HERMES VIEIRA BARBEIRO

Avaliação temporal da regulação do tônus vascular e da
produção de superóxido induzido por purinas em aorta
isolada de ratos Wistar endotoxêmicos

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Fisiopatologia Experimental
da Faculdade de Medicina da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiopatologia
Experimental

Orientador: Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo
2005

Aos meus verdadeiros e eternos Mestres: Quito e Dinha, que são, em minha vida, muito mais do que Francisco e Maria a me ensinarem a ser o que sou.

Augustinho, Baixinha, Cy, Gui, Heldão, Heldinho, Le, Lídia, Maricota, Mi, Nê, Preta, Zé e Zé os quais sempre demonstram, com seus exemplos, como diferenciar o certo do errado.

Davi, Daniel, Danúbio, Eunice, Jú, Mara e Tucão,
causa e efeito de bons ensinamentos de vida.

Às duas preciosidades que o Grande Arquiteto do Universo colocou em minha vida: Carolina e Denise. Meus grandes amores que me mostram, a cada dia, a deliciosa alegria de viver.

Agradecimentos

Ao Dr. Irineu Tadeu Velasco e ao Dr. Heraldo Possolo de Souza pela acolhida e oportunidade da realização desta Tese no LIM 51.

Ao meu sábio orientador Dr. Francisco Garcia Soriano que se mostrou um verdadeiro mestre no desafio de me orientar. A possibilidade de aprender com sua dedicação, simplicidade e cumplicidade é enobrecedora e sou eternamente grato por tudo isso.

Aos amigos do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, pelo carinho e ensinamento essencial em minha formação.

Aos amigos Fátima, Geraldo, Kelli, Suely e Vera, pela alegria, amizade e companheirismo.

Aos companheiros pós graduandos do LIM 51.

Aos amigos que colaboraram direta ou indiretamente para a realização desta Tese.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Resumo

Summary

INTRODUÇÃO	1
Importância biológica da célula endotelial	2
Óxido Nítrico e Nitrato	4
Óxido Nítrico e stress oxidativo	4
Óxido Nítrico e COX2.....	7
Célula endotelial e purinas.....	8
Importância biológica dos receptores purinérgicos	9
Classificação dos receptores purinérgicos	10
Receptores P2 no vaso sanguíneo.....	11
Choque séptico / LPS	12
Receptores <i>TOLL</i>	14
TLR2.....	15
TLR4	16
Comportamento e LPS	17
Lesão de múltiplos órgãos e sistemas	18
OBJETIVOS	21
MATERIAIS E MÉTODOS	22
Animais/Anestesia:	23
Indução de endotoxemia:	23
Grupo Endotoxêmico:	23
Grupo Controle:.....	24
Tempo de estudo:.....	24
Comportamento:	24
Histologia pulmonar:	25
Hematoxilina e Eosina:	26
Imunohistoquímica para COX-2:	26
Coloração específica para Colágeno Total:	27
Quantificação de expressão gênica para TLR4, TLR2 e iNOS.....	28
Extração de RNA	28
Amplificação de iNOS, TLR2 e TLR4 por RT PCR	29
Quantificação de Superóxido:.....	31
Quantificação de nitrato.....	32
Reatividade vascular da aorta:.....	33
Análise estatística:	33
Resultados	36
Caracterização do modelo experimental de endotoxemia:	36
Alterações pulmonares decorrentes da endotoxemia:	37
Histologia	39
Hematoxilina e Eosina	40
Colágeno total	41
COX-2	43
Expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 no pulmão	45

Alterações na aorta torácica decorrentes da endotoxemia	46
Expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 na aorta isolada	47
Quantificação de superóxido e modulação pelo ATP:.....	48
Participação da Cicloxigenase e Óxido Nítrico na quantificação de superóxido em aortas isoladas	49
Quantificação de Nitrato:	Erro! Indicador não definido.
Reatividade Vascular:.....	51
Modulação purinérgica na resposta a agentes vasoativos conhecidos:.....	51
ATP e ADP 8, 16 e 24 horas após indução de endotoxemia:	53
Participação da via da COX e NO no relaxamento promovido pelo ATP e ADP:	55
<i>Discussão</i>.....	58
Endotélio	64
LPS e quadro clínico:	58
Perda de peso, ciclo circadiano e mortalidade	58
Pulmão e aorta	60
COX2.....	60
Expressão de mRNA para iNOS, TLR2 e TLR4 em pulmão e aorta	61
Superóxido.....	63
Purinérgicos e reatividade vascular	65
<i>Conclusões</i>	71
<i>Referências bibliográficas</i>.....	73

Lista de abreviaturas

Ach	Acetilcolina
ADP	Difosfato de adenosina
ATP	Trifosfato de adenosina
BSA	Soro de albumina bovina
CD14	Proteína de membrana ancorada ao glycosyl-phosphatidylinositol
COX	Cicloxigenase
COX1	Cicloxigenase constitutiva
COX2	Cicloxigenase induzível
DNA	Ácido desoxiribonucleico
ECAM	Molécula de adesão da célula endotelial
EDHF	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
EDRF	Fator relaxante derivado do endotélio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FMOS	Falência de múltiplos órgãos e sistemas
GTP	Trifosfato de guanidina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina
ICAM	Molécula de adesão intercelular
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
KCl	Cloreto de potássio
K _m	Constante de Michaelis-Menten

LBP	Proteína ligante de LPS
LPS	Lipopolissacarídeo
LNAME	N ^ω -nitro-L-arginina metil éster
MD2	Proteína acessória extra célula
MODS	Síndrome da disfunção múltipla de órgãos
MOF	Falência múltipla de órgãos
rmRNA	Ácido reboxiribonucleico mensageiro
NAD	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo - reduzida
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NANC	Não aderenérgico não colinérgico
NE	Noradrenalina
NFKB	Fator de transcrição nuclear B
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
ONOO ⁻	Peroxinitrito
P1	Receptor purinérgico do tipo 1
P2	Receptor purinérgico do tipo 2
PAMP	Padrões moleculares associados ao patógeno
PARP	Poli (ADP-ribose) polimerase
PBS	Tampão fosfato salina
PCR	Reação em cadeia polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂

PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGI ₂	Prostaciclina I ₂
TLR	Receptores do tipo <i>Toll</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UDP	Difosfato de uracil
UTP	Trifosfato de uracil
VCAM	Molécula de adesão vascular

RESUMO

Barbeiro, H. V. Avaliação temporal da regulação do tônus vascular e da produção de superóxido induzido por purinas em aorta isolada de ratos Wistar endotoxêmicos. São Paulo, 2005. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Pacientes infectados que podem evoluir para sepse ocupam por volta de 25% dos leitos de UTI, com taxa de mortalidade próxima de 20%. Estes pacientes podem evoluir para sepse grave elevando-se assim a taxa de mortalidade para 40%, esta taxa pode subir para 60% se estes pacientes evoluírem para choque séptico. Entender as bases fisiológicas da endotoxemia é fundamental para o auxílio no tratamento destes pacientes. Neste estudo foi observado, após a indução de endotoxemia, alterações comportamentais, pulmonares pelo aumento de colágeno e aumento da expressão gênica (iNOS, TLR4 e TLR2) em pulmão e aorta. A resposta vasodilatadora ao ATP e ADP foi estudada, em anéis isolados de aortas pré contraídas com noradrenalina ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) de animais submetidos a injeção de LPS (10mg/kg i.p.) por 8, 16 ou 24 horas. Observamos diferença na resposta vasodilatadora nos animais injetados por 16 horas (G16), com maior relaxamento para o ATP e maior sensibilidade ao ADP; diferenças estas não observadas nos períodos de 8 e 24 horas. Avaliamos também a quantificação de superóxido (O_2^-) nos três períodos estudados e encontramos picos de quantificação no G16 modulada pelo ATP e este efeito não foi observado nos grupos de 8 e 24 horas. Em função das diferenças observadas no G16 avaliamos, tanto em animais controles (GC) quanto no G16, a participação dos derivados da síntese de óxido nítrico (NO) e participação da via da cicloxigenase (COX) na quantificação de O_2^- e na reatividade vascular modulada por purinérgicos (ATP/ADP). A presença de LNAME (inibidor da síntese de NO) aboliu a resposta vasodilatadora do ATP e do ADP nos dois grupos. A indometacina aumenta a sensibilidade no GC tanto para ATP quanto para ADP. No G16 não observamos diferença de sensibilidade ao ATP e observamos uma inversão na sensibilidade ao ADP. Na

quantificação de O_2^- não observamos modulação pelo ATP e ADP no GC. No G16 não foi observada modulação pela indometacina. Ao adicionarmos ATP na presença de indometacina observamos diminuição dos níveis de O_2^- e esta diminuição não foi observada ao adicionarmos ADP. A presença de LNAME diminuiu a quantificação de O_2^- e ao adicionarmos ATP ou ADP não observamos modificação nos níveis de O_2^- , a qual permaneceu diminuída quando comparada com os níveis basais. Na aorta isolada de animais endotoxêmicos tanto o ATP quanto o ADP mantém a produção de NO, mas só o ATP reduz a produção de O_2^- , possivelmente pelo reacoplamento da NOS causado pelo ATP, diminuindo a quantidade de O_2^- e aumentando a biodisponibilidade de NO.

SUMMARY

Barbeiro, H. V. Analysis of purinergic modulation of vascular reactivity and superoxide production in aorta from endotoxemic rats. São Paulo, 2005. Tese (doutorado). Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Even the most simple infection may reach sepsis. The relevance of sepsis is shown by the epidemiologic data of incidence and mortality. Sepsis represents 25% of ICU patients, and present 20% mortality, there are two more severe grades of sepsis. Studies with severe sepsis shown a mortality of 40%, and septic shock has 60% of mortality. The understanding of pathophysiology is important to improve septic support and treatment. Our study demonstrated behaviour changes, increased collagen in tissue lung, and also gene expression of iNOS, TLR4 and TLR2 increased in aorta and lung. Aortic rings from animals infected with 10mg/kg i.p. of LPS, were used to study ATP and ADP effect. A time course were realized for the times points 8, 16 and 24 hours. The aortic rings were pre contracted with 10^{-7} M noradrenaline, and the purinergic compounds produced vasodilation in all periods. However, the group studied after 16 hours of LPS injection (G16) showed higher ATP relaxation and higher ADP sensitivity, not seen in 8 and 24 hours. Superoxide production presented the highest values in G16, and ATP was able to reduce superoxide release. G16 showed also the highest NO production by endotoxemic aorta. These data shown that at 16 hours after LPS injection there are the highest oxidative stress level and aortic dysfunction. Our following experiments were designed to analyse the role of nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase (COX) in the purinergic action on vascular reactivity and superoxide production. The NOS inhibitor (LNAME) blocked completely the ATP and ADP vasodilation. On the other hand, indomethacin a COX inhibitor when added to the bath produced an increase sensitivity to ATP and ADP in control group (GC). However, in G16 indomethacin did not change ATP sensitivity, and for ADP there was a inversion of pattern compared to GC. Indomethacin did not change superoxide production in endotoxemic aorta, and did not block ATP effect. LNAME reduced superoxide release to the same levels with or without ATP/ADP. ATP/ADP produced vasodilation in endotoxemic aorta by NO

release, and ATP was able to reduce superoxide production. Our hypothesis is: ATP re-couples endotoxemic NOS function with consequent reduction of superoxide release and increase of NO bioavailability.

INTRODUÇÃO

Introdução

Importância biológica da célula endotelial

Tradicionalmente, o endotélio era considerado como um componente inerte nas paredes dos vasos sanguíneos. Nos últimos trinta anos, a importância funcional da célula endotelial tem sido mostrada na regulação da homeostase vascular (Russo *et al.*, 2002).

Nos mamíferos, o endotélio está presente em todos os tipos de vasos sanguíneos e portanto em todos os órgãos. Em um homem de 70 kg, constitui uma área de 1000 m² com 10¹² células e 100 gramas aproximadamente (Jaffe, 1987).

As células endoteliais tem papel multifuncional, elas regulam respostas imunes, controlam a coagulação sanguínea, servem como interface ajustando a permeabilidade entre sangue e tecido, contribuem na angiogênese e recuperação vascular e na modulação do tônus vascular. Estas diversas funções conferem às células endoteliais funções indispensáveis na homeostase corpórea tanto em condição normal quanto em algumas condições patológicas (Tran *et al.*, 2000). Estas observações deixam claro que as células endoteliais têm outras funções além de recobrir os vasos (Vane *et al.*, 1990).

Furchgott e Zawadski (Furchgott; Zawadzki, 1980) descobriram um potente vasodilatador em resposta a um agonista muscarínico em tiras de aorta com endotélio intacto. Eles chamaram esta substância de EDRF (Fator Relaxante Derivado do Endotélio). Sete anos depois, os grupos de Ignarro, Palmer e Murad junto com seus respectivos colaboradores (Ignarro *et al.*, 1987; Murad *et al.*, 1987; Palmer *et al.*, 1987) mostraram, em estudos independentes, que o EDRF e o Óxido Nítrico (NO) eram a mesma substância. Demonstrou-se

também que esta simples molécula, o NO, era sintetizada pelas células endoteliais através da L-arginina. Esta descoberta deflagrou uma verdadeira explosão de pesquisas sobre o papel do NO fisiológico e fisiopatológico nas mais diversas condições e órgãos.

O endotélio modula o tônus vascular através da síntese e liberação de substâncias vasoativas que promovem a vasoconstrição ou a vasodilatação, como a endotelina, o NO e o EDHF (Fator Hiperpolarizante Derivado do Endotélio). Esta modulação se dá ainda pela influência dos níveis de outras substâncias vasoativas circulantes como a bradicinina e angiotensina II. O tonus basal dos vasos é mantido pela contínua geração de baixos níveis de NO (Russo *et al.*, 2002).

Em resposta a vários estímulos, as células endoteliais podem alterar suas funções e mudar de anti-coagulante para pró-coagulante, ou iniciar síntese e liberação de fatores vasoativos, citocinas ou fator de crescimento (Di Virgilio; Solini, 2002).

