressiva é a principal causa da rápida deterioração no choque séptico irreversível ou simplesmente um passo final em uma resposta inflamatória descompensada ainda não está totalmente claro. Da mesma forma, os fatores que contribuem para a disfunção cardiovascular na sepse não foram completamente definidos. No entanto, a hipoperfusão e hipoxia tecidual são uma marca característica da sepse grave. As consequências metabólicas da insuficiência tissular é a glicólise anaeróbica com aumento na produção de lactato e íons hidrogênio, acidose, diminuição da produção de energia mitocondrial, homeostase iônica perturbada nas membranas celulares e capacidade funcional reduzida das células do tecido (VINCENT; DE BACKER, 2005; ROMERO-BERMEJO et al., 2011; LIN; LEE; WU, 2014). A determinação do lactato na sepse, portanto é de grande importância, por retratar a perfusão tecidual, e principalmente agora após a última atualização dos critérios diagnósticos da sepse.

O tratamento com cilostazol trouxe uma melhora na perfusão sanguínea, que pode ser associado à melhora hemodinâmica no início da sepse promovida pela sua ação vasodilatadora, garantindo a manutenção do tônus vascular que proporcionou adequada perfusão tecidual. Outros mecanismos de ação do fármaco também podem justificar a melhora em alguns parâmetros obtidos ao longo do trabalho, porém, a chave para permitir a melhora em outros parâmetros na sepse, possa ser mesmo a melhora hemodinâmica inicial, trazendo ganhos na perfusão tecidual, prevenindo o desenvolvimento de disfunção orgânica, fornecendo assim tempo ao organismo.

## 7 CONCLUSÃO

O cilostazol melhorou a resposta vasoconstritora obtida para fenilefrina e angiotensina II *in vivo* e em anel de aorta isolado para fenilefrina e Cloreto de potássio nos animais sépticos, prevenindo o desenvolvimento de hiporreatividade.

Cilostazol restaurou a resposta na frequência cardíaca para isoprenalina nos animais sépticos, melhorando a resposta cardíaca.

A resposta obtida no fluxo sanguíneo renal não foi alterada pelo cilostazol, porém os animais sépticos tratados apresentaram aumento em seu valor basal, demonstrando preservação no fluxo sanguíneo nesses animais.

Cilostazol preveniu a ocorrência de hemoconcentração nos animais sépticos, sendo esse um marcador indireto de melhora na permeabilidade vascular.

Cilostazol preveniu o aumento da atividade de mieloperoxidase e infiltração leucocitária no pulmão de animais sépticos, diminuindo o recrutamento de neutrófilos e inflamação no tecido.

Cilostazol apresentou melhora hemodinâmica e de perfusão sanguínea aos tecidos, prevenindo a elevação do lactato nos animais sépticos.

Nossos resultados demonstram que o uso de inibidores de PDEs como o cilostazol pode representar uma importante ferramenta terapêutica complementar para o tratamento da sepse, desde que utilizados em momentos iniciais do desenvolvimento da síndrome.

