

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

RAFAELA STACHEWSKI

**Envolvimento da angiotensina II em parâmetros inflamatórios na sepse experimental**

Florianópolis

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

RAFAELA STACHEWSKI

**Envolvimento da angiotensina II em parâmetros inflamatórios na sepse experimental**

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação  
em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde  
da Universidade Federal de Santa Catarina  
como requisito para a obtenção do título de  
Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy.

Coorientadora: MSc Thiele Osvaldt Rosales.

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Stachewski, Rafaela  
Envolvimento da angiotensina II em parâmetros  
inflamatórios na sepse experimental / Rafaela Stachewski ;  
orientador, Jamil Assreuy, coorientador, Thiele Osvaldt  
Rosales, 2019.  
49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências:

1. Farmácia. 2. Sepses. 3. Pneumosepses. 4. Óxido Nítrico.  
5. Angiotensina II. I. Assreuy, Jamil. II. Osvaldt  
Rosales, Thiele. III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Rafaela Stachewski

**Envolvimento da angiotensina II em parâmetros inflamatórios na sepse experimental**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Bacharel em Farmácia e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 20 de novembro de 2019.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marení Rocha Farias  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Jamil Assreuy  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Regina de Sordi  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Msc. Elaine Leocádia Anton  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTOS

A Deus e a Santo Expedito, do qual sou grande devota, pela força, coragem e graças concedidas ao longo da graduação;

A meus amados pais, Aloísio e Aldanir, pelo amor e apoio incondicionais. Por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim. Sem vocês, nada seria possível;

Ao meu querido irmão, Aloísio Junior, minha maior alegria, motivação e saudade;

Ao meu namorado, Nicolas Gabriel, por ser meu parceiro e conselheiro em todos os momentos, mesmo às quatro horas da manhã. Por todo o amor, compreensão e apoio emocional (e nos experimentos);

Aos meus avós, pelo apoio e orações;

Aos meus sogros, Sérgio e Fabiana, pelos conselhos e confiança em mim depositada;

Ao meu professor e orientador Jamil Assreuy, pela oportunidade, orientação e acolhida no NOLab desde o primeiro momento;

A minha co-orientadora Thiele, pela amizade, paciência e ajuda. Por ser exemplo de mulher e de pesquisadora. Foi uma honra ser sua aluna de iniciação científica e aprender tanto com você;

A todos os integrantes e amigos que conheci no Laboratório de Farmacologia do Óxido Nítrico (NOLab): Adri, Camila, Clarissa, Dai, Deborah, Filipe, Graci, Hanna, Jheni e Malu. Obrigada pela excelente convivência e por serem sempre tão solícitos. Vocês tornaram esta caminhada muito mais agradável;

À minha grande amiga Yasmim Dalsenter, por todos os abraços, conselhos, filmes bregas e por compreender meus momentos de ausência;

Ao Junior Garcia de Oliveira, pelo auxílio nas dosagens de mieloperoxidase;

Ao professor Daniel Fernandes, pela ajuda com as estatísticas deste trabalho;

Aos membros da banca avaliadora;

Aos funcionários do biotério da Farmacologia e do LAMEB;

Ao CNPq.

Obrigada!

“A ciência nunca resolve um problema  
sem criar pelo menos outros dez.”

George Bernard Shaw

## RESUMO

A sepse é responsável por um número exorbitante de óbitos e internações, especialmente na rede pública de saúde. Ela é definida como a presença de disfunção orgânica que põe risco à vida, decorrente de resposta imune desregulada do organismo frente a uma infecção - principalmente provocada por bactérias gram-negativas como a *Klebsiella pneumoniae*. Um dos pontos que fundamenta a sepse é a hipotensão, ocasionada pela produção elevada de óxido nítrico (NO), e que culmina na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA). Esse mecanismo fisiológico classicamente regula a pressão arterial sistêmica através de seu mediador-chave, a angiotensina II (AngII). No entanto, a AngII vem sendo apontada como um agente pró-inflamatório relevante, por aumentar o recrutamento de células imunes para o local de infecção, por exemplo. Esse efeito é ocasionado a partir da ligação de AngII em receptores do tipo AT1 em vários órgãos, inclusive linfócitos e macrófagos. Assim, este trabalho investigou alguns indicadores inflamatórios durante a sepse induzida por pneumonia, mediante bloqueio de receptores AT1 com o losartana. Para isso, camundongos *Swiss* fêmeas receberam injeções do fármaco após a indução da sepse, numa dose de 1 mg/kg a cada 8 horas, durante 24 horas. Trinta horas após o início do experimento, os animais foram eutanasiados e se procedeu com as coletas do lavado broncoalveolar (BAL), sangue e biópsias de pulmões dos animais, para as posteriores análises. Foram avaliados os seguintes parâmetros: contagem total e diferencial de leucócitos no sangue; dosagens de AST, ALT, lactato e metabólitos do óxido nítrico (NOx) no plasma; contagem total de leucócitos e dosagens de NOx e proteínas no BAL; dosagem de mieloperoxidase pulmonar e expressão de NOS-2 nesse órgão. Foram utilizadas metodologias como contagem em câmara de Neubauer, ensaios de absorvância e *Western blotting*. A losartana, no esquema de dose utilizado, não apresentou efeitos sobre parâmetros inflamatórios. Considerando que a AngII é sabidamente um agente pró-inflamatório, mais estudos são necessários com outras doses e tempos de tratamento.

**Palavras-chave:** Sepse. Pneumosepse. Óxido Nítrico. Angiotensina II.

## ABSTRACT

Sepsis is responsible for an exorbitant number of deaths and hospitalizations, especially in the health public system. It is defined as the presence of life-threatening organ dysfunction resulting from the body's unregulated immune response to an infection - gram-negative bacteria such as *Klebsiella pneumoniae* are the major causes. One of the pillars supporting sepsis is hypotension, caused by the excessive production of nitric oxide (NO), which culminates in the activation of the renin-angiotensin-aldosterone system. This physiological mechanism classically regulates systemic blood pressure through its key mediator, Angiotensin II (AngII). However, AngII has been identified as a relevant pro-inflammatory agent, as it increases the recruitment of immune cells to the site of infection, for example. This effect is caused by binding of AngII to AT1 receptors in various organs, including lymphocytes and macrophages. Thus, this work aims to investigate the events related to some inflammatory indicators during pneumonia-induced sepsis by blocking AT1 receptors with losartan. For this, female Swiss mice received injections of the drug after sepsis induction at a dose of 1 mg / kg every 8 hours for 24 hours. Thirty hours after the beginning of the experiment, the animals were euthanized and the bronchoalveolar lavage (BAL), blood and lung biopsies were collected for further analysis. The following parameters were evaluated: total and differential blood leukocyte count; dosages of plasma AST, ALT, lactate and nitric oxide (NOx) metabolites; total leukocyte count and NOx and protein dosages in BAL; pulmonary myeloperoxidase dosage and NOS-2 expression in this organ. Methodologies such as Neubauer chamber counting, absorbance assays and Western blotting were used. Losartan in the dose used had no effect on inflammatory parameters. Considering that AngII is known to be a proinflammatory agent, further studies are needed with other doses and treatment times.

**Keywords:** Sepsis. Pneumosepsis. Nitric Oxide. Angiotensin II.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática das etapas de agravamento da sepse .....	13
Figura 2 – Esquema do Sistema-Renina-Angiotensina.....	19
Figura 3 –Estruturas químicas da losartana, captopril e alisquireno.....	22
Figura 4 – Desenho experimental, mostrando as etapas de indução da sepse, tratamento e coleta das amostras.....	26
Figura 5 – Efeito da losartana nos números de leucócitos totais no lavado broncoalveolar de camundongos normais e sépticos.....	32
Figura 6 – Efeito da losartana nos níveis de proteínas no lavado broncoalveolar de camundongos normais e sépticos.....	33
Figura 7 – Efeito da losartana nos níveis de nitrato e nitrito (NOx) no lavado broncoalveolar de camundongos normais e sépticos.....	34
Figura 8 – Efeito da losartana nos níveis de nitrato e nitrito (NOx) no plasma de camundongos normais e sépticos.....	35
Figura 9 – Efeito da losartana nos níveis plasmáticos de AST e ALT em camundongos normais e sépticos.....	36
Figura 10 – Efeito da losartana na contagem total de leucócitos no sangue dos camundongos normais e sépticos.....	37
Figura 11 – Efeito da losartana na contagem de leucócitos polimorfonucleares no sangue dos camundongos normais e sépticos.....	38
Figura 12 – Efeito da losartana na atividade de mieloperoxidase nos pulmões dos camundongos normais e sépticos.....	39
Figura 13 – Efeito da losartana nos níveis da NOS-2 nos pulmões dos camundongos normais e sépticos.....	40

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Avaliação sequencial de falência de órgãos - SOFA.....	14
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ACCP** *American College of Chest Physician*

**ALT** Alanina aminotransferase

**ANOVA** Análise de variância

**AngII** Angiotensina II

**AST** Aspartato aminotransferase

**ATCC** Coleção de cultura do tipo americana (*American Type Culture Collection*)

**AVC** Acidente Vascular Cerebral

**BAL** Lavado broncoalveolar (*Bronchoalveolar lavage*)

**BHI** Infusão Cérebro-coração (*Brain-heart Infusion*)

**BSA** Soro albumina bovina

**CEUA** Comitê de Ética para Uso de Animais

**DMO** Disfunção múltipla de órgãos

**D.O** Densidade óptica

**ECA** Enzima Conversora de Angiotensina

**EDTA** Ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

**EPM** Erro padrão da média

**FIO<sub>2</sub>** Fração de Oxigênio Inspirado

**HAS** Hipertensão Arterial Sistêmica

**HRP** *Horseradish* peroxidase

**HTAB** Hexadeciltrimetilamônio

**IgG** Imunoglobulina G

**IL** Interleucina

**ILAS** Instituto Latino Americano de Sepsis

**i.t.** Intratraqueal

**i.p.** Intrapertoneal

**LPS** Lipopolissacarídeo

**MCP-1** Proteína quimioatratadora de monócitos tipo 1

**MPO** Mieloperoxidase

**NF- $\kappa$ B** Fator de transcrição nuclear  $\kappa$ B (*Nuclear Factor Kappa B*)

**NO** Óxido nítrico

**NOLab** Laboratório de Farmacologia do Óxido Nítrico

**NOS** Óxido nítrico sintase

**NOS-1** Óxido nítrico sintase neuronal

**NOS-2** Óxido nítrico sintase induzida

**NOS-3** Óxido nítrico sintase endotelial

**NOx** Nitrato + nitrito: metabólitos do óxido nítrico

**pO<sub>2</sub>** Pressão arterial parcial de oxigênio

**P.A.M** Pressão Arterial Média

**PAMPs** Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*)

**PBS** Tampão salina fosfatado (*Phosphate buffered saline*)

**PCR** Proteína C Reativa

**qSOFA** *Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment*

**pH** Potencial hidrogeniônico

**PMSF** Fluoreto de fenil-metano-sulfonil

**SCCM** *Society of Critical Care Medicine*

**SIRS** Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

**SOFA** Avaliação sequencial de disfunção orgânica (*Sequential Organ Failure Assessment*)

**SRA** Sistema Renina Angiotensina

**SRAA** Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

**SUS** Sistema Único de Saúde

**TLR-4** Receptor do tipo Toll-4

**TMB** Tetrametilbenzidina

**TNF-alfa** Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor-alpha*)

**T-Per** *Tissue Protein Extraction Reagent*

**U.A.** Unidades Arbitrárias

**UFC** Unidades formadoras de colônia

**UFSC** Universidade Federal de Santa Catarina

**USA** Estados Unidos da América (*United States of América*)

**UTI** Unidade de terapia intensiva

**V** Volts

## SUMÁRIO

<b>1.1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.2	SEPSE.....	12
<b>1.1.2</b>	<b>Histórico.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Epidemiologia .....</b>	<b>15</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Fisiopatogenia .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.4</b>	<b>Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona .....</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>22</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1	MATERIAIS.....	24
<b>4.1.1</b>	<b>Animais .....</b>	<b>24</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Preparo da solução de Losartana Potássica para o ensaio farmacológico.....</b>	<b>24</b>
4.2	MÉTODOS.....	24
<b>4.2.1</b>	<b>Modelo Experimental de Sepsis por Pneumonia .....</b>	<b>24</b>
<i>4.2.1.1</i>	<i>Expansão e preparação da suspensão bacteriana .....</i>	<i>24</i>
<i>4.2.1.2</i>	<i>Execução do modelo de pneumonia .....</i>	<i>25</i>
<b>4.2.2</b>	<b>Protocolos experimentais.....</b>	<b>25</b>
<i>4.2.2.1</i>	<i>Desenho experimental.....</i>	<i>25</i>
<i>4.2.2.2</i>	<i>Coleta de sangue, BAL e tecidos .....</i>	<i>26</i>
<i>4.2.2.3</i>	<i>Contagem Total de Células no BAL .....</i>	<i>27</i>
<i>4.2.2.4</i>	<i>Dosagem de proteínas totais no BAL .....</i>	<i>27</i>
<i>4.2.2.5</i>	<i>Contagem Total e Diferencial de Células no sangue .....</i>	<i>27</i>
<i>4.2.2.6</i>	<i>Dosagem de nitrito e nitrato (NOx) no plasma e BAL .....</i>	<i>28</i>
<i>4.2.2.7</i>	<i>Dosagem de mieloperoxidase tecidual .....</i>	<i>28</i>