Nos sítios inflamatórios o endotélio facilita a migração de leucócitos para o espaço extra-vascular guiando estes leucócitos através da monocamada endotelial. Na presença de endotoxina, o endotélio é ativado para expressar fatores mediadores da migração de leucócitos: o ICAM (Molécula de Adesão Inter-celular), VCAM-1 (Molécula de Adesão da Célula Vascular) e E-selectina (Russo *et al.*, 2002).

Choque séptico pode induzir modulações fenotípicas no endotélio através de diferentes mecanismos. Em alguns casos, o patógeno interfere diretamente nas células endoteliais (Aird, 2003).

Óxido Nítrico e Nitrato

Mudanças nos padrões de práticas agrícolas, como o processamento e a industrialização de comida, tem causado um acúmulo de nitratos/nitritos no meio ambiente. Bactérias presentes no solo, na água e na comida são capazes de utilizar os compostos de nitrogênio (usado em fertilizantes) para sintetizar nitratos (e nitritos) (Tannenbaum *et al.*, 1978). Nitratos e nitritos, usados em combinação com sal na preservação de carne para consumo, servem como importante agente microbicida para inibir o crescimento de bactérias causadoras do botulismo. Além disso, nitrito tem sido utilizado como um vasodilatador, ou um depressor circulatório para aliviar espasmos musculares. Estes compostos podem causar efeitos celulares adversos, mas o risco para a saúde pela exposição ao nitrito e nitrato ainda não está bem definido (Chow; Hong, 2002).

A habilidade do NO em reagir com complexos de ferro faz com que o citocromo P450 ative enzimas que tem como alvo a inibição do próprio NO e consequentemente pode haver uma retroalimentação (feedback) negativa na síntese de NO. O nitrato e o nitrito são produtos de oxidação do NO (Zweier *et al.*, 1999) e é bem conhecida a interação química entre antioxidantes e nitrito/nitrato (Chow; Hong, 2002).

Em mamíferos, o NO existe como um radical livre lipofílico ($\text{NO}^\cdot$) o qual é inativado pelo ânion superóxido ($\text{O}_2^\cdot$) próximo a superfície endotelial; esta reação pode levar a formação de nitrato inativo ou geração de peroxinitrito ($\text{ONOO}^\cdot$) o qual é extramamente mais destrutivo (Gryglewski *et al.*, 2001).

Óxido Nítrico e stress oxidativo

O macrófago desempenha um importante e indispensável papel na proteção dos organismos a diferentes patógenos e quando os macrófagos são

ativados por microrganismos patogênicos, estes aumentam a produção de NO e espécies reativas de oxigênio (ERO) (Maeng *et al.*, 2004).

O radical livre NO é formado pela oxidação de um átomo de nitrogênio guanidino da L-arginina pró NO mais L-citrulina, ou seja, a oxidação de um átomo de nitrogênio guanidino de L-arginina produz L-citrulina e NO. As enzimas que catalisam esta reação são chamadas de NO sintase (NOS). Há três diferentes isoformas de NOS em células de mamíferos: NOS endotelial (eNOS ou NOS III) encontrada na célula endotelial, célula epitelial e em miócito cardíaco; NOS neuronal (nNOS ou NOS I) encontrada em células neuronais e na musculatura esquelética; NOS induzível (iNOS ou NOS II) encontrada em macrófagos, hepatócitos, músculo liso e em vários outros tecidos (Titheradge, 1999). A eNOS e a nNOS, são enzimas expressas constitutivamente, sua ativação é dependente do aumento do Ca^{2+} intracelular. A eNOS está envolvida na regulação do tônus vascular enquanto a nNOS na neurotransmissão (Moncada *et al.*, 1991). A iNOS é funcionalmente independente de Ca^{2+} e normalmente não é expressa constitutivamente, sendo induzível a expressão em determinados eventos fisiopatológicos e está envolvida com a resposta imune (Nathan, 1992).

O NO tanto pode ser citotóxico quanto citoprotetor. Sobre condições fisiológicas ele provavelmente age como um importante “scavenger” de radicais livres, limitando o efeito citotóxico associado com radicais livres como o superóxido (Parratt, 1998).

Durante a sepse, a ativação do endotélio sofre mudanças em sítios específicos que gera impacto no balanço das propriedades vasoconstritora e vasodilatadora (Aird, 2003). Alterações na liberação de NO ou no mecanismo de relaxamento promovido pelo NO tem sido relacionado a piora da resposta

endotélio-dependente após exposição ao lipopolissacáride (LPS) (Hernanz *et al.*, 2004)

A disfunção endotelial está associada com a perda do NO bioativo liberado em resposta ao mediador Acetilcolina; seja por reduzir a formação ou por acelerar a degradação do NO. A degradação do NO também se dá pelo aumento ERO incluindo o O_2^- , o qual é considerado como um dos maiores responsáveis pela disfunção endotelial (Behrendt; Ganz, 2002).

O O_2^- têm se mostrado tóxico para várias moléculas de importância biológica. Acredita-se que lesões celulares mediadas por ERO podem estar associadas com a patogênese de várias doenças como infarto do miocárdio, inflamação, hipertrofia cardíaca, aterosclerose e disfunção endotelial no diabetes (Chen *et al.*, 2000).

Brandes e colaboradores (Brandes *et al.*, 1999) demonstraram o aumento da produção vascular de O_2^- causado pelo LPS em ratos. Javesghani e colaboradores (Javesghani *et al.*, 2003), além de demonstrar este aumento de produção O_2^- pelo LPS tanto em ratos quanto em porcos, também demonstrou que a produção O_2^- dependente de NADPH estava aumentada nestes animais.

Na última década se tornou claro que em tecidos vasculares em condições normais, ERO são geradas principalmente pela atividade de uma oxidase a qual cataliza a redução do oxigênio molecular para O_2^- , usando NADH ou NADPH como doador de elétrons (Griendling *et al.*, 2000), porém, a função fisiológica da NADPH oxidase ainda não está determinada (Souza *et al.*, 2003). O aumento do “stress” oxidativo nos vasos sanguíneos, resulta em uma piora da função endotelial (Wu *et al.*, 2004).

A literatura relata como causa de injúria de órgãos e perda do tônus vascular na sepse a produção aumentada de NO, em consequência de uma maior produção de iNOS. O NO em concentrações elevadas produz dano celular pela sua propriedade de espécie reativa e pela interação com o superóxido formando ONOO^- , um potente agente oxidante (Javesghani *et al.*, 2003). O ONOO^- é um forte agente oxidante o qual estimula o processo inflamatório pela ativação de fatores de transcrição como o NFkB (Cooke; Davidge, 2002) (Wu *et al.*, 2004). A decomposição do ONOO^- em nitrato é intimamente ligada com a oxidação química destas espécies reativas e ambas reações tem sido objeto de recentes investigações e intensos debates (Szabo, 2003).

Óxido Nítrico e COX2

A existência de duas diferentes isoenzimas de cicloxigenase (COX), COX1 e COX2, foi bem estabelecida por Frölich (Frolich, 1997). Assim como a iNOS, a COX2 também é induzível e exerce um importante papel na resposta inflamatória. A expressão de COX2 é potenciada em vários tecidos quando o sistema imune é estimulado ou quando é seguido por administração de LPS (Swiergiel; Dunn, 2002). A interação entre NO e COX2 já foi mostrada anteriormente por Bing e colaboradores (Bing *et al.*, 2001) e esta interação pode exacerbar o processo inflamatório através da geração adicional de mediadores pró-inflamatórios (Honda *et al.*, 2000).

A liberação de PGI_2 (metabólito da via da cicloxigenase) e de NO é feita ao mesmo tempo pelas células endoteliais, porém a interação entre estas duas vias ainda não é clara e tanto inibição quanto ativação da via da COX pelo NO já foram descritas (Gryglewski *et al.*, 2001). O aumento da produção de NO

pela iNOS e de ERO após exposição ao LPS podem ter papel relevante na resposta endotélio-dependente. No entanto, a função de outros fatores, como os metabólitos da COX2, cuja produção tem sido descrita como mediador de outros efeitos vasculares do LPS, ainda não está bem estudada (Hernanz *et al.*, 2004).

Quando liberado em pequenas quantidades, o NO diminui os níveis de PGE₂ e PGF_{2α} (produtos pró-inflamatórios). Assim, o NO possui propriedades tanto citoprotetora quanto citotóxica dependendo da quantidade e da isoforma de NOS que está sendo produzida (Alexander, 1998).

Célula endotelial e purinas

Entre as décadas de 20 e 70 foram demonstradas: 1- uma potente ação extracelular da adenina; 2- a liberação de trifosfato de adenosina (ATP) por terminais nervosos (Dunn *et al.*, 2001) e 3- que o ATP poderia ser um neurotransmissor liberado por terminações não adrenérgicas e não colinérgicas (NANC) no intestino (Burnstock *et al.*, 1970; Burnstock, 1972). Em 1992, Burnett e colaboradores (Burnett *et al.*, 1992) demonstraram que as terminações nervosas NANC incluíam mediadores não peptídicos como o NO e o ATP na regulação do tônus em certos leitos vasculares. Também em 1992, tanto Edwards (Edwards *et al.*, 1992) quanto Evans (Evans *et al.*, 1992) e seus respectivos colaboradores consideraram o ATP como um neurotransmissor em preparações vasculares. Em 1997, Rongen e colaboradores (Rongen *et al.*, 1997) salientaram que o ATP extracelular exerce um papel importante na agregação plaquetária e também no tonus vascular. Em 1998 Ralevic e colaboradores (Ralevic; Burnstock, 1998) relataram que na parede vascular o ATP é um mediador de vasodilatação que envolve mecanismos que podem

dependem ou não do endotélio vascular. Em 2000 Park e colaboradores (Park *et al.*, 2000) demonstraram o envolvimento de neurotransmissores NANC (ATP e NO) no relaxamento modulado pelo endotélio em aorta torácica de ratos e sugeriram ainda, que o NO não é liberado por terminações nervosas em si, mas sim pela interação entre o ATP liberado pelas terminações nervosas e o endotélio.

Importância biológica dos receptores purinérgicos

Apesar da maioria dos estudos com purinas terem sido realizados em mamíferos, também foi demonstrado a presença de receptores purinérgicos em vários outros organismos. Estes receptores são conhecidos em bactérias, musgos, plantas superiores, protozoários, anelídeo, moluscos, equinodermas, artrópodo e em todas as classes de vertebrados (Aird, 2002).

A ação biológica da adenosina e nucleotídeos de adenina foi investigada por mais de 70 anos e por muito tempo o progresso nesse campo foi pequeno. Dificuldades metodológicas, incluindo a falta de boas ferramentas farmacológicas podem explicar essas dificuldades (Pintor *et al.*, 2000).

O ATP é conhecido classicamente como fornecedor de energia para muitas reações enzimáticas nos seres vivos. Entretanto, esta substância também pode ser liberada na corrente sanguínea por células endoteliais, plaquetas e neurônios purinérgicos, produzindo efeitos de vasodilatação e agregação plaquetária (Pearson; Gordon, 1979; Gordon; Martin, 1983; Dawicki *et al.*, 1985; Pearson; Gordon, 1985; Cattaneo *et al.*, 1990; Borst; Schrader, 1991; Gorman *et al.*, 1991; Gorman *et al.*, 1992), mostrando assim, que os efeitos biológicos do ATP se dá pela ativação de receptores purinérgicos (Ralevic; Burnstock, 1998).

Classificação dos receptores purinérgicos

Das duas famílias de receptores conhecidas e aceitas, a adenosina e em alguns casos a inosina se ligam aos receptores do tipo P1 (todos acoplados a proteína G), enquanto que ATP, ADP, UTP e UDP se ligam aos receptores do tipo P2 (Ralevic; Burnstock, 1998). Os receptores P1 foram subdivididos em quatro subgrupos (A_1 , A_{2A} , A_{2B} e A_3); os receptores do tipo P2 foram subdivididos em P2X e P2Y, baseado em sua forma estrutural e nas evidências bioquímicas e ações farmacológicas (Burnstock; Kennedy, 1985). Os receptores P2Y compõem a superfamília de receptor acoplado a proteína G; deste grupo foram descritos os seguintes subtipos de P2Y: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆ e P2Y₁₁. Os receptores P2X produzem suas ações ligando-se a canais iônicos, os descritos até o momento são P2X₁₋₇ (Dunn *et al.*, 2001). O ATP ativa todos os tipos de receptores P2Y, contudo, outras substâncias purinérgicas como o ADP, UTP, UDP e GTP não apresentam o mesmo espectro de atividade. Os receptores P2Y são largamente distribuídos e tem sido reportados no coração, tecido vascular, tecido conectivo e tecido neural (Ralevic; Burnstock, 1998). Os estudos de De Mey e colaboradores (De Mey; Vanhoutte, 1981) mostraram que o ATP induz vasodilatação por ativação de receptores P2Y endoteliais; este efeito é produzido tanto pelo ATP liberado de terminações neuronais quanto pela administração intravenosa. O efeito de vasodilatação ao ATP também foi descrito em veia porta e artérias pulmonares (Liu *et al.*, 1992; Brizzolara *et al.*, 1993). Receptores P2Y são significativamente mais sensíveis ao ATP do que os receptores do tipo P2X (Dunn *et al.*, 2001). Purinorreceptores do tipo P2X localizados no músculo liso desencadeiam

vasoconstrição ao serem estimulados pelo ATP (Chapal; Loubatieres-Mariani, 1983; Burnstock; Kennedy, 1985).

Receptores P2 no vaso sanguíneo

Os principais subtipos de receptores purinérgicos P2 presentes no endotélio são P2Y₁ e P2Y₂, mas RNA mensageiro para P2Y₄ e P2Y₇ já foram identificados no endotélio (Jin *et al.*, 1998). Receptores do tipo P2X são expressos pela células endoteliais em níveis muito baixos e isso nos leva a crer que esta expressão precisa ser reavaliada em futuros estudos (Di Virgilio; Solini, 2002). Evidências funcionais sugerem que as células endoteliais expressam receptores P2X₇ (Goepfert *et al.*, 2000), enquanto estudos moleculares revelam a expressão de receptores P2X₄ (Korenaga *et al.*, 2001). Há vários relatos documentando a expressão, pela célula endotelial, de outros membros da família de receptores P2 (P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2X₁, P2X₂, P2X₃, P2X₅ e P2X₆) (Di Virgilio; Solini, 2002).