## REFERÊNCIAS

- ABDELSAMEEA, A. A.; MOHAMED, A. M.; AMER, M. G.; ATTIA, S. M. Cilostazol attenuates gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 68, n. 4, p. 247-253, 2016.
- ABRAHAM, E.; MATTHAY, M. A.; DINARELLO, C. A.; VINCENT, J. L.; COHEN, J.; OPAL, S. M. et al. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. **Critical care medicine**, v. 28, n. 1, p. 232-235, 2000.
- ABRAHAM, E.; SINGER, M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Critical care medicine**, v. 35, n. 10, p. 2408-2416, 2007.
- AHMAD, F.; DEGERMAN, E.; MANGANIELLO, V. C. Cyclic nucleotide phosphodiesterase 3 signaling complexes. **Hormone and metabolic research**, v. 44, n. 10, p. 776-785, 2012.
- ALVES-FILHO, J. C.; DE FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F. O.; CUNHA, F. Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30, n. 7, p. 3-9, 2008.
- ANGELE, M. K.; SCHNEIDER, C. P.; CHAUDRY, I. H. Bench-to-bedside review: latest results in hemorrhagic shock. **Critical Care**, v. 12, n. 4, p. 218, 2008.
- ANGUS, D. C. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board?. **Jama**, v. 306, n. 23, p. 2614-2615, 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. **Critical Care Medicine-Baltimore**, v. 29, n. 7, p. 1303-1310, 2001.
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840-851, 2013.
- AOKI, C.; HATTORI, Y.; TOMIZAWA, A.; JOJIMA, T.; KASAI, K. Anti-inflammatory role of cilostazol in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo. **Journal of atherosclerosis and thrombosis**, v. 17, n. 5, p. 503-509, 2010.
- ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune disorders drug targets**, v. 6, n. 2, p. 165-73, jun. 2006.
- 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.
- BENDER, A. T.; BEAVO, J. A. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: molecular regulation to clinical use. **Pharmacological reviews**, v. 58, n. 3, p. 488-520, 2006.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 182, n. 1, p. 214-23, jul. 2000.

BJORNSSON, T. D. Use of Serum Creatinine Concentrations to Determine Renal Function1. **Clinical pharmacokinetics**, v. 4, n. 3, p. 200-222, 1979.

BOFFA, J-J.; ARENDSHORST, W. J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock. **Journal of the American Society of Nephrology**, v. 16, n. 1, p. 117-124, 2005.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992.

BOUGLÉ, A.; DURANTEAU, J. Pathophysiology of sepsis-induced acute kidney injury: the role of global renal blood flow and renal vascular resistance. In: **Controversies in Acute Kidney Injury**. Karger Publishers, 2011. p. 89-97.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature reviews Drug discovery**, v. 4, n. 10, p. 854-865, 2005.

CASTRO, L. R.; VERDE, I.; COOPER, D. M.; FISCHMEISTER, R. Cyclic guanosine monophosphate compartmentation in rat cardiac myocytes. **Circulation**, v. 113, n. 18, p. 2221-2228, 2006.

CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. **Kidney international**, v. 72, n. 5, p. 557-565, 2007.

CAVAILLON, J. M.; ADIB-CONQUY, M. Monocytes/macrophages and sepsis. **Critical care medicine**, v. 33, n. 12, p. S506-S509, 2005.

CERRA, F. B. The systemic septic response: multiple systems organ failure. **Critical care clinics**, v. 1, n. 3, p. 591-607, 1985.

CHVOJKA, J.; SYKORA, R.; KROUZECKY, A.; RADEJ, J.; VARNEROVA, V.; KARVUNIDIS, T. et al. Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. **Critical care**, v. 12, n. 6, p. R164, 2008.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-891, 2002.

CONTI, M.; BEAVO, J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 481-511, 2007.



CORRAL, J.; YÉLAMOS, J.; HERNÁNDEZ-ESPINOSA, D.; MONREAL, Y.; MOTA, R.; ARCAS, I. et al. Role of lipopolysaccharide and cecal ligation and puncture on blood coagulation and inflammation in sensitive and resistant mice models. **The American journal of pathology**, v. 166, n. 4, p. 1089-1098, 2005.

CURRY, F.R. E.; ADAMSON, R. H. Tonic regulation of vascular permeability. *Acta physiologica*, v. 207, n. 4, p. 628-649, 2013.

DA MOTTA, N. A. V.; DE BRITO, F. C. F. Cilostazol exerts antiplatelet and anti-inflammatory effects through Ampk activation and Nf-kb inhibition on hypercholesterolemic rats. **Fundamental & clinical pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 327-337, 2016.

DE BACKER, D.; CRETEUR, J.; PREISER, J. C.; DUBOIS, M. J.; VINCENT, J. L. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 166, n. 1, p. 98-104, 2002.

