



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Junior Garcia de Oliveira

**Efeitos da inibição da fosfodiesterase-3 sobre parâmetros cardiovasculares,
inflamatórios e mortalidade durante a sepse experimental**

Florianópolis
2023

Junior Garcia de Oliveira

**Efeitos da inibição da fosfodiesterase-3 sobre parâmetros cardiovasculares,
inflamatórios e mortalidade durante a sepse experimental**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

Florianópolis

2023

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

Oliveira, Junior Garcia de
Efeitos da inibição da fosfodiesterase-3 sobre parâmetros
cardiovasculares, inflamatórios e mortalidade durante a
sepse experimental / Junior Garcia de Oliveira ;
orientador, Daniel Fernandes, 2023.
134 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Sepses. 3. Sistema Cardiovascular.
4. Nucleotídeos cíclicos. 5. Cilostazol. I. Fernandes,
Daniel. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Junior Garcia de Oliveira

**Efeitos da inibição da fosfodiesterase-3 sobre parâmetros cardiovasculares,
inflamatórios e mortalidade durante a sepse experimental**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 09 de maio de 2023,
pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Igor Alexandre Côrtes de Menezes
Universidade Federal do Paraná

Profa. Dra. Aurea Elizabeth Linder
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Jamaira Aparecida Victorio
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado
adequado para obtenção do título de Doutor em Farmacologia.

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Daniel Fernandes
Orientador

Florianópolis, 2023.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Daniel Fernandes, por ter me aceito em seu laboratório e por ter dedicado muito do seu tempo para me orientar ao longo dos últimos anos, sempre com muita disposição e entusiasmo, contribuindo muito ao meu crescimento pessoal e profissional.

À Profa. Regina de Sordi que também me auxiliou desde o início do trabalho, colaborando e dando todo suporte experimental e científico necessário.

Àqueles que colaboraram com apoio técnico, científico ou estrutural no desenvolvimento do trabalho: Prof. Jamil Assreuy, Profa. Aurea Elizabeth Linder e Prof. José Eduardo da Silva Santos por sempre manterem as portas de seus laboratórios abertas e disponíveis para auxiliar; Elaine Leocádia Anton Amarantes pelo suporte na técnica de western blotting; Eduardo Souza Silva pelo suporte na análise de hiperemia vascular pós-oclusiva; Gabrielle Delfrate pelo auxílio experimental; Letícia Kramer Pachecho pelo suporte nas análises bioquímicas; Adriane Madeira e Daiane Mara Bobermin por suporte técnico. Agradeço também àqueles que de alguma forma colaboraram com ideias ou na realização desse trabalho.

À Profa. Carmen Diniz Pereira por ter me aceito em seu laboratório por seis meses na Universidade do Porto, possibilitando as análises de imuno-histoquímica. Agradeço também aos seus alunos por me acolherem e auxiliarem nos experimentos, em especial o Martin Vojtek.

Aos colegas de laboratório e amigos Gustavo Ferreira Alves, Marcelo de Almeida Nakashima pelas excelentes conversas científicas e por todo apoio e amizade ao longo desses anos. Agradeço também a outros colegas do laboratório que contribuíram no laboratório e pela amizade Lucas Braga Albino e Thander Jacson Nunes Calente.

Ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, professores, coordenação e discentes.

À equipe técnica do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB) e a equipe do Biotério Central da UFSC.

À UFSC e ao laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESC.

Aos professores membros da banca examinadora do doutorado, Dr. Igor Alexandre Côrtes de Menezes, Dr. Juliano Ferreira, Dra. Jamaira Aparecida Victório, Dr. Geisson Marcos Nardi, Dra. Priscila de Souza e Dra. Aurea Elizabeth Linder pela leitura da tese, discussões e contribuições para a versão final deste documento e para a minha formação profissional.

À Priscila Laiz Zimath por todo auxílio ao longo dos últimos anos em experimentos, discussões científicas e por sempre me apoiar em cada pequena conquista; sua força e determinação são inspirações diárias para mim.

Aos meus pais e irmãos, por todo o apoio e confiança depositados em mim desde a minha graduação. Muito obrigado.

RESUMO

A sepse é uma disfunção orgânica causada por uma resposta imune desregulada do hospedeiro diante de uma infecção. Com isso, ocorrem profundas alterações que afetam o sistema cardiovascular, causam agregação plaquetária, migração de neutrófilos, prejudicam a estabilidade endotelial vascular e por fim, levam ao desenvolvimento da disfunção multiorgânica que se relaciona a alta mortalidade. Essas alterações celulares têm diferentes causas, dentre elas, a mudança nos níveis de nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) nos diferentes microdomínios de sinalização, levando a perturbações na transdução de sinalização intracelular. Diferentes pontos de vias que levam a síntese de cAMP e cGMP estão comprometidas durante a sepse. Diante disso, um importante alvo molecular na modulação do conteúdo de nucleotídeos cíclicos são as enzimas fosfodiesterases (PDEs), responsáveis por degradar e controlar a difusão de cAMP e cGMP, e a ativação de alvos moleculares no interior dos microdomínios de sinalização. Dentre as PDEs, a família PDE3 exibe atividade dual, controlando a hidrólise de ambos os nucleotídeos. O cilostazol é um inibidor seletivo de PDE3 aprovado e seguro no uso clínico como uma estratégia de aumento na biodisponibilidade de nucleotídeos cíclicos. Portanto, nós investigamos o impacto da inibição de PDE3 pelo cilostazol em parâmetros cardiovasculares, hemodinâmicos, inflamatórios e na sobrevida em um modelo experimental de sepse. A sepse foi induzida pelo procedimento cirúrgico de ligação e perfuração cecal (CLP) em ratos wistar machos e os animais controle foram os falso-operados (sham). Cilostazol (15 mg/kg, og) ou veículo foi administrado seis horas depois do procedimento cirúrgico. Em diferentes tempos ao longo de vinte de quatro horas após o procedimento de CLP foram obtidos parâmetros cardiovasculares, inflamatórios e relacionados a danos multiorgânicos, além da sobrevida dos animais que foi avaliada durante cento e vinte horas. Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA, número 1667100417). Os animais sépticos apresentaram aumento no escore de gravidade de doença, hipotensão, taquicardia, redução no fluxo sanguíneo renal, prejuízo na resposta de hiperemia vascular pós-oclusiva muscular, hiporreatividade vascular, inflamação sistêmica, desenvolvimento de disfunção multiorgânica e mortalidade ao longo do tempo. Além disso, observou-se reduções no conteúdo plasmático e em alguns tecidos de nucleotídeos cíclicos, principalmente de cGMP. Não foram observadas alterações no conteúdo proteico de PDE3A e pPDE3A (Ser312) por conta da sepse. A inibição de PDE3A aumentou os níveis de cAMP no plasma e no tecido muscular nos animais sépticos, preveniu a queda no fluxo sanguíneo renal, reduziu marcadores de inflamação e má perfusão tecidual como o lactato, melhorou parcialmente a reatividade vascular para vasoconstritores, reduziu parcialmente a migração de neutrófilos e o extravasamento vascular tecidual. Entretanto, no tecido cardíaco gerou indícios de lesão por sobrecarga cardíaca por hiperativação de via receptores β -adrenérgicos/cAMP/PKA, apesar de reduzir conteúdo de NOS2 e modular receptor A_{2A} e ENT1. Por fim, o cilostazol quando associado a antibioticoterapia reduziu o risco de mortalidade nos animais no início da sepse. Diante dos resultados, a inibição de PDE3 parece agir na prevenção da progressão do quadro de sepse para choque séptico nos animais, exibindo alguns benefícios celulares que podem ser associados a modulação dos níveis de cAMP nos microdomínios de sinalização celular.

Palavras-chave: nucleotídeos cíclicos; cilostazol; sistema cardiovascular; choque séptico; ligação e perfuração cecal.

ABSTRACT

Sepsis is a life-threatening organ dysfunction caused by a dysregulated host immune response to infection. Because of this, profound changes occur, impairing the cardiovascular system, causing platelet aggregation, and neutrophil migration, impairing vascular endothelial stabilization, and leading to multiorgan dysfunction establishment related to high mortality. These cellular alterations have different causes, including changes in cyclic nucleotide (cAMP and cGMP) levels in the distinct signaling microdomains, leading to disturbances in intracellular signaling transduction. Furthermore, different upstream pathways that lead to the synthesis of cAMP and cGMP are compromised during sepsis. Therefore, a critical molecular target in modulating the range of cyclic nucleotides are the phosphodiesterase enzymes (PDEs), responsible for degrading and controlling the diffusion of cAMP and cGMP and the activation of molecular targets restrict in the signaling microdomains. Among the PDEs, the PDE3 family exhibits dual activity, controlling the hydrolysis of both nucleotides. Cilostazol is a selective PDE3 inhibitor approved and safe for clinical use as a strategy to increase the bioavailability of cyclic nucleotides. Thus, we investigated the impact of PDE3 inhibition by cilostazol on cardiovascular, hemodynamic, inflammatory, and survival parameters in an experimental model of sepsis. Sepsis was performed by cecal ligation and puncture (CLP) procedure in male Wistar rats, and the control animals were sham-operated. Cilostazol (15 mg/kg, og) or vehicle was administered six hours later. After that, data were obtained at different times over twenty-four hours after the CLP procedure regarding cardiovascular, inflammatory and multiorgan damage parameters, in addition to percent survival during one hundred and twenty hours. This study was previously approved by the University Institutional Ethics Committee (Protocol number 1667100417). Septic animals presented increased disease severity score, hypotension, tachycardia, reduced renal blood flow, impaired post-occlusive muscular, vascular hyperemia response, vascular hyporeactivity, systemic inflammation, development of multiorgan dysfunction, and mortality over time. In addition, reductions in plasma and some tissues of cyclic nucleotide levels, mainly cGMP, were observed. No changes in PDE3A and pPDE3A (Ser312) protein content due to sepsis were observed. PDE3A inhibition increased cAMP levels in plasma and muscle tissue in septic animals. In addition, improved parameters such as renal blood flow renal, reduced biomarkers of inflammation and poor blood perfusion as lactate, partially improved vascular reactivity to vasoconstrictors, partially reduced neutrophil migration, and vascular tissue leakage. However, in cardiac tissue, it exhibited signs of injury due to cardiac overload due to hyperactivation of the β -adrenergic receptors/cAMP/PKA pathway, despite reducing NOS2 content and modulating A2A and ENT1 receptors. Ultimately, cilostazol, when associated with antibiotic therapy, reduced mortality risk at the onset of sepsis in animals. Given the results, PDE3 inhibition seems to prevent the progression of sepsis to septic shock in animals, showing some cellular benefits that may be associated with the modulation of cAMP levels in the cell signaling microdomains.

Keywords: cyclic nucleotides; cilostazol; cardiovascular system; septic shock; cecal ligation and puncture.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disfunção multiorgânica observada durante a sepse e choque séptico.....	24
Figura 2. Vias de sinalização de nucleotídeos cíclicos controladas pelas diferentes famílias de PDEs.....	28
Figura 3. Regulação na expressão das diferentes isoformas de PDE3 nos tecidos .	34
Figura 4. Estrutura molecular do cilostazol	36
Figura 5. Linha do tempo do protocolo experimental 1	43
Figura 6. Linha do tempo do protocolo experimental 2.	44
Figura 7. Linha do tempo do protocolo experimental 3	46
Figura 8. Efeito da inibição de PDE3 no desenvolvimento da sepse e nas alterações cardiovasculares observadas no modelo experimental da doença	67
Figura 9. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na hiporreatividade a vasoconstritores.	69
Figura 10. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 em marcadores plasmático de danos orgânicos e inflamação e em parâmetros hematológicos	72
Figura 11. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 em parâmetros hematológicos ..	73
Figura 12. Efeito da inibição da PDE3 em marcadores de dano tecidual, inflamação, permeabilidade vascular e dano oxidativo no pulmão	76
Figura 13. Efeito da inibição da PDE3 em marcadores de dano tecidual, inflamação, permeabilidade vascular e dano oxidativo no coração	78
Figura 14. Efeito da inibição da PDE3 em marcadores de dano tecidual, inflamação, permeabilidade vascular e dano oxidativo no rim	80
Figura 15. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 nos níveis plasmáticos e teciduais de cAMP e cGMP	82
Figura 16. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 nos níveis proteicos da porção total de PDE3A e fosforilada (Ser312) de PDE3A	84
Figura 17. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 em danos histológicos em cardiomiócitos e coronárias.....	86
Figura 18. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 em danos histológicos em cardiomiócitos e coronárias.....	87
Figura 19. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na imunomarcagem da porção total de PDE3A e fosforilada (Ser312) de PDE3A no coração.....	89

Figura 20. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na imunomarcção de NOS3 e NOS2 no coração.....	91
Figura 21. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na imunomarcção de ENT1 e A _{2A} no coração e nos níveis plasmáticos de adenosina	93
Figura 22. Genes diferencialmente expressos no tecido cardíaco durante a sepse .	95
Figura 23. Efeito da sepse, da inibição de PDE3 e de antibiótico na sobrevivência observada nos animais ao longo do tempo	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios que compõem o escore SOFA (Sequential Organ Failure Assessment)	19
Tabela 2. Características das diferentes famílias de fosfodiesterases (PDEs) e seus inibidores farmacológicos	30
Tabela 3. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na hiporreatividade a vasoconstritores	70
Tabela 4. Efeito da associação da inibição de PDE3 e do antibiótico na sobrevida dos animais ao longo do tempo	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A_{2A}: receptor de adenosina subtipo A_{2A}.
- ABC: complexo avidina-biotina (do inglês, *avidine-biotin complex*)
- AC: adenilil ciclase
- AKAP: proteínas de ancoragem de A-cinase (do inglês, *A-kinase anchor proteins*)
- ALT: alanina aminotransferase
- ARRIVE: do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*
- AST: aspartato aminotransferase
- BCA: ácido bicinconínico (do inglês, *bicinchoninic acid*)
- cAMP: adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (do inglês, *cyclic adenosine monophosphate*)
- CAT: catalase
- cGMP: guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (do inglês, *cyclic guanosine monophosphate*)
- CID: coagulação intravascular disseminada
- CLP: ligação e perfuração cecal (do inglês, *cecal ligation and puncture*)
- CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta (do inglês, *cAMP response element-binding protein*)
- DAB: tetrahidrocloreto de 3,3-diaminobenzidina
- DAG: diacilglicerol
- DAMPs: padrões moleculares associados a danos (do inglês, *damage-associated molecular patterns*)
- DBCA: Diretriz Brasileira para o Cuidado e uso de Animais para fins científicos
- DMSO: dimetilsulfóxido
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ELISA: ensaio imunoenzimático (do inglês, *enzyme-linked immunosorbent assay*)
- ENT1: transportador equilibrativo de nucleosídeos 1 (do inglês, *equilibrative nucleoside transporter 1*)

EPAC: proteínas de troca ativadas diretamente por cAMP (do inglês, *exchange proteins directly activated by cAMP*)

EPM: erro padrão da média

FC: frequência cardíaca

FDA: do inglês, *Food and Drug Administration*

FeSO₄: sulfato ferroso

FRET: transferência de energia de ressonância por fluorescência (do inglês, *fluorescent resonance energy transfer*)

FSM: fluxo sanguíneo muscular

FSR: fluxo sanguíneo renal

GC: guanilil ciclase

GPCRs: receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (do inglês, *G protein-coupled receptors*)

GRKs: cinases de receptores acoplados a proteína G (do inglês, *G-protein-coupled receptors kinases*)

H₂O₂: peróxido de hidrogênio

H₂SO₄: ácido sulfúrico

HCl: ácido clorídrico

HE: hematoxilina e eosina

HMGB1: proteínas de alta mobilidade B1 (do inglês, *high mobility group box-*

1)

HRPO: hiperemia reativa pós-oclusiva

HTAB: brometo de hexadeciltrimetilamônio (do inglês, *hexadecyltrimethylammonium bromide*)

IHC: imuno-histoquímica

IL: interleucina

ILAS: Instituto Latino Americano de Sepsis

IP₃: Inositol trifosfato

LPS: lipopolissacarídeo

LOOH: hidroperóxidos lipídicos (do inglês, *lipid hydroperoxide*)

LRA: lesão renal aguda

LTCC: canais para Ca²⁺ do tipo L (do inglês, *L-type Ca²⁺ channels*)

MPO: mieloperoxidase

MTT: brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio

N₂: nitrogênio gasoso

NFκB: fator nuclear kappa B (do inglês, *Nuclear Factor κB*)

NL₂: nitrogênio líquido

NLRs: receptores do tipo NOD (do inglês, *NOD-like receptors*)

NO: óxido nítrico (do inglês, *nitric oxide*)

NO₂: óxido nítrico sintase 2 (do inglês, *nitric oxide synthase 2*)

NO₃: óxido nítrico sintase 3 (do inglês, *nitric oxide synthase 3*)

NO_x: nitrato e nitrito

OMS: Organização Mundial da Saúde

PAM: pressão arterial média

PAMPs: padrões moleculares associados ao patógeno (do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*)

PAS: ácido periódico de Schiff (do inglês, *periodic acid–Schiff*)

PAS: pressão arterial sistólica

PDE: fosfodiesterase (do inglês, *phosphodiesterase*)

PKA: proteína cinase A (do inglês, *protein kinase A*)

PKB: proteína cinase B (do inglês, *protein kinase B*)

PKC: proteína cinase C (do inglês, *protein kinase C*)

PKG: proteína cinase G (do inglês, *protein kinase G*)

PLB: fosfolambana (do inglês, *phospholamban*)

PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês, *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PRRs: receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, *pattern recognition receptors*)

RLRs: receptores do tipo RIG-1 - ácido retinóico indutível do gene 1 (do inglês, *RIG-1-like receptors*)

RyR: receptores de rianodina (do inglês, *ryanodine receptors*)

SDRA: síndrome do desconforto respiratório agudo

SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica (do inglês, *systemic inflammatory response syndrome*)

SOD: superóxido dismutase

SOFA: do inglês, *sequential organ failure assessment*

TMB: 3,3',5',5'-tetrametilbenzidina

TNF-α: fator de necrose tumoral-α (do inglês, *tumor necrosis factor-α*)

UTIs: unidades de tratamento intensivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	SEPSE: DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA	18
1.2	FISIOPATOLOGIA DA SEPSE E SINALIZAÇÃO CELULAR.....	21
1.3	ENZIMAS FOSFODIESTERASES.....	26
1.4	FOSFODIESTERASE 3.....	33
1.5	INIBIÇÃO DE FOSFODIESTERASE 3 NA SEPSE.....	36
2	OBJETIVOS.....	39
2.1	OBJETIVO GERAL	39
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	REAGENTES.....	40
3.2	ANIMAIS	41
3.3	PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS.....	41
3.3.1	Protocolo experimental 1: Análise de parâmetros cardiovasculares, hemodinâmicos, marcadores de danos e inflamação tecidual e o impacto da inibição de PDE3 pelo cilostazol nestes contextos.....	41
3.3.2	Protocolo experimental 2: envolvimento da fosforilação de PDE3A na sepse	44
3.3.3	Protocolo experimental 3: impacto da inibição de PDE3 na mortalidade induzida na sepse	44
3.4	MODELO DE LIGAÇÃO E PERFURAÇÃO CECAL (CLP).....	46
3.5	PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA EM ANIMAIS CONSCIENTES.....	47
3.6	GLICOSE SANGUÍNEA.....	48
3.7	PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) E FLUXO SANGUÍNEO RENAL EM ANIMAIS ANESTESIADOS.....	48
3.8	HIPEREMIA REATIVA PÓS-OCCLUSIVA (HRPO) EM ANIMAIS ANESTESIADOS	49
3.9	REATIVIDADE VASCULAR <i>EX VIVO</i>	50
3.10	PERMEABILIDADE VASCULAR	51

3.11	NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS CAMP E CGMP	
	52	
3.12	NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ADENOSINA.....	52
3.13	NÍVEIS TECIDUAIS DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS CAMP E CGMP ..	53
3.14	PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS.....	53
3.15	DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO (NOX) PLASMÁTICO	54
3.16	ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) TECIDUAL	55
3.17	MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS TECIDUAIS	56
3.17.1	Atividade da enzima catalase (CAT)	56
3.17.2	Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	57
3.17.3	Níveis teciduais de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)	57
3.18	HISTOLOGIA DE TECIDO PULMONAR, CARDÍACO E RENAL	57
3.19	IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TECIDO CARDÍACO	59
3.20	EXTRAÇÃO PROTEICA E WESTERN BLOT.....	60
3.21	ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA	64
3.22	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
4	RESULTADOS	65
4.1	A INIBIÇÃO DE PDE3A AUMENTA A FREQUÊNCIA CARDÍACA, EVITA A REDUÇÃO DO FLUXO SANGUÍNEO RENAL E MELHORA PARCIALMENTE A RESPOSTA VASCULAR PERIFÉRICA	65
4.2	A INIBIÇÃO DE PDE3 PREVINE PARCIALMENTE O DESENVOLVIMENTO DA HIPORREATIVIDADE VASCULAR INDUZIDA PELA SEPSE	68
4.3	A INIBIÇÃO DE PDE3 EVITA PARCIALMENTE A OCORRÊNCIA DE ALTERAÇÕES EM MARCADORES PLASMÁTICOS DE DANOS E EM PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS CAUSADOS PELA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NO DESENVOLVIMENTO DA SEPSE	71
4.4	A SEPSE CAUSA ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E DANOS TECIDUAIS E A INIBIÇÃO DE PDE3 PREVINE EM PARTES ESSAS ALTERAÇÕES	74
4.5	A SEPSE ALTERA PARCIALMENTE OS NÍVEIS PLASMÁTICOS E TECIDUAIS DE NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS (CAMP E CGMP) SEM ALTERAR OS NÍVEIS PROTEICOS DE PDE3A E A INIBIÇÃO DESSA ENZIMA MODULA EM PARTES OS NÍVEIS DE CAMP	80
4.6	A SEPSE CAUSA ALTERAÇÃO HISTOPATOLÓGICA NO CORAÇÃO E A INIBIÇÃO DE PDE3 ACENTUA ESSES DANOS.....	85

4.7	A SEPSE ALTERA A IMUNOMARCAÇÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS A INFLAMAÇÃO E SINALIZAÇÃO DE ADENOSINA NO CORAÇÃO E A INIBIÇÃO DE PDE3 MODULA PARCIALMENTE ESSAS MUDANÇAS	88
4.8	A SEPSE COMPROMETE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE, SINALIZAÇÃO E CONTENÇÃO EM MICRODOMÍNIOS DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS NO CORAÇÃO.....	94
4.9	O TRATAMENTO COM ANTIBIÓTICO PREVINE O DESFECHO DE MORTALIDADE CAUSADA PELA SEPSE AO LONGO DO TEMPO E A INIBIÇÃO DE PDE3 EXIBE UM EFEITO PROTETOR ADITIVO AO ANTIBIÓTICO APENAS NO INÍCIO DA DOENÇA	96
5	DISCUSSÃO.....	99
6	CONCLUSÃO	117
	REFERÊNCIAS	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE: DEFINIÇÕES E EPIDEMIOLOGIA

Num contexto histórico, a palavra sepse origina-se do grego *septikós* e menções ao termo sepse já apareciam em poemas de Homero (700 a.C.) e Hipócrates (460-377 a.C.) que descrevem a sepse como sendo um perigoso e odorífero comprometimento biológico que poderia ocorrer no organismo (Funk, Parrillo e Kumar, 2009).

A sepse tem sido historicamente uma síndrome heterogênea com complexa definição clínica sendo caracterizada por uma resposta imune desequilibrada do hospedeiro a um evento infeccioso. Por conta da dificuldade na definição clínica da doença e na tentativa de uniformizar os critérios diagnósticos da sepse, no ano de 1991, durante a reunião de consenso da *American College of Chest Physicians* e da *Society of Critical Care Medicine* a doença foi definida como uma resposta inflamatória sistêmica associada a uma infecção. Nessa reunião também foram definidos os quadros de síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS, do inglês, *Systemic Inflammatory Response Syndrome*), sepse, sepse grave e choque séptico (Abraham *et al.*, 2000; Bone *et al.*, 1992). Os critérios diagnósticos definidos na época receberam duras críticas nos anos seguintes por apresentarem alta sensibilidade e baixa especificidade no diagnóstico do paciente séptico, além da dificuldade na classificação clínica do paciente de acordo com a escala de gravidade. As mesmas sociedades se reuniram novamente em 2001 na busca por tornar as definições mais claras e específicas. Nesse sentido, a avaliação e diagnóstico do paciente séptico passou a considerar variáveis inflamatórias, hemodinâmicas, perfusão tecidual e disfunção orgânica (Levy *et al.*, 2003).

Em 2016 ocorreu a última atualização nos critérios de definição e diagnóstico de sepse pelos esforços da *Society of Critical Care Medicine* e *European Society of Intensive Care Medicine*, passando a existir somente a classificação de sepse e choque séptico. A definição de sepse passa a ser um quadro de disfunção orgânica potencialmente fatal causado por uma resposta imunológica desregulada a uma infecção. Já o choque séptico define-se por ser um quadro de sepse, porém com grandes anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas capazes de aumentar substancialmente a mortalidade (Singer *et al.*, 2016).

Na prática clínica para o diagnóstico de sepse e a mensuração da severidade de danos orgânicos se adotou o uso do escore SOFA (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*). Os pacientes são diagnosticados com sepse ao apresentarem infecção sistêmica e pontuação no escore de SOFA de dois pontos ou mais. Já os pacientes com choque séptico apresentam sepse, hipotensão persistente e refratária, necessitando de vasopressores para manutenção da pressão arterial média (PAM) acima de 65 mmHg e níveis de lactato maiores que 2 mmol/L após reanimação volêmica (Cecconi *et al.*, 2018). A tabela 1 a seguir demonstra quais são os critérios avaliados no escore SOFA.

Tabela 1. Critérios que compõem o escore SOFA (*Sequential Organ Failure Assessment*)

SISTEMA	ESCORE				
	0	1	2	3	4
Respiratório PaO ₂ /FIO ₂ , mmHg (KPa)	≥400	<400	<300	<200	<100
Coagulação Plaquetas, x10 ³ /uL	≥150	<150	<100	<50	<20
Fígado Bilirrubina, mg/dL (umol/L)	<1,2	1,2-1,9	2,0-5,9	6,0-11,9	>12,0
Cardiovascular	PAM ≥70 mmHg	PAM <70 mmHg	Dopamina <5 ou dobutamina qualquer dose ^a	Dopamina 5.1-1.5 ou fenilefrina ≤0.1 ou noradrenalina ≤0.1 ^a	Dopamina >15 ou fenilefrina ≥0.1 ou noradrenalina ≥0.1 ^a
Sistema Nervoso Central Escala de coma de Glasgow ^b	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal Creatinina, mg/dL (umol/L)	<1.2	1,2-1,9	2,0-3,4	3,5-4,9	>5,0
Débito urinário, mL/d				<500	<200

Fonte: Adaptado de Singer *et al.*, 2016.

PaO₂, pressão parcial de oxigênio; FIO₂, fração inspirada de oxigênio; PAM, pressão arterial média.

^aDoses de catecolaminas administradas em µg/Kg/min por no mínimo 1 h.

^bEscala de coma de Glasgow: pontuação de 3 a 15; quanto mais próximo de 15 melhor é a função neurológica.

A incidência de sepse é elevada ao redor do mundo e tem aumentado ao longo dos anos. Um estudo feito em países de alta renda sugere que ocorrem anualmente em torno de 31,5 milhões de casos de sepse, sendo do total 19,4 milhões de casos de choque séptico, causando 5,3 milhões de mortes no mundo. Porém, os dados tanto de incidência quanto de mortalidade podem ser ainda maiores quando considerarmos a estrutura dos sistemas de saúde em países de média e baixa renda (Rudd *et al.*, 2020). As elevadas taxas de morbidade e mortalidade observadas na sepse são em decorrência da disfunção múltipla orgânica que afeta vários órgãos e tecidos. Entre eles, está o sistema cardiovascular, no qual a disfunção cardíaca precede e favorece o desenvolvimento de disfunções orgânicas secundárias, contribuindo para o desenvolvimento da falência múltipla em outros órgãos (Pool, Gomez e Kellum, 2018). Portanto, a sepse e a subsequente disfunção multiorgânica permanece sendo a principal causa de mortalidade em pacientes hospitalizados, sendo o choque séptico responsável por mais de 50% da mortalidade total observada em unidades de tratamento intensivo (UTIs).

No Brasil, os números atuais relacionados a sepse são escassos. O Instituto Latino-americano de Sepse (ILAS) avaliou a prevalência estimada de sepse no país (SPREAD, do inglês *Sepsis PREvalence Assessment Database*) a partir de um estudo observacional. Nesse estudo foram incluídos 227 UTIs de hospitais públicos e privados nas diferentes regiões brasileiras. O estudo mostrou que os pacientes sépticos ocupavam em torno de 30% da totalidade de leitos disponíveis e que a mortalidade observada foi alta, 55,5%, não apontando diferenças entre os hospitais públicos e privados na mortalidade observada (Machado *et al.*, 2017). Um segundo estudo agora longitudinal avaliando dados de 2006 a 2015 apontou que a incidência de novos casos da doença aumentou 50,5% durante o período analisado no Brasil. A letalidade da sepse em crianças e adolescentes caiu 40,1%, porém nas demais faixas etárias observou-se um aumento de 11,4%. Ainda, diferente do estudo anterior, observou-se maior mortalidade em hospitais públicos (55,5%) quando comparado a hospitais privados (37%) (Neira, Hamacher e Japiassu, 2018). Recentemente, um novo estudo do SPREAD-ED (do inglês, *Sepsis Prevalence Assessment Database in Emergency Department*) coordenado pelo ILAS, incluindo amostras obtidas por conveniência de 74 prontos-socorros de sistema público e privado de saúde de todas as regiões do Brasil apontou que, além da alta mortalidade observada principalmente na rede pública de saúde, há uma alocação inadequada dos pacientes que leva a um

atraso no acesso do paciente grave a UTIs em ambos os sistemas, mas de forma mais expressiva também na rede pública, e a justificativa para isso é a falta de estrutura e leitos de UTIs disponíveis (Machado *et al.*, 2023). Apesar de alguns dados conflitantes entre os estudos, todos apontam para um dado alarmante, a alta mortalidade observada no país.

Além da alta taxa de mortalidade, a doença também reduz a qualidade de vida dos pacientes sobreviventes (Langley *et al.*, 2013; Poll, van der *et al.*, 2017). Nos últimos anos, apesar de terem ocorridos avanços na pesquisa básica e clínica relacionadas à sepse, o prognóstico de pacientes sépticos permanece marcadamente ruim, não existindo até hoje um tratamento farmacológico aprovado direcionado à sepse e sim um suporte terapêutico para o controle da infecção e disfunção multiorgânica. Por conta disso, em 2017 a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a sepse como uma prioridade em saúde e por conta disso adotou uma resolução para melhorar a prevenção, diagnóstico e manejo clínico da doença (Reinhart *et al.*, 2017).

1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE E SINALIZAÇÃO CELULAR

A sepse é uma síndrome altamente heterogênea causada por uma resposta imune desequilibrada do hospedeiro frente a uma infecção. Vale ressaltar que, embora a infecção seja o evento desencadeante da doença, a resposta imune aberrante frequentemente permanece após o tratamento bem-sucedido da infecção com os antimicrobianos (Fink e Shaw Warren, 2014; Marshall, 2014).

Em geral, na fisiopatologia da sepse é considerada uma fase inicial hiperinflamatória que perdura por vários dias, seguida por uma fase imunossupressora mais prolongada (Hotchkiss, Monneret e Payen, 2013b). Por muitos anos, a resposta inflamatória desproporcional à infecção foi considerada central na patogênese da sepse, porém atualmente está claro que a resposta do hospedeiro é perturbada de uma maneira muito mais complexa, envolvendo inflamação excessiva e sustentada, supressão imunológica e uma falha em retornar à homeostase (Poll, Van Der *et al.*, 2017).

Um estudo nos EUA onde avaliou-se mais de trezentos mil pacientes com sepse constatou que em 63% dos casos, as infecções tinham origem comunitárias, 11% eram infecções adquiridas no ambiente hospitalar e 26% eram infecções relacionadas ao cuidado em saúde (hospitalizações recentes, residentes de casa de

longa permanência de idosos, pacientes em hemodiálise, entre outros) (Page, Donnelly e Wang, 2015). Os sítios de infecções mais comumente relacionados aos quadros de sepse são sistema respiratório, seguido por infecções abdominais, geniturinárias, bacteremia primária (corrente sanguínea), infecções de pele e tecidos moles (Angus *et al.*, 2001; Leligdowicz *et al.*, 2014). Os microrganismos causadores da doença podem ser bactérias, fungos, vírus e protozoários, com destaque para as bactérias e fungos, porém com uma crescente importância nos casos de origem viral principalmente após a recente pandemia do vírus SARS-COV2. Dentre as principais bactérias isoladas em pacientes sépticos estão as Gram-positivas (*Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*) (Vincent *et al.*, 2009).

Durante a infecção, o reconhecimento do patógeno é mediado por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) que detectam produtos comuns de vias de biossíntese de microrganismos - como por exemplo lipolissacarídeo (LPS) bacteriano, chamados de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs, do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Na sepse diferentes PRRs e PAMPs estão envolvidos na resposta para os diferentes microrganismos, como por exemplo receptores *Toll-like* (TLR1, 2, 4, 5 e 6) que reconhecem produtos bacterianos como ácido lipoteicoico, lipoproteínas, flagelina, e TLRs intracelulares (TLR3, 7 e 9) envolvidos na detecção de material genético de vírus ou bactérias. Outros receptores que reconhecem produtos microbianos incluem receptores do tipo NOD - domínio de oligomerização de nucleotídeos (NLRs, do inglês *NOD-like receptors*), receptores do tipo RIG-1 - ácido retinóico indutível do gene 1 (RLRs, do inglês *RIG-1-like receptors*) e receptores de lecitina do tipo C. A ativação desses diferentes receptores durante a infecção é essencial para o reconhecimento de uma ampla gama de microrganismos e resultar em efeitos complementares, sinérgicos ou antagônicos, modulando assim a imunidade inata e adaptativa. Os PRRs também reconhecem produtos do próprio hospedeiro, denominados padrões moleculares associados a danos (DAMPs, do inglês *damage-associated molecular patterns*), como as proteínas de alta mobilidade B1 (HMGB1, do inglês *high mobility group box-1*), que apresentam um importante papel na regulação da resposta inflamatória (Ishii *et al.*, 2008; Salomao *et al.*, 2012). O *crosstalk* entre PAMPs e DAMPs desencadeia uma cascata de diferentes vias de sinalização intracelulares, se destacando a subsequente ativação e translocação do citoplasma para o núcleo do

fator nuclear kappa B (NFkB, do inglês, *Nuclear Factor κB*), promovendo ativação de genes-alvo e levando a transcrição de diversas citocinas pró-inflamatórias (Lawrence, 2009).

A liberação de mediadores inflamatórios por células da imunidade inata após o reconhecimento do patógeno, como o fator de necrose tumoral-α (TNF-α, do inglês *tumor necrosis factor-α*), interleucina-6 (IL-6), -1 (IL-1) estimulam o aumento da expressão de isoformas das enzimas óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *nitric oxide synthase*), principalmente a isoforma tipo 2 (NOS2) aumentando a síntese de óxido nítrico (NO, do inglês *nitric oxide*), neste contexto também ocorre o aumento da síntese de prostaglandinas e leucotrienos (O'Brien *et al.*, 2007). A ação desses mediadores sobre as células endoteliais resulta na ativação da coagulação, vasodilatação, extravasamento vascular, rolamento e migração de neutrófilos juntamente com mediadores inflamatórios para o espaço extravascular, contribuindo de maneira central na fisiopatologia das disfunções orgânicas e hipotensão durante a sepse (Angus e Poll, van der, 2013). Além disso, a resposta inflamatória desencadeia ativação de fatores pró-coagulantes, enquanto fatores anticoagulantes naturais, como proteína C ativada, anti-trombina, inibidores de fator tecidual estão diminuídos na sepse, resultando em um estado pró-coagulante com formação de múltiplos microtrombos que obstruem pequenos vasos, que em última análise levam à coagulação intravascular disseminada (Marshall, 2003).

Todo o organismo é afetado na sepse, porém, por razões práticas relacionadas a facilidade com que a função do órgão pode ser avaliada, alguns sistemas são normalmente avaliados na prática clínica e por conta disso são os mais amplamente estudados: o sistema cardiorenal, neurológico, hematológico e hepático (Lelubre e Vincent, 2018). Além disso, é importante ressaltar que a disfunção de um único órgão é rara, em parte devido à existência de '*crosstalk* órgão-órgão' ou interorganização *crosstalk*, de modo que a falência de um órgão leva à disfunção de outro órgão (Vincent e Backer, De, 2013). A figura 1 abaixo destaca a ocorrência da disfunção multiorgânica na sepse e quais parâmetros podem ser avaliados na prática clínica.

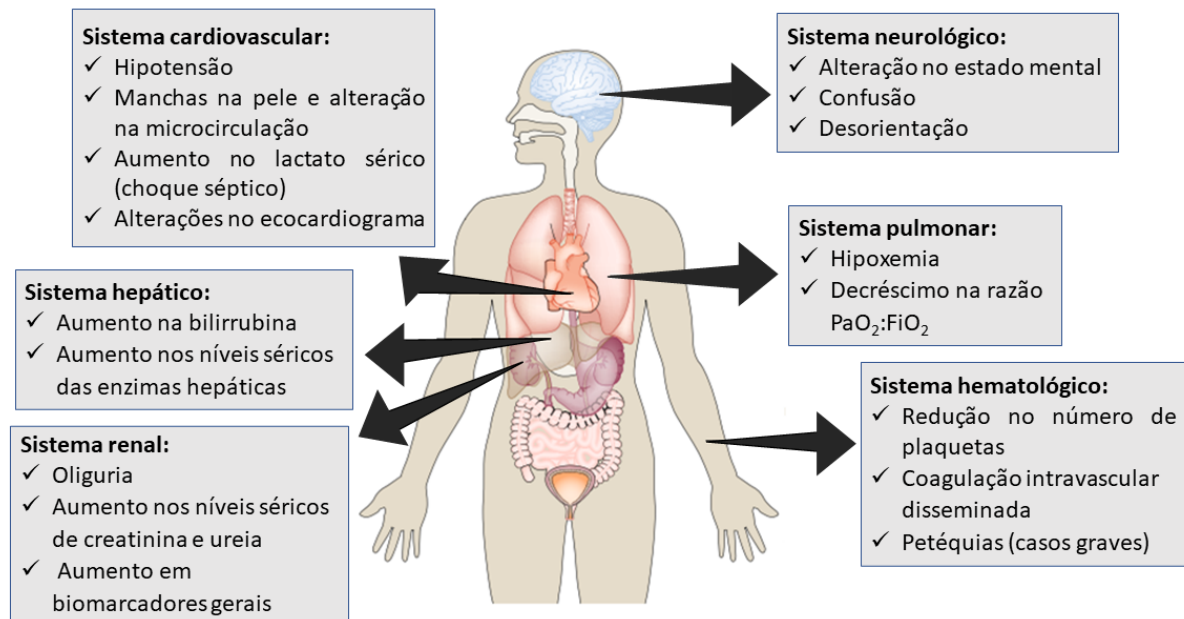


Figura 1. Disfunção multiorgânica observada durante a sepse e choque séptico. Diferentes órgãos e sistemas são acometidos durante a doença, contribuindo para o desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos observados na sepse e choque séptico. Na prática clínica, esses diferentes parâmetros são monitorados para avaliar a evolução do paciente. Adaptado de Lelubre e Vincent, 2018.

O sistema cardiovascular é altamente comprometido na sepse, sendo a hipotensão arterial uma característica marcante na disfunção cardiovascular em pacientes sépticos. Os principais fatores que contribuem para a fisiopatologia da hipotensão arterial são os quadros hipovolemia, aumento da permeabilidade vascular, redução do tônus vascular e depressão miocárdica, que pode ser grave e está associada a diminuições globais das frações de ejeção dos ventrículos esquerdo e direito. A redução no tônus vascular está associada principalmente a níveis elevados de NO e peroxinitritos (Levy *et al.*, 2010). Já a depressão miocárdica pode ocorrer como resultado da toxicidade direta dos mediadores inflamatórios sobre os cardiomiócitos (Antonucci *et al.*, 2014).