Células da musculatura lisa vascular expressam P2X₁, P2X₂, P2X₄, P2X₇, P2Y₂, P2Y₄ e P2Y₆ (Kunapuli; Daniel, 1998) e não há relato sobre a expressão de P2Y₁₁. Grande ênfase é dada aos receptores P2 presentes no endotélio e na musculatura lisa, mas a expressão de receptores P2 por fibroblastos, outro componente celular da parede do vaso, não pode ser esquecida, especialmente em condições patológicas e o resultado final da estimulação vascular de nucleotídeos de adenosina depende da interação das respostas individuais dos receptores P2Y e P2X em todos os elementos da parede vascular (Di Virgilio; Solini, 2002).

Choque séptico / LPS

O sistema imune inato é o maior responsável pelo mecanismo de defesa nos animais, ou seja, ele é responsável pela vigilância da invasão de patógenos através dos receptores para reconhecimento de padrões conservados evolutivamente, também conhecido como família de Receptores do Tipo Toll (TLR) (Nagy, 2003).

Está bem definido atualmente que o LPS que compõe a membrana externa da bactéria Gram-negativa, é o maior mediador das altas taxas de morbidade e mortalidade características do choque séptico por Gram-negativo. Administração experimental de endotoxina (LPS) em animais mimetiza os sintomas do choque séptico (Titheradge, 1999).

A sinalização por LPS envolve a interação de várias proteínas. LPS se liga a proteína ligante de LPS (LBP) e interage com o CD14 (proteína de membrana ancorada ao glycosyl-phosphatidylinositol) na parede do macrófago. Este complexo ativa receptores responsáveis pelo início da sinalização inflamatória. (TLR4) (Nagy, 2003).

Após a ativação pelo LPS, o fator de transcrição nuclear NF- κ B migra para o núcleo atingindo a região do DNA promotora, e ativando assim a produção de mRNA e posterior produção de proteínas envolvidas no processo inflamatório. Serão produzidas citocinas (TNF, IL-1, IL-12, IL-10, IL-8), proteínas de adesão celular (ICAM, VCAM), iNOS e COX2 dentre outras substâncias. O indivíduo que passa por todo este processo apresentará: febre, perda do apetite, pelos eriçados, redução de atividade física, hipotensão arterial, taquicardia, diarreia (sintomas da sepse). Este estado leva a agressão de múltiplos órgãos, dependendo da dose utilizada e da suscetibilidade de cada indivíduo.

Sepse é definida como a resposta sistêmica à infecção, a mais comum se dá pela contaminação sanguínea com bactéria (Bone, 1994). O desenvolvimento do choque resulta em uma progressiva falha do sistema circulatório em oferecer sangue e oxigênio para órgãos vitais do corpo prejudicando a oxigenação e a perfusão tecidual (Thiemermann, 1997). Os sintomas incluem queda severa da pressão sanguínea (hipotensão) com hiporeatividade a agentes vasoconstritores (vasoplegia) que pode causar disfunção ou falência de vários órgãos incluindo pulmões, fígado, rins e cérebro e por último a morte (Rackow; Astiz, 1991; Kilbourn et al., 1997).

Pacientes sépticos apresentam um estado hiperdinâmico caracterizado por taquicardia, alto débito cardíaco, baixa resistência vascular sistêmica, hipoxemia, oliguria e acidose láctica (Kilbourn *et al.*, 1997; Thiemermann, 1997). Seguindo a infecção há um aumento na concentração circulante de catecolaminas, cortisol e glucagon (Rackow; Astiz, 1991) resultando em taquicardia e vasoconstrição periférica (Titheradge, 1999). Esta fase é seguida por uma progressiva vasodilatação associada com alto débito cardíaco e diminuição da resistência vascular e vasoplegia em alguns casos. Subsequente a isso, pode se desenvolver dano cardíaco com um progressivo comprometimento no débito cardíaco e ocorre inadequada perfusão e oxigenação tecidual (Thiemermann, 1997).

A disfunção vascular durante a sepsé representa 75% dos casos de óbito, devido ao choque severo não responsivo a drogas vasoativas ou pelo desenvolvimento de MOPS (Falência de Múltiplo Órgãos e Sistemas). O aumento das concentrações de interleucina 6 e interleucina 10 (IL-6 e IL-10), estão associadas com a mortalidade de pacientes com sepsé, mas a elevação

destas interleucinas não pode ser usada isoladamente para o prognóstico de mortalidade (Simpson *et al.*, 2000).

Receptores *TOLL*

O termo *TOLL* foi originalmente descrito se referindo ao receptor de superfície celular para orientação dorso/ventral em larva de *Drosophila* (Stein *et al.*, 1991). Em *Drosophila* o receptor TOLL mostrou-se importante na proteção contra infecção de fungos. O sequenciamento do genoma da *Drosophila* revelou a existência de nove receptores da família *TOLL* (Tauszig *et al.*, 2000). Na década de 90 foram identificadas as primeiras proteínas de mamífero relacionadas estruturalmente com o *TOLL* de *Drosophila* e foram chamadas de receptores do tipo *TOLL* (TLR) 1 e 4 (Medzhitov *et al.*, 1997). TOLL e a família de proteínas TLR são caracterizadas pela presença de um domínio extracelular rico em leucina e uma região intracitoplasmática contendo um receptor *TOLL*/interleucina-1, importante na sinalização tanto para TLR de *Drosophila* quanto para TLR de mamíferos, indicando que eles tem componentes de sinalização homólogos. Na verdade, para cada degrau de sinalização encontrado para *Drosophila*, tem sido descrito um sistema homólogo para mamíferos (Horng; Medzhitov, 2001).

Bactérias e fungos possuem elementos específicos que são reconhecidos pelas células do sistema imune como padrões moleculares associados ao patógeno. Recentes estudos mostram que o TLR reconhece estes padrões moleculares associados ao patógeno (Kelley *et al.*, 2003).

O sistema imune é responsável pela rápida resposta inicial do organismo para potenciais perigos, incluindo patógenos e injúria tecidual. Dos receptores

da família TLR provém a primeira linha de defesa do organismo contra possíveis infecções. A ativação destes receptores resulta em um estímulo específico para a expressão de genes que são solicitados para o controle da infecção, incluindo a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias, seguido do recrutamento de neutrófilo para o local de infecção (Nagy, 2003).

Dos 10 membros da família de TLR descritos (TLR 1-10), potenciais ligantes também tem sido identificados para estes receptores (Akira, 2003) e somente TLR2 e TLR4 tem implicações na sinalização por LPS (Vodovotz *et al.*, 2001).

TLR2

Bactéria Gram-positiva pode provocar respostas imunes similares à resposta gerada pelo LPS. De acordo com alguns autores, a habilidade do TLR2 de interagir com uma variedade de ligantes é baseado na habilidade de formar heterodímeros com outros TLR, principalmente o TLR6 e o TLR1 (Takeuchi *et al.*, 2001). Então TLR2 parece aumentar seu repertório de especificidades pela formação, ao menos, de dois tipos de heterodímeros funcionais com outros TLR (Werling; Jungi, 2003). Takeuchi e colaboradores (Takeuchi *et al.*, 1999) sugerem que o TLR2 não está associado com o LPS, por outro lado, também mostram que LPS de *Leptospira interrogans* e de *Porphyromonas gingivalis*, os quais são estruturalmente diferentes do LPS de enterobactérias, tem ativado células através do TLR2. Também tem sido demonstrado que o TLR2 está envolvido na resposta para lipoproteínas/lipopeptídeos de *Mycobacterium tuberculosis*, bactéria Gram-negativa, *Borrelia burgdorferi* e *Mycoplasma fermentans* dentre outras (Akira; Hemmi, 2003). Os resultados obtidos por pesquisadores independentes são

contraditórios, mostrando que a verdadeira função do TLR2 ainda não está bem estabelecida.

Vodovotz e colaboradores (Vodovotz *et al.*, 2001), descrevem um aumento da expressão gênica para TLR2 em ratos injetados com LPS, maiores níveis foram encontrados em fígado, seguido de pulmão e baço. Descrevem ainda que em hepatócitos, as citocinas produzidas em resposta ao LPS, seguido por um aumento de expressão de TLR4, podem regular a expressão de TLR2, potenciando a resposta de infecção pelo aumento da sensibilidade para estímulos Gram-positivo.

TLR4

O LPS provoca uma grande variedade de respostas immunoestimulatórias, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL1 β , TNF α , IL-12 e substâncias inflamatórias efetoras como o NO. CD14 expresso por fagócito mononuclear foi demonstrado ligar-se ao LPS, mas a ausência de uma porção intracitoplasmática no CD14, sugere que este ligante não tem capacidade de iniciar a transdução de sinal e que outras proteínas de membranas podem ser essenciais para a sinalização por LPS em fagócitos mononucleares (Ingalls *et al.*, 1999). Em 1998, Poltorak e colaboradores (Poltorak *et al.*, 1998) mostraram que a sinalização pelo LPS é transmitida pelo TLR4. O padrão molecular associado ao patógeno melhor estudado é o do LPS, o maior componente da membrana externa de bactérias Gram-negativas. O complexo receptor de LPS consiste de CD14, TLR4 e MD-2. Como estas moléculas interagem com LPS ainda é desconhecido (Werling; Jungi, 2003).

Comportamento e LPS

A sucessão periódica de noite e dia tem influenciado a vida no planeta Terra durante milhões de anos; alguns organismos “internalizaram” estas mudanças periódicas na forma de um relógio circadiano. A principal função é organizar os processos bioquímicos, fisiológicos e comportamental ao longo do ciclo circadiano, otimizando, deste modo, a performance do organismo na antecipação das mudanças de condições do meio ambiente (Holzberg; Albrecht, 2003).

Algumas funções biológicas se repetem em ciclos de aproximadamente 24 horas durante toda a vida. O racional para esta organização circadiana é manter o equilíbrio em resposta às mudanças do meio ambiente. Este mecanismo gera sinais endógenos que agem nas células dos sistemas fisiológicos dos organismos para que estes possam se adaptar frente às possíveis alterações do meio ambiente (Moore-Ede, 1986).

Assim como o meio ambiente pode alterar o ritmo biológico dos seres vivos, alterações metabólicas nos indivíduos também podem desorganizar este ritmo. O comportamento tanto de humanos quanto de várias espécies animais mudam drasticamente quando se tem alguma infecção. O comportamento da infecção tem as respostas fisiológicas bem estabelecidas e documentada em todas as espécies de animais estudadas (Kelley *et al.*, 2003).

A administração de LPS em roedores induz hipofagia, perda de peso e hipolocomoção; sintomas coletivamente relacionados a “doenças de comportamento” (Connor *et al.*, 2002).

O aumento de interleucina 1 β , citocina envolvida em processos inflamatórios, causa substancial diferenças no comportamento, incluindo diminuição na procura por comida (McCarthy *et al.*, 1986). Swiergiel e

colaboradores (Swiergiel; Dunn, 2002) relacionaram a alteração pela procura por comida com o aumento da síntese de COX2 e consequentemente uma maior produção das citocinas.

A organização circadiana dos organismos vivos é estabelecida como sendo um componente chave da atividade neuro-endócrina do sistema imune o qual mantém a homeostase (Chacon *et al.*, 2002).

Há evidências suficientes para aceitar o conceito de que a liberação de citocinas é interpretada pelo cérebro como um sinal molecular de inflamação. Várias patologias podem atualmente ser consideradas como uma motivação, ou seja, uma mobilização central organiza a percepção e ação em face de uma ameaça representada por patógenos infecciosos (Dantzer, 2001).

Muitos estudos tem sido feitos sobre diferentes drogas e reatividade vascular na sepse, mas apesar das substâncias purinérgicas serem endógenas com ações anti inflamatórias e vasculares comprovadas, não há estudos sobre o seu papel na regulação do tonus vascular durante o evento enotóxico (Garcia Soriano *et al.*, 2001).

Lesão de múltiplos órgãos e sistemas

Trauma severo, hemorragia e queimadura podem iniciar uma cascata de eventos levando a complicações sépticas, incluindo Síndrome de Disfunção Múltiplas de Órgãos (MODS) ou Falência Multipla de Órgãos (MOF). Em pacientes com politrauma, alguns fatores relacionados com bactéria (exacerbação da inflamação, hipoxia de tecido e toxinas por exemplo) podem estar presentes e induzir uma resposta inflamatória local e sistêmica (Yao *et al.*, 1998).

Choque endotóxico está associado com hipotensão, diminuição da resistência vascular periférica e injúria do endotélio (Suffredini et al., 1989). Uma das consequências da endotoxina é a excessiva produção de radicais livres derivados do oxigênio pela ativação de neutrófilos (Can et al., 2003). Estes fatores contribuem na instalação e manutenção do processo inflamatório.

Alterações funcionais e morfológicas das células endoteliais desempenham papel importante nos distúrbios da circulação. Clinicamente, a endotoxemia encontrada frequentemente em várias patologias é considerada causadora de desordens na microcirculação resultando em MOF e isto é característico dos estágios finais de doenças sistêmicas severas (Oda et al., 2000).

OBJETIVOS

Objetivo principal

- Estudar o efeito do ATP e do ADP na produção de O_2^- e na reatividade vascular da aorta isolada de ratos endotoxêmicos.

Objetivos secundários

- Avaliar o comportamento e a efetividade da indução de endotoxemia no modelo proposto;
- Avaliar dano a órgãos: pulmão e aorta;
- Avaliar a participação da via da cicloxigenase na ação dos purinérgicos sobre a reatividade vascular e sobre a quantificação de O_2^- ;
- Avaliar a participação da síntese do óxido nítrico na ação dos purinérgicos sobre a reatividade vascular e sobre a quantificação de O_2^- ;

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e Métodos

O protocolo experimental deste estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Foi utilizado análise de Variância (ANOVA) ou teste “t” de student quando pertinente e foi considerado como diferença significativa os grupos que obtiverem $p < 0,05$.

Após o uso nos experimentos, os animais foram congelados e encaminhados para descarte de acordo com as normas utilizadas pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para descarte de lixo biológico.

