

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE ARARAQUARA

Luiz Alves Rodrigues

**INFLUÊNCIA DA ENDOTOXINA DE *E. coli*, NωNLA E DEXAMETASONA  
SOBRE A RESPONSIVIDADE VASCULAR À ANGIOTENSINA II.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Análises Clínicas para obtenção  
do título de Doutor em Análises Clínicas, área de  
concentração: Análises Clínicas.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Teresa Pepato

Araraquara – 2006

Autor; Luiz Alves Rodrigues

Título: "INFLUÊNCIA DA ENDOTOXINA DE E. coli, NωNLA E  
DEXAMETASONA SOBRE A RESPONSABILIDADE VASCULAR  
À ANGIOTENSINA II".

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Análises Clínicas para obtenção  
do título de Doutor em Análises Clínicas, área de  
concentração: Análises Clínicas.

**Banca Examinadora**

Prof. (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof. (a) Dr. (a) \_\_\_\_\_

Instituição \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

*À DEUS, em primeiro lugar pela saúde Física e Espiritual por ele concedidas durante o período de desenvolvimento deste Trabalho !!!!*

*Ao Prof. Dr. José Francisco Fracasso, pela valiosa, segura e imprescindível Orientação no desenvolvimento deste trabalho !*

*À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Iracilda Zepone Carlos, pela colaboração !*

*Aos Profs. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Cleopatra da Silva Planeta e especialmente à Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Maria do Carmo Longo do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, pela amizade e colaboração !*

*Às Técnicas de apoio acadêmico do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia Elizabete Zocal Paro Lepera e Rosana Finoti Pupim Silva, pela valiosíssima assessoria técnica no desenvolvimento dos protocolos experimentais e acessoria informática !*

*À Técnica de apoio acadêmico Marisa Campos Polesi Placeres do Laboratório de Imunologia do Departamento de Análises Clínicas, pelo apoio técnico num protocolo experimental !*

*À todos os Pós-graduandos e Estagiários do Laboratório de Farmacologia do Departamento de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia, que direta ou indiretamente colaboraram, em especial ao Doutorando Fábio Cardoso Cruz pela valiosa assistência informática !*

*Às funcionárias Cláudia Lúcia Molina, Laura Rosim, Sonia Ornelas e Maria do Carmo Molina, da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, pela amizade, presteza e colaboração com que sempre nos atenderam !*

*À Tirene Pavanelli pela valiosa assessoria informática !*

*À minha Família, pela paciência, compreensão e apoio dedicados durante todo o transcorrer deste Trabalho !*

*À todos,*

*Muito Obrigado !!!!*

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>A</b> .....	angiotensinogênio
<b>Adx</b> .....	adrenalectomizado
<b>AI</b> .....	angiotensina I
<b>AI</b> .....	angiotensina II
<b>Car</b> .....	carragenina
<b>Dexa</b> .....	dexametasona
<b>DXS</b> .....	sulfato de dextran
<b>Diclo</b> .....	diclofenaco
<b>ECA</b> .....	enzima conversora de angiotensina
<b>Etx</b> .....	endotoxina de <i>Escherichia coli</i>
<b>E. coli</b> .....	<i>Escherichia coli</i>
<b>e.v.</b> .....	endovenosa
<b>IL</b> .....	interleucina
<b>i.p.</b> .....	intraperitoneal
<b>i.pl</b> .....	intra plantar
<b>Kg</b> .....	kilograma
<b>mg</b> .....	miligrama
<b>ml</b> .....	mililitro
<b>mm</b> .....	milímetro
<b>mmHg</b> .....	milímetro de mercúrio
<b>Nime</b> .....	nimesulide
<b>NO</b> .....	óxido nítrico
<b>Nor</b> .....	noradrenalina
<b>NOS</b> .....	óxido nítrico sintase
<b>N<math>\omega</math>NLA</b> .....	N $\omega$ -metil L-Arginina
<b>PAF</b> .....	fator de agregação plaquetária
<b>P.A</b> .....	puro para análise
<b>PAM</b> .....	pressão arterial média
<b><math>\mu</math>g</b> .....	micrograma

**sal**.....salina (solução fisiológica, NaCl 0,15M)

**TNF**.....fator de necrose tumoral

## LISTA DE FIGURAS

- Figuras
- 1- Gráfico modelo representativo da PAM
  - 2- Gráfico da PAM em ratos controle
  - 3- Gráfico da PAM em ratos tratados com dextran
  - 4- Gráfico da PAM em ratos Adx
  - 5- Gráfico da PAM em ratos falso-operados
  - 6- Gráfico da PAM em ratos pré-tratados com Dexa
  - 7- Gráfico da PAM em ratos Adx pré-tratados com Dexa
  - 8- Gráfico da PAM em ratos pré-tratados com Diclo
  - 9- Gráfico da PAM em ratos pré-tratados com Nime
  - 10- Gráfico da PAM em ratos Adx pré-tratados com Nime
  - 11- Gráfico da PAM em ratos adrenodemedulados
  - 12-Edema de pata em ratos controle
  - 13- Edema de pata em ratos Adx
  - 14- Edema de pata em ratos falso-operados
  - 15- Edema de pata em ratos pré-tratados com Dexa
  - 16- Edema de pata em ratos Adx pré-tratados com Dexa
  - 17 - Edema de pata em ratos pré-tratados com Diclo
  - 18 - Edema de pata em ratos pré-tratados com Nime
  - 19 - Edema de pata em ratos pré-tratados com N $\omega$ NLA
  - 20 - Edema de pata em ratos pré-tratados com PAF
  - 21 - Edema de pata em ratos pré-tratados com Etx

# SUMÁRIO

	<b>Pág</b>
Resumo.....	01
Abstract.....	03
Introdução	
Sistema renina-angiotensina.....	04
Receptores da All.....	06
Sistema nitrérgico.....	08
Choque séptico.....	09
Relação entre o sistema angiotensinérgico e o sistema nitrérgico.....	12
Objetivos.....	14
Material e Métodos	
Anestesia.....	15
Vias de administração de drogas.....	15
Substâncias utilizadas.....	15
Preparo do animal.....	16
Registro da PAM.....	16
Edema de pata.....	17
Medida do edema.....	17
Adrenalectomia.....	18
Demedulação das adrenais.....	18
Animais falso-operados.....	19
Análise estatística.....	19
Resultados.....	20
Gráfico modelo demonstrativo.....	21
PAM em ratos normais.....	22
PAM em ratos tratados com Dextran.....	23
PAM em ratos Adx.....	24
PAM em ratos falso-operados.....	25



PAM em ratos pré-tratados com Dexa.....	26
PAM em ratos Adx pré-tratados com Dexa.....	27
PAM em ratos pré-tratados com Diclo.....	28
PAM em ratos pré-tratados com Nime.....	29
PAM em ratos Adx pré-tratados com Nime.....	30
PAM em ratos adrenodemedulados.....	31
Edema de pata em ratos controle.....	32
Edema de pata em ratos Adx.....	33
Edema de pata em ratos falso-operados.....	34
Edema de pata em ratos pré-tratados com Dexa.....	35
Edema de pata em ratos Adx pré-tratados com Dexa.....	36
Edema de pata em ratos pré-tratados com Diclo.....	37
Edema de pata em ratos pré-tratados com Nime.....	38
Edema de pata em ratos pré-tratados com N $\omega$ NLA.....	39
Edema de pata em ratos pré-tratados com PAF.....	40
Edema de pata em ratos pré-tratados com Etx.....	41
 Discussão.....	 42
 Referências bibliográficas.....	 56
 Apêndice.....	 70
Parecer 61/2004 – Comitê de Ética em Pesquisa.....	70
Resumos em Congressos.....	71
Trabalho em Publicação.....	73

## **INFLUÊNCIA DA ENDOTOXINA DE *E. coli*, NO NO E DEXAMETASONA SOBRE A REATIVIDADE VASCULAR À ANGIOTENSINA II.**

### **RESUMO**

O choque séptico, que é a maior causa de morte no Brasil e no Mundo, consequência de trauma infeccioso, a indução da óxido nítrico sintase (NOS) do endotélio vascular por produtos originados da parede de bactérias é considerado a causa, mas também parte da ativação de mecanismos de defesa do hospedeiro contra a infecção. Uma pronunciada hipotensão seguida de redução da reatividade vascular a mediadores vasoconstritores é determinada pela intensa liberação de mediadores relaxantes, como o próprio óxido nítrico (NO), que podem progredir para a morte do hospedeiro. Em ratos, este fenômeno é igualmente observado. O quadro de choque séptico ou Sepsis pode ser reproduzido pela injeção parenteral de endotoxina de várias bactérias Gram-negativas, como a endotoxina de ***E. coli*** (Etx), que produz intensa hipotensão aguda e prolongada, com pronunciada hiporreatividade a angiotensina II (AII). A injeção de Dextran produziu uma hipotensão

comparável à da Etx, porém a potência vasoconstritora da AII foi completamente mantida. A hiporreatividade à AII após Etx pode ser revertida completamente pelo inibidor da NOS, o N $\omega$ NLA, sugerindo o envolvimento do sistema renina-angiotensina e a via L-arginina-NO, no fenômeno. Mediadores originários das glândulas adrenais estão envolvidos, uma vez que a adrenalectomia total dos ratos não permitiu a reversão da hiporreatividade à AII pelo N $\omega$ NLA. O envolvimento de drogas antiinflamatórias esteroidais (Dexametasona [Dexa]) ou não-esteróidais (Diclofenaco [Diclo] e Nimesulide [Nime]) no fenômeno não foi plenamente estabelecido, pois animais pré-tratados com estas drogas não modificaram a reversão da hiporreatividade vascular à AII. Do mesmo modo, a adrenodemedulação afastou a possibilidade de envolvimento de mediadores da medula adrenal na hiporreatividade revertida pelo N $\omega$ NLA. No modelo do Edema de Pata, onde avaliamos a influência da Dexa, Diclo e Nime, não observamos diferenças significativas no Edema induzido pela carragenina (Car) ou Etx. Neste modelo, o edema produzido pela Car ou Etx não foram diferentes em ratos adrenalectomizados ou controles, mesmo após pré-tratamento com Dexa, Diclo ou Nime. Já em ratos pré-tratados com Etx i.p. 2 horas antes da indução do edema, observamos uma significativa redução da ação edematogênica da

Car e da Etx. Contrariamente, em ratos pré-tratados com fator de agregação plaquetária, a potência edematogênica de Car e Etx foi potencializada.