4.2.2.8	<i>Dosagem plasmática de lactato, aspartatoaminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)</i> .....	29
4.2.2.9	<i>Avaliação da expressão de NOS-2 nos pulmões por Western blotting</i> .....	29
4.2.2.10	<i>Análise dos dados</i> .....	31
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
5.1	Contagem total de leucócitos no BAL .....	31
5.2	DOSAGEM DE PROTEÍNAS NO BAL.....	32
5.3	DOSAGEM DE NO <sub>x</sub> NO BAL .....	33
5.4	DOSAGEM DE NO <sub>x</sub> NO PLASMA.....	34
5.5	MENSURAÇÃO DE AST E ALT NO PLASMA .....	35
5.6	CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS NO SANGUE.....	36
<b>5.7</b>	CONTAGEM DE POLIMORFONUCLEARES NO SANGUE .....	37
5.8	DOSAGEM TECIDUAL DE MIELOPEROXIDASE PULMONAR .....	38
5.9	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA NOS-2 NOS PULMÕES POR <i>WESTERN BLOTTING</i> .....	39
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>45</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 SEPSE

#### 1.1.1 Histórico

Apesar do termo “Sepse” estar em evidência nas pesquisas científicas atuais e nas notícias globais que tangem sua agressividade e mortalidade, a origem do termo é bastante antiga, tendo evoluído juntamente com os avanços da microbiologia. Muito do que sabemos provém dos conhecimentos do médico e filósofo grego Hipócrates. No século IV a.C, ele sugeriu o termo “pepsis” para representar a fermentação, e o termo “sepsis” para descrever o estado de putrefação da matéria orgânica na presença de bactérias. Esses dois conceitos referiam-se a duas maneiras de degradação biológica, complementares e correlacionadas – similar ao princípio chinês da dualidade da existência Yin e Yang (MAJNO, 1991). Pasteur sugeriu, no século XIX, que os processos infecciosos decorriam de microrganismos, e Semmelweis postulou o protocolo de assepsia das mãos antes da realização de procedimentos médicos após observar resultados estatísticos que comprovavam a diminuição na prevalência de infecções adotando essa medida (CALLEGARI, 2010; VIANA; MACHADO; SOUZA, 2017). Assim, acreditava-se que os patógenos eram os causadores exclusivos da sepse, até ser observada a presença destes na corrente sanguínea. Além disso, a teoria de que só a invasão do hospedeiro por bactérias fundamentava o processo séptico perdeu sua força atualmente, tendo em vista o grande número de óbitos mesmo fazendo uso de antibióticos inovadores que promovem eliminação efetiva do patógeno inicial (revisado por NAMAS et al., 2012). Assim, os pesquisadores sugeriram que a resposta do hospedeiro (e não somente o ‘germe’) sustenta um pilar importante no estabelecimento dessa condição clínica (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

Foi somente em 1991 que ocorreu uma conferência (posteriormente reconhecida como *Sepsis-1*) onde se estabeleceu conceitos mais objetivos sobre o assunto. Ficou definido que a sepse consistia na ‘síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) decorrente da ação de um agente infeccioso’, sendo a SIRS fundamentada na presença de pelo menos dois dos seguintes parâmetros: taquipneia, taquicardia, febre ou hipotermia e leucocitose, leucopenia ou neutrofilia. Ainda, outras definições foram propostas nesse consenso, como “sepse grave” e “choque séptico”. A sepse grave associava a sepse propriamente dita a uma disfunção orgânica ou hipoperfusão. Ainda, o choque séptico consistia na evolução dos quadros anteriores, culminando num estado de falência circulatória devido à hipotensão refratária à reposição

volêmica. Apesar dos desafios para diferenciar SIRS de sepse, essa gama de definições perdurou por mais de vinte anos até ser reformulada. No ano de 2001, houve o *Sepsis-2*, que expandiu alguns critérios diagnósticos, no entanto sem apresentar novas definições clínicas (SINGER et al., 2016).

Em 2016, especialistas de diferentes áreas que compunham o *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e o *American College of Chest Physician* (ACCP) reuniram-se para atualizar essas definições e formularam o consenso *Sepsis-3*, com base em conhecimentos novos da morfologia, bioquímica, biologia, imunologia e disfunção orgânica verificados durante a sepse. Desse modo, a definição atualmente adotada para sepse é: ‘presença de disfunção orgânica ameaçadora à vida, causada por resposta imune desregulada do organismo frente à infecção’ – sendo justamente essa disfunção o que diferencia a sepse de uma infecção não complicada. Já o choque séptico consiste no agravamento do quadro de sepse, onde as anormalidades circulatórias, metabólicas e celulares são graves o suficiente para elevar a taxa de mortalidade - já que o choque pode levar à disfunção múltipla de órgãos (DMO), pelo comprometimento da perfusão tecidual. No choque séptico, clinicamente, os pacientes estão hipotensos, apresentam níveis séricos de lactato superiores a 2 mmol/L e necessitam de agentes vasopressores para a manutenção da pressão arterial média (P.A.M) acima de 65 mmHg (SINGER et al., 2016).

O termo “sepse grave” caiu em desuso, bem como os critérios de SIRS para a definição do quadro séptico pois alterações na contagem de leucócitos, temperatura ou frequência cardíaca podem ser apenas indicativos de uma infecção comum, a qual não necessariamente irá evoluir para disfunção orgânica letal. Além de tudo, vale ressaltar que a simplificação da nomenclatura agiliza o diagnóstico. As etapas de agravamento do quadro séptico, segundo o Sepsis-3 são mostradas na Figura 1.

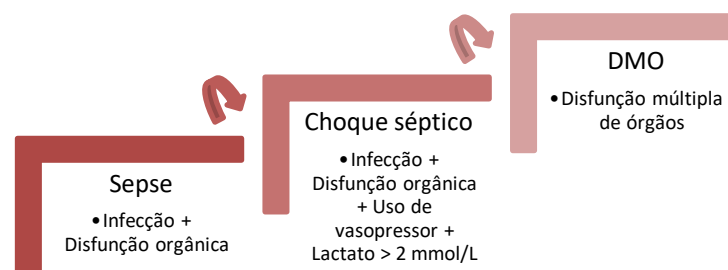


Figura 1. Esquema mostrando as etapas de agravamento da sepse até chegar à disfunção múltipla de órgãos, segundo definições estabelecidas pelo Sepsis-3. Adaptado de <https://docplayer.com.br/53623990-Sepse-na-utiliza-00-professor-maikon-maciel-professor-maikon-maciel-1.html>



Outro ponto definido pelo *Sepsis-3* foi a valorização de uma “pontuação” conhecida como Avaliação Sequencial de Falência Orgânica (SOFA, do inglês *Sequential Organ Failure Assessment*), no intuito de auxiliar o manejo clínico e facilitar estudos epidemiológicos, através da quantificação de anormalidades nos sistemas respiratório, circulatório, hepático, cardiovascular, nervoso e renal, mediante a realização de exames clínicos (SINGER et al., 2016). O aumento agudo desse escore em dois ou mais pontos caracteriza disfunção orgânica (e consequentemente sepse), conforme mostrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Avaliação sequencial de falência orgânica (SOFA).

Variável	SOFA 0	SOFA 1	SOFA 2	SOFA 3	SOFA 4
pO <sub>2</sub>	≥ 400	< 400	< 300	< 200	< 100
Plaquetas x10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup>	≥ 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Bilirrubina (mg/dL)	1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 5,9	6,0 – 11,9	> 12,0
Cardiovascular	P.A.M > 70	P.A.M < 70	Dopamina < 5 µg ou dobutamina em qualquer dose	Dopamina 5 - 15 µg ou adrenalina ≤ 0,1 µg ou noradrenalina ≤ 0,1 µg	Dopamina > 15 µg ou adrenalina ≤ 0,1 µg ou noradrenalina > 0,1 µg
Escala de coma de Glasgow	15	13-14	10-12	6-9	< 6
Creatinina (mg/dL), ou diurese (mL/dia)	≤ 1,2	1,2 – 1,9	2,0 – 3,4	3,5 – 4,9 Diurese < 500 mL/dia	> 5,0 Diurese < 200 mL/dia

pO<sub>2</sub>: pressão arterial parcial de oxigênio; FIO<sub>2</sub>: Fração de oxigênio inspirado; P.A.M: pressão arterial média; Escala de coma de Glasgow: contempla a pontuação de 3 a 15, quanto maior a pontuação, melhor está a função neurológica do paciente. Fonte: Adaptado de Singer *et al.*, 2016.

Fora desenvolvido também a simplificação *quickSOFA* (*qSOFA*, do inglês, *Quick Sepsis-related Organ Failure Assessment*), no intuito de permitir uma triagem mais rápida de pacientes sépticos, uma vez que os exames requeridos pelo SOFA necessitam de tempo hábil para serem realizados – que não existe quando o enfermo está à beira do leito. O *qSOFA* considera quadro séptico quando são verificados: pressão arterial sistólica < 100 mmHg, frequência respiratória < 22/min e rebaixamento do nível de consciência (dada pela Escala de coma de Glasgow < 15). No entanto, segundo o Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS), a utilização do critério SOFA e particularmente da hiperlactatemia como fator determinante do quadro de choque séptico não são viáveis em muitos países, particularmente nos locais de maior letalidade. Ainda, o ILAS sugere que o *qSOFA* não deve ser utilizado como método de triagem

– e somente como escore de gravidade - devido a sua falta de sensibilidade (CAVALCANTI, 2019).

O ILAS, fundado em 2005 com o intuito de difundir informações sobre a sepse, é uma entidade sem fins lucrativos que visa melhorar a assistência a pacientes internados e sobreviventes da sepse, mediante estudos clínicos, propostas de diretrizes de prática clínica e divulgação de campanhas como a “Sobrevivendo à Sepse”. Apesar desses incessantes esforços, o modo de tratar a sepse é o mesmo de décadas atrás, consistindo basicamente em antibioticoterapia e suporte hemodinâmico, já que não existe nenhum tratamento específico (LAGU et al. 2012).

### **1.1.2 Epidemiologia**

A sepse é responsável por cerca de 17 milhões de ocorrências anuais em todo o mundo. Pneumonias, infecções abdominais, urinárias, cutâneas e relacionadas a cateteres são as causas mais frequentes dessa patologia (ANGUS; VAN DER POLL, 2013; VIANA; MACHADO; SOUZA, 2017).

A fisiopatologia da sepse é bastante complexa. A infecção que origina essa condição clínica pode ser proveniente de bactérias, vírus, fungos ou protozoários, mas são as bactérias gram-negativas as responsáveis por mais de 41% dos casos, de acordo com o registro internacional de sepse (BEALE et al., 2009). São exemplos importantes de bactérias gram-negativas a *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*.

Mais de duzentas mil mortes de pacientes adultos são reportadas anualmente no Brasil, principalmente em unidades de terapia intensiva (UTIs) de hospitais públicos vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS). A realização dos exames necessários e o tempo de internação desses pacientes acarretam grande ônus financeiro. Além disso, a maioria dos hospitais públicos não dispõe dos recursos requeridos para o tratamento desses indivíduos, como a dosagem de lactato, realização de culturas de microrganismos básicos e administração de antimicrobianos (MACHADO et al, 2017). Assim, a sepse se consolida como um relevante problema de saúde pública.

No estudo de Machado e colaboradores (2017), foi verificado que 30,2% dos leitos de UTIs brasileiras são ocupados por pacientes com sepse, dentre as 300 unidades avaliadas. Também ficou demonstrado que esses pacientes respondem por um índice de mortalidade de

55,7%. Outro estudo, de caráter observacional, desenvolvido na UTI do Hospital Universitário João de Barros Barreto em Belém, entre janeiro de 2009 a dezembro de 2010 demonstrou alguns fatores de risco determinantes no agravamento do quadro séptico, por exemplo: ter idade superior a 65 anos, apresentar comorbidades como neoplasias, hipertensão arterial sistêmica (HAS) e estar sujeito a procedimentos invasivos (BARROS; MAIA; MONTEIRO, 2016).

### 1.1.3 Fisiopatogenia

A interação entre microrganismos e processos imunes é mediada tanto pela resposta imune inata quanto pela imunidade adaptativa. O chamado processo inflamatório visa conter microrganismos com os quais temos contato o tempo todo e desde o início da vida, para evitar infecções constantes, quadros fulminantes e auxiliar na recuperação do organismo como um todo (TANIGUCHI, 2019). A palavra ‘inflamação’ provém do dialeto latim *inflamare* e do grego *phlogos*, que significam literalmente “pegar fogo”, fazendo alusão à reação tecidual frente a agente agressor, com conseqüente extravasamento de líquidos e células sanguíneas. O curso do processo inflamatório chama a atenção desde a antiguidade – onde os gregos já se atentavam aos seus sinais de *calor*, *rubor*, *tumor* e *dor*. Médicos romanos sugeriram que alterações funcionais também compunham as inflamações (BRASILEIRO FILHO, 2017). Porém, mesmo sendo um mecanismo defensivo, o quadro inflamatório quando não resolvido pode ser bastante danoso.

Eventualmente, os microrganismos invasores conseguem ultrapassar as barreiras de defesa do organismo e desencadear uma infecção. Quando o contato entre microrganismo e resposta imune se dá de maneira inadequada, pode acontecer a chamada descompartimentalização do processo inflamatório – na qual uma infecção inicialmente originada no trato respiratório, por exemplo, torna-se sistêmica e culmina em disfunção endotelial e microcirculatória. Esses danos podem conduzir a um quadro de hipoperfusão geral que se estende em disfunção orgânica – o que atualmente conhecemos como sepse (TANIGUCHI, 2019).