DE BACKER, D.; DONADELLO, K.; SAKR, Y.; OSPINA-TASCON, G.; SALGADO, D.; SCOLLETTA, S.; VINCENT, J. L. Microcirculatory alterations in patients with severe sepsis: impact of time of assessment and relationship with outcome. **Critical care medicine**, v. 41, n. 3, p. 791-799, 2013.

DE MONTMOLLIN, E.; ABOAB, J.; MANSART, A.; ANNANE, D. Bench-to-bedside review:  $\beta$ -adrenergic modulation in sepsis. **Critical care**, v. 13, n. 5, p. 230, 2009.

DEJANA, E.; TOURNIER-LASSERVE, E.; WEINSTEIN, B. M. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. **Critical care medicine**, v. 35, n. 5, p. 1244-1250, 2007.

DEJANA, E.; TOURNIER-LASSERVE, E.; WEINSTEIN, B. M. The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. **Developmental cell**, v. 16, n. 2, p. 209-221, 2009.

DENNINGER, J. W.; MARLETTA, M. A. Guanylate cyclase and the NO/cGMP signaling pathway. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics**, v. 1411, n. 2, p. 334-350, 1999.

DOI, K.; LEELAHAVANICHKUL, A.; YUEN, P. S.; STAR, R. A. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **The Journal of clinical investigation**, v. 119, n. 10, p. 2868, 2009.

DOMBROVSKIY, V. Y.; MARTIN, A. A.; SUNDERRAM, J.; PAZ, H. L. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. **Critical care medicine**, v. 35, n. 5, p. 1244-1250, 2007.

DONATI, A.; DAMIANI, E.; BOTTICELLI, L.; ADRARIO, E.; LOMBRANO, M. R.; DOMIZI, R. et al. The aPC treatment improves microcirculation in severe sepsis/septic shock syndrome. **BMC anesthesiology**, v. 13, n. 1, p. 25, 2013.

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. **European journal of pharmacology**, v. 668, n. 1, p. 285-292, 2011.

EICHEL, K; JULLIÉ, D; VON ZASTROW, M. [beta]-Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. **Nature cell biology**, v. 18, n. 3, p. 303-310, 2016.

FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock**, v. 30, n. 7, p. 10-13, 2008.

FERNANDES, D.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; DUMA, D.; VILLELA, C. G.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Molecular pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 983-990, 2006.

FERNANDES, D.; SORDI, R.; PACHECO, L. K.; NARDI, G. M.; HECKERT, B. T.; VILLELA, C. G. et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, n. 3, p. 991-999, 2009.

FLYNN, A.; MANI, B. C.; MATHER, P. J. Sepsis-induced cardiomyopathy: a review of pathophysiologic mechanisms. **Heart failure reviews**, v. 15, n. 6, p. 605-611, 2010.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **The FASEB Journal**, v. 12, n. 10, p. 773-790, 1998.

FRANCIS, S. H.; HOUSLAY, M. D.; CONTI, M. inhibitors: factors that influence potency, selectivity, and action. In: **Phosphodiesterases as Drug Targets**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 47-84.

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

GAO, M.; WANG, X.; ZHANG, X.; HA, T.; MA, H.; LIU, L. et al. Attenuation of cardiac dysfunction in polymicrobial sepsis by microRNA-146a is mediated via targeting of IRAK1 and TRAF6 expression. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 2, p. 672-682, 2015.

GOLDENBERG, N. M.; STEINBERG, B. E.; SLUTSKY, A. S.; LEE, W. L. Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. **Science translational medicine**, v. 3, n. 88, p. 88ps25-88ps25, 2011.

GOTO, S. Cilostazol: potential mechanism of action for antithrombotic effects accompanied by a low rate of bleeding. **Atherosclerosis Supplements**, v. 6, n. 4, p. 3-11, 2005.