**Palavras chave:** endotoxina, angiotensina II, choque séptico, edema de pata, NO, dexametasona, reatividade vascular à AII.

## **ABSTRACT**

In septic shock that is major cause of death following in infectious trauma, the induction of nitric oxide synthase (NOS) of vascular endothelium by bacterial products is considered to be part of the defense mechanism of hosp against infection. But the hypotension and vascular hyporeactivity determined by intense release of relaxing factors essentially from endothelial cells, in response to substances, released from walls bacteria which can progress to death of hosp. The hyporeactivity to angiotensin II (AII) is observed in Etx-induced hypotension. The current study show that the vasoconstriction response of AII in rats is reversed by an inhibitor of NOS (N $\omega$ NLA) in control rats, but in adrenalectomized rats these inhibitor did not reversed the hyporeactivity. The dexamethasone impaired the protective effect of N $\omega$ NLA against Etx-induced hyporeactivity. In adrenalectomized rats the N $\omega$ NLA not reverts vascular hyporeactivity to AII. The involvement of antiinflammatory nonsteroids drugs (diclofenac [Diclo] and nimesulide [Nime]) not was involved in reversion of vascular hyporeactivity to AII. Dextran injection, produced hypotension but not produced vascular hyporeactivity to AII. These mechanism is not clarified. In paw edema carragenin (Car) and endotoxin induced not observed the involvement of adrenalectomy, dexamethasone, Diclo and Nime in phenomen. The potency edematogenic of Car and Etx was not altered, but in rats pré-treatads with Etx

for 2 hours, the edematogenic potency of Car and Etx was reduced significantly, but in rats pré-treatads with platelet agregation factor, the edematogenic response of Car and Etx was potentialized.

**Key words:** endotoxin, angiotensin II, septic schock, paw edema, NO, dexamethasone, vascular hyporreactivity to AII.

## INTRODUÇÃO

### SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

O sistema renina-angiotensina é um sistema importante na regulação, a curto e a longo prazo da pressão sanguínea arterial, em diversas condições de hipotensão. Os fatores que levam a estas condições podem ser: redução no volume sanguíneo eficaz, nas dietas hipossódicas e uso de diuréticos, perda sanguínea por hemorragia, isquemia cardíaca congestiva, cirrose hepática, síndrome nefrótica e redução na resistência periférica total (provocada por vasodilatadores), que levam a ativação da liberação de renina pelos rins. Não está claro se esta ativação também ocorre durante o choque séptico ou aquele induzido por lipopolisacarídeos da parede bacteriana na vigência de processo infeccioso generalizado. A renina é uma enzima que atua sobre o angiotensinogênio (A) para catalisar a formação do decapeptídeo angiotensina I (AI). Este decapeptídeo é posteriormente clivado pela enzima conversora de angiotensina (ECA), produzindo o octapeptídeo vasopressor ativo angiotensina II (AII) [Goodman and Gilman's, 2002].

A AII apresenta uma ação moduladora no sistema cardiovascular por estimulação da liberação de aldosterona e conseqüentemente inibição da natriurese. Esta ação da AII sobre a zona glomerulosa do córtex da adrenal aumenta a síntese e a secreção de aldosterona. Esta por sua vez, atua no túbulo distal e ducto coletor nos rins causando retenção de  $\text{Na}^+$  e aumento na excreção de  $\text{K}^+$  e  $\text{H}^+$ . O efeito estimulante da AII na síntese e liberação de aldosterona é aumentado sob condições de hiponatremia ou hiperpotassemia e é reduzido quando as concentrações destes cátions no plasma são alterados em

direções opostas. Adicionalmente, a AII estimula a liberação de catecolaminas da medula adrenal por despolarização das células cromafins (Ferrario, 1991).

A AII atua por diferentes mecanismos para elevar a pressão arterial aos seus níveis normais. Ela atua de diferentes formas para aumentar a resistência periférica total. Sugeriu-se que o mecanismo mais importante seja pela capacidade que a AII possui em inibir a excreção de  $\text{Na}^+$  e água pelos rins. Desse modo Hall et al. (1980) esclareceram que as alterações na função renal induzidas pela AII desempenham um papel importante na estabilização a longo prazo da pressão arterial diante das grandes oscilações na ingestão nutricional de  $\text{Na}^+$ .

O substrato endógeno natural para a renina é o A, que é uma  $\alpha_2$ -globulina que circula em quantidades abundantes no plasma. A região molecular importante deste peptídeo é o terminal amino, a partir do qual a AI é formada. A estrutura primária do A foi obtida por clonagem molecular (Kageyama et al., 1984). O A é sintetizado basicamente no fígado, embora o RNA mensageiro ( $\text{RNA}_m$ ) que o codifica também seja abundante no tecido adiposo, em determinadas regiões do SNC e nos rins (Campbell & Habiner, 1986; Cassis et al., 1988). O A é continuamente sintetizado e secretado pelo fígado e sua síntese é estimulada por vários hormônios, incluindo glicocorticóides, hormônios tireoideanos e pela própria AII (Bem-Ari & Garisson, 1988). A taxa de síntese de AII pode ser influenciada por alterações nos níveis de A, pois animais transgênicos que superexpressam o gene de A são hipertensos (Kimura et al., 1992) e animais sem este gene são hipotensos (Tanimoto et al., 1994). Historicamente o A não é considerado um fator importante para a doença cardiovascular da hipertensão (Hata et al., 1994). Apesar de não ter sido estabelecida uma relação causa-efeito, aumentos nos

níveis de A estão associados à hipertensão essencial (Jeunemaitre et al., 1992) e existe uma ligação genética entre a hipertensão essencial e o gene de expressão de A (Caulfield et al., 1994). Além disso, uma mutação específica nesse gene foi associada à hipertensão essencial (Hata et al., 1994) e à hipertensão induzida pela gravidez (Ward et al., 1993).

A ECA que converte o AI em AII, é uma dipeptidilcarboxipeptidase, cujos substratos preferidos devem ter apenas um grupo carboxil livre e a prolina não deve ser o penúltimo aminoácido; portanto esta enzima não degrada a AII (Williams et al., 1994). A bradicinina (Bk) é um dos muitos substratos naturais para a ECA, que a inativa do mesmo modo que outros potentes vasodilatadores (Linz and Scholkens, 1992) A conversão de AI em AII **in vivo** é muito rápida devido a atividade da ECA ligada à membrana na superfície luminal das células endoteliais em todo o sistema vascular e pulmonar (Williams et al., 1994).

Outras vias alternativas para a biosíntese de AI tem sido descritas e embora a importância fisiológica dessas vias não seja amplamente conhecida; alguns tecidos contém enzimas processadoras de A em AI (proteases não renina) ou diretamente em AII (catepsina G e tonina) [Dzau, 1993]. Tem sido ainda descritas outras enzimas processadoras de AI que não seja a ECA (enzima geradora de AII sensível a quimostatina e quinase cardíaca (Dzau et al., 1993).

## **Receptores de angiotensina**

Os efeitos da angiotensina são exercidos através de receptores seletivos localizados na superfície celular do endotélio vascular. Esses



receptores foram caracterizados farmacologicamente em dois subtipos (Chiu et al., 1989) em  $At_1$  e  $At_2$  (Bumpus et al., 1991). O subtipo  $At_1$  tem alta afinidade pelo losartan (um antagonista seletivo) e baixa afinidade pelo PD 123177 e CGP 42112 A (um peptídeo análogo), enquanto que o receptor  $At_2$  tem uma alta afinidade pelo PD 123177 e CGP 42112 A, mas com baixa afinidade pelo losartan (Bumpus et al., 1991). Portanto estas propriedades podem ser empregadas para caracterização diferencial destes dois subtipos de receptores. Ambos os receptores já foram clonados (Sasaki et al., 1991; Murphy et al., 1991; Mukoyama et al., 1993). O receptor  $At_1$  é membro da família de receptores ligados a Proteína G, com 7 regiões transmembrana possíveis e tem 359 aminoácidos. O receptor  $At_2$  tem 363 aminoácidos, também possui 7 regiões transmembrana, mas não é fortemente ligado à proteína G. Os receptores  $At_1$  e  $At_2$  tem pequena homologia de seqüência (apenas 32% de identidade da seqüência de aminoácidos).

Até o presente, todos os efeitos farmacológicos da AII parecem ser mediados pelo receptor  $At_1$ , não tendo sido definido de maneira inequívoca um papel funcional para o receptor  $At_2$ . Foram clonadas quatro isoformas altamente homólogas do receptor  $At_1$  de ratos e duas isoformas de seres humanos. O receptor  $At_2$  está amplamente distribuído nos tecidos fetais, mas sua distribuição é mais restrita nos adultos. Nos adultos, alguns tecidos contém basicamente receptores  $At_1$  ou receptores  $At_2$ , enquanto outros tecidos tem os dois subtipos em quantidades semelhantes; sob este aspecto, diferenças teciduais e de espécie são a regra e não a exceção (Timmemans et al., 1993).

O mecanismo de acoplamento do receptor  $At_1$  com seus efetores via proteína G, envolve a ativação de enzimas que também atuam na cadeia de biosíntese dos fatores da inflamação. Além da fosfolipase  $C\beta$  e da fosfolipase

D, a ativação do receptor  $At_1$  também estimula a fosfolipase  $A_2$ , que metaboliza a fosfatidilcolina em ácido araquidônico; posteriormente este ácido araquidônico é metabolizado em prostaglandinas e em tromboxano  $A_2$  através das cicloxigenases (Cox-1 e Cox-2) e em leucotrienos através da lipoxigenase (Sasaki et al., 1991). Esses derivados do ácido araquidônico modificam a resposta celular final ativando seus próprios receptores na superfície celular. Nestes eventos envolvendo a síntese dos mediadores do processo inflamatório, é provável que tanto as drogas antiinflamatórias esteroidais e não- estroidais, devem modificar indiretamente as respostas farmacológicas aos agonistas dos receptores  $At_1$  e  $At_2$ . Os mecanismos do acoplamento do receptor  $At_1$  com seu efector tem sido estudados mais amplamente, por serem farmacologicamente mais importantes. Alguns estudos sugerem que os receptores  $At_1$  quando antagonizados pelo losartan, inibem a proteína associada à membrana, tirosina fosfatase, através da proteína G sensível à toxina pertussis e/ou regulam os canais de  $K^+$  (Kambayashi et al., 1994).