Na sepse nem sempre se verifica a presença de bactérias viáveis na corrente sanguínea, mas sim de padrões moleculares associados a patógenos (ou PAMPs, do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) como é o caso do lipopolissacarídeo (LPS) (ANGUS, 2011). Diferentemente das bactérias gram-positivas (que possuem parede celular composta principalmente de peptidoglicanos e ácido lipoteicóico), a parede celular de bactérias gram-

negativas apresenta uma fração externa de LPS, fator que determina sua toxicidade e antigenicidade (NOGUEIRA; SOUZA, 2009). Os PAMPs são reconhecidos por macrófagos e neutrófilos através de receptores do tipo Toll-4 (TLR-4), culminando na ativação de um sistema de sinalização intracelular, cujas vias convergem para o fator de transcrição nuclear-kB (NF-kB), em sua maioria. O NF-kB ativa e sinaliza a produção de genes anti e pró-inflamatórios como a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ), IL-1, fator de necrose tumoral-alfa e da enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS-2). Consequentemente, é verificado um aumento na permeabilidade vascular e no recrutamento de leucócitos para os tecidos, amplificando a inflamação (CINEL; OPAL, 2009; HOTCHKISS et al., 2016; LIU et al., 2017).

A NOS-2 é encontrada em macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, entre outros tipos celulares, sendo uma das enzimas responsáveis pela produção do óxido nítrico (NO) frente à estímulos como citocinas e metabólitos bacterianos (FLEMING, 1999). O NO é um mediador crucial no desenrolar da fisiopatologia da sepse, e sua produção excessiva está diretamente relacionada à hipotensão, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores e, consequentemente, à disfunção cardiovascular, renal e pulmonar verificadas em pacientes sépticos (EVANS et al., 1993; revisado em ASSREUY, 2006). Ele é originado a partir do aminoácido L-arginina, abundante no citoplasma de células endoteliais, a partir da ação enzimática da NOS. São descritas três isoformas dessa enzima: a neuronal (NOS-1), a endotelial (NOS-3) e a induzida (NOS-2), sendo as duas primeiras expressas constitutivamente, enquanto a última normalmente é expressa por ação de citocinas (FORSTERMANN; SESSA, 2011).

Como já citado anteriormente, os pacientes sépticos mostram um quadro de hipotensão, fator que sabidamente ativa sistema endógenos potentes para correção da pressão arterial. Dois destes sistemas são o sistema nervoso simpático (ou adrenérgico) e o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA; Figura 2). Este último, e foco deste trabalho, é o sistema fisiológico responsável pelo controle do balanço hidroeletrólítico. Além da queda da pressão sanguínea, ocorrências como o uso de agonistas de receptores beta-adrenérgicos, redução da perfusão renal pré-glomerular ou diminuição no fluxo de cloreto de sódio pela mácula densa (estrutura adjacente às células justaglomerulares renais) também estimulam a ativação desse sistema (RIBEIRO; FLORÊNCIO, 2000; RANG E DALE, 2016).

#### 1.1.4 Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

Há mais de um século, Tigerstedt e Bergman perceberam que extratos renais possuíam uma substância passível de elevar a pressão arterial, à qual atribuíram o nome de ‘renina’. Goldblatt e seu grupo demonstraram que essa substância era liberada quando havia hipotensão. Em 1940, Braun-Menéndez, Page e Helmer concluíram que a renina era uma enzima, e que a atividade vasoconstritora na verdade era proveniente do peptídeo formado a partir da ação enzimática da renina sobre um substrato plasmático (GOODMAN; GILMAN, 2012). Ao peptídeo foi atribuído o nome angiotensina, enquanto o substrato plasmático passou a se chamar angiotensinogênio. Em 1950, diferenciou-se a angiotensina I da angiotensina II (Ang II), sendo a última a molécula mais ativa (CHAPPELL, 2012). A hipoperfusão renal estimula a liberação de renina pelos rins. A renina é uma enzima que converte o angiotensinogênio (uma globulina liberada pelo fígado) em angiotensina I. Esta, por sua vez, é um decapeptídeo que é transformado em Ang II, agora com oito aminoácidos, mediante ação da enzima conversora de angiotensina (ECA). A ECA é encontrada no lúmen de células endoteliais, particularmente em capilares pulmonares e renais. A Ang II é o principal efetor do sistema renina-angiotensina (SRA), alcançando seus órgãos-alvo através da corrente sanguínea e desencadeando resposta fisiológica vasoconstritora. Ela consegue elevar rapidamente a pressão arterial, porém pode também promover uma resposta pressora lenta ao favorecer a liberação de aldosterona pela glândula suprarrenal, promovendo reabsorção de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  e bicarbonato e excreção de  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$  nos túbulos contorcidos distais. Além de aumentar a pressão sanguínea, a Ang II pode ainda promover remodelamento vascular, tendo grande destaque em patologias como a aterosclerose, insuficiência cardíaca, hipertensão e inflamação (revisado em MARCHESI *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2008; GOODMAN; GILMAN, 2012).

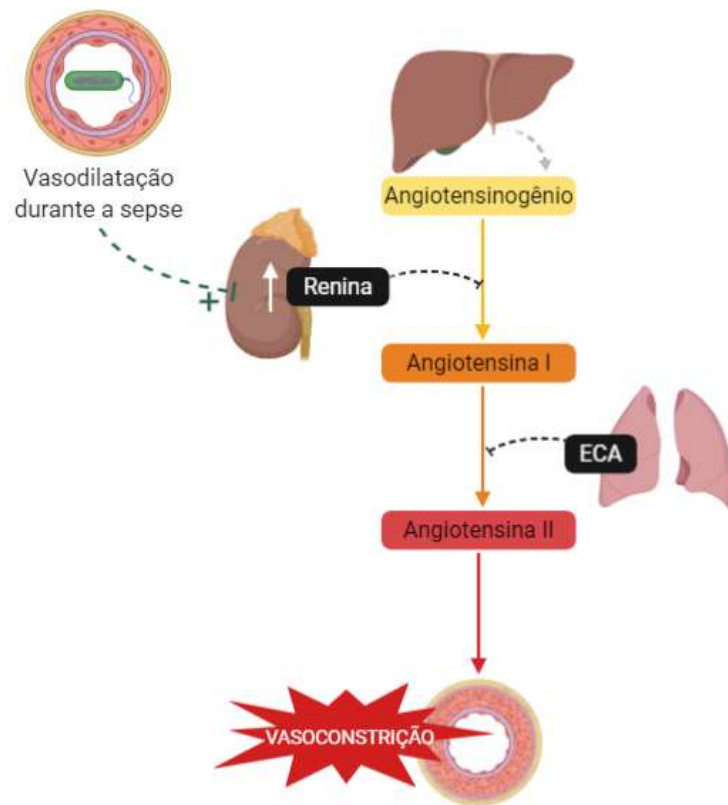


Figura 2. Representação do Sistema Renina-Angiotensina durante a sepse, bem como seus órgãos efetores. Adaptado de Diagnóstico Lab, 2017.

Em 2000, pesquisadores observaram a existência da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), homóloga à ECA, porém responsável por converter a Ang II em angiotensina 1-7. Esta por sua vez promove vasodilatação, contrapondo-se aos efeitos da Ang II (DONOGHUE et al., 2000; ANGUIANO et al., 2017).

A nível molecular, a Ang II medeia seus efeitos através da ligação em receptores AT1 e AT2, pertencentes à classe de receptores acoplados à proteína G. Receptores dessa classe são encontrados na membrana das células, como também no seu interior (GOBEIL et al., 2006; JONG; HARMON; O'MALLEY, 2018). Grande parte dos efeitos biológicos da Ang II decorre da sua interação com receptores AT1 - amplamente distribuídos nos pulmões, fígado, cérebro, glândulas suprarrenais, rins, coração e vasos sanguíneos, culminando em efeitos vasoconstritores, de remodelamento vascular e até mesmo pró-inflamatórios. Os receptores tipo AT2 possuem expressão aumentada em fetos e em algumas regiões cerebrais, e se sugere que os efeitos cardiovasculares derivados da ativação desse tipo de receptor sejam opostos aos verificados com o receptor AT1 (SCHULMAN; RAIJ, 2008). Portanto, a ideia de que o SRA consiste apenas em um sistema endócrino é bastante obsoleta, já que atualmente são descritos

SRA teciduais – cuja Ang II produzida relaciona-se a processos de hipertrofia, proliferação celular e inflamação, por exemplo (GOODMAN; GILMAN, 2012; CIUCEIS *et al.*, 2005). Vários componentes do SRA são expressos em células imunes, inclusive receptores de AngII são encontrados em linfócitos e macrófagos (CHANG; WEI, 2015).

Além de efeitos no sistema circulatório, a Ang II vem sendo descrita como um agente pró-inflamatório em potencial. Mediante estímulo de receptores AT1, ela pode aumentar o rolamento, adesão e migração dos leucócitos, evento importante na inflamação. Isso é possível graças à sua ação direta sobre alguns mediadores pró-inflamatórios vasculares como selectinas, integrinas, moléculas de adesão, citocinas e quimiocinas (CIUCEIS *et al.*, 2005; MARCHESI *et al.*, 2008). As selectinas são moléculas similares à lectina expressa em leucócitos e plaquetas, e medeiam as interações iniciais entre leucócitos e endotélio que dão início à inflamação. As integrinas são um tipo de receptor de superfície celular, que possibilitam a ligação entre leucócitos ativados e moléculas de adesão em células residentes vasculares. Já as citocinas são proteínas de baixo peso molecular que ativam células inflamatórias, enquanto quimiocinas estão principalmente envolvidas na quimiotaxia leucocitária. Podemos citar como exemplo dessas quimiocinas, a MCP-1 (proteína quimioatratadora de monócitos tipo 1), TNF-alfa, IL-6, e IL-8 (CHANG; WEI, 2015; revisado em FERRAZ; FERNANDEZ, 2014, revisado em STORCH *et al.*, 2017). Ainda, a Ang II pode aumentar os níveis da proteína C reativa (PCR) em macrófagos, um clássico marcador de inflamação aguda, via receptor AT1 com consequente ativação de NF-κB. Tudo isso pode induzir uma inflamação nas paredes vasculares, com deposição de matriz extracelular e consequente hiperplasia de células musculares, exemplificando o envolvimento da Ang II nos processos de remodelamento e proliferação vascular. Além disso, alguns estudos já demonstraram que a Ang II está envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes, inclusive na artrite reumatoide (CHANG; WEI, 2015).

Atualmente, diversos fármacos disponíveis para uso clínico atuam sobre o SRA. São exemplos os medicamentos inibidores da ECA, inibidores da renina e também os antagonistas de receptores AT1 (GOODMAN; GILMAN, 2012).

O mecanismo de ação dos inibidores da ECA consiste em bloquear a conversão de angiotensina I em Ang II. No entanto, essa enzima não é específica para a angiotensina I, atuando também na degradação da bradicinina através da clivagem de unidades dipeptídicas. Assim, pode ocorrer um acúmulo desse substrato nas vias aéreas, provocando tosse seca em até

20% dos pacientes. Temos como representantes dessa classe o lisinopril, o captopril e o enalaprilato – cujas estruturas já são biologicamente ativas – e o enalapril, por exemplo, um pró-farmaco que requer a ação de esterases para tornar-se ativo (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Os inibidores diretos da renina compõem uma classe de fármacos anti-hipertensivos relativamente nova. A inibição bastante específica da renina impossibilita sua ação sobre o seu único substrato - o angiotensinogênio - bloqueando o restante da via. O alisquireno é o primeiro e único fármaco aprovado dessa classe, sendo bem tolerado e recomendado para pacientes que não respondem a outros anti-hipertensivos (GOODMAN; GILMAN, 2012).

Já os antagonistas de receptores AT1 atuam diretamente a nível desse receptor, de maneira reversível e competitiva. No entanto, pelo fato de se ligarem ao receptor AT1 com grande afinidade e seletividade, ocorre uma estimulação aumentada do AT2 - isso pode explicar parte dos efeitos benéficos antiproliferativos e antifibróticos verificados no tratamento com antagonistas de receptores AT1 (CHANG; WEI, 2015). São exemplos a losartana, valsartana e candesartana. (GOODMAN; GILMAN, 2012). Antagonistas do receptor AT1 são conhecidos por possuírem ações anti-inflamatórias. As estruturas químicas de alguns fármacos que atuam sobre o SRA estão representadas na figura 3.