GOTTS, J. E.; MATTHAY, M. A. Sepsis: pathophysiology and clinical management. **bmj**, v. 353, p. i1585, 2016.

GRESELE, P.; MOMI, S.; FALCINELLI, E. Anti-platelet therapy: phosphodiesterase inhibitors. **British journal of clinical pharmacology**, v. 72, n. 4, p. 634-646, 2011.

GROMMES, J.; SOEHNLEIN, O. Contribution of neutrophils to acute lung injury. **Molecular medicine**, v. 17, n. 3-4, p. 293, 2011.

GUARIDO, K. L.; GONÇALVES, R. P.; JÚNIOR, A. G.; DA SILVA-SANTOS, J. E. Increased activation of the Rho-A/Rho-kinase pathway in the renal vascular system is responsible for the enhanced reactivity to exogenous vasopressin in endotoxemic rats. **Critical care medicine**, v. 42, n. 6, p. e461-e471, 2014.

GUARINO, M. P.; SANTOS, A. I.; MOTA-CARMO, M.; COSTA, P. F. Effects of anaesthesia on insulin sensitivity and metabolic parameters in Wistar rats. **in vivo**, v. 27, n. 1, p. 127-132, 2013.

HALL, M. J.; WILLIAMS, S. N.; DEFRANCES, C. J.; GOLOSINSKIY, A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. 2011.

HAYASHI, S. I.; MORISHITA, R.; MATSUSHITA, H.; NAKAGAMI, H.; TANIYAMA, Y.; NAKAMURA, T. et al. Cyclic AMP inhibited proliferation of human aortic vascular smooth muscle cells, accompanied by induction of p53 and p21. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 237-243, 2000.

HENGMING, K. E.; HUANCHEN, W.; MENGCHUN, Y. E. Structural insight into the substrate specificity of phosphodiesterases. In: **Phosphodiesterases as Drug Targets**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 121-134.

HONG, H.; MACKEY, W. C. The limits of evidence in drug approval and availability: a case study of cilostazol and naftidrofuryl for the treatment of intermittent claudication. **Clinical therapeutics**, v. 36, n. 8, p. 1290-1301, 2014.

HOUSLAY, M. D. Adaptation in cyclic AMP signalling processes: a central role for cyclic AMP phosphodiesterases. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 1998. p. 161-167.

HOUSLAY, M. D. Underpinning compartmentalised cAMP signalling through targeted cAMP breakdown. **Trends in biochemical sciences**, v. 35, n. 2, p. 91-100, 2010.

HUSSAIN, M B; HOBBS, A J; MACALLISTER, R J. Autoregulation of nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic GMP signalling in mouse thoracic aorta. **British journal of pharmacology**, v. 128, n. 5, p. 1082-1088, 1999.

IGAWA, T.; TANI, T.; CHIJIWA, T.; SHIRAGIKU, T.; SHIMIDZU, S.; KAWAMURA, K. et al. Potentiation of anti-platelet aggregating activity of cilostazol with vascular endothelial cells. **Thrombosis research**, v. 57, n. 4, p. 617-623, 1990.

ITO, H.; HASHIMOTO, A.; MATSUMOTO, Y.; YAO, H.; MIYAKODA, G. Cilostazol, a phosphodiesterase inhibitor, attenuates photothrombotic focal ischemic brain injury in hypertensive rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, n. 2, p. 343-351, 2010.

IWASHYNA, T. J.; ELY, E. W.; SMITH, D. M.; LANGA, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. **Jama**, v. 304, n. 16, p. 1787-1794, 2010.

JULO-SCHAEFFER, G.; GRAY, G. A.; FLEMING, I.; SCHOTT, C.; PARRATT J. R.; STOCLET, J. C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 259, n. 4, p. H1038-H1043, 1990.

KAUSS, I. A. M.; GRION, C. M.; CARDOSO, L. T. Q.; ANAMI, E. H. T.; NUNES, L. B.; FERREIRA, G. L. et al. The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 264-270, 2010.