A disfunção cardiovascular gera um efeito cascata que repercute em outros sistemas, muito dependente do choque distributivo de sangue, oxigênio e nutrientes aos tecidos, resultando em metabolismo celular de oxigênio anormal e hiperlactatemia (Honore *et al.*, 2015; Vincent e Backer, De, 2013). Embora anormalidades circulatórias sistêmicas sejam fáceis de serem identificadas e de maior facilidade na intervenção, as anormalidades da microcirculação, incluindo uma diminuição na densidade capilar e um aumento na heterogeneidade da perfusão, normalmente também estão

presentes e podem persistir mesmo após restauração global das variáveis sistêmicas, como pressão arterial e oferta de oxigênio (Backer, De *et al.*, 2014). A sepse causa disfunção na autorregulação da microcirculação, assim alguns capilares são subperfundidos enquanto outros recebem um aumento desproporcional de fluxo sanguíneo. Esse desequilíbrio leva à hipóxia na microcirculação de algumas regiões, resultando em um déficit na oxigenação tecidual causado pela má perfusão (Mok *et al.*, 2021). Somado a isso, na sepse há profundas alterações na sinalização celular que favorecem o desenvolvimento de disfunções na micro- e macrocirculação, além de diferentes danos teciduais levando ao desenvolvimento da falência multiorgânica. Isso reforça a importância em reestabelecer o equilíbrio hemodinâmico e de perfusão tecidual na doença tão intimamente ligados ao desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos.

A eficiente integração de sinais extra- e intracelulares é necessária para a correta sinalização e manutenção do funcionamento celular. Diferentes doenças humanas, como por exemplo a sepse, resultam de anormalidades em funções celulares decorrentes de uma desregulação na integração da sinalização celular (Maurice *et al.*, 2014). Durante esse fenômeno de sinalização celular, numerosos sistemas efetores estão envolvidos; entre eles está um dos primeiros sistemas de transdução intracelular de sinal descritos, os nucleotídeos cíclicos (Arora *et al.*, 2013; Baillie, Tejeda e Kelly, 2019).

Na sepse, observa-se uma redução nos níveis do nucleotídeo cíclico, adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP, do inglês *cyclic adenosine monophosphate*), através de modelos experimentais da doença (Neviere *et al.*, 2016; Thangamalai *et al.*, 2013). Essa diminuição em parte é atribuída a uma redução da expressão e atividade da enzima adenilil ciclase (AC), porém também pode ser justificada pela alteração na densidade de receptores metabotrópicos acoplados a proteína G (GPCRs, do inglês *G protein-coupled receptors*), que fazem transdução de sinal através da AC e que nesse contexto levam a uma menor atividade enzimática (Böhm *et al.*, 1995). Essas evidências experimentais comprovam que a sepse altera diferentes elementos da via de sinalização, culminando em redução dos níveis de cAMP. Alterações também são observadas nos níveis de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (cGMP, do inglês *cyclic guanosine monophosphate*) durante a sepse, com a observação de diminuição da atividade enzimática da guanilil ciclase (GC),

responsável pela produção do cGMP durante fases iniciais no desenvolvimento da síndrome (Fernandes *et al.*, 2006).

Os sistemas de sinalização de nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) regulam muitos processos fisiológicos, incluindo contração muscular cardíaca, vasodilatação, proliferação e diferenciação celular, expressão gênica, inflamação, apoptose e vias metabólicas (Francis, Blount e Corbin, 2011). Como na sepse observa-se uma redução dos níveis de nucleotídeos cíclicos em alguns momentos da evolução temporal da doença, uma abordagem farmacológica visando o aumento ou prevenção na queda nos níveis desses segundos mensageiros pode contribuir na normalização das disfunções orgânicas observadas.

Os níveis de nucleotídeos cíclicos podem ser modulados através de sua produção, ou mais eficientemente através da inibição de enzimas responsáveis pela sua degradação, as 3',5'-fosfodiesterases de nucleotídeos cíclicos (PDEs, do inglês *phosphodiesterases*). Essas enzimas estão distribuídas em 11 distintas famílias, de acordo com afinidade pelos substratos cGMP e/ou cAMP, perfil de inibição farmacológica e distribuição tecidual (Maurice *et al.*, 2014). O impacto e a utilidade terapêutica do bloqueio na hidrólise de nucleotídeos cíclicos catalisada por PDEs são reconhecidos há muito tempo, existindo inibidores de PDEs utilizados na clínica para diferentes indicações, como promoção de aumento na função cardíaca, melhora na vasodilatação, perfusão tecidual, entre outros (Baillie, Tejeda e Kelly, 2019).

1.3 ENZIMAS FOSFODIESTERASES

O cAMP e cGMP são sintetizados pelas enzimas adenilil- e guanilil ciclase respectivamente, e transduzem sinais celulares através de muitos alvos efetores, como a proteína cinase- ativada por cAMP (PKA, do inglês *protein kinase A*), ativada por cGMP (PKG, do inglês *protein kinase G*), canais iônicos controlados por nucleotídeos cíclicos, proteínas de troca ativadas diretamente por cAMP (EPAC1 e 2, do inglês *exchange proteins directly activated by cAMP*) e PDEs (Francis, Blount e Corbin, 2011). Por fim, a transdução de sinais por nucleotídeos cíclicos leva a fosforilação de inúmeros alvos, modulando a transcrição proteica através da interação com a proteína de ligação ao elemento de resposta (CREB, do inglês *cAMP response element-binding protein*). De forma oposta, a ativação de PDEs pelos nucleotídeos cíclicos leva a destruição de cAMP e cGMP, exercendo controle negativo sobre o fenômeno de transdução de sinal por eles operados (Baillie, Tejeda e Kelly, 2019).

A história das PDEs iniciou mesmo antes da descoberta dos nucleotídeos cíclicos com o trabalho de Henry Hyde Salter (1823-71), um importante médico e pesquisador na área do conhecimento relacionada a asma. Henry possuía asma e percebeu que quando consumia café, sua respiração melhorava, um efeito que foi atribuído as propriedades broncodilatadoras da cafeína (Sakula, 1985). O mecanismo de ação da cafeína naquele momento era desconhecido, porém foi associado com a inibição de PDEs anos mais tarde. Por conta disso, análogos da cafeína foram introduzidos com sucesso como tratamentos de doenças respiratórias – porém, atualmente já se sabe que os principais efeitos farmacológicos da cafeína são atribuídos a sua ação antagonista em receptores de adenosina, pois a cafeína é um inibidor pouco potente de PDEs, necessitando de alta concentração local para inibir essas enzimas, sendo tais concentrações atingidas somente em estudos com modelos *in vitro*. Em 1958, utilizando extrato de fígado, Earl Sutherland e Ted Rall demonstraram pela primeira vez a existência de um nucleotídeo termoestável (cAMP) atuando como um segundo mensageiro mediando vários efeitos celulares de neurotransmissores e hormônios. Neste mesmo estudo, a PDE foi identificada como sendo a enzima responsável pela inativação do cAMP, também se demonstrou que essa enzima poderia ser ativada com adição de magnésio e inibida com adição de cafeína (Sutherland e Rall, 1958). Já a molécula de cGMP foi identificada apenas cinco anos mais tarde através da análise de urina de ratos, adicionando-se esse segundo importante nucleotídeo cíclico no conhecimento sobre os sistemas de sinalização celular (Ashman *et al.*, 1963). Por conta de sua grande contribuição na descoberta do cAMP na sinalização de hormônios, Sutherland foi laureado com o prêmio Nobel em medicina e fisiologia no ano de 1971.

Desde a descoberta da existência das PDEs, o conhecimento sobre essas enzimas progrediu bastante. As PDEs constituem uma superfamília altamente conservada de enzimas diméricas responsáveis pela degradação canônica dos nucleotídeos 3',5'-cAMP e 3',5'-cGMP não canônica de 3',5'-cCMP, 3',5'-cIMP, and c-di-GMP (Maurice *et al.*, 2014; Schneider e Seifert, 2017). Existem onze famílias de PDEs que são agrupadas de acordo com homologia e especificidade do domínio catalítico C-terminal para cAMP e/ou cGMP. Cada família apresenta múltiplas isoformas, diferindo no comprimento e complexidade de seus domínios regulatórios N-terminal. Por exemplo, as famílias de PDEs 1-3, 10 e 11 são PDEs de substrato duplo capazes de hidrolisar cAMP e cGMP. As famílias de PDEs 4, 7 e 8 são

específicas para cAMP, por sua vez, as famílias de PDEs 5, 6 e 9 são específicas para cGMP (Baillie, Tejeda e Kelly, 2019; Maurice *et al.*, 2014). Em cada família de PDE há múltiplos genes que através de *splicing* alternativo dão origem há mais de cem variantes distintas de isoenzimas. A figura 2 a seguir retrata a disposição das diferentes famílias de PDEs no controle de sinalizações intracelulares operadas pelos nucleotídeos cíclicos.

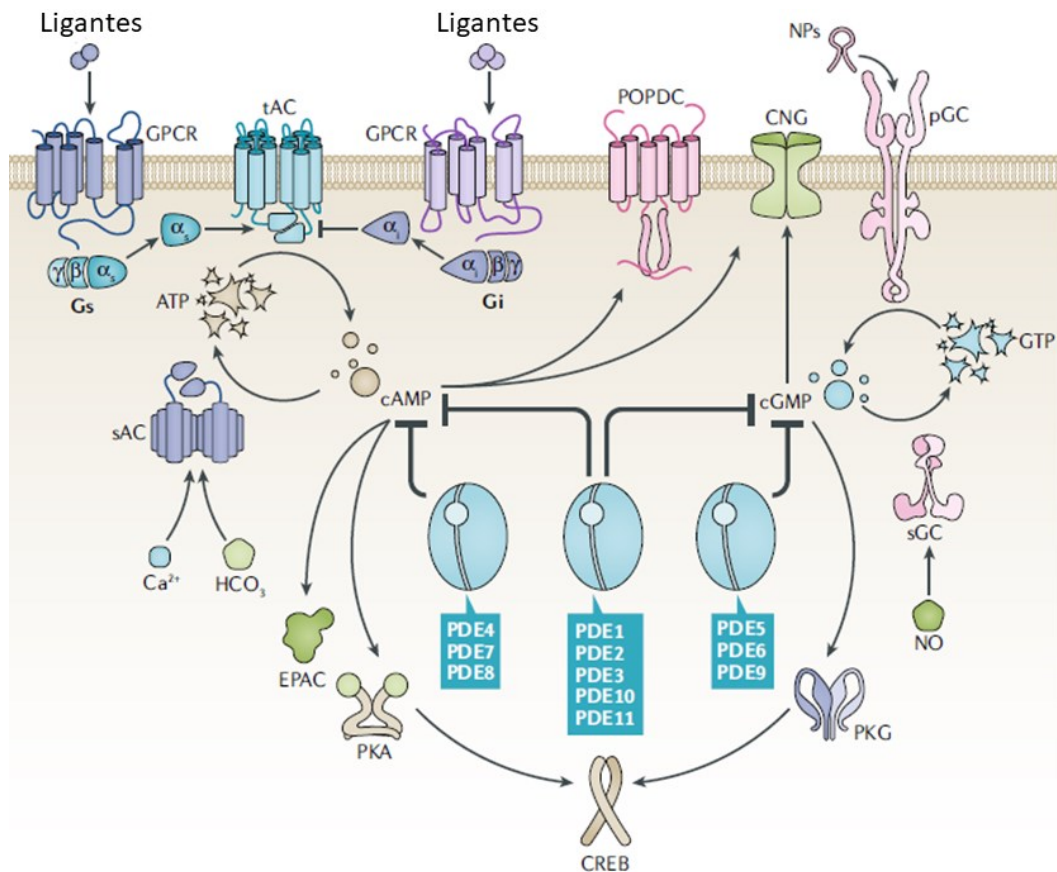


Figura 2. Vias de sinalização de nucleotídeos cíclicos controladas pelas diferentes famílias de PDEs. Ambas as vias canônicas de sinalização de nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) recebem influências de diferentes moléculas responsáveis pela geração, transdução e inativação dos sinais celulares. O cAMP é sintetizado pela enzima adenilil ciclase transmembrana (tAC) que é ativada pela proteína Gas e inibida por Gai, assim como pela enzima adenilil ciclase solúvel (sAC) que é ativada por bicarbonato e cálcio intracelular. Já o cGMP é sintetizado pela enzima guanilil ciclase particulada (pGC) que é ativada por peptídeos natriurético (NPs), também é sintetizado pela enzima guanilil ciclase solúvel (sGC) que é ativada pelo óxido nítrico (NO). Ambos, cAMP e cGMP ativam canais operados por nucleotídeos cíclicos (CNGs) e alotericamente modulam a atividade das enzimas fosfodiesterases (PDEs), responsáveis pela degradação e controle da sinalização dos nucleotídeos cíclicos. Os principais eventos de transdução de sinal pelo cGMP é decorrente de sua atividade estimulatória sobre proteína cinase G (PKG), enquanto o cAMP ativa proteína cinase A (PKA), proteína de troca ativada por cAMP (Epac) e proteínas de domínio popeye (POPDC). A transdução de sinais por cAMP e cGMP em última análise leva ao aumento na fosforilação de uma variedade de alvos moleculares *downstream*, incluindo a proteína de ligação responsiva ao cAMP (CREB). As onze famílias de PDEs podem ser organizadas de acordo com a especificidade na degradação e inativação dos nucleotídeos cíclicos. As famílias PDE4, 7 e 8 de forma específica atuam somente no controle de cAMP. Por outro lado, as famílias PDE5, 6 e 9 degradam especificamente cGMP. Há ainda as famílias de PDE1, 2, 3, 10 e 11 que apresentam uma atividade enzimática dual, controlando os níveis de cAMP e cGMP. GPCR: receptor metabotrópico acoplado a proteína G. Adaptado de Baillie, Tejeda e Kelly, 2019.

Os determinantes estruturais nos domínios regulatórios N-terminal contribuem para a localização subcelular e formação de sinalossomos únicos das PDEs (Lee, Maurice e Baillie, 2013). A incorporação de diferentes famílias ou subfamílias nos sinalossomos específicos permite um ajuste fino na sinalização dos nucleotídeos cíclicos (Kritzer *et al.*, 2012). Por conta disso, mais de uma família de PDE comumente controla um ponto diferente de uma determinada sinalização celular. Devido a importância do controle operado por essas enzimas, vários inibidores estão disponíveis para uso clínico no tratamento de diferentes doenças demonstrando segurança e eficácia terapêutica. Em detrimento da ausência desses parâmetros – segurança e/ou eficácia - alguns inibidores de PDEs estão disponíveis somente como ferramentas experimentais. As principais características das onze famílias de PDEs assim como de seus inibidores disponíveis estão sumarizados na tabela 2.

Tabela 2. Características das diferentes famílias de fosfodiesterases (PDEs) e seus inibidores farmacológicos

(continua)

Família de PDE	Gene de PDE	Especificidade de substrato	Expressão tecidual	Inibidores seletivos (IC50)
PDE1	PDE1A (9 variantes) PDE1B (2 variantes) PDE1C (5 variantes)	cAMP e cGMP	Ampla; significativa em miócitos cardíacos e vasculares, neurônios centrais e periféricos, células linfóides e mielóides, testículos e esperma	Comercializado vimpocetina (14 µM) Não comercializados W-7 (300 µM) IC224 (80 nM)
PDE2	PDE2A (4 variantes)	cAMP e cGMP	Ampla; significantes no encéfalo, coração, fígado, córtex da adrenal, endotélio e plaquetas	Não comercializados EHNA (800 nM) oxindole (40 nM) BAY60-7550 (4.7 nM) PDP (0.6 nM) IC933 (4 nM)
PDE3	PDE3A (3 variantes) PDE3B (1 variante)	cAMP e cGMP	Ampla; significativa em miócitos cardíacos e vasculares, encéfalo, fígado, tecidos adiposos, células β-pancreáticas, endotélio, tecido epitelial, oócitos e plaquetas	Comercializados cilostazol (200 nM) amrinona (16.7 µM) milrinona (150 nM) enoximona (10 µM) olprinona (1.25 µM) pimobendan (320 nM) anagrelida (36 nM) Não comercializados cilostamide (20 nM) OPC-33540 (0.3 nM) zardaverina (0.5–2 µM)

(continua)

Família de PDE	Gene de PDE	Especificidade de substrato	Expressão tecidual	Inibidores seletivos (IC50)
PDE4	PDE4A (7 variantes) PDE4B (4 variantes) PDE4C (7 variantes) PDE4D (9 variantes)	cAMP	Ampla; significativa em células do sistema cardiovascular, neurais, sistema imune e inflamatório	Comercializados roflumilaste (0.6 nM) apremilast (74 nM) crisaborol (490 nM) drotaverina (6.07 µM) Não comercializados rolipram (1 µM) cilomilast (70-120 nM) Ro 20-1724 (5 µM) piclamilast (1 nM) zardaverina (0.8–4 µM)
PDE5	PDE5A (3 variantes)	cGMP	Ampla; significativa em miócitos vasculares, miócitos cardíacos doentes, pulmões, encéfalo, plaquetas, rins, tecidos do sistema gastrointestinal e pênis	Comercializados sildenafil (5 nM) vardenafil (1 nM) tadalafil (5 nM) Não comercializado zaprinaste (500-700 nM)
PDE6	PDE6A (1 variante) PDE6B (1 variante) PDE6C (1 variante)	cGMP	Limitada aos fotorreceptores e glândula pineal	Indisponível
PDE7	PDE7A (3 variantes) PDE7B (4 variantes)	cAMP	Ampla em tecidos incluindo baço, encéfalo, pulmões e rins, além de células linfóides e mielóides	Não comercializados ASB16165 (15 nM) BRL 50481 (2.1 µM)
PDE8	PDE8A (5 variantes) PDE8B (6 variantes)	cAMP	Ampla, significativa nos testículos e tireóide	Não comercializado PF-04957325 (43 µM)

(conclusão)

Família de PDE	Gene de PDE	Especificidade de substrato	Expressão tecidual	Inibidores seletivos (IC50)
PDE9	PDE9A (20 variantes)	cGMP	Ampla, significativa no baço, encéfalo e células intestinais	Não comercializados Zaprinaste (35 µM) BAY73-6691 (55 nM) PF-04447943 (2.8 nM) WYQ-C28L (22 nM)
PDE10	PDE10A (6 variantes)	cAMP	Limitada ao encéfalo e testículos	Comercializado Papaverina (36 nM)
PDE11	PDE11 (4 variantes)	cAMP	Limitada a próstata, testículos, glândulas salivares e pituitária	Indisponível

Fonte: Adaptado de Baillie, Tejada e Kelly, 2019; Maurice et al., 2014.

1.4 FOSFODIESTERASE 3

A família de enzimas PDE3 apresenta atividade enzimática dual, com afinidades submicromolares para os nucleotídeos cíclicos, porém com uma atividade catalítica maior sobre cAMP do que cGMP. Portanto, o cGMP se comporta como um inibidor competitivo na hidrólise de cAMP pela PDE3. As enzimas PDE3 são expressas em diferentes tecidos, com destaque no tecido cardíaco de muitas espécies, sendo abundantes em mamíferos, incluindo humanos. No tecido cardíaco humano, a atividade de PDE3 está presente no citosol e frações microssomais, sendo que essa última reúne a maior parte da atividade enzimática de hidrólise de cAMP (Ahmad *et al.*, 2015). A PDE3 é codificada por dois genes – PDE3A e PDE3B. Ambos são expressos no tecido cardíaco, porém a isoforma PDE3A é predominante (Hambleton *et al.*, 2005; Wechsler *et al.*, 2002). Ainda, trabalhos utilizando a técnica de *knockout* desses genes em camundongos mostraram que PDE3A é a responsável pelos efeitos cardiotônicos observados no uso clínico de inibidores de PDE3 (Beca *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2007). Há três isoformas distintas de PDE3A (PDE3A1, -2 e -3) que diferem no domínio N-terminal proteico, sendo essas diferenças essenciais para o aprisionamento dessas isoformas em distintos compartimentos subcelulares juntamente com outros parceiros moleculares, que são determinantes para a formação dos microdomínios de sinalização. A PDE3A1 é a isoforma mais longa e contém ambos os domínios hidrofóbicos NHR1 e NHR2 sendo encontrada na fração particulada em compartimentos celulares. A PDE3A2 contém somente o domínio hidrofóbico NHR2 e pode ser detectada tanto nas frações particuladas quanto citosólicas nas células. Já a isoforma PDE3A3 é a mais curta, não possuindo resíduos hidrofóbicos, estando presente somente no citosol das células (Wechsler *et al.*, 2002). Opondo-se à diversidade de isoformas de PDE3A, até o momento apenas uma isoforma de PDE3B foi descrita, estando localizada no tecido cardíaco na região de túbulos-T próximo de mitocôndrias, enquanto as isoformas PDE3A estão associadas ao retículo sarcoplasmático (Chung *et al.*, 2015). As isoformas PDE3A1, PDE3A2 e PDE3B contém sítios de fosforilação para diferentes cinases, incluindo PKA, RAC α serina/treonina-proteína cinase (AKT1 ou PKB, do inglês *protein kinase B*) e PKC (do inglês, *protein kinase C*), as quais regulam de forma positiva a atividade enzimática e a interação proteína-proteína dessas enzimas com outros parceiros nos domínios de sinalização (Movsesian, Ahmad e Hirsch, 2018). A figura 3 reúne as informações

sobre a regulação gênica na transcrição das diferentes isoformas de PDE3 assim como destacando as principais características de cada isoforma.

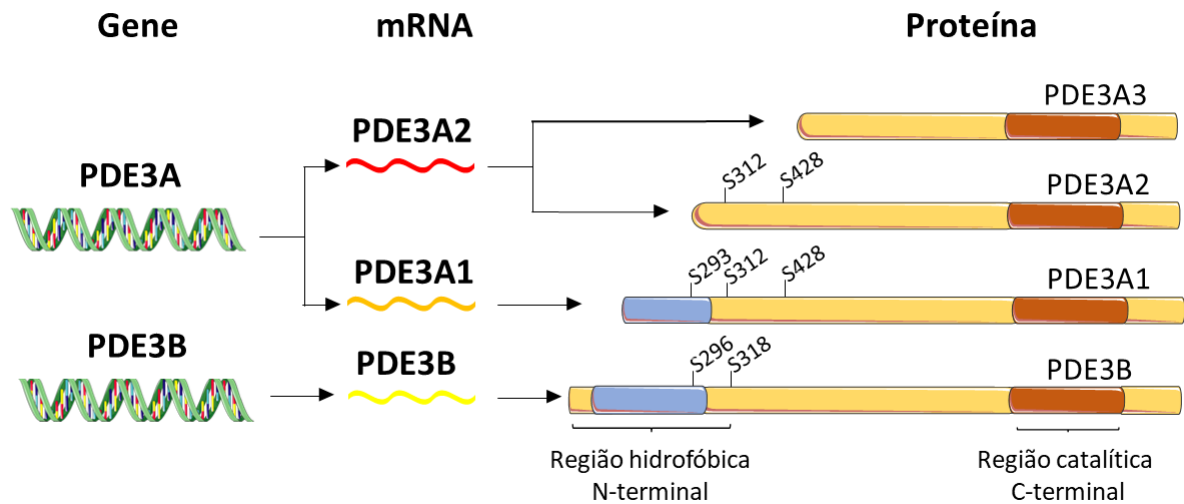


Figura 3. Regulação na expressão das diferentes isoformas de PDE3 nos tecidos. Dois genes distintos codificam a transcrição das 4 isoformas de PDE3. O gene PDE3A codifica dois genes mRNA, sendo que o mRNA PDE3A2 é transcrito nas isoformas PDE3A3 e PDE3A2. O mRNA PDE3A1 se relaciona a isoforma PDE3A1 e o mRNA PDE3B codifica a isoforma PDE3B. Uma característica marcante entre todas as isoformas de PDE3 e isso se aplica também às demais famílias é a presença de um domínio catalítico C-terminal preservado entre as diferentes isoformas, apresentando diferenças marcantes no domínio regulatório N-terminal, como diferenças na extensão proteica, regiões hidrofóbicas e sítios de fosforilação por diferentes alvos moleculares que juntos contribuem na determinação da localização celular e controle na atividade enzimática. Adaptado de Movsesian, 2016. Figura elaborada através do Smart Medical Art (smart.servier.com).

Apesar de destacarmos aqui a expressão e importância da enzima PDE3 no tecido cardíaco, dado ser o tecido com maior conteúdo da enzima. Conforme foi descrito na tabela 2, a expressão de PDE3 é ampla no organismo, estando presente nos miócitos cardíacos e vasculares, encéfalo, fígado, tecidos adiposos, células β -pancreáticas, endotélio, tecido epitelial, oócitos e plaquetas. A PDE3 assim como as demais isoformas de PDEs são essenciais na formação de microdomínios de sinalização de nucleotídeos cíclicos. Entretanto, estudos que utilizaram diferentes modelos animais de hipertrofia e/ou falência cardíaca têm demonstrado relevantes, porém variadas alterações na expressão de PDEs, onde observam-se desde normalidade na expressão de PDEs até aumento na expressão e atividade de isoformas que degradam cAMP e/ou cGMP (Ding *et al.*, 2005; Dodge *et al.*, 2001; Nagendran *et al.*, 2007; Nikolaev *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 1999). Essas alterações enzimáticas quando estão presentes podem contribuir para a

descompartimentalização da sinalização de cAMP e cGMP e causar a perda na especificidade de sinalização.

Durante a sepse, muitas alterações ocorrem e causam uma perturbação da sinalização de cAMP e cGMP. Entre elas, estudos utilizando modelos animais da doença demonstraram um aumento na expressão e atividade de PDE3 e 4 durante a sepse e endotoxemia. Além disso, estudos indicam efeitos protetores de cAMP e cGMP ao estimular ou inibir algumas isoformas de PDEs (Schlegel *et al.*, 2009; Schlegel e Waschke, 2009). Durante a sepse, a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ROS e RNS, do inglês *reactive oxygen -nitrogen species*) favorece o estresse oxidativo e nitrosativo, alterando funções de diversas proteínas, entre elas PDEs. O peroxinitrito causa modificação em PKG- α pela nitração em aminoácidos tirosina, inibindo a enzima e reduzindo seu efeito inibitório sobre a fosforilação de PDE3A em aminoácidos serina. Isso resulta na maior atividade de PDE3A, reduzindo os níveis de cAMP disponíveis nos microdomínios (Zemskov *et al.*, 2021). Em outro estudo, utilizando modelo de ligação e perfuração cecal em murinos foi demonstrado um aumento no conteúdo de PDE4D e na razão de degradação enzimática que contribuem para a queda nos níveis de cAMP nos microdomínios de sinalização cardíaca (Sakai *et al.*, 2017). Vale destacar que o aumento da expressão de uma isoforma de PDE pode resultar em uma perturbação em microdomínios próximos que podem ser regulados por outras isoformas de PDEs.

No mesmo sentido, estudos com animais utilizando modelo experimental de falência cardíaca têm demonstrado que as enzimas PDEs são alvos terapêuticos plausíveis. Entretanto, os mecanismos celulares controlados por cada família de PDE são bastante complexos e apontam para a necessidade de uma intervenção direcionada a uma família de PDE em específico, para limitar ao máximo o microdomínio de sinalização que será modulado (Kamel *et al.*, 2023). Essa intervenção farmacológica pode ser feita com o uso de inibidores seletivos das diferentes famílias de PDEs disponíveis, evitando-se assim uma intervenção global em diferentes isoformas de PDEs que culminaria em uma intensa elevação nos níveis de nucleotídeos cíclicos em vários compartimentos celulares, podendo romper os limites dos microdomínios de sinalização e prejudicar o complexo *crosstalk* entre o cAMP, cGMP e PDEs no controle da transdução de sinal intracelular.

1.5 INIBIÇÃO DE FOSFODIESTERASE 3

Dentre os diferentes inibidores de PDE3 disponíveis e descritos previamente na tabela 2, temos o cilostazol, que é metabolizado pelas enzimas hepáticas do citocromo P450, resultando em metabólitos ainda ativos. O cilostazol e seus metabólitos ativos de forma reversível se ligam ao sítio catalítico das enzimas PDE3, ocupando o sítio ativo enzimático e conseqüentemente, diminuindo a degradação de nucleotídeos cíclicos, principalmente o cAMP. Isso resulta em efeitos farmacológicos que são atribuídos à elevação nos níveis de cAMP, como aumento no funcionamento cardíaco, aumento na vasodilatação, inibição na ativação e agregação plaquetária, entre outros (Hiratsuka *et al.*, 2007). O cilostazol também é capaz de inibir a captação de adenosina para o interior das células, o que pode contribuir ainda mais para o aumento dos níveis de cAMP pela atuação da adenosina em seus receptores metabotrópicos acoplados a proteína Gs (Sun *et al.*, 2002). O efeito inibitório sobre a ativação e agregação plaquetária pelo cilostazol é comparável a aspirina e ticlopidina, porém o cilostazol apresenta menor incidência de complicações hemorrágicas (Panchal *et al.*, 2013). A figura 4 representa a estrutura química do cilostazol.

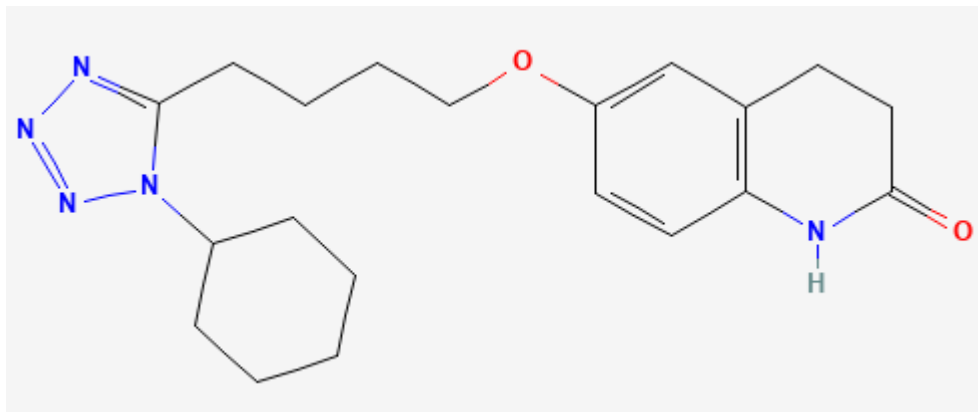


Figura 4. Estrutura molecular do cilostazol

Fonte: PubChem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2754>

Por conta dos benefícios de vasodilatação e inibição da agregação plaquetária o cilostazol desde o ano de 1999 encontra-se aprovado pelo órgão *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da claudicação intermitente e os guias da *American College of Cardiology* e *American Heart Association* fornecem uma recomendação de classe I para o uso do cilostazol como primeira opção farmacológica para o tratamento da claudicação intermitente e na melhora da distância percorrida

nos pacientes com doença vascular periférica (Gerhard-Herman *et al.*, 2017). Além dessa principal indicação terapêutica, o cilostazol vem recebendo recentemente uma crescente nas evidências científicas no uso do fármaco em outras condições patológicas, fortalecendo a possibilidade de seu reposicionamento terapêutico.

Em estudos clínicos randomizados e controlados demonstrou-se que o cilostazol diminui a recorrência de acidente vascular encefálico (AVE) isquêmico não cardioembólico em pacientes e com menor risco de ocorrência de sangramentos comparado à aspirina (Gotoh *et al.*, 2000; Uchiyama *et al.*, 2010). Há também um estudo de meta-análise envolvendo pacientes com AVE e outras doenças aterotrombóticas onde mostrou-se que o cilostazol foi associado com um menor risco na incidência total de eventos vasculares e cerebrovasculares comparado ao placebo (Uchiyama *et al.*, 2010). Há ainda muitos estudos clínicos em diferentes fases de desenvolvimento avaliando a possibilidade de reposicionamento do cilostazol em diferentes abordagens, incluindo falência cardíaca, infarto agudo do miocárdio, osteoartrite, doenças vasculares encefálicas, doenças hepáticas, entre outras condições. Esses estudos podem ser acessados no site, “clinicaltrials.gov”.

Além dos diferentes efeitos mencionados acima, o cilostazol aumenta a vasodilatação, previne a hiperplasia e proliferação de células musculares lisas nos vasos, diminui de forma sutil a pressão arterial sistólica, aumenta a frequência cardíaca de forma não associada com taquiarritmia e melhora o fluxo sanguíneo tecidual (Appleton *et al.*, 2019; Kwon *et al.*, 2015). Os efeitos vasodilatadores do cilostazol aparentam resultar da ação do cAMP sobre células musculares lisas e com uma maior liberação de NO pelas células endoteliais em resposta ao aumento de cAMP local, além da inibição da proliferação de células musculares lisas, garantindo maior complacência de artérias (Hashimoto *et al.*, 2006). Esse remodelamento ocorre porque o cAMP reduz a atividade do fator de crescimento derivado de plaquetas, que regula a proliferação de células musculares lisas vasculares (Havenon, De *et al.*, 2021; Hayashi *et al.*, 2000).

Por conta da ampla expressão das enzimas PDE3 no organismo diversos estudos têm demonstrado uma gama de efeitos associados ao cilostazol, como atividades antitrombóticas, anti-inflamatória, antioxidante e cardioprotetora (Chattipakorn *et al.*, 2014; Motta *et al.*, 2021; Motta, da e Brito, de, 2016; Tawfik, El-Kherbetawy e Makary, 2018). Nos últimos anos ainda, tem crescido o interesse de pesquisadores nos efeitos pleiotrópicos do cilostazol, incluindo potencial efeito anti-

inflamatório. Estudos utilizando modelos *in vitro*, utilizando células da microglia estimuladas com LPS demonstraram que o cilostazol foi capaz de prevenir o aumento na síntese de NO e de citocinas pró-inflamatórias (Yoshikawa *et al.*, 1999, 2002). Além disso, também foi demonstrado em modelo *in vitro* utilizando células de linhagem de macrófago (RAW264.7) estimuladas com diferentes ligantes de receptores *Toll-like* que o cilostazol foi capaz de inibir a ativação e translocação ao núcleo do NFκB (Sakamoto *et al.*, 2018). Outros estudos *in vivo* demonstraram que cilostazol suprime hiperplasia neointimal induzida por LPS e a migração de macrófagos em um modelo lesão vascular induzida por balão em coelhos (Tsai *et al.*, 2008). Além disso, um estudo mostrou que o cilostazol foi capaz de diminuir a síntese de citocinas pró-inflamatórias e a mortalidade em um modelo de endotoxemia induzida pela administração de LPS em camundongos (Park *et al.*, 2010).

Diante da complexidade das alterações observadas na fisiopatologia da sepse, onde ocorre uma perturbação em muitos sistemas de sinalização que convergem nos nucleotídeos cíclicos, propomos nesse estudo a utilização do cilostazol, um inibidor seletivo de PDE3 com comprovada eficácia e principalmente segurança no uso clínico. Espera-se que essa ferramenta farmacológica aumente os níveis principalmente de cAMP de uma forma racional em microdomínios específicos de sinalização celular. Nossa hipótese é que a inibição de PDE3 no início na sepse promove um aumento dos níveis principalmente de cAMP, acarretando a subsequente melhora de parâmetros cardíacos, vasculares, inflamatórios e metabólicos amplamente acometidos na doença, evitando-se assim o desenvolvimento precoce da disfunção multiorgânica observada na sepse experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da inibição da enzima PDE3 sobre as alterações cardiovasculares, inflamatórias e metabólicas induzidas por um modelo experimental de sepse em ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Analisar se a inibição de PDE3 previne alterações cardiovasculares na pressão arterial, frequência cardíaca, fluxo sanguíneo renal e muscular, reatividade vascular *in vivo* e *ex vivo*.

2) Avaliar se a inibição de PDE3 previne alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos de danos teciduais.

3) Verificar se a inibição de PDE3 exibe efeito anti-inflamatório prevenindo a elevação nos níveis plasmáticos de nitrato – nitrito (NOx), o aumento na permeabilidade vascular e aumento na migração de neutrófilos aos tecidos durante a sepse.

4) Avaliar se a sepse causa alterações histológicas em tecidos e se a inibição de PDE3 previne esses danos.

5) Analisar se a inibição de PDE3 aumenta os níveis plasmáticos de cAMP, cGMP e adenosina, além dos níveis teciduais de cAMP e cGMP durante a sepse.

6) Avaliar o conteúdo proteico por *western blotting* de PDE3A total e sua porção fosforilada (pPDE3A (Ser312)) durante a sepse e diante da inibição de PDE3.

7) Analisar a imunomarcação para PDE3A total, pPDE3A(Ser312), óxido nítrico sintase 2 (NOS2), óxido nítrico sintase 3 (NOS3), receptor de adenosina A_{2A} e transportador equilibrativo de nucleosídeo 1 (ENT1) durante a sepse e inibição de PDE3.

8) Avaliar se a inibição de PDE3 melhora a sobrevida dos animais durante a sepse.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES

As seguintes substâncias foram usadas neste estudo: cilostazol (IPCA Laboratories Limited, Mumbai, Índia); cloridrato de fenilefrina, angiotensina II, cloridrato de isoproterenol, brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB), fosfato monossódico, fosfato dissódico, dicloridrato de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, ortovanadato de sódio, fluoreto de fenilmetilsulfonil, coquetel de inibidores de protease, solução Ponceau S, solução de persulfato de amônio, 3-isobutil-1-metilxantina, tetrahidrocloreto de 3,3-diaminobenzidina (DAB), meio de montagem EUKITT®, dimetil sulfóxido (DMSO) e brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA); reagentes usados para preparar SDS-PAGE, Tris-HCl, N,N,N',N'-tetrametil etilenodiamina, azul brilhante de coomassie G 250 e reagente de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EUA); reagente de extração de proteína tecidual T-PER™, kit de ensaio de proteína Pierce™ ácido bicinconínico (BCA) e SuperSignal™ contendo substratos quimioluminescentes (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA); cloridrato de cetamina e xilazina (Syntec do Brasil Ltda, Cotia, SP, Brasil); cloridrato de tramadol (Laboratório Teuto, Anápolis, GO, Brasil); heparina sódica (Cristália Farmacêutica, São Paulo, SP, Brasil); ácido acético, álcool etílico, formaldeído, ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) dissódico, ácido sulfúrico, sulfato ferroso e ácido pirogálico (Labsynth, Diadema, SP, Brasil); formamida (Dinâmica, Indaiatuba, SP, Brasil); peróxido de hidrogênio (Rioquímica Ltda, São José do Rio Preto, SP, Brasil); anticorpo monoclonal anti-PDE3A sc-293446, anticorpo monoclonal anti-NOS2 sc-7271, anticorpo policlonal anti-NOS3 sc-654, anticorpo monoclonal anti-receptor de adenosina A_{2A} sc-32261 e anticorpo monoclonal anti-ENT1 sc-377283 (Santa Cruz, Dallas, TX, EUA); anticorpo policlonal anti-Phospho-PDE3A (Ser312) PA5-64844 (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA); anticorpo anti-IgG-peroxidase de camundongo 7076 e anticorpo anti-IgG-peroxidase de coelho 7074 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA), anticorpo monoclonal anti-β-actina A5441 e anticorpo monoclonal anti-GAPDH-peroxidase G9295 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA); anticorpo biotinilado anti-IgG de camundongo, anticorpo biotinilado anti-IgG de coelho e reagente do complexo avidina-biotina (ABC) (Vector Laboratories, Newark, CA, EUA); kit fluorimétrico para determinação de adenosina ab211094 (Abcam Plc, Cambridge, Inglaterra); kits de

imunoabsorção enzimática para determinação de cAMP 581001 e cGMP 581021 (CaymanChemical, Ann Arbor, MI, EUA).

3.2 ANIMAIS

Foram utilizados ratos *Rattus norvegicus* machos, da linhagem Wistar (300-350 g; 3-4 meses de idade) fornecidos pela Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, SC, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas ventiladas Tecniplast® (gaiolas plásticas de 45 x 34 x 16 cm, 5 ratos por gaiola) sob temperatura controlada (22 ± 2 °C), ciclo claro/escuro (12/12 h) com livre acesso a água e comida (Puro Trato, Santo Augusto, RS, Brasil). Todos os animais receberam tratamento com o antiparasitário de amplo espectro fembendazol na dose de 20 mg/kg/dia na água de beber durante cinco dias, seguido por um período de carência de sete dias antes do início dos protocolos experimentais. Os experimentos foram realizados entre 8:00 e 18:00 h, exceto a análise de parâmetros cardiovasculares por pletismografia de cauda, que foi realizada entre 6:00 e 22:00 h. Todos os procedimentos experimentais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética Institucional da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo número 1667100417). Nos protocolos experimentais foram seguidas as recomendações da Diretriz Brasileira para o Cuidado e uso de Animais para fins científicos (DBCA) e do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), além disso todos os experimentos foram descritos e executados em conformidade com as diretrizes ARRIVE (do inglês, *Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (Kilkenny *et al.*, 2010).