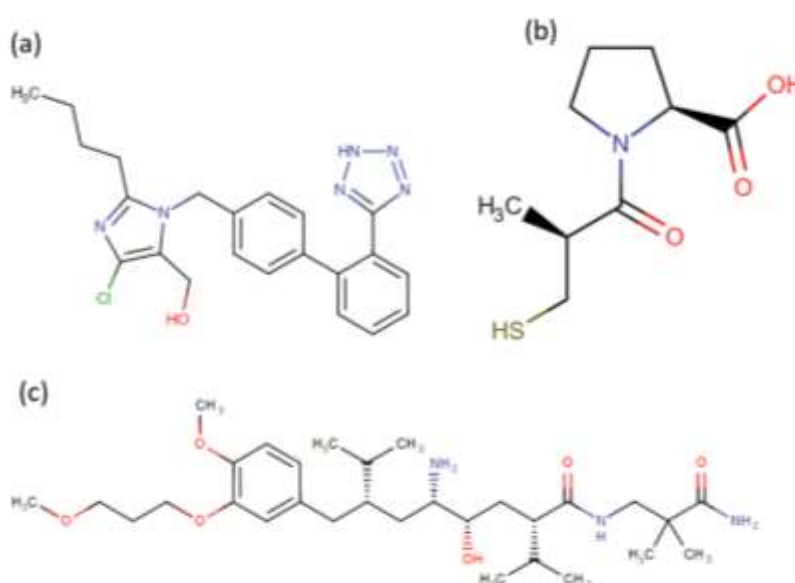


Figura 3. Estruturas químicas de (a) losartana, (b) captopril e (c) alisquireno.  
Fonte: drugbank.ca



A losartana, especificamente, é um fármaco sintético destinado ao tratamento da hipertensão, mas pode ser prescrita visando reduzir o risco de acidentes vasculares cerebrais (AVC) ou conter a progressão de danos renais em pacientes portadores de diabetes tipo 2. Para reduzir a pressão arterial em seres humanos, a posologia recomendada é de 50 mg uma vez ao dia, via oral. A nível farmacocinético, é bem absorvida, apresentando 33% de biodisponibilidade via oral, e quando distribuída na circulação sanguínea pode se ligar intensamente a proteínas plasmáticas, porém não se acumula significativamente no plasma. A meia-vida final reportada para a losartana é de aproximadamente 2 horas, e de 6 a 9 horas para seu metabólito ativo. Seu metabolismo consiste na transformação em um aldeído intermediário e posteriormente em ácido carboxílico – sendo essa a forma ativa da molécula – por enzimas do citocromo P450, como a CYP3A4, CYP2C9 e CYP2C10. Cerca de 14% da losartana é convertida para sua forma ativa, porém a molécula também pode sofrer hidroxilação de modo a formar um metabólito inativo. A nível farmacodinâmico, não exerce nenhum efeito agonista. Cerca de 4% desse fármaco é excretado inalterado na urina, e 6% na forma de metabólito ativo (LOSARTANA POTÁSSICA, 2019).

Conhecendo a importância da Ang II na inflamação, fármacos que modulam o SRA vêm ganhando maior visibilidade e adquirindo facetas que não foram exploradas inicialmente (MARCHESI *et al.*, 2008). Porém, alguns trabalhos que demonstram o papel anti-inflamatório do bloqueio da Ang II em modelos experimentais utilizam doses muito elevadas de antagonistas do receptor AT1 ou de inibidores da ECA, resultando em hipotensão excessiva, o que complica a interpretação dos resultados (PACHECO, 2009). Na sepse, particularmente, onde já é verificado um quadro geral de hipotensão e hiporresponsividade a vasoconstritores, um tratamento com dose muito elevada não é coerente.

Assim, o principal objetivo deste trabalho é investigar alterações inflamatórias decorrentes do tratamento com uma dose baixa de losartana potássica em camundongos submetidos a sepse por pneumonia.

## 2 JUSTIFICATIVA

Este trabalho de conclusão de curso vincula-se à linha de pesquisa “Disfunção cardiovascular da sepse: mecanismos, consequências fisiopatológicas e possibilidades terapêuticas”, do Laboratório de Farmacologia do Óxido Nítrico (NOLab), Departamento de Farmacologia, UFSC.

Apesar da sepse ser uma afecção conhecida há séculos, ainda não existem tratamentos específicos que auxiliem no manejo de pacientes nesse estado crítico, de modo que a terapêutica instituída apenas tenta eliminar o patógeno inicial e manter a condição hemodinâmica estável. O elevado número de óbitos causado pelo choque séptico, somado ao ônus financeiro decorrente do tempo de internação desses pacientes, clama por pesquisas de novas terapias.

Na sepse, toda a disfunção orgânica verificada decorre de um ambiente pró-inflamatório, fundamentado na liberação de mediadores endógenos como o NO e citocinas inflamatórias. Nesse quadro clínico ocorre hipotensão, proveniente da produção exacerbada de NO, sendo verificada uma clássica ativação do SRA. O efector chave desse sistema é a Ang II, que além de ser um poderoso vasoconstritor (com atividade cerca de 40 vezes superior à da noradrenalina) também vem sendo descrito como um agente pró-inflamatório, mediante ligação em receptores chamados AT1 em órgãos endócrinos, mas também em células imunes, aumentando o recrutamento das mesmas, por exemplo.

Dessa forma, estudar o envolvimento do SRA sobre parâmetros inflamatórios, visando o bloqueio dos receptores AT1 com auxílio de um fármaco antagonista (losartana potássica) pode ampliar a compreensão da fisiopatologia da sepse, e eventualmente compor novos esquemas de tratamento.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito do tratamento com uma baixa dose de losartana em parâmetros inflamatórios de camundongos submetidos a sepse por pneumonia.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar os seguintes parâmetros, nos animais controles e sépticos:

- I) Contagem total de leucócitos no sangue e lavado broncoalveolar (BAL);
- II) Contagem diferencial de leucócitos no sangue total;
- III) Quantificação de proteínas no BAL;
- IV) Dosagem da mieloperoxidase pulmonar;
- V) Dosagens plasmáticas de lactato, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT);
- VI) Produção de NO através da dosagem de seus metabólitos (nitrito e nitrato, NOx), no plasma e BAL;

- VII) Quantificação e expressão da enzima NOS-2 nos pulmões dos camundongos, através da técnica de *Western blotting*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAIS**

#### **4.1.1 Animais**

Para a realização do vigente estudo, foram utilizados camundongos Swiss fêmeas (*Mus musculus*) com três meses de idade e pesando entre 35 a 40 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Esses animais passaram inicialmente por tratamento com albendazol e suplemento vitamínico, sendo mantidos dentro de mini-isoladores (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil) em biotério com temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), comida e água *ad libitum* e ciclo claro/escuro (12 h/12 h). Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC), sob o protocolo CEUA 833119061.

#### **4.1.2 Preparo da solução de losartana potássica para o ensaio farmacológico**

O fármaco losartana potássica em sua forma pura apresenta-se como um pó branco e fino, e foi obtido comercialmente em farmácia magistral, sendo armazenado em freezer a  $-20^\circ\text{C}$  até o momento do preparo da solução, onde foi dissolvido em solução salina (NaCl 0,9%). O esquema de dose administrada foi 1 mg/kg via intraperitoneal (i.p), imediatamente após a indução da sepse e subsequentemente de 8 em 8 horas, respeitando o tempo de meia vida do fármaco. A solução foi aquecida em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$  no momento de aplicação nos animais.

### **4.2 MÉTODOS**

#### **4.2.1 Modelo Experimental de Sepse por Pneumonia**

##### *4.2.1.1 Expansão e preparação da suspensão bacteriana*

A *Klebsiella pneumoniae* - cepa ATCC 700603 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) – foi a bactéria utilizada para indução da sepse nos animais, necessitando ser manipulada dentro de câmara de segurança biológica classe II, tipo A1 da marca Valiclean (Campinas, SP). Uma alíquota liofilizada de 500 uL da bactéria em questão foi descongelada e

incubada com 40 mL de caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI), em tubo plástico de 50 mL, por 18 horas a 37°C em estufa, para expansão do lote bacteriano. Após esse período a solução apresentava aspecto turvo, e o tubo foi centrifugado a 2.500 g por 20 minutos, sendo seu sobrenadante descartado em frasco contendo hipoclorito. O precipitado resultante foi ressuscitado em 30 mL de PBS estéril e centrifugado, para lavagem da bactéria. Foram feitas duas lavagens no total, repetindo o procedimento citado. Depois das centrifugações, o sedimento resultante foi ressuscitado em agitador de tubos do tipo *Vortex*, transferido para microtubos *ependorf* e diluído em PBS estéril, na proporção 1:5 (necessária para atingir a dose a ser inoculada nos camundongos).

#### 4.2.1.2 Execução do modelo de pneumonia

A indução do quadro séptico nos animais foi feita a partir da injeção intratraqueal (i.t) da suspensão de *Klebsiella pneumoniae*, obtida como descrito acima. O anestésico utilizado para anestesia geral foi o isoflurano líquido na concentração de 5%, seguida de manutenção com máscara facial (isoflurano 3%). Os camundongos foram mantidos em posição supino inclinado (45°) durante todo o procedimento. Cessadas as reações a estímulos, a região do pescoço dos animais foi higienizada com álcool iodado, sendo realizada uma pequena incisão na pele para identificação da traqueia. Na traqueia foram injetados 50 µL da suspensão bacteriana contendo  $1 \times 10^8$  unidades formadoras de colônia/mL. A pele foi então suturada e cada animal recebeu PBS estéril (30 mL/Kg, a 37°C, via subcutânea) como reposição volêmica. Os animais foram mantidos em ambiente aquecido até recuperação da anestesia e depois alocados para biotério com temperatura e luz controlados.

## 4.2.2 Protocolos experimentais

### 4.2.2.1 Desenho experimental

No momento da cirurgia de indução da sepse, os camundongos foram randomizados em quatro grupos experimentais: naïve (grupo 1), naïve tratados com losartana (grupo 2), pneumosepse (grupo 3) e pneumosepse tratados com losartana (grupo 4). Os animais naïve e naïve tratados foram utilizados como controle, tanto de condições fisiológicas como de variáveis decorrentes do tratamento. Os animais tratados (grupo 2 e 4) receberam injeções de losartana potássica diluída em solução salina, via intraperitoneal (i.p) numa dose de 1 mg/kg, de 8 em 8 horas ao longo de 30 horas. Após as 30 horas, as amostras de todos os grupos

experimentais foram coletadas, e consistiam em sangue, BAL e fragmentos de pulmão. A Figura 4 ilustra o desenho experimental.

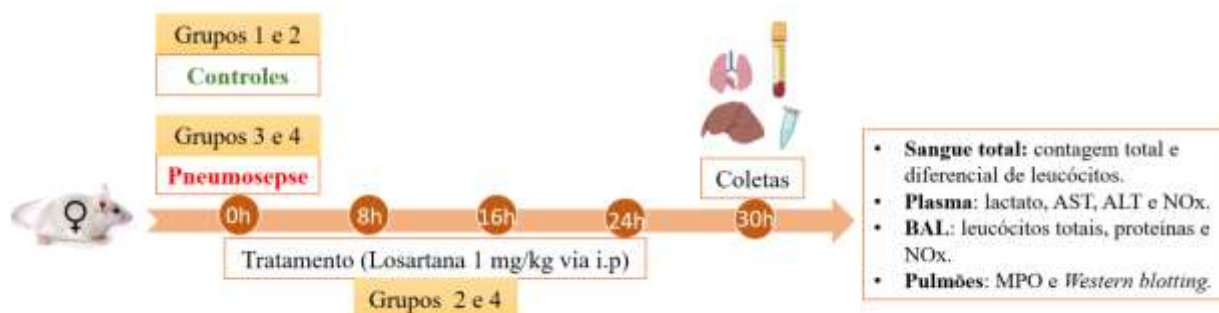


Figura 4. Desenho do experimento, ilustrando o momento de indução da pneumosepse, coleta de amostras e análises realizadas.

#### 4.2.2.2 Coleta de sangue, BAL e tecidos

Para coleta das amostras, os camundongos foram eutanasiados utilizando sobredose dos anestésicos cetamina e xilazina (200 e 20 mg/kg; via i.p, respectivamente), administrados juntamente com 100 UI de heparina (HEPAMAX-S®, heparina sódica suína 5000 U.I/mL), trinta horas após o início do experimento. Confirmada a ausência de estímulos, o tórax dos animais foi aberto, o sangue extravasado a partir de um corte feito no átrio direito do coração dos animais, e coletado com uma seringa plástica de 3 mL, também heparinizada. Algumas alíquotas de sangue foram destinadas à dosagem de lactato, necessitando de acondicionamento em *ependorfs* contendo solução de fluoreto/EDTA preparada no dia da coleta. O restante do sangue destinou-se à contagem total e diferencial em analisador hematológico automatizado, e também foi empregado na realização de esfregaços para contagem diferencial manual. Posteriormente, se procedeu com a centrifugação do sangue a 1200 g em temperatura ambiente, para separação do plasma – o qual foi alíquotado e armazenado em freezer a -80°C para as análises posteriores (dosagens bioquímicas de AST, ALT, lactato e quantificação de metabólitos do óxido nítrico (NOx)).

Depois de retirado o sangue, realizou-se a coleta do lavado broncoalveolar (BAL). Nesse procedimento, a traqueia dos animais foi exposta para inserção de uma cânula (21G) acoplada a seringa. Foram injetados 0,5 mL de PBS estéril, lentamente, sendo o BAL aspirado de volta à seringa. Esse procedimento foi repetido três vezes em cada animal, de modo a formar um pool

de amostra. Uma alíquota de cada pool foi destinada à contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer, enquanto o restante foi centrifugado a 3.000 g durante 10 minutos. O sobrenadante obtido foi imediatamente congelado e armazenado em freezer a -80°C, utilizado posteriormente para realização de dosagens bioquímicas e de proteínas, conforme descrito nos itens 4.2.2.8 e 4.2.2.4.

Em seguida, foram coletados fragmentos dos pulmões, com o auxílio de tesouras cirúrgicas, pinças e bisturis. Esse tecido foi acondicionado em microtubos *ependorf* e congelado imediatamente em nitrogênio líquido, sendo mantido a -80°C até as respectivas análises (dosagem tecidual de mieloperoxidase e *Western blotting* para detecção e quantificação da proteína NOS-2, vide itens 4.2.2.7 e 4.2.2.9).