KOHNO, T.; YAMAGUCHI, H.; HAKOSHIMA, T. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of human phosphodiesterase 12. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystalization Communications**, v. 66, n. 5, p. 520-522, 2010.

KOVALSKI, V.; PRESTES, A. P.; OLIVEIRA, J. G.; ALVES, G. F.; COLARITES, D. F.; MATTOS, J. E. et al. Protective role of cGMP in early sepsis. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 174-181, 2017.

LAGU, T.; ROTHBERG, M. B.; SHIEH, M. S.; PEKOW, P. S.; STEINGRUB, J. S.; LINDENAUER, P. K. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Critical care medicine**, v. 40, n. 3, p. 754-761, 2012.

LANG, C. H.; SPOLARICS, Z.; OTTLAKAN, A.; SPITZER, J. J. Effect of high-dose endotoxin on glucose production and utilization. **Metabolism-Clinical and Experimental**, v. 42, n. 10, p. 1351-1358, 1993.

LEE, W. L.; SLUTSKY, A. S. Sepsis and endothelial permeability. **The New England journal of medicine**, v. 363, n. 7, p. 689, 2010.

LEELAHAVANICHKUL, A.; SOUZA, A. C. P.; STREET, J. M.; HSU, V.; TSUJI, T.; DOI, K. et al. Comparison of serum creatinine and serum cystatin C as biomarkers to detect sepsis-induced acute kidney injury and to predict mortality in CD-1 mice. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 307, n. 8, p. F939-F948, 2014.

LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Coagulation and sepsis. **Thrombosis research**, v. 149, p. 38-44, 2017.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS international sepsis definitions conference. **Intensive care medicine**, v. 29, n. 4, p. 530-538, 2003.

LEVY, M. M.; MACIAS, W. L.; VINCENT, J. L.; RUSSELL, J. A.; SILVA, E.; TRZASKOMA, B.; WILLIAMS, M. D. Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. **Critical care medicine**, v. 33, n. 10, p. 2194-2201, 2005.

LIAO, M. H.; CHEN, S. J.; TSAO, C. M.; SHIH, C. C.; WU, C. C. Possible biomarkers of early mortality in peritonitis-induced sepsis rats. **journal of surgical research**, v. 183, n. 1, p. 362-370, 2013.

LIN, X.; LEE, D.; WU, D. Sabiporide improves cardiovascular function and attenuates organ injury from severe sepsis. **Journal of surgical research**, v. 188, n. 1, p. 231-237, 2014.

LIU, Y.; SHAKUR, Y.; KAMBAYASHI, J. Phosphodiesterases as targets for intermittent claudication. In: **Phosphodiesterases as drug targets**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 211-236.

LOPEZ, A.; LORENTE, J. A.; STEINGRUB, J.; BAKKER, J.; MCLUCKIE, A.; WILLATTS, S. et al. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Crit. Care Med.** v.32, p.21-30, 2004.

MACARTHUR, H.; WESTFALL, T. C.; RILEY, D. P.; MISKO, T. P.; SALVEMINI, D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 17, p. 9753-9758, 2000.

MADDENS, M.; SOWERS, J. Catecholamines in critical care. **Critical care clinics**, v. 3, n. 4, p. 871-882, 1987.

MAITRA, S. R.; WOJNAR, M. M.; LANG, C. H. Alterations in tissue glucose uptake during the hyperglycemic and hypoglycemic phases of sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 13, n. 5, p. 379-385, 2000.

MANICKAVASAGAM, S.; YE, Y.; LIN, Y.; PEREZ-POLO, R. J.; HUANG, M. H.; LUI, C. Y. et al. The cardioprotective effect of a statin and cilostazol combination: relationship to Akt and endothelial nitric oxide synthase activation. **Cardiovascular drugs and therapy**, v. 21, n. 5, p. 321-330, 2007.

MARTIN, G. S.; MANNINO, D. M.; EATON, S.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.