3.3 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Protocolo experimental 1: Análise de parâmetros cardiovasculares, hemodinâmicos, marcadores de danos e inflamação tecidual e o impacto da inibição de PDE3 pelo cilostazol nestes contextos

Na análise dos parâmetros cardiovasculares em animais conscientes os ratos foram submetidos a seções de treinamento, obtendo-se o valor basal da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC). Posteriormente, esses animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, sendo um grupo falso-operado (sham) e o outro grupo submetido ao procedimento cirúrgico de ligação e perfuração cecal (do inglês, *cecal ligation and puncture*, CLP). Ambos os grupos receberam tratamento analgésico com tramadol (10 mg/kg, ip). Seis horas após a cirurgia, os

animais dos grupos sham e CLP foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos para receber o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, og) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, og), conforme a descrição abaixo:

- 1) Sham veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, oral gavagem)
- 2) Sham cilostazol (15 mg/kg, oral gavagem)
- 3) CLP veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, oral gavagem)
- 4) CLP cilostazol (15 mg/kg, oral gavagem)

Os valores de PAS e FC foram obtidos em diferentes medidas ao longo do período de vinte e quatro horas (Fig. 1A). A cada doze horas os animais receberam reforço anestésico com tramadol (5 mg/kg, ip) e ao término das análises no tempo de vinte e quatro horas, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica, totalizando o triplo da dose anestésica com cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente). A dose de cilostazol foi escolhida com base na extrapolação da dose utilizada em humanos para roedores e em estudos farmacocinéticos e toxicológicos do fármaco em ratos e humanos (Bramer, Forbes e Mallikaarjun, 1999; Mustapha *et al.*, 2017; Nair e Jacob, 2016).

Em um segundo bloco de experimentos, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos e submetidos ao procedimento de CLP ou sham. Seis horas após o procedimento, os animais foram de forma randomizada distribuídos em 4 grupos e tratados com cilostazol ou veículo como descrito acima. A glicose sanguínea, temperatura corporal e escore de gravidade da doença foram analisados em animais conscientes em diferentes tempos ao longo de vinte e quatro horas (Fig. 1A). O escore de gravidade de doença foi obtido através da análise de seis parâmetros, letargia, piloereção, tremor, exsudato periorbital, desconforto respiratório e diarreia (O’Riordan *et al.*, 2020).

Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram anestesiados para a análise de parâmetros cardiovasculares por métodos invasivos, obtendo-se os parâmetros de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo muscular (FSM), hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) e reatividade vascular *in vivo*. Após as medidas hemodinâmicas, os animais foram eutanasiados por sobredosagem anestésica, amostras de sangue e tecidos foram coletados para posteriores análises, conforme mostrado no protocolo esquemático (Fig. 5).

Em um terceiro conjunto experimental, vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica e o vaso da aorta torácica foi coletado para análise de reatividade vascular *ex vivo* em sistema de banho de órgão isolado. Todos os experimentos dos três protocolos experimentais foram divididos e realizados em dias diferentes para garantir a reprodutibilidade do estudo, da mesma forma um animal não foi submetido a muitas análises concomitantes ou sequenciais, prezando pelo bem-estar animal e evitando-se o viés de muitas intervenções farmacológicas/animal.

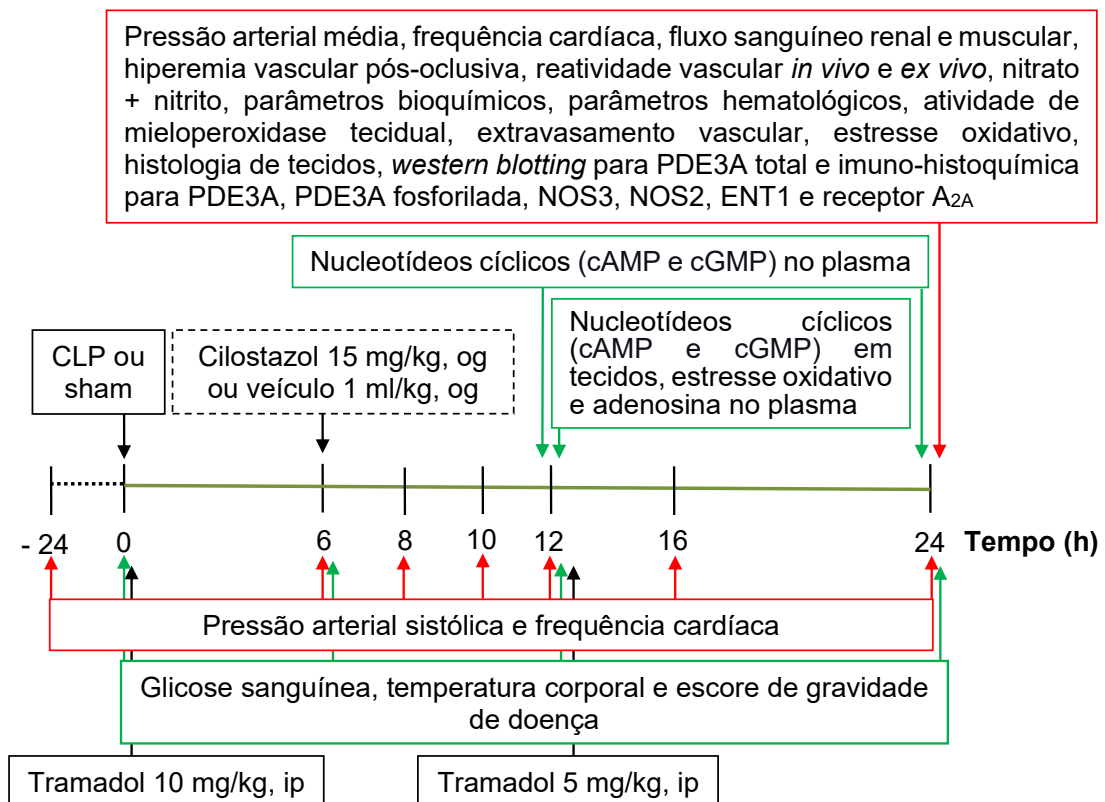


Figura 5. Linha do tempo do protocolo experimental 1. Antes de serem submetidos ao procedimento de CLP ou sham os animais receberam o analgésico tramadol (10 mg/kg, ip). Seis horas após o procedimento de CLP ou sham, os ratos receberam cilostazol (15 mg/Kg, og) ou óleo de amendoim (1 ml/Kg, og) e 12 h após o procedimento os animais receberam reforço analgésico com tramadol (5 mg/kg, ip). As análises foram realizadas em tempos diferentes de acordo com cada teste dentro de 24 h. Pressão arterial média, frequência cardíaca e fluxo sanguíneo renal em animais anestesiados (n= 7-8 animais/grupo); fluxo sanguíneo muscular e hiperemia reativa pós-oclusiva em animais anestesiados (n= 6-9 animais/grupo); glicemia (n=7 animais/grupo); pressão arterial sistólica e frequência cardíaca em animais acordados (n= 6-7 animais/grupo); reatividade vascular *ex vivo* em sistema de banho de órgãos (n= 10-13 animais/grupo); NOx, AST, ALT, ureia, creatinina, lactato, ácido úrico, creatina quinase, adenosina no plasma e nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) no plasma e em tecidos (n= 10 animais/grupo); parâmetros hematológicos (n= 8-9 animais/grupo); atividade da enzima mieloperoxidase tecidual e ensaio de permeabilidade vascular por extravasamento do corante azul de Evans (n= 9-11 animais/grupo); análise histológica e imuno-histoquímica para PDE3A, PDE3A fosforilada, NOS3, NOS2, ENT1 e receptor A_{2A} (n= 5 animais/grupo); *western blotting* para PDE3A (n= 8 animais/grupo); estresse oxidativo (n= 6 animais/grupo).

Nox: nitrato + nitrito; AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; PDE3A: fosfodiesterase 3A; NOS3: óxido nítrico sintase 3; NOS2: óxido nítrico sintase 2; ENT1: transportador equilibrativo de nucleosídeos 1; A_{2A}: receptor de adenosina subtipo A_{2A}.

3.3.2 Protocolo experimental 2: envolvimento da fosforilação de PDE3A na sepse

Para avaliar o envolvimento da fosforilação da PDE3A na sepse, os animais foram distribuídos em dois grupos, sendo um grupo naive e um grupo de animais submetidos ao procedimento de CLP. Os animais do grupo naive não receberam nenhuma intervenção cirúrgica ou farmacológica, foram eutanasiados por sobredose anestésica e os tecidos do coração e aorta torácica foram coletados e processados para posterior análise de conteúdo proteico por *Western blotting*. Os animais do grupo CLP receberam o analgésico tramadol (10 mg/kg, ip) antes do procedimento cirúrgico e reforço analgésico com tramadol (5 mg/kg, ip) após doze horas nos animais que foram eutanasiados no tempo de vinte e quatro horas. Os animais do grupo CLP foram eutanasiados por sobredose anestésica e da mesma forma que os animais naive, os tecidos foram coletados e analisados por *western blotting* para determinar o conteúdo proteico de PDE3A fosforilada (Ser 312) (Fig. 6).

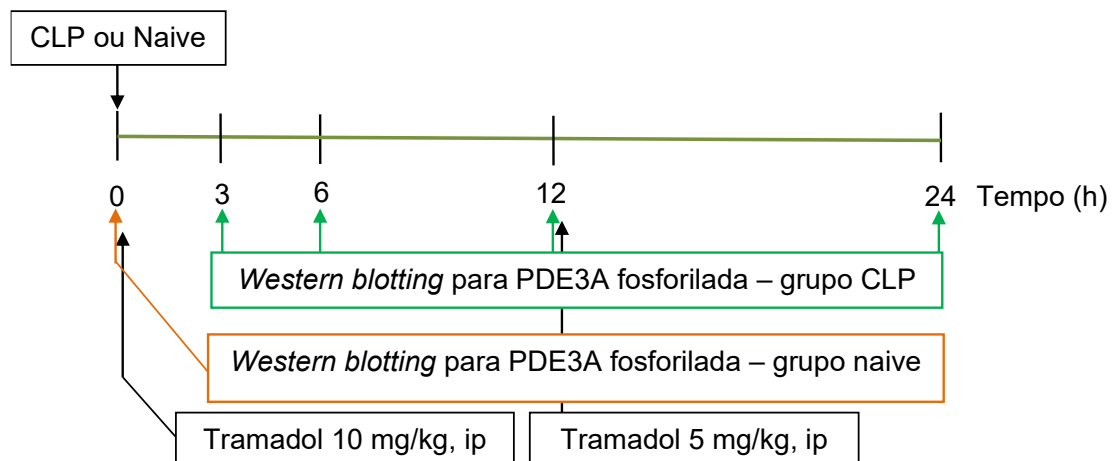


Figura 6. Linha do tempo do protocolo experimental 2. Os animais do grupo naive foram eutanasiados e tiveram seus tecidos coletados no tempo 0. Os ratos do grupo CLP receberam antes do procedimento cirúrgico o analgésico tramadol (10 mg/kg, ip) e nos grupos de análise mais tardia receberam reforço analgésico com tramadol (5mg/kg, ip) 12 h após o procedimento. Os animais do grupo CLP foram eutanasiados e os tecidos foram coletados após 3, 6, 12 ou 24 h após o procedimento cirúrgico. Os tecidos foram processados para posterior análise do conteúdo de PDE3A fosforilada (Ser 312) por *Western blotting* (n=6-8 animais/grupo). PDE3A: fosfodiesterase 3A; fosfodiesterase 3A.

3.3.3 Protocolo experimental 3: impacto da inibição de PDE3 na mortalidade induzida na sepse

Por fim, em outro conjunto experimental independente, a mortalidade dos animais foi analisada durante cento e vinte horas. Para isso, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos, sham ou CLP. Seis horas depois, foram

randomizados em 7 grupos experimentais de acordo com o tratamento, conforme descrito abaixo:

- 1) Sham veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, oral gavagem)
- 2) Sham cilostazol (15 mg/kg, oral gavagem) + antibiótico (24.000 UI de penicilina/kg, intramuscular)
- 3) CLP veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, oral gavagem)
- 4) CLP cilostazol (15 mg/kg, oral gavagem)
- 5) CLP veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, oral gavagem) + antibiótico (24.000 UI de penicilina/kg, intramuscular)
- 6) CLP cilostazol (15 mg/kg, oral gavagem) + antibiótico (24.000 UI de penicilina/kg, intramuscular)
- 7) CLP cilostazol (15 mg/kg, oral gavagem) duas doses + antibiótico (24.000 UI de penicilina/kg, intramuscular)

Os animais foram tratados com cilostazol (15 mg/kg, og), veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, og) e/ou suspensão de antibiótico (24.000 UI de penicilina/kg, im) seis horas após o procedimento cirúrgico. Após vinte e quatro horas, somente os animais do grupo sete receberam mais uma dose de cilostazol (15 mg/kg, og) e a sobrevivência foi analisada a cada doze horas até completar o tempo de cento e vinte horas. Todos os animais sobreviventes receberam reforço analgésico com tramadol (5 mg/kg, ip) a cada doze horas por até setenta e duas horas para manutenção do efeito analgésico durante o protocolo experimental (Fig. 7). Ao término do experimento, os animais sobreviventes foram eutanasiados com sobredose anestésica.

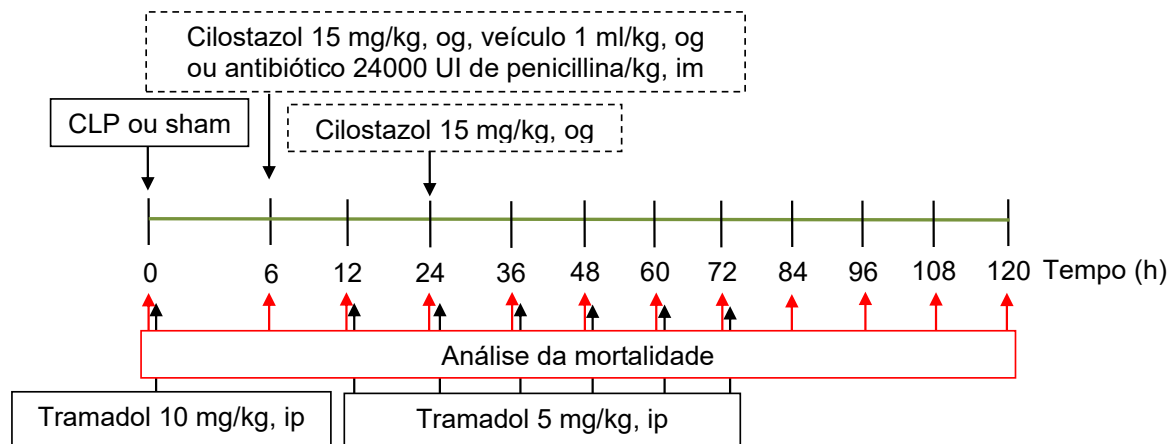


Figura 7. Linha do tempo do protocolo experimental 3. Seis horas após o procedimento CLP ou sham, os ratos receberam cilostazol (15 mg/kg, og), óleo de amendoim (1 ml/kg, og), ou antibiótico (24.000 UI de penicilina/kg, im) e um grupo recebeu após 24 h uma dose adicional de cilostazol (15 mg/kg, og). Todos os animais receberam tramadol (10 mg/kg, ip) antes e cada 12 h após o a cirurgia, tramadol (5 mg/kg, ip) durante as primeiras 72 horas. A mortalidade dos animais foi verificada em diferentes tempos durante 120 h (n=3-35 animais/grupo).

3.4 MODELO DE LIGAÇÃO E PERFURAÇÃO CECAL (CLP)

O procedimento de CLP foi realizado conforme descrito anteriormente com pequenas modificações (Wichterman, Baue e Chaudry, 1980). Os ratos receberam uma injeção de tramadol (10 mg/Kg, ip), e dez minutos depois foram anestesiados com cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, respectivamente, ip). Na sequência, realizou-se a tricotomia dos pelos na região abdominal dos animais e estes foram posicionados em decúbito dorsal sob uma mesa cirúrgica acoplada com manta de aquecimento (37 °C). Realizou-se a antissepsia do local com álcool iodado (iodo 0,1% e álcool etílico 50% v/v), em seguida a laparotomia nos animais com incisão longitudinal de aproximadamente 1,5 cm na região da linha alba e subsequente exposição do ceco. Após a exteriorização do ceco, o lúmen foi reduzido por ligadura não obstrutiva logo acima da válvula ileocecal, utilizando linha de seda e haste flexível para limitar a obstrução. Uma única perfuração transfixante foi feita no ceco com uma agulha de calibre 22G (0,70 x 25 mm) e sem a remoção da agulha e utilizando de movimentos circulares, uma pequena porção de conteúdo fecal (equivalente a uma coluna de aproximadamente 5 mm) foi extravasada através da perfuração. Após isso, o ceco foi cuidadosamente recolocado na cavidade peritoneal, sendo na sequência os músculos do abdômen e da pele suturados com fios de seda. O mesmo pesquisador sempre realizou esse procedimento para manter a reprodutibilidade no modelo cirúrgico. Um procedimento cirúrgico semelhante, incluindo laparotomia de pelos, incisão

longitudinal sobre a região da linha alba, mas sem externalização, ligação e perfuração do ceco, foi realizado no grupo controle falso-operado (sham). Após o procedimento, todos os animais receberam 5 ml/100 g de peso corporal de solução fisiológica (NaCl 0,9%) estéril aquecida (37 °C) por via subcutânea (sc) na região do dorso para ressuscitação volêmica e para reproduzir o suporte hemodinâmico clínico conforme descrito anteriormente (Hubbard *et al.*, 2005; Wichterman, Baue e Chaudry, 1980). Os animais foram alocados em uma manta aquecida (37 °C) e monitorados até a recuperação total da anestesia (aproximadamente 120 minutos). Doze horas após a cirurgia, os ratos receberam tramadol (5 mg/kg, ip) para manutenção analgésica. A manutenção da analgesia foi feita a cada doze horas por um período máximo de até três dias na curva de sobrevivência e/ou de acordo com a necessidade em cada protocolo experimental realizado.

3.5 PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA (PAS) E FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) POR PLETISMOGRAFIA DE CAUDA EM ANIMAIS CONSCIENTES

A PAS (expressa em mmHg) e FC (expressa em bpm) foram determinados em ratos conscientes por método não invasivo através da pletismografia de cauda. Os animais foram previamente submetidos a seções de treinamento durante três dias consecutivos, possibilitando a ambientação com o aparato contendor, obtendo-se os valores basais de PAS e FC antes da realização do procedimento cirúrgico. Nos dias de treinamento e análise, os animais foram mantidos em sala pré-aquecida (30 °C) para aclimação por quinze minutos. Em seguida, os ratos foram alocados em um contendor de acrílico transparente por cinco minutos, possibilitando o posicionamento do manguito de insuflação acoplado a um transdutor de pulso pneumático (pletismógrafo) na região da base da cauda dos animais. O transdutor detectou variações de pressão e volume sanguíneo na cauda dos animais após ser inflado a uma pressão máxima de 240 mmHg, interrompendo assim o fluxo sanguíneo. O sinal de pulso e os parâmetros cardiovasculares foram obtidos durante as análises através da observação do retorno do sinal de pulso durante a deflação do manguito a uma taxa constante. Os valores de PAS e FC foram adquiridos através do transdutor de pulso acoplado ao sistema de aquisição de dados Powerlab 4/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia) e registrados através do software de integração LabChart8® (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia). Ao término do experimento, os animais

foram eutanasiados com sobredose anestésica, totalizando o triplo da dose anestésica com cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente).

3.6 GLICOSE SANGUÍNEA

A glicose sanguínea (expressa em mg/dL) foi analisada em animais conscientes imediatamente antes do procedimento cirúrgico e após seis, doze e vinte e quatro horas. Para a coleta de sangue, os ratos tiveram a ponta da cauda cortada (aproximadamente 1 mm). A primeira gota de sangue foi descartada e a segunda gota de sangue foi utilizada para a medida da glicose sanguínea por meio de um glicosímetro (Accu-Chek Active, Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha).

3.7 PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM), FREQUÊNCIA CARDÍACA (FC) E FLUXO SANGUÍNEO RENAL EM ANIMAIS ANESTESIADOS

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, im, respectivamente) e suplementados com a mesma solução em intervalos de quarenta e cinco minutos. Na sequência, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica acoplada à manta de aquecimento (37 °C). Foi realizada uma incisão na altura do pescoço dos animais e após a localização da veia jugular direita, foi inserida uma cânula de polietileno PE 50 acoplada com seringa de 1 ml contendo solução fisiológica (NaCl 0,9% estéril). Este acesso venoso foi utilizado para a administração de drogas vasoativas. Após isso, a artéria carótida esquerda foi localizada, cuidadosamente separada do nervo vago e tecidos adjacentes e foi canulada. Durante a canulação, a artéria teve o fluxo sanguíneo temporariamente interrompido por compressão de uma pinça curva, e em seguida, foi inserida uma cânula de polietileno PE 50 heparinizada (50 UI/ml de solução fisiológica NaCl 0,9% estéril). A cânula foi fixada no vaso através de fio de seda e conectada a um transdutor de pressão descartável acoplado ao sistema de aquisição de dados Powerlab 4/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia) e registrados em um computador através do software de integração LabChart8® (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia). O local da incisão foi coberto com gaze embebida em solução fisiológica NaCl 0,9% estéril para evitar a exposição e desidratação tecidual. Após dez minutos de estabilização dos animais no sistema, os valores de pressão arterial média (PAM, em mmHg) e frequência cardíaca (FC, em bpm) foram obtidos antes e durante intervenções farmacológicas realizadas nos testes de reatividade vascular *in vivo*

através da administração intravenosa de doses crescentes dos vasoconstritores fenilefrina, um agonista seletivo de receptor α_1 -adrenérgico (3, 10 e 30 nmol/kg, iv); angiotensina II, um agonista não seletivo de receptor AT₁ e AT₂ (3, 10 e 30 pmol/kg, iv) e do simpaticomimético isoprenalina, uma agonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos (0,3, 1 e 3 nmol/kg, iv), conforme descrito anteriormente (Silva-Santos e Assrey, 1999).

Concomitantemente à avaliação da PA e da FC, obteve-se os valores do fluxo sanguíneo renal (FSR, em unidades de perfusão, PU), nos animais. Para isso, foi realizada a tricotomia dos pelos na região abdominal, antisepsia do local com álcool iodado (iodo 0,1%, álcool etílico 50%, v/v) e uma incisão longitudinal de aproximadamente 1,5 cm foi feita no flanco esquerdo dos animais. Em seguida, com auxílio de pinças e hastes flexíveis, o intestino foi gentilmente movido permitindo a localização do rim esquerdo. Foi posicionada sobre a superfície renal uma sonda (modelo VP1T) conectada ao laser Doppler de monitoramento de fluxo sanguíneo (moorVMS-LDF2, Moor Instruments, Axminster, Reino Unido) também acoplado ao sistema PowerLab 4/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia) com integração através do software LabChart8® (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia), conforme descrito previamente (Kovalski *et al.*, 2017). Após dez minutos de estabilização, iniciou-se a obtenção das medidas que foram feitas durante toda a análise de reatividade vascular *in vivo*, conforme descrito acima. Ao término do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica, totalizando o triplo da dose anestésica com cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente).

3.8 HIPEREMIA REATIVA PÓS-OCLUSIVA (HRPO) EM ANIMAIS ANESTESIADOS

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, im, respectivamente). Em seguida, foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica acoplada à manta de aquecimento (37 °C) e foram submetidos à canulação da artéria carótida esquerda, conforme descrito anteriormente (seção 3.7). Na sequência, foi realizada uma pequena incisão na pele da perna direita dos animais para expor o ventre do músculo tibial anterior. Uma sonda (modelo VP1T) conectada ao laser Doppler de monitoramento de fluxo sanguíneo (moorVMS-LDF2, Moor Instruments, Axminster, Reino Unido) foi posicionada diretamente na região ventral do músculo e análise foi feita conforme descrita

anteriormente (Souza-Silva *et al.*, 2021). Resumidamente, após vinte minutos de estabilização, obteve-se os valores de PAM (em mmHg), FC (em bpm) e o fluxo sanguíneo muscular basal (em PU). Em seguida, um manguito de insuflação foi posicionado na perna próximo ao joelho dos animais e inflado até uma pressão máxima de 300 mmHg para reduzir o fluxo sanguíneo muscular. Após cinco minutos de oclusão, a pressão do manguito de insuflação foi liberada e o fluxo sanguíneo foi restabelecido imediatamente, possibilitando a obtenção da resposta de hiperemia reativa pós oclusiva (HRPO), obtendo-se os valores de fluxo sanguíneo muscular máximo (em PU), tempo para resposta máxima (em segundos), tempo de recuperação de 50% da resposta (em segundos) e integral relativa ao basal (em $UP.s \times 10^3$). Todos os parâmetros analisados foram obtidos através do sistema PowerLab 4/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia) com integração pelo software LabChart8® (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia). Durante o protocolo experimental a incisão foi coberta com gaze embebida em solução fisiológica NaCl 0,9% estéril, evitando-se a exposição e desidratação do músculo. Ao término do protocolo experimental, os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica, totalizando o triplo da dose anestésica com cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente).

3.9 REATIVIDADE VASCULAR *EX VIVO*

Os animais receberam solução anticoagulante contendo heparina sódica (200 UI/kg, ip) e após dez minutos foram eutanasiados com sobredose anestésica de cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente). Em seguida, os animais foram dispostos em decúbito dorsal, realizou-se uma incisão na região da caixa torácica, e artéria aorta torácica foi cuidadosamente removida, disposta em placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs (em mmol/L, NaCl 118; KCl 4,6; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2; KH_2PO_4 1,2; $NaHCO_3$ 25; $C_6H_{12}O_6$ 11,1 e $CaCl_2$ 25). Na sequência, o tecido adiposo perivascular foi removido com o auxílio de tesoura oftálmica e a aorta torácica foi seccionada em anéis de aproximadamente 3-4 mm de espessura. Os anéis foram inseridos em um sistema de banho de órgão isolado, posicionado entre duas hastes metálicas, sendo uma haste fixa ao sistema e a outra haste móvel conectada a um transdutor de tensão isométrica acoplado ao sistema de aquisição de dados PowerLab 4/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia) com integração pelo software LabChart8® (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill Australia).

Os anéis dos vasos foram mantidos sob as seguintes condições durante o protocolo experimental, tensão basal de 1 g, temperatura constante de 37 °C nas cubas de vidro, solução nutritiva de Krebs e mistura carbogênica (95% de O₂ e 5% de CO₂) borbulhando constantemente na cuba.

Após sessenta minutos de estabilização, com substituições da solução nutritiva de Krebs a cada 15 minutos, a viabilidade do tecido foi avaliada através da adição de solução nutritiva de Krebs contendo 60 mM de cloreto de potássio (KCl), promovendo uma contração despolarizante independente de receptores. Na sequência, os anéis foram pré-contraídos com adição de fenilefrina, agonista seletivo de receptor α_1 -adrenérgico (10^{-6} M) e durante o platô de contração foram relaxados com adição de acetilcolina, agonista não seletivo de receptores muscarínicos (10^{-5} M), avaliando-se assim a viabilidade endotelial, onde foi considerado endotélio intacto quando a acetilcolina foi capaz de produzir um relaxamento de pelo menos 80% do platô de contração inicial gerado pela fenilefrina. Os anéis que apresentaram integridade tecidual e endotelial foram utilizados neste estudo. O protocolo experimental consistiu em curvas dose-resposta para fenilefrina (1×10^{-9} a 3×10^{-5} M) e KCl (10 a 90 mM) avaliando-se a resposta de contração (em g).

3.10 PERMEABILIDADE VASCULAR

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, im, respectivamente), e na sequência uma solução aquecida (37 °C) contendo o corante azul de Evans foi administrado através da veia gengival (50 mg/kg, iv), esse acesso venoso foi feito conforme descrito previamente (Oliveira, Souza-Silva e Tonussi, 2009). Os animais foram então mantidos durante 30 minutos em manta de aquecimento (37 °C) e após esse período, os animais foram eutanasiados com superdose anestésica (cetamina e xilazina, 270 e 30 mg/kg, respectivamente, ip). Uma incisão torácica foi realizada e os animais foram perfundidos com solução fisiológica NaCl 0,9% estéril gelada (4 °C) durante cinco minutos através de um cateter tipo borboleta inserido no ventrículo esquerdo cardíaco e a realização de um corte no átrio direito. Amostras de tecidos do coração, pulmão e rim foram coletadas, pesadas, cortadas e incubadas com solução de formamida (>99%, 8 ml/g de tecido) durante quarenta e oito hora a 56 °C, conforme previamente descrito (Radu e Chernoff, 2013). Resumidamente, após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas (3.000 x g, 10 minutos) e 200 μ L de sobrenadante foram transferidos para uma

microplaca de 96 poços e foi determinado a densidade óptica da absorbância em 630 nm em um leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça). A concentração do corante azul de Evans foi determinada a partir da interpolação dos dados com uma curva padrão do corante azul de Evans conforme descrito anteriormente (krzyzanowska *et al.*, 2010). Os resultados foram expressos em ng/mg de tecido.

3.11 NÍVEIS PLASMÁTICOS DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS cAMP E cGMP

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, im, respectivamente) e dispostos em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica acoplada à manta de aquecimento (37 °C). Na sequência, foi realizada uma incisão na altura do pescoço dos animais e após a localização da artéria carótida esquerda, esta foi cuidadosamente separada do nervo vago e tecidos adjacentes, então o sangue foi coletado através da inserção de um cateter. O sangue foi coletado diretamente em microtubo contendo solução de EDTA 7,5 mM e 3-isobutil-1-metilxantina 0,1 mM, evitando-se a coagulação do sangue e a destruição dos nucleotídeos cíclicos, respectivamente. Após a centrifugação do sangue (1800 x g, 10 minutos, 4°C), o plasma foi obtido e imediatamente congelado em nitrogênio líquido (NL₂, -196 °C). Posteriormente, as amostras foram descongeladas, 250 µl de amostra foram adicionadas em 1.000 µl de etanol absoluto (99,5%) gelado (4 °C) e esta mistura foi então agitada em vórtex. Após cinco minutos à temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas (1500 x g, 10 minutos, 4°C) para remoção do precipitado e, em seguida, o sobrenadante foi transferido para um segundo microtubo e estas amostras foram secas sob uma corrente constante de nitrogênio gasoso (N₂). Após a ressuspensão com 500 µl de solução ELISA buffer, o cAMP e o cGMP foram determinados por ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) (CaymanChemical, Ann Arbor, MI, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pmol/ml de cAMP e cGMP.

3.12 NÍVEIS PLASMÁTICOS DE ADENOSINA

Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina (90 e 10 mg/kg, im, respectivamente) e em seguida a carótida esquerda foi canulada conforme descrito anteriormente (seção 3.11). O sangue foi coletado diretamente em

microtubo contendo solução de heparina (5 UI/ml de sangue), imediatamente foi centrifugado (1800 x g, 10 minutos, 4°C) e as amostras de plasma obtidas foram congeladas de forma instantânea em nitrogênio líquido (NL₂, -196 °C) e armazenadas em ultra freezer -80 °C. Após, as amostras foram descongeladas, 10 ul de plasma foram adicionados em uma microplaca de 96 poços branca e adicionados de 40 ul de adenosina buffer. Os níveis plasmáticos de adenosina foram então determinados através de kit de ensaio fluorimétrico (Abcam Plc, Cambridge, Inglaterra) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em µM de adenosina.

3.13 NÍVEIS TECIDUAIS DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS cAMP E cGMP

Os animais foram eutanasiados através de sobredose anestésica com solução de quetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente). Na sequência os animais foram dispostos em decúbito dorsal, incisões foram feitas e amostras de tecidos do ventrículo cardíaco, pulmão, aorta torácica e músculo tibial anterior foram coletados para a determinação dos níveis teciduais dos nucleotídeos cíclicos cAMP e cGMP. Após coletado, os tecidos foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido (NL₂, -196 °C). Na sequência, as amostras foram descongeladas, 100 mg de tecido foram homogeneizados em 1 ml de solução de ácido tricloroacético (5% em água ultrapura), mantidos em gelo. As amostras foram então centrifugadas (1500 x g, 10 minutos, 4°C) e cuidadosamente o sobrenadante foi transferido para um segundo tubo onde o ácido tricloroacético foi removido através de extração em solução de água saturada em éter. Na sequência, o éter residual foi removido das amostras através de evaporação em banho maria (70 °C, 5 minutos) e as amostras contendo os nucleotídeos cíclicos foram finalmente congeladas. Por fim, os níveis teciduais dos nucleotídeos cíclicos cAMP e cGMP foram determinados através de ensaio de imunoabsorção enzimática (do inglês, *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ELISA) (CaymanChemical, Ann Arbor, MI, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A concentração de proteína nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), e os níveis teciduais de cAMP e cGMP foram expressos em pmol/mg de proteína.

3.14 PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HEMATOLÓGICOS

Os animais foram anestesiados e o sangue coletado conforme descrito anteriormente (seção 3.11). Para análise de todos os parâmetros bioquímicos, com

exceção dos níveis de lactato, o sangue foi coletado em microtubos contendo heparina (5 UI/ml de sangue), centrifugado (1800 x g, 10 minutos, 4°C), e o plasma foi obtido e analisado pelo Laboratório de Análises Clínicas do HU/UFSC (projeto de pesquisa 169/2018 GEP/HU/UFSC/EBSERH). As amostras de plasma foram analisadas no equipamento automatizado Dimension RxL Max HM (Siemens Healthineers, Erlanger, Alemanha). Os níveis de aspartato aminotransferase (AST, em U/L), alanina aminotransferase (ALT, em U/L), ureia (em mg/dl), creatina quinase (CK, em U/L) e ácido úrico (em mg/dl) foram determinados de acordo com as instruções de kits para ensaios comerciais (Siemens Healthineers, Erlanger, Alemanha).

Para a análise do lactato, o sangue foi coletado em microtubos contendo EDTA dissódico (0,023 M) e fluoreto de sódio (0,95 M), evitando-se a coagulação e inibindo a glicólise, respectivamente. O plasma foi obtido por centrifugação das amostras (1800 x g, 10 minutos, 4°C) e os níveis de lactato (em mg/dl) foram determinados de acordo com as instruções do kit de ensaio comercial (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil).

Para as análises hematológicas, o sangue foi coletado conforme descrito acima, em microtubos contendo heparina (5 UI/ml de sangue). O sangue total foi analisado e obteve-se as contagens absolutas (em $10^3/\mu\text{l}$) e diferenciais (em %) de leucócitos, eritrócitos (em $10^6/\mu\text{l}$), hematócrito (em %) e plaquetas (em $10^3/\mu\text{l}$) através de contador de células automatizado (Horiba ABX®, Micros 60, Montpellier, França).

3.15 DETERMINAÇÃO DE NITRATO E NITRITO (NOX) PLASMÁTICO

O sangue foi coletado conforme descrito na seção 3.11, processado conforme descrito na seção 3.14 para as análises bioquímicas, e o plasma obtido foi utilizado para a estimativa da síntese e liberação de NO através da determinação de seus metabólitos nitrato e nitrito (NOx) no plasma, conforme descrito anteriormente (Sordi *et al.*, 2011). Resumidamente, as amostras foram diluídas na proporção de 1:1 em água destilada, desproteinizadas pela adição de solução sulfato de zinco (20%, 1/10 do volume de amostra diluída). As amostras foram homogeneizadas em vórtex e mantidas em repouso por uma hora em banho de gelo. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (7.300 x g, 15 minutos, 4°C), o sobrenadante foi removido e incubado durante três horas a 37 °C em microplaca de 96 poços com *Escherichia coli*, permitindo a conversão de nitrato em nitrito por meio de enzimas nitrato redutase expressas por essas bactérias. Após incubação, a microplaca

contendo as amostras foi centrifugada (2.250 x g, 15 minutos, temperatura ambiente), permitindo a remoção das bactérias. O volume de 100 µl do sobrenadante foi transferido para uma segunda microplaca de 96 poços e após a conversão enzimática do nitrato em nitrito, a reação foi revelada pela adição de 100 µl do reagente de Griss (sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 10% e α -naftil-etilenodiamina 0,1% em água ultrapura). A absorbância das amostras foi determinada em 540 nm em um leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça). Os valores de NO_x foram determinados a partir da interpolação dos dados com uma curva padrão de nitrato e nitrito. Os valores foram apresentados em µM de NO_x (NO²⁻/NO³⁻).

3.16 ATIVIDADE DA ENZIMA MIELOPEROXIDASE (MPO) TECIDUAL

Os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente). Na sequência, foram dispostos em decúbito dorsal, uma incisão torácica foi realizada e então os animais foram perfundidos com solução fisiológica (NaCl 0,9% estéril) gelada (4 °C) por cinco minutos através de um cateter tipo borboleta inserido no ventrículo esquerdo cardíaco e após a realização de um corte no átrio direito. Amostras de tecidos do coração, pulmão e rim foram coletadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido (NL₂, -196 °C). Na sequência, as amostras foram descongeladas, homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato de sódio 20 mM (pH 7,4, 4 °C) em gelo. Em seguida, os homogenatos foram centrifugados (13000 x g, 10 minutos, 4 °C), os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuspensos em 1 ml de tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB, 0,5% em tampão fosfato 50 mM, pH 6,0) permitindo a liberação da enzima MPO do interior de grânulos. Nesta etapa, somente as amostras do rim passaram por uma etapa adicional de incubação com aquecimento (2 horas, 60 °C), objetivando-se a eliminação da interferência de peroxidases não específicas deste tecido (Schierwagen, Bylund-fellenius e Lundberg, 1990). Na sequência, as amostras foram novamente centrifugados (13000 x g, 10 minutos, 4 °C) e o sobrenadante resultante foi utilizado para o ensaio. A reação foi realizada em microplaca de 96 poços através da adição de 30 µL de sobrenadante, 180 µL de H₂O₂ (concentração final por poço de 0,3 mM) diluído em tampão fosfato de sódio 80 mM (pH 5,4) e 20 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) (concentração final por poço de 1,6 mM) dissolvido em DMSO. A atividade da MPO foi medida por oxidação do TMB dependente de H₂O₂ durante 10 minutos a 37 °C em um leitor de placas (Tecan

Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça), a absorvância foi medida em 650 nm, a cada um minuto. A concentração de proteína foi determinada pelo método do ácido bicinconínico (BCA) (Smith *et al.*, 1985), e a atividade da enzima MPO tecidual foi expressa em unidades de densidade óptica (OD)/mg de proteína.

3.17 MARCADORES DE DANOS OXIDATIVOS TECIDUAIS

Amostras de tecidos do coração, pulmão e rim foram coletadas conforme descrito na seção 3.16 nos tempos de doze e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico e utilizadas para a determinação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase, e dos níveis de hidroperóxidos lipídicos nesses tecidos. As amostras teciduais pesando 100 mg foram homogeneizadas em 1 ml de tampão fosfato de sódio 200 mM (4 °C). Na sequência, as amostras foram divididas em alíquotas, onde homogenatos foram congelados em nitrogênio líquido (NL₂, -196 °C) e armazenados em ultra freezer para a determinação posterior dos níveis de hidroperóxidos lipídicos. Outra parte das alíquotas foram centrifugadas (10.000 x rpm, 10 minutos, 4 °C) e as amostras de sobrenadante obtidas foram também congelados em nitrogênio líquido (NL₂, -196 °C) e armazenadas em ultra freezer e utilizadas para a determinação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase.

3.17.1 Atividade da enzima catalase (CAT)

A atividade da enzima antioxidante catalase (CAT) foi determinada por meio da decomposição do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em oxigênio (O₂) e água (H₂O) conforme previamente descrito (Aebi, 1984). A reação foi desenvolvida em microplaca de 96 poços através da adição de 1 µl de amostra, 9 µl de H₂O₂ (0,3 M) e 240 µl de tampão fosfato de sódio (10 mM, pH 7,0). A leitura da placa foi feita em 240 nm em um leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça) durante 2 minutos a 37 °C, obtendo-se o decaimento do valor das absorvâncias. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), e os resultados foram expressos em µM/min/mg de proteína, que se relaciona a constante do consumo de H₂O₂ por minuto.

3.17.2 Atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi determinada através da sua capacidade de inibir a auto oxidação do pirogalol, conforme descrito (Marklund e Marklund, 1974). Em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 30 µl de amostra, 99 µl de tampão fosfato (50 mM, pH 7,0), 6 µl de MTT (1,25 mM) e 15 µl de pirogalol (100 µM). A placa foi incubada a 37 °C durante 5 minutos, após isso foi adicionado 150 µl de DMSO para parar a reação. A reação foi lida em 570 nm em um leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça). Os valores de absorbância das amostras foram comparados aos controles contendo tampão, MTT e o pirogalol, sendo esse o valor de 100% de auto oxidação do pirogalol. A quantidade de enzima necessária para inibir 50% da reação (CI₅₀) equivale a 1 unidade (U) de SOD. A concentração de proteína foi determinada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), e os resultados foram expressos em U/mg de proteína.