Animais/Anestesia:

Ratos Wistar adultos de $259,65 \pm 1,72$ g foram obtidos do Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e mantidos em gaiolas (30 cm x 40 cm) no Biotério de Experimentação da Disciplina de Reumatologia – Departamento de Clínica Médica com água e ração “ad libidum” e em temperatura ambiente controlada entre $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de hidrato de cloral 10% (2,94 mL/1000g de peso) (de Carvalho *et al.*, 1990; Nigro *et al.*, 1997).

Indução de endotoxemia:

Grupo Endotoxêmico:

Injeção intra-peritoneal (i.p.) de Lipopolysaccharide (de *Escherichia coli* - Serotype 026:B6/Sigma) na dose de 10mg/kg (Kim *et al.*, 1997).

Grupo Controle:

Injeção intra-peritoneal de solução fisiológica 0.9% na dose de 2,94 mL/1000g.

Tempo de estudo:

Os ensaios foram realizados em 8, 16 ou 24 horas após a injeção intraperitoneal de LPS/salina. Os animais foram pesados antes da injeção de LPS/salina e após 8, 16 ou 24 horas para verificação da possível diferenciação de peso.

Comportamento:

Após anestesia com éter, foi realizado uma laparotomia (3 cm) para implantação intraperitoneal de um transmissor esterilizado E-Mitter (Mini Metter®). Após a cirurgia o rato foi colocado em uma gaiola especial dotada de roda para exercício físico espontâneo e comedouro especial para ração em pó; este animal permaneceu nesta gaiola se adaptando por um período de 5 dias. Através deste transmissor, foi possível monitorar as variações da temperatura interna, onde avaliamos a área representada pelo gráfico da média da temperatura obtida a cada minuto e avaliamos também a movimentação espontânea dos animais pela soma obtida por minuto, pois a caixa é colocada em cima de um receptor que capta os sinais enviados pelo transmissor; além destes parâmetros, foi possível monitorar a soma de vezes por minuto que o animal procura por comida, esta medida é efetuada através de um dispositivo controlado por infravermelho instalado no comedouro, o qual detecta a

presença, sempre que o animal procura por alimento; através de um sistema de imã instalado na roda (RUNNING WHEEL) quantificamos o uso da mesma para exercício físico não estimulado pela soma de vezes por minuto que este imã era acionado. Após o período de adaptação, começou a aquisição de dados no início do período claro (7:00h) e se estendeu por um período de dois dias, estes dados serviram como medida basal (ou período de estabilização) e após este período, sem parar a aquisição, foi injetado LPS 10mg/kg i.p. (7:00h) com a permanência da aquisição contínua por mais 36 horas, onde analisamos as variações dos parâmetros previamente descritos, nos períodos de 8, 16 e 24 horas após a injeção de LPS quando comparados com os respectivos períodos de estabilização.

Histologia pulmonar:

Os animais anestesiados foram entubados e submetidos a uma pressão positiva nas vias aéreas de 5cm de água. Após toracotomia foi realizada a retirada dos pulmões inflados, os quais foram fixados em formol 10% para posterior processamento em parafina.

As lâminas de hematoxilina/eosina (H.E.), as lâminas de imunohistoquímica para COX-2 e as lâminas coradas com Picrossírius foram analisadas por um sistema de análise de imagens (Quantimet 520 –Leica).

Tanto para a quantificação de núcleos (H.E.) quanto para a quantificação da expressão de COX-2 (imunohistoquímica), as contagens foram normalizadas pela área do parênquima em uma área de 59.632,07 μm^2 , enquanto que nas lâminas coradas com Picrossírius para contagem do colágeno total, as contagens foram normalizadas pela medida do septo em

estudo. Em todos os animais foram realizadas contagens em 10 campos aleatórios por lâmina.

Hematoxilina e Eosina:

Cortes seriados de parafina (5 µm) foram desparafinados em xilol, na sequência o tecido foi hidratado com banhos sucessivos de álcool (absoluto, 95° e 70°) seguido de um banho com água corrente. O tecido foi incubado com Hematoxilina de Harris durante 6 minutos para coloração de núcleos e lavado com água corrente; em seguida foi submetido a um banho de diferenciador (HCl 1%), um banho de água corrente e um banho de água amoniacal (Hidróxido de Amônia 1%), seguido de lavagem com água corrente. Nova desidratação com álcool 95° foi realizada antes da incubação por 35 segundos com uma solução de Eosina + Floxina (composição em mL/L: eosina 1% 111,73; floxina 1% 11,17; álcool 95° 871,51; ácido acético Glacial 5,59), seguido de banhos sucessivos de álcool 95° (duas vezes) e álcool absoluto (quatro vezes). Para finalizar, o tecido passa por uma última lavagem com xilol (três vezes) e o tecido é montado em uma lâmina com resina sintética Entellan® (Merck) para fixação da lamínula.

Imunohistoquímica para COX-2:

Cortes seriados de parafina (5 µm) foram desparafinados em xilol, na sequência o tecido foi hidratado com banhos sucessivos de álcool (absoluto, 95° e 70°) seguido de banho com água corrente e banho com água deionizada. O bloqueio de peróxido endógeno foi efetuado banhos em uma solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 10 Vol.) durante 5 minutos seguido de banho com

água corrente, banho com água deionizada e banho com Tampão Fosfato Salino (PBS). A recuperação antigênica foi realizada com solução de citrato de sódio 10mM, pH 6,0 em alta temperatura (panela a vapor) por 40 minutos; após resfriamento com banhos de água fria os cortes foram lavados com PBS por 5 minutos e incubados com leite desnatado 2% por 30 minutos para bloquear as reações inespecíficas. A incubação foi realizada durante a noite em geladeira com o anticorpo primário para COX-2 (C20 Santa Cruz) previamente diluído em albumina bovina (BSA) seguido por banho com PBS por 5 minutos. Os cortes foram incubados em câmara úmida durante 45 minutos a 37 °C com anticorpo secundário biotinilado (kit Dako LSAB+), seguido por banho com PBS por 5 minutos. Em seguida os cortes foram colocados em solução de cromógeno (70mg de DAB para 70mL de PBS com 4 mL de H₂O₂ 10 Vol.) por 3 minutos para a revelação, seguido de banho em água corrente por 5 minutos. Foi utilizado banho por 30 segundos em Hematoxilina de Harris para contra corar seguido de banho em água corrente por 5 minutos. Para finalizar, o tecido passa por banhos sucessivos de álcool (70°, 95° e álcool absoluto) e por uma última lavagem com xilol, o tecido é então montado em uma lâmina com resina sintética Entellan[®] (Merck) para fixação da lamínula.

Coloração específica para Colágeno Total:

A densidade de colágeno foi calculada a partir de espécimes coradas pelo método Pricrosírius. Cortes seriados de parafina (5 µm) foram desparafinados em xilol, na sequência o tecido foi hidratado com banhos sucessivos de álcool (absoluto, 95° e 70°) seguido de banho com água corrente e banho com água deionizada, seguido de banho por 2 minutos com ácido

fosfomolibídico 0,2%, banho com água destilada e incubado por 110 minutos em solução de Síríus red 0,1% diluído a partir de uma solução saturada de ácido pícrico (33,33mg/mL), na sequência foi lavado (2 minutos) em ácido clorídrico 0,01N, seguido de banhos sucessivos de álcool (70°, 95° e absoluto) e banho de xilol. As lâminas foram montadas em entelan®.

Quantificação de expressão gênica para TLR4, TLR2 e iNOS

Após toracotomia e dissecação, a aorta torácica (do arco da aorta até o diafragma) e 100 mg do pulmão direito foram removidos, limpos em solução fisiológica 0,9% e armazenados em tubos criogênicos em freezer -80°C. Estes tecidos foram homogeneizados em gral de aço inoxidável resfriado com nitrogênio líquido (Bel-Art Products) e pistilo de cerâmica, as amostras foram armazenadas em tubos de 1,5 mL, para a realização da extração de RNA.

Extração de RNA

O RNA total dos homogenatos foi extraído com 1 mL de Trizol (Invitrogen) em tubo de 1,5 mL, seguido de incubação de 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foram adicionados 200 µL de clorofórmio, os tubos foram agitados em *vortex* e incubados por 3 minutos em temperatura ambiente. Após incubação, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5804 R) a 4°C durante 15 minutos a 12000g. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5 mL, onde foram adicionados 500 µL de isopropanol gelado. Após incubação por 10 minutos a amostra voltou a ser centrifugada a 4°C por 10 minutos a 12000g. O sobrenadante foi desprezado e, ao *pellet* foi adicionado 1 mL de etanol 70% gelado seguido de centrifugação a 4°C durante

5 minutos a 7500g. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi reconstituído em 50 µL de água com 0,1% de Dietilpirocarbonato (Sigma) e armazenado em freezer -80°C.

Amplificação de iNOS, TLR2 e TLR4 por RT PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é um método *in vitro* que amplifica enzimaticamente sequências específicas de DNA utilizando pequenos oligonucleotídeos de 18 a 25 bases que ligam-se a determinadas regiões de interesse do genoma.

O procedimento consiste de uma série de ciclos repetidos de amplificação. Os produtos sintetizados servem como moléculas-molde no próximo, duplicando o número de moléculas a cada ciclo, criando uma reação em cadeia. Após 20 ciclos, a amplificação é de aproximadamente 10^6 a 10^8 .

Essa amplificação pode ser obtida também utilizando o RNA como material iniciador. Esse procedimento, denominado RT-PCR, é realizado por meio da reação de transcrição reversa, seguida de PCR convencional no cDNA.

A partir de 1 µg de RNA total, o cDNA foi sintetizado com 1µl de transcriptase reversa Impron II (Promega); 1 µl de Oligo dT (0,5 µg/µl - Promega); 1 µl de dNTP (10mM – Invitrogen), 6 µl de buffer 5 X ; 0,5 µl de RNAsin (Promega), 2,4 µl de Cloreto de magnésio (25 mM).

A reação foi incubada em termociclador MJ Research PTC-200 por 50 minutos a 42° C e 70 ° C por 15 minutos.

Após a síntese de cDNA foi feita uma reação de PCR para amplificação de rRNA como controle positivo e teste da viabilidade de cada amostra.

A reação de PCR foi realizada com 25 µl de volume total com 17,75 µl de água deionizada; 2,5 µl de tampão (10X); 1µl de cloreto de magnésio a 50 mM; 0,5µl mM de dNTPs (10mM); 1 µl de cada primer a 10 pmol/µl; 0,25 µl de Taq polimerase (Invitrogen) e 1 µl de cDNA em termociclador PTC 200 MJ Research.

Todas as reações foram acompanhadas de um controle negativo (todos os componentes da reação, menos o cDNA) para eliminar uma possível contaminação da reação.

Para a avaliação da amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em agarose a 1% corado com brometo de etídeo (Horizon® – Life Technologies). Todas as amostras foram normalizadas com a amplificação do gene rRNA.

Foram utilizados os seguintes primers (Invitrogen):

TLR4 sense: AAGAGCTGGAATACCTGGAC

TLR4 antisense : GAAATGCTACAGTGGCTACC

35 ciclos : 95° C por 5 minutos; 95° C por 30 segundos; 60° C por 1 minuto; 72° C por 1 minuto; extensão final de 72° C por 10 minutos, gerando um produto de 620 pb.

TLR2 sense: CAGCTGGAGAACTCTGACCC

TLR2 antisense: CAAAGAGCCTGAAGTGGGAG

35 ciclos : 95° C por 5 minutos; 95° C por 30 segundos; 60° C por 1 minuto; 72° C por 1 minuto; extensão final de 72° C por 10 minutos, gerando um produto de 200 pb.

iNOS sense: CACCTTGGAGTTCACCCAGT

iNOS antisense: ACCACTCGTACTTGGGATGC

35 ciclos: 94° C por 0,5 minuto; 92° C por 1 minuto; 63,5° C por 1 minuto; 72° C por 1 minuto; extensão final de 72° C por 10 minutos, gerando um produto de 170 pares de base.

rRNA sense: GAAAGATGGTGAACCTATGCC

rRNA antisense: TTACCAAAGTGGCCCACTA

30 ciclos: 95° C 1 minuto; 60° C 1 minuto, 72° C 1 minuto e extensão de 70° C por 10 minutos, gerando um produto de 320 pb.

Quantificação de Superóxido:

Após toracotomia e dissecação, a aorta torácica foi retirada, limpa e seccionada em 2 fragmentos de 8-10mm. Os anéis de aorta foram colocados em cubas com solução de Krebs-Henseleit (composição em mMol/L: CaCl₂ 1.6, MgSO₄ 1.17, EDTA 0.026, NaCl 130, NaHCO₃ 14.9, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, glicose 11) aquecidas a 37°C e aerados com carbogênio (O₂ 95%, CO₂ 5%) por um período de estabilização de 20 minutos; após este período os anéis foram colocados nas cubas aquecidas (37°C) do luminômetro Berthold 9505 (EG&G Instruments GmbH, Munich, Germany), após incubação com Lucigenina 5x10⁻⁴ M por 5 minutos foi iniciada a contagem por 20 minutos. Os resultados são expressos em função do peso seco das artérias (cpm/mg de tecido).

Nestes experimentos as artérias dissecadas foram seccionadas em duas para que o estudo controle fosse feito no mesmo animal, ou seja, um pedaço da artéria foi incubada somente com Lucigenina e a outra, além da Lucigenina, foi incubada também com ATP/ADP (1x10⁻³M).

Também foram realizadas as quantificações de superóxido na presença de indometacina (1x10⁻⁵M) e Lname (1x10⁻³M).

Quantificação de nitrato

Após toracotomia e dissecação, a aorta torácica (do arco da aorta até o diafragma) foi removida, limpa em solução fisiológica 0,9% e armazenada em tubos criogênicos no freezer -80°C . Do mesmo animal foram retirados 200 mg do pulmão direito, o qual também foi lavado com solução fisiológica 0,9% e armazenado em tubos criogênicos no freezer -80°C . Os tecidos, tanto a aorta quanto o pulmão, foram homogeneizados em gral de aço inoxidável resfriado com nitrogênio líquido (Bel-Art Products) e pistilo de cerâmica.