MARTIN, Y.; AVENDANO, C.; PIEDRAS, M. J. Evaluation of Evans Blue extravasation as a measure of peripheral inflammation. **Protocol Exchange**, v. 10, 2010.

MATTHAY, M. A.; ZEMANS, R. L. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, p. 147-163, 2011.

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, n. 4, p. 290-314, 2014.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological reviews**, v. 86, n. 1, p. 279-367, 2006.

MIRA, J. P.; CARIOU, A.; GRALL, F.; DELCLAUX, C.; LOSSER, M. R.; HESHMATI, F. et al. Association of TNF2, a TNF- $\alpha$  promoter polymorphism, with septic shock susceptibility and mortality: a multicenter study. **Jama**, v. 282, n. 6, p. 561-568, 1999.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. Annie. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine: a pathway for the regulation of cell function and communication. **Biochemical pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1709-1715, 1989.

NAKAMURA, T.; HOUCHI, H.; MINAMI, A.; SAKAMOTO, S.; TSUCHIYA, K.; NIWA, Y. et al. Endothelium-dependent relaxation by cilostazol, a phosphodiesterase III inhibitor, on rat thoracic aorta. **Life sciences**, v. 69, n. 15, p. 1709-1715, 2001.

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. **Critical care medicine**, v. 42, n. 6, p. e391-e400, 2014.

NEMZEK, J. A.; HUGUNIN, M. S.; OPP, M. R. Modeling Sepsis in the Laboratory: Merging Sound Science with Animal Well-Being. **Comparative Medicine**, v. 58, n. 2, p. 120-128, 2008.

O'NEILL, J. S.; MAYWOOD, E. S.; CHESHAM, J. E.; TAKAHASHI, J. S.; HASTINGS, M. H. cAMP-dependent signaling as a core component of the mammalian circadian pacemaker. **Science**, v. 320, n. 5878, p. 949-953, 2008.

PARK, K. W.; PARK, J. J.; LEE, S. P.; OH, I. Y.; SUH, J. W.; YANG, H. M. et al. Cilostazol attenuates on-treatment platelet reactivity in patients with CYP2C19 loss of function alleles receiving dual antiplatelet therapy: a genetic substudy of the CILON-T randomised controlled trial. **Heart**, p. hrt. 2010.216499, 2011.

PARK, W. S.; JUNG, W. K.; LEE, D. Y.; MOON, C.; YEA, S. S.; PARK, S. et al. Cilostazol protects mice against endotoxin shock and attenuates LPS-induced cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via MAPK inhibition and NF- $\kappa$ B inactivation: Not involved in cAMP mechanisms. **International immunopharmacology**, v. 10, n. 9, p. 1077-1085, 2010.

PERL, M.; LOMAS-NEIRA, J.; VENET, F.; CHUNG, C. S.; AYALA, A. Pathogenesis of indirect (secondary) acute lung injury. **Expert review of respiratory medicine**, v. 5, n. 1, p. 115-126, 2011.

POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F., GARRIDO, A. G., NAKAGAWA, N., SANNOMIYA, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v. 30, n. 7, p. 53-59, 2008.

POULSEN, J. B.; ANDERSEN, K. R.; KJAER, K. H.; VESTERGAARD, A. L.; JUSTESEN, J.; MARTENSEN, P. Characterization of human phosphodiesterase 12 and identification of a novel 2'-5' oligoadenylate nuclease—The ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1. **Biochimie**, v. 94, n. 5, p. 1098-1107, 2012.

REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB journal**, v. 22, n. 3, p. 659-661, 2008.

REDFORS, B.; BRAGADOTTIR, G.; SELLGREN, J.; SWÄRD, K.; RICKSTEN, S. E. Acute renal failure is NOT an “acute renal success”—a clinical study on the renal oxygen supply/demand relationship in acute kidney injury. **Critical care medicine**, v. 38, n. 8, p. 1695-1701, 2010.