3.17.3 Níveis teciduais de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

Os níveis de hidroperóxidos lipídicos (LOOH) foram determinados através da adição de 100 µl de homogenato das amostras (descrito na seção 3.17) e 10 µl de metanol. Na sequência, as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (9.000 x rpm, 20 minutos, 4 °C). Após isso, em uma microplaca de 96 poços foram adicionados 30 µl do sobrenadante e 140 µl de solução de reação (hidroxitolueno butilado 4 mM, FeSO₄ 250 mM, H₂SO₄ 25 mM e xilenol laranja 100 mM). A microplaca foi incubada ao abrigo da luz durante 30 min e após, a reação foi lida a 560 nm em um leitor de placas (Tecan Infinite® 200 PRO, Mannedorf, Suíça), sendo a concentração de LOOH ajustada para 1 mg de tecido. Os resultados foram expressos em mmol/mg de tecido

3.18 HISTOLOGIA DE TECIDO PULMONAR, CARDÍACO E RENAL

Os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente). Na sequência, os tecidos do pulmão, coração e rim foram coletados, fixados em solução de ALFAC (etanol 80%, formaldeído 40% e ácido acético glacial 100% na proporção 17:2:1, respectivamente) durante 16 horas em temperatura ambiente e posteriormente foram mantidos em solução de álcool 70° GL. Na sequência, o material foi submetido a sucessivas lavagens de 30-60 minutos em etanol em concentrações crescentes (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) e xileno (98,5%), para posterior inclusão em parafina. Os blocos de

parafina foram cortados em seções de 5 µm em um micrótomo rotativo (Leica RM2255, Wetzlar, Alemanha) e as seções foram depositadas em lâminas e submetidas a desparafinização e posterior coloração de hematoxilina e eosina (HE) por um equipamento de coloração de lâminas automatizado (Leica AutoStainer XL, Nussloch, Alemanha). As lâminas foram analisadas por um microscópio invertido (Olympus IX83, Tóquio, Japão), e as imagens foram obtidas por uma câmera acoplada ao software CellSens Imaging versão 1.12 (Olympus, Tóquio, Japão). Dois examinadores analisaram cegamente os danos teciduais. As alterações histopatológicas observada no pulmão foram mensuradas com o auxílio de uma escala de pontuação semiquantitativa de dano tecidual de acordo com a seguinte classificação: normal (0 pontos), mínimo (1 ponto), moderado (2 pontos), intenso (3 pontos) e grave (4 pontos), conforme descrito anteriormente (Beck *et al.*, 2001).

Em um segundo ensaio experimental, animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente). Fragmentos do ventrículo esquerdo cardíaco foram coletados, fixados em solução de formalina neutra tamponada 10% (formaldeído 37-40% na proporção de 1:10 de água ultrapura e fosfato de sódio, pH 6,8) durante 48 horas em temperatura ambiente. Após fixadas, as amostras foram mantidas em solução de álcool 70° GL. O material foi submetido as mesmas etapas descritas acima de desidratação e inclusão em parafina. Na sequência, os blocos foram cortados em seções de 5 µm em um micrótomo rotativo eletrônico (pfm Rotary 3006 EM, Köln, Alemanha) e as seções foram depositadas em lâminas convencionais e silanizadas. As lâminas convencionais foram coradas por hematoxilina e eosina (HE), tricrômio de Masson e ácido periódico de Schiff (PAS). Já as lâminas silanizadas foram utilizadas na análise de imuno-histoquímica de tecidos conforme descrito abaixo (seção 3.19). As lâminas foram analisadas por um microscópio (Nikon Eclipse E400, Tóquio, Japão) e as imagens foram adquiridas por uma câmera (Leica DFC295, Nussloch, Alemanha) através do software Leica Microsystems versão 3.5.0 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). A análise histológica foi feita através de cegamento por um pesquisador independente do setor de histopatologia da Universidade do Porto (U.Porto, Porto, Portugal).

3.19 IMUNO-HISTOQUÍMICA DE TECIDO CARDÍACO

Conforme descrito acima, blocos de tecidos do ventrículo esquerdo cardíaco foram cortados em seções de 5 µm e dispostos em lâminas silanizadas com poli-L-lisina. A reação de imuno-histoquímica foi realizada conforme descrita anteriormente (Leal *et al.*, 2008). Resumidamente, os cortes fixados em lâminas passaram por desparafinização com tolueno (99,5%) em estufa 40 °C e na sequência foram reidratados em uma série decrescente graduada de etanol (100%, 95%, 80%, 50%) e água ultrapura em temperatura ambiente. Após esse procedimento, a peroxidase endógena foi bloqueada com adição de solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% sobre os cortes e a ligação inespecífica de proteínas foi bloqueada com adição de soro de cabra 2% em tampão fosfato de solução salina [PBS (g/L): 8 g NaCl; 0,201 g KCl; 0,191 g KH₂PO₄; 0,765 g Na₂HPO₄.2H₂O]. Após lavagens sequenciais, os cortes foram incubados com os anticorpos primários, anticorpo monoclonal de camundongo anti-A_{2A} (diluição 1:100, sc-32261, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA), anticorpo monoclonal de camundongo anti-ENT1 (diluição 1:100, sc-377283, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA), anticorpo monoclonal de camundongo anti-NOS2 (diluição 1:100, sc-7271, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA), anticorpo policlonal de coelho anti-NOS3 (diluição 1:100, sc-654, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA), anticorpo monoclonal de camundongo anti-PDE3A (diluição 1:20, sc-293446, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA) e anticorpo policlonal de coelho anti-phospho-PDE3A (Ser312) (diluição 1:100, PA5-106199, ThermoFisher Scientific, MA, EUA). A incubação com anticorpos primários foi realizada '*overnight*' em uma câmara umidificada sob refrigeração (4 °C). A especificidade de ligação dos anticorpos primários foi previamente testada em trabalhos utilizando técnica de siRNA, anti-PDE3A (Dillard *et al.*, 2020), anti-A_{2A} (Thakur *et al.*, 2010), anti-ENT1 (Ghoneim e Piquette-Miller, 2016). Na sequência, as lâminas foram lavadas com solução tampão PBT (0,1% de Tween 20 em tampão PBS) e incubadas com os anticorpos secundários, anticorpo biotinilado anti-IgG de camundongo ou anticorpo biotinilado anti-IgG de coelho (diluição 1: 125 em PBT, Vector Laboratories, Newark, CA, EUA) por uma hora, em temperatura ambiente. Após lavagens das lâminas em solução PBT, estas foram incubadas com o reagente do complexo avidina-biotina (ABC, Vector Laboratories, Newark, CA, EUA) durante uma hora, em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com solução de tetrahidrocloro de 3,3-diaminobenzidina (DAB) ativado com H₂O₂, que é utilizado como um cromóforo da reação. Ao fim, a reação foi

interrompida pela lavagem das lâminas com água ultrapura. As lâminas contendo os cortes com a reação de imuno-histoquímica finalizada foram então desidratadas em uma série graduada de etanol (50%, 80%, 95%, 100%) e xileno (98,5%), e fixadas com lamínulas com meio de montagem Eukitt (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). Para controles negativos (controles para ligação não específica do anticorpo secundário), durante o processamento dos cortes os anticorpos primários foram omitidos e os demais seguiram conforme descrito acima. As micrografias da imuno-histoquímica foram adquiridas através de câmera CDC (Leica DFC295, Nussloch, Alemanha), acoplada ao microscópio (Nikon Eclipse E400, Tóquio, Japão), utilizando o software Leica Microsystems versão 3.5.0 (Leica Microsystems, Nussloch, Alemanha). A reação de imunomarcção foi quantificada através de um software de análise de imagem PAQI (Centro de materiais da Universidade do Porto - CEMUP, Porto, Portugal) conforme previamente descrito (Leal *et al.*, 2008). Os resultados da imunomarcção foram expressos em percentual (%) de área imunomarcada em relação a área total das fotomicrografias.

3.20 EXTRAÇÃO PROTEICA E WESTERN BLOT

Os animais foram eutanasiados com sobredose anestésica de cetamina e xilazina (270 mg e 30 mg/kg, ip, respectivamente). Após a eutanásia, os tecidos do coração e da aorta torácica foram coletados, instantaneamente congelados em solução de nitrogênio líquido (NL₂, -196 °C) e armazenados em ultra freezer (-80 °C) até o momento das análises. As amostras pesando aproximadamente 100 mg foram congeladas em nitrogênio líquido (NL₂, -196 °C), pulverizadas, transferidas para um microtubo contendo 300 µl de tampão de extração de proteína contendo fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM, ortovanadato de sódio 100 mM e coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) em solução de T-Per (do inglês, Tissue Protein Extraction Reagent; Thermo Scientific, Rockford, IL, Estados Unidos). As amostras permaneceram incubadas no tampão de extração durante uma hora a 4 °C. Após esse período, os lisados de tecidos foram centrifugados (10.000 rpm, 30 minutos, 4°C), os sobrenadantes foram coletados e as concentrações de proteína foram determinadas usando o kit de ensaio de proteína Pierce™ BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA), conforme descrito (Smith *et al.*, 1985). Alíquotas de proteína total (60 µg) foram acrescidas em tampão Laemmli (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) contendo glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4

mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%) na proporção 1:2 (coração) e 1:6 (aorta) v/v. Posteriormente essas amostras foram aquecidas a 100 °C durante 8 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese (Mini Protean II, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) em gel de poli(acrilamida) SDS-PAGE 7%. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (0,45 µm, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) na presença de 20% metanol e 1% SDS em voltagem constante de 120 V por uma hora. A transferência da banda foi verificada por coloração com solução de Ponceau, e as membranas foram bloqueadas com solução de leite em pó desnatado 5% em TBS-T durante uma hora em temperatura ambiente. Na sequência, as membranas foram incubadas com os anticorpos primários, anticorpo monoclonal de camundongo anti-PDE3A (diluição 1:3.000 para o coração e 1:750 para aorta, sc-293446, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA) e anticorpo policlonal de coelho anti-phospho-PDE3A (Ser312) (diluição 1:500 para coração e aorta, PA5-106199, ThermoFisher Scientific, MA, EUA) durante 16 horas a 4°C. Posteriormente, as membranas foram lavadas com tampão TBS-T e incubadas com anticorpo secundário, anticorpo ligado a peroxidase anti-IgG de camundongo (7076) e anticorpo ligado a peroxidase anti-IgG de coelho (7074) (diluição 1:5.000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, EUA) durante uma hora em temperatura ambiente. A especificidade do anticorpo anti-PDE3A foi previamente testada por *knockdown* usando a técnica de siRNA (Dillard *et al.*, 2020). Os controles internos de corrida usados para todos os experimentos foram anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase anti-GAPDH (diluição 1:35.000, G9295, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou anticorpo monoclonal conjugado com peroxidase anti-β-actina (diluição 1:25.000, A5441, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA). Em seguida, as membranas foram expostas à solução comercial contendo substrato da enzima peroxidase (SuperSignal™ Western Blot ThermoFisher Scientific, MA, EUA), e a detecção das bandas das proteínas foi realizada por densitometria utilizando um sistema de aquisição de imagem digital com dispositivo de carga acoplada (ChemiDoc™ MP System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) e o software ImageLab® versão 6.0.1 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Os resultados foram expressos como uma razão de PDE3A/GAPDH, PDE3A/β-actina e PDE3A fosforilada (Ser 312)/GAPDH. O fragmento lisado de cada animal foi considerado como n = 1.

3.21 ANÁLISE DE BIOINFORMÁTICA

Para avaliar o impacto da sepse no tecido cardíaco, realizou-se um estudo de bioinformática utilizando dados públicos de sequenciamento de RNA (RNAseq) de um estudo de transcriptoma do coração de camundongos da linhagem C57BL/6J submetidos ao modelo experimental de CLP (Rumienczyk *et al.*, 2021). Foram avaliados genes relacionados a proteínas envolvidas em pontos *upstream* que levam à síntese ou permitem a sinalização de nucleotídeos cíclicos, além de proteínas que sofrem alteração durante a inflamação na sepse e de genes relacionados as enzimas PDEs que apresentam expressão no tecido cardíaco (PDE1A, PDE1B, PDE1C, PDE2A, PDE3A, PDE3B, PDE4A, PDE4B, PDE4C, PDE4D, PDE5A, PDE7A, PDE7B, PDE8A, PDE8B) e que participam extensamente no controle de difusão desses segundo-mensageiros nos microdomínios de sinalização. Também se avaliou genes relacionados a proteínas *downstream* alvos de ação dos nucleotídeos cíclicos no coração, compreendendo ao todo 85 genes.

A análise dos dados de RNAseq foi feita através dos programas STAR aligner (versão 2.7.9a) e featureCounts (versão 2.0.3). Realizou-se uma análise de expressão gênica diferencial utilizando a linguagem de programação R, onde os dados brutos foram importados e processados, criando-se quadros de dados e metadados. As informações foram analisadas através do pacote DESeq2, obtendo-se os dados na forma de DESeqDataSet, permitindo a análise do conjunto de dados através da função DESeq.

Analisou-se a expressão diferencial entre os grupos experimentais sham e CLP e entre os diferentes tempos disponíveis (seis, doze e vinte e quatro horas após a cirurgia). Nesse estudo, se realizou a combinação de ferramentas de bioinformática para analisar os dados de expressão gênica e realizar um enriquecimento funcional dos dados obtidos dos animais. Em seguida, calculamos o coeficiente de correlação de Pearson entre as amostras e visualizamos o mapa de calor construído a partir do pacote *heatmap*. Os genes diferencialmente expressos foram identificados a partir da leitura dos dados, processamento e filtragem para mudanças significativas na expressão ($\log_2 \text{fold change} > 0$, $\text{fold change} > 1,5$, e valor de $p < 0,05$).

3.22 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo amostral foi baseado no desvio padrão (DP) e na magnitude da diferença entre os grupos obtidos na análise do fluxo sanguíneo renal de um estudo anterior realizado em nosso grupo de pesquisa (Kovalski *et al.*, 2017). Assim, considerando 4 grupos experimentais, $\alpha = 0,05$, poder de 80% e tamanho do efeito de 0,59 (f, considerando procedimento de sepse e interação de tratamento), foram necessários 6 animais em cada grupo para significância estatística. Esse tamanho de amostra mantém o poder de pelo menos 80% para os demais parâmetros cardiovasculares (PAS e FC). Considerando a taxa de mortalidade de 30% do modelo CLP em 24 h, 10 animais foram incluídos nos grupos CLP e 8 nos grupos sham. O número final (n) em cada grupo está indicado nas legendas das figuras.

Para reatividade vascular em experimentos de banho de órgãos como resultado primário, um $n=10$ é necessário para um tamanho de efeito de 0,45 (f), um $\alpha = 0,05$ e um poder de 0,8. Portanto, 13 animais foram incluídos nos grupos CLP e 11 nos grupos sham para contabilizar a taxa de mortalidade. O software GPower 3.1.1 foi utilizado para o cálculo do tamanho da amostra (Faul *et al.*, 2007).

Para a análise de sobrevivência, foi calculado um tamanho amostral de 35 animais por grupo com base em uma taxa de redução de mortalidade esperada de 25%, com poder de 80% e $\alpha = 0,05$. O software *Primer of Statistics 7* (Primer-e, Auckland, Nova Zelândia) foi usado para o cálculo do tamanho amostral dos experimentos de sobrevivência.

Na maior parte dos resultados, os dados foram apresentados como gráficos de pontos de dispersão onde cada ponto representa um animal, a linha representa a média \pm erro padrão da média (EPM). Nos dados de temperatura, PAS, FC, HRPO total, reatividade vascular *ex vivo* e glicose sanguínea o ponto representa a média \pm EPM. O efeito dos agentes vasoativos na variação da PAM, tempo de resposta e FC foi mostrado como diagrama de caixa, representando a mediana, com percentil 25 e 75. As barras verticais representam os valores mínimo e máximo obtidos. Os resultados do escore de gravidade de doença, dano histológico, ureia e creatinina foram representados como mediana \pm intervalo interquartil. A curva de sobrevivência foi representada em linha que representa o valor médio do grupo em cada tempo analisado, sem medida de dispersão.

As curvas de concentração-resposta de agonistas foram ajustadas usando regressão não linear. As potências dos agonistas e as respostas máximas foram

expressas como o logaritmo negativo da concentração molar do agonista produzindo 50% da resposta máxima (pEC_{50}) e o efeito máximo induzido pelo agonista (EMax), respectivamente.

A significância estatística foi analisada por ANOVA de duas vias, seguida do pós teste de Bonferroni. Todos os dados analisados pela ANOVA foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk e Bartlett para comprovação da normalidade e homogeneidade das variâncias, respectivamente. Os dados de NOx, lactato, ácido úrico, MPO, azul de Evans, hematócrito e contagem de granulócitos foram transformados por função logarítmica para alcançar distribuição gaussiana e homocedasticidade. Os dados categóricos, escore de gravidade de doença e dano histológico além dos dados de ureia e creatinina que foram considerados assimétricos mesmo após transformação foram analisados teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Um valor de P inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados através do software GraphPad Prism versão 8 (La Jolla, CA, EUA) e do software Jamovi versão 1.6 (The Jamovi project, Sydney, Austrália).

4 RESULTADOS

4.1 A INIBIÇÃO DE PDE3A AUMENTA A FREQUÊNCIA CARDÍACA, PRESERVA O FLUXO SANGUÍNEO RENAL E MELHORA A RESPOSTA VASCULAR PERIFÉRICA

A sepse foi induzida experimentalmente em ratos machos através do procedimento cirúrgico de ligação e perfuração cecal (CLP), sendo utilizado como controle os animais falso-operados (sham). Nesses animais foram avaliados diferentes parâmetros que comprovam que o modelo experimental foi capaz de reproduzir características esperadas do desenvolvimento da doença, como alterações em parâmetros cardiovasculares, inflamação, mortalidade entre outros. A intervenção farmacoterapêutica nos animais foi a inibição das diferentes isoformas das enzimas fosfodiesterase 3 (PDE3) através do cilostazol, um inibidor seletivo, seguro e inserido na prática clínica para o tratamento da doença arterial periférica (PAD). O cilostazol foi administrado aos animais no tempo de seis horas após o procedimento cirúrgico na dose de 15 mg/kg via oral gavagem. Os animais foram avaliados ao longo de vinte e quatro horas, com exceção na análise de curva de sobrevivência (cento e vinte horas) obtendo-se os dados de diferentes parâmetros que foram avaliados e apresentados nessa seção.

Os animais conscientes apresentaram alterações na temperatura corporal (Fig. 8A) e aumento do escore de gravidade de doença (Fig. 8B) ao longo do tempo de vinte e quatro horas. Observou-se que a inibição de PDE3 causou uma redução significativa da temperatura corporal nos tempos de doze e vinte e quatro horas quando comparado aos valores iniciais do grupo CLP cilostazol e comparado aos animais do grupo CLP veículo nos tempos avaliados (Fig. 8A, $p < 0,05$). Entretanto, o tratamento não impediu o aumento do escore de gravidade de doença nos animais sépticos nos tempos de seis, doze e vinte e quatro horas (Fig. 8B).

Também em animais conscientes, analisou-se a pressão arterial sistólica (PAS) e a frequência cardíaca (FC) ao longo do tempo. A média dos valores basais de todos os animais vinte e quatro horas antes da cirurgia foi de PAS $133,1 \pm 1,20$ mmHg e FC $350,6 \pm 4,52$ bpm. No tempo de seis horas após o procedimento cirúrgico, os animais sépticos apresentaram redução da PAS (Fig. 8C, CLP veículo $81,55 \pm 6,23$ e CLP cilostazol $88,70 \pm 6,21$ mmHg) e aumento da FC (Fig. 8D, CLP veículo $400,2 \pm 5,02$ bpm e CLP cilostazol $418,7 \pm 5,13$ bpm), mantendo-se esses valores sustentados ao longo do tempo, comprovando a hipotensão e a taquicardia nesses animais (Fig.

8C e 8D, $p < 0.05$ comparado aos animais controle). A inibição de PDE3 não alterou os valores da PAS, porém aumentou de forma significativa a FC nos animais sépticos a partir de oito horas após a cirurgia de CLP em aproximadamente 13% (Fig. 8D, CLP veículo $414,6 \pm 6,77$ e CLP cilostazol $467,3 \pm 9,45$ bpm, $p < 0,05$), mantendo esses valores elevados ao longo do tempo, porém retornando a valores semelhantes ao grupo CLP veículo após vinte e quatro horas (Fig. 8D, $p > 0,05$ comparando CLP veículo e CLP cilostazol).

Em animais anestesiados, os parâmetros cardiovasculares foram analisados no tempo de vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico. Observou-se que os animais sépticos apresentaram redução na pressão arterial média (PAM) (Fig. 8E, $p < 0,01$), aumento na FC (Fig. 8F, $p < 0,05$), redução do fluxo sanguíneo renal nos animais do grupo CLP veículo (Fig. 8G, $p < 0,01$), e normalidade no fluxo sanguíneo muscular (Fig. 8H). De forma significativa, o tratamento com cilostazol impediu a redução do fluxo sanguíneo renal na sepse (Fig. 8G, CLP veículo $251,92 \pm 42,04$ e CLP cilostazol $394,22 \pm 25,97$ UP, $P < 0,05$; interação entre o procedimento e tratamento, $p = 0,004$).

Apesar da sepse não ter alterado o fluxo sanguíneo muscular (Fig. 8H), a doença alterou o perfil de resposta de hiperemia reativa pós-oclusiva (Fig. 8I). A sepse reduziu o fluxo sanguíneo muscular máximo e o tratamento com cilostazol impediu essa redução nos animais sépticos (Fig. 8J, CLP veículo $96,18 \pm 10,94$ e CLP cilostazol $185,2 \pm 26,77$ UP, $p < 0,05$; interação entre o procedimento e tratamento, $p = 0,029$). A doença não causou alterações significativas no tempo de resposta máxima (Fig. 8K), tempo de recuperação de 50% da resposta (Fig. 8L) e na integral relativa ao basal (Fig. 8M). Porém, nesse último parâmetro avaliado, foi observada uma interação entre o procedimento cirúrgico e o tratamento ($p = 0,045$), onde o cilostazol aumentou de forma não estatisticamente significativa o valor da integral nos animais sépticos (Fig. 8M, CLP veículo $374,2 \pm 51,91$ e CLP cilostazol $584,4 \pm 72,02$ UP.s $\times 10^3$, $p = 0,05$).

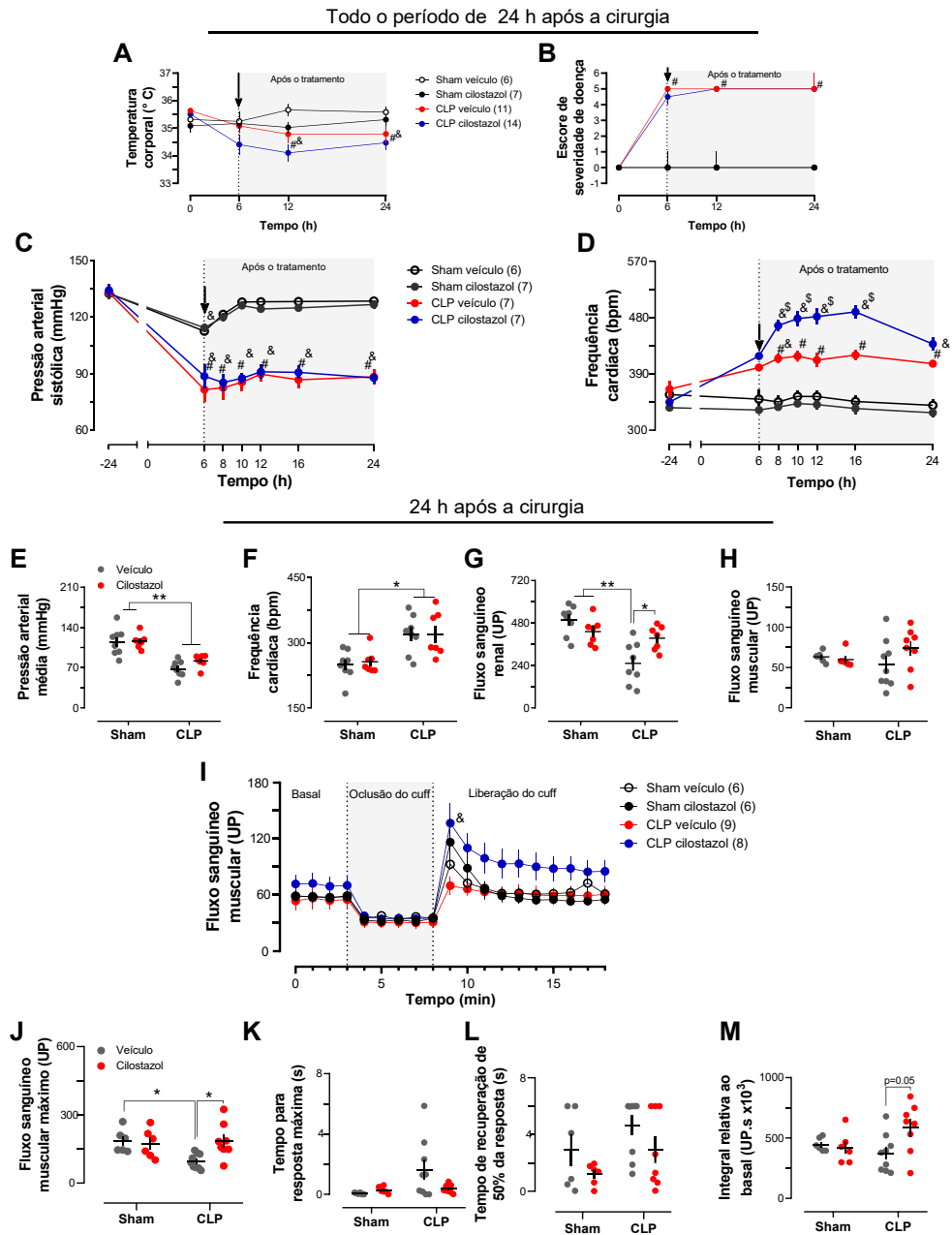


Figura 8. Efeito da inibição de PDE3 no desenvolvimento da sepse e nas alterações cardiovasculares observadas no modelo experimental da doença. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Os animais foram analisados ao longo do tempo, obtendo-se a temperatura corporal (A), escore de severidade da doença (B), pressão arterial sistólica (C) e frequência cardíaca (D), por métodos não invasivos. Após 24 h, os animais foram sedados e submetidos a métodos invasivos, permitindo obter os valores de pressão arterial média (E), frequência cardíaca (F), fluxo sanguíneo renal (G), fluxo sanguíneo muscular (H) e a análise da resposta de hiperemia reativa pós-oclusiva (I-M). Nos painéis A, C, D, I os dados são representados na linha como valor da média \pm EPM, $n = 6-14$ animais/grupo. No painel B os dados são apresentados como mediana \pm intervalo interquartil, $n = 6-14$ animais/grupo. Nos painéis E-H, J-M, cada ponto representa um animal, a linha representa \pm EPM, $n = 6-8$ animais/grupo. Os dados do painel B foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Os demais dados foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ comparado os grupos CLP aos controles, & $p < 0,05$ comparado ao valor inicial, \$ $p < 0,05$ comparado o grupo CLP veículo ao CLP cilostazol, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. As setas nos painéis A-D indicam o início do tratamento com cilostazol ou veículo.

4.2 A INIBIÇÃO DE PDE3 PREVINE O DESENVOLVIMENTO DA HIPORREATIVIDADE VASCULAR INDUZIDA PELA SEPSE

Durante o desenvolvimento da sepse e principalmente do choque séptico é comum o comprometimento na resposta vascular vasoconstritora após a administração de drogas vasoativas em decorrência da hiporreatividade vascular caracterizada por um quadro de hipotensão refratária a administração de volume e drogas vasoativas. Por conta disso, a análise da resposta vascular seja *in vivo* ou *ex vivo* é essencial em modelos experimentais da doença.

Vinte e quatro horas após o procedimento de CLP, em ratos sedados, verificou-se que os animais sépticos apresentaram um prejuízo da variação na PAM e no tempo de resposta contrátil após a administração dos vasoconstritores, fenilefrina - agonista seletivo de receptor α_1 -adrenérgico (Fig. 9A e 9D, $p < 0,05$) e angiotensina II - agonista não seletivo de receptor AT_1 e AT_2 (Fig. 9B e 9E, $p < 0,05$). De forma significativa, a inibição de PDE3 preveniu o prejuízo contrátil da angiotensina II na maior dose utilizada (Fig. 9B e 9E, $p < 0,05$), porém não alterou a resposta para fenilefrina (Fig. 9A e 9D). Avaliou-se também a resposta cronotrópica positiva da isoprenalina - agonista não seletivo de receptores β -adrenérgicos - sobre a FC nos animais. Foi observado que na maior dose administrada os animais sépticos apresentaram uma redução da variação na FC e a inibição de PDE3 preveniu de forma significativa essa redução (Fig. 9C, sham veículo $157,0 \pm 14,75$ CLP veículo $68,38 \pm 10,94$ e CLP cilostazol $161,3 \pm 22,24$ bpm, $p < 0,05$; interação entre procedimento e tratamento $p = 0,008$).

A reatividade vascular foi também avaliada de forma *ex vivo* em sistema de banho de órgão isolado utilizando anéis de aorta torácica obtidos no tempo de vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP. Foi observado nos animais sépticos um prejuízo na resposta contrátil para fenilefrina - resposta dependente do receptor α_1 -adrenérgico - e a inibição de PDE3 preveniu parte desse prejuízo (Fig. 9F, $p < 0,001$). Também foi observado um comprometimento na resposta contrátil para o cloreto de potássio (KCl) - contração por despolarização de membrana e independente de receptor - porém, diferente do observado para a fenilefrina o tratamento com cilostazol não preveniu esse prejuízo (Fig. 9G).

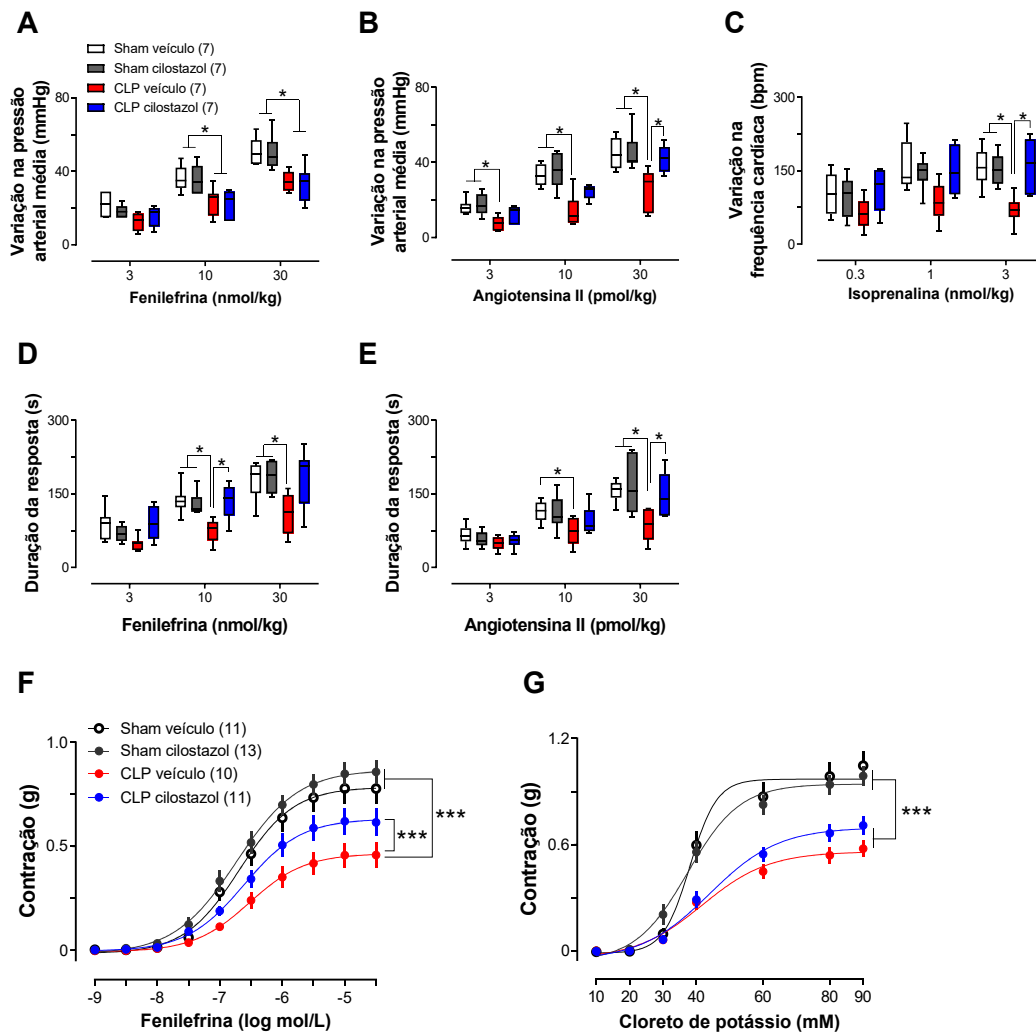


Figura 9. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na hiporreatividade a vasoconstritores. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham, seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem) e vinte e quatro h depois os animais foram anestesiados e preparados para as análises de reatividade vascular *in vivo* (A-E) e *ex-vivo* (F e G). Doses crescentes dos vasoconstritores fenilefrina e angiotensina II foram administrados nos animais obtendo-se a variação da pressão arterial média (A e B) e tempo de resposta contrátil (D e E). Também foi administrado isoprenalina, obtendo-se a variação da frequência cardíaca. Em sistema de órgão isolado contendo anel de aorta torácica foi realizada curvas concentração-resposta para os vasoconstritores fenilefrina e cloreto de potássio (F e G). Nos painéis A-E os dados são representados como mediana na linha, com percentil 25 e 75 \pm os valores mínimo e máximo, n=7 animais/grupo. Nos painéis F e G os dados são representados como valor da média na linha \pm EPM, n=10-13 animais/grupo. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. *p<0,05, ***p<0,001.

A partir das curvas concentração-resposta obtidas, foram avaliados os parâmetros de potência (pCE50) e eficácia (Emax) da resposta contrátil, conforme descrito na tabela 3. Os animais do grupo CLP veículo apresentaram redução na potência e eficácia da resposta vasoconstritora para fenilefrina (Tab. 3, pCE50 - sham veículo $6,70 \pm 0,05$ e CLP veículo $6,47 \pm 0,06$, p<0,05; Emax - sham veículo $0,79 \pm 0,07$ e CLP veículo $0,47 \pm 0,06$, p<0,01), além de um prejuízo na eficácia da resposta

contrátil para KCl (Tab. 3, sham veículo $1,05 \pm 0,08$ e CLP veículo $0,58 \pm 0,05$, $p < 0,001$). A inibição de PDE3 impediu de forma significativa a redução na potência da resposta vasoconstritora para fenilefrina (Tab. 3, CLP veículo $6,47 \pm 0,06$ e CLP cilostazol $6,7 \pm 0,05$, $p < 0,05$).

Tabela 3. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na hiporreatividade a vasoconstritores

Parâmetros	Veículo		Cilostazol	
	Sham	CLP	Sham	CLP
Fenilefrina				
pCE ₅₀ (mol/L)	$6,70 \pm 0,05$	$6,47 \pm 0,06^{\#}$	$6,73 \pm 0,07$	$6,70 \pm 0,05^{\$}$
E _{max} (g)	$0,79 \pm 0,07$	$0,47 \pm 0,06^{##}$	$0,86 \pm 0,05$	$0,62 \pm 0,06$
Cloreto de potássio				
pCE ₅₀ (mol/L)	$1,39 \pm 0,01$	$1,36 \pm 0,02$	$1,41 \pm 0,02$	$1,35 \pm 0,02$
E _{max} (g)	$1,05 \pm 0,08$	$0,58 \pm 0,05^{###}$	$0,98 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,06^{\#}$

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham, seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem) e vinte e quatro h depois os animais foram anestesiados e preparados para as análises de reatividade vascular *ex-vivo*. Em sistema de órgão isolado contendo anel de aorta torácica foi realizada curvas concentração-resposta para os vasoconstritores fenilefrina e cloreto de potássio, obtendo-se os diferentes parâmetros que foram analisados. Os valores representam a média \pm EPM, n=11 animais grupo sham veículo, 13 animais sham cilostazol, 10 animais CLP veículo e 11 animais CLP cilostazol. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. $\#p < 0,05$ comparado ao grupo sham, $##p < 0,01$ comparado ao grupo sham, $###p < 0,001$ comparado ao grupo sham, $\$p < 0,05$ comparando os grupos CLP veículo e CLP cilostazol.

pCE₅₀: representa o negativo do logaritmo da concentração do agonista (em mol/L) necessária para produzir 50% da resposta máxima; E_{max}: representa a resposta máxima contrátil obtida (em g).

4.3 A INIBIÇÃO DE PDE3 PREVINE DANOS MULTIORGÂNICOS CAUSADOS PELA INFLAMAÇÃO SISTÊMICA NA SEPSE

Durante a sepse, ocorrem profundas alterações inflamatórias e cardiovasculares que contribuem para o desenvolvimento de danos multiorgânicos, que em última análise cooperam para a alta mortalidade observada na doença. No desenvolvimento da síndrome. Neste cenário, participam diferentes mediadores de sinalização celular, entre eles, destacamos o óxido nítrico (NO), um mediador crítico na sepse pela sua contribuição no surgimento da hipotensão, falência circulatória e no comprometimento da resposta vasoconstritora.

Vinte e quatro horas após procedimento de CLP observou-se um aumento nos níveis plasmáticos dos metabólitos do NO (nitrato + nitrito – NOx) e o tratamento com cilostazol reduziu de forma não estatisticamente significativa esses níveis na sepse (Fig. 10A, CLP veículo $117,0 \pm 18,61$ e CLP cilostazol $71,35 \pm 8,18$ μM , $p=0,06$). Observou-se também nos animais sépticos o aumento nos níveis circulantes de marcadores plasmáticos de danos, como aspartato aminotransferase (Fig. 10B), alanina aminotransferase (Fig. 10C); normalidade nos níveis de creatina quinase (Fig. 10D), ureia (Fig. 10E) e creatinina (Fig. 10F); aumento nos níveis de ácido úrico (Fig. 10G) e lactato (Fig. 10H). O tratamento com cilostazol impediu somente a elevação dos níveis de lactato nos animais sépticos, entretanto esse é um importante marcador de perfusão tecidual e metabolismo energético celular (Fig. 10H, CLP veículo $50,90 \pm 7,953$ e CLP cilostazol $27,10 \pm 4,682$ mg/dL, $p<0,01$).

Também no tempo de vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, os animais apresentaram consumo de plaquetas evidenciado pela redução do número circulante desses fragmentos celulares (Fig. 10I), houve aumento do número de eritrócitos e hematócrito e o tratamento com cilostazol preveniu esse aumento (Fig. 10J, CLP veículo $11,36 \pm 0,49$ e CLP cilostazol $9,82 \pm 0,37$ $10^6/\mu\text{L}$, $p<0,01$; Fig. 10K, CLP veículo $50,40 \pm 2,46$ e CLP cilostazol $41,22 \pm 0,82$ %, $p<0,01$). Outra importante alteração que ocorre durante a doença é no metabolismo da glicose, por conta disso, a glicose sanguínea foi avaliada ao longo de vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico. A partir de doze horas após a cirurgia de CLP, os animais sépticos desenvolveram hipoglicemia que foi sustentada até o período de vinte e quatro horas (Fig. 10L, $p<0,05$ comparado ao valor inicial; $p<0,05$ comparado aos animais controle em cada tempo analisado) e o tratamento com cilostazol não preveniu a queda na glicose sanguínea nesses animais.