Os homogenatos de aorta e pulmão foram ressuspensos em PBS, e divididos em dois tubos; um para a quantificação de proteínas (Bradford) e outro para determinação de nitrato por quimioluminescência em analisador de NO (Sievers, modelo NOA 280, USA). Este método requer a redução de nitrato (NO_3^-) para NO por meio da reação de cloreto de vanádio (VnCl_4) em ácido clorídrico (HCl) a 95°C . O NO gerado é carregado por N_2 , um gás inerte, para uma câmara de geração de ozônio. A reação entre NO e ozônio gera luz, a qual é quantificada por células fotomultiplicadoras.

As curvas de calibração em níveis múltiplos foram realizadas com padrão externo (nitrato de sódio – Aldrich), utilizando-se programa específico (Sievers versão 2.2, USA). Amostras dos homogenatos totais de aorta foram realizados nos animais nos tempos de endotoxemia descritos previamente.

Os valores medidos de nitratos em $\mu\text{mol/mg}$ foram corrigidos pela quantidade de proteínas dos homogenatos.

Reatividade vascular da aorta:

Após toracotomia e dissecação, a aorta torácica foi retirada, limpa e seccionada em fragmentos de 4-5mm. Os anéis de aorta foram colocados em cubas para órgão isolado com solução de Krebs-Henseleit (composição em mMol/L: CaCl_2 1.6, MgSO_4 1.17, EDTA 0.026, NaCl 130, NaHCO_3 14.9, KCl 4.7, KH_2PO_4 1.18, glicose 11) aquecidas a 37°C e aerados com carbogênio (O_2 95%, CO_2 5%). Estes segmentos permaneceram suspensos por um período de estabilização de 60 minutos com uma tensão de 1,5g por duas hastes de aço inoxidável que tracionavam os anéis; aos 20 e 40 minutos a solução de Krebs-Henseleit foi trocada e a tensão reajustada (de Carvalho *et al.*, 1990; Nigro *et al.*, 1997). A haste inferior foi fixada na própria cuba de órgão isolado e a superior permaneceu conectada a um transdutor de tensão (BIOPAC System® TSD105A), onde, após o período de estabilização foram realizadas, de acordo com o foco do experimento curvas dose resposta (CDR) a Noradrenalina (1×10^{-9} – 1×10^{-5} M), Cloreto de Potássio (20-120 mM), Acetilcolina (1×10^{-8} – 1×10^{-5} M); ATP (1×10^{-8} – 1×10^{-4} M) e ADP (1×10^{-8} – 1×10^{-4} M). Nos estudos com ATP e ADP também foram realizados CDR na presença de LNAME 1×10^{-3} M e Indometacina 1×10^{-5} M. Nos estudos com Noradrenalina, Cloreto de Potássio e Acetilcolina também foram realizados CDR na presença de bloqueador de receptores purinérgicos (Suramin 1×10^{-4} M).

Análise estatística:

Os dados estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística de comparação de médias, utilizou-se análise de variância (ANOVA) pareada ou quando necessário foi utilizada análise de variância não

pareada, com teste de Tukey para comparação entre grupos. Teste “t” de student pareado ou não pareado foi utilizado quando pertinente; estas análises foram efetuadas com o programa Instat[®] - Versão 3.05 (GraphPad Software Incorporation). O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Resultados

Caracterização do modelo experimental de endotoxemia:

Para análise de mortalidade foram utilizados 273 animais injetados com LPS, destes, obtivemos óbito de 49 animais (17,94%).

Antes de estudar a reatividade vascular promovida pelo ATP/ADP em aorta torácica isolada de rato Wistar endotoxêmico, foi preciso comprovar o efeito da dose de LPS que utilizamos nos animais em estudo.

Avaliamos a perda de peso após injeção de LPS. Nos 319 animais estudados, todos perderam peso. No grupo de 8 horas após injeção de LPS, houve perda de $12,4 \pm 0,7\text{g}$; nos animais estudados após 16 horas da injeção de LPS houve perda de $13,7 \pm 0,5\text{g}$ e nos animais estudados após 24 horas da injeção de LPS houve perda de $19,3 \pm 1,4\text{g}$, (Figura 1).

Foram utilizados 7 animais para estudo com telemetria, onde observamos as alterações de amplitude e frequência nos padrões do ciclo circadiano após a indução de endotoxemia (Figura 2). A coleta de dados começou a ser efetuada 48 horas antes da injeção de LPS e se prolongou por 36 horas após a injeção. Os resultados obtidos nos diferentes períodos de estudo para a movimentação, procura por comida, exercício espontâneo e temperatura estão expressos em média e erro padrão da média (Figura 3).

Figura 1. Perda de peso dos animais tratados com LPS (10mg/kg i.v.) por períodos de 8 ($12,4 \pm 0,7$ g; n=8), 16 ($13,7 \pm 0,5$ g; n=7), e 24 ($19,3 \pm 1,4$ g; n=9), horas e seus respectivos controles.

* p < 0,05 em comparação com seu respectivo controle

p < 0,05 em comparação com os demais grupos

Alterações pulmonares decorrentes da endotoxemia:

Por ser o pulmão um dos órgãos alvos da endotoxemia, resolvemos quantificar, através da histologia, alguns parâmetros para confirmação da infecção causada pelo LPS nos diferentes períodos estudados.

LIM 51

Figura 2. Alterações de amplitude e frequência nos padrões do ciclo circadiano ocasionado pela injeção de LPS (10mg/kg i.p.) na movimentação espontânea (**A**), na procura por comida (**B**), na busca espontânea por exercício físico (**C**) e na temperatura corpórea (**D**). n=7.

Figura 3. Alterações circadiana nas quantificações decorrentes da injeção de LPS (10mg/kg i.p.) na movimentação espontânea (**A**), na procura por comida (**B**), na busca espontânea por exercício físico (**C**) e na temperatura corpórea (**D**). n=8.

* p < 0,05 em comparação com seu respectivo controle.

Histologia

Estudos complementares com pulmão foram realizados para mapear as alterações pulmonares durante o desenvolvimento da endotoxemia nos períodos de estudo com LPS. Lâminas foram preparadas especificamente para cada tipo de análise.

Hematoxilina e Eosina

Foi realizada a coloração de Hematoxilina e Eosina (Figura 4) para a quantificação da área de parênquima e o número de núcleos migrados para o interstício (Figura 5),

Figura 4. Coloração de HE (Hematoxilina e Eosina) em pulmões de animais controles e tratados com LPS 10 mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas. Aumento de 200x.

Figura 5. Área de parênquima (**A**) e número de núcleos que migraram para o interstício (**B**) nos diferentes períodos estudados.
 * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Colágeno total

Através da marcação específica de Picrossírius analisamos o remodelamento do parênquima pulmonar através da quantificação do colágeno total existente nos pulmões dos animais controle e dos animais tratados com LPS 10mg/kg i.v. (Figura 6 e Figura 7).

Figura 6. Quantificação do colágeno total em pulmões de animais controles e de animais tratados por 8, 16 e 24 horas após LPS 10mg/kg i.p.
* $p < 0,05$ em comparação com os demais grupos.

Figura 7 – Coloração de Picrosirius em pulmões de animais controles e tratados com LPS 10 mg/kg i.p. por 8, 16 ou 24 horas. Aumento de 400x.

COX-2

Para caracterização da endotoxemia também foi realizado marcação específica com anti-corpo primário para COX2 (Figura 8). A média e erro padrão específico para cada grupo estão expostos na Figura 9.

Figura 8. Coloração específica para COX2 em pulmões de animais controles e tratados com LPS 10 mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas. Aumento de 400x.

Figura 9. Quantificação da COX2 em animais controles e em animais tratados por 8, 16 e 24 horas após a injeção de LPS 10mg/kg i.p.
 * $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle

Expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 no pulmão

Por RT-PCR foi quantificado nos pulmões a expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4. A densitometria ótica obtida das bandas do RT-PCR estão na figura 10 expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Alterações na aorta torácica decorrentes da endotoxemia

Após verificarmos a eficácia da injeção de LPS 10mg/kg i.p. com os dados previamente mostrados e antes de começarmos a trabalhar com a reatividade vascular em si, verificamos algumas alterações na aorta isolada.

Figura 10. Densitometria ótica da expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 em pulmões de animais controle e injetados com LPS 10mg/kg i.p.

* $p < 0,05$ em comparação com os demais grupos.

$p < 0,05$ em comparação com os grupos Controle e LPS 24h.

Expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 na aorta isolada

Avaliamos a expressão gênica para iNOS, TLR2 e TLR4 nos grupos controle, 8, 16 e 24 horas após a injeção de LPS; na Figura 11 está a densitometria ótica para as bandas obtidas por RT-PCR dos grupos estudados. Os dados estão expressos em média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 11. Densitometria ótica da expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 em aorta de animais controle e injetados com LPS 10mg/kg i.p.

* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

$p < 0,05$ em comparação com o grupo LPS 16h.

Quantificação de superóxido e modulação pelo ATP:

Além da quantificação de Superóxido realizada nos períodos estudados (8, 16 e 24 horas após injeção de LPS 10mg/kg i.p.) em aortas isoladas íntegras, também foi estudado a modulação exercida pelo ATP e pelo ADP nesta resposta (Figura 12).

Figura 12. Quantificação de Superóxido em aorta isolada em animais controles e injetados com LPS 10mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas. Modulação pelo ATP e ADP.

*p<0,05 em comparação com o grupo controle

#p<0.05 em comparação com o grupo injetado por 16 horas na presença de ATP.

Participação da Cicloxigenase e Óxido Nítrico na quantificação de superóxido em aortas isoladas

Nos animais injetados com LPS 10mg/kg/16 horas i.p. também foi avaliado a participação da cicloxigenase e óxido nítrico na quantificação de superóxido; estas vias foram bloqueadas respectivamente com indometacina e Lname (Figura 13).

Figura 13. Quantificação de superóxido em aorta isolada de animais injetados com LPS 10mg/kg/16 horas i.p. na presença de Indometacina (**B, D**) ou Lname (**A, C**) seguido de ATP (**A, B**) ou ADP (**C, D**).

*p<0,05 em comparação com o grupo LPS

Quantificação de Nitrato:

Quantificação de Nitrato foi realizada nos períodos estudados (8, 16 e 24 horas após injeção de LPS 10mg/kg i.p.) em homogenatos de aortas isoladas (Figura 14). A quantificação obtida foi corrigida pela quantidade de proteína encontrada em cada amostra.

Figura 14. Quantificação de Nitrato em aorta isolada em animais controles e injetados com LPS 10mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas
* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle

Reatividade Vascular:

Modulação purinérgica na resposta a agentes vasoativos conhecidos:

Para estudar a possível interação entre receptores purinérgicos e alguns agentes vasoativos conhecidos, foram realizadas Curvas Dose-Resposta a Noradrenalina, Cloreto de Potássio e Acetilcolina na presença de Suramin (bloqueador de receptor purinérgico) (Figura 15).

Figura 15. Reatividade vascular a noradrenalina (A), Cloreto de Potássio (B) e Acetilcolina (C) em aorta isolada de animais controles (A) e de animais injetados com LPS 10mg/kg/16h i.p.

* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle + Suramin

Testamos a reatividade vascular para a dose única de Noradrenalina nos experimentos de relaxamento (Figura 16). A reatividade vascular também para noradrenalina foi estudada em animais injetados com LPS 40mg/kg/16 horas i.p. (Figura 17).

Foram realizadas Curvas Dose Resposta para o ATP, ADP e Adenosina em aortas isoladas pre contraídas com Noradrenalina. Escolhemos trabalhar com ATP e com o ADP por apresentarem melhores respostas vasodilatadoras do que a Adenosina, tanto para animais controles quanto para animais que foram injetados com LPS 10mg/kg/16h i.p. (Figura 18).

Figura 16. Dose única de noradrenalina ($1 \times 10^{-7} \text{M}$) em aorta isolada de animais controles e de animais injetados com LPS 10mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas.

* $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

ATP e ADP 8, 16 e 24 horas após indução de endotoxemia:

Curvas Dose-Resposta ao ATP e ADP foram realizadas em 8, 16 e 24 horas após a injeção de LPS 10 mg/kg i.p. Foram realizadas análises de Resposta Máxima de relaxamento e quando pertinente análise de EC₅₀. Os resultados estão expressos na Figura 19 e na Tabela 1.

Figura 17. Reatividade vascular a noradrenalina em aorta isolada de animais controles (●) e de animais injetados com LPS 40mg/kg/16h i.p.(▲).

Figura 18. Reatividade vascular ao ATP, ADP e Adenosina em aorta isolada de animais controles (A) e de animais injetados com LPS 10mg/kg/16h i.p.(B). *p<0,05 em comparação com o grupo controle

Figura 19. Reatividade vascular ao ATP e ao ADP em aorta isolada em animais controles (●) e injetados com LPS (▲) 10mg/kg i.p. após 8, 16 e 24 horas de injeção

*p<0,05 em comparacao com o grupo controle.

	ATP		ADP	
	R. M.	EC50 (10 ⁻⁸ M)	R. M.	EC50 (10 ⁻⁸ M)
Controle 8h	102,82 ± 2,19	2,64	74,90 ± 5,25	2,54 2,15 2,93
LPS 8h	101,28 ± 2,79	2,53	71,61 ± 5,02	2,45 1,84 3,06
Controle 16h	100,15 ± 0,85	—	62,15 ± 4,08	2,58 2,38 2,78
LPS 16h	106,72 ± 2,29*	—	71,93 ± 5,40	1,97* 1,84 2,11
Controle 24h	104,36 ± 1,36	2,49	77,59 ± 6,51	2,43 1,96 2,91
LPS 24h	97,92 ± 3,59	2,27	75,33 ± 3,94	1,96 1,54 2,38

Tabela 1. Resposta Máxima e EC50 obtidas das Curvas Dose Resposta ao ATP e ADP em aortas isoladas de ratos controles e injetados com LPS 10mg/kg i.p. por 8, 16 e 24 horas.

*p<0,05 em comparação com o grupo controle

Participação da via da COX e NO no relaxamento promovido pelo ATP e

ADP:

Curvas Dose-Resposta ao ATP e ADP foram realizadas em 16 horas após a injeção de LPS 10 mg/kg i.p. na presença de bloqueador da via da ciclooxygenase (Indometacina 1x10⁻⁵M) ou na presença de bloqueador da síntese de NO (Lname 1x10⁻³M) (Figura 20).