### **Sistema nitrérgico**

O óxido nítrico (NO) é um neurotransmissor com características mecanísticas diferentes dos neurotransmissores mais amplamente estudados até uma década atrás. O NO participa de inúmeras ações biológicas sistêmicas nos mamíferos, sendo quase sempre responsável por respostas inibitórias, como a vasodilatação, no caso da hipotensão severa causada no choque séptico. O choque séptico é uma das mais importantes causas de morte em quadros severos de sepsis. O NO responsável pela mediação da vasodilatação é produzido e liberado após a ativação de uma sintase endotelial constitutiva

(NOSc), pela Etx nos casos de choque endotóxico (Klosterhalfen & Bhardwaj, 1988; Thitheradge, 1999). Esta superprodução de NO resulta numa hipotensão e redução da responsividade contrátil do sistema vascular à Nor (Ambrosio & Fracasso, 2000). Na fase final do choque endotóxico, uma isoforma da sintase de óxido nítrico, NOS indutível (NOSi), é induzida em vários órgãos e na parede dos vasos arteriais. A indução desta NOSi contribui ainda mais para a queda da pressão arterial sistêmica em ratos com choque endotóxico (Szabo et al., 1994).

## **CHOQUE SÉPTICO**

Endotoxinas de *E. coli* (Etx) são lipopolissacarídeos constituintes normais de parede celular de bactérias gram-negativas, liberadas na corrente sanguínea após a morte ou lise destas bactérias, que freqüentemente produzem no homem e nos animais um estado patológico conhecido por choque séptico, choque endotoxêmico, choque gram-negativo ou bacteriano (Kilpatrick-Smith & Erecinska, 1983). Estas substâncias tóxicas tem sido designadas **endotoxinas** para diferenciá-las de outras substâncias tóxicas sintetizadas e excretadas para o meio, pela célula bacteriana íntegra e denominada **exotoxinas**. Extensas alterações hemodinâmicas e fisiológicas são causadas pela Etx que levam ao quadro clínico denominado de choque séptico. Um dos primeiros sinais deste choque é a queda da pressão arterial sanguínea, considerada hipotensão quando valores sistólicos abaixo de 80 mmHg são mantidos por mais de 30 min (Neme & Nestarez, 1978). Além desta alteração cardiovascular, há uma falta ou redução significativa de resposta aos vasoconstritores e uma hiperreatividade aos vasodilatadores (Ambrosio &

Fracasso, 2000; Paya, 1993). Os mecanismos fundamentais da hipotensão mediada pela Etx não estão plenamente compreendidos (Griglewski et al., 1988), porém a mediação destas alterações por um vasodilatador endógeno, o NO tem recebido atenção considerável (Thitherradge, 1999).

Na infecção experimental induzida in vivo, um aumento na resistência do hospedeiro é observado quando pequenas doses de endotoxina são administradas 24 horas antes da indução da infecção ou de doses letais de Etx. Entretanto se a Etx é administrada imediatamente antes da indução da infecção, os animais tornam-se menos resistentes (Flohé et al., 1991).

A hiporreatividade vascular aos vasoconstritores como as catecolaminas, é um dos efeitos mais pronunciados do choque séptico em ratos (Paya et al., 1993; Ambrósio & Fracasso, 2000) e contribui para uma alta taxa de morte associada ao choque gram-negativo. É sabido que a Etx reproduz a hiporreatividade em animais e uma alta produção de NO tem sido implicada no efeito da Etx em alterar essa reatividade vascular (Gray et al., 1990). Tem sido descrito que a Etx induz a enzima sintase de NO, que produz NO a partir do aminoácido não essencial L-arginina em vários tecidos de rato e que a dexametasona (Dexa), uma droga antiinflamatória corticóide, previne a indução desta enzima e a hiporreatividade vascular associada em aorta de rato (Rees et al., 1990). Todavia alguns efeitos da Etx sobre a pressão arterial e reatividade vascular podem preceder a indução da NOS, a qual demora várias horas para ocorrer em vários modelos animais (Schuller et al., 1992). A hiporreatividade rápida à noradrenalina (Nor) se deve à estimulação rápida da NOS<sub>c</sub> pela Etx e a hiporreatividade tardia à Nor se deve à indução NOS<sub>i</sub> pela Etx. Foi verificado que uma vez estabelecida a hiporreatividade à Nor, o

tratamento com Dexametasona não produz efeito; portanto a Dexametasona só é eficaz em prevenir a hiporreatividade à Noradrenalina, quando o tratamento é preventivo (Paya et al., 1993). Deste modo está estabelecido que a expressão da NOSi em resposta a Etx é portanto negativamente regulada pela Dexametasona in vivo e o aumento dos glicocorticóides endógenos, tem sido proposto contribuir para o desenvolvimento da tolerância cardiovascular às injeções repetidas de Etx (Szabo et al., 1994).

No homem e em animais a Etx causa rápida leucopenia, provavelmente devido a um seqüestro dos leucócitos pelos capilares, principalmente pulmonares. Após um período de 4-6 horas da administração da Etx, a leucopenia é seguida de leucocitose pela liberação de granulócitos da medula óssea (Morrison & Ulevitch, 1978). A ativação das células endoteliais pela Etx, TNF- $\alpha$  ou IL-1 estimula a aderência de leucócitos, promove atividade pró-coagulante e induz a liberação de mediadores inflamatórios e substâncias vasoativas. Deste modo as células endoteliais são alvo crítico das reações inflamatórias destrutivas e como células efetoras potenciais na resposta inflamatória, podendo influenciar profundamente o curso de uma septicemia gram-negativa (Pohlman & Harlan, 1992).

Como o sistema renina-angiotensina pode ser ativado nos casos de hipotensão desta natureza, torna-se interessante explorar se a reatividade vascular frente a AII altera-se nestas condições de superprodução de NO, pela indução aumentada de ambas as sintases NOSi e NOSc. Assim, o emprego de inibidores destas enzimas sintases pode ser útil na avaliação do envolvimento do sistema renina-angiotensina e do sistema nitrérgico na responsividade vascular aos peptídeos endogenamente ativos.

Como citado anteriormente, o mecanismo de ação da AII, ocorre pela ativação específica de receptores  $At_1$  que são acoplados à proteína G. Desse modo há a geração de segundo-mensageiros, que indiretamente podem promover a ativação de enzimas formadoras de mediadores do processo inflamatório (leucotrienos a partir do ácido araquidônico das membranas celulares), tornando provável a influência de substâncias antiinflamatórias esteroidais (AIES) e não-esteroidais (AINES) com o sistema renina-angiotensina. O envolvimento de mediadores do processo inflamatório pode ser avaliado com o emprego de drogas AINES como o Diclofenaco, que é um derivado do ácido fenilacético desenvolvido como antiinflamatório, possuindo também propriedades analgésicas e antipiréticas. Sua ação ocorre por inibição da ciclooxigenase (Cox), preferencialmente a  $Cox_1$ . Já o nimesulide é outro antiinflamatório não-esteroidal possuindo ações antipiréticas e analgésicas, cuja ação ocorre por inibição preferencial da  $Cox_2$ , com menores efeitos sobre a mucosa gástrica que o Diclofenaco. A Dexametasona, tem sua ação antiinflamatória pela inibição da fosfolipase situada na membrana celular, não permitindo a ativação da cascata das reações desencadeadas localmente no processo inflamatório (mediadores teciduais)[Goodman and Gilman's, 2002].

### **Relação entre o sistema angiotensinérgico e o sistema nitrérgico**

A AII é hábil para ativar o sistema Cinina-NO cardiovascular. Em cultura de células endoteliais bovinas, a AII estimula de forma concentração-dependente a produção de GMPC e aumenta a liberação de cinina endógena (Lopes-Aguirrea & Páramo, 1999). Nestas células a biosíntese de GMPC foi

bloqueada pelo icatiban (antagonista seletivo de receptor de bradicinina de subtipo B<sub>1</sub>), bem como pelo inibidor da NOS, N<sup>ω</sup>NLA (Wiemer et al., 1993). A produção de cininas e/ou NO favorece um envolvimento do subtipo de receptor At<sub>2</sub> no cão. Ambas as drogas também bloquearam a produção de NO induzida pela AII, medida pela liberação de nitrito em microvasos coronarianos e artérias coronárias de cão (Wiemer et al., 1993 a).

Estes conhecimentos acerca da relação da ECA, cininas e NO revelam uma interdependência destes sistemas, sob condições fisiológicas e fisiopatológicas; conseqüentemente envolvendo também o sistema renina-angiotensina. A atividade basal e estimulada das cininas derivadas do endotélio vascular, estão relacionadas ou mesmo dependem da expressão e/ou atividade da ECA, pois os inibidores da ECA contribuem para o aumento destas cininas. Deste modo, a regulação da NOS é relevante no controle da hipertensão, aterosclerose e falência cardíaca, onde a inibição total das ações do NO derivado do endotélio é observado. As cininas e os inibidores da ECA são reguladores da NOS e aumentam a produção de NO, entretanto as cininas e os inibidores da ECA são capazes de reduzir a produção de superóxidos gerados pela disfunção da NOS (Thimermans et al., 1993).

Tem sido proposto que a hipotensão e a hiporreatividade vascular aos vasoconstrictores causados indiretamente pela Etx podem estar envolvidas com processos de estresse oxidativo **in vivo**, pois foi detectado que durante a vigência do choque séptico há uma redução de fatores endógenos antioxidantes e mesmo o envolvimento do próprio NO que é uma espécie de radical reativo (Pleiner et al, 2003).

Neste estudo, procuramos avaliar a influência de drogas em diferentes protocolos experimentais, no modelo de “choque endotóxico”

produzido pela Etx e seus efeitos na reatividade vascular à AII e adicionalmente a influência de drogas em diferentes protocolos experimentais no modelo de “edema de pata” induzido pela Etx e pela Car que apresentam potentes efeitos edematogênicos, em ratos.