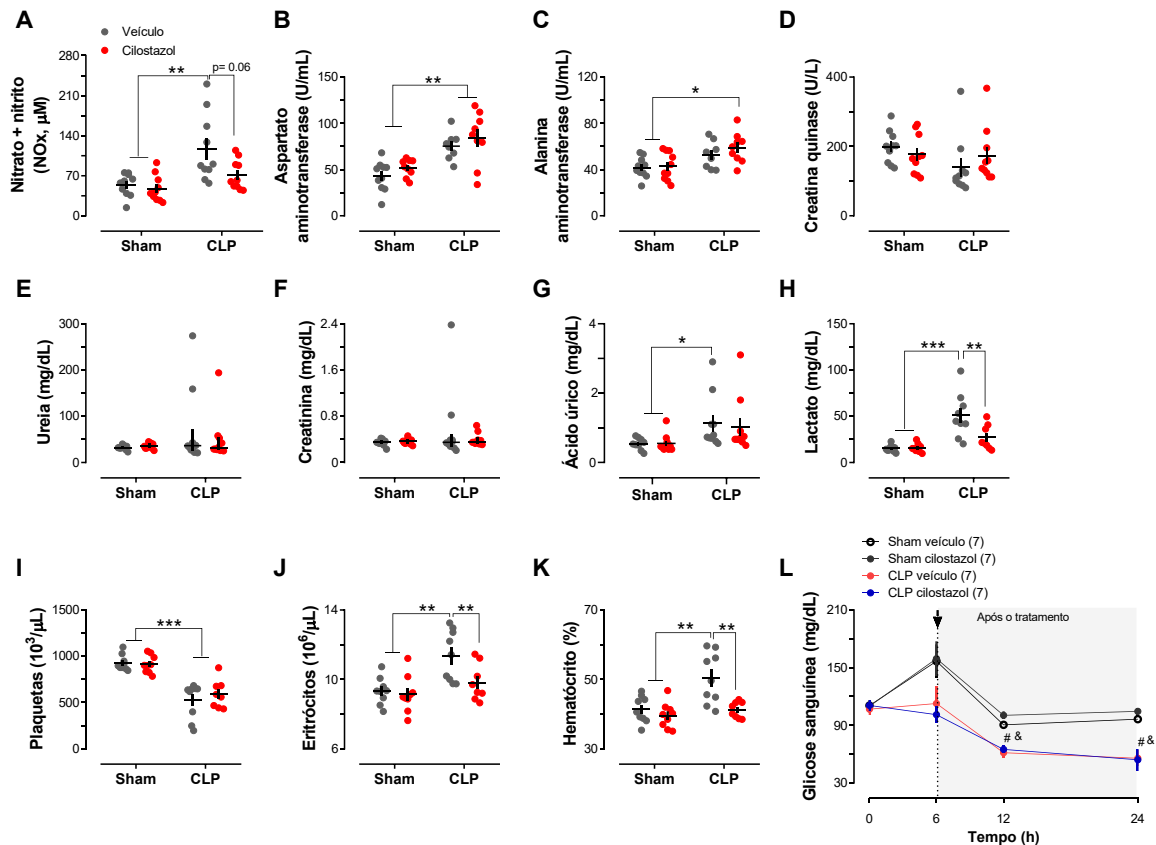


Figura 10. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 em marcadores plasmático de danos orgânicos e inflamação e em parâmetros hematológicos. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Os níveis de glicose sanguínea (L) foram analisados ao longo do tempo até completar 24 h. Após esse período, os animais foram eutanasiados, o sangue total e o plasma foram obtidos para a análise de nitrato + nitrito (A), aspartato aminotransferase (B), alanina aminotransferase (C), creatina quinase (D), ureia (E), creatinina (F), ácido úrico (G), lactato (H), plaquetas (I), eritrócitos (J) e hematócrito (K). Nos painéis A-K, cada ponto representa um animal, a linha representa a média \pm EPM nos painéis A-D e G-K, $n=7-10$ animais/grupo. Nos painéis E e F, a linha representa a mediana \pm intervalo interquartil, $n=7-10$ animais/grupo. No painel L a linha representa a média \pm EPM, $n=7$ animais/grupo. Os dados dos painéis E e F foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Os demais dados foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, # $p<0,05$ comparado aos grupos sham, & $p<0,05$ comparado aos valores iniciais do próprio grupo. A seta no painel L representa o início do tratamento.

Na resposta inflamatória sistêmica durante a sepse há o envolvimento das diferentes células leucocitárias, o que leva alterações na contagem dessas células no sangue periférico. Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP, os animais sépticos apesar de não apresentarem mudanças na contagem absoluta de leucócitos (Fig. 11A), eles exibiram reduções na contagem relativa e absoluta de linfócitos (Fig. 11B e 7C) e o cilostazol impediu de forma significativa a redução na contagem absoluta desse tipo celular (Fig. 11C, CLP veículo $1,72 \pm 0,19$ e CLP cilostazol $3,40 \pm 0,39$ $10^3/\mu\text{L}$, $p<0,05$). Houve também aumento na contagem relativa de granulócitos (Fig.

11D e 11F), porém sem alterações na contagem absoluta dessas populações celulares (Fig. 11E e 11G).

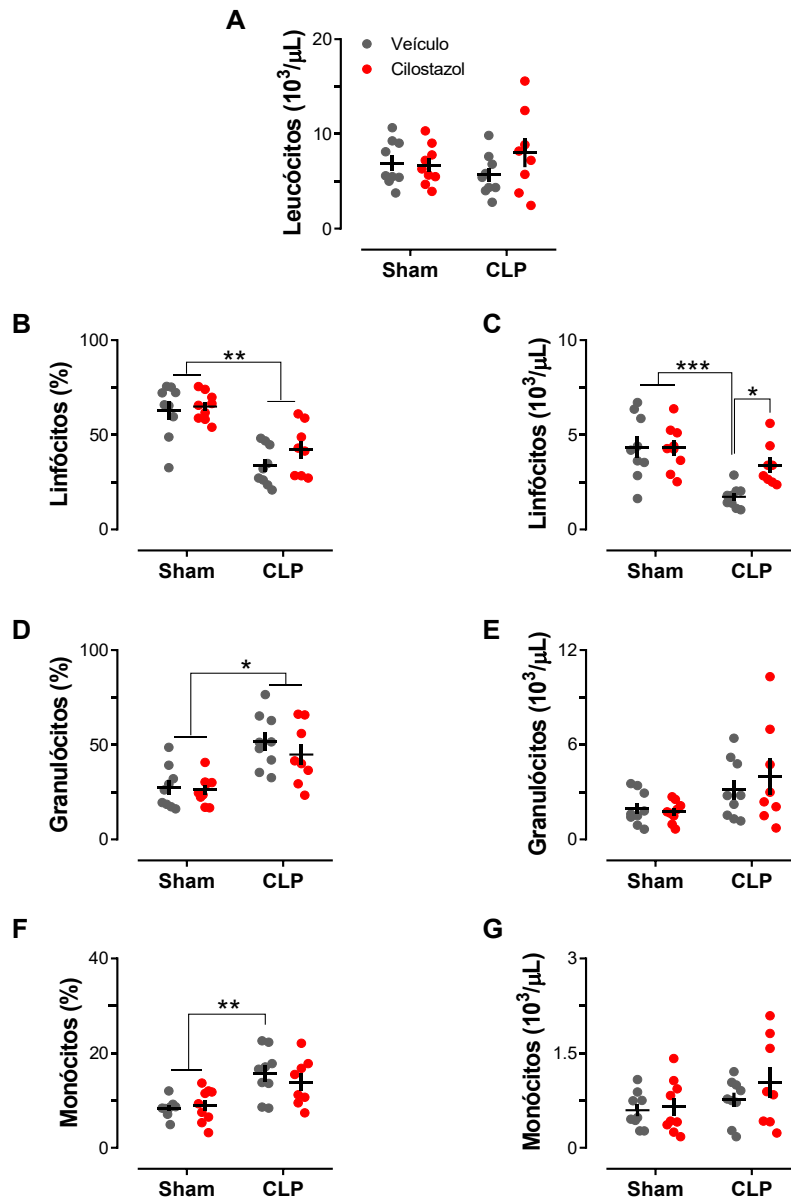


Figura 11. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 em parâmetros hematológicos. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Vinte e quatro horas depois os animais foram eutanasiados e o sangue total foi obtido para a determinação de leucócitos (A), contagem relativa e absoluta de linfócitos (B e C), granulócitos (D e E) e monócitos (F e G). Nos painéis A-G, cada ponto representa um animal, a linha representa a média \pm EPM, n= 7-10 animais/grupo. Os dados foram analisados pelo teste de ANOVA de duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.4 A INIBIÇÃO DE PDE3 PREVINE INFLAMAÇÃO E DANOS TECIDUAIS NA SEPSE

No desenvolvimento da sepse, profundas alterações inflamatórias sistêmicas ocorrem, gerando um efeito em cascata que culmina em danos teciduais, mesmo em tecidos que não apresentavam o foco primário de infecção causador da doença.

Vinte e quatro horas após o procedimento de CLP observou-se através de análise histopatológica do pulmão que os animais dos grupos sham veículo e sham cilostazol apresentaram normalidade na histologia no tecido (Fig. 12A e 12B). Porém os animais do grupo CLP veículo apresentam aumento na espessura dos septos alveolares e presença de células leucocitárias que migraram ao tecido (Fig. 12C) e os animais do grupo CLP cilostazol apresentam uma menor extensão desses danos teciduais, embora eles ainda estejam presentes (Fig. 12D). A proteção gerada ao tecido através da inibição de PDE3 foi medida através de escore semiquantitativo de danos que apontou para um aumento na pontuação de danos na sepse e prevenção desse aumento com o tratamento (Fig. 12E, $p < 0,05$). Observou-se também um aumento da permeabilidade vascular no pulmão dos animais séptico através da análise de extravasamento do corante azul de Evans e o cilostazol preveniu de forma não estatisticamente significativa esse aumento (Fig. 12F, CLP veículo $1,66 \pm 0,28$ e CLP cilostazol $0,95 \pm 0,11$, $p = 0,08$). A análise da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no pulmão evidenciou o aumento da migração leucocitária, destacando-se os neutrófilos ao tecido e a inibição de PDE3 preveniu de forma significativa essa migração celular (Fig. 12G, CLP veículo $4,15 \pm 1,59$ e CLP cilostazol $0,47 \pm 0,13$ DO/mg de proteína, $p < 0,05$).

Foram avaliados nos tempos de doze e vinte quatro horas após o procedimento cirúrgico alguns parâmetros relacionados ao estresse oxidativo. Os níveis da atividade da enzima catalase (CAT) não se alteraram durante a doença (Fig. 12H). Porém, observou-se um aumento na atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) doze horas após o CLP e o tratamento com cilostazol preveniu de forma significativa esse aumento (Fig. 12I, CLP veículo $0,10 \pm 0,01$ e CLP cilostazol $0,07 \pm 0,01$ U/mg de proteína, $p < 0,05$). A atividade de SOD foi maior em todos os grupos no tempo de vinte e quatro horas comparado ao tempo anterior de doze horas, entretanto, não se observou alteração entre os grupos nesse tempo mais tardio (Fig. 8L). Apesar da alteração da atividade de SOD, observou-se que no tempo de vinte e quatro horas,

todos os grupos apresentaram um menor nível de hidroperóxido lipídico no pulmão (Fig. 12J).

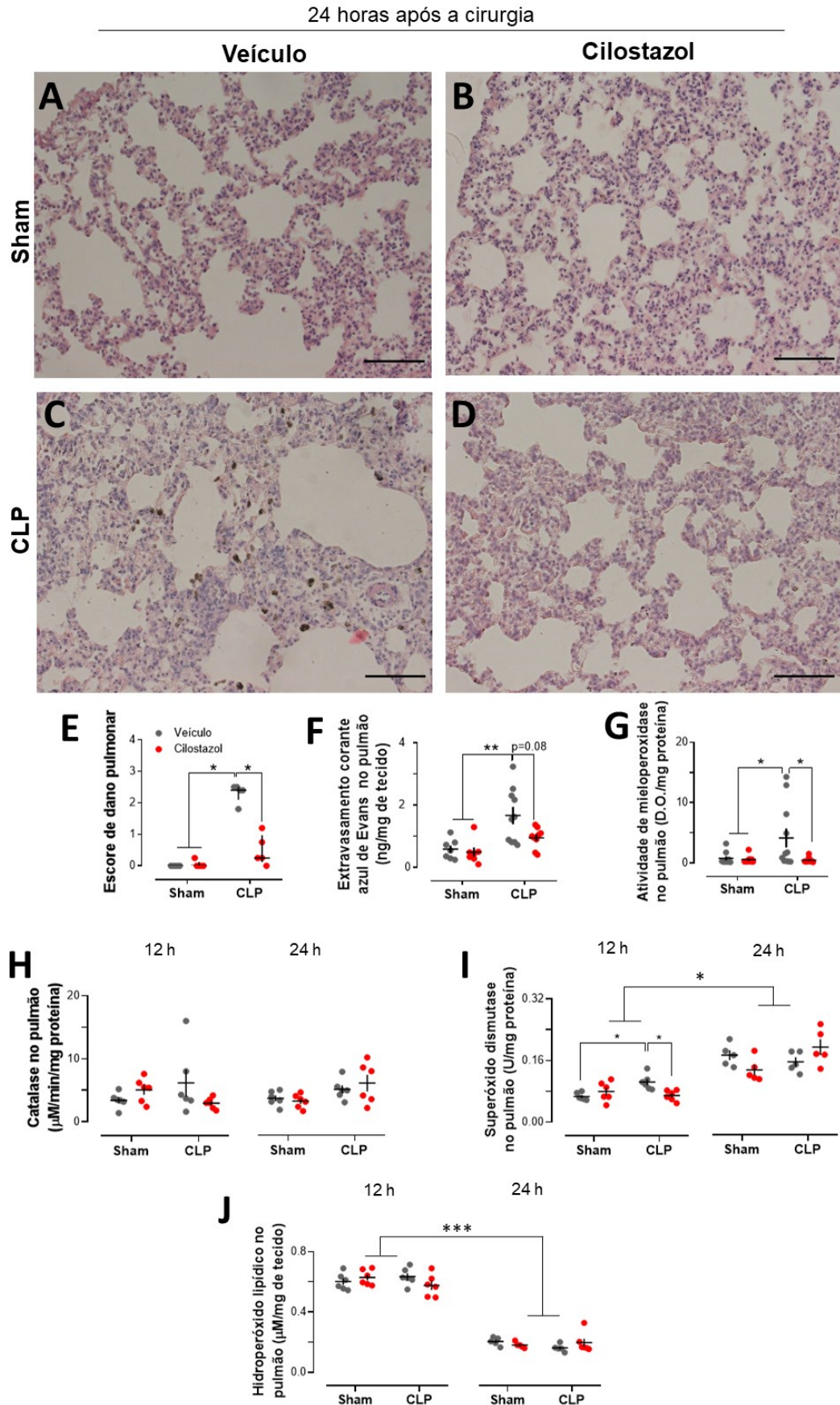


Figura 12. Efeito da inibição da PDE3 em marcadores de dano tecidual, inflamação, permeabilidade vascular e dano oxidativo no pulmão. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Grupos independentes foram eutanasiados nos tempos de doze e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico e o tecido do pulmão foi coletado para diferentes análises. No tempo de vinte e quatro horas, foram feitas fotomicrografias representativas da arquitetura pulmonar normal nos grupos sham veículo (A) e sham cilostazol (B), fotomicrografias contendo alterações histológicas, com aumento da espessura do septo alveolar e infiltração leucocitária no grupo CLP veículo (C) e fotomicrografias contendo prevenção de parte dos danos histológicos no grupo CLP cilostazol (D). A barra de escala representa 100 μ m (coloração de hematoxilina-eosina, ampliação de 200x). As imagens foram analisadas por escore semiquantitativo de danos (E). Foram avaliados também o extravasamento do azul de Evans (F) e atividade de mieloperoxidase (G). Nos tempos de doze e vinte e quatro horas foram analisados catalase (H), superóxido dismutase (I) e hidroperóxido lipídico (J). No painel E, cada ponto representa um animal individual, a linha representa a mediana \pm intervalo interquartil, n=5 animais/grupo. Nos painéis F-J, cada ponto representa um animal individual, a linha representa a média \pm EPM, n=6-10 animais/grupo. Os dados do painel E foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós teste de Dwass-Steel-Critchlow-Fligner Dunn, os dados restantes (F-M) foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós teste de Bonferroni. *p<0,05, **p<0,01.

Vinte e quatro horas após o procedimento de CLP o tecido cardíaco nos animais dos grupos sham veículo e sham cilostazol apresentaram normalidade na análise histopatológica (Fig. 13A e 13B). Embora os animais dos grupos CLP veículo e CLP cilostazol não apresentaram sinais de danos relacionados a formação de fibrose, em alguns animais foram observadas alterações nos cardiomiócitos relacionadas à ocorrência de degeneração hialina (Fig. 13C e 13D), esse tipo de alteração celular será melhor explorado em figuras a seguir nesse documento (Fig. 17 e 18). A sepse causou o aumento da permeabilidade vascular apontado pelo aumento do extravasamento do corante azul de Evans no tecido cardíaco (Fig. 13E, sham veículo $0,12 \pm 0,03$, CLP veículo $0,33 \pm 0,04$ e CLP cilostazol $0,30 \pm 0,05$ ng/mg de tecido, p<0,05). Os animais do grupo CLP veículo apresentaram um aumento não significativo na atividade de MPO (Fig. 13F, sham veículo $1,18 \pm 0,23$ e CLP veículo $2,14 \pm 0,24$ DO/mg de proteína, p=0,05), porém nos animais do grupo CLP cilostazol esse aumento foi significativo (Fig. 13F, sham cilostazol $1,32 \pm 0,12$ e CLP cilostazol $3,46 \pm 0,91$ DO/mg de proteína, p<0,01). Os parâmetros de estresse oxidativo no coração não apresentaram alterações nos tempos de doze e vinte e quatro horas após o CLP entre os grupos (Fig. 13G – 13I). Entretanto, observou-se uma maior atividade de SOD (Fig. 13H) e um menor nível de hidroperóxido lipídico (Fig. 13I) em todos os grupos no tempo de vinte e quatro horas.

24 horas após a cirurgia

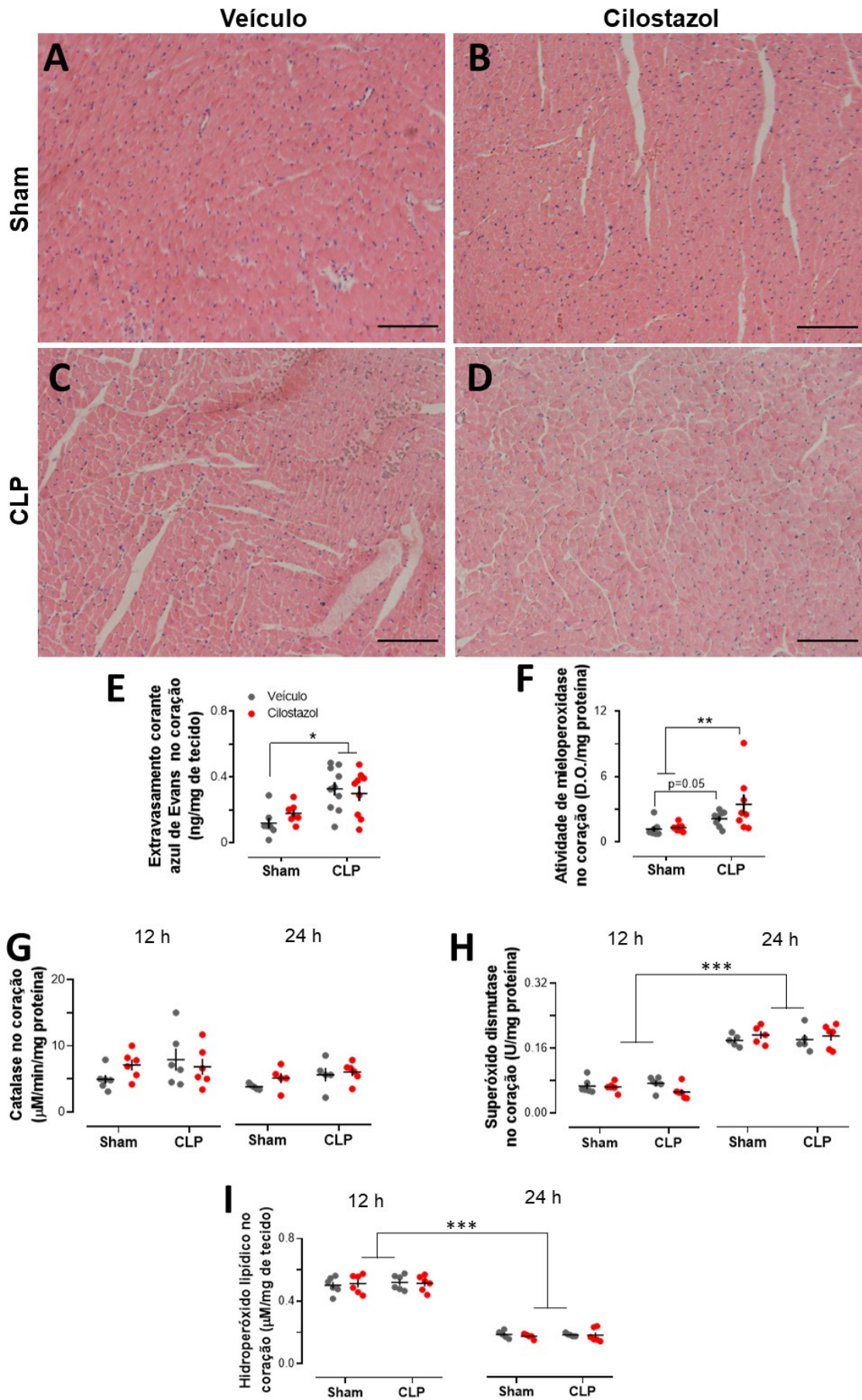


Figura 13. Efeito da inibição da PDE3 em marcadores de dano tecidual, inflamação, permeabilidade vascular e dano oxidativo no coração. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Grupos independentes foram eutanasiados nos tempos de doze e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico e o tecido do coração foi coletado para diferentes análises. No tempo de vinte e quatro horas, foram feitas fotomicrografias representativas da arquitetura normal do coração nos grupos sham veículo (A) e sham cilostazol (B), fotomicrografias contendo alterações histológicas de degenerescência hialina dos cardiomiócitos nos grupos CLP veículo (C) e CLP cilostazol (D). A barra de escala representa 100 μm (coloração de hematoxilina-eosina, ampliação de 200x). Foram avaliados também o extravasamento do azul de Evans (E) e atividade de mieloperoxidase (F). Nos tempos de doze e vinte e quatro horas foram analisados catalase (G), superóxido dismutase (H) e hidroperóxido lipídico (I). Nos painéis E-I, cada ponto representa um animal individual, a linha representa a média \pm EPM, $n=6-10$ animais/grupo. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p<0,05$.

Após vinte e quatro horas do procedimento de CLP, a análise histopatológica do rim apontou normalidade tecidual na região do córtex renal (Fig. 14A – 14D). Porém, semelhante ao ocorrido em outros tecidos, o rim apresentou aumento da permeabilidade vascular de acordo com a análise do extravasamento do corante azul de Evans (Fig. 14E, sham veículo $0,56 \pm 0,07$, CLP veículo $0,94 \pm 0,09$ e CLP cilostazol $1,07 \pm 0,19$ ng/mg de tecido, $p<0,05$) e aumento de forma não significativa na atividade de MPO nos animais do grupo CLP veículo (Fig. 14F, sham veículo $0,37 \pm 0,048$ e CLP veículo $0,55 \pm 0,045$ DO/mg de proteína, $p=0,07$). O tratamento com cilostazol não preveniu o aumento da permeabilidade vascular nos animais sépticos (Fig. 14E).

Doze horas após o CLP, os animais sépticos apresentaram aumento significativo na atividade da CAT (Fig. 14G, sham veículo $0,97 \pm 0,19$ e CLP veículo $2,83 \pm 0,60$, $p<0,05$), porém esse aumento não foi observado vinte e quatro horas após a cirurgia (Fig. 14G). Apesar disso, observou-se uma menor atividade de CAT nos animais do grupo CLP cilostazol, quando comparado ao mesmo grupo no tempo de doze horas (Fig. G, $p<0,001$). Não foram observadas alterações na atividade de SOD entre os grupos em cada tempo (Fig. 10H), porém houve uma menor atividade de SOD no tempo de vinte e quatro horas em todos os grupos analisados quando comparado ao tempo de doze horas (Fig. H, $p<0,05$). Ainda, foi observado nos animais sépticos um aumento significativo dos níveis de hidroperóxido lipídico doze horas após o CLP (Fig. 14I, sham veículo $0,50 \pm 0,02$ e CLP veículo $0,59 \pm 0,02$ $\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$ de proteína, $p<0,05$) e normalização após vinte e quatro horas (Fig. 14I), apesar disso, identificou-se um menor nível de hidroperóxido lipídico em todos os grupos no tempo de vinte e quatro horas. O tratamento com cilostazol não preveniu o aumento da

atividade de CAT e hidroperóxido lipídico nos animais sépticos doze horas após o CLP (Fig. 14G e I).

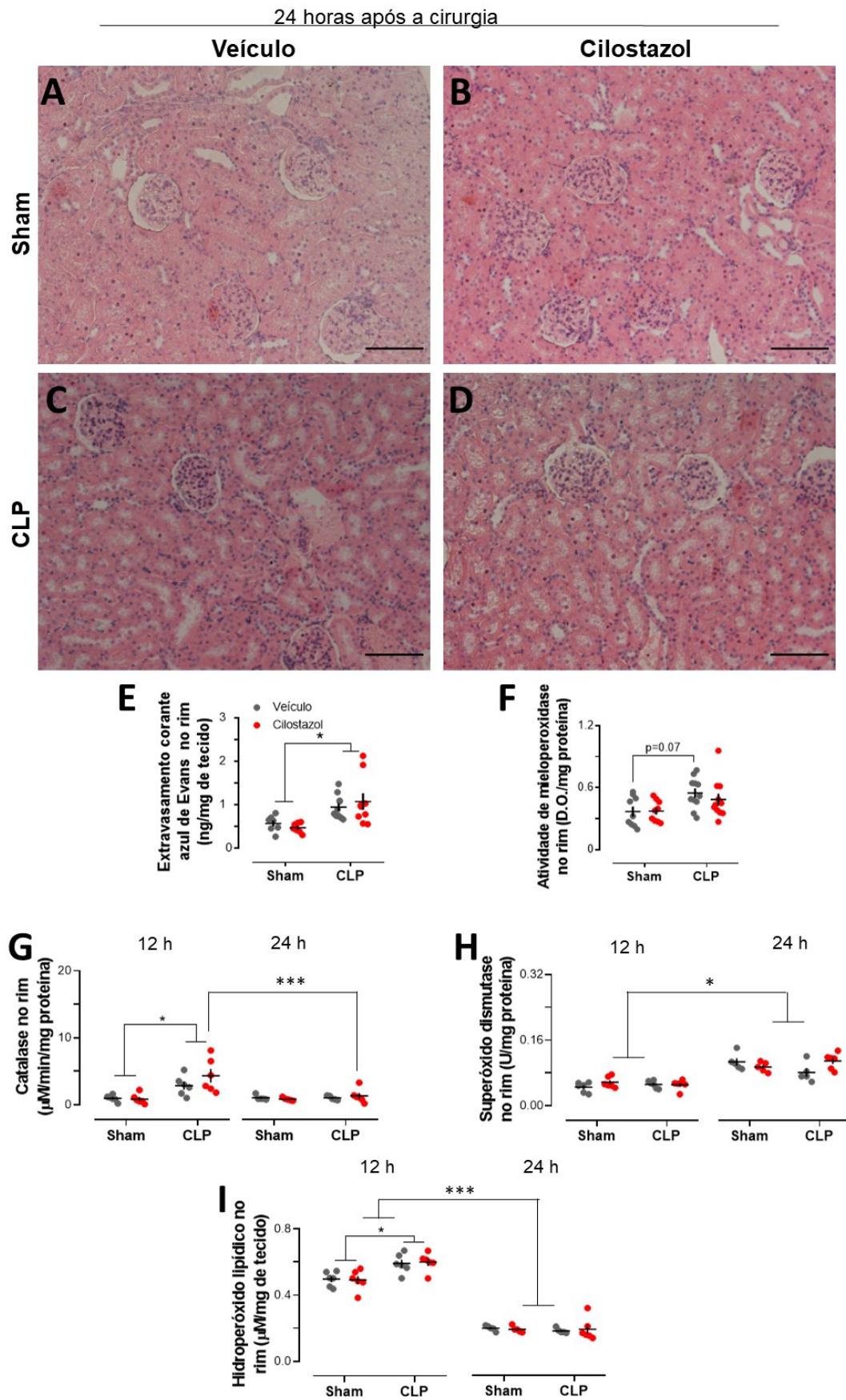


Figura 14. Efeito da inibição da PDE3 em marcadores de dano tecidual, inflamação, permeabilidade vascular e dano oxidativo no rim. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Grupos independentes foram eutanasiados nos tempos de doze e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico e o tecido do rim foi coletado para diferentes análises. No tempo de vinte e quatro horas, foram feitas fotomicrografias representativas da arquitetura normal do rim nos grupos sham veículo (A), sham cilostazol (B), CLP veículo (C) e CLP cilostazol (D). A barra de escala representa 100 μ m (coloração de hematoxilina-eosina, ampliação de 200x). Foram avaliados também o extravasamento do azul de Evans (E) e atividade de mieloperoxidase (F). Nos tempos de doze e vinte e quatro horas foram analisados catalase (G), superóxido dismutase (H) e hidroperóxido lipídico (I). Nos painéis E-I, cada ponto representa um animal individual, a linha representa a média \pm EPM, n=6-10 animais/grupo. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós teste de Bonferroni. *p<0,05.

4.5 A SEPSE REDUZ OS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS SEM ALTERAR OS NÍVEIS PROTEICOS DE PDE3A E A INIBIÇÃO DESSA ENZIMA AUMENTA OS NÍVEIS DE cAMP

Durante a sinalização celular mediada por diferentes ligantes à receptores ou outros alvos celulares, determinados mediadores de sinalização são produzidos, destacamos aqui os nucleotídeos cíclicos (cAMP e cGMP) que são elementos-chave na mediação e amplificação de algumas respostas celulares mediadas por alguns ligantes, levando a ativação de determinados alvos moleculares, com destaque as proteínas cinases A (PKA) e G (PKG). Durante a sepse, muitas vias de sinalização acabam sendo impactadas em diferentes pontos, levando a uma perturbação do equilíbrio na síntese e ação dos nucleotídeos cíclicos. Nos tempos de doze e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico de CLP, a sepse não causou alteração na concentração plasmática de cAMP (Fig. 15A e 15C), porém a inibição de PDE3 nos animais sépticos aumentou significativamente os níveis cAMP (Fig. 15A, CLP veículo $12,69 \pm 1,61$ e CLP cilostazol $25,11 \pm 4,64$ pmol/mL, p<0,05; interação entre procedimento e tratamento p=0,046). Esse efeito não foi mais observado no tempo de vinte e quatro horas (Fig. 15C). Já a concentração plasmática de cGMP esteve reduzida nos animais sépticos nos tempos de doze e vinte e quatro horas após o CLP e o tratamento com cilostazol não alterou esses níveis (Fig. 15B, p<0,001 e 15D, p<0,01).

A determinação dos níveis plasmáticos dos nucleotídeos cíclicos é bastante importante, porém a concentração plasmática desses sinalizadores resulta da produção e liberação pelas diferentes células e tecidos do organismo como um todo,

portanto para avaliarmos cada contexto tecidual, nós determinamos os níveis de cAMP e cGMP em alguns tecidos alvo nesse estudo.

Doze horas após o procedimento de CLP não foram observadas alterações nos níveis teciduais de cAMP e cGMP no pulmão (Fig. 15E e 15F), aorta torácica (Fig. 15I e 15J) e músculo tibial anterior (Fig. 15K e 15L). Entretanto, no coração dos animais sépticos observou-se uma redução nos níveis de cAMP (Fig. 15G, sham veículo $133,10 \pm 6,90$ e CLP veículo $91,60 \pm 10,52$ pmol/mg de proteína, $p < 0,05$) e cGMP (Fig. 15H, sham veículo $7,80 \pm 0,79$ e CLP veículo $4,89 \pm 0,31$ pmol/mg de proteína, $p < 0,05$). Os animais sépticos que receberam tratamento com cilostazol não apresentaram redução nos níveis de cAMP no coração (Fig. 15G, sham cilostazol $116,8 \pm 10,18$ e CLP cilostazol $117,9 \pm 8,83$ pmol/mg de proteína, $p > 0,05$) e apresentaram aumento nos níveis de cAMP no músculo tibial anterior (Fig. 15K, CLP veículo $50,71 \pm 3,96$ e CLP cilostazol $69,83 \pm 5,77$ pmol/mg de proteína, $p < 0,05$; interação entre procedimento e tratamento $p = 0,029$).

Os níveis teciduais e plasmáticos dos nucleotídeos cíclicos sofrem influência de vias de sinalização e enzimas que levam à sua produção, porém de forma mais eficaz de controle, sofrem influência das enzimas responsáveis pela sua degradação e inativação, as enzimas fosfodiesterases (PDEs), entre elas a família PDE3 que é capaz de controlar a degradação de ambos, porém majoritariamente de cAMP.

A sepse e a inibição enzimática não resultaram em mudanças no nível proteico total de PDE3A no coração e aorta torácica vinte e quatro horas após o procedimento de CLP determinados pela técnica de *Western blotting* (Fig. 16A e 16B). Foi avaliado também o nível de fosforilação da proteína PDE3A no aminoácido serina 312 em diferentes tempos ao longo das vinte e quatro horas após o procedimento de CLP. De forma única nesse estudo, para a análise do conteúdo proteico de PDE3A fosforilada, os animais sépticos foram comparados aos animais naive que não foram submetidos a nenhum procedimento ou tratamento. Da mesma forma que ocorreu com o nível total de PDE3A, o nível de fosforilação da proteína permaneceu inalterado durante a sepse no coração e aorta torácica (Fig. 16C e 16D).

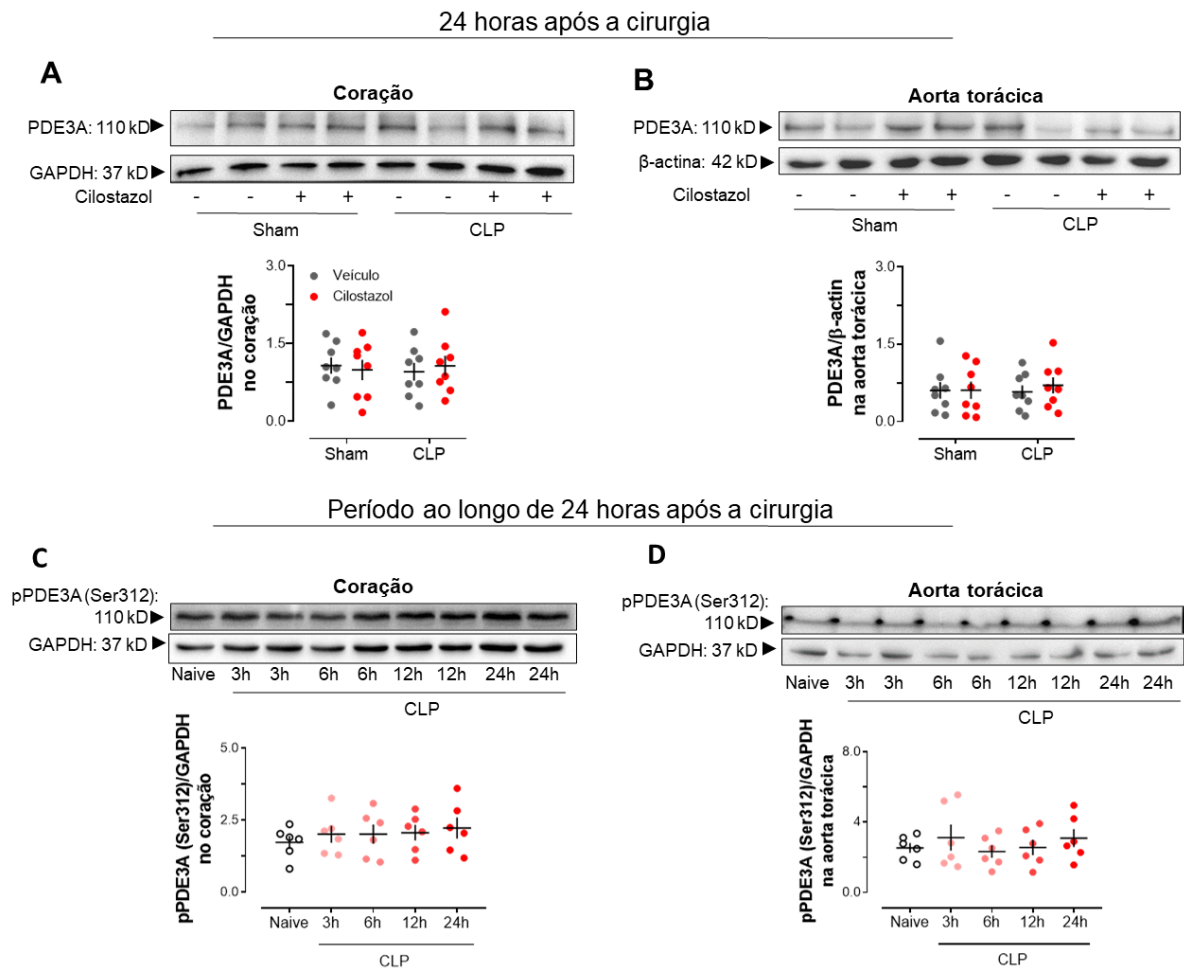


Figura 16. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 nos níveis proteicos da porção total de PDE3A e fosforilada (Ser312) de PDE3A. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Grupos independentes foram eutanasiados nos tempos de três, seis, doze e vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, obtendo-se tecidos do coração e aorta torácica para determinar os níveis totais da proteína PDE3A no coração (A) e aorta torácica (B) no tempo de vinte e quatro horas. Já os níveis proteicos da porção fosforilada (Ser312) de PDE3A foram determinados no coração (C) e aorta torácica (D) em diferentes tempos ao longo de vinte e quatro horas. Western blotting representativo das proteínas PDE3A e porção fosforilada (Ser312) de PDE3A, as proteínas GAPDH e β -actina foram utilizadas como controle carga proteica e as análises densitométricas são apresentadas como pontos que representam cada animal independente \pm EPM nos painéis A-D, n=6-8 animais/grupo. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo pós teste de Bonferroni. PDE3A: fosfodiesterase 3A; pPDE3A (Ser312): fosfodiesterase 3A fosforilada no aminoácido serina 312.

4.6 A SEPSE CAUSA DANOS HISTOPATOLÓGICOS NO CORAÇÃO E A INIBIÇÃO DE PDE3 AGRAVA AS LESÕES

Durante a sepse profundas alterações inflamatórias e hemodinâmicas ocorrem, propiciando o desenvolvimento da falência cardiovascular que precede e favorece a extensão de danos multiorgânicos que afetam todo o organismo. O coração é um órgão central durante a falência cardiovascular, recebendo influências de diversos mediadores pró-inflamatórios e sinalizadores como catecolaminas endógenas que aumentam o trabalho cardíaco e a demanda energética durante a fase hiperdinâmica da sepse, o que pode gerar danos teciduais permanentes. Demonstramos em figuras anteriores que os animais sépticos apresentaram redução na pressão arterial, aumento na frequência cardíaca, aumento na permeabilidade vascular e na migração de neutrófilos ao tecido cardíaco, além de uma redução no nível de cAMP e indícios de danos histológicos no tecido. Portanto, análises mais detalhadas de histopatologia e imunomarcações no tecido cardíaco serão demonstradas a seguir.

Vinte e quatro horas após o procedimento de CLP a análise histopatológica do coração foi feita através de cegamento e analisadores distintos. Foi observado que os animais do grupo sham veículo apresentaram normalidade na histopatologia cardíaca por coloração de hematoxilina e eosina (HE) tanto de cardiomiócitos (Fig. 17A e 17D) quanto de coronárias (Fig. 17G e 17J). Porém, os animais sépticos que receberam o tratamento com veículo apresentaram na região de cardiomiócitos alterações histopatológicas de células exibindo citoplasma hiperacidófilo, hialino e homogêneo, sem sinais de estriação característica e núcleo condensado e hiper Cromático, sugestivo de degeneração hialina (Fig. 17B e 17E), porém sem alteração aparente em coronárias (Fig. 17H e 17K). As alterações em cardiomiócitos foram mais intensas e perceptíveis nos animais do grupo CLP cilostazol (Fig. 17C e 17F) porém também apresentaram normalidade na região das coronárias (Fig. 17I e 17L). Analisou-se nas coronárias as medidas de espessura da camada muscular (Fig. 17M), camada adventícia (Fig. 17N), diâmetro do lúmen das coronárias (Fig. 17O) e obteve-se a relação entre a camada muscular e adventícia (Fig. 17P) e a relação entre lúmen e camada muscular (Fig. 17Q) onde verificou-se a ausência de alterações aparentes no estado contrátil desses vasos na sepse. Nessas imagens de

histopatologia também foi verificado a ausência de sinais característicos de início do desenvolvimento de fibrose cardíaca.