Figura 20. Reatividade vascular ao ATP (A, B) e ao ADP (C, D) em aorta isolada em animais controles e injetados com LPS 10mg/kg/16h i.p. na presença de Indometacina (símbolo vazio) e de Lname (símbolo cheio com X).

* $p < 0,05$ em comparação com a resposta máxima do grupo controle
 # $p < 0,05$ em comparação com a EC₅₀ do grupo controle

DISCUSSÃO

Discussão

LPS e quadro clínico:

Perda de peso, ciclo circadiano e mortalidade

“Comportamento doentio” é um estado motivacional desencadeado por estímulos imunes através do qual um organismo reorganiza suas prioridades para enfrentar qualquer infecção (Connor et al., 2002).

A administração de LPS desencadeia a produção e liberação de várias substâncias que modificará a homeostase, atuando sobre a função cardiovascular, respiratória, metabólica, imunológica e outras. Estas substâncias vasoativas incluem catecolaminas, histamina, 5-hydroxytryptamina, peptídeos opióides, purinas, cininas, prostaglandinas, tromboxanas, leucotrienos, angiotensina e radicais livres de oxigênio. A relevância particular de cada um destes mediadores para a patologia da sepse ainda não está esclarecida (Parratt, 1998).

Experimentalmente, o comportamento doentio pode ser induzido em roedores pela administração de LPS (Shen et al., 1999; Bluthé et al., 2000). A injeção de LPS aumenta a concentração de interleucina pró-inflamatória circulante pela ativação de monócitos e macrófagos (Givalois et al., 1994). O aumento da produção periférica de citocinas atua sobre o cérebro, produzindo os sintomas clássicos do comportamento doentio, como febre, anorexia/hipofagia (diminuição da ingestão de comida), cachexia (diminuição do peso corpóreo) (Tesfagzi et al., 2001), hipolocomoção (Connor et al., 2002).

Os parâmetros estudados: procura por comida, temperatura, movimentação e exercício espontâneo revelaram o desenvolvimento do

comportamento doentio precocemente, comprovado pelo aumento da temperatura corpórea desde o período de 8 horas, aumento este que se manteve nos períodos seguintes. Na movimentação e exercício espontâneo, observamos diminuição da movimentação espontânea e da busca por exercício físico nos animais endotoxêmicos nos períodos estudados (16 e 24 horas). Não houve diferença no período de 8 horas. Isto pode ser explicado pelo fato de os animais terem sido injetados com LPS no início do período de claro e as respostas foram semelhantes às encontradas nos animais controles, como o período de claro é o momento de repouso desta espécie, torna-se difícil demonstrar redução de atividade.

A utilização da telemetria como método quantitativo mostra-se útil para estudar o efeito do LPS no desencadeamento da endotoxemia, pois métodos qualitativos (pelos eriçados, animal prostado etc), geralmente não são precisos para a avaliação deste efeito. Este método proporcionou dados mais objetivos.

Em relação ao estado doentio também foi observada perda progressiva de peso nos animais injetados com LPS (cachexia) quando comparados com seus respectivos controles nos períodos estudados, ou seja no período de 24 horas após LPS houve maior perda de peso comparado com os demais grupos estudados.

A dose de LPS utilizada no estudo, além de desencadear o chamado estado doentio, produziu mortalidade de 17,94%, evidenciando que o quadro produzido por essa dose de LPS foi severo.

Estes dados confirmam que a dose utilizada de LPS produz o quadro clínico doentio do organismo perante uma infecção que evolui para sepse ou sepse grave com altos índices de mortalidade.

Pulmão e aorta

COX2

O estudo imunohistoquímico do tecido pulmonar revelou maior expressão de COX2 nos animais tratados com LPS. Este dado sugere possível ativação das vias inflamatórias no parênquima e endotélio. Fato este que é coincidente com o achado de aumento de infiltrado inflamatório, por possível ação indireta na quimiotaxia de substâncias produzidas no pulmão ou decorrente da ativação do endotélio. Segundo Panzer e colaboradores (Panzer; Uguccioni, 2004) a prostaglandina E2 exerce papel importante na resposta imune e pode influenciar os efeitos pró-inflamatórios de quimiocinas e seus receptores que são os principais responsáveis pela migração leucocitária. Contudo, estes animais não apresentaram aumento da área intersticial. Portanto não houve edema tecidual, aumento da permeabilidade vascular e lesão endotelial significativa dentro do período de 24 horas. No entanto, houve aumento do infiltrado inflamatório, mas como não foi acompanhado por alteração de permeabilidade, nossa hipótese é de predomínio de ação quimiotática neste período.

A análise da quantidade de colágeno total revelou aumento em 24 horas após LPS e este dado revela-se interessante, pois o fenômeno de fibrose e remodelamento pulmonar mostrou-se precoce no modelo estudado. Rojas e colaboradores (Rojas et al., 2005) concluíram que a administração i.p. de endotoxina causa resposta inflamatória sistêmica, injúria e disfunção pulmonar. Estes efeitos estão associados com a deposição de colágeno na parede alveolar (Corbel et al., 2001)

Expressão de mRNA para iNOS, TLR2 e TLR4 em pulmão e aorta

Na sequência, realizamos o estudo da expressão gênica de iNOS, TLR2 e TLR4 no pulmão e na aorta. Proteínas do tipo *Toll* foram descritas em *Drosophila melanogaster* relacionada ao desenvolvimento embrionário, posteriormente verificou-se sua participação na infecção fúngica. Estudos em mamíferos revelou a existência de proteínas similares (TLR), relacionada ao reconhecimento de componentes específicos de invasores.

Em 1998, a proteína “toll-like receptor” 4 (TLR4) foi identificada como transdutor de sinal para LPS (Poltorak et al., 1998). Desde então TLRs tem sido descritos como reconhecedores e mediadores de sinais para uma grande variedade de componentes de bactérias, fungos e vírus (Tsan; Gao, 2004). Interação de TLRs com padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) indicam a presença de infecção e iniciam cascatas de sinalização, levando assim, a respostas imunes e inflamatórias (Akira, 2003; Takeda et al., 2003; Takeda; Akira, 2004)

Hirschfeld e colaboradores (Hirschfeld et al., 2000) demonstraram que em preparações comerciais de LPS, baixos níveis de lipoproteínas (3pM) podem estar presentes no produto e a presença destas lipoproteínas podem aumentar a expressão de TLR2; porém salientam que tanto o TLR4 quanto o TLR2 são importantes na resposta a infecção por bactéria Gram-negativa, pois tanto o LPS quanto as lipoproteínas estão presentes nas bactérias.

Homma e colaboradores (Homma et al., 2004) demonstraram que a expressão de TLR2 é fortemente regulada por citocinas (TNF α e IFN γ) presentes após estímulo inflamatório.

Nós analisamos a expressão gênica de TLR2 e TLR4 no intuito de observar quanto sua expressão pode ser afetada após o estímulo de LPS e consequentemente a ativação inflamatória. O TLR4 pode estar envolvido por ação direta, contudo uma alteração do TLR2, representa uma regulação mediada ou por sinalização intracelular coincidente das vias TLR4 e TLR2, pela presença de lipoproteínas no LPS ou pelos mediadores inflamatórios produzidos.

No pulmão foi observado aumento significativo na expressão gênica para TLR4 após 8 horas, seguida de diminuição em 16 horas, e pequeno aumento de expressão no período de 24 horas quando comparados com o grupo controle.

Assim como no pulmão, a expressão gênica de TLR2 na aorta teve aumento significativo nos três períodos estudados. Provavelmente, a interação entre diferentes membros da família “toll” pode estar envolvida na resposta inflamatória, pois segundo Wyllie e colaboradores (Wyllie et al., 2000) a interação entre diferentes TLRs pode conferir respostas específicas na sinalização por LPS. Sinergismo entre TLR2 e TLR4 também foi estudado na indução de COX2 por bactérias na musculatura vascular (Jimenez et al., 2005).

A expressão gênica de TLR4 na aorta, teve aumento significativo após 8 horas da injeção de LPS seguida de diminuição em 16 horas e aumento da expressão no período de 24 horas quando comparado com o grupo controle.

A síntese de NO se diferencia em quantidade e tempo de liberação em decorrência do tipo de NO sintase ativa. As enzimas constitutivas (eNOS e nNOS) sintetizam NO em pequenas quantidades, já a forma induzida (iNOS) sintetiza NO em grandes quantidades e por longos períodos excedendo até o

tempo do estímulo inflamatório de uma infecção (Nedelec et al., 2001). Perante o estímulo inflamatório, a indução de expressão gênica de iNOS ocorre em diversos tipos de células: endotelial, muscular lisa, macrófago. Este fato acarreta maior quantidade de NO durante sepse e esta substância é responsável por aumento de permeabilidade e redução da resistência vascular, ativação de neutrófilo e macrófago (Vo et al., 2005).

No grupo com 8 horas após injeção de LPS foi encontrado pico de expressão gênica para iNOS tanto em pulmão quanto em aorta. Nos períodos de 16 e 24 horas após a injeção de LPS os níveis de expressão gênica para iNOS voltaram aos níveis basais no pulmão, enquanto na aorta a diminuição foi gradativa, mas sem retornar aos níveis basais.

A dosagem de nitrato (subproduto do NO), mostra que o pico de sua produção ocorre em 16 horas sendo portanto posterior ao aumento da enzima. O radical livre NO (precursor do nitrato) desempenha funções de sinalização celular, vasodilatação, inflamação e participa também na produção de lesão tecidual (Nedelec et al., 2001).

Superóxido

Nosso estudo mostrou que o LPS induziu aumento na produção vascular de O_2^- , apresentando um pico no período de 16 horas. Em 24 horas, a produção de O_2^- pela aorta ainda é maior que o basal, porém inicia-se uma recuperação em direção ao estado basal.

O O_2^- desempenha funções de sinalização de fenômenos fisiológicos, ativação da célula endotelial com regulação da expressão de moléculas de adesão da célula endotelial (ECAM). Contudo, perante níveis elevados de O_2^- ,

passa a ocorrerem efeitos danosos ao próprio organismo. Entre os tecidos, o endotélio representa uma das maiores fontes de O_2^- , em relação aos componentes celulares, a cadeia respiratória da mitocôndria está entre as maiores vias de produção de O_2^- , nas situações de perturbação metabólica (Li; Shah, 2004).

A elevação dos níveis de EROs na inflamação e na sepse também afetam a reatividade vascular, conforme foi descrito por outros autores (Godin et al., 1993; Peters et al., 2003) e que veremos a seguir. A concomitância de pico de produção de O_2^- e de NO em 16 horas cria o cenário propício à produção de peroxinitrito intravascular. Esta substância é bastante lesiva, produzindo quebra de DNA e ativação da Poli (ADP-ribose) polimerase (PARP); a atividade desta enzima depleta o ATP, NAD e NADPH das células e este fato induz a disfunção endotelial (Liaudet et al., 2000).

Endotélio

Os estudos de Furchgott e Zawadzki (Furchgott; Zawadzki, 1980) demonstraram que o endotélio exerce papel fundamental na regulação do tônus. A seguir, os trabalhos de Murad e colaboradores (Murad et al., 1987) e de Ignarro e colaboradores (Ignarro et al., 1987) demonstraram que a capacidade vasodilatadora se deve a síntese e secreção (liberação) de NO pelo endotélio. A literatura a respeito da participação do NO em diversas patologias é extensa, fato que demonstra sua relevância.

Além da comprovada importância fisiológica do endotélio (Vane et al., 1990), estudos demonstram que a célula endotelial é o principal alvo de toxinas e pode sofrer danos, levando a disfunção endotelial, a qual contribui com a

falência de múltiplos órgãos (Grandel; Grimminger, 2003) e instalação do choque séptico (Morrison; Ulevitch, 1978).

As células endoteliais são ativadas quando há reconhecimento de bactérias ou seus produtos circulantes na corrente sanguínea (Peters et al., 2003) e utilizando de mecanismos que reconhecem padrões estruturais dos patógenos, iniciam a expressão de mediadores inflamatórios (Henneke; Golenbock, 2002).

Purinérgicos e reatividade vascular

O relaxamento endotélio dependente do ATP/ADP (receptores P2y) é caracterizado por liberação de NO e menor síntese de prostaglandinas (Liu et al., 2002).

Na literatura se encontram trabalhos sobre reatividade vascular na sepse com resultados divergentes sobre a disfunção endotelial. São descritos tanto perda (Erol; Kosay, 2000; Chauhan et al., 2003) quanto aumento (Beach et al., 2001) de relaxamento a estímulos endotélio dependentes. Contudo, o predomínio dos trabalhos encontrados na literatura descrevem alguma perda de função endotelial na sepse.

Antes de iniciarmos propriamente o estudo dos purinérgicos, verificamos a capacidade de resposta contrátil da aorta isolada de animais endotoxêmicos submetidos às substâncias noreadrenalina (NE) e cloreto de potássio (KCl). A seguir estudamos a ação vasodilatadora da acetilcolina (Ach).

Diversos estudos demonstraram hiporeatividade a vários agentes vasoativos em modelos de choque endotoxêmicos (Wakabayashi et al., 1987; Julou-Schaeffer et al., 1990; Parker; Adams, 1993; Umans et al., 1993; Erol;

Kosay, 2000). Erol e colaboradores (Erol; Kosay, 2000) utilizaram em modelo experimental injeção de LPS 5mg/kg i.p. em ratos albinos e estudaram a resposta vasoconstritora a fenilefrina após 18h da injeção. Neste modelo, observaram redução da resposta vasoconstritora pela análise da curva dose resposta. Em nosso estudo, a análise de contração pela curva dose resposta não mostrou diferença para NE e KCl. Entretanto, analisando o efeito da dose única de NE em estudo posterior encontramos redução da resposta contrátil em 24 horas após a injeção de LPS.

Na análise de reatividade vascular de aorta isolada, há dois parâmetros que precisam ser levados em consideração quando se estuda farmacologicamente a ação de agentes vasoativos. O primeiro parâmetro é a resposta máxima obtida pelo agente vasoativo, onde se trabalha saturando os receptores a serem estudados, portanto esse dado informa sobre o número total de receptores e integridade das vias celulares efetoras. O segundo parâmetro, conhecido como EC50 (concentração eficaz 50%), é a dose necessária para se atingir a metade da resposta máxima. Equivalente matemática do km de cinética enzimática, permite avaliar a sensibilidade e bloqueios reversíveis dos receptores e vias efetoras.