#### 4.2.2.3 *Contagem total de células no BAL*

O BAL foi diluído em líquido de Türk (água Milli-Q, ácido acético glacial 2% e cristais de azul de metileno), na proporção 1:1, para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. Foram contados os leucócitos presentes nos quatro quadrantes externos superiores e inferiores da câmara, sendo o valor obtido multiplicado pelo fator de correção (20x). O número de leucócitos totais nas amostras está expresso em células/mL de BAL.

#### 4.2.2.4 *Dosagem de proteínas totais no BAL*

A quantificação de proteínas totais no BAL foi feita seguindo o método de Bradford (1976), e padronizado utilizando curva de albumina de soro bovino (BSA) com concentrações variando entre 0 a 250 µg/mL. A leitura de absorbância das amostras foi realizada em leitor de placas (Elx 800, Bio-tek Instruments, USA), no comprimento de onda de 595 nm. A concentração de proteínas é proporcional à absorbância das amostras, estando expressa em µg de proteínas/mL de BAL.

#### 4.2.2.5 *Contagem total e diferencial de células no sangue*

O número de células totais bem como a contagem diferencial de células sanguíneas dos animais foi determinado em analisador hematológico automatizado (HORIBA ABX – Micros 60). Realizou-se também uma contagem diferencial manual, a partir de esfregaços sanguíneos corados com kit Panótico rápido (Laborclin®, Pinhais, Paraná).

#### 4.2.2.6 Dosagem de nitrito e nitrato (NOx) no plasma e BAL

A quantificação de nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) permite inferir indiretamente os níveis de NO no plasma e BAL dos animais, pois são metabólitos estáveis do óxido nítrico. Nesse procedimento, as amostras precisaram ser desproteinizadas com sulfato de zinco ( $\text{ZnSO}_4$ , 2%), incubadas em banho de gelo por 60 minutos e centrifugadas a 11.000 g por 15 minutos. Os sobrenadantes límpidos foram separados, pipetados em placa de 96 poços e incubados com *Escherichia coli*, em câmara úmida, durante 3 horas à 37 °C. A *E.coli* expressa a enzima nitrato redutase, que converte o nitrato em nitrito - permitindo a detecção deste. Decorridas as 3 horas, a placa foi centrifugada na mesma centrífuga com auxílio de rotor de placas, e os sobrenadantes novamente separados e pipetados para outra placa de 96 poços. Aos sobrenadantes, adicionou-se o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água Milli-Q) na proporção 1:1. Efetuou-se a leitura da absorbância de cada poço, no comprimento de onda de 540 nm em leitora de placas (Elx 800, Bio-tek Instruments, USA). Os níveis de NO na amostra são diretamente proporcionais à absorbância obtida, padronizados com curvas padrão de nitrato e nitrito (0 a 150  $\mu\text{M}$ ) previamente preparadas. A metodologia de dosagem de NOx segue as recomendações de Granger e colaboradores (1990).

#### 4.2.2.7 Dosagem de mieloperoxidase tecidual

Inicialmente foram preparados os reagentes necessários para a realização do ensaio, que consistiam em tampão fosfato 20 mM pH 7,4, tampão fosfato 50 mM pH 6,0, tampão fosfato 80 mM pH 5,4, tampão fosfato 50 mM com 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), solução de peróxido de hidrogênio 0,4 mM em tampão fosfato 80 mM e solução de tetrametilmenzidina (TMB) 18,4 mM hidrossolúvel. Biópsias de pulmão de aproximadamente 30 mg foram trituradas com 1 mL de tampão fosfato 20 mM pH 7,4, em tubos de ensaio de plástico, utilizando homogeneizador do tipo Ultra Turrax durante 10 segundos ou até completa desintegração das amostras. Em seguida, os homogenatos foram transferidos para microtubos *ependorf* e centrifugados a 10.000 g a 4° C por 10 minutos. Essa etapa é importante para eliminação de possíveis interferentes, como excesso de neutrófilos do sangue. O sobrenadante de cada microtubo foi descartado e o precipitado ressuspensionado em tampão fosfato 50 mM pH 6,0 contendo 0,5% de HTAB, passando por nova centrifugação. O HTAB é um detergente que libera e solubiliza a MPO contida nos grânulos. Os sobrenadantes foram coletados e diluídos

numa concentração de 1:10 em tampão fosfato 50 mM pH 6,0. Transferiu-se 30  $\mu$ L dos sobrenadantes diluídos para placa de 96 poços, aos quais foram adicionados 20  $\mu$ L de solução TMB hidrossolúvel 18,4 mM e 180  $\mu$ L de solução de peróxido de hidrogênio 0,4 mM. O TMB consiste no agente de cor, visualizada mediante adição da solução de peróxido – que atua como catalisador da reação. Essa mistura foi incubada sob agitação durante 12 minutos em multileitora de placas (TECAN Infinite M200) a 37°C, que efetuou leituras cinéticas num comprimento de onda de 650 nm a cada 2 minutos. Foram selecionadas as absorbâncias no tempo de 4 minutos para todas as amostras. Os resultados foram expressos em densidade óptica (D.O), considerando multiplicação pelo fator de diluição empregado (10x).

#### 4.2.2.8 *Dosagem plasmática de lactato, AST e ALT*

Os níveis plasmáticos de lactato, AST e ALT foram determinados no plasma dos animais por meio da utilização de kits comerciais (LABTEST e Bioclin), de acordo com as instruções dos fabricantes. Todos são testes colorimétricos que visam a determinação quantitativa desses marcadores, sendo a intensidade de cor obtida proporcional à concentração destes no plasma.

A leitura das absorbâncias foi feita em placa de 96 poços, a 550 nm para lactato e 505 nm para AST e ALT. Os valores foram calculados com base na concentração do calibrador e expressos em mg/dL.

#### 4.2.2.9 *Avaliação da expressão de NOS-2 nos pulmões por Western blotting*

As biópsias de pulmão foram pulverizadas manualmente, sonicadas e adicionadas em tampão de lise [(Na<sub>2</sub>VO<sub>4</sub> 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM, coquetel de inibidores de proteases 1% (P8340)] (Sigma-Aldrich Co. LLC, St. Louis, MO, EUA) em T-Per (Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA)], que promove rompimento das células do tecido e permite a extração da proteína de interesse. Esses homogenatos passaram por centrifugação a 9000 g por 20 min a 4°C, e os sobrenadantes foram então coletados. Uma alíquota de cada sobrenadante foi separada para dosagem de proteínas segundo o método de Bradford, para padronizar a quantidade de amostra a ser pipetada no gel de poliacrilamida, conforme descrito abaixo. Ao restante dos sobrenadantes foi adicionado tampão de amostra na concentração 1:1 (glicerol 25%, mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol



1,0%, Tris/HCl 0,5 mM e SDS 10%), sendo posteriormente submetidos à fervura a 95°C durante 10 minutos, para desnaturação das proteínas.

Essas amostras passaram por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (7%), durante duas horas e trinta minutos. A eletroforese faz com que as proteínas existentes em cada amostra separem-se em bandas, de acordo com seus pesos moleculares. As amostras migram pelo gel devido a aplicação de diferença de potencial elétrico em cuba específica, na voltagem de 90 V. O volume pipetado de cada amostra foi padronizado para conter 80 µg de proteínas por poço. Foi também pipetado um padrão de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, Estados Unidos) nos géis. Após a corrida das proteínas nos géis, as mesmas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm), em cuba apropriada, dentro de câmara fria (4°C), durante duas horas e na voltagem de 100 V.

Depois, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau 0,2% (v/v) em ácido tricloroacético 3% (v/v) para visualização das bandas e controle interno da transferência, e posteriormente lavadas três vezes com TBS-t (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, contendo 0,05% (v/v) de Tween 20, pH 7,5) até remoção do corante. As membranas foram cortadas em duas partes, tomando como referência as bandas de padrão de peso obtido comercialmente (BioRad®). O primeiro corte da membrana abrangia a região da NOS-2 - com peso molecular de 130 kDa - e a outra seção destinou-se à marcação da β-actina, cujo peso molecular é de 42 kDa. O bloqueio de ligações inespecíficas se deu com a incubação das membranas com leite em pó desnatado 5% diluído em TBS-t sob agitação e em temperatura ambiente.

As membranas foram incubadas durante a noite, em câmara fria, com a solução contendo o anticorpo primário diluído em TBS-t + leite 5% (anti-NOS-2 1:500; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), que detecta especificamente epítomos da proteína de interesse (NOS-2) aderida na membrana. No dia seguinte, a solução de anticorpo primário foi retirada, e adicionou-se solução de anticorpo secundário anti-IgG conjugado com peroxidase (anti-mouse HRP 1:5000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). O anticorpo secundário está ligado à HRP, uma enzima reveladora que gera sinal fotométrico, permitindo a revelação das proteínas pela técnica de quimioluminescência. A revelação fotométrica foi realizada no aparelho fotodocumentador CHEMIDOC (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA). A análise dos dados obtidos foi feita através de densitometria, ou seja, pela avaliação da quantidade de proteína com base na

intensidade óptica das bandas obtidas utilizando o software ImageLab™ (Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA). Foi feita uma correção de intensidade das bandas com base na revelação concomitante da proteína constitutiva  $\beta$ -actina (1:25000, conjugada com peroxidase; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA). Os valores estão expressos graficamente como unidades arbitrárias.

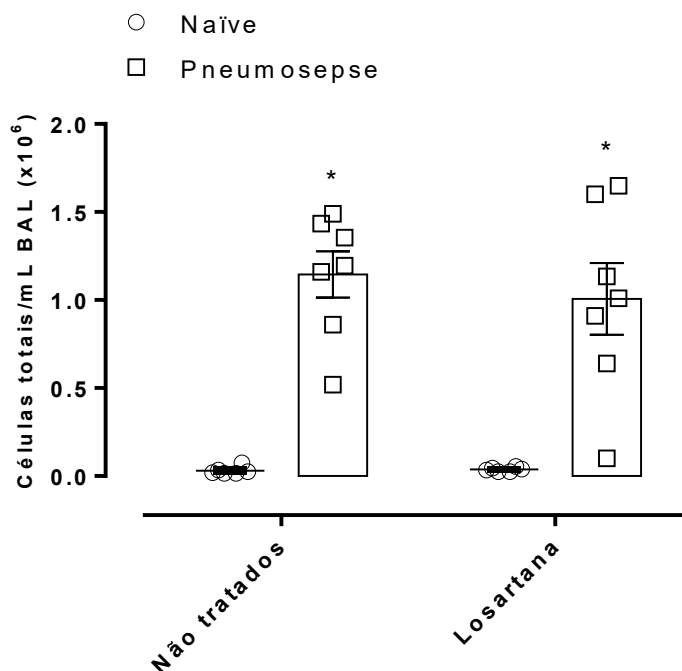
#### 4.2.2.10 Análise dos dados

Os resultados obtidos estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). A análise estatística foi feita utilizando análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguida do pós-teste de Tukey. Valores de  $p < 0,05$  são considerados significativos. Os testes estatísticos foram realizados o programa GraphPad Prism® versão 6.0 (San Diego, CA, USA).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS NO BAL

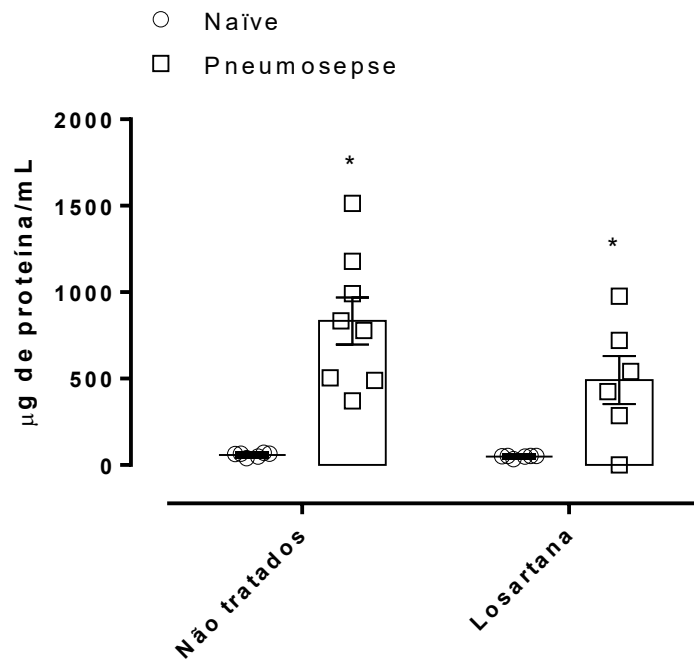
Foi verificado um aumento considerável na quantidade de leucócitos no BAL de animais sépticos ( $1,2 \pm 0,13 \times 10^6$  células/mL) se comparado ao grupo *naïve* ( $0,03 \pm 0,01 \times 10^6$  células/mL), conforme demonstrado na Figura 5. O tratamento com losartana (1 mg/kg, i.p) após a indução da sepse não modificou a contagem de células leucocitárias do BAL em comparação aos animais sépticos controle.



**Figura 5. Efeito da losartana nos números de leucócitos totais no lavado broncoalveolar de camundongos normais e sépticos.** Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta do BAL. A contagem total de leucócitos no BAL corresponde ao tempo de 30 horas após a indução da sepse. Cada símbolo corresponde a um animal e as barras horizontais e verticais simbolizam a média e o EPM., respectivamente (n = 6-7). ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey, \*p < 0,05 (naive vs. pneumosepse).