## OBJETIVOS

Os objetivos do presente estudo visaram explorar um possível envolvimento do sistema Renina-angiotensina com a reatividade cardiovascular a AII, frente a situações de acentuada hipotensão causada pela endotoxina de bactérias gram-negativas, como por exemplo a **E. coli** (Etx), assim como a participação dos sistemas normalmente desencadeados na reversão deste quadro, em ratos.

Investigamos a hipótese da formação acentuada de NO e produtos da ciclooxigenase e se esta formação pode ser modulada por glicocorticóides endógenos e/ou outros mediadores químicos liberados pela Etx.

Para verificarmos essas hipóteses avaliamos:

- 1- Se as respostas pressóricas da (AII), frente à situações de acentuada hipotensão causada pela Etx (modelo experimental que se assemelha ao modelo “in vivo” do choque endotoxêmico, estão afetadas, através do estudo das variações da pressão arterial média (PAM).
- 2- Se ocorre hiporreatividade vascular à AII, semelhantemente ao que ocorre com a noradrenalina. Utilizamos inibidor da NO-sintase para verificarmos esta hipótese, através de registro da PAM.
- 3- Verificamos se a participação dos produtos das ciclooxigenases ( COX<sub>1</sub> e COX<sub>2</sub> ), como por exemplo as prostaglandinas e tromboxanos (endógenos), que se relacionam à hiporreatividade vascular à

noradrenalina, também estão presentes na hiporreatividade à AII. Utilizamos inibidores da COX<sub>1</sub> e COX<sub>2</sub> para verificarmos esta hipótese..

- 4- É conhecido que ratos adrenalectomizados [Adx] são mais sensíveis a pequenas doses de Etx. Quando estes animais sem os glicocorticóides endógenos são submetidos a doses sub-letais da Etx, eles desenvolvem choque circulatório muito pronunciado, caracterizado por uma profunda queda da pressão arterial e hiporreatividade às drogas vasoconstrictoras e hiperreatividade às drogas vasodilatadoras. Serão utilizados em nossos experimentos, para registros de PAM, animais Adx e adrenodemedulados [Adm] para compará-los com animais controles e controles “falso- operados” para verificarmos esta hipótese.
- 5- Animais adrenalectomizados, portanto desprovidos de glicocorticóides endógenos, foram submetidos à doses subletais de Etx, para avaliarmos se esta condição modifica as características da reatividade vascular à AII, comparados com animais Adx tratados com glicocorticóides, através de registros da PAM.

## MATERIAL E MÉTODOS

### 1. Anestesia

Utilizamos para experimentos **in vivo**, ratos machos Wistar originários do Biotério Central do Campus de Botucatu/UNESP, pesando entre 200-300g. Os animais foram anestesiados com tiopental sódico, dissolvido em solução fisiológica (NaCl 0,9%), na dose de 50 mg/Kg i.p. Em alguns protocolos utilizamos o éter dietílico P.A., quando foi o caso do procedimento de cirurgias e portanto, precisamos da recuperação do animal.

### 2. Vias de administração das drogas

As drogas foram administradas pela veia jugular esquerda ou direita, previamente canuladas com cânulas de polietileno, nº 50 com o animal anestesiado, para os experimentos de registro da PAM.

Utilizamos também, quando necessário, a via intra- peritoneal [i.p.] para a administração de drogas, quando avaliamos o efeito sistêmico em pré-tratamento do animal. Para os experimentos onde avaliamos o edema de pata a via intra- plantar [i.pl.] foi utilizada.

Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCF Araraquara.

### 3. Substâncias utilizadas

-Heparina (Liquemine, Roche)

-Endotoxina de *Escherichia coli* (026-B6, Difco Co.)

-Tiopental sódico (Tionembutal, Abbott do Brasil)

As demais substâncias foram obtidas junto à Sigma Chemical Co.

-Dexametasona                      -Diclofenaco sódico    -Nimesulide

-Nw-Metil-L-Arginina (NwNLA)

-Angiotensina II

-Carragenina

#### **4. Preparo do animal para a medida da pressão arterial**

O animal anestesiado, colocado em decúbito dorsal, fixado sobre uma placa de cortiça, depilado na região ventral do pescoço, com bisturi procede-se uma incisão crânio-caudal na pele sobre a linha mediana, divulgando o tecido até atingir a traquéia, a seguir esta é seccionada transversalmente e canulada com cânula de polietileno nº 240, a fim de remover secreções brônquicas eventualmente produzidas. Posteriormente, através de incisão ventral anterior do pescoço e divulsão do tecido, introduziu-se uma cânula PE nº 50 na veia jugular, que foi utilizada para a injeção das substâncias. A artéria carótida esquerda ou direita foi canulada e conectada a fisiógrafo para registro das respostas pressóricas (PAM). Após incisão longitudinal na região ventral mediana do pescoço, afastou-se as glândulas salivares parotidianas, identifica-se os músculos esternocleidomastóide e o esternoióide, entre as fibras de músculos localiza-se o nervo vago, integrante do feixe vaso nervoso cervical, isolou-se o feixe da musculatura por divulsão, separando a carótida, procedeu-se um corte em 'V' (pique no vaso, para introdução da cânula de polietileno nº 50), conectando-a ao fisiógrafo para o registro das respostas (PAM).

## **5. Registro da pressão arterial média (PAM)**

Através da artéria carótida conectada a um fisiógrafo ANAMED, foi registrada a PAM, durante todo o decorrer do experimento.

## **6. Edema de Pata**

A carragenina (Car) e a Etx utilizadas para produzir edema na pata no animal foram diluídas em solução fisiológica (NaCl 0,15M) para que o volume da injeção intraplantar (i. pl.) nunca excedesse 0,1 ml por pata, injetadas sempre na pata posterior direita..

A medida do edema foi feita após intervalos de tempo determinados nas figuras; para cada protocolo utilizado: imediatamente após a injeção (0) e após a 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> e 24<sup>a</sup> horas da injeção intraplantar. Utilizamos para medir o volume da pata o medidor de espessura “Mitutoyo”, 2050-08 (Fracasso et al., 1996).

### **6.1 Medida do edema induzido em pata de rato utilizando espessímetro**

Medida da espessura da pata: limpamos a pata posterior do rato com álcool e medimos sua espessura em mm.

O valor do aumento da espessura da pata inflamada (edema) foi obtido subtraindo-se o valor final da espessura observada menos o valor imediatamente após a administração i.pl. das drogas utilizadas para produzir o edema.

## **7. Adrenalectomia**

No animal anestesiado, após a depilação, foi feita uma incisão de aproximadamente 3 cm na região dorso-lombar, paravertebral, atingindo-se o espaço reto-abdominal. Com utilização de uma pinça curva, as adrenais foram expostas e retiradas sem o tecido adiposo que as envolve. Uma vez suturados, os animais foram mantidos em dieta alimentar normal, sem qualquer medicação. Os animais foram utilizados 5-6 dias após a cirurgia e, neste período, receberam com a dieta, água e solução fisiológica (NaCl 0,15M) , “ad libitum” (Zarrow et al., 1964).

### **7.1 Demedulação das adrenais**

A técnica cirúrgica é semelhante à adrenalectomia. Ao alcançar as adrenais, ao invés de retirá-las com a pinça, fez-se uma leve incisão na glândula com uma lâmina afiada e, por meio de compressão cuidadosa, expõe-se a medula que pode então ser removida.

Após a cirurgia, os animais foram mantidos nas mesmas condições dos animais adrenalectomizados (Zarrow et al., 1964).

## **7.2 Animais falso-operados**

Os animais falso-operados foram manipulados cirurgicamente como os animais adrenalectomizados (Adx) ou adrenodemedulados (Adm), exceção feita à remoção da glândula ou de sua medula adrenal. Foram mantidos por 5-6 dias, até o momento do experimento sob as mesmas condições que aqueles.

## **8. Experimentos**

- 8.1-** Para avaliarmos a reatividade vascular, bem como a reversão da hiporreatividade instalada após a Etx, empregamos substâncias supostamente envolvidas no choque séptico e em reações inflamatórias: NωNLA, AIES, AINES, DXS. Avaliamos as variações da PAM, através de registros da PAM conforme gráfico ilustrativo de um animal, antes (controle) e após a administração e.v. das referidas substâncias.
- 8.2-** Para avaliarmos os envolvimentos de substâncias cujos mecanismos de ação são mais conhecidos (Car), no processo inflamatório agudo e subcrônico (0 a 48 horas), por injeção i.pl. como agente edematogênico, empregamos o modelo do Edema de

Pata em animais controles e Adx num período de 0 a 24 horas, antes e após a administração sistêmica (i.p.) das substâncias (conforme os procedimentos descritos em cada um dos resultados apresentados).

## **9. Análise estatística**

A análise estatística dos resultados da PAM e do Edema de pata foi realizada através de ANOVA. As comparações múltiplas foram feitas através do pós-teste de Bonferroni. Para  $P < 0,05$  as diferenças foram consideradas significativas.