Em relação ao relaxamento vascular mediado pela Ach, observamos uma redução de sensibilidade ($>EC_{50}$) nos animais que receberam LPS. A Ach é liberada nas junções neuromusculares e desta forma o sistema nervoso pode controlar o fluxo sanguíneo para cada território vascular. Choi e colaboradores (Choi et al., 2003) demonstraram que há ATP nas vesículas sinápticas e que este atua na estabilização de Ach e é liberado junto a Ach. Realizamos estudos sobre a ação de Ach na presença de bloqueador purinérgico (Suramin) e

observamos aumento da EC50 para a Ach, ou seja, a redução de sensibilidade. Este dado mostra uma interação entre a ação da Ach e dos purinérgicos, uma possível potencialização da ação de Ach sobre os receptores promovido pelos purinérgicos.

As curvas dose resposta ao ATP e ADP foram realizadas em 8, 16 e 24 horas após a injeção de LPS. Para cada um destes períodos foram avaliadas as diferenças de respostas máximas e quando estas respostas não se diferenciaram, utilizamos a análise de EC50. Diferenças significativas não foram encontradas nos períodos de 8 e 24 horas após a injeção de LPS, porém no período de 16 horas observamos diferença de resposta máxima para o ATP e de EC50 para o ADP. Neste mesmo período avaliamos a participação da via da ciclooxigenase e da síntese do NO na ação de ATP e ADP sobre os vasos. Relaxamento dependente de endotélio foi observado tanto para o ATP quanto para o ADP, pois este relaxamento foi modulado pelo uso de LNAME, isto é, houve bloqueio praticamente total da resposta vascular. No bloqueio da via da ciclooxigenase por indometacina, observamos maior sensibilidade (menor valor de EC50) nos animais controles tanto para ATP quanto para ADP. A modulação pela indometacina ao ATP e ao ADP observada em condições basais não foi observada na curva dose resposta ao ATP nos animais endotoxêmicos. Na curva dose resposta ao ADP, a indometacina promoveu inversão de resposta no animal endotoxêmico quando comparado ao animal controle, ou seja, em animais endotoxêmicos é preciso dose menor de ADP para atingir 50% da resposta máxima enquanto que na presença de indometacina, nos animais endotoxêmicos, é necessário dose maior para atingir a uma resposta equivalente a 50% da resposta máxima (EC50).

Assim como relata a literatura, nosso estudo mostra que a ação do ATP e ADP é via liberação de NO, pois o uso do LNAME bloqueia esta resposta. Porém, algum outro mecanismo, além da liberação de NO pode estar envolvido no efeito vasodilatador dos purinérgicos, pois em nossos experimentos observamos que na presença de indometacina, há mudanças de respostas quando comparados animais endotoxêmicos e animais controles. A maior sensibilidade ($<EC_{50}$) observada tanto na curva dose resposta ao ATP quanto ao ADP nos animais controles não são observadas nos animais endotoxêmicos. Na curva dose resposta ao ATP não encontramos diferença e na curva dose resposta ao ADP foi observado inversão de sensibilidade. Ainda mais relevante é o fato que os purinérgicos produziram maior relaxamento nos animais endotoxêmicos, contrastando com a maioria dos trabalhos sobre reatividade vascular endotélio dependente. No intuito de esclarecer este aspecto fomos estudar a ação do ATP e do ADP sobre a produção de O_2^- , elemento importante na alteração da resposta vascular da sepse. Encontramos significativa ação do ATP no período de 16 horas, onde os purinérgicos foram eficazes em reduzir a produção de O_2^- . Este dado por si explica a diferença de resposta vasodilatadora dos vasos de animais endotoxêmicos aos purinérgicos durante a sepse. O O_2^- atua como sequestrador de NO, reduzindo portanto a biodisponibilidade do NO, em concentrações elevadas lesa lípidos e proteínas levando ao dano celular. Oxida diversas proteínas e substâncias como a própria NOS, reduzindo a produção de NO e até mesmo alterando a ação da NOS, fazendo com que a NOS oxidada passe a produzir O_2^- .

A seguir investigamos qual seria a via produtora de O_2^- no animal endotoxêmico que é modulada pelos purinérgicos. Utilizando inibidores da COX e da NOS verificamos a ação do ATP/ADP na modulação de O_2^- .

Os nossos resultados mostram que na presença de indometacina o ATP mantém a capacidade de reduzir a produção de O_2^- . Sendo pouco provável que esta via seja a causadora do melhor relaxamento vascular observado no animal endotoxêmico.

A inibição da NOS pelo Lname, produziu uma redução de O_2^- semelhante aos níveis obtidos na presença do ATP, é interessante observar que a posterior adição de ATP ou ADP na presença de LNAME não produziu redução adicional na produção de O_2^- . Os purinérgicos não tendo produzido redução adicional de O_2^- elimina a possibilidade de ação “sequestradora” direta pelo ATP/ADP.

Estes resultados são concordantes com os estudos da literatura em demonstrar que a NOS durante a sepse produz O_2^- . Nossos resultados apontam que a NOS, é de importante magnitude na produção de O_2^- durante a sepse. O uso de LNAME elimina a possibilidade de que o NO, produzido pela ação dos purinérgicos, atue como um sequestrador de O_2^- .

Finalmente estas observações de ação do ATP em reduzir O_2^- e apresentar melhor relaxamento vascular endotélio dependente, ou seja via NO, possibilitam a formulação da hipótese: A NOS que apresenta desacoplamento de sua função normal durante a sepse, produzindo também O_2^- , pode ter sua capacidade reestabelecida em função da ação do ATP.

CONCLUSÕES

Conclusões

- A dose de LPS utilizada neste modelo produziu um estado de doença, caracterizado pela perda de peso, alterações do ciclo circadiano e pelo aumento da COX2;
- Neste modelo observamos o desenvolvimento do processo inflamatório sistêmico que pode estar envolvido nas alterações pulmonares e vasculares observadas;
- Aumento da expressão gênica de TLR2 pode estar associado ao aumento da expressão gênica de iNOS e TLR4 e à maior biodisponibilidade de O_2^- e NO observado após a injeção de LPS;
- Na aorta isolada de animais endotoxêmicos, ATP e ADP mantém o aumento da produção de NO, mas somente ATP reduz significativamente a produção de O_2^- ;
- Possivelmente o ATP reacopla o funcionamento da NOS durante a endotoxemia, diminuindo a biodisponibilidade de O_2^- e aumentando a biodisponibilidade de NO.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências bibliográficas

- Aird SD. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon*. 2002;40(4):335-93.
- Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003;101(10):3765-77.
- Akira S. Mammalian Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(1):5-11.
- Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett*. 2003;85(2):85-95.
- Alexander B. The role of nitric oxide in hepatic metabolism. *Nutrition*. 1998;14(4):376-90.
- Beach PK, Spain DA, Kawabe T, Harris PD, Garrison RN. Sepsis increases NOS-2 activity and decreases non-NOS-mediated acetylcholine-induced dilation in rat aorta. *J Surg Res*. 2001;96(1):17-22.
- Behrendt D, Ganz P. Endothelial function. From vascular biology to clinical applications. *Am J Cardiol*. 2002;90(10C):40L-48L.
- Bing RJ, Miyataka M, Rich KA, Hanson N, Wang X, Slosser HD, Shi SR. Nitric oxide, prostanooids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2001;7(11):3385-92.
- Bluthe RM, Laye S, Michaud B, Combe C, Dantzer R, Parnet P. Role of interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha in lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a study with interleukin-1 type I receptor-deficient mice. *Eur J Neurosci*. 2000;12(12):4447-56.
- Bone RC. Gram-positive organisms and sepsis. *Arch Intern Med*. 1994;154(1):26-34.
- Borst MM, Schrader J. Adenine nucleotide release from isolated perfused guinea pig hearts and extracellular formation of adenosine. *Circ Res*. 1991;68(3):797-806.
- Brandes RP, Koddenberg G, Gwinner W, Kim D, Kruse HJ, Busse R, Mugge A. Role of increased production of superoxide anions by NAD(P)H oxidase and xanthine oxidase in prolonged endotoxemia. *Hypertension*. 1999;33(5):1243-9.
- Brizzolara AL, Crowe R, Burnstock G. Evidence for the involvement of both ATP and nitric oxide in non-adrenergic, non-cholinergic inhibitory neurotransmission in the rabbit portal vein. *Br J Pharmacol*. 1993;109(3):606-8.
- Burnett AL, Lowenstein CJ, Brecht DS, Chang TS, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*. 1992;257(5068):401-3.
- Burnstock G. Purinergic nerves. *Pharmacol Rev*. 1972;24(3):509-81.
- Burnstock G, Kennedy C. Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor? *Gen Pharmacol*. 1985;16(5):433-40.
- Burnstock G, Campbell G, Satchell D, Smythe A. Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol*. 1970;40(4):668-88.
- Can C, Demirci B, Uysal A, Akcay YD, Kosay S. Contradictory effects of chlorpromazine on endothelial cells in a rat model of endotoxic shock in association with its actions on serum TNF-alpha levels and antioxidant enzyme activities. *Pharmacol Res*. 2003;48(3):223-30.
- Cattaneo M, Canciani MT, Lecchi A, Kinlough-Rathbone RL, Packham MA, Mannucci PM, Mustard JF. Released adenosine diphosphate stabilizes thrombin-induced human platelet aggregates. *Blood*. 1990;75(5):1081-6.
- Chacon F, Cano P, Lopez-Varela S, Jimenez V, Marcos A, Esquifino AI. Chronobiological features of the immune system. Effect of calorie restriction. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56 Suppl 3(S69-72).
- Chapal J, Loubatieres-Mariani MM. Evidence for purinergic receptors on vascular smooth muscle in rat pancreas. *Eur J Pharmacol*. 1983;87(4):423-30.
- Chauhan SD, Seggara G, Vo PA, Macallister RJ, Hobbs AJ, Ahluwalia A. Protection against lipopolysaccharide-induced endothelial dysfunction in resistance and conduit vasculature of iNOS knockout mice. *Faseb J*. 2003;17(6):773-5.
- Chen SJ, Wu CC, Yang SN, Lin CI, Yen MH. Hyperpolarization contributes to vascular hyporeactivity in rats with lipopolysaccharide-induced endotoxic shock. *Life Sci*. 2000;68(6):659-68.
- Choi RC, Siow NL, Cheng AW, Ling KK, Tung EK, Simon J, Barnard EA, Tsim KW. ATP acts via P2Y1 receptors to stimulate acetylcholinesterase and acetylcholine receptor expression: transduction and transcription control. *J Neurosci*. 2003;23(11):4445-56.

- Chow CK, Hong CB. Dietary vitamin E and selenium and toxicity of nitrite and nitrate. *Toxicology*. 2002;180(2):195-207.
- Connor TJ, O'Sullivan J, Nolan Y, Kelly JP. Inhibition of constitutive nitric oxide production increases the severity of lipopolysaccharide-induced sickness behaviour: a role for TNF- α . *Neuroimmunomodulation*. 2002;10(6):367-78.
- Cooke CL, Davidge ST. Peroxynitrite increases iNOS through NF-kappaB and decreases prostacyclin synthase in endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282(2):C395-402.
- Corbel M, Theret N, Caulet-Maugendre S, Germain N, Lagente V, Clement B, Boichot E. Repeated endotoxin exposure induces interstitial fibrosis associated with enhanced gelatinase (MMP-2 and MMP-9) activity. *Inflamm Res*. 2001;50(3):129-35.
- Dantzer R. Cytokine-induced sickness behavior: mechanisms and implications. *Ann N Y Acad Sci*. 2001;933(222-34).
- Dawicki DD, Agarwal KC, Parks RE, Jr. Role of adenosine uptake and metabolism by blood cells in the antiplatelet actions of dipyridamole, dilazep and nitrobenzylthioinosine. *Biochem Pharmacol*. 1985;34(22):3965-72.
- de Carvalho MH, Nigro D, Scivoletto R, Barbeiro HV, de Oliveira MA, de Nucci G, Fortes ZB. Comparison of the effect of endothelin on microvessels and macrovessels in Goldblatt II and deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats. *Hypertension*. 1990;15(2 Suppl):I68-71.
- De Mey JG, Vanhoutte PM. Role of the intima in cholinergic and purinergic relaxation of isolated canine femoral arteries. *J Physiol*. 1981;316(347-55).
- Di Virgilio F, Solini A. P2 receptors: new potential players in atherosclerosis. *Br J Pharmacol*. 2002;135(4):831-42.
- Dunn PM, Zhong Y, Burnstock G. P2X receptors in peripheral neurons. *Prog Neurobiol*. 2001;65(2):107-34.
- Edwards FA, Gibb AJ, Colquhoun D. ATP receptor-mediated synaptic currents in the central nervous system. *Nature*. 1992;359(6391):144-7.
- Erol A, Kosay S. Effects of aminoguanidine administration on vascular hyporeactivity in thoracic aorta from endotoxaemic rats. *Eur J Pharmacol*. 2000;408(2):175-81.
- Evans RJ, Derkach V, Surprenant A. ATP mediates fast synaptic transmission in mammalian neurons. *Nature*. 1992;357(6378):503-5.
- Frolich JC. A classification of NSAIDs according to the relative inhibition of cyclooxygenase isoenzymes. *Trends Pharmacol Sci*. 1997;18(1):30-4.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288(5789):373-6.
- Garcia Soriano F, Liaudet L, Marton A, Hasko G, Batista Lorigados C, Deitch EA, Szabo C. Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. *Crit Care Med*. 2001;29(4):703-8.
- Givalois L, Dornand J, Mekaouche M, Solier MD, Bristow AF, Ixart G, Siaud P, Assenmacher I, Barbanel G. Temporal cascade of plasma level surges in ACTH, corticosterone, and cytokines in endotoxin-challenged rats. *Am J Physiol*. 1994;267(1 Pt 2):R164-70.
- Godin C, Caprani A, Dufaux J, Flaud P. Interactions between neutrophils and endothelial cells. *J Cell Sci*. 1993;106 (Pt 2)(441-51).
- Goepfert C, Imai M, Brouard S, Csizmadia E, Kaczmarek E, Robson SC. CD39 modulates endothelial cell activation and apoptosis. *Mol Med*. 2000;6(7):591-603.
- Gordon JL, Martin W. Endothelium-dependent relaxation of the pig aorta: relationship to stimulation of 86Rb efflux from isolated endothelial cells. *Br J Pharmacol*. 1983;79(2):531-41.
- Gorman MW, Ning XH, He MX, Portman MA, Sparks HV. Adenosine release and high energy phosphates in intact dog hearts during norepinephrine infusion. *Circ Res*. 1992;70(6):1146-51.
- Gorman MW, Wangler RD, Bassingthwaite JB, Mohrman DE, Wang CY, Sparks HV. Interstitial adenosine concentration during norepinephrine infusion in isolated guinea pig hearts. *Am J Physiol*. 1991;261(3 Pt 2):H901-9.
- Grandel U, Grimminger F. Endothelial responses to bacterial toxins in sepsis. *Crit Rev Immunol*. 2003;23(4):267-99.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494-501.
- Gryglewski RJ, Chlopicki S, Uracz W, Marcinkiewicz E. Significance of endothelial prostacyclin and nitric oxide in peripheral and pulmonary circulation. *Med Sci Monit*. 2001;7(1):1-16.