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.

ROGERS, K. C.; OLIPHANT, C. S.; FINKS, S. W. Clinical efficacy and safety of cilostazol: a critical review of the literature. **Drugs**, v. 75, n. 4, p. 377-395, 2015.

ROMERO-BERMEJO, F. J.; RUIZ-BAILEN, M.; GIL-CEBRIAN, J.; HUERTOS-RANCHAL, M. J. Sepsis-induced cardiomyopathy. **Current cardiology reviews**, v. 7, n. 3, p. 163-183, 2011.

RUBENFELD, G. D.; CALDWELL, E.; PEABODY, E.; WEAVER, J.; MARTIN, D. P.; NEFF, M. et al. Incidence and outcomes of acute lung injury. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1685-1693, 2005.

SCHESCHOWITSCH, K.; DE MORAES, J. A.; SORDI, R.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. **Pharmacological research**, v. 100, p. 73-84, 2015.

SCHICK, M. A.; WUNDER, C.; WOLLBORN, J.; ROEWER, N.; WASCHKE, J.; GERMER, C. T.; SCHLEGEL, N. Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation. **The Journal of physiology**, v. 590, n. 11, p. 2693-2708, 2012

SCHLEGEL, N.; WASCHKE, J. cAMP with other signaling cues converges on Rac1 to stabilize the endothelial barrier—a signaling pathway compromised in inflammation. **Cell and tissue research**, v. 355, n. 3, p. 587-596, 2014.

SCHMITTINGER, C. A.; DÜNSER, M. W.; TORGERSEN, C.; LUCKNER, G.; LORENZ, I.; SCHMID, S. et al. Histologic pathologies of the myocardium in septic shock: a prospective observational study. **Shock**, v. 39, n. 4, p. 329-335, 2013.

SCHRIER, R. W.; WANG, W. Acute renal failure and sepsis. **New England Journal of Medicine**, v. 351, n. 2, p. 159-169, 2004.

SCHRÖR, K. The pharmacology of cilostazol. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v. 4, n. s2, 2002.

SEYMOUR, C. W.; LIU, V. X.; IWASHYNA, T. J.; BRUNKHORST, F. M.; REA, T. D.; SCHERAG, A. et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 762-774, 2016.

SHAKUR, Y.; HOLST, L. S.; LANDSTROM, T. R.; MOVSESIAN, M.; DEGERMAN, E.; MANGANIELLO, V. Regulation and function of the cyclic nucleotide phosphodiesterase (PDE3) gene family. 2000.

SHIH, C. C.; CHEN, S. J.; CHEN, A.; WU, J. Y.; LIAW, W. J.; WU, C. C. Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. **Critical care medicine**, v. 36, n. 6, p. 1864-1872, 2008.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M.; ANNANE, D.; BAUER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **Jama**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SORDI, R.; FERNANDES, D.; ASSREUY, J. Differential involvement of potassium channel subtypes in early and late sepsis-induced hyporesponsiveness to vasoconstrictors. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 184-189, 2010.

SPRONK, P. E.; INCE, C.; GARDIEN, M. J.; MATHURA, K. R.; OUDEMANS-VAN STRAATEN, H. M.; ZANDSTRA, D. F. Nitroglycerin in septic shock after intravascular volume resuscitation. **The Lancet**, v. 360, n. 9343, p. 1395-1396, 2002.

SURAPISITCHAT, J.; BEAVO, J. A. Regulation of endothelial barrier function by cyclic nucleotides: the role of phosphodiesterases. In: **Phosphodiesterases as Drug Targets**. Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 193-210.

SUZUKI, Kunihiro et al. Cilostazol activates AMP-activated protein kinase and restores endothelial function in diabetes. **American journal of hypertension**, v. 21, n. 4, p. 451-457, 2008.

TAKEUCHI, O; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805-820, 2010.