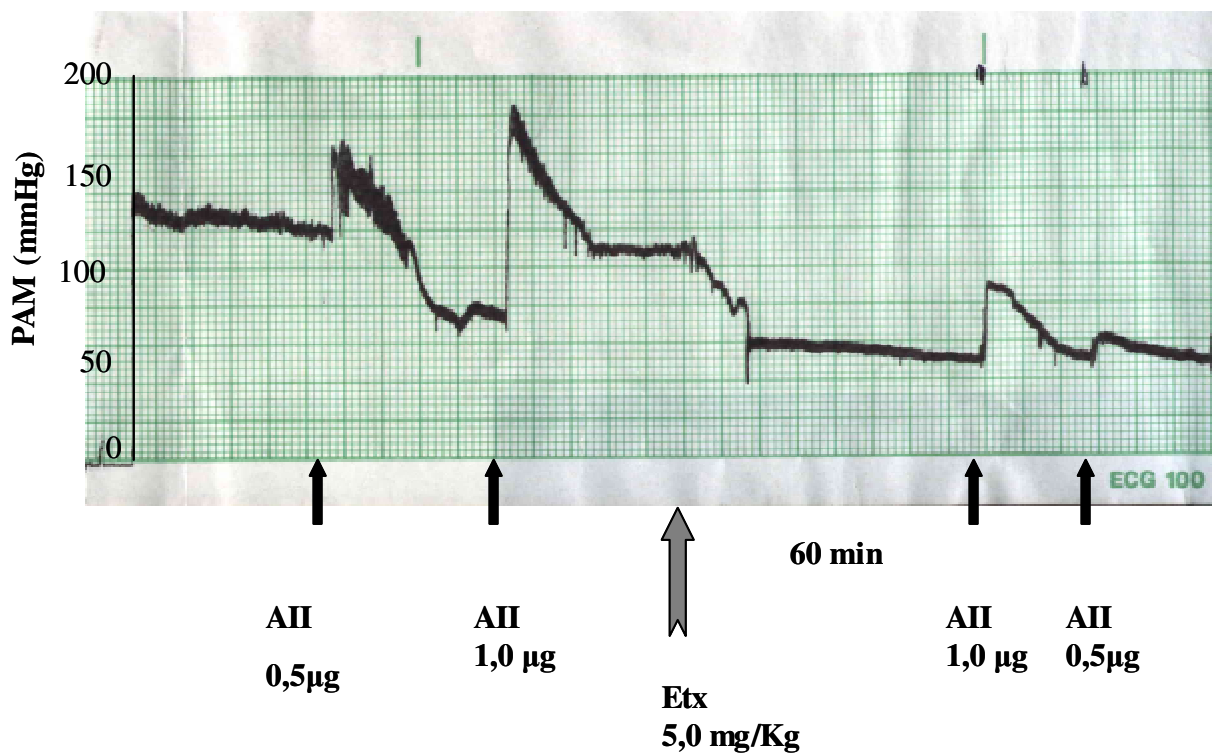
O número de animais por protocolo estão apresentados em cada figura.



## **RESULTADOS**

### **1 - Pressão Arterial Média**

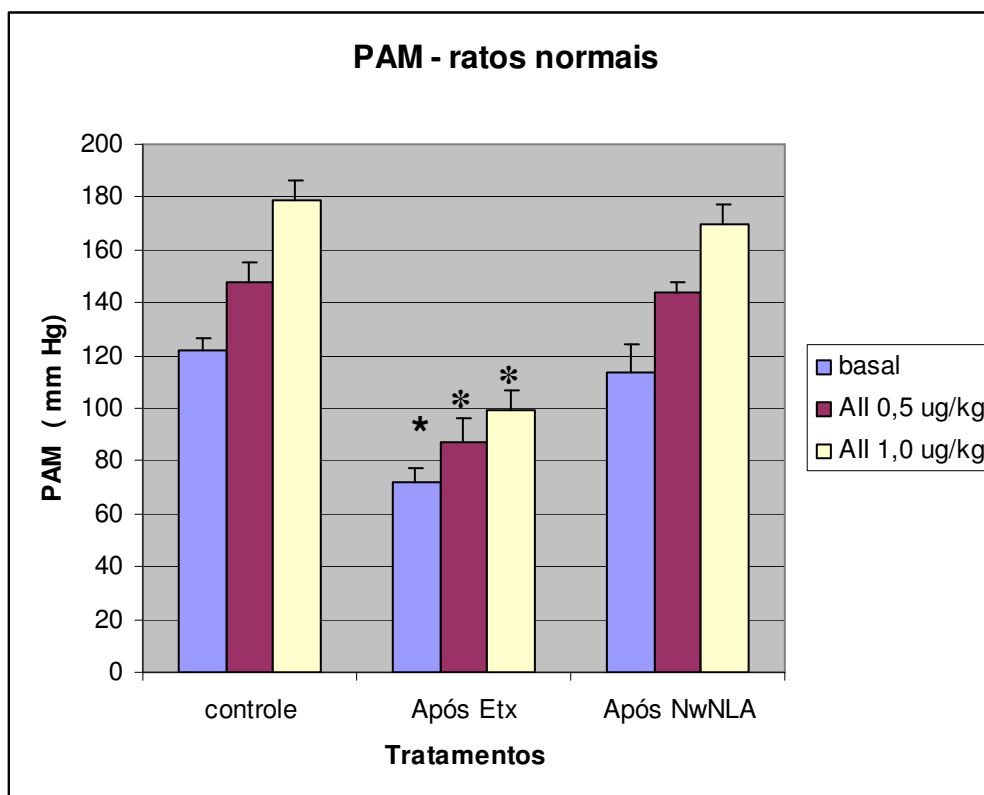
A angiotensina II apresentou efeitos hipertensores dose-dependentes, que foram registrados durante 2 horas de experimento, cujo efeito tem duração de aproximadamente 2 min. com retorno ao tônus vascular basal. As doses de 0,5 e 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  injetadas e.v. entre intervalos de 5 minutos e repetidos a cada 15 min., mostraram uma homogeneidade e reprodutividade de respostas. A figura 1 mostra um traçado representativo, onde está representado também os efeitos da AII após 1 hr de pré-tratamento do animal com Etx 5,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e.v.



**Figura 1:** Gráfico modelo representativo das alterações na pressão arterial média (PAM) induzidas pela Angiotensina II (AII), nas doses indicadas, antes (basal) e após o tratamento com Etx (5,0 mg/kg e.v.).

## Efeitos da AII na PAM em animais controle

Na Figura 2 estão representados as respostas da AII em animais controles antes (controle) e 1 hora após Etx (após Etx) e 1 hora após NwNLA (25  $\mu\text{g}/\text{kg}$  e.v.). Observamos que após Etx instala-se uma hipotensão com hiporreatividade vascular à AII (0,5 e 1,0  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ). Após o tratamento dos animais com NwNLA observamos a reversão do tônus vascular basal e da reatividade vascular à AII nas duas doses empregadas, comparadas com o controle.

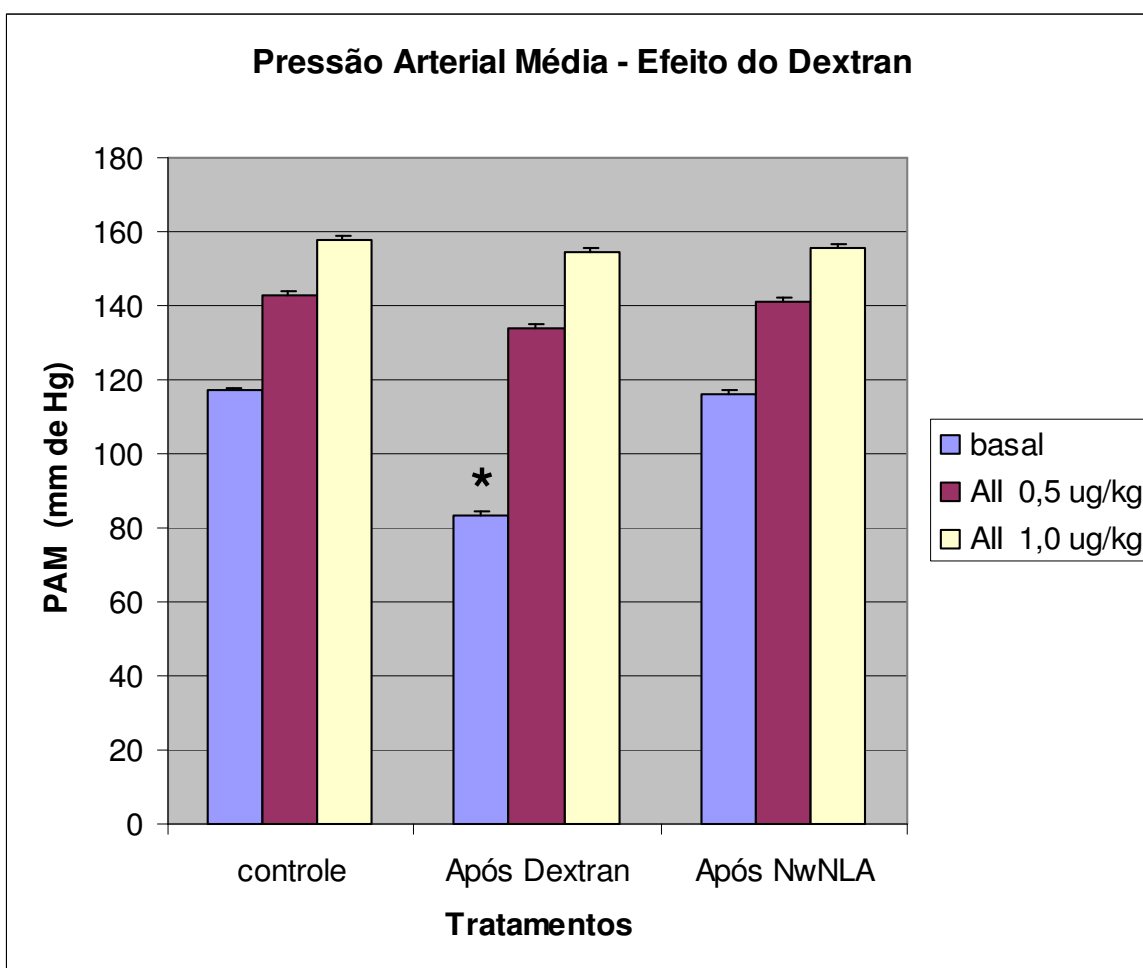


**Figura 2:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (basal) e após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NwNLA

(25 mg/kg e.v.) em animais normais. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). \*P < 0,05 (respostas após Etx, comparadas com o controle