## 5.2 DOSAGEM DE PROTEÍNAS NO BAL

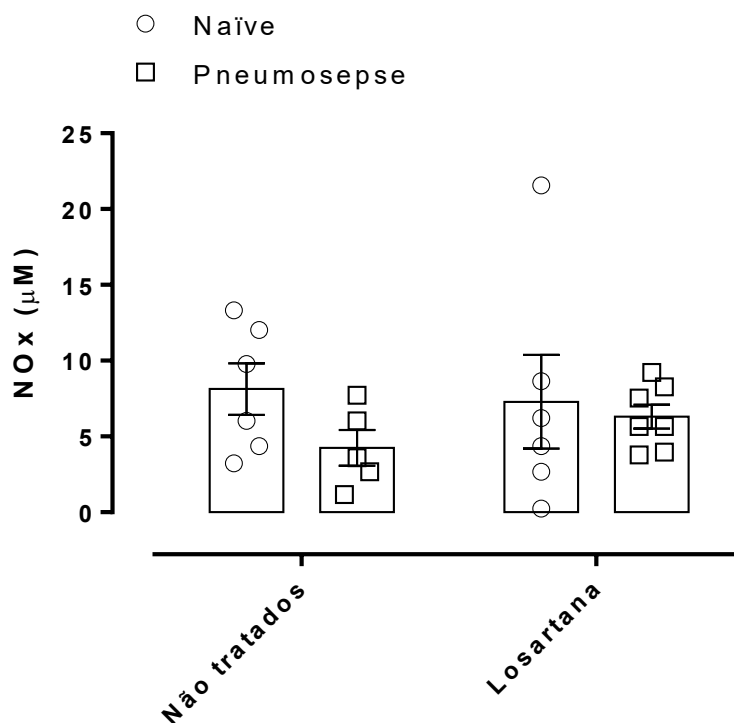
A quantidade de proteínas encontradas no BAL dos animais sépticos foi significativamente maior ( $833 \pm 137$   $\mu$ g de proteína/mL) se comparada ao grupo *naïve* ( $59 \pm 5$   $\mu$ g de proteína/mL). O tratamento com a losartana (1 mg/kg i.p.) promoveu uma redução nos níveis de proteínas totais no BAL de animais submetidos à pneumosepse ( $492 \pm 139$   $\mu$ g de proteína/mL), que não foi significativo do ponto de vista estatístico, conforme apresentado na Figura 6.



**Figura 6. Efeito da losartana nos níveis de proteínas no lavado broncoalveolar de camundongos normais e sépticos.** Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta do BAL. A quantificação de proteínas no BAL corresponde ao tempo de 30 horas após a indução da sepse. Cada símbolo equivale a um animal e as barras horizontais e verticais simbolizam a média e o EPM respectivamente (n = 6-8). ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey, \*p < 0,05 (naive vs. pneumosepse).

### 5.3 DOSAGEM DE NO<sub>x</sub> NO BAL

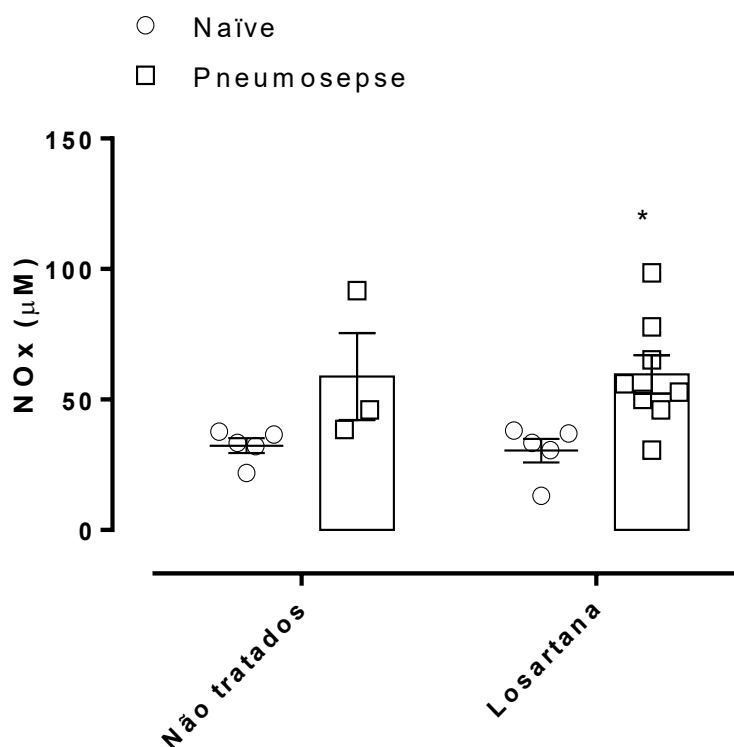
As concentrações de nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub>) no lavado broncoalveolar encontrados nos animais controles e sépticos não foram diferentes. O tratamento com losartana não modificou os níveis desses metabólitos, 30 horas após a indução da sepse (Figura 7).



**Figura 7. Efeito da losartana nos níveis de nitrato e nitrito (NO<sub>x</sub>) no lavado broncoalveolar de camundongos normais e sépticos.** Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta do BAL. A dosagem de NO<sub>x</sub> no BAL corresponde ao tempo de 30 horas após a indução da sepse. Cada símbolo equivale a um animal e as barras horizontais e verticais simbolizam a média e o EPM, respectivamente (n = 5-7). ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

#### 5.4 DOSAGEM DE NO<sub>x</sub> NO PLASMA

Já no plasma, a concentração de NO<sub>x</sub> mostrou-se aumentada nos animais sépticos ( $58,8 \pm 16,6 \mu\text{M}$ ) quando comparada à animais controle ( $32,4 \pm 2,8 \mu\text{M}$ ). O tratamento com losartana resultou em níveis de  $59,6 \pm 7,3 \mu\text{M}$ , contrapondo-se aos valores encontrados nos camundongos controle que receberam losartana ( $30,4 \pm 4,5 \mu\text{M}$ ) (Figura 8).



**Figura 8.** Efeito da losartana nos níveis de nitrato e nitrito (NOx) no plasma de camundongos normais e sépticos. Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta do sangue e separação do plasma. A dosagem de NOx no plasma corresponde ao tempo de 30 horas após a indução da sepse. Cada símbolo equivale a um animal e as barras horizontais e verticais simbolizam a média e o EPM, respectivamente (n = 3-8). ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey, \*p < 0,05 (naive vs. pneumosepse).

### 5.5 MENSURAÇÃO DE AST E ALT NO PLASMA

Tendo em vista a possibilidade de dano de múltiplos órgãos durante a sepse, foi realizada a dosagem das enzimas AST e ALT no plasma dos animais, que são marcadores de função hepática. Não foram verificadas diferenças nos níveis plasmáticos dessas enzimas, tanto nos animais sépticos quanto nos animais controle. O tratamento com losartana não interferiu nesses parâmetros bioquímicos (Figura 9).

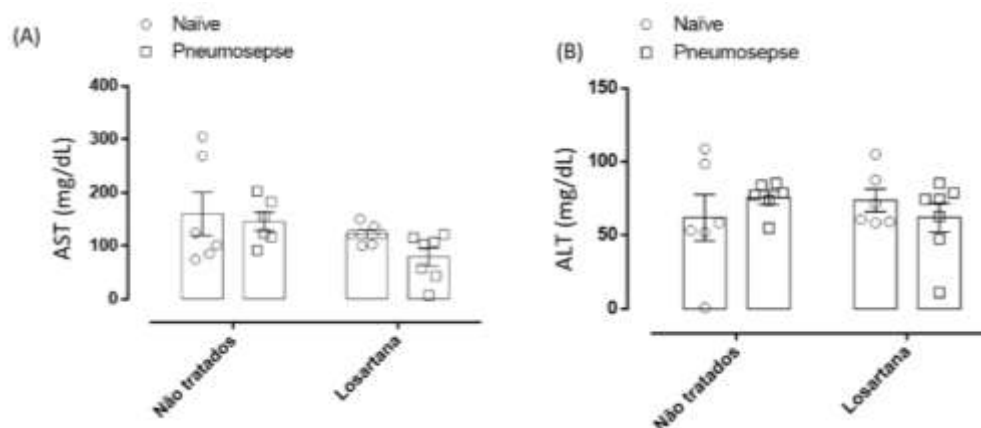
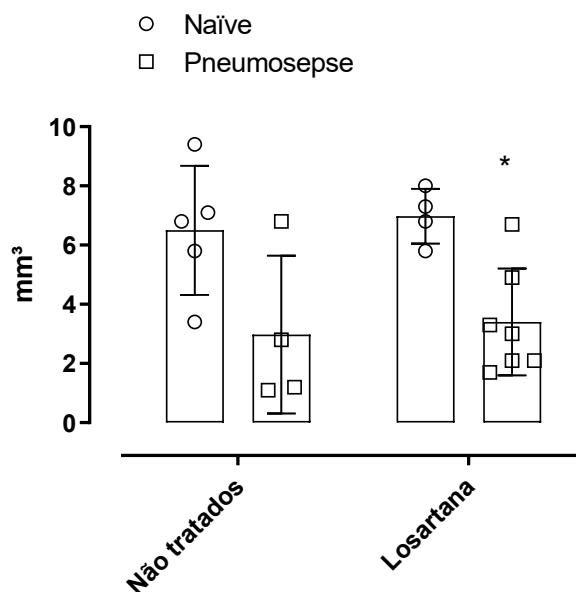


Figura 9. Efeito da losartana nos níveis plasmáticos de AST e ALT em camundongos normais e sépticos. Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta do sangue e separação do plasma. As dosagens de AST (painel A) e ALT (painel B) no plasma são referentes ao tempo de 30 horas após a indução da sepse. Cada símbolo equivale a um animal e as barras horizontais e verticais simbolizam a média e o EPM, respectivamente (n = 6-7). ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

## 5.6 CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS NO SANGUE

No tempo de 30 horas após a pneumosepse, foi verificada a ocorrência de leucopenia nos animais submetidos a esse modelo. Tal diminuição é típica do quadro séptico induzido por esse modelo experimental, corroborando com dados da literatura (SORDI et al., 2013). No entanto, o tratamento dos animais sépticos com losartana não alterou o número de leucócitos (Figura 10).

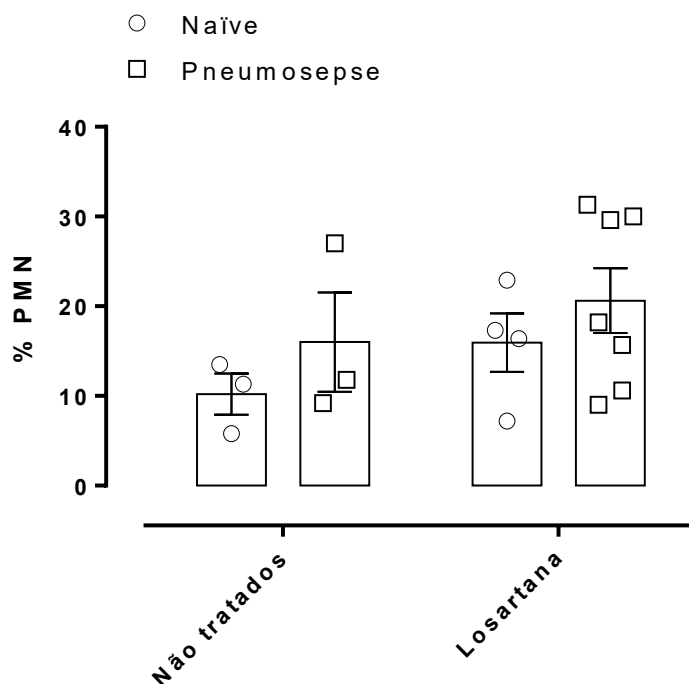


**Figura 10 – Efeito da losartana na contagem total de leucócitos no sangue dos camundongos normais e sépticos.** Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta do sangue e separação do plasma. A contagem absoluta foi avaliada num tempo de 30 horas após a indução da sepse, em contador hematológico automatizado. Cada símbolo equivale a um animal e as barras horizontais e verticais simbolizam a média e o EPM, respectivamente (n = 4-7). ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey, \*p < 0,05 (naive vs. pneumosepse).

## 5.7 CONTAGEM DE POLIMORFONUCLEARES NO SANGUE

Embora o quadro de sepse tenha mostrado uma tendência à elevação nos números de leucócitos polimorfonucleares, não foi encontrada diferença significativa em comparação com animais controles. O tratamento com losartana não influenciou os números (Figura 11).