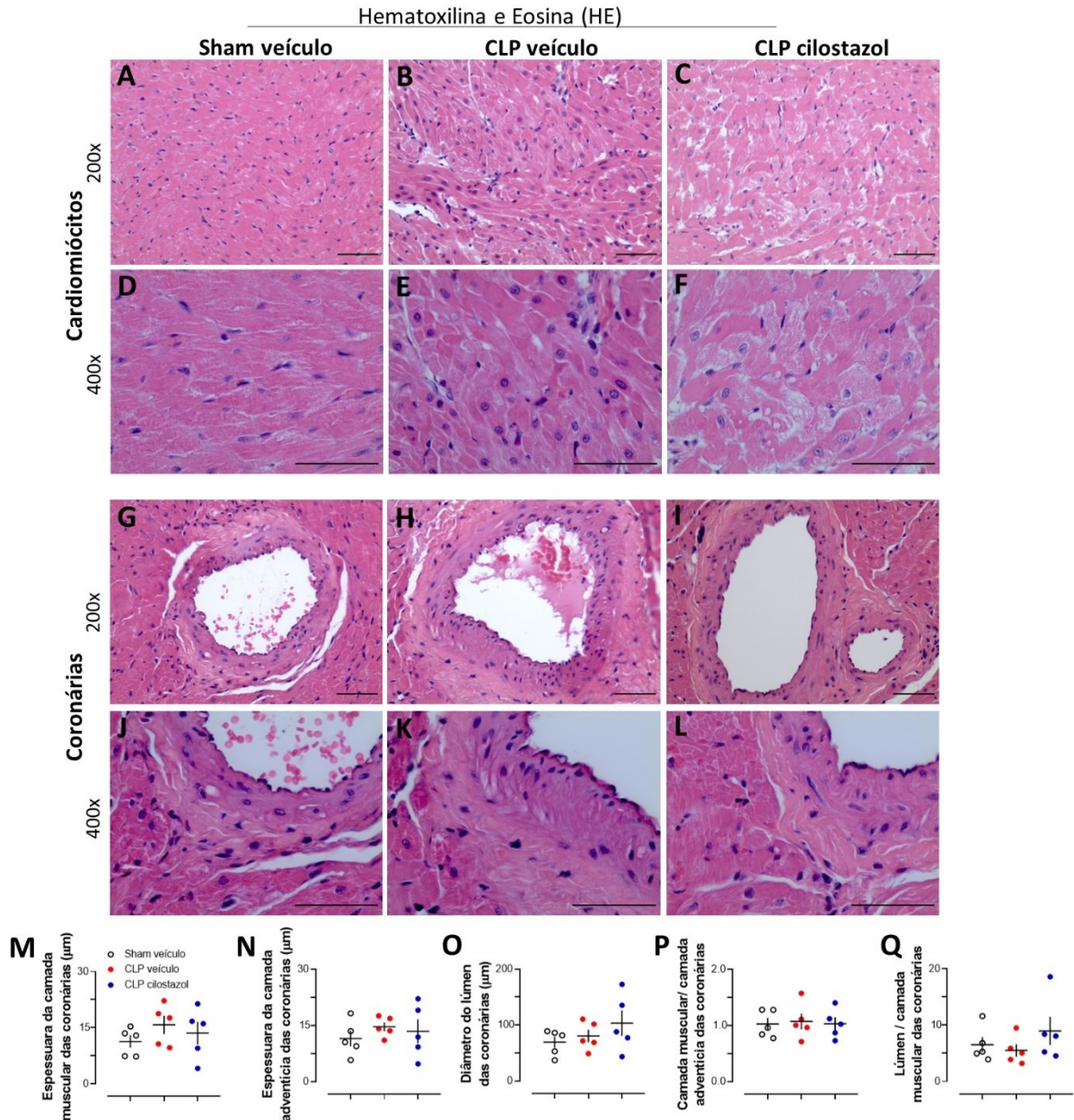


Figura 17. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 em danos histológicos em cardiomiócitos e coronárias. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados e o tecido do coração foi coletado e foram feitas fotomicrografias representativas da arquitetura normal dos cardiomiócitos e coronárias no grupo sham veículo (A, D, G e J) e fotomicrografias contendo alterações histológicas de degenerescência hialina nos cardiomiócito e normalidade em coronárias nos grupos CLP veículo (B, E, H e K) e CLP cilostazol (C, F, I e L). A barra de escala representa 25 µm (coloração de hematoxilina-eosina, ampliação de 200x e 400x). A camada muscular e adventícia das coronárias foram medidas obtendo-se a espessura da camada muscular (M), camada adventícia (N), diâmetro do lúmen das coronárias (O), relação da camada muscular/camada adventícia (P) e relação do lúmen / camada muscular (Q). Cada ponto representa um animal individual, a linha representa a média \pm EPM, n=5 animais/grupo. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um via, seguido pelo pós teste de Bonferroni.

A coloração de ácido periódico de Schiff evidenciou a positividade na coloração para a presença de degeneração mucinosa nos cardiomiócitos (Fig. 18A, 18B e 18C) e coronárias (Fig. 18D, 18E e 18F) em todos os grupos, uma característica fisiológica que pode ser relacionada a idade dos animais. A coloração de tricrômico de Masson (Fig. 18G – 18L) não apontou sinais de danos e reforçou a ausência de sinais de fibrose cardíaca observada na coloração de HE.

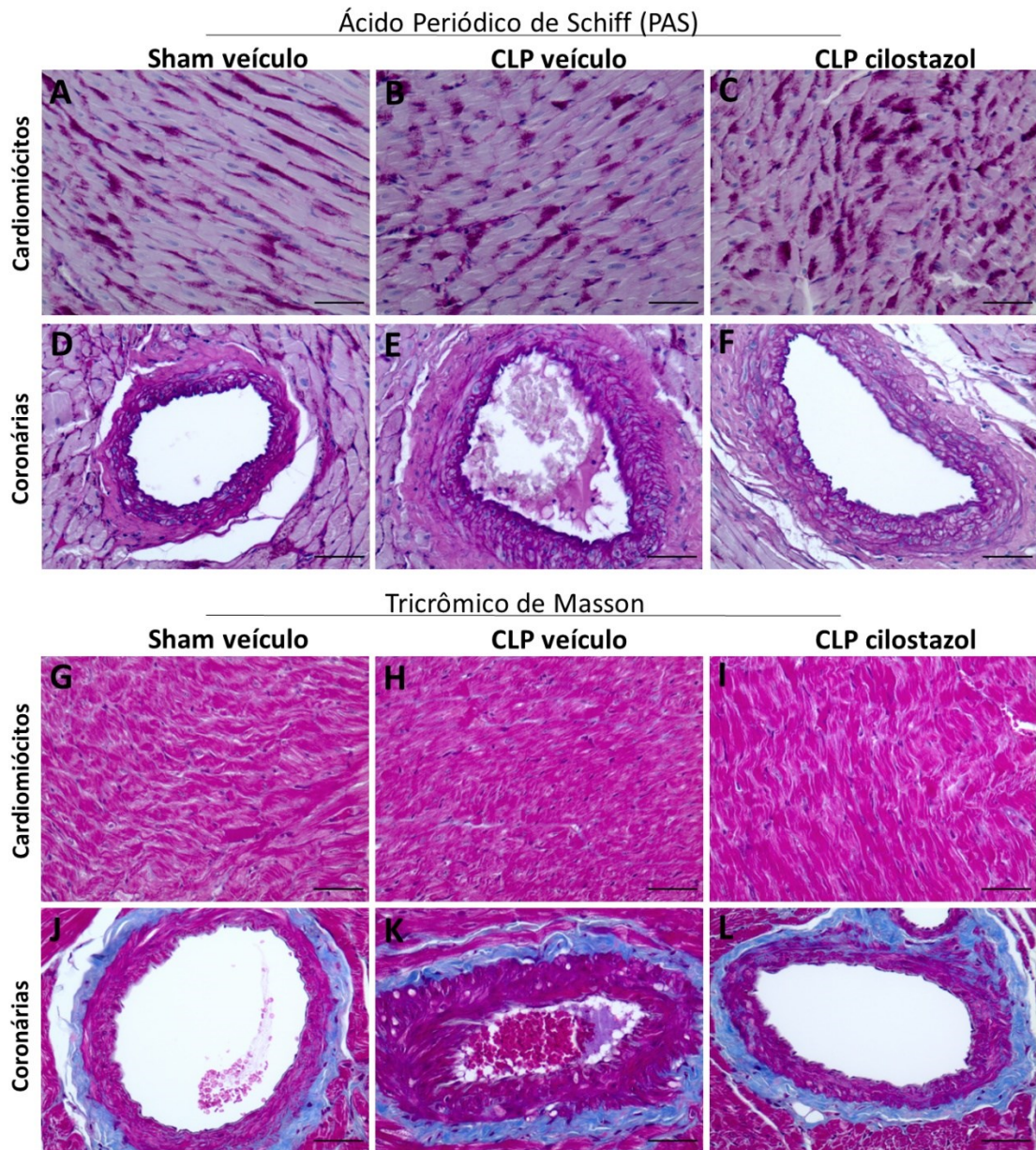


Figura 18. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 em danos histológicos em cardiomiócitos e coronárias. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados e o tecido do coração foi coletado e foram feitas fotomicrografias representativas da arquitetura dos cardiomiócitos e coronárias exibindo degenerescência mucinosa/basofílica nos cardiomiócito e normalidade em coronárias e ausência de sinais de fibrose nos grupos sham veículo (A, D, G e J), CLP veículo (B, E, H e K) e CLP cilostazol (C, F, I e L). A barra de escala representa 25 µm (coloração de ácido periódico de Schiff A-F e coloração de tricrômio de Masson G-L, ampliação de 200x).

4.7 A SEPSE CAUSA INFLAMAÇÃO CARDÍACA E A INIBIÇÃO DE PDE3A PROTEGE EM PARTES O TECIDO

A sepse comumente afeta o funcionamento cardíaco, tanto de forma aguda quanto a longo prazo através de mudanças hemodinâmicas e inflamatórias que ocorrem na doença e que acabam afetando o órgão.

De forma complementar ao ensaio *western blotting*, foi analisado através da técnica de imuno-histoquímica a imunomarcação para a proteína PDE3A total e pPDE3A (Ser312) que corresponde a sua fração fosforilada no aminoácido Ser312 no tempo de vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP.

Foi observado que a sepse e a inibição de PDE3 não alteraram a imunomarcação tanto para PDE3A nas regiões de cardiomiócitos (Fig. 19A – 19D) e coronárias (Fig. 19E – 19H) quando para a pPDE3A (Ser312) em cardiomiócitos (Fig. 19I – 19L) e coronárias (Fig. 19M – 19P). Além disso, o perfil das imunomarcações nas diferentes fotomicrografias demonstra a presença de forma difusa intracelularmente dessas proteínas nos cardiomiócitos e na camada muscular das coronárias.

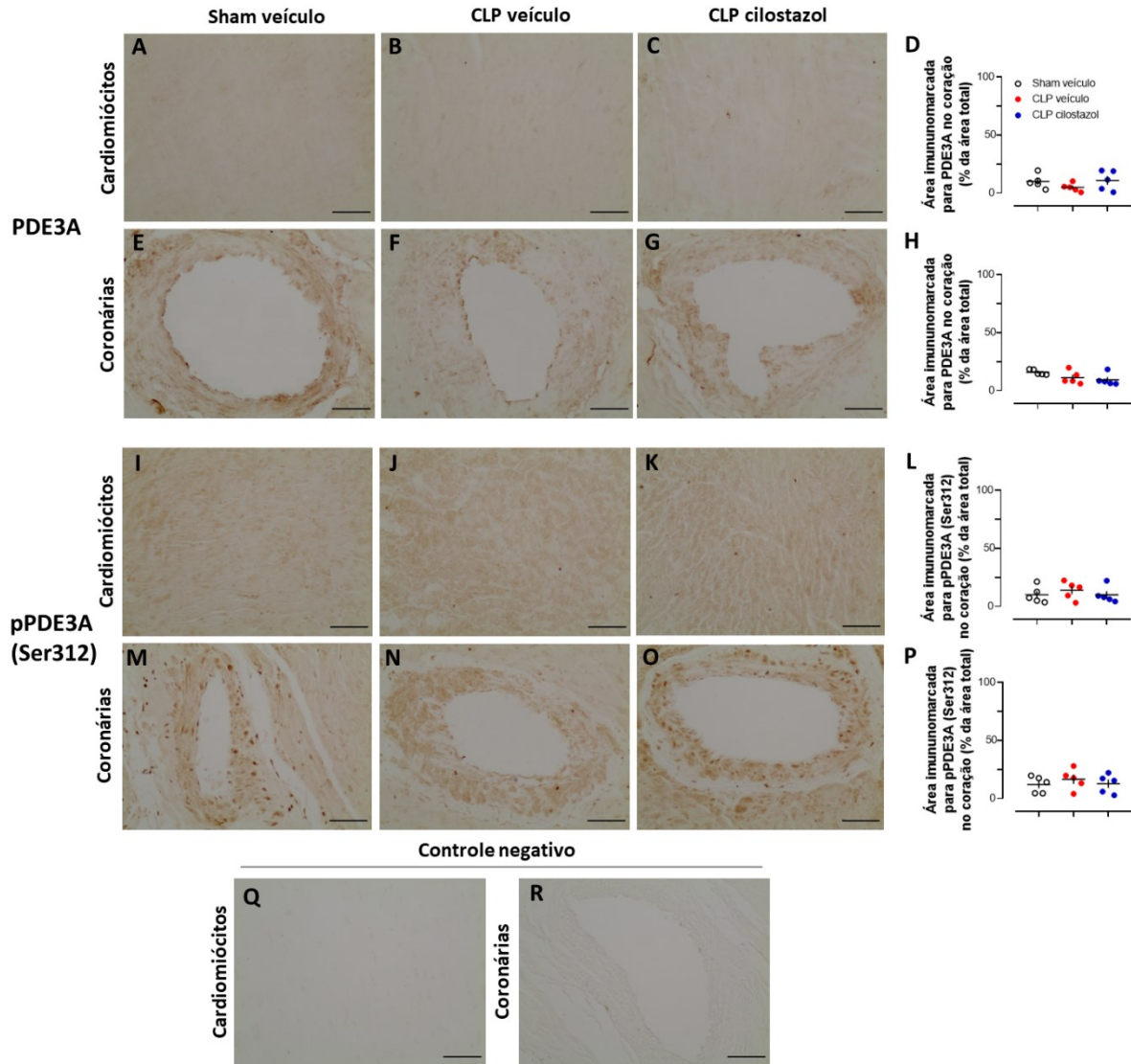


Figura 19. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na imunomarcagem da porção total de PDE3A e fosforilada (Ser312) de PDE3A no coração. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados e o tecido do coração foi coletado e analisado por imuno-histoquímica com marcação para a proteína PDE3A na região de cardiomiócitos (A-C) e coronárias (E-G), porção fosforilada (Ser312) de PDE3A em cardiomiócitos (I-K) e coronárias (M-O). A barra de escala representa 25 μ m (ampliação de 200x). Através de controle negativo de reação (Q e R) a imunomarcagem foi quantificada e representada nos painéis D, H, L e P, onde cada ponto representa um animal individual, a linha \pm EPM, n=5 animais/grupo. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um via, seguido pelo pós teste de Bonferroni.

PDE3A: fosfodiesterase 3A; pPDE3A (Ser312): fosfodiesterase 3A fosforilada no aminoácido serina 312.

Durante a sepse ocorre o aumento da síntese de óxido nítrico (NO), sendo esse um importante mediador da resposta vasodilatadora na doença. O NO é sintetizado por três diferentes isoformas de enzimas denominadas de óxido nítrico sintase (NOS). Avaliamos através a imunomarcação para duas diferentes isoformas de NOS - NOS3 (óxido nítrico sintase 3 ou endotelial) amplamente expressa em células endoteliais e NOS2 (óxido nítrico sintase 2 ou induzida) que comumente tem sua expressão e atividade aumentada durante eventos infecciosos e/ou inflamatórios.

Foi observado que a imunomarcação para NOS3 não se alterou durante a sepse e não sofreu influência da inibição de PDE3 em cardiomiócitos (Fig. 20A – 20D) e coronárias (Fig. 20E – 20H). Porém, a imunomarcação para NOS2 na região de cardiomiócitos aumentou na sepse e a inibição de PDE3 impediu de forma significativa esse aumento em cardiomiócitos (Fig. 20I – 20L, CLP veículo $15,59 \pm 3,27$ e CLP cilostazol $3,04 \pm 0,34$, $p < 0,05$). A imunomarcação na região das coronárias demonstrou que somente os animais sépticos que não receberam o inibidor de PDE3 apresentaram aumento significativo na imunomarcação para NOS2 (Fig. 20M – 20P, sham veículo $5,49 \pm 1,53$ e CLP veículo $17,57 \pm 2,86$ % da área total, $p < 0,05$).

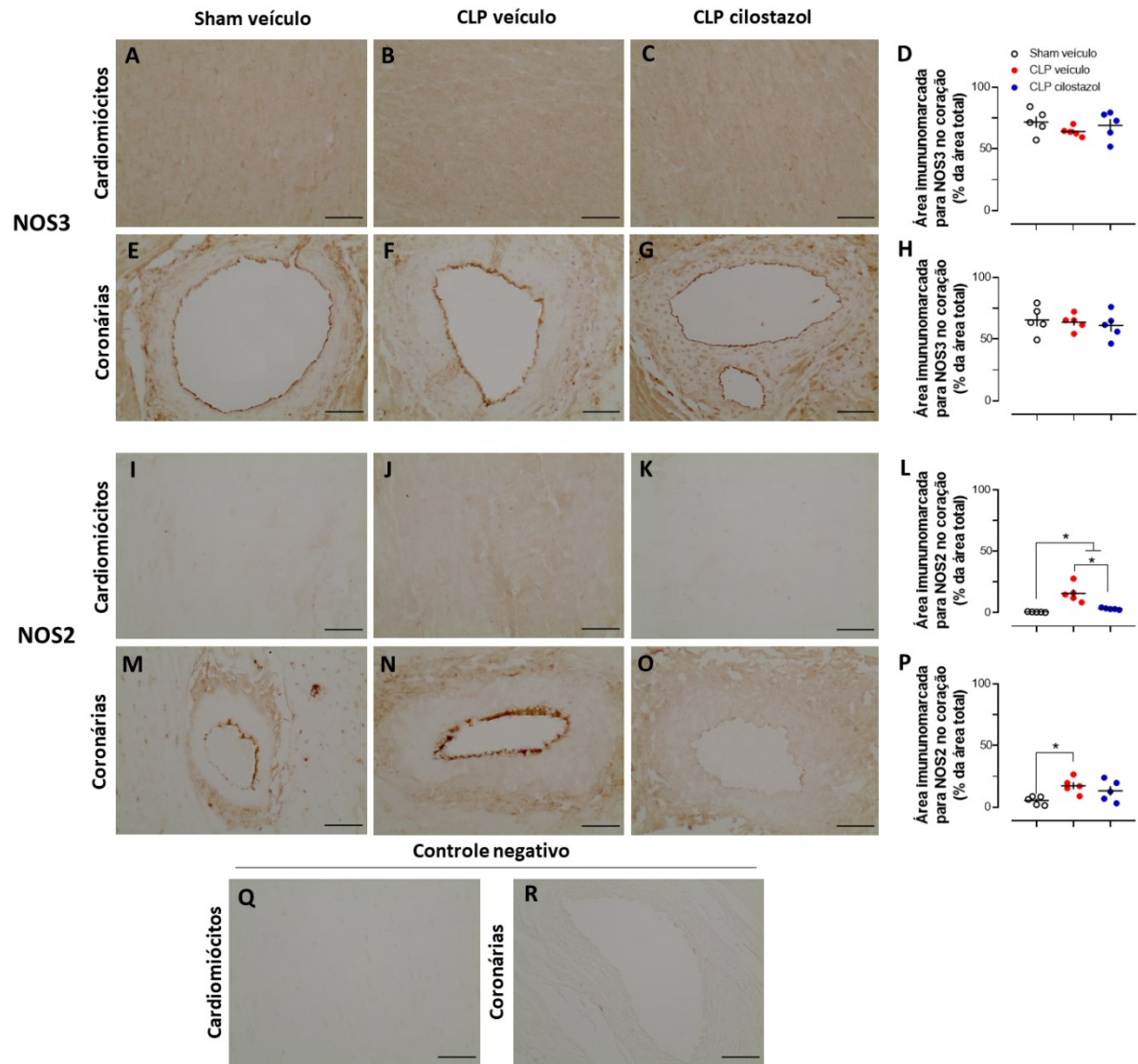


Figura 20. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na imunomarcagem de NOS3 e NOS2 no coração. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados e o tecido do coração foi coletado e analisado por imuno-histoquímica com marcação para as proteínas NOS3 na região de cardiomiócitos (A-C) e coronárias (E-G), NOS2 em cardiomiócitos (I-K) e coronárias (M-O). A barra de escala representa 25 μ m (ampliação de 200x). Através de controle negativo de reação (Q e R) a imunomarcagem foi quantificada e representada nos painéis D, H, L e P, onde cada ponto representa um animal individual, a linha \pm EPM, n=5 animais/grupo. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um via, seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$. NOS3: Óxido nítrico sintase 3 ou endotelial; NOS2: Óxido nítrico sintase 2 ou induzida.

Durante a resposta inflamatória que ocorre na sepse outro sinalizador celular que sofre modulação em sua produção e sinalização celular é a molécula de adenosina, mediando vasoconstrição e/ou vasodilatação a depender do subtipo de seu receptor expresso no tecido e leito vascular, além de exercer um efeito imunomodulador a longo prazo em sobreviventes da sepse. Além disso, há evidências na literatura que demonstram que o cilostazol além de ser um inibidor seletivo de PDE3 exibe a capacidade de inibir a captação de adenosina, aumentando os níveis intersticiais desse sinalizador, que pode atuar de forma sinérgica à inibição de PDE3 e aumentar os níveis de cAMP tecidual.

Os níveis de adenosina no interstício resultam de sua produção a partir da hidrólise do ATP e de sua captação para o interior da célula através de transportadores celulares. A imunomarcagem do transportador equilibrativo de nucleosídeos tipo 1 (ENT1) - responsável pelo transporte equilibrativo intra/extracelular de moléculas como a adenosina - demonstrou que o seu conteúdo proteico reduziu na sepse e a inibição de PDE3 impediu de forma significativa essa redução nos cardiomiócitos (Fig. 21A – 21D, Sham veículo $78,90 \pm 4,50$, CLP veículo $52,77 \pm 5,63$ e CLP cilostazol $78,31 \pm 7,72$ % da área total, $p < 0,05$), porém a doença e o tratamento com cilostazol não alteraram a imunomarcagem nas coronárias (Fig. 21E – 21H). De forma contrária, foi observado que a imunomarcagem para o receptor de adenosina do subtipo A_{2A} aumentou de forma significativa nos cardiomiócitos durante a sepse em animais que não receberam o inibidor de PDE3 (Fig. 21I – 21L, sham veículo $9,47 \pm 1,06$ e CLP veículo $22,87 \pm 4,29$ % da área marcada, $p < 0,05$) e não foram observadas mudanças na região das coronárias (Fig. 21M – 21P). Além da imunomarcagem tecidual do receptor e transportador de adenosina, doze horas após o CLP realizamos a determinação dos níveis plasmáticos de adenosina na tentativa de reportar mudanças nos níveis desse sinalizador. Não foram observadas alterações nos níveis de adenosina plasmática no tempo analisado decorrentes da sepse ou do tratamento com cilostazol (Fig. 21S, sham veículo $2,01 \pm 0,38$, CLP veículo $2,53 \pm 0,46$ e CLP cilostazol $2,14 \pm 0,28$ μM , $p > 0,05$).

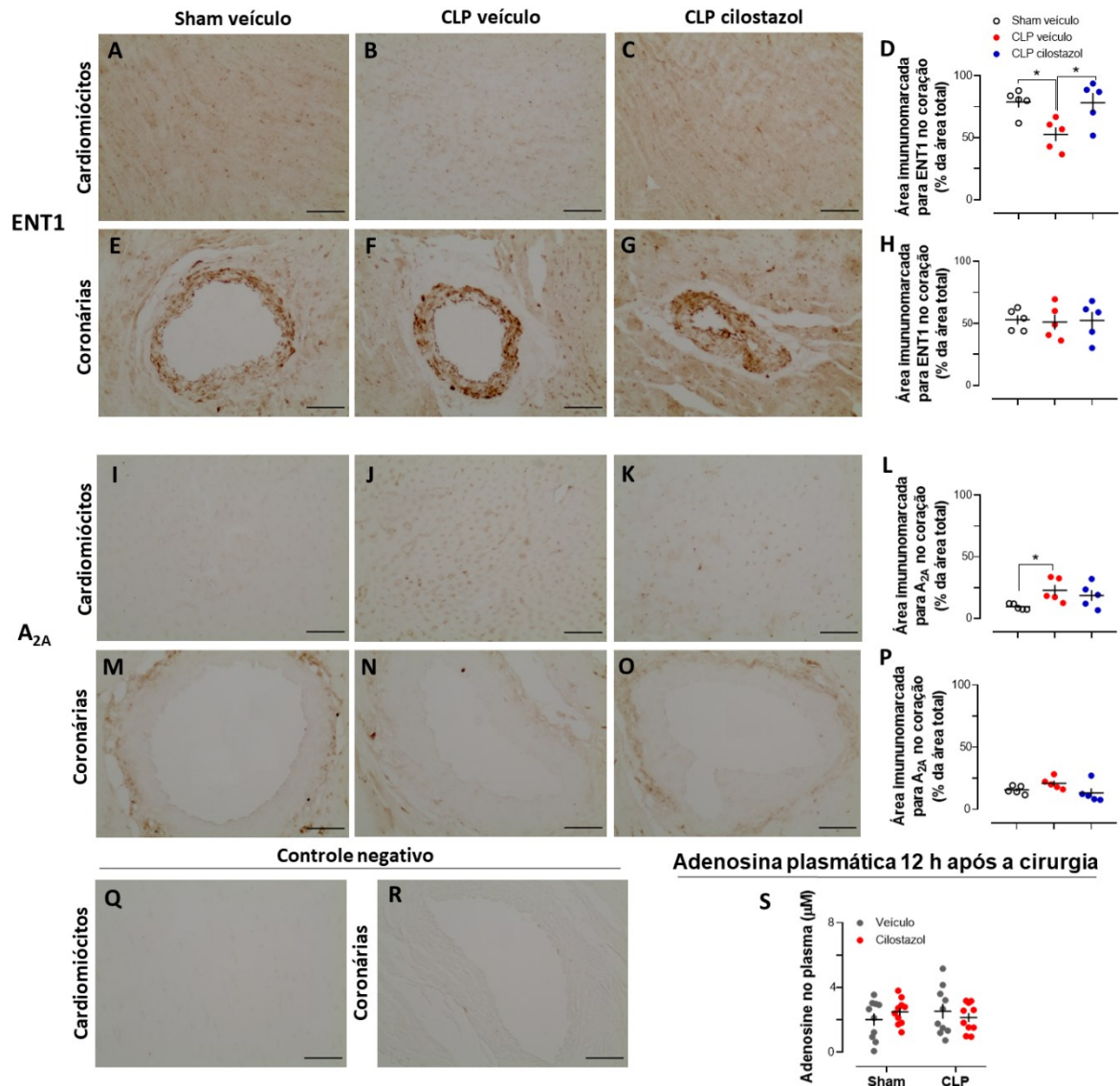


Figura 21. Efeito da sepse e da inibição de PDE3 na imunomarcção de ENT1 e A_{2A} no coração e nos níveis plasmáticos de adenosina. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem) ou veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados e o tecido do coração foi coletado e analisado por imuno-histoquímica com marcação para as proteínas ENT1 na região de cardiomiócitos (A-C) e coronárias (E-G), A_{2A} em cardiomiócitos (I-K) e coronárias (M-O). A barra de escala representa 25 µm (ampliação de 200x). Através de controle negativo de reação (Q e R) a imunomarcção foi quantificada e representada nos painéis D, H, L e P, onde cada ponto representa um animal individual, a linha ± EPM, n=5 animais/grupo. Um grupo individual de animais foi submetido aos procedimentos e tratamentos mencionados acima, porém sendo eutanasiados no tempo de doze horas após a cirurgia, obtendo-se o plasma para a determinação dos níveis circulantes de adenosina (S), cada ponto representa um animal independente, n=10 animais/grupo. Os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de um via, seguido pelo pós teste de Bonferroni. *p<0,05.

ENT1: Transportador equilibrativo de nucleosídeos tipo 1; A_{2A}: Receptor de adenosina do tipo A_{2A}.

4.8 A SEPSE COMPROMETE PROTEÍNAS ENVOLVIDAS NA SÍNTESE, SINALIZAÇÃO E CONTENÇÃO EM MICRODOMÍNIOS DOS NUCLEOTÍDEOS CÍCLICOS NO CORAÇÃO

Uma análise de RNAseq a partir de um estudo de bioinformática avaliando-se 85 genes no tecido cardíaco a partir de dados públicos, apontou para um perfil de expressão diferencial de 12 genes em pelo menos um tempo analisado ao longo do desenvolvimento da sepse. Comparando-se dados obtidos dos grupos sham e CLP, podemos observar que genes relacionados as proteínas *upstream* adenilil ciclase (Adcy6 e Adcy7) estão reduzidos no tempo de doze horas nos animais sépticos, podendo impactar no conteúdo dessa enzima de síntese da molécula de cAMP (Fig. 22, $p < 0,05$). Também no tempo de doze horas se observa uma redução no gene relacionado ao receptor β_1 -adrenérgico nos animais sépticos, podendo levar a uma menor densidade desse receptor no coração e um menor estímulo de síntese do cAMP (Fig. 22, $p < 0,05$). Já os genes relacionados as proteínas de ancoragem de A- cinase (AKAP, do inglês *A-kinase anchor proteins*), apresentaram redução no tempo de doze horas relacionados aos genes Akap1 e Akap6 e um aumento do gene Akap12 no tempo de seis horas após o CLP nos animais sépticos (Fig. 22, $p < 0,05$). Alterações em genes relacionados a essas proteínas são importantes uma vez que essas proteínas participam da organização dos microdomínios de sinalização dos nucleotídeos cíclicos. Houve também no tempo de doze horas redução do gene Arrb1 relacionado a proteína β -arrestina, importante na internalização de receptores, além de se observar uma redução do gene Nos2 relacionado a enzima NOS2 (Fig. 22, $p < 0,05$). Entretanto, houve aumento do gene Nos3 nos tempos de seis e doze horas, sendo relacionado a enzima NOS3, mostrando que a síntese local de NO se altera na sepse (Fig. 22, $p < 0,05$). Apesar dos genes de PDE3 não apresentarem expressão diferencial no coração durante a sepse, se observou no tempo de doze horas uma redução do gene Pde4a e aumento do gene Pde4b nos tempos de seis e doze horas, sendo esses genes relacionados às isoformas PDE4A e PDE4B, sendo essas enzimas importantes colaboradores no controle da difusão de cAMP no coração juntamente com as isoformas de PDE3 (Fig. 22, $p < 0,05$). Por fim, observou-se mais tardiamente no tempo de vinte e quatro horas uma redução no gene Ryr3 que se relaciona a proteína *downstream* canal de rianodina (Fig. 22, $p < 0,05$).

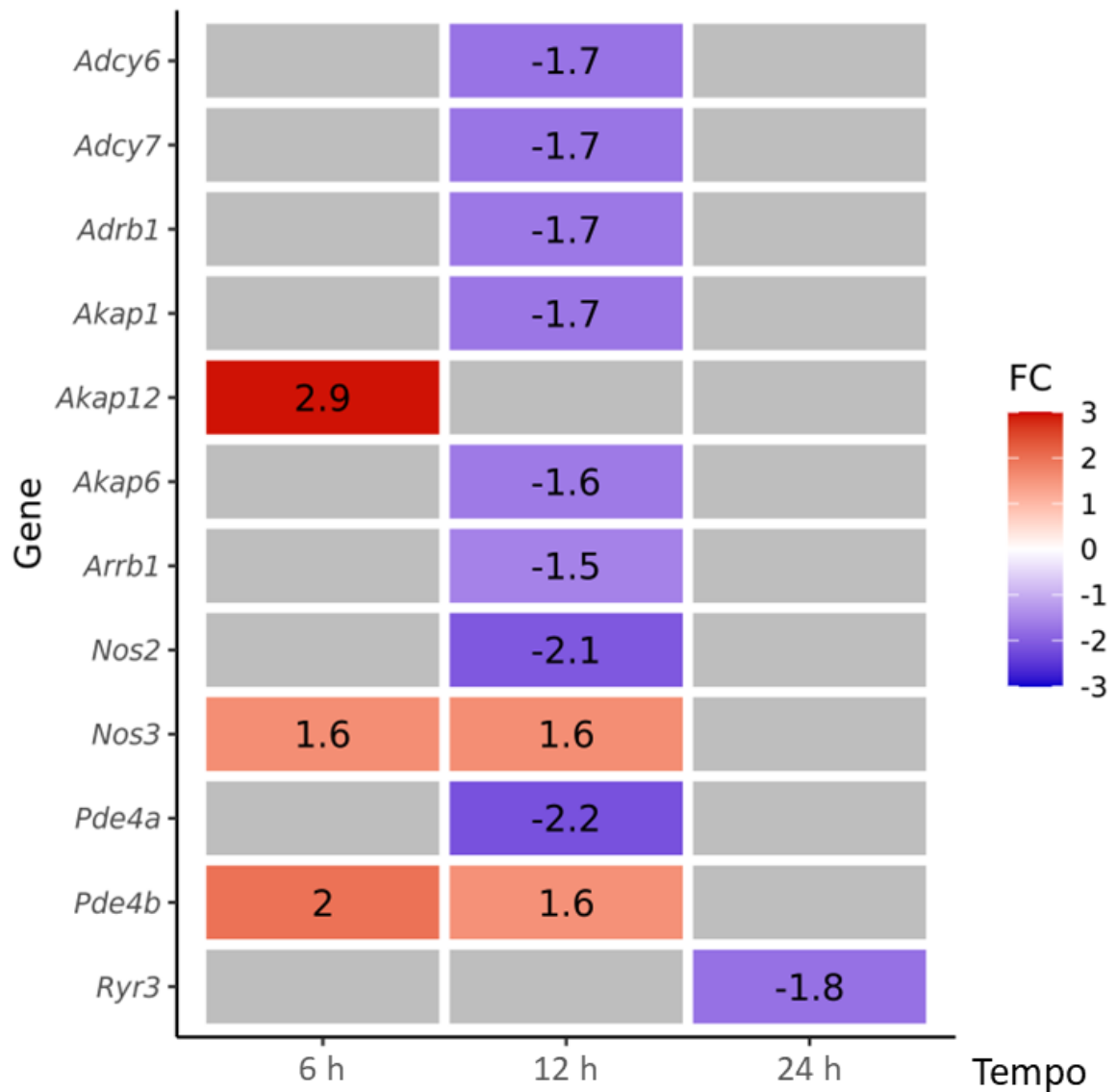


Figura 22. Genes diferencialmente expressos no tecido cardíaco durante a sepse. A partir de um estudo de bioinformática, utilizando dados públicos e analisando a expressão diferencial de 85 genes com base no RNAseq, observou-se ao longo dos tempos de seis, doze e vinte e quatro horas alterações nos genes *Adcy6*, *Adcy7*, *Adrb1*, *Akap1*, *Akap12*, *Akap6*, *Arrb1*, *Nos2*, *Nos3*, *Pde4a*, *Pde4b* e *Ryr3*. Os dados são expressos em mapas de temperatura e valores de *fold changes*. Os dados expressos como aumento ou redução na expressão exibem $p < 0,05$.

4.9 A ASSOCIAÇÃO DE ANTIMICROBIANOS E A INIBIÇÃO DE PDE3 PROTEGE OS ANIMAIS CONTRA A MORTALIDADE INDUZIDA PELA SEPSE

A sepse é uma doença infecciosa grave que causa altas taxas de mortalidade na clínica, principalmente em unidades de tratamento intensivo (UTIs), portanto a análise do desfecho morte é essencial em modelos animais que avaliam propostas de intervenções farmacológicas na doença.

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e o percentual de sobrevivida foi avaliado ao longo do tempo. Os animais dos grupos sham veículo e sham cilostazol conforme esperado não apresentaram mortalidade ao longo das cento e vinte horas. Entretanto, os animais sépticos apresentaram queda na sobrevivida ao longo do tempo, em vinte e quatro horas os animais do grupo CLP veículo apresentaram percentual de sobrevivida de 51,43%, CLP cilostazol 57,14%, CLP veículo + antibiótico 54,29%, CLP cilostazol + antibiótico 80,0% e CLP cilostazol duas doses + antibiótico 71,43%. Ao longo do tempo a taxa de sobrevivida foi diminuindo, principalmente nos grupos que não receberam antibiótico e após cento e vinte horas o percentual de sobrevivida no grupo CLP veículo foi de 22,86%, CLP cilostazol 28,57%, CLP veículo + antibiótico 51,43%, CLP cilostazol + antibiótico 62,86% e CLP cilostazol duas doses + antibiótico 62,86%. Quando analisado a curva de sobrevivida como um todo ao longo do tempo o fator decisivo para proteção contra a mortalidade na sepse foi a inserção da antibioticoterapia nos animais (Fig. 23A, $p < 0,05$). O tratamento com o inibidor de PDE3 não melhorou de forma significativa a curva de sobrevivida dos animais sépticos (Fig. 23A), porém foi observado uma menor mortalidade nos grupos que receberam o tratamento em associação de cilostazol e antibiótico a partir do tempo de 24 horas após o CLP (Fig. 23B e 23C)

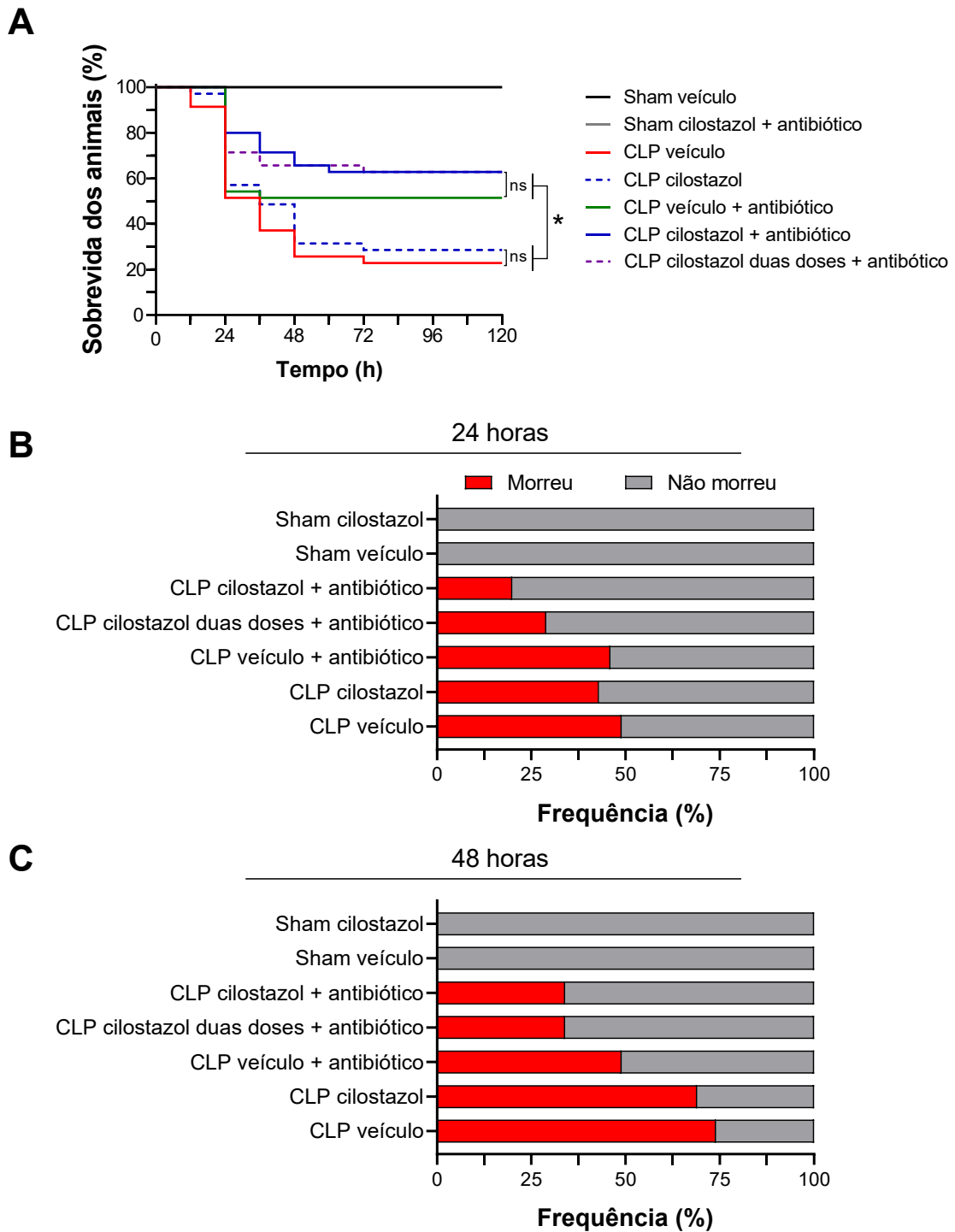


Figura 23. Efeito da sepse, da inibição de PDE3 e de antibiótico na sobrevivência observada nos animais ao longo do tempo. Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem), veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem), ou antibiótico (24.000 UI de penicilina/kg, IM). O percentual de sobrevivência foi obtido ao longo de 120 h após o procedimento cirúrgico (A), nos tempos de 24 horas (B) e 48 horas (C) observa-se a menor ocorrência de mortalidade nos grupos que receberam o tratamento em associação de cilostazol e antibiótico. No painel A, a linha representa a média de cada grupo, n=3 animais/grupos sham e n=35 animais/grupos CLP. Os dados foram analisados pelo teste de log-rank (Mantel-Cox). *P<0.05.