### Efeitos da AII na PAM em ratos pré-tratados com Sulfato de Dextran

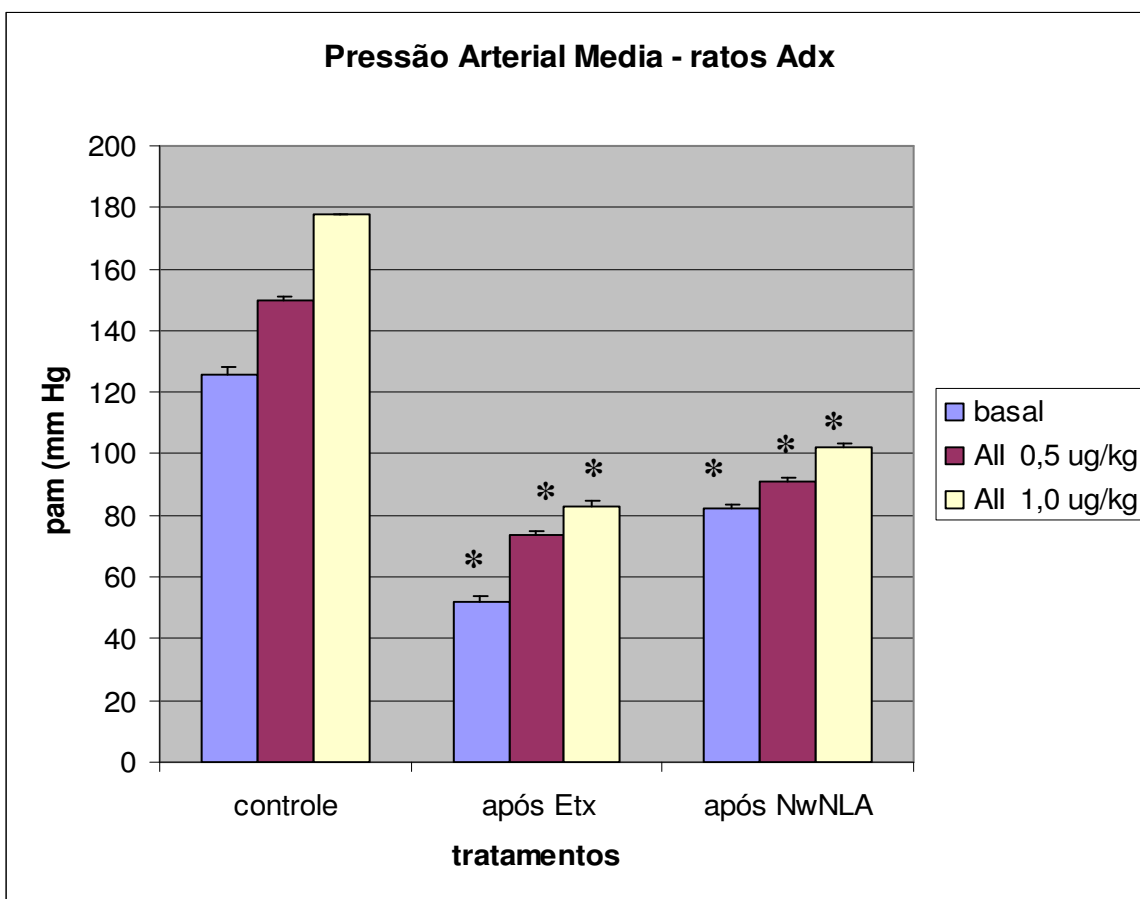
Na Figura 3 observamos que o DXT embora produza uma hipotensão no tônus vascular a reatividade vascular à AII foi mantida (após dextran) e após o tratamento dos animais com NωNLA, a reatividade vascular não se alterou significativamente (após NωNLA), comparado com o controle.



**Figura 3:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (basal) e após os tratamentos com Dextran (3,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NωNLA (25 mg/kg e.v.), em animais controles. Os resultados representam a média ± EPM (n = 7). \*P < 0,05 comparados com o basal (controle).

#### Efeitos da AII em animais Adx

A Figura 4 mostra alterações na PAM tanto no tônus vascular quanto nos efeitos hipertensores da AII (controle) quando os animais foram desprovidos das glândulas adrenais. Porém, após a administração de Etx, estes animais apresentaram uma hipotensão e hiporreatividade à AII (após Etx) mais pronunciada que os animais controle (Figura 3), não apresentando a reversão após o NωNLA (após NωNLA), comparados com o basal (controle).

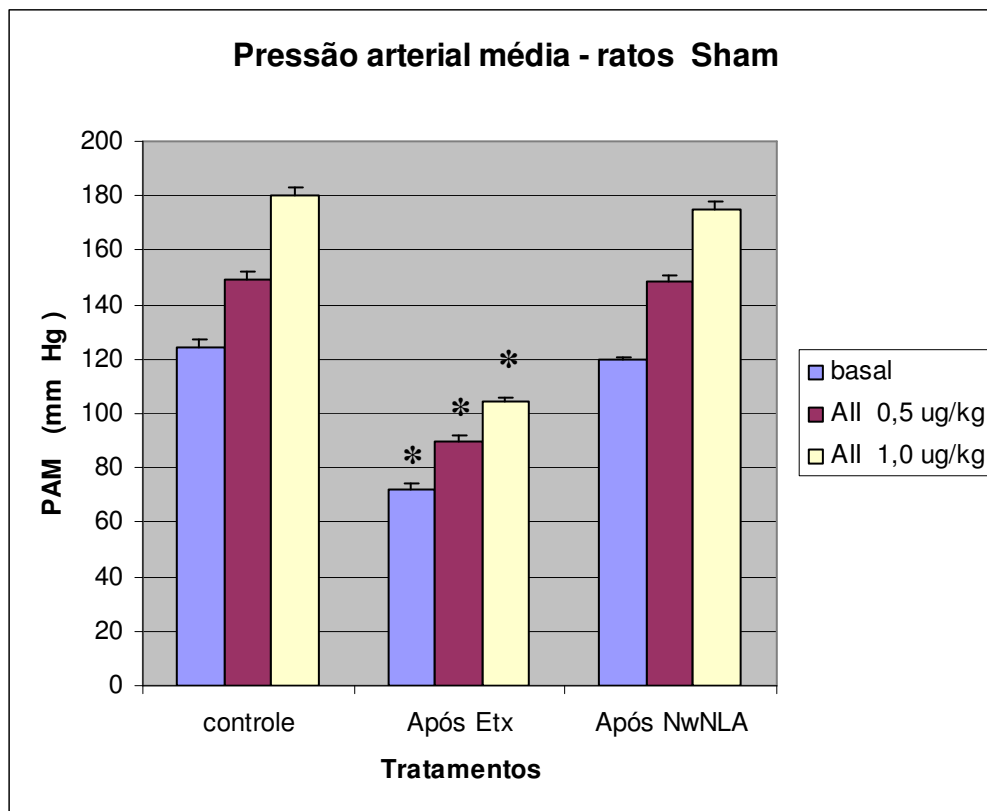


**Figura 4:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (basal) e após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NωNLA

(25 mg/kg e.v.), em animais adrenalectomizados (Adx). Os resultados representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). \* P < 0,05 comparados com o basal (controle).

### Efeitos da AII em animais falso-operados (sham)

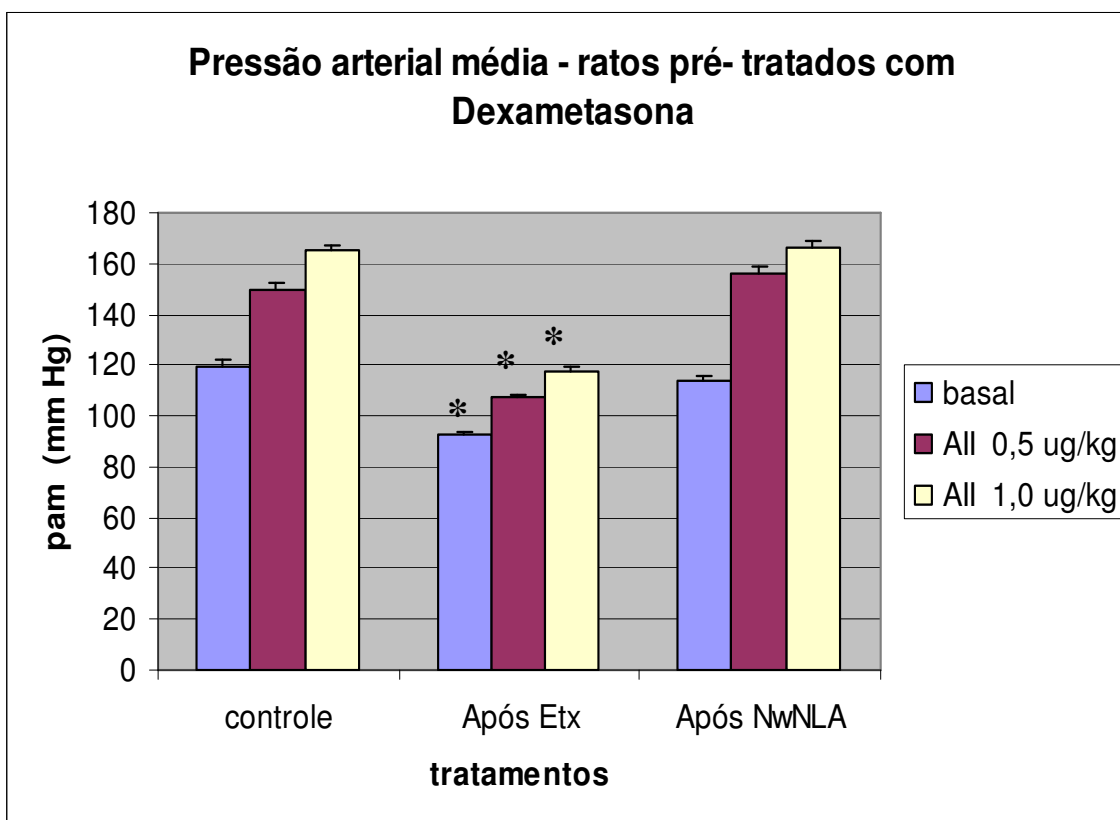
Os animais falso-operados, não apresentaram diferenças significativas quando comparados aos animais controle em relação à reatividade vascular à AII (Figura 5), tanto nos efeitos hipotensores da Etx (após Etx); quanto após a administração e.v. de NωNLA (após NωNLA).



**Figura 5:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (basal) e após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NwNLA (25 mg/kg e.v.), em animais sham. Os resultados representam a média  $\pm$  PM (n = 6). \*P < 0,05 comparados com o basal (controle).

## Efeitos da AII em animais pré-tratados com Dexametasona

A Dexametasona administrada 1 hr antes do tratamento dos animais com Etx, produziu uma redução parcial da hipotensão e hiporreatividade vascular à AII. Após tratamento dos animais com NwNLA, o tônus vascular e a reatividade à AII (Figura 6) foram revertidas completamente, quando comparadas com os animais controle (Figura 2).