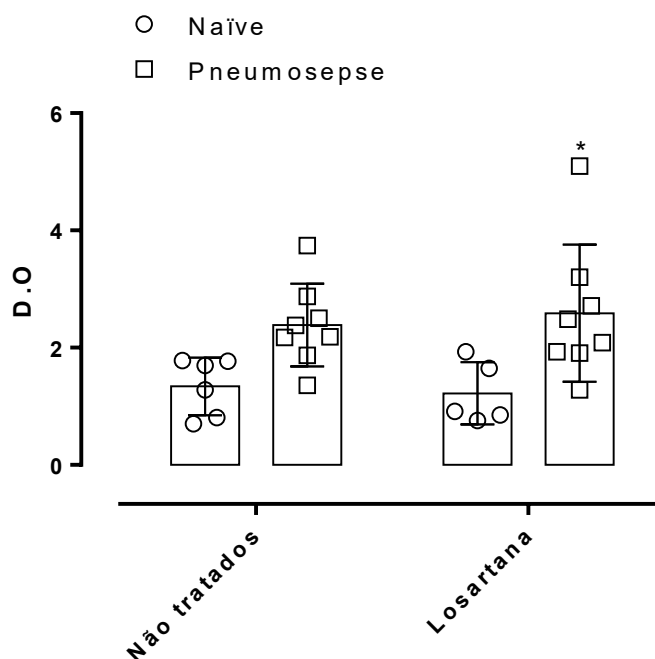




**Figura 11. Efeito da losartana na contagem de leucócitos polimorfonucleares no sangue dos camundongos normais e sépticos.** Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta do sangue e separação do plasma. A contagem foi feita no tempo de 30 horas após a indução da sepse, em contador hematológico automatizado. Cada símbolo equivale a um animal e as barras horizontais e verticais simbolizam a média e o EPM, respectivamente (n = 3-7). ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

### 5.8 DOSAGEM TECIDUAL DE MIELOPEROXIDASE PULMONAR

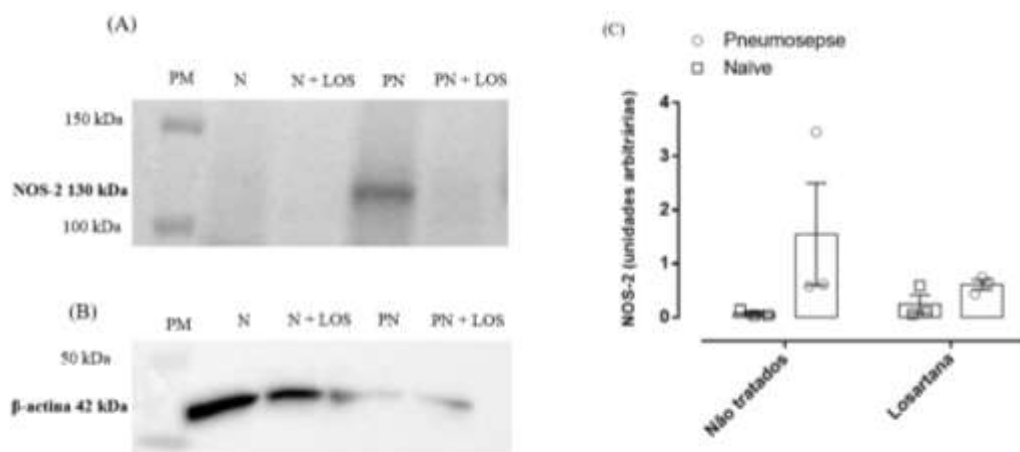
O quadro séptico induziu aumento nos níveis de mieloperoxidase nos pulmões ( $2,4 \pm 0,2$  D.O.) se comparados aos animais controle ( $1,3 \pm 0,2$  D.O). O tratamento com losartana não alterou de maneira significativa a quantidade de MPO nos pulmões dos camundongos que desenvolveram sepse por pneumonia ( $2,6 \pm 0,4$  D.O/mg de pulmão) (Figura 12).



**Figura 12. Efeito da losartana na atividade de mieloperoxidase nos pulmões dos camundongos normais e sépticos.** Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta dos fragmentos de pulmão. Padronizou-se uma quantidade de aproximadamente 30 mg para cada amostra. A quantificação da mieloperoxidase pulmonar foi avaliada num tempo de 30 horas após a indução da sepse. Cada símbolo equivale a um animal e as barras horizontais e verticais simbolizam a média e o EPM, respectivamente (n = 5-8). ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey. \*p < 0,05 (naïve vs. pneumosepse).

## 5.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA NOS-2 NOS PULMÕES POR WESTERN BLOTTING

Foi avaliada a expressão da NOS-2 nos pulmões dos animais controle e dos animais submetidos à sepse por pneumonia, através da técnica de *Western blotting*. A Figura 13A mostra as bandas da NOS-2 existentes em homogenatos de pulmões de animais controle e sépticos, 30 horas após o início da sepse. A Figura 13B representa as bandas de  $\beta$ -actina, uma proteína constitutiva utilizada como controle de transferência das proteínas. Na figura 13C temos a representação gráfica da quantificação dos níveis de NOS-2.



**Figura 13. Efeito da losartana nos níveis da NOS-2 nos pulmões dos camundongos normais e sépticos.** Em cada animal séptico foram inoculadas  $1 \times 10^8$  UFC de *Klebsiella pneumoniae* (i.t). Os animais tratados receberam injeções de losartana (i.p) na dose 1 mg/kg imediatamente depois da indução da sepse, com injeções subsequentes de 8 em 8 horas, até coleta dos fragmentos de pulmões, que foram imediatamente congelados, 30 horas após a indução da sepse. No Painel (A) cada banda representa a NOS-2 existente no pulmão de cada animal. O Painel B mostra as bandas de beta-actina para as respectivas amostras. N= 3 animais por grupo onde PM = padrão de peso molecular, N = animais naïve, N + LOS = animais naïve tratados com losartana, PN = animais sépticos, PN + LOS = animais sépticos tratados com losartana. Para melhor visualização o painel (A) teve seu contraste reduzido em 25%. ANOVA de duas vias seguido de pós-teste de Tukey.

## 6 DISCUSSÃO

Haja vista o potencial pró-inflamatório da Ang II, que exerce seus efeitos mediante ligação nos receptores AT1 e pode recrutar leucócitos para o local de infecção por exemplo, buscamos nesse trabalho melhor entender como esse mediador está envolvido na sepse. Salvar a vida de pacientes nesse estado tão crítico ainda depende de escassas terapias, baseadas em antibióticos e manutenção da pressão arterial, representando um grande desafio particularmente para países em desenvolvimento. Desse modo, descobrir novos alvos terapêuticos para a sepse e choque séptico é de extrema importância.

Neste trabalho, foi avaliada a influência do bloqueio de receptores AT1 sobre a inflamação no decorrer do processo séptico, em camundongos fêmeas submetidos ao modelo de pneumosepse, a partir do tratamento com o fármaco losartana - um antagonista competitivo do receptor AT1.

O modelo de pneumosepse mimetiza a sepse decorrente de pneumonia, e reproduz alguns aspectos clínicos verificados em humanos. Apesar de não induzir sepse polimicrobiana

esse modelo foi selecionado pois a pneumonia é responsável por metade dos casos de sepse registrados (ANGUS; POLL, 2013). Dados prévios de nosso laboratório demonstram que o modelo de pneumosepse padronizado por Sordi e colaboradores (2013) já está bem instaurado, tanto a nível de execução quanto a nível de padronização de dose. Assim, a dose selecionada para ser injetada intratraquealmente nos animais foi  $1 \times 10^8$  UFC/mL, que promove mortalidade média de 50% de camundongos fêmeas em 48 horas (OLIVEIRA, 2019). Pelo fato da dose de bactéria a ser inoculada já estar descrita para camundongos fêmeas, não foi realizada a curva de mortalidade para os animais desse trabalho.

A losartana foi escolhida por ser um antagonista dos receptores AT1 e bloquear o SRA com mais seletividade que os inibidores da ECA (Hollenberg *et al.*, 1998). A dose de losartana (1 mg/kg) foi definida com base na posologia atual recomendada para seres humanos, que é de 50 mg uma vez ao dia, no entanto reitera-se que essa dose é definida para o fármaco como anti-hipertensivo. Considerando um peso médio de 70 kg para um adulto, atinge-se uma concentração próxima a 1 mg/kg. Para definição da dose também foi levado em consideração um trabalho anterior do laboratório (PACHECO, L K, 2009) o qual demonstrou que uma dose de 0,25 mg/kg de losartana melhora alguns parâmetros inflamatórios e a reatividade vascular de ratos sépticos. Mesmo assim, a dose escolhida para o presente trabalho foi quatro vezes maior. Ressalta-se o cuidado tomado quanto à farmacocinética do fármaco, importante para a posterior avaliação das condições inflamatórias. O tempo de meia-vida da losartana no plasma é de 2 horas, e seu metabólito ativo pode permanecer em circulação por até 9 horas. Assim, a primeira dose da solução de losartana 1 mg/kg foi fornecida aos animais (i.p) logo após a indução da sepse, sendo a dose reforçada a cada 8 horas até o momento de coleta das amostras. Porém, deve-se considerar que o metabolismo dos camundongos é diferente do humano, o que significa que não necessariamente a dose selecionada condiz com a dose usual adotada como padrão para seres humanos (LEWIS; ROSENGART, 2018).

O envolvimento da Ang II na patogenia da inflamação já é descrito em vários trabalhos, que citam principalmente a sua ação sobre o recrutamento de células inflamatórias. Esse efeito pró-inflamatório acontece porque a AngII, através da estimulação de receptores AT1, aumenta a quimiotaxia de leucócitos, ativa a expressão de moléculas de adesão e citocinas, e modula a produção de espécies reativas de oxigênio, por exemplo (EGIDO E RUIZ-ORTEGA, 2007; MARCHESI *et al.*, 2008). Estudos clínicos vem demonstrando que a utilização de medicamentos que promovem um bloqueio do SRA é útil não só na modulação de eventos cardiovasculares (como

hipertensão ou cardiopatia isquêmica) mas também na redução da inflamação e estresse oxidativo, justificando a utilização desses fármacos em doenças de caráter inflamatório como a aterosclerose, artrite reumatoide e lúpus eritematoso sistêmico (ROSEI *et al.*, 2005; CHANG; WEI, 2015).

Logo, apesar da losartana ser um medicamento classicamente utilizado como anti-hipertensivo, a intenção dessa pesquisa foi empregá-la como anti-inflamatório sendo a dose propositalmente inferior se comparada às doses utilizadas em artigos científicos que também abordam o tratamento com losartana visando benefícios anti-inflamatórios na sepse. Hagiwara *et al.* (2009), por exemplo, utilizaram uma dose de 50 mg/kg de losartana após desafiar ratos Wistar machos com injeção de LPS. Nessa pesquisa, o tratamento melhorou a lesão pulmonar dos ratos, pela redução de citocinas plasmáticas e da atividade da ECA2. Porém, não foram verificados parâmetros relacionados a pressão arterial nos animais desse estudo. Além disso, essa dose é bastante discrepante da adotada para o tratamento em humanos. Portanto, pode-se assumir que alguns trabalhos que sugerem benefícios com a intervenção no SRA em modelos de inflamação acabam por utilizar doses muito altas de antagonistas dos receptores AT1 ou de inibidores da ECA, fator que pode provocar hipotensão excessiva nos animais e dificultar a interpretação dos resultados (PACHECO, 2009). No vigente trabalho, esse foi um ponto levado em consideração na tentativa de evitar a piora da hipotensão, condição já verificada no quadro séptico e que poderia comprometer as análises, caso acontecesse um aumento da mortalidade dos animais.

A coleta das amostras no tempo de 30 horas após a indução da sepse por pneumonia foi definida com base em um trabalho anterior de nosso laboratório, o qual demonstrou que a migração de leucócitos nesse modelo ocorre principalmente 24 horas após o desafio com *Klebsiella pneumoniae*, e que passadas 48 horas o número desses leucócitos no foco infeccioso tende a cair. No tempo de 24 horas após o insulto, também é verificada uma leucopenia nos animais submetidos ao modelo de pneumosepse (SORDI *et al.*, 2013). A escolha do tempo de 30 horas também objetivou analisar os parâmetros inflamatórios em um tempo mais agudo, considerando que 48 horas após a inoculação da bactéria na traqueia dos animais a mortalidade dos mesmos tende a aumentar, independente da quantidade de UFC inoculadas (OLIVEIRA, 2019).

Quanto aos resultados obtidos, foi observada uma elevação significativa na quantidade de leucócitos totais e nas proteínas totais no BAL dos camundongos sépticos, quando contrapostos aos animais naïve, assim como um aumento da migração de neutrófilos para o

parênquima pulmonar, dado pela dosagem de mieloperoxidase nesse órgão (apenas nos grupos de animais tratados com losartana). O aumento desses parâmetros indica que o modelo de pneumosepse foi corretamente executado, e apontam o desenvolvimento da sepse nos animais. Sordi e colaboradores (2013) observaram a existência de neutrófilos aderidos a células endoteliais de capilares pulmonares, a partir de 6 horas após a pneumosepse.

Além disso, a dosagem de metabólitos do óxido nítrico no plasma de animais sépticos tratados também se mostrou aumentada, sendo esse um achado típico do quadro séptico. Ressalta-se que não foi verificada uma diferença significativa na dosagem de NO<sub>x</sub> de animais sépticos não tratados (se comparados aos animais controle não tratados), porém acredita-se que essa estatística decorra do 'n' pequeno de amostras disponíveis no grupo de animais sépticos. O aumento nos parâmetros inflamatórios citados, no entanto, não foi revertido quando os animais foram tratados com losartana.

Analisando o sangue dos animais, foi observada a ocorrência de leucopenia nos camundongos sépticos, e uma tendência a aumentar o número de células polimorfonucleares, inclusive nos esfregaços (uma vez que os neutrófilos migram para o foco infeccioso, nesse caso para os pulmões, na tentativa de combater a infecção) (revisado em BROWN et al., 2006). Não foram verificadas diferenças na contagem total e diferencial de células sanguíneas quando os animais receberam losartana.

Não se observou diferenças estatisticamente significativas nas dosagens das enzimas hepáticas AST e ALT, e isso pode ser justificado pelo fato de que, mesmo os animais estando em curso do processo inflamatório exacerbado da sepse, as coletas foram realizadas num tempo de 30 horas, e talvez esse seja um tempo muito precoce para verificação de um dano de extensão hepática. O tratamento com losartana não influenciou nos níveis de AST e ALT.