TANIGUCHI, L. U.; BIERRENBACH, A. L.; TOSCANO, C. M.; SCHETTINO, G. P.; AZEVEDO, L. C. Sepsis-related deaths in Brazil: an analysis of the national mortality registry from 2002 to 2010. **Critical Care**, v. 18, n. 6, p. 1, 2014.

TAVARES, E.; MALDONADO, R.; MIÑANO, F. J. Immunoneutralization of endogenous aminoprocaltitonin attenuates sepsis-induced acute lung injury and mortality in rats. **The American journal of pathology**, v. 184, n. 11, p. 3069-3083, 2014.

TRZECIAK, S., DELLINGER, R. P., PARRILLO, J. E., GUGLIELMI, M., BAJAJ, J., ABATE, N. L. et al. Early microcirculatory perfusion derangements in patients with



severe sepsis and septic shock: relationship to hemodynamics, oxygen transport, and survival. **Annals of emergency medicine**, v. 49, n. 1, p. 88-98. e2, 2007.

TSAO, C. M.; HUANG, H. C.; CHEN, Z. F.; LIAW, W. J.; LUE, W. M.; CHEN, A. et al. Beneficial effects of hyperoncotic albumin on liver injury and survival in peritonitis-induced sepsis rats. **Shock**, v. 35, n. 2, p. 210-216, 2011.

VAN DER POLL, T., VAN DE VEERDONK, F. L., SCICLUNA, B. P., & NETEA, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, 2017.

VARPULA, M.; TALLGREN, M.; SAUKKONEN, K.; VOIPIO-PULKKI, L. M. PETTILÄ, V. Hemodynamic variables related to outcome in septic shock. **Intensive care medicine**, v. 31, n. 8, p. 1066-1071, 2005.

VERMA, S. K.; MOLITORIS, B. A. Renal endothelial injury and microvascular dysfunction in acute kidney injury. In: **Seminars in nephrology**. v. 35, n. 1, p. 96-107, 2015.

VINCENT, J. L.; DE BACKER, D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. **Critical care**, v. 9, n. 4, p. S9, 2005.

VINCENT, J. L.; GRIS, P.; COFFERNILS, M.; LEON, M.; PINSKY, M.; REUSE, C.; KAHN, R. J. Myocardial depression characterizes the fatal course of septic shock. **Surgery**, v. 111, n. 6, p. 660-667, 1992.

WASHYNA, T. J.; ELY, E. W.; SMITH, D. M.; LANGA, K. M. Long-term cognitive impairment and functional disability among survivors of severe sepsis. **Jama**, v. 304, n. 16, p. 1787-1794, 2010.

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.

WILLIAMS, D. L.; HA, T.; LI, C.; KALBFLEISCH, J. H.; SCHWEITZER, J.; VOGT, W. et al. Modulation of tissue Toll-like receptor 2 and 4 during the early phases of polymicrobial sepsis correlates with mortality. **Critical care medicine**, v. 31, n. 6, p. 1808-1818, 2003.

WU, B. G.; PENG, T. C.; TSAI, P. S.; WANG, T. Y.; JENG, M. J.; HUANG, C. J. High-lipid enteral nutrition could partially mitigate inflammation but not lung injury in hemorrhagic shock rats. **journal of surgical research**, v. 184, n. 2, p. 997-1005, 2013.

ZACCOLO, M.; MOVSESIAN, M. A. cAMP and cGMP signaling cross-talk. **Circulation research**, v. 100, n. 11, p. 1569-1578, 2007.

ZHANG, G.; GHOSH, S. Toll-like receptor-mediated NF- $\kappa$ B activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 1, p. 13-19, 2001.

ZOU, L.; FENG, Y.; CHEN, Y. J.; SI, R.; SHEN, S.; ZHOU, Q. et al. Toll-like receptor 2 plays a critical role in cardiac dysfunction during polymicrobial sepsis. **Critical care medicine**, v. 38, n. 5, p. 1335, 2010.