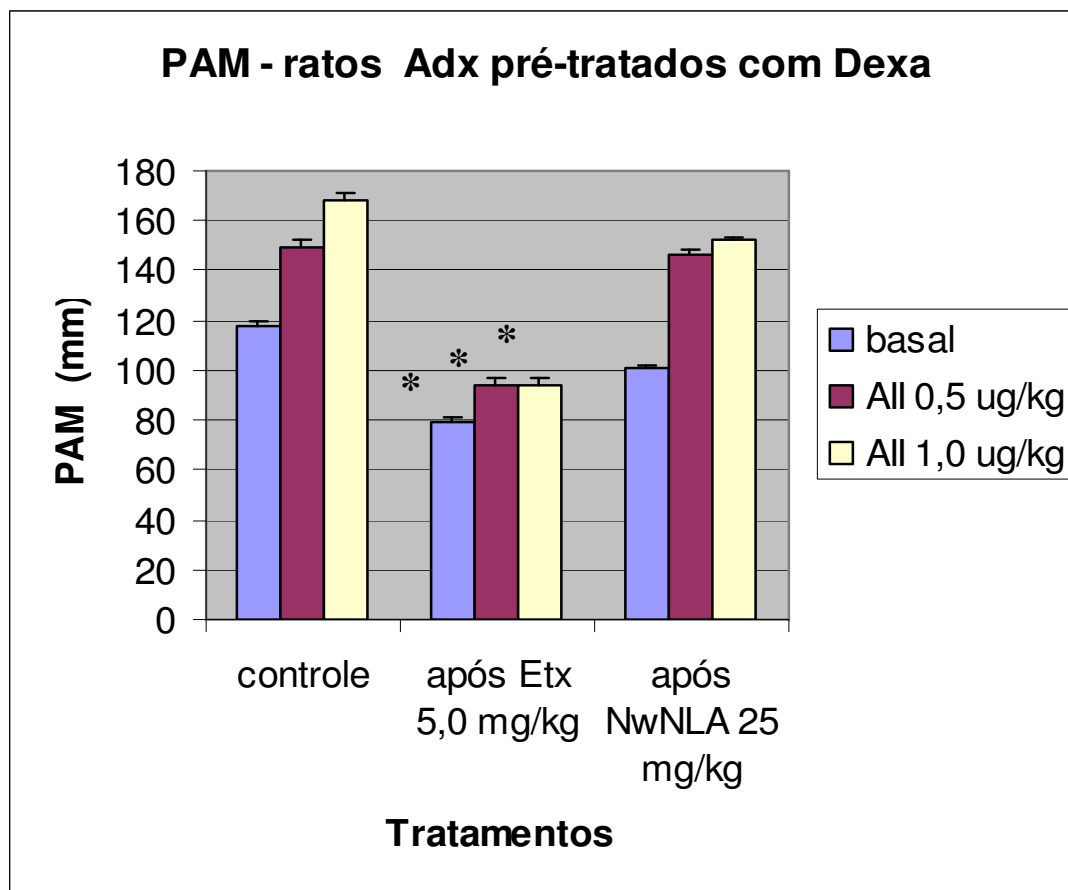


**Figura 6:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (basal)

e após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NωNLA (25 mg/kg e.v.) em animais pré-tratados com Dexametasona (Dexa). Os resultados representam a média ± EPM (n = 10). \*P < 0,05; comparados com o basal (controle).

### Efeitos da AII em animais Adx pré-tratados com Dexametasona

Animais Adx pré-tratados com Dexametasona 3 mg/kg i.p. após a administração da Etx, apresentaram uma redução do tônus basal com uma redução da reatividade vascular à AII. Uma reversão parcial do tônus vascular e reversão completa da reatividade vascular à AII após o NωNLA (após NωNLA) podemos observar na Figura 7, quando comparados com as respostas observadas na Figura 5.



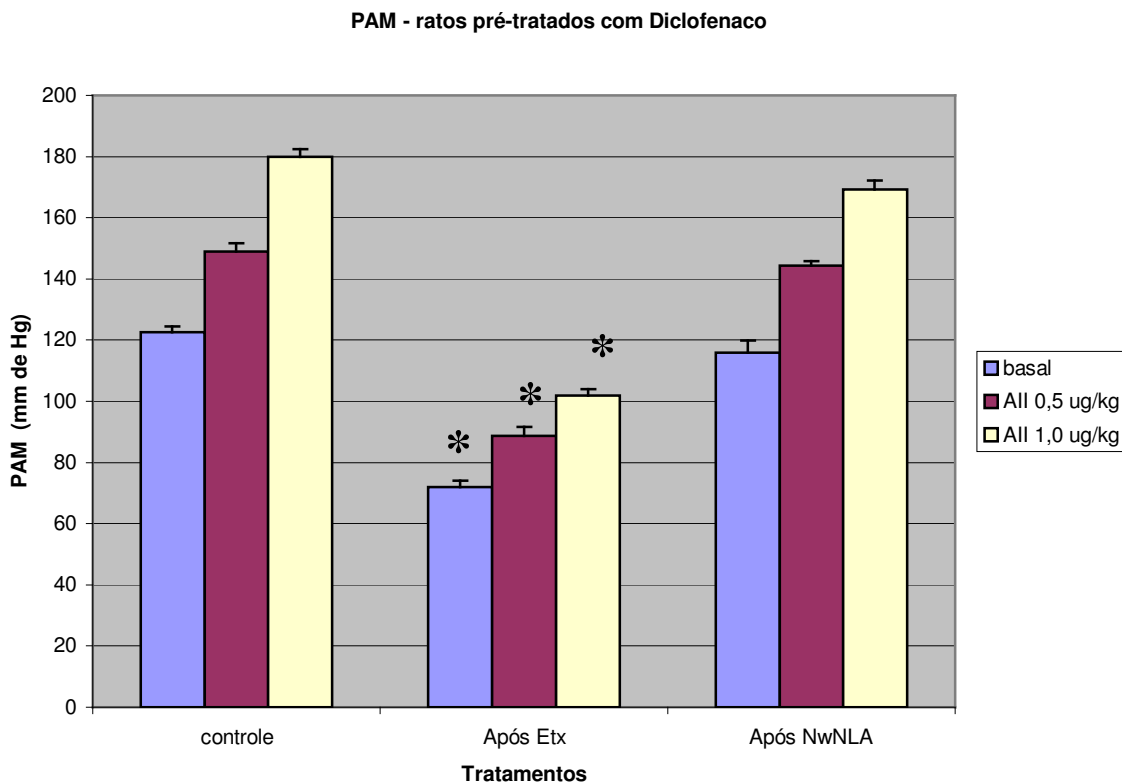
**Figura 7:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (basal) e após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após



N $\omega$ NLA (25 mg/kg e.v.) em animais Adx pré-tratados com Dexa. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM (n = 7). \*P < 0,05. comparados com o basal (controle).

### Efeitos da AII em animais pré-tratados com Diclofenaco

O diclofenaco não alterou o tônus vascular e nem os efeitos pressóricos da AII causados pela administração de Etx e N $\omega$ NLA, como mostra a Figura 8. Podemos observar que os efeitos hipotensores da Etx e a hiporreatividade vascular à AII (após Etx) foram completamente revertidas após a administração de N $\omega$ NLA (após N $\omega$ NLA).

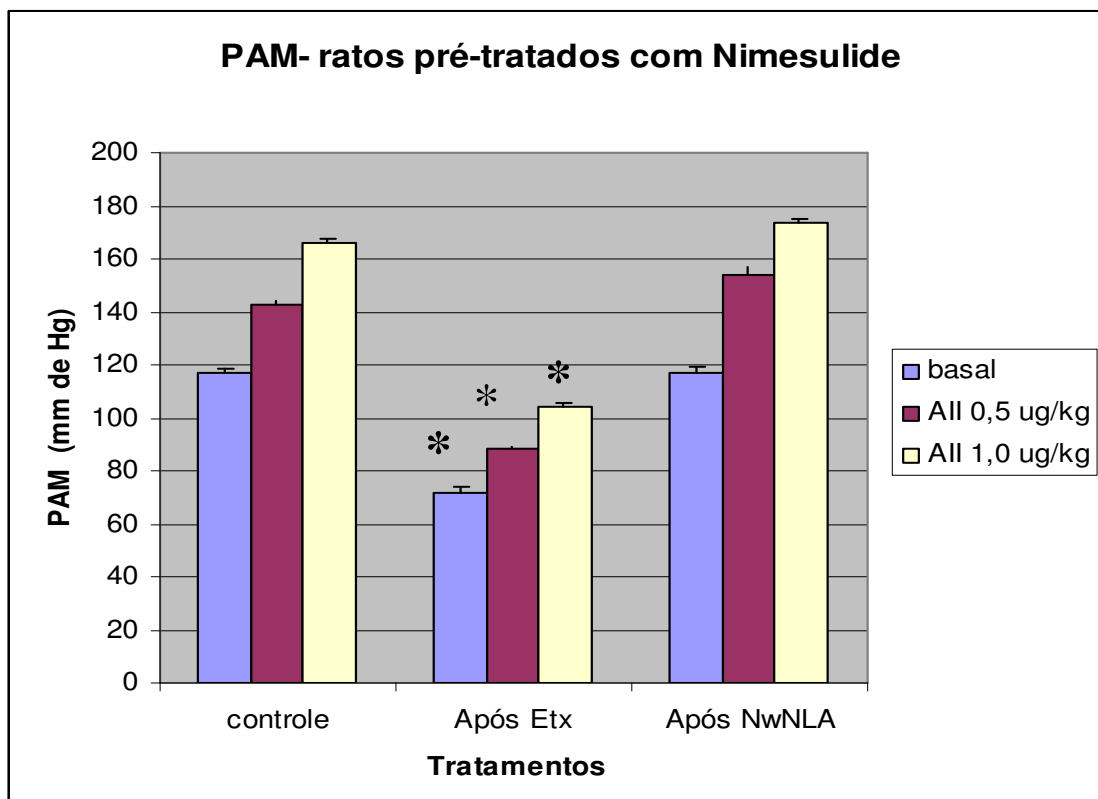


**Figura 8:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes

(basal) e após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NwNLA (25 mg/kg e.v.) em animais pré-tratados com Diclo. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \*P < 0,05 comparados com o basal (controle).

### Efeitos da AII em animais pré-tratados com Nimesulide

O Nimesulide não afetou as respostas pressóricas da AII ocorridas após a administração de Etx e NwNLA, conforme podemos observar na Figura 9. A redução do tônus basal e a hiporreatividade vascular à AII (após Etx) foram completamente revertidas com o NwNLA (após NwNLA).