Apesar do tratamento com o inibidor de PDE3 não ter melhorado de forma significativa a curva de sobrevivência nos animais sépticos, foi observado através do teste exato de Fisher que a associação do cilostazol ao antibiótico reduziu de forma significativa o risco do desenvolvimento do desfecho morte no tempo de vinte e quatro horas (Tabela 4, $p=0,04$; risco relativo de 0,44 e intervalo de confiança de 95% (0,2-0,89)). Portanto, o inibidor de PDE3 exerceu um efeito protetor no início da doença nos animais sépticos, momento bastante oportuno pois possibilita a inserção de ferramentas de suporte hemodinâmico e farmacológico a esses animais.

Tabela 4. Efeito da associação da inibição de PDE3 e do antibiótico na sobrevivência dos animais ao longo do tempo

Grupos (24 h após a cirurgia)	Morte		Total
	Sim	Não	
CLP cilostazol + antibiótico*#	7	28	35
CLP veículo + antibiótico	16	19	35
Total	23	47	70

Os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP ou sham e seis h depois receberam o tratamento com cilostazol (15 mg/kg, gavagem), veículo (óleo de amendoim, 1 ml/kg, gavagem), ou antibiótico (24.000 UI de penicilina/kg, IM). Vinte e quatro horas após a cirurgia, o número de mortes nos grupos CLP veículo + antibiótico e CLP cilostazol + antibiótico foram analisados pelo teste exato de Fisher. * $P=0,04$; #risco relativo=0,44, intervalo de confiança de 95% (0,2-0,89).

5 DISCUSSÃO

Neste trabalho demonstramos que o modelo experimental de sepse utilizado foi capaz de gerar alterações cardiovasculares e inflamatórias sistêmicas que causaram danos orgânicos verificados em marcadores plasmáticos e teciduais além de resultar em mortalidade nos animais. O tratamento com cilostazol, um inibidor de PDE3 resultou na prevenção de alguns desfechos inflamatórios, hemodinâmicos e cardiovasculares observados na sepse, destacando-se seu efeito protetor no risco de mortalidade nos animais no início da sepse quando associado a antibioticoterapia. Adicionalmente, a inibição de PDE3 aumentou os níveis plasmáticos e parcialmente os níveis teciduais de cAMP, nos permitindo pelo menos em parte, associar os benefícios observados à modulação no conteúdo intracelular de cAMP nos microdomínios de sinalização.

A sepse é uma doença que resulta de uma complexa resposta imune do hospedeiro a uma infecção. Por conta dessa complexidade, a reprodução da síndrome através de modelos experimentais em animais esbarra em muitas particularidades inerentes à doença ou ao modelo experimental utilizado. Os modelos atualmente utilizados podem ser divididos em administração de toxinas exógenas – como por exemplo o LPS, administração de patógenos viáveis ou ainda a ruptura de barreiras endógenas de proteção nos animais. Dentre os diferentes modelos, optamos por utilizar nesse estudo o CLP, que apresenta a capacidade de reproduzir parte das características clínicas da doença, como progressão da infecção, disfunção cardiovascular, inflamação e o desenvolvimento de lesão multiorgânica (Dejager *et al.*, 2011). Apesar disso, o modelo assim como os demais apresenta limitações, destacando-se a grande variabilidade observada em diferentes parâmetros analisados. Essa variabilidade pode ser oriunda da própria resposta imune observada nos animais, porém pode receber contribuição da região do ceco em que a ligadura semi-oclusiva é posicionada onde causa tamanhos distintos de necrose entre os animais, o próprio conteúdo fecal extravasado que pode variar entre os animais, ocorrência de sangramentos além da microbiota residente em cada animal (Buras, Holzmann e Sitkovsky, 2005). Além disso, diferenças observadas entre espécies no contexto de sinalização celular não invalidam, porém exigem maior atenção na tentativa de translação de benefícios farmacoterapêuticos obtidos em modelos experimentais de sepse para possíveis ensaios clínicos no futuro.

Neste estudo, utilizamos somente ratos machos, o que por um lado traz benefícios na diminuição da variabilidade biológica, porém em outro deixa de avaliar a proposta de intervenção farmacológica em ambos os sexos e isso é importante na sepse. Atualmente sabe-se que a severidade e o prognóstico da doença são mais favoráveis no sexo feminino. Os mecanismos de tais diferenças não são completamente entendidos, porém sabe-se que em machos, os níveis elevados de testosterona e DHEA medeiam a supressão imune com aumento na severidade e mortalidade na sepse. Opondo-se a isso, em fêmeas, os níveis elevados de estradiol contribuem para o aumento da sobrevivência (Shields, Wang e Cornelius, 2023). Diante desse fato e da alta variabilidade esperada no modelo de CLP, neste estudo optamos por utilizar somente animais machos, pois em decorrência da maior proteção hormonal em fêmeas, seria esperado menor gravidade e mortalidade do modelo nesse sexo, exigindo ajustes de n amostral ou intensidade no modelo para padronizar a mesma gravidade em ambos os sexos.

As disfunções orgânicas causadas pela sepse são bastante intensas e advêm de alterações em diferentes vias de sinalização. Dados da literatura demonstram que a sepse pode perturbar em diferentes pontos o processo de transdução de sinal mediado pelos nucleotídeos cíclicos, cAMP e cGMP. Tanto as vias que levam à síntese de nucleotídeos cíclicos – receptores acoplados a proteína Gs, enzimas AC e GC, quanto seus alvos de ação – PKA, PKG, canais operados por nucleotídeos cíclicos ou ainda PDEs são afetados levando a uma alteração nos níveis intracelulares desses sinalizadores dentro de seus microdomínios de sinalização (Neviere *et al.*, 2016; Thangamalai *et al.*, 2013). As enzimas PDEs são responsáveis pela inativação de nucleotídeos cíclicos, diminuindo sua difusão e ação nos microdomínios de sinalização (Kokkonen e Kass, 2017). Frente à intensa atividade enzimática das PDEs, propostas de modulação farmacológica nos níveis de nucleotídeos cíclicos são mais atraentes tendo essas enzimas como alvo (Maurice *et al.*, 2014). Entretanto, a inibição global de PDEs é um grande desafio, pois causa uma elevação acentuada dos nucleotídeos cíclicos em muitos microdomínios distintos, podendo inclusive destruir a organização de microdomínios de contenção dos nucleotídeos cíclicos, isso desencadearia a ativação de forma acentuada de vias dependentes da fosforilação de PKA e PKG. Para evitar isso e possibilitar o uso clínico da inibição de PDEs, há inibidores seletivos de famílias distintas, possibilitando uma modulação racional e restrita de nucleotídeos cíclicos (Kamel *et al.*, 2023). Dados prévios do nosso grupo

de pesquisa demonstraram que a inibição de PDE5 em um modelo experimental de sepse apresentou efeitos anti-inflamatórios e melhora na perfusão tecidual, diminuindo a ocorrência de lesão multiorgânica (Kovalski *et al.*, 2017). A PDE5 degrada exclusivamente cGMP, já no presente estudo a proposta de intervenção farmacológica foi a inibição da enzima PDE3 que apresenta atividade enzimática dual, degradando cAMP e cGMP, porém preferencialmente cAMP (Baillie, Tejeda e Kelly, 2019). O cilostazol é um inibidor seletivo de PDE3 com um bom perfil de eficácia e segurança, estando disponível para uso clínico no tratamento da doença arterial periférica. Ao aumentar os níveis de cAMP o cilostazol exibe uma ampla gama de efeitos, como inibição na agregação plaquetária, vasodilatação, aumento no trabalho cardíaco, efeitos antiproliferativos, atenuação de isquemia e reperfusão (Chancharoenthana *et al.*, 2017; Colman, 2004). Além disso, o fármaco possui muitos efeitos pleiotrópicos que vêm sendo explorados, como por exemplo os efeitos anti-inflamatórios, antioxidante e cardioprotetor (Chattipakorn *et al.*, 2014; Motta, da e Brito, de, 2016; Tawfik, El-Kherbetawy e Makary, 2018). Como a sepse é causada por uma reposta inflamatória sistêmica onde observam-se profundas alterações hemodinâmicas, metabólicas e cardiovasculares que causam lesões multiorgânicas, esses efeitos positivos da inibição de PDE3 pelo cilostazol se mostram de grande interesse e por isso foram explorados nesse estudo.

Foram avaliados diferentes parâmetros nos animais que comprovam que o modelo experimental foi capaz de reproduzir características esperadas no desenvolvimento da doença, como alterações cardiovasculares, inflamatórias, mortalidade, entre outros.

Dentre os parâmetros avaliados, observou-se que os animais sépticos apresentaram aumento no escore de gravidade da doença, avaliando-se a presença de letargia, piloereção, tremor, exsudato periorbital, desconforto respiratório e diarreia (O'Riordan *et al.*, 2020). A inibição de PDE3 pelo cilostazol não melhorou o escore de gravidade na doença e de forma curiosa, reduziu a temperatura corporal nos animais sépticos. Essa redução pode estar relacionada a um possível efeito aditivo da elevação de catecolaminas na sepse e a inibição de PDE3. Com a queda na resistência vascular periférica, o organismo libera catecolaminas na tentativa de manutenção dos parâmetros cardiovasculares na sepse. Dentre as catecolaminas, a noradrenalina atua de maneira central no centro termorregulador hipotalâmico através de receptores α -adrenérgicos reduzindo a temperatura corporal (Poole e Stephenson,

1979). Por outro lado, já se demonstrou que a inibição de isoformas de PDEs que aumentam os níveis de cAMP podem causar hipotermia em camundongos através de regulação autônoma central (McDonough *et al.*, 2020). Portanto, há a possibilidade de estarmos diante de um efeito sinérgico entre aumento de catecolaminas e inibição de PDE3 com aumento de cAMP que convergem no controle central gerando hipotermia. O impacto dessa mudança de temperatura é incerto, pois foram observados tanto casos de hipotermia quanto de hipertermia nos animais sépticos, porém vale ressaltar que variações drásticas na temperatura são preditores de mortalidade, inclusive um estudo de meta-análise demonstrou que a mortalidade é mais alta em pacientes com quadros de hipotermia (Rumbus *et al.*, 2017).

O desenvolvimento da disfunção cardiovascular na sepse é comum e bastante grave, sendo a hipotensão arterial a característica mais comum na doença. Os principais contribuintes na fisiopatologia da hipotensão arterial são os quadros de hipovolemia, tônus vascular reduzido e depressão miocárdica, a qual pode ser severa e está associada com decréscimos globais nas frações de ejeção ventricular esquerda e direita (Antonucci *et al.*, 2014). Nos animais se observou a queda na pressão arterial, o que estimula vias que tentam compensar essas alterações. Tanto a redução no tônus vascular, quanto a própria presença de microrganismos ou produtos microbianos como as endotoxinas durante a infecção, ou ainda a ativação de vias pró-inflamatórias levam ao aumento na liberação de catecolaminas. Por sua vez, as catecolaminas exercem efeitos anti-inflamatórios por inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a liberação de citocinas anti-inflamatórias (Kharrat e Jain, 2022). O efeito das catecolaminas no sistema cardiovascular ocorre através da ligação em receptores β -adrenérgicos cardíacos e receptores α_1 -adrenérgicos vasculares.

No coração, as catecolaminas ao ligarem-se em receptores β -adrenérgicos exercem efeito cronotrópico positivo (aumento na frequência cardíaca), inotrópico (aumento na força de contração) e lusotrópico (aumento na taxa de relaxamento). Isso ocorre por ativação de receptores β -adrenérgicos acoplados a proteína Gs, levando ao aumento de cAMP, aumento na ativação de PKA e na fosforilação de proteínas que participam do complexo excitação-contração dos cardiomiócitos, também conhecidas como proteínas de mobilização de Ca^{2+} , incluindo canais para Ca^{2+} do tipo L (LTCC, do inglês *L-type Ca²⁺ channels*) no plasmalema, fosfolambana (PLB, do inglês *phospholamban*) e receptores de rianodina (RyR, do inglês *ryanodine*

receptors) no retículo sarcoplasmático; além de proteína C de ligação à miosina (MyBP-C, do inglês *myosin binding protein C*) nos miofilamentos (Bers, 2002; Eisner *et al.*, 2017). Já a ligação de catecolaminas a receptores α_1 -adrenérgicos, presentes em miócitos vasculares leva a ativação de proteína Gq e aumento de atividade de fosfolipase C que ao quebrar fosfolipídeos de membrana aumenta os níveis de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3). Por fim o DAG ativa PKC, aumentando a fosforilação de canais para cálcio e o IP3 atua sobre seu receptor no retículo endoplasmático aumentando a liberação de cálcio e gerando a resposta vasoconstritora nos vasos (Timmermans, Chiu e Thoolen, 1987). A inibição de PDE3 não alterou a hipertensão arterial na sepse, porém no coração, provavelmente por permitir uma maior difusão do cAMP no interior de seu microdomínio de sinalização potencializou a via receptor β -adrenérgico/cAMP/PKA cardíaca gerando maior fosforilação de proteínas-alvos e tendo um efeito aditivo no aumento da frequência cardíaca nos animais sépticos. Esse aumento na frequência cardíaca pode ter causado uma sobrecarga ao órgão, justificando o surgimento de danos histológicos relacionados a degeneração hialina que será discutida a frente.

Apesar das catecolaminas elevarem a frequência cardíaca nos animais, houve falha em elevar a pressão arterial. A hiporreatividade vascular na sepse e choque séptico é comum e resulta de diferentes fatores, como vasodilatação excessiva e redução no tônus vascular, perda de volume intravascular e depressão miocárdica (Antonucci *et al.*, 2014; Qureshi e Rajah, 2008). Além disso, na sepse há a dessensibilização e destruição de receptores GPCR que são responsáveis pela resposta vasoconstritora periférica, como os receptores adrenérgicos, os receptores V1 de vasopressina e receptores de angiotensina tipo 1 (AT1). A dessensibilização ocorre exatamente pelo excesso de estimulação desses receptores por seus ligantes durante a sepse, o que leva ao aumento na fosforilação desses receptores pela família de cinases de GPCR (GRKs, do inglês *G-protein-coupled receptors kinases*) (Levy *et al.*, 2018). Além dessas alterações globais nos parâmetros cardiovasculares, atualmente está claro que as disfunções microvasculares são determinantes no desenvolvimento da disfunção multiorgânica e mortalidade na sepse (Backer, De *et al.*, 2014). Para avaliarmos como estava a microcirculação e perfusão tecidual na sepse nós avaliamos através de laser dopler o fluxo sanguíneo renal e muscular.

O rim é um órgão fundamental para gerenciar mudanças no equilíbrio de fluídos e tem sua função prejudicada durante a sepse por conta de reposição volêmica,

prejuízo na função cardíaca, aumento na permeabilidade vascular e perda na integridade endotelial. Além disso, na sepse a lesão renal é comum e pode ocorrer tanto por mudanças na perfusão tecidual quanto por lesão tubular direta causada por diferentes mediadores pró-inflamatórios, levando à incapacidade do rim em realizar autorregulação (Fage *et al.*, 2023). De fato, nos animais observou-se redução no fluxo sanguíneo renal que corrobora ao desenvolvimento de lesões no tecido. A inibição de PDE3 preveniu parte dessa redução, o que pode ter representado uma melhora microcirculatória nas regiões de córtex e medula renal que são altamente acometidas na sepse em decorrência da liberação local excessiva de NO, citocinas e outros mediadores pró-inflamatórios, que são filtrados no glomérulo e causam lesões tubulares nos rins (Bezemer *et al.*, 2005; Zarbock, Gomez e Kellum, 2014). Provando que na sepse a lesão multiorgânica é distinta de um órgão a outro, não foi observado alteração no fluxo sanguíneo muscular. Entretanto, observou um prejuízo na resposta de hiperemia reativa pós-oclusiva (HRPO) nos animais sépticos, onde a inibição de PDE3 melhorou em partes essas alterações. A resposta de HRPO resulta de um protocolo estático de oclusão por *cuff* que cria temporariamente uma isquemia, permitindo a análise da resposta de HRPO após a liberação do *cuff* e restabelecimento do fluxo sanguíneo. Diversos mediadores vasodiladores como o ADP, ATP, prostaglandinas, NO e outros sinalizadores derivados do endotélio contribuem para a resposta final de HRPO (Clifford e Hellsten, 2004; Messina, Weiner e Kaley, 1977; Wunsch *et al.*, 2000). Assim sendo, esses dados nos mostram que reatividade vascular no músculo está comprometida nos animais sépticos e isso é muito relevante dado a proporção de massa muscular no nosso organismo e o fato dessas mudanças poderem colaborar para o desenvolvimento de lesões musculares. De fato, o tecido muscular e adiposo são os que mais exibem alterações histológicas em sobreviventes de sepse, onde se observam alterações semelhantes a caquexia com intensa perda de tecido muscular e adiposo, resultando em desfechos negativos que prejudicam a qualidade de vida de pacientes sobreviventes, diminuindo a capacidade locomotora, causando disfunção respiratória e alterando o metabolismo sistêmico (Callahan e Supinski, 2009; Goossens *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2018).

A hiporreatividade vascular foi avaliada *in vivo* e *ex vivo* em banho de órgão isolado utilizando anéis de aorta torácica. Como esperado, os animais sépticos apresentaram hiporreatividade vascular com prejuízo na resposta contrátil para o agonista seletivo de receptor α_1 -adrenérgico – fenilefrina - e agonista não seletivo de

receptor AT1 – angiotensina II, além disso, observou-se um prejuízo na resposta cronotrópica positiva cardíaca para o simpatomimético isoprenalina. A inibição de PDE3 demonstra pouco efeito na resposta vasoconstritora *in vivo* para fenilefrina, entretanto melhorou de forma mais clara a resposta vasoconstritora para angiotensina II, além de preservar a resposta cardíaca para isoprenalina. Apesar de não explorarmos por quais mecanismos isso pode ter ocorrido, é possível que a inibição de PDE3 tenha alterado o conteúdo intracelular de Ca^{2+} tornando esse sinalizador mais disponível após os estímulos farmacológicos. Há ainda a possibilidade de que o tratamento ao aumentar os níveis locais de cAMP possa ter modulado o processo dessensibilização desses receptores comumente observada na sepse. Além disso, o nível local aumentado de cAMP pode ter prevenido em parte a propagação do insulto inflamatório, reduzindo assim o comprometimento desses receptores. De fato, há evidências na literatura de que o tratamento com dexametasona ao inibir a atividade de NF- κ B atenua o insulto inflamatório, diminui a liberação de citocinas pró-inflamatórias e evita a redução na densidade de receptores α_1 -adrenérgicos em camundongos submetidos ao modelo de CLP (Schmidt *et al.*, 2009).

Esses mesmos mecanismos podem estar por trás da melhora na reatividade vascular *ex vivo* observada também na resposta vasoconstritora para fenilefrina. Apesar desses dados animadores, vale lembrar que o parâmetro global de pressão arterial permaneceu reduzido nos animais sépticos tratados com cilostazol, demonstrando que o prejuízo cardiovascular estava marcadamente presente nesses animais.

Durante a resposta inflamatória que ocorre na sepse há a participação de diferentes mediadores, com destaque para o NO que atua de maneira central na resposta contra o microrganismo invasor, na modulação do tônus vascular e que em excesso contribui na disfunção cardiovascular, tendo um papel crítico nas alterações cardiovasculares e hemodinâmicas observadas na sepse (Winkler *et al.*, 2017). Em nosso estudo observamos o aumento plasmático dos metabólitos do NO (NOx) e a inibição de PDE3 reduziu de forma não significativa esses níveis. A redução ainda que parcial pode ter ocorrido por uma menor produção de NO pelas isoformas de NOS, como por exemplo NOS2 ou ainda por aumento na excreção renal desses metabólitos. Tendo em vista que a inibição de PDE3 preservou o fluxo sanguíneo renal durante a sepse, pressupõe-se que a filtração renal também apresentou melhora facilitando assim a eliminação dos metabólitos relacionados.

Foram avaliados diferentes parâmetros bioquímicos de danos teciduais, onde se observou aumento das transaminases AST e ALT que comumente estão elevados em pacientes sépticos, sendo AST expressa em diferentes tecidos – músculo esquelético, coração, fígado, pulmões, entre outros e ALT atua como um bom marcador de dano hepático por ser expressa principalmente nesse tecido (Lescot *et al.*, 2012). Outros parâmetros não apresentaram aumento nos animais sépticos, como CK expressa em tecidos musculares em geral, ureia e creatinina que são marcadores de filtração e dano renal. Entretanto, os níveis de ácido úrico elevaram-se na sepse, podendo ser um resultado conjunto de maior produção desse metabólito através da morte e destruição celular, estresse oxidativo, metabolismo de purinas como a adenosina e um déficit na depuração, onde 2/3 ocorre nos rins e o restante ocorre por eliminação hepática. De qualquer forma, os níveis elevados de ácido úrico podem estar associados ao desenvolvimento precoce de insuficiência renal aguda e lesão pulmonar, por isso estudos sugerem o seu uso como um marcador precoce de gravidade da doença (Akbar *et al.*, 2015).

Os níveis de lactato também se elevaram na sepse, sendo esse um marcador muito importante de má perfusão tecidual e prejuízos no metabolismo energético celular, e por isso é utilizado na prática clínica como critério diagnóstico de quadros de choque séptico quando os pacientes apresentam níveis plasmáticos maiores que 2 mmol/L, auxiliando assim no diagnóstico precoce da doença. Os níveis de lactato circulantes são indicadores importantes da severidade de sepse e choque séptico e estudos recentes indicam importante função regulatória do lactato nas respostas imune e inflamatória, através de modificações pós-translacionais relacionadas a lactação de diferentes alvos moleculares (Nolt *et al.*, 2018). Além disso, é importante ressaltar que a acidose láctica embora comumente esteja relacionada a um déficit de perfusão e hipóxia tecidual, pode ser oriunda também de uma resposta adaptativa ao metabolismo alterado pela doença ou ainda por conta da abordagem terapêutica ao paciente, onde utiliza-se a reposição volêmica e administração de drogas vasoativas (Suetrong e Walley, 2016). A inibição de PDE3 preveniu a elevação dos níveis de lactato podendo ser em decorrência de melhora na perfusão tecidual, possibilitando uma melhora na troca de oxigênio e nutrientes nos tecidos, ou ainda por maior eficiência na eliminação hepática e renal desse metabólito. De qualquer forma, a redução nos níveis de lactato se correlaciona inversamente à severidade na doença. Um estudo demonstrou inclusive que níveis de lactato acima de 2 mmol/L por um

período de vinte e quatro horas se correlacionam mais fortemente a mortalidade do que níveis de PAM inferiores a 65 mmHg pelo mesmo período (Houwink *et al.*, 2016).

Durante a resposta imune exacerbada na sepse, ocorre intensa ativação plaquetária, levando a coagulação intravascular disseminada (CID), onde observa-se exaustão de agentes anticoagulantes, supressão da fibrinólise e aumento no sequestro esplênico de plaquetas. Se por um lado a ativação plaquetária colabora na contenção da progressão da infecção, o surgimento de CID causa diversos danos vasculares e teciduais, e nos casos graves de sepse, aproximadamente 35% dos pacientes exibem complicações da CID (Levi, 2018). A incidência de CID é maior em fases tardias da doença e se correlacionam diretamente ao desenvolvimento do choque séptico e disfunção orgânica, aumentando o risco de mortalidade pela sepse (Gando *et al.*, 2013). Apesar do cilostazol clinicamente diminuir a ativação plaquetária ao promover o aumento do cAMP nesses fragmentos celulares, não se observou prevenção na queda do número de plaquetas, o que pode sugerir que o insulto inflamatório e a ativação plaquetária na sepse é muito intensa frente a esse mecanismo de ação do inibidor de PDE3. Nos animais sépticos observou-se o aumento na contagem de eritrócitos e no hematócrito que podem ser justificados pela junção de diferentes frentes, como a ocorrência de uma resposta adaptativa do organismo em melhorar o transporte de oxigênio e mobilizar para isso reservas esplênicas de hemácias ou pelo aumento do extravasamento vascular e ocorrência de hipovolemia, levando ao desenvolvimento de hemoconcentração, que também pode causar lesões multiorgânicas na sepse (Patel *et al.*, 2010). De forma positiva, a inibição de PDE3 preveniu esses achados, o que pode representar uma ação benéfica contra o aumento da permeabilidade vascular e na melhora de perfusão tecidual nos animais sépticos.

Os níveis glicêmicos se alteram na sepse, em decorrência de respostas hormonais para as catecolaminas ou cortisol, além das mudanças inflamatórias observadas na doença. Comumente os pacientes apresentam quadros de hiperglicemia, resultado do aumento na síntese hepática de glicose e redução na utilização de glicose em tecidos periféricos. Porém, os pacientes podem também apresentar hipoglicemia, decorrente de uma deficiência hepática na síntese de glicose e perturbações metabólicas sistêmicas (Plummer e Deane, 2016). Nos animais sépticos se observou uma redução da glicose sanguínea e a inibição de PDE3 não preveniu essa queda, sendo esse aspecto importante, pois desequilíbrios na glicemia

na sepse são graves e associados ao risco de mortalidade. Além disso, a enzima PDE3B é expressa em ilhotas pancreáticas e regula a exocitose do hormônio insulina e a inibição de PDE3 não gerou um decréscimo adicional da glicose sanguínea que poderia ter graves consequências nesses animais (Walz *et al.*, 2007).

Durante a resposta inflamatória na sepse ocorrem alterações tanto no número quanto na função dos leucócitos. No início da infecção há o aumento do número de leucócitos, principalmente neutrófilos para o combate ao microrganismo invasor no foco primário de infecção e na bacteremia secundária. Como a bacteremia é transitória na sepse, com o passar do tempo, ocorre migração desses patógenos aos órgãos e tecidos, levando a migração de leucócitos principalmente de neutrófilos para esses focos secundários de infecção, agravando a resposta inflamatória tecidual e favorecendo a disfunção multiorgânica. Com a progressão da doença, pode ocorrer a redução na contagem de leucócitos, incluindo linhagens granulocítica e linfocítica, instaurando a imunossupressão tardia comumente observada na sepse, levando a maior susceptibilidade a complicações e novas infecções no paciente. Estima-se que aproximadamente 60% dos pacientes sobreviventes de sepse apresentam re-hospitalizações no primeiro ano pós a sepse por conta de novas infecções e em torno de 15% dos pacientes morrem ainda no primeiro ano pós-sepse por conta da imunossupressão tardia (Mira *et al.*, 2017; Shankar-Hari *et al.*, 2016, 2019).

Nos animais sépticos foi observado aumento na contagem de granulócitos e monócitos e diminuição na contagem de linfócitos. Esse perfil de modulação era esperado pela origem da infecção polimicrobiana no modelo de CLP. Porém um fato interessante foi que a inibição de PDE3 preveniu a queda na contagem de linfócitos. Esse efeito é muito importante, pois estudos sugerem uma associação inversa entre a queda no número de linfócitos e aumento da mortalidade observada na sepse (Hotchkiss, Monneret e Payen, 2013a).

Para avaliarmos a extensão dos danos inflamatórios aos tecidos, selecionamos tecidos-alvos em termos da importância para os desfechos analisados no estudo e a gravidade de seu acometimento na sepse. De uma forma geral, o tecido pulmonar apresentou maior extensão de danos quando comparado aos tecidos do coração e rim. Também foi nesse tecido que a inibição de PDE3 reverteu mais intensamente os danos observados. Os danos histológicos encontrados se relacionam ao aumento da permeabilidade vascular no pulmão, espessamento de septos alveolares e migração de neutrófilos ao tecido. A inibição de PDE3 ao reduzir a formação de edema pulmonar

pode estar agindo por mecanismos de estabilização endotelial promovido pelo aumento nos níveis locais de cAMP. Um estudo demonstrou que o uso de inibidor de PDE4 que também aumenta os níveis de cAMP foi capaz de reduzir a permeabilidade vascular em um modelo de endotoxemia induzida por LPS em ratos (Schick *et al.*, 2012).

A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular que ocorre na inflamação durante a sepse são causados por diferentes mediadores, como histamina, TNF- α , interleucinas, NO, que causam vasodilatação e desestabilizam as junções endoteliais levando ao aumento da permeabilidade vascular. Demonstrou-se no pulmão de camundongos através de modelo de endotoxemia que o TNF- α induz a degradação do glicocálice microvascular, envolvendo a perda de heparan sulfato e ativação de heparanase endotelial e que a degradação do glicocálice aumenta a exposição de moléculas de adesão na superfície endotelial contribuindo para a migração e adesão de neutrófilos (Schmidt *et al.*, 2012). A migração de neutrófilos e proteínas para o espaço extravascular, favorecendo o edema tecidual está associado a maior gravidade na sepse, pois prejudica a perfusão tecidual e troca de nutrientes em regiões de microcirculação. Especialmente no pulmão essas alterações podem gerar a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Hu, Hao e Tang, 2020). Os neutrófilos são células leucocitárias muito importantes, pois através da liberação de enzimas proteolíticas e espécies reativas conseguem destruir patógenos, porém na sepse, a intensa infiltração de neutrófilos nos tecidos contribui para o desenvolvimento da disfunção multiorgânica (Brown *et al.*, 2006; Kolaczowska e Kubes, 2013). De forma curiosa, não foram observadas muitas alterações relacionadas ao sistema enzimático de combate ao estresse oxidativo no tecido pulmonar, ocorrendo somente alteração de superóxido dismutase em fases iniciais da doença. Isso pode remeter ao contexto de que apesar de muitos desfechos terem apresentado alterações na sepse, o sistema enzimático de detoxificação de espécies oxidantes nesses animais se mostrou preservado.

No tecido cardíaco também se observou alterações relacionadas ao aumento da permeabilidade vascular e migração de neutrófilos. Além disso, foram observadas alterações histológicas relacionadas a ocorrência degeneração hialina, onde a hipercontração cardíaca pelo aumento de catecolaminas é a responsável pela geração de tais danos (Berridge *et al.*, 2016). Os animais que receberam o inibidor de PDE3 exibiram maiores extensões nesses danos e nossa hipótese é que após a

queda da pressão arterial e diante do insulto infeccioso, o organismo desses animais aumentou a liberação de catecolaminas que atuam sobre receptores β -adrenérgicos cardíacos aumentando a frequência cardíaca como um mecanismo de regulação para compensar a queda na pressão arterial. Porém, esse aumento na frequência e força de contração cardíaca teve um custo nesses animais, com indício de lesões no tecido e deposição de material hialino. O dano mais acentuado nos animais sépticos que receberam o inibidor de PDE3 tem ligação com a potencialização da via de sinalização receptor β -adrenérgico/cAMP/PKA, aumentando ainda mais o trabalho cardíaco na sepse, sobrecarregando o órgão em um momento em que há um comprometimento metabólico no coração. Essa alteração cardíaca observada se relaciona ao início de lesão tecidual, não se observando ainda sinais de formação de tecido fibroso cicatricial no coração, alterações essas que levariam um período maior para a sua visualização. Portanto, esses indícios de lesão cardíaca preocupam, porém ainda não se concretizaram em lesões irreversíveis ao tecido, porém o estímulo contínuo causado pelas catecolaminas endógenas ou exógenas através de drogas vasoativas não cessam tão precocemente nos pacientes sépticos, sendo esse o principal estímulo de geração do dano cardíaco.

Já no tecido renal, apesar da análise histológica não apresentar alterações, o tecido apresentou aumento na permeabilidade vascular, migração de neutrófilos e alteração em defesas antioxidantes enzimáticas, além de apresentar de forma momentânea dano relacionado a peroxidação lipídica. O dano renal na sepse é comum e bastante grave e recebe contribuição da vasoconstrição excessiva no leito renal que se opõe à hiporreatividade sistêmica, isso causa uma diminuição no fluxo sanguíneo que se soma à lesão tubular direta causada pelos mediadores inflamatórios liberados na sepse (Boffa e Arendshorst, 2005). Essas alterações no tecido podem ser um indicativo do início da lesão renal aguda (LRA) na sepse e vale ressaltar que o fluxo sanguíneo renal estava reduzido nos animais sépticos, corroborando para o desenvolvimento de tais lesões que são complicações graves da sepse e que podem levar à falência renal. A inibição de PDE3 por ter promovido um aumento no fluxo sanguíneo renal trouxe um ganho muito importante ao tecido, uma vez que facilita o funcionamento do órgão, melhorando a eliminação de mediadores inflamatórios e metabólitos deletérios como o lactato e ácido úrico e previne o desenvolvimento da lesão renal irreversível.

Na sepse diferentes vias de transmissão de sinalização estão comprometidas levando aos diferentes desfechos observados na doença. Nesse contexto, perturbações tanto na síntese, difusão e confinamento em microdomínios restritos de sinalização ocorrem com os nucleotídeos cíclicos. Para avaliar a repercussão de mudanças na sinalização mediada pelos nucleotídeos cíclicos nós determinamos os níveis plasmáticos e teciduais de cAMP e cGMP. Vale lembrar que os níveis desses sinalizadores resultam da síntese através das enzimas AC e GC, e degradação pelas enzimas PDEs, responsáveis pelo rompimento da ligação fosfodiéster levando a inativação desses segundo-mensageiros intracelulares, controlando assim a magnitude da difusão livre de cAMP e cGMP no interior das células, mantendo-os restritos a microdomínios distintos, garantindo a especificidade da sinalização celular (Anton *et al.*, 2022; Kokkonen e Kass, 2017). Não observamos alterações no nível plasmático de cAMP por conta da sepse, entretanto, a inibição de PDE3 aumentou os níveis circulantes desse sinalizador no início da doença e o efeito desapareceu mais tardiamente provavelmente pela $\frac{1}{2}$ vida de eliminação do fármaco. Já os níveis de cGMP apresentaram-se reduzidos nos períodos analisados demonstrando que a via de sinalização NO/GC/cGMP/PKG está bastante comprometida na sepse e a inibição de PDE3 não alterou os níveis de cGMP. Esses dados corroboram estudos da literatura que demonstram que a isoforma de PDE3 apesar de apresentar uma atividade dual apresenta maior atividade catalítica e controle sobre os níveis de cAMP do que sobre cGMP (Revisado em Kamel *et al.*, 2023). Os níveis plasmáticos embora muito importantes, representam o resultante de mudanças nos níveis desses sinalizadores em diferentes compartimentos, órgãos e tecidos, por isso, realizamos também a quantificação dos níveis de cAMP e cGMP em tecidos-chave dentro dos desfechos analisados no estudo.

Quando comparamos os níveis teciduais de nucleotídeos cíclicos, percebemos que os níveis de cAMP são aproximadamente dez vezes maiores do que cGMP nos homogenatos teciduais. Além disso, de forma não esperada, não observamos alterações nos níveis de cAMP e cGMP no tecido pulmonar, um tecido em que a inibição de PDE3 melhorou diferentes parâmetros. Também não foram observadas alterações nos níveis de cAMP na aorta e músculo tibial, apresentando redução somente no tecido cardíaco. A diminuição de cAMP no tecido cardíaco pode ter relação com o fenômeno de dessensibilização de receptores β -adrenérgicos, diminuição no conteúdo e atividade de AC levando a uma redução na síntese de

cAMP, ou ainda, podem ter ocorrido mudanças na atividade ou disposição de PDEs dentro dos microdomínios de sinalização cardíaca, levando a uma maior razão de degradação de cAMP, como ocorre em doenças como a insuficiência cardíaca (Kamel *et al.*, 2023; Neviere *et al.*, 2016; Thangamalai *et al.*, 2013). Fortalecendo a hipótese de que mudanças na atividade enzimática possam ter ocorrido no tecido, os animais sépticos que receberam o inibidor de PDE3 não apresentaram redução de cAMP. Apesar dos níveis de cAMP não reduzirem no músculo, a inibição de PDE3 aumentou os níveis desse sinalizador nesse tecido. Isso corrobora dados clínicos que demonstram que o cilostazol melhora o fluxo sanguíneo na doença arterial periférica principalmente em membros inferiores, mecanismo esse relacionado ao aumento de cAMP em células musculares lisas, células endoteliais, inibindo assim agregação plaquetária, dilatando os vasos e melhorando o fluxo sanguíneo (Revisado em (Zheng *et al.*, 2019). Esse dado também auxilia na interpretação da melhora na RHPO nos animais sépticos que receberam o inibidor de PDE3. Já os níveis de cGMP apresentaram redução somente no tecido cardíaco e a inibição de PDE3 não alterou esses níveis. Um ponto importante sobre essas determinações teciduais é que elas resultam de homogenatos teciduais e, portanto, a ausência de mudanças nos níveis globais desses sinalizadores não refuta a hipótese de que em microdomínios específicos e restritos esses níveis não possam estar alterados, pois pequenas mudanças nesses domínios que podem inclusive não serem detectadas no método de quantificação utilizado podem ser determinantes na mediação de alguns desfechos analisados.

Como a intervenção farmacológica nesse estudo foi a inibição de PDE3, nós avaliamos o conteúdo proteico da isoforma PDE3A que é a isoforma mais amplamente expressa nos tecidos cardiovasculares e de interesse nesse estudo. Ainda, avaliamos se o grau de ativação da enzima através de fosforilação no aminoácido Ser312 estaria sendo modulado ao longo da sepse. Os resultados nos mostraram que os níveis proteicos totais e a porção fosforilada de PDE3 não se alteram na doença. Esse fato não nos causou tanta surpresa, pois as PDEs são enzimas bastante conservadas e estudos na literatura não mostram de forma clara qual o nível de alteração proteica em estados patológicos, existindo desde não alteração, diminuição ou ainda aumento na expressão de PDEs em modelos experimentais de insuficiência cardíaca (Ding *et al.*, 2005; Dodge *et al.*, 2001; Nagendran *et al.*, 2007; Nikolaev *et al.*, 2010; Sato *et al.*, 1999). Porém, normalmente nesses modelos experimentais há maior período no

desenvolvimento de tais alterações, o que nos leva a acreditar que em períodos mais curtos como no caso do presente estudo, esse tipo de alteração é pouco provável de ocorrer. Porém, o nível de fosforilação dessa proteína pode contribuir para mudanças tanto no perfil de atividade enzimática quanto promover mudanças no aprisionamento dessas enzimas em microdomínios de sinalização. Entretanto, para nossa surpresa, o nível de fosforilação no aminoácido Ser312 que pode ser modulada tanto por PKA e PKC não mostrou diferenças (Hunter, MacKintosh e Hers, 2009). Isso nos leva a pensar que mudanças sutis no nível de fosforilação e ativação dessa proteína não é o maior determinante para a sua atividade catalítica sobre cAMP e cGMP na sepse e que ela pode ter um nível de ativação bastante elevado o que justifica sua alta atividade catalítica sobre esses nucleotídeos cíclicos em condições tanto fisiológicas quanto patológicas. Assim, acreditamos que mudanças na composição dos microdomínios de sinalização possam ser mais importantes para a atividade catalítica, uma vez que as PDEs se associam fisicamente a diferentes parceiros de sinalização, entre eles algumas proteínas que se apresentam alteradas na sepse, podendo levar ao fenômeno de descompartimentalização de sinalização como é observado em outras doenças como na insuficiência cardíaca (Sprenger *et al.*, 2015). Se essa premissa for verdadeira e estiver ocorrendo no contexto avaliado nesse estudo, a difusão das moléculas de cAMP e cGMP está alterada no interior das células. Com isso, não há mais o correto direcionamento desses sinalizadores aos seus alvos moleculares o que pode ter consequências drásticas nas sinalizações celulares. Isso implica que após estimulados, diferentes receptores podem não apresentar respostas fisiológicas adequadas, podendo existir desde uma ineficiente até exagerada sinalização celular após os estímulos por diferentes ligantes, contribuindo para o desenvolvimento da disfunção multiorgânica na sepse.

Diante da importância da disfunção cardiovascular na sepse e do fato da ampla expressão de PDE3 no tecido nós avaliamos no coração a imunomarcagem para diferentes proteínas, dentre elas PDE3A total e sua fração fosforilada. Pudemos observar que o perfil de expressão é amplo por todas as células de miócito cardíaco e vascular e não observamos mudanças no perfil e localização da imunomarcagem nos animais sépticos. Entretanto, esse resultado não refuta a hipótese de que possa existir uma descompartimentalização de PDE3 na sepse. Para responder de forma definitiva se houve ou não tal mudança, experimentos como os ensaios utilizando canais operados por nucleotídeos cíclicos e biossensores de transferência de energia

de ressonância por fluorescência (FRET, do inglês *fluorescent resonance energy transfer*), possibilitando analisar a dinâmica na síntese e difusão dos nucleotídeos cíclicos nos microdomínios de sinalização, possibilitaria analisar a disposição de PDE3 e seus parceiros de sinalização que podem estar alterados no coração (Feil *et al.*, 2021; Ghigo e Mika, 2019; Zaccolo, Zerio e Lobo, 2021).