- Henneke P, Golenbock DT. Innate immune recognition of lipopolysaccharide by endothelial cells. *Crit Care Med.* 2002;30(5 Suppl):S207-13.
- Hernanz R, Briones AM, Alonso MJ, Vila E, Salaices M. Role of iNOS, COX-2 and reactive oxygen species in the bradykinin relaxation impairment after LPS in cerebral arteries from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;
- Hirschfeld M, Ma Y, Weis JH, Vogel SN, Weis JJ. Cutting edge: repurification of lipopolysaccharide eliminates signaling through both human and murine toll-like receptor 2. *J Immunol.* 2000;165(2):618-22.
- Holzberg D, Albrecht U. The circadian clock: a manager of biochemical processes within the organism. *J Neuroendocrinol.* 2003;15(4):339-43.
- Homma T, Kato A, Hashimoto N, Batchelor J, Yoshikawa M, Imai S, Wakiguchi H, Saito H, Matsumoto K. Corticosteroid and cytokines synergistically enhance toll-like receptor 2 expression in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004;31(4):463-9.
- Honda S, Migita K, Hirai Y, Ueki Y, Yamasaki S, Urayama S, Kawabe Y, Fukuda T, Kawakami A, Kamachi M, Kita M, Ida H, Aoyagi T, Eguchi K. Induction of COX-2 expression by nitric oxide in rheumatoid synovial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;268(3):928-31.
- Horng T, Medzhitov R. Drosophila MyD88 is an adapter in the Toll signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(22):12654-8.
- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(24):9265-9.
- Ingalls RR, Heine H, Lien E, Yoshimura A, Golenbock D. Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors. *Infect Dis Clin North Am.* 1999;13(2):341-53, vii.
- Jaffe EA. Cell biology of endothelial cells. *Hum Pathol.* 1987;18(3):234-9.
- Javesghani D, Hussain SN, Scheidel J, Quinn MT, Magder SA. Superoxide production in the vasculature of lipopolysaccharide-treated rats and pigs. *Shock.* 2003;19(5):486-93.
- Jimenez R, Belcher E, Sriskandan S, Lucas R, McMaster S, Vojnovic I, Warner TD, Mitchell JA. Role of Toll-like receptors 2 and 4 in the induction of cyclooxygenase-2 in vascular smooth muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(12):4637-42.
- Jin J, Dasari VR, Sistare FD, Kunapuli SP. Distribution of P2Y receptor subtypes on haematopoietic cells. *Br J Pharmacol.* 1998;123(5):789-94.
- Julou-Schaeffer G, Gray GA, Fleming I, Schott C, Parratt JR, Stoclet JC. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. *Am J Physiol.* 1990;259(4 Pt 2):H1038-43.
- Kelley KW, Bluth RM, Dantzer R, Zhou JH, Shen WH, Johnson RW, Broussard SR. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain Behav Immun.* 2003;17 Suppl 1(S112-8).
- Kilbourn RG, Traber DL, Szabo C. Nitric oxide and shock. *Dis Mon.* 1997;43(5):277-348.
- Kim HW, Breiding P, Greenburg AG. Enhanced modulation of hypotension in endotoxemia by concomitant nitric oxide synthesis inhibition and nitric oxide scavenging. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1997;25(1-2):153-62.
- Korenaga R, Yamamoto K, Ohura N, Sokabe T, Kamiya A, Ando J. Sp1-mediated downregulation of P2X4 receptor gene transcription in endothelial cells exposed to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280(5):H2214-21.
- Kunapuli SP, Daniel JL. P2 receptor subtypes in the cardiovascular system. *Biochem J.* 1998;336 (Pt 3):513-23.
- Li JM, Shah AM. Endothelial cell superoxide generation: regulation and relevance for cardiovascular pathophysiology. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004;287(5):R1014-30.
- Liaudet L, Soriano FG, Szabo E, Virag L, Mabley JG, Salzman AL, Szabo C. Protection against hemorrhagic shock in mice genetically deficient in poly(ADP-ribose)polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(18):10203-8.
- Liu SF, Crawley DE, Rohde JA, Evans TW, Barnes PJ. Role of nitric oxide and guanosine 3',5'-cyclic monophosphate in mediating nonadrenergic, noncholinergic relaxation in guinea-pig pulmonary arteries. *Br J Pharmacol.* 1992;107(3):861-6.
- Liu SH, Shan LM, Wang H. Pharmacological characteristics of novel putative purinoceptors in vascular endothelium. *Cell Biol Int.* 2002;26(11):963-9.
- Maeng O, Kim YC, Shin HJ, Lee JO, Huh TL, Kang KI, Kim YS, Paik SG, Lee H. Cytosolic NADP(+)-dependent isocitrate dehydrogenase protects macrophages from LPS-induced nitric oxide and reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;317(2):558-64.

- McCarthy DO, Kluger MJ, Vander AJ. Effect of centrally administered interleukin-1 and endotoxin on food intake of fasted rats. *Physiol Behav.* 1986;36(4):745-9.
- Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA, Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature.* 1997;388(6640):394-7.
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1991;43(2):109-42.
- Moore-Ede MC. Physiology of the circadian timing system: predictive versus reactive homeostasis. *Am J Physiol.* 1986;250(5 Pt 2):R737-52.
- Morrison DC, Ulevitch RJ. The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. A review. *Am J Pathol.* 1978;93(2):526-617.
- Murad F, Waldman S, Molina C, Bennett B, Leitman D. Regulation and role of guanylate cyclase-cyclic GMP in vascular relaxation. *Prog Clin Biol Res.* 1987;249(65-76).
- Nagy LE. Recent insights into the role of the innate immune system in the development of alcoholic liver disease. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(8):882-90.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *Faseb J.* 1992;6(12):3051-64.
- Nedelec E, Abid A, Cipolletta C, Presle N, Terlain B, Netter P, Jouzeau J. Stimulation of cyclooxygenase-2-activity by nitric oxide-derived species in rat chondrocyte: lack of contribution to loss of cartilage anabolism. *Biochem Pharmacol.* 2001;61(8):965-78.
- Nigro D, Fortes ZB, Scivoletto R, Barbeiro HV, Carvalho MH. Sex-related differences in the response of spontaneously hypertensive rats to angiotensin-converting enzyme inhibitor. *Endothelium.* 1997;5(1):63-71.
- Oda M, Han JY, Nakamura M. Endothelial cell dysfunction in microvasculature: relevance to disease processes. *Clin Hemorheol Microcirc.* 2000;23(2-4):199-211.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327(6122):524-6.
- Panzer U, Uguccioni M. Prostaglandin E2 modulates the functional responsiveness of human monocytes to chemokines. *Eur J Immunol.* 2004;34(12):3682-9.
- Park JI, Shin CY, Lee YW, Huh IH, Sohn UD. Endothelium-dependent sensory non-adrenergic non-cholinergic vasodilatation in rat thoracic aorta: involvement of ATP and a role for NO. *J Pharm Pharmacol.* 2000;52(4):409-16.
- Parker JL, Adams HR. Selective inhibition of endothelium-dependent vasodilator capacity by *Escherichia coli* endotoxemia. *Circ Res.* 1993;72(3):539-51.
- Parratt JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia. *J Antimicrob Chemother.* 1998;41 Suppl A(31-9).
- Pearson JD, Gordon JL. Vascular endothelial and smooth muscle cells in culture selectively release adenine nucleotides. *Nature.* 1979;281(5730):384-6.
- Pearson JD, Gordon JL. Nucleotide metabolism by endothelium. *Annu Rev Physiol.* 1985;47(617-27).
- Peters K, Unger RE, Brunner J, Kirkpatrick CJ. Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. *Cardiovasc Res.* 2003;60(1):49-57.
- Pintor J, Miras-Portugal T, Fredholm BB. Research on purines and their receptors comes of age. *Trends Pharmacol Sci.* 2000;21(12):453-6.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science.* 1998;282(5396):2085-8.
- Rackow EC, Astiz ME. Pathophysiology and treatment of septic shock. *Jama.* 1991;266(4):548-54.
- Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. *Pharmacol Rev.* 1998;50(3):413-92.
- Rojas M, Woods CR, Mora AL, Xu J, Brigham KL. Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005;288(2):L333-41.
- Rongen GA, Floras JS, Lenders JW, Thien T, Smits P. Cardiovascular pharmacology of purines. *Clin Sci (Lond).* 1997;92(1):13-24.
- Russo G, Leopold JA, Loscalzo J. Vasoactive substances: nitric oxide and endothelial dysfunction in atherosclerosis. *Vascul Pharmacol.* 2002;38(5):259-69.
- Shen Y, Connor TJ, Nolan Y, Kelly JP, Leonard BE. Differential effect of chronic antidepressant treatments on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavioural symptoms in the rat. *Life Sci.* 1999;65(17):1773-86.
- Simpson AJ, Smith MD, Weverling GJ, Suputtamongkol Y, Angus BJ, Chaowagul W, White NJ, van Deventer SJ, Prins JM. Prognostic value of cytokine concentrations (tumor necrosis factor-

- alpha, interleukin-6, and interleukin-10) and clinical parameters in severe melioidosis. *J Infect Dis.* 2000;181(2):621-5.
- Souza HP, Cardounel AJ, Zweier JL. Mechanisms of free radical production in the vascular wall. *Coron Artery Dis.* 2003;14(2):101-7.
- Stein D, Roth S, Vogelsang E, Nusslein-Volhard C. The polarity of the dorsoventral axis in the *Drosophila* embryo is defined by an extracellular signal. *Cell.* 1991;65(5):725-35.
- Suffredini AF, Fromm RE, Parker MM, Brenner M, Kovacs JA, Wesley RA, Parrillo JE. The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *N Engl J Med.* 1989;321(5):280-7.
- Swiergiel AH, Dunn AJ. Distinct roles for cyclooxygenases 1 and 2 in interleukin-1-induced behavioral changes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;302(3):1031-6.
- Szabo C. Multiple pathways of peroxynitrite cytotoxicity. *Toxicol Lett.* 2003;140-141(105-12).
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol.* 2004;16(1):3-9.
- Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21(335-76).
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999;11(4):443-51.
- Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, Morr M, Radolf JD, Zychlinsky A, Takeda K, Akira S. Discrimination of bacterial lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol.* 2001;13(7):933-40.
- Tannenbaum SR, Fett D, Young VR, Land PD, Bruce WR. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. *Science.* 1978;200(4349):1487-9.
- Tauszig S, Jouanguy E, Hoffmann JA, Imler JL. Toll-related receptors and the control of antimicrobial peptide expression in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(19):10520-5.
- Tesfaigzi Y, Rudolph K, Fischer MJ, Conn CA. Bcl-2 mediates sex-specific differences in recovery of mice from LPS-induced signs of sickness independent of IL-6. *J Appl Physiol.* 2001;91(5):2182-9.
- Thiemermann C. Nitric oxide and septic shock. *Gen Pharmacol.* 1997;29(2):159-66.
- Titheradge MA. Nitric oxide in septic shock. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411(2-3):437-55.
- Tran QK, Ohashi K, Watanabe H. Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc Res.* 2000;48(1):13-22.
- Tsan MF, Gao B. Endogenous ligands of Toll-like receptors. *J Leukoc Biol.* 2004;76(3):514-9.
- Umans JG, Wylam ME, Samsel RW, Edwards J, Schumacker PT. Effects of endotoxin in vivo on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta. *Am Rev Respir Dis.* 1993;148(6 Pt 1):1638-45.
- Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med.* 1990;323(1):27-36.
- Vo PA, Lad B, Tomlinson JA, Francis S, Ahluwalia A. autoregulatory role of endothelium-derived nitric oxide (NO) on Lipopolysaccharide-induced vascular inducible NO synthase expression and function. *J Biol Chem.* 2005;280(8):7236-43.
- Vodovotz Y, Liu S, McCloskey C, Shapiro R, Green A, Billiar TR. The hepatocyte as a microbial product-responsive cell. *J Endotoxin Res.* 2001;7(5):365-73.
- Wakabayashi I, Hatake K, Kakishita E, Nagai K. Diminution of contractile response of the aorta from endotoxin-injected rats. *Eur J Pharmacol.* 1987;141(1):117-22.
- Werling D, Jungi TW. TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003;91(1):1-12.
- Wu L, Ashraf MH, Facci M, Wang R, Paterson PG, Ferrie A, Juurlink BH. Dietary approach to attenuate oxidative stress, hypertension, and inflammation in the cardiovascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(18):7094-9.
- Wyllie DH, Kiss-Toth E, Visintin A, Smith SC, Boussouf S, Segal DM, Duff GW, Dower SK. Evidence for an accessory protein function for Toll-like receptor 1 in anti-bacterial responses. *J Immunol.* 2000;165(12):7125-32.
- Yao YM, Redl H, Bahrami S, Schlag G. The inflammatory basis of trauma/shock-associated multiple organ failure. *Inflamm Res.* 1998;47(5):201-10.
- Zweier JL, Samouilov A, Kuppusamy P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1411(2-3):250-62.