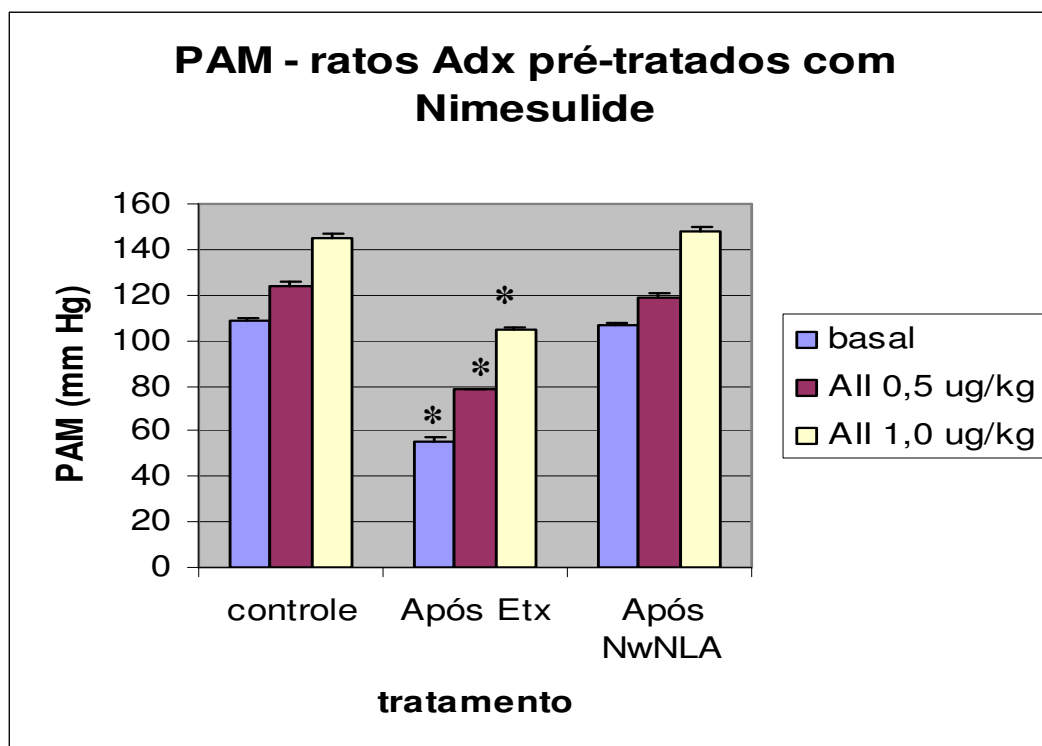


**Figura 9:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (basal) e após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NwNLA (25 mg/kg e.v.) em animais pré-tratados com Nime. Os resultados

representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \*P < 0,05 comparados com o basal (controle).

### Efeitos da AII em animais Adx pré-tratados com Nimesulide

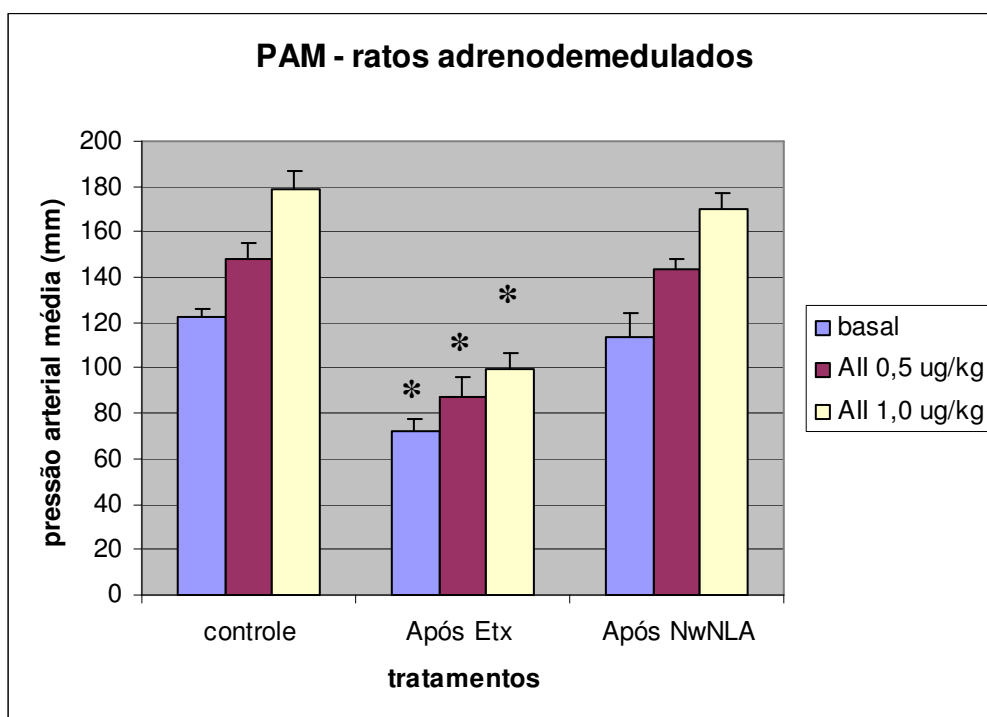
Os animais Adx, que apresentam maior sensibilidade à Etx e ao N $\omega$ NLA não apresentaram diferenças na responsividade da AII sobre a PAM quando comparados com o controle. Observamos que a queda do tônus e a redução da reatividade vascular à AII (após Etx) foram revertidas pelo N $\omega$ NLA (após N $\omega$ NLA), como observamos na Figura 10. Os resultados observados nesta Figura apresentam diferenças se comparados aos resultados da Figura 4 (animais Adx). Não procedemos a comparação estatística destes resultados (Figura 10 e Figura 4).



**Figura 10:** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (controle) e após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NwNLA (25 mg/kg e.v.) em animais Adx pré-tratados com Nimesulide. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM (n = 5). \*P < 0,05 comparados com o basal (controle).

### Efeitos da AII em ratos Adrenodemedulados

Animais desprovidos da medula das glândulas adrenais não apresentaram diferenças nas respostas da AII sobre a PAM após a Etx e mesmo após o NwNLA, como observamos na Figura 11, se a compararmos com os resultados da Figura 2. Podemos observar que a hipotensão e a hiporreatividade vascular à AII nestes animais adrenodemedulados foram semelhantes àsquelas observadas nos animais controle (após Etx) e a reversão completa tanto do tônus quanto da reatividade vascular à AII (após NwNLA).

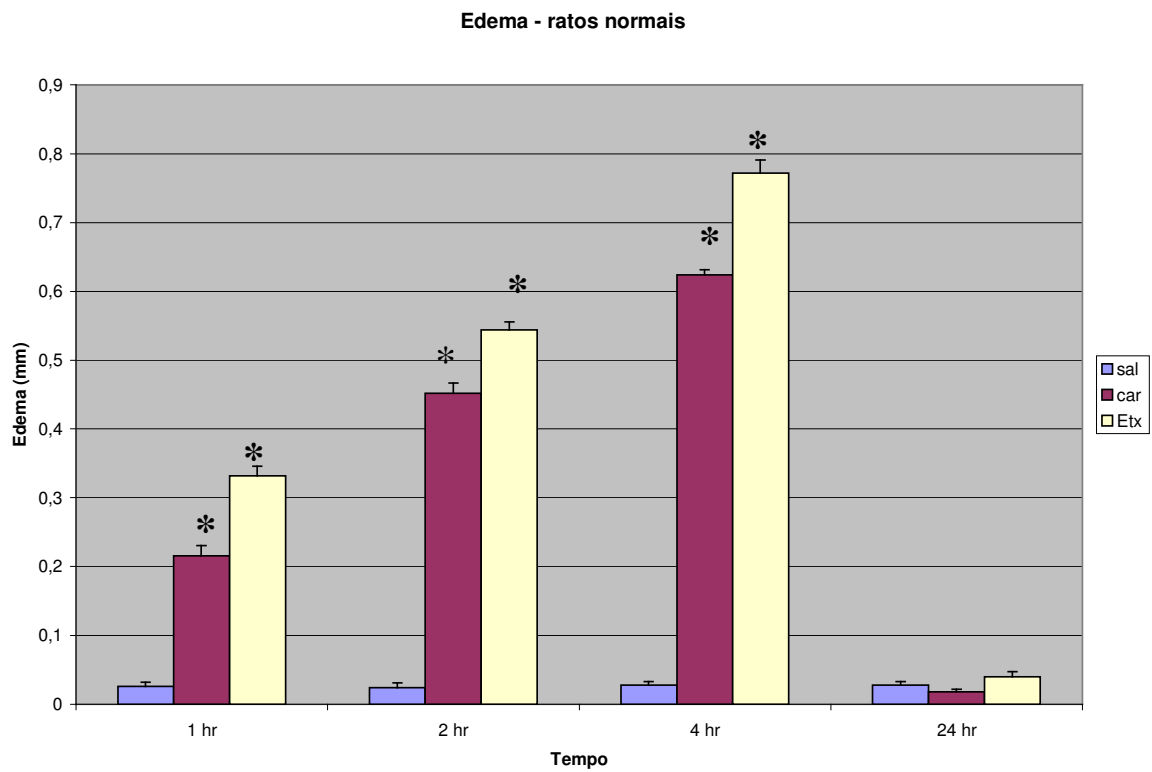


**Figura 11** Alterações na PAM induzidas pela AII, nas doses indicadas, antes (controle) E após os tratamentos com Etx (5,0 mg/kg e.v.) e 1 hora após NwNLA (25 mg/kg e.v.) em animais adrenodemedulados. Os resultados representam a média  $\pm$  EPM (n = 10). \*P < 0,05 comparados com o basal (controle).

## **2- Edema de pata induzido por injeção intraplantar (i. pl.)**

Estes resultados evidenciam uma relação entre as vias de resposta inflamatória do organismo num modelo experimental local e agudo, que envolve uma interrelação entre a via L-Arginina-NO e a cascata da formação dos mediadores do processo inflamatório. Estes resultados corroboram algumas observações avaliadas no modelo de respostas de agentes AIES e AINES relacionando com a queda do tônus vascular e da queda da reatividade vascular à AII, um dos neurotransmissores vasoconstritores que pode ser acionado em condições de endotoxemia (choque endotóxico).