A estimulação do fator de transcrição kB é um ponto comum decorrente tanto da ativação da AngII como da cascata do NO na sepse, sendo o NF-kB translocado para o núcleo, onde induz a expressão de genes pró-inflamatórios (LIU et al., 2017). Esse fato nos levou a crer que possa haver uma relação entre a AngII e o NO durante o desenvolver da sepse, fundamentando a realização da técnica de *Western blotting* pra a isoforma NOS-2. A expressão da NOS-2 nos pulmões dos animais, detectada através da imunoeletoforese de proteínas, em um dos géis de poliacrilamida mostrou-se aumentada nos animais sépticos no tempo de 30 horas, se comparada à ínfima expressão nos animais controle, tratados com losartana ou não. Apesar dos resultados obtidos com essa metodologia não apresentarem diferenças estatísticas

dadas as limitações encontradas durante o desenvolvimento da técnica ou pelo número reduzido de animais por grupo, supõe-se pela primeira vez que o tratamento agudo com losartana, após indução da sepse experimental, pode estar relacionado a uma redução nos níveis de NOS-2 pulmonar. Acredita-se que o número pequeno de animais tenha sido o problema limitante dessa estatística.

Considerando a redução nos níveis de NOS-2, podemos prever o perfil das citocinas inflamatórias. Sabe-se que a NOS-2 é expressada em diversos tipos celulares, inclusive células endoteliais e leucócitos, frente circunstâncias pró-inflamatórias como a presença de produtos bacterianos ou citocinas (Kleinert et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2014). Assim, uma redução nos níveis de NOS-2 pode estar relacionada a uma concomitante diminuição de citocinas inflamatórias a nível pulmonar e circulatório. Mais estudos são necessários para a confirmação dessa hipótese, utilizando metodologias como dosagem de citocinas por ELISA, e também a expressão da NOS-2 por *Western blotting* em outros órgãos.

Por último, ressalta-se a ocorrência de alguns problemas metodológicos durante o desenvolvimento deste trabalho. Foi observada uma anormalidade durante a dosagem de lactato plasmático, sendo a absorvância (e conseqüentemente a concentração) nas amostras dos animais controle muito superior à dos animais sépticos, ocorrência já verificada em análises prévias do nosso grupo de pesquisa, e que contrasta com os resultados esperados (uma vez que o lactato é um marcador de dano orgânico e níveis elevados do mesmo são associados à má perfusão sistêmica, conforme acontece na sepse) (HERNANDEZ; BELLOMO; BAKKER, 2018), portanto esse resultado não foi considerado. Quanto aos resultados obtidos com a técnica de *Western blotting*, reitera-se que foram analisados os pulmões dos animais, no entanto, a coleta desse órgão foi realizada após a retirada do BAL, processo que pode ter danificado mecanicamente os pulmões, e talvez interferido nos resultados não homogêneos para a expressão da NOS-2 nos animais sépticos. Ainda, a coleta do BAL foi realizada injetando-se vagarosamente 0,5 mL de PBS estéril três vezes, formando um pool de amostra. Isso pode ter diluído o fluido pulmonar, influenciando na contagem de leucócitos totais. Esse último problema poderia ser amenizado tentando-se injetar 1 mL de PBS de uma vez só nos pulmões dos animais, sendo que o BAL aspirado de volta à seringa só poderia ser aproveitado desde que o volume fosse de no mínimo 800 µL. Na dosagem de NOx plasmático, o número pequeno de amostras principalmente no grupo de animais sépticos decorreu do volume insuficiente de sangue coletado em alguns animais, já bastante hipotensos e debilitados, que conseqüentemente

foi insatisfatório para executar todas as análises da maneira adequada e pode ter impactado na estatística desse parâmetro. Na contagem de células polimorfonucleares no sangue, acredita-se que o 'n' menor verificado nos grupos experimentais seja decorrente de hemólise, o que pode ter impossibilitado a leitura adequada de algumas amostras pelo contador hematológico. Finalmente, relembramos que não foi realizado um ensaio de *binding* para comprovar a ligação efetiva do fármaco losartana nos receptores AT1, mas foi assumido que a interação ocorreu adequadamente dada a alta afinidade do fármaco por esse receptor, e também pela manutenção das doses a cada 8 horas.

## 7 CONCLUSÃO

Fazendo uso de técnicas farmacológicas como a cirurgia de indução de sepse por pneumonia em camundongos, e de diversas técnicas bioquímicas para as análises das amostras coletadas, esse trabalho buscou esclarecer a influência do bloqueio do receptor AT1 com o fármaco losartana, sobre alguns parâmetros de inflamação na sepse.

O tratamento com losartana nessa dose e tempo não parece alterar indicadores inflamatórios. No entanto, considerando que a AngII é um agente pró-inflamatório de fato, mais estudos são necessários com outras doses e outros tempos de tratamento para esclarecer essa possível relação entre o bloqueio do receptor de angiotensina, o óxido nítrico e a inflamação durante o decorrer do quadro séptico.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUIANO, L. et al. Circulating ACE2 in Cardiovascular and Kidney Diseases. **Current Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 30, p.3231-3241, 2017.

ANGUS, D C; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **The New England Journal of Medicine** v. 369, n. 9, p. 840-851, 2013.

ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets** v. 6, n. 2, p. 165-173, jun. 2006.

BARROS, L L S; MAIA, C S F; MONTEIRO, M C. Fatores de risco associados ao agravamento de sepse em pacientes em Unidade de Terapia Intensiva. **Cad. Saúde Colet.**, Rio de Janeiro, v. 24, n. 4, p.388-396, nov. 2016.



BEALE, R. et al. Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): Lessons from an International Sepsis Registry. **Infection**, v. 37, n. 3, p.222-232, 2009.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

BROWN, KA et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet**, Londres, v. 368, n. 9530, p.157-169, jul. 2006.

CALLEGARI, D C. **A assepsia das mãos na prática médica: A complexa descoberta da simplicidade**. 2010. Disponível em: <<https://www.cremesp.org.br/?siteAcao=Revista&id=480>>. Acesso em: 01 nov. 2019.

CHAPPELL, M C. Nonclassical Renin-Angiotensin System and Renal Function. **Comprehensive Physiology**, Winston-salem, p.1-33, 2 out. 2012.

CHANG, Y.; WEI, W.. Angiotensin II in inflammation, immunity and rheumatoid arthritis. **Clinical & Experimental Immunology**, China, v. 179, n. 2, p.137-145, 2 jan. 2015.

CINEL, I; OPAL, S M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical care medicine**, v. 37, n. 1, p. 291-304, 2009.

CONCEITOS. In: INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE “FLAVIA MACHADO”. **Instituto Latino Americano de Sepsis – EAD Ensino à Distância**. 2019. Disponível em: < <https://ilas.eadplataforma.com/lesson/detail/2/11/> > Acesso em 13 outubro 2019.

DONOGHUE et al. **A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9**. *Circulation Research*, 2000.

DRUGBANK. Losartan, 2019. Disponível em: <<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00678/>>. Acesso em: 25 de outubro de 2018.

EGIDO, J.; RUIZ-ORTEGA, M. Anti-inflammatory actions of quinalapril. **Cardiovasc. Drugs Ther.**, 21: 211-220, 2007.

EPIDEMIOLOGIA. In: INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE “ALEXANDRE BIASI CAVALCANTI”. **Instituto Latino Americano de Sepsis – EAD Ensino à Distância**. 2019. Disponível em: <<https://ilas.eadplataforma.com/lesson/detail/2/10/>> Acesso em 13 outubro 2019.

EVANS, T *et al.* Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circulatory shock** v. 41, n. 2, p. 77-81, out. 1993.

FISIOPATOGENIA. In: INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE “LEANDRO UTINO TANIGUCHI”. **Instituto Latino Americano de Sepsis – EAD Ensino à Distância**. 2019. Disponível em: < <https://ilas.eadplataforma.com/lesson/detail/2/3/> > Acesso em 13 outubro 2019.

FLEMING, I; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovascular Research** v. 43, n. 3, p. 532-541, 15 ago. 1999.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p.829-837, 2011.

GOBEIL, F et al. G-protein-coupled receptors signalling at the cell nucleus: an emerging paradigm This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled The Nucleus. **Canadian Journal Of Physiology And Pharmacology**, Canadá, v. 84, n. 3-4, p.287-297, mar. 2006.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 12 ed.: McGraw-Hill, pp. 743 - 766, 2012.

HAGIWARA, S et al. Antagonist of the Type-1 ANG II receptor prevents against LPS-induced septic shock in rats. **Intensive Care Medicine**, Japão, v. 35, n. 8, p.1471-1478, 16 jun. 2009.

HERNANDEZ, G; BELLOMO, R; BAKKER, J. The ten pitfalls of lactate clearance in sepsis. **Intensive Care Medicine**, Rotterdam, v. 45, n. 1, p.82-85, 12 maio 2018.  
BROWN, KA et al. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet**, Londres, v. 368, n. 9530, p.157-169, jul. 2006.

HOLLENBERG, N.K.; FISHER, N.D.L.; PRICE, D.A. Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue. Evidence from comparative pharmacological interruption of the rennin system. **Hypertension**, 32: 387-392, 1998

HOTCHKISS, R S.; MONNERET, G; PAYEN, D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862, 2013.

HERNANDEZ, G; BELLOMO, R; BAKKER, J. The ten pitfalls of lactate clearance in sepsis. **Intensive Care Medicine**, Rotterdam, v. 45, n. 1, p.82-85, 12 maio 2018.

JONG, Y I.; HARMON, S K.; O'MALLEY, K L. Intracellular GPCRs Play Key Roles in Synaptic Plasticity. **Acs Chemical Neuroscience**, Saint Louis, v. 9, n. 9, p.2162-2172, 6 fev. 2018.

LAGU, T et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 3, p.754-761, 2012.

LEWIS, A J.; ROSENGART, M R.. Bench-to-Bedside: A Translational Perspective on Murine Models of Sepsis. **Surgical Infections**, Pensilvânia, v. 19, n. 2, p.137-141, fev. 2018.

LIU, T et al. NF- $\kappa$ B signaling in inflammation. **Signal Transduction And Targeted Therapy**, v. 2, n. 1, p.1-9, 2017.

LOSARTANA POTÁSSICA. Dr. Marco Aurélio Limirio G. Filho. Laboratório Neo Química, Brainfarma Indústria Química e Farmacêutica S.A. Anápolis, 2019. Bula de remédio.

MACHADO, F R et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p.1180-1189, 2017.

MAJNO, G. The Ancient Riddle of σήψη (Sepsis). *The Journal of Infectious Diseases.*, p. 937-945, 1991.

MARCHESI, C.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E L. Role of the renin-angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in Pharmacological Sciences**, 29 (7): 367-374, 2008

NOGUEIRA, J M R. et al. Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde. v. 4. Rio de Janeiro: EPSJV,IOC, 2009. p. 221-397.

OLIVEIRA, L R C et al. Analysis of Toll-Like Receptors, iNOS and Cytokine Profiles in Patients with Pulmonary Tuberculosis during Anti-Tuberculosis Treatment. **Plos One**, Botucatu, v. 9, n. 2, p.1-10, 18 fev. 2014.

OLIVEIRA, F R M B. **Influência do ambiente redox em parâmetros inflamatórios da pneumosepse**. 2019. 93f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, UFSC, Florianópolis, 2019.

PACHECO, L K. **Envolvimento da angiotensina II nos eventos iniciais da sepse avaliado através de parâmetros hemodinâmicos e inflamatórios**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Departamento de Farmacologia, UFSC, Florianópolis, 2009.

RANG, H. P. et al. *Rang & Dale Farmacologia*. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RIBEIRO, J M; FLORENCIO, L P. Bloqueio farmacológico do sistema renina angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e antagonismo do receptor AT1. **Revista Brasileira de Hipertensão**, Belo Horizonte, v. 3, p.293-302, 2000. Disponível em: <<http://departamentos.cardiol.br/dha/revista/7-3/016.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

ROSEI, E.A. et al. Effects of candesartan cilexetil and enalapril on inflammatory markers of atherosclerosis in hypertensive patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. **J. Hypertens.** 23: 435-444, 2005.

SCHULMAN, I H.; RAIJ, L. The angiotensin II type 2 receptor: what is its clinical significance? **Current Hypertension Reports**, 10 (3): 188-93, 2008.

SINGER, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p.801-810, 2016.

SORDI, R. et al. Pneumonia-induced sepsis in mice: temporal study of inflammatory and cardiovascular parameters. **International Journal Of Experimental Pathology**, v.94, n. 2, p.144-155, 2013.

SOUZA, C F D. **Envolvimento da enzima óxido nítrico sintase 1 (NOS-1) na disfunção cardíaca e muscular esquelética na sepse experimental**. 2018. 15 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Ccs, Ufsc, Florianópolis, 2018.

VIANA, R A P P; MACHADO, F R; SOUZA, J L A. **SEPSE: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA: A atuação e colaboração da Enfermagem na rápida identificação e tratamento da doença**. 2. ed. São Paulo: Gerência de Comunicação, 2017. 65 p. (-). Disponível em: <<https://www.ilas.org.br/assets/arquivos/ferramentas/livro-sepse-um-problema-de-saude-publica-coren-ilas.pdf>>. Acesso em: 27 out. 2019.