As imunomarcações demonstraram também que não houve alteração conteúdo de NOS3 responsável pela síntese constitutiva de NO por células endoteliais, que desempenha um papel fisiológico essencial, regulando o fluxo sanguíneo coronariano e o desempenho cardíaco de forma parácrina e autócrina (Gödecke *et al.*, 1998; Massion e Balligand, 2003). Esse dado corrobora a normalidade histológica observada em ramos coronarianos no coração. Somado a isso, há na literatura evidências de que apesar de ocorrerem mudanças na perfusão no tecido, as coronárias se mostram preservadas, demonstrando que o problema não é essencialmente ligado a essa rede vascular, apontando para a importância de outros parâmetros como a inflamação e distúrbios metabólicos no tecido cardíaco (Poveda-Jaramillo, 2021). Já a imunomarcação para NOS2 mostrou que na sepse houve o aumento no conteúdo proteico dessa enzima no coração. Isso provavelmente ocorreu pois essa isoforma de NOS é regulada positivamente durante a sepse por conta do aumento na síntese de citocinas pró-inflamatórias e desempenha um papel importante na síntese de forma excessiva e contínua da molécula de NO, que no coração exerce um efeito depressor sobre a função miocárdica (Assreuy, 2006). A redução no conteúdo de NOS2 nos cardiomiócitos resultante da inibição de PDE3 corrobora dados da literatura que demonstram efeitos anti-inflamatórios do cilostazol relacionados a inibição na ativação de NFκB que leva ao aumento na transcrição de citocinas pró-inflamatórias (Motta, da e Brito, de, 2016).

Há evidências na literatura de que o cilostazol apresenta no coração a capacidade de inibir de PDE3 e a captação de adenosina, sendo esse segundo mecanismo também importante na modulação dos níveis de cAMP no tecido após o uso do fármaco (Liu *et al.*, 2001). A sinalização de adenosina no coração mostrou-se alterada na sepse. Provavelmente a elevação dos níveis de adenosina locais podem justificar as mudanças que foram observadas de aumento no conteúdo do receptor A_{2A} acoplado a proteína Gs levando ao aumento dos níveis de cAMP após sua estimulação. Além disso, estudos demonstram que a ligação da adenosina em receptores A_{2A} aumenta a síntese de citocinas anti-inflamatórias e modula a atividade

de neutrófilos e macrófagos, podendo contribuir na redução da inflamação excessiva tecidual (Haskó *et al.*, 2008; Haskó e Cronstein, 2013). O aumento na adenosina local pode ser a responsável pela queda no conteúdo do transportador ENT1, que se relaciona a mecanismos adaptativos que contribui para o aumento da sinalização de adenosina no tecido, modulando assim a resposta inflamatória local. O cilostazol atua provavelmente inibindo esse transportador ao promover o aumento dos níveis de adenosina e a sua presença impediu a queda no conteúdo nesse transportador nos animais sépticos. A nossa hipótese é de que o cilostazol pode ter diminuído o dano inflamatório no tecido cardíaco e isso ter modulado os níveis locais de adenosina e mantendo inalterado o conteúdo proteico desse transportador em cardiomiócitos. Apoiando essa ideia, há evidências na literatura de que a utilização do cilostazol está associada a efeitos anti-apoptóticos, anti-inflamatórios, antioxidantes e cardioprotetores (Chattipakorn *et al.*, 2014; Motta, da e Brito, de, 2016; Tawfik, El-Kherbetawy e Makary, 2018). Estudos demonstram que os níveis extracelulares de adenosina aumentam durante insultos inflamatórios ou situações de hipóxia tecidual (Eltzschig *et al.*, 2003; Synnestvedt *et al.*, 2002). Apesar da sepse ser causada por uma resposta imune desregulada e apresentar má perfusão em alguns leitos vasculares, ao determinarmos os níveis plasmáticos de adenosina não encontramos diferenças na sepse. Isso pode ter ocorrido pelo tempo analisado, que correspondeu a uma fase inicial da doença, pois um estudo utilizando modelo de CLP em camundongos demonstrou que os níveis de adenosina estão elevados em fases tardias em animais sobreviventes de quadros de sepse, exercendo um papel de imunossupressão (Nascimento *et al.*, 2021).

Diante da gravidade da doença, um dos desfechos mais importantes avaliados nesse estudo é a sobrevida observada nos animais. De forma geral, a sepse causou alta taxa de mortalidade nos animais e o tratamento com uma associação de antibióticos de amplo espectro foi efetiva em prevenir essa mortalidade. A inibição de PDE3 de forma isolada se mostrou ineficaz em prevenir a mortalidade. Isso nos mostra que apesar de o tratamento melhorar alguns parâmetros ao longo do estudo, a complexidade da doença exige provavelmente uma associação farmacológica como um suporte mais efetivo. Entretanto, quando analisamos o efeito da associação da inibição de PDE3 ao antibiótico observamos que de forma precoce o tratamento diminui o risco de morte nos animais. Esse resultado é essencial pois demonstra que o uso de inibidor de PDE3 no início da doença quando associado a outras terapias de

suporte pode melhorar alguns parâmetros inflamatórios, danos teciduais e mais importante, prevenir a mortalidade pela doença que ainda permanece elevada ao redor do mundo. Na clínica os pacientes sépticos comumente recebem terapia de suporte composta por antimicrobianos, ressuscitação fluídica, ventilação mecânica e suporte pressórico com a administração de vasopressores e nesse estudo essas ferramentas não foram adotadas, sendo essa uma importante limitação. Além disso, a adoção conjunta de tais medidas poderia inclusive tornar mais evidentes os benefícios da inibição de PDE3 na sepse.

Apesar de alguns resultados promissores na inibição de PDE3, um aspecto muito importante envolvendo essa e outras isoformas de PDEs são as diferenças na expressão entre espécies. Essas enzimas são expressas em todos os mamíferos, porém com diferenças importantes na expressão de cada isoforma, formando microdomínios de sinalização distintos entre as espécies. Por exemplo no coração de humanos, a atividade total de hidrólise de cAMP é cinco vezes maior do que em roedores, por conta da ampla expressão de PDE3 e outras isoformas, enquanto a PDE4 apresenta menor contribuição, sendo esse cenário oposto nos roedores, tendo a PDE4 uma participação de destaque na hidrólise de cAMP cardíaco. Além disso, quando a PDE4 é inibida em roedores, ocorre o aumento na fosforilação de diversas proteínas-alvo no miócito cardíaco, porém isso não ocorre em humanos com a inibição de PDE4 (Richter *et al.*, 2011; Vinogradova e Lakatta, 2021). Isso não invalida os resultados obtidos nesse trabalho, somente destaca a importância de avaliarmos as diferenças entre espécies durante a extrapolação de conclusões.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os animais submetidos ao modelo experimental de sepse apresentaram disfunções cardiovasculares, hemodinâmicas e inflamatórias de forma sistêmica, causando lesões orgânicas em diferentes tecidos. Os níveis proteicos totais e fração fosforilada de PDE3A permaneceram inalterados na sepse, já os níveis dos nucleotídeos cíclicos apresentaram durante a progressão da doença.

A inibição de PDE3 nos animais sépticos aumentou o trabalho cardíaco, o fluxo sanguíneo renal, melhorou parcialmente a resposta de hiperemia reativa pós-oclusiva e a reatividade vascular. Além disso, o tratamento preveniu a elevação de lactato, do hematócrito e a queda do número de linfócitos, e preveniu a mortalidade precoce na sepse quando associado a antibioticoterapia. No tecido cardíaco, apesar da inibição de PDE3 ter indícios de melhora na resposta inflamatória tecidual, observou-se danos histológicos relacionados a sobrecarga no trabalho cardíaco. Quando analisado o impacto da inibição de PDE3 nos níveis de nucleotídeos cíclicos em animais sépticos, observou-se que o tratamento aumentou principalmente os níveis plasmáticos de cAMP. Já nos tecidos, o aumento não foi observado em todos os órgãos analisados.

Estudos assim como esse em que se avaliam diferentes desfechos, tecidos e sistemas orgânicos são importantes na proposta de intervenção terapêutica na sepse, pois evidenciam a complexidade da doença e que principalmente a ocorrência de benefícios em um tecido e ausência em outro, ou ainda a aumento de danos decorrentes da intervenção terapêutica podem ser melhor representados na junção de diferentes análises e principalmente na ocorrência de mortalidade.

Os resultados parciais de melhora em alguns parâmetros analisados nos permitem postular que o principal efeito da inibição de PDE3 no início da doença é prevenir a progressão da sepse para quadros choque séptico, pois o tratamento melhora em partes a hiporreatividade e impede a elevação do lactato. Entretanto, vale ressaltar que ainda não há um tratamento farmacológico exclusivo para sepse e suas disfunções multiorgânicas, e por conta da complexidade da doença, o tratamento mais provável será através da associação de diferentes ferramentas farmacológicas em uma rede de suporte, possibilitando a exploração de benefícios como o encontrado da inibição de PDE3. Com base nos resultados, observamos em alguns contextos que a inibição de PDE3 aumenta os níveis de cAMP, podendo ser esse o principal

mecanismo por detrás dos benefícios observados nos animais sépticos. Além disso, ressaltamos que de acordo com evidências na literatura, a ausência de mudanças globais nos níveis de nucleotídeos cíclicos e da enzima PDE3 podem não representar as mudanças importantes nos microdomínios de sinalização que comumente ocorrem durante a sepse.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. *et al.* Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. **Critical care medicine**, v. 28, n. 1, p. 232–235, 2000.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.

AHMAD, F. *et al.* Regulation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 2 (SERCA2) activity by phosphodiesterase 3A (PDE3A) in human myocardium: Phosphorylation-dependent interaction of PDE3A1 with SERCA2. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 11, p. 6763–6776, 13 mar. 2015.

AKBAR, S. R. *et al.* Hyperuricemia: An early marker for severity of illness in sepsis. **International Journal of Nephrology**, v. 2015, 2015.

ANGUS, D. C. *et al.* Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Critical care medicine**, v. 29, n. 7, p. 1303–1310, 2001.

ANGUS, D. C.; POLL, T. VAN DER. Severe Sepsis and Septic Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840–851, 29 ago. 2013.

ANTON, S. E. *et al.* Receptor-associated independent cAMP nanodomains mediate spatiotemporal specificity of GPCR signaling. **Cell**, v. 185, n. 7, p. 1130–1142.e11, 31 mar. 2022.

ANTONUCCI, E. *et al.* Myocardial depression in sepsis: From pathogenesis to clinical manifestations and treatment. **Journal of Critical Care**, v. 29, n. 4, p. 500–511, 2014.

APPLETON, J. P. *et al.* Effects of isosorbide mononitrate and/or cilostazol on hematological markers, platelet function, and hemodynamics in patients with lacunar ischaemic stroke: Safety data from the Lacunar Intervention-1 (LACI-1) trial. **Frontiers in Neurology**, v. 10, n. JUL, 2019.

ARORA, K. *et al.* Compartmentalization of cyclic nucleotide signaling: A question of when, where, and why? **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 465, n. 10, p. 1397–1407, out. 2013.

ASHMAN, D. F. *et al.* Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine 3', 5'-monophosphate from rat urine. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 11, n. 4, p. 330–334, 1963.

ASSREUY, J. Nitric Oxide and Cardiovascular Dysfunction in Sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets**, v. 6, p. 165–173, 2006.

BACKER, D. DE *et al.* Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 73–79, 2014.

BAILLIE, G. S.; TEJEDA, G. S.; KELLY, M. P. Therapeutic targeting of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterases: inhibition and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 18, n. 10, p. 770–796, 1 out. 2019.

BECA, S. *et al.* Phosphodiesterase type 3A regulates basal myocardial contractility through interacting with sarcoplasmic reticulum calcium atpase type 2a Signaling complexes in mouse heart. **Circulation Research**, v. 112, n. 2, p. 289–297, 18 jan. 2013.

BECK, M. A. *et al.* Selenium deficiency increases the pathology of an influenza virus infection. **The FASEB Journal**, v. 15, n. 8, p. 1481–1483, jun. 2001.

BERRIDGE, B. R. *et al.* Non-proliferative and proliferative lesions of the cardiovascular system of the rat and mouse. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 3, p. 1S-47S, 2016.

BERS, D. M. Cardiac excitation–contraction coupling. **Nature**, v. 415, n. 6868, p. 198–205, 2002.

BEZEMER, R. *et al.* Recent advances in the pathophysiology of ischemic acute renal failure. **J. Physiol. Renal Physiol**, v. 365, n. 9457, p. 2199–2210, 2005.

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

BÖHM, M. *et al.* Increase of Myocardial Inhibitory G-Proteins in Catecholamine-Refractory Septic Shock or in Septic Multiorgan Failure. **The American journal of medicine**, v. 98, n. 2, p. 183–186, 1995.

BONE, R. C. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644–1655, 1992.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRAMER, S. L.; FORBES, W. P.; MALLIKAARJUN, S. Cilostazol Pharmacokinetics after Single and Multiple Oral Doses in Healthy Males and Patients

with Intermittent Claudication Resulting from Peripheral Arterial Disease. **Clinical pharmacokinetics**, v. 37, n. 2, p. 1–11, 1999.

BROWN, K. A. *et al.* Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. **The Lancet**, v. 368, n. 9530, p. 157–169, 2006.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Model organisms: Animal models of sepsis: Setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 854–865, out. 2005.

CALLAHAN, L. A.; SUPINSKI, G. S. Sepsis-induced myopathy. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 10, p. S354, 2009.

CECCONI, M. *et al.* Sepsis and septic shock. **The Lancet**, v. 392, n. 10141, p. 75–87, 7 jul. 2018.

CHANCHAROENTHANA, W. *et al.* Cilostazol attenuates intimal hyperplasia in a mouse model of chronic kidney disease. **PLoS ONE**, v. 12, n. 12, p. e0187872, 1 dez. 2017.

CHATTIPAKORN, S. C. *et al.* Phosphodiesterase-3 inhibitor (cilostazol) attenuates oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction in the heart. **Journal of Geriatric Cardiology**, v. 11, n. 2, p. 151–157, 2014.

CHUNG, Y. W. *et al.* Targeted disruption of PDE3B, but not PDE3A, protects murine heart from ischemia/reperfusion injury. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 17, p. E2253–E2262, 28 abr. 2015.

CLIFFORD, P. S.; HELLSTEN, Y. Vasodilatory mechanisms in contracting skeletal muscle. **Journal of applied physiology**, v. 97, n. 1, p. 393–403, 2004.

COLMAN, R. W. Platelet cyclic adenosine monophosphate phosphodiesterases: targets for regulating platelet-related thrombosis. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 30, n. 4, p. 451–460, 2004.

DEJAGER, L. *et al.* Cecal ligation and puncture: The gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, abr. 2011.

DILLARD, J. *et al.* Nitric oxide activates AMPK by modulating PDE3A in human pulmonary artery smooth muscle cells. **Physiological Reports**, v. 8, n. 17, p. e14559, 1 set. 2020.

DING, B. *et al.* A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 102, n. 41, p. 14771–14776, 2005.

DODGE, K. L. *et al.* mAKAP assembles a protein kinase A/PDE4 phosphodiesterase cAMP signaling module. **The EMBO journal**, v. 20, n. 8, p. 1921–1930, 2001.

EISNER, D. A. *et al.* Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. **Circulation Research**, v. 121, n. 2, p. 181–195, 7 jul. 2017.

ELTZSCHIG, H. K. *et al.* Coordinated adenine nucleotide phosphohydrolysis and nucleoside signaling in posthypoxic endothelium: Role of ectonucleotidases and adenosine A_{2B} receptors. **Journal of Experimental Medicine**, v. 198, n. 5, p. 783–796, 1 set. 2003.

FAGE, N. *et al.* Norepinephrine and Vasopressin in Hemorrhagic Shock: A Focus on Renal Hemodynamics. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 4, 1 fev. 2023.

FAUL, F. *et al.* G* Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior research methods**, v. 39, n. 2, p. 175–191, 2007.

FEIL, R. *et al.* Visualising and understanding cGMP signals in the cardiovascular system. **British Journal of Pharmacology**, v. 179, n. 11, p. 2394–2412, 2021.

FERNANDES, D. *et al.* Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Molecular Pharmacology**, v. 69, n. 3, p. 983–990, mar. 2006.

FINK, M. P.; SHAW WARREN, H. Strategies to improve drug development for sepsis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 10, p. 741–758, 1 jan. 2014.

FRANCIS, S. H.; BLOUNT, M. A.; CORBIN, J. D. Mammalian Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Molecular Mechanisms and Physiological Functions. **Physiological reviews**, v. 91, n. 2, p. 651–690, 2011.

FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and Septic Shock: A History. **Critical Care Clinics**, v. 25, n. 1, p. 83–101, jan. 2009.

GANDO, S. *et al.* A randomized, controlled, multicenter trial of the effects of antithrombin on disseminated intravascular coagulation in patients with sepsis. **Critical care**, v. 17, p. 1–10, 2013.

GERHARD-HERMAN, M. D. *et al.* 2016 AHA/ACC guideline on the management of patients with lower extremity peripheral artery disease: Executive Summary: A report of the American college of cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines. **Circulation**, v. 135, n. 12, p. e686–e725, 2017.

GHIGO, A.; MIKA, D. cAMP/PKA signaling compartmentalization in cardiomyocytes: Lessons from FRET-based biosensors. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 131, p. 112–121, 1 jun. 2019.

GHONEIM, R. H.; PIQUETTE-MILLER, M. Endotoxin-mediated downregulation of hepatic drug transporters in HIV-1 transgenic rats. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, n. 5, p. 709–719, 1 maio 2016.

GÖDECKE, A. *et al.* Coronary hemodynamics in endothelial NO synthase knockout mice. **Circulation research**, v. 82, n. 2, p. 186–194, 1998.

GOOSSENS, C. *et al.* Adipose tissue protects against sepsis-induced muscle weakness in mice: From lipolysis to ketones. **Critical Care**, v. 23, n. 1, 1 jul. 2019.

GOTOH, F. *et al.* Cilostazol stroke prevention study: A placebo-controlled double-blind trial for secondary prevention of cerebral infarction. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 9, n. 4, p. 147–157, 2000.

HAMBLETON, R. *et al.* Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3 and their contribution to cAMP hydrolytic activity in subcellular fractions of human myocardium. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 47, p. 39168–39174, 25 nov. 2005.

HASHIMOTO, A. *et al.* Activation of endothelial nitric oxide synthase by cilostazol via a cAMP/protein kinase A- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent mechanism. **Atherosclerosis**, v. 189, n. 2, p. 350–357, dez. 2006.

HASKÓ, G. *et al.* Adenosine receptors: Therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 9, p. 759–770, 2008.

HASKÓ, G.; CRONSTEIN, B. Regulation of inflammation by adenosine. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 85, 2013.

HAVENON, A. DE *et al.* Cilostazol for Secondary Stroke Prevention: History, Evidence, Limitations, and Possibilities. **Stroke**, p. E635–E645, 2021.

HAYASHI, S.-I. *et al.* Cyclic AMP Inhibited Proliferation of Human Aortic Vascular Smooth Muscle Cells, Accompanied by Induction of p53 and p21. **Hypertension**, v. 35, n. 1, p. 237–243, 2000.

HIRATSUKA, M. *et al.* Characterization of human cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of cilostazol. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 35, n. 10, p. 1730–1732, out. 2007.

HONORE, P. M. *et al.* Prevention and treatment of sepsis-induced acute kidney injury: an update. **Annals of Intensive Care**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 1 dez. 2015.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Immunosuppression in sepsis: A novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 3, p. 260–268, mar. 2013a.

____. Sepsis-induced immunosuppression: From cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862–874, dez. 2013b.

HOUWINK, A. P. I. *et al.* The association between lactate, mean arterial pressure, central venous oxygen saturation and peripheral temperature and mortality in severe sepsis: A retrospective cohort analysis. **Critical Care**, v. 20, n. 1, 12 mar. 2016.

HU, Q.; HAO, C.; TANG, S. From sepsis to acute respiratory distress syndrome (ARDS): Emerging preventive strategies based on molecular and genetic researches. **Bioscience Reports**, v. 40, n. 5, 1 maio 2020.

HUBBARD, W. J. *et al.* Cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 24, n. SUPPL. 1, p. 52–57, dez. 2005.

HUNTER, R. W.; MACKINTOSH, C.; HERS, I. Protein kinase C-mediated phosphorylation and activation of PDE3A regulate cAMP levels in human platelets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 18, p. 12339–12348, 1 maio 2009.

ISHII, K. J. *et al.* Host Innate Immune Receptors and Beyond: Making Sense of Microbial Infections. **Cell Host and Microbe**, v. 3, n. 6, p. 352–363, 12 jun. 2008.

KAMEL, R. *et al.* Cyclic nucleotide phosphodiesterases as therapeutic targets in cardiac hypertrophy and heart failure. **Nature Reviews Cardiology**, v. 20, n. 2, p. 90–108, 1 fev. 2023.

KHARRAT, A.; JAIN, A. Hemodynamic dysfunction in neonatal sepsis. **Pediatric Research**, v. 91, n. 2, p. 413–424, 1 jan. 2022.

KILKENNY, C. *et al.* Improving bioscience research reporting: The arrive guidelines for reporting animal research. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, p. e1000412, jun. 2010.

KOKKONEN, K.; KASS, D. A. Nanodomain Regulation of Cardiac Cyclic Nucleotide Signaling by Phosphodiesterases. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 57, p. 455–479, 6 jan. 2017.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, mar. 2013.

KOVALSKI, V. *et al.* Protective role of cGMP in early sepsis. **European Journal of Pharmacology**, v. 807, p. 174–181, 2017.

KRITZER, M. D. *et al.* AKAPs: The architectural underpinnings of local cAMP signaling. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 351–358, fev. 2012.

KRZYZANOWSKA, AGI *et al.* Evaluation of Evans Blue extravasation as a measure of peripheral inflammation. **Protocol Exchange**, 15 dez. 2010.

KWON, B.-J. *et al.* A Randomized Comparison Study Assessing the Impact of Cilostazol on the Heart Rate and Arrhythmias by 24-Hour Ambulatory Holter Electrocardiographic Monitoring after Drug-Eluting Stent Implantation for Coronary Artery Disease. **Journal of Atherosclerosis and Thrombosis**, v. 22, n. 2, p. 152–164, 2015.

LANGLEY, R. J. *et al.* Sepsis: An integrated clinico-metabolomic model improves prediction of death in sepsis. **Science Translational Medicine**, v. 5, n. 195, 24 jul. 2013.

LAWRENCE, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 1, n. 6, 2009.

LEAL, S. *et al.* Immunohistochemical characterization of adenosine receptors in rat aorta and tail arteries. **Microscopy Research and Technique**, v. 71, n. 10, p. 703–709, out. 2008.

LEE, L. C. Y.; MAURICE, D. H.; BAILLIE, G. S. Targeting protein-protein interactions within the cyclic AMP signaling system as a therapeutic strategy for cardiovascular disease. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 4, p. 451–464, mar. 2013.

LEE, Y. *et al.* Muscle Mass Depletion Associated with Poor Outcome of Sepsis in the Emergency Department. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 72, n. 4, p. 336–344, 1 maio 2018.

LELIGDOWICZ, A. *et al.* Association between source of infection and hospital mortality in patients who have septic shock. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 189, n. 10, p. 1204–1213, 15 maio 2014.

LELUBRE, C.; VINCENT, J. L. Mechanisms and treatment of organ failure in sepsis. **Nature Reviews Nephrology**, v. 14, n. 7, p. 417–427, 1 jul. 2018.

LESCOT, T. *et al.* Acquired liver injury in the intensive care unit. **The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 117, n. 4, p. 898–904, 2012.

LEVI, M. Pathogenesis and diagnosis of disseminated intravascular coagulation. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 40, p. 15–20, 1 maio 2018.

LEVY, B. *et al.* Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: From bench to bedside. **Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 12, p. 2019–2029, 2010.

LEVY, B. *et al.* Vasoplegia treatments: The past, the present, and the future. **Critical Care**, v. 22, n. 1, 27 fev. 2018.

LEVY, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical Care Medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250–1256, 1 abr. 2003.

LIU, Y. *et al.* Cilostazol (Pletal®): A dual inhibitor of cyclic nucleotide phosphodiesterase type 3 and adenosine uptake. **Cardiovascular Drug Reviews**, v. 19, n. 4, p. 369–386, 2001.

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, 1 nov. 2017.

MACHADO, F. R. *et al.* Sepsis in Brazilian emergency departments: a prospective multicenter observational study. **Internal and Emergency Medicine**, p. 1–13, 2023.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the Superoxide Anion Radical in the Autoxidation of Pyrogallol and a Convenient Assay for Superoxide Dismutase. **European Journal of Biochemistry**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MARSHALL, J. C. Such stuff as dreams are made on: Mediator-directed therapy in sepsis. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 5, p. 391–405, maio 2003.

____. Why have clinical trials in sepsis failed? **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 4, p. 195–203, 2014.

MASSION, P. B.; BALLIGAND, J. L. Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): Lessons from genetically modified mice. **Journal of Physiology**, v. 546, n. 1, p. 63–75, 1 jan. 2003.

MAURICE, D. H. *et al.* Advances in targeting cyclic nucleotide phosphodiesterases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 4, p. 290–314, 2014.

MCDONOUGH, W. *et al.* Inhibition of type 4 cAMP-phosphodiesterases (PDE4s) in mice induces hypothermia via effects on behavioral and central autonomous thermoregulation. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, 1 out. 2020.

MESSINA, E. J.; WEINER, R.; KALEY, G. Arteriolar reactive hyperemia: modification by inhibitors of prostaglandin synthesis. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 232, n. 6, p. H571–H575, 1977.

MIRA, J. C. *et al.* Sepsis pathophysiology, chronic critical illness, and persistent inflammation-immunosuppression and catabolism syndrome. **Critical Care Medicine**, v. 45, n. 2, p. 253–262, 1 fev. 2017.

MOK, G. *et al.* Macrocirculatory and Microcirculatory Endpoints in Sepsis Resuscitation. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 36, n. 12, p. 1385–1391, 1 dez. 2021.

MOTTA, N. A. V. *et al.* Could cilostazol be beneficial in COVID-19 treatment? Thinking about phosphodiesterase-3 as a therapeutic target. **International Immunopharmacology**, v. 92, 1 mar. 2021.

MOTTA, N. A. V. DA; BRITO, F. C. F. DE. Cilostazol exerts antiplatelet and anti-inflammatory effects through AMPK activation and NF-κB inhibition on hypercholesterolemic rats. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 327–337, 1 ago. 2016.

MOVSESIAN, M. Novel approaches to targeting PDE3 in cardiovascular disease. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 163, p. 74–81, 1 jul. 2016.

MOVSESIAN, M.; AHMAD, F.; HIRSCH, E. Functions of PDE3 isoforms in cardiac muscle. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 5, n. 1, 1 mar. 2018.

MUSTAPHA, O. *et al.* Comparison of three different types of cilostazol-loaded solid dispersion: Physicochemical characterization and pharmacokinetics in rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 154, p. 89–95, 1 jun. 2017.

NAGENDRAN, J. *et al.* Phosphodiesterase type 5 is highly expressed in the hypertrophied human right ventricle, and acute inhibition of phosphodiesterase type 5 improves contractility. **Circulation**, v. 116, n. 3, p. 238–248, 2007.

NAIR, A.; JACOB, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. **Journal of Basic and Clinical Pharmacy**, v. 7, n. 2, p. 27, 2016.

NASCIMENTO, D. C. *et al.* Sepsis expands a CD39+ plasmablast population that promotes immunosuppression via adenosine-mediated inhibition of macrophage antimicrobial activity. **Immunity**, v. 54, n. 9, p. 2024- 2041.e8, 14 set. 2021.

NEIRA, R. A. Q.; HAMACHER, S.; JAPIASSU, A. M. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, 1 abr. 2018.

NEVIERE, R. *et al.* Abnormal mitochondrial cAMP/PKA signaling is involved in sepsis-induced mitochondrial and myocardial dysfunction. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, 10 dez. 2016.

NIKOLAEV, V. O. *et al.* β 2-adrenergic receptor redistribution in heart failure changes cAMP compartmentation. **Science**, v. 327, n. 5973, p. 1650–1653, 26 mar. 2010.

NOLT, B. *et al.* Lactate and Immunosuppression in Sepsis. **Shock**, v. 49, n. 2, p. 120–125, 1 fev. 2018.

O'BRIEN, J. M. *et al.* Sepsis. **American Journal of Medicine**, v. 120, n. 12, p. 1012–1022, dez. 2007.

OLIVEIRA, D. T.; SOUZA-SILVA, E.; TONUSSI, C. R. Technical report: Gingival vein puncture: a new simple technique for drug administration or blood sampling in rats and mice. **Scandinavian Journal of Laboratory Animal Sciences**, v. 36, n. 2, p. 109–113, 2009.

O'RIORDAN, C. E. *et al.* X-Linked Immunodeficient Mice With No Functional Bruton's Tyrosine Kinase Are Protected From Sepsis-Induced Multiple Organ Failure. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 581758, 7 out. 2020.

PAGE, D. B.; DONNELLY, J. P.; WANG, H. E. Community-, Healthcare-, and Hospital-Acquired Severe Sepsis Hospitalizations in the University HealthSystem Consortium. **Critical Care Medicine**, v. 43, n. 9, p. 1945–1951, 1 set. 2015.

PANCHAL, H. B. *et al.* Comparison of on-treatment platelet reactivity between triple antiplatelet therapy with cilostazol and standard dual antiplatelet therapy in patients undergoing coronary interventions: A meta-analysis. **Journal of**

Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics, v. 18, n. 6, p. 533–543, nov. 2013.

PARK, W. S. *et al.* Cilostazol protects mice against endotoxin shock and attenuates LPS-induced cytokine expression in RAW 264.7 macrophages via MAPK inhibition and NF- κ B inactivation: Not involved in cAMP mechanisms. **International Immunopharmacology**, v. 10, n. 9, p. 1077–1085, set. 2010.

PATEL, K. N. *et al.* Polymicrobial sepsis and endotoxemia promote microvascular thrombosis via distinct mechanisms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 8, n. 6, p. 1403–1409, jun. 2010.

PLUMMER, M. P.; DEANE, A. M. Dysglycemia and Glucose Control During Sepsis. **Clinics in Chest Medicine**, v. 37, n. 2, p. 309–319, 1 jun. 2016.

POLL, T. VAN DER *et al.* The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 7, p. 407–420, 1 jul. 2017.

POLL, T. VAN DER *et al.* The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 7, p. 407–420, 1 jul. 2017.

POOL, R.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Mechanisms of Organ Dysfunction in Sepsis. **Critical Care Clinics**, v. 34, n. 1, p. 63–80, 1 jan. 2018.

POOLE, S.; STEPHENSON, J. D. Effects of noradrenaline and carbachol on temperature regulation of rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 43–51, 1979.

POVEDA-JARAMILLO, R. Heart Dysfunction in Sepsis. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 35, n. 1, p. 298–309, 1 jan. 2021.

QURESHI, K.; RAJAH, A. Septic Shock: A Review Article. **British Journal of Medical Practitioners**, v. 1, n. 2, 2008.

RADU, M.; CHERNOFF, J. An in vivo assay to test blood vessel permeability. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 73, p. e50062, 2013.

REINHART, K. *et al.* Recognizing Sepsis as a Global Health Priority — A WHO Resolution. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, p. 414–417, 3 ago. 2017.

RICHTER, W. *et al.* Conserved expression and functions of PDE4 in rodent and human heart. **Basic Research in Cardiology**, v. 106, n. 2, p. 249–262, mar. 2011.

RUDD, K. E. *et al.* Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, 18 jan. 2020.

RUMBUS, Z. *et al.* Fever is associated with reduced, hypothermia with increased mortality in septic patients: A meta-analysis of clinical trials. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, 1 jan. 2017.

RUMIENCZYK, I. *et al.* Multi-organ transcriptome dynamics in a mouse model of cecal ligation and puncture-induced polymicrobial sepsis. **Journal of Inflammation Research**, v. 14, p. 2377–2388, 2021.

SAKAI, M. *et al.* Diminished responsiveness to dobutamine as an inotrope in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis: Attribution to phosphodiesterase 4 upregulation. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 312, n. 6, p. H1224–H1237, 9 jun. 2017.

SAKAMOTO, T. *et al.* Anti-inflammatory properties of cilostazol: Its interruption of DNA binding activity of NF- κ B from the Toll-like receptor signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 62, p. 120–131, 1 set. 2018.

SAKULA, A. Henry Hyde Salter (1823-71): a biographical sketch. **Thorax**, v. 40, n. 12, p. 887–888, 1985.

SALOMAO, R. *et al.* Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. **Shock**, v. 38, n. 3, p. 227–242, ago. 2012.

SATO, N. *et al.* Mechanisms of desensitization to a PDE inhibitor (milrinone) in conscious dogs with heart failure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 276, n. 5, p. H1699–H1705, 1999.

SCHICK, M. A. *et al.* Phosphodiesterase-4 inhibition as a therapeutic approach to treat capillary leakage in systemic inflammation. **Journal of Physiology**, v. 590, n. 11, p. 2693–2708, jun. 2012.

SCHIERWAGEN, C.; BYLUND-FELLENIS, A.; LUNDBERG, C. Improved Method for Quantification of Tissue PMN Accumulation Measured by Myeloperoxidase Activity. **Journal of pharmacological methods**, v. 23, n. 3, p. 179–186, 1990.

SCHLEGEL, N. *et al.* Lipopolysaccharide-induced endothelial barrier breakdown is cyclic adenosine monophosphate dependent in vivo and in vitro. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 5, p. 1735–1743, 2009.

SCHLEGEL, N.; WASCHKE, J. Impaired cAMP and Rac 1 signaling contribute to TNF- α -induced endothelial barrier breakdown in microvascular endothelium. **Microcirculation**, v. 16, n. 6, p. 521–533, 2009.

SCHMIDT, C. *et al.* Inhibition of NF- κ B activity prevents downregulation of α 1-adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis. **Shock**, v. 32, n. 3, p. 239–246, set. 2009.

SCHMIDT, E. P. *et al.* The pulmonary endothelial glycocalyx regulates neutrophil adhesion and lung injury during experimental sepsis. **Nature Medicine**, v. 18, n. 8, p. 1217–1223, ago. 2012.

SCHNEIDER, E. H.; SEIFERT, R. Inactivation of non-canonical cyclic nucleotides: Hydrolysis and transport. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 238, p. 169–205, 2017.

SHANKAR-HARI, M. *et al.* Evidence for a causal link between sepsis and long-term mortality: A systematic review of epidemiologic studies. **Critical Care**, v. 20, n. 1, 13 abr. 2016.

_____. Risk factors at index hospitalization associated with longer-term mortality in adult sepsis survivors. **JAMA Network Open**, v. 2, n. 5, 1 maio 2019.

SHIELDS, C. A.; WANG, X.; CORNELIUS, D. C. Sex differences in cardiovascular response to sepsis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 324, n. 2, p. C458–C466, 2023.

SILVA-SANTOS, J. E.; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 290, n. 1, p. 380–387, jul. 1999.

SINGER, M. *et al.* The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 23 fev. 2016.

SMITH, P. K. *et al.* Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical biochemistry**, v. 150, n. 1, p. 76–85, 1985.

SORDI, R. *et al.* Early potassium channel blockade improves sepsis-induced organ damage and cardiovascular dysfunction. **British Journal of Pharmacology**, v. 163, n. 6, p. 1289–1301, jul. 2011.

SOUZA-SILVA, E. *et al.* Detection of blood flow perfusion and post - occlusive reactive hyperemia in the skeletal muscle of rats. **Life Sciences**, v. 278, 1 ago. 2021.

SPRENGER, J. U. *et al.* In vivo model with targeted cAMP biosensor reveals changes in receptor-microdomain communication in cardiac disease. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 6965, 28 abr. 2015.

SUETRONG, B.; WALLEY, K. R. Lactic acidosis in sepsis: It's Not All anaerobic: Implications for diagnosis and management. **Chest**, v. 149, n. 1, p. 252–261, 1 jan. 2016.

SUN, B. *et al.* New Mechanism of Action for Cilostazol: Interplay Between Adenosine and Cilostazol in Inhibiting Platelet Activation. **Journal of cardiovascular pharmacology**, v. 40, n. 4, p. 577–585, 2002.

____. Role of phosphodiesterase type 3A and 3B in regulating platelet and cardiac function using subtype-selective knockout mice. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 8, p. 1765–1771, ago. 2007.

SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. **The Journal of biological chemistry**, v. 232, n. 2, p. 1077–1091, jun. 1958.

SYNNESTVEDT, K. *et al.* Ecto-5'-nucleotidase (CD73) regulation by hypoxia-inducible factor-1 mediates permeability changes in intestinal epithelia. **Journal of Clinical Investigation**, v. 110, n. 7, p. 993–1002, 1 out. 2002.

TAWFIK, M. K.; EL-KHERBETAWY, M. K.; MAKARY, S. Cardioprotective and Anti-Aggregatory Effects of Levosimendan on Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in High-Fat-Fed Rats Involves Modulation of PI3K/Akt/mTOR Signaling Pathway and Inhibition of Apoptosis: Comparison to Cilostazol. **Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics**, v. 23, n. 5, p. 456–471, 1 set. 2018.

THAKUR, S. *et al.* Inactivation of adenosine A_{2A} receptor attenuates basal and angiotensin II-induced ROS production by Nox2 in endothelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 51, p. 40104–40113, 17 dez. 2010.

THANGAMALAI, R. *et al.* Atorvastatin prevents sepsis-induced downregulation of myocardial β_1 -adrenoceptors and decreased cAMP response in mice. **Shock**, v. 41, n. 5, p. 406–412, 2013.

TIMMERMANS, P. B.; CHIU, A. T.; THOOLEN, M. J. Calcium handling in vasoconstriction to stimulation of α_1 - and α_2 -adrenoceptors. **Canadian journal of physiology and pharmacology**, v. 65, n. 8, p. 1649–1657, 1987.

TSAI, C. S. *et al.* Cilostazol attenuates MCP-1 and MMP-9 expression in vivo in LPS-administrated balloon-injured rabbit aorta and in vitro in LPS-treated monocytic THP-1 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 103, n. 1, p. 54–66, 1 jan. 2008.

UCHIYAMA, S. *et al.* Cilostazol for prevention of secondary stroke (CSPS 2): an aspirin-controlled, double-blind, randomised non-inferiority trial. **The Lancet Neurology**, v. 9, p. 959–968, 2010.

VINCENT, J.-L. *et al.* International Study of the Prevalence and Outcomes of Infection in Intensive Care Units. **Jama**, v. 302, n. 21, p. 2323–2329, 2009.

VINCENT, J.-L.; BACKER, D. DE. Circulatory Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 18, p. 1726–1734, 31 out. 2013.

VINOGRADOVA, T. M.; LAKATTA, E. G. Dual activation of phosphodiesterase 3 and 4 regulates basal cardiac pacemaker function and beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 16, 2 ago. 2021.

WALZ, H. A. *et al.* β -cell PDE3B regulates Ca^{2+} -stimulated exocytosis of insulin. **Cellular Signalling**, v. 19, n. 7, p. 1505–1513, jul. 2007.

WECHSLER, J. *et al.* Isoforms of cyclic nucleotide phosphodiesterase PDE3A in cardiac myocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 41, p. 38072–38078, 11 out. 2002.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and Septic Shock-A Review of Laboratory Models and a Proposal. **JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH**, v. 29, p. 189–201, 1980.

WINKLER, M. S. *et al.* Markers of nitric oxide are associated with sepsis severity: An observational study. **Critical Care**, v. 21, n. 1, 15 jul. 2017.

WUNSCH, S. A. *et al.* Time course of vasodilatory responses in skeletal muscle arterioles: role in hyperemia at onset of exercise. 2000.

YOSHIKAWA, M. *et al.* Effects of phosphodiesterase inhibitors on cytokine production by microglia. **Multiple Sclerosis Journal**, v. 5, n. 2, p. 126–133, 1999.

YOSHIKAWA, M. *et al.* Effect of phosphodiesterase inhibitors on nitric oxide production by glial cells. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**, v. 196, n. 3, p. 167–177, 2002.

ZACCOLO, M.; ZERIO, A.; LOBO, M. J. Subcellular organization of the camp signaling pathway. **Pharmacological Reviews**, v. 73, n. 1, p. 278–309, 1 jan. 2021.

ZARBOCK, A.; GOMEZ, H.; KELLUM, J. A. Sepsis-induced acute kidney injury revisited: Pathophysiology, prevention and future therapies. **Current Opinion in Critical Care**, v. 20, n. 6, p. 588–595, 2014.

ZEMSKOV, E. A. *et al.* Nitration of protein kinase G-1 α modulates cyclic nucleotide crosstalk via phosphodiesterase 3A: Implications for acute lung injury. **Journal of Biological Chemistry**, v. 297, n. 2, 1 ago. 2021.

ZHENG, H. *et al.* Progress in the Mechanism and Clinical Application of Cilostazol. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 31, p. 2919–2936, 25 nov. 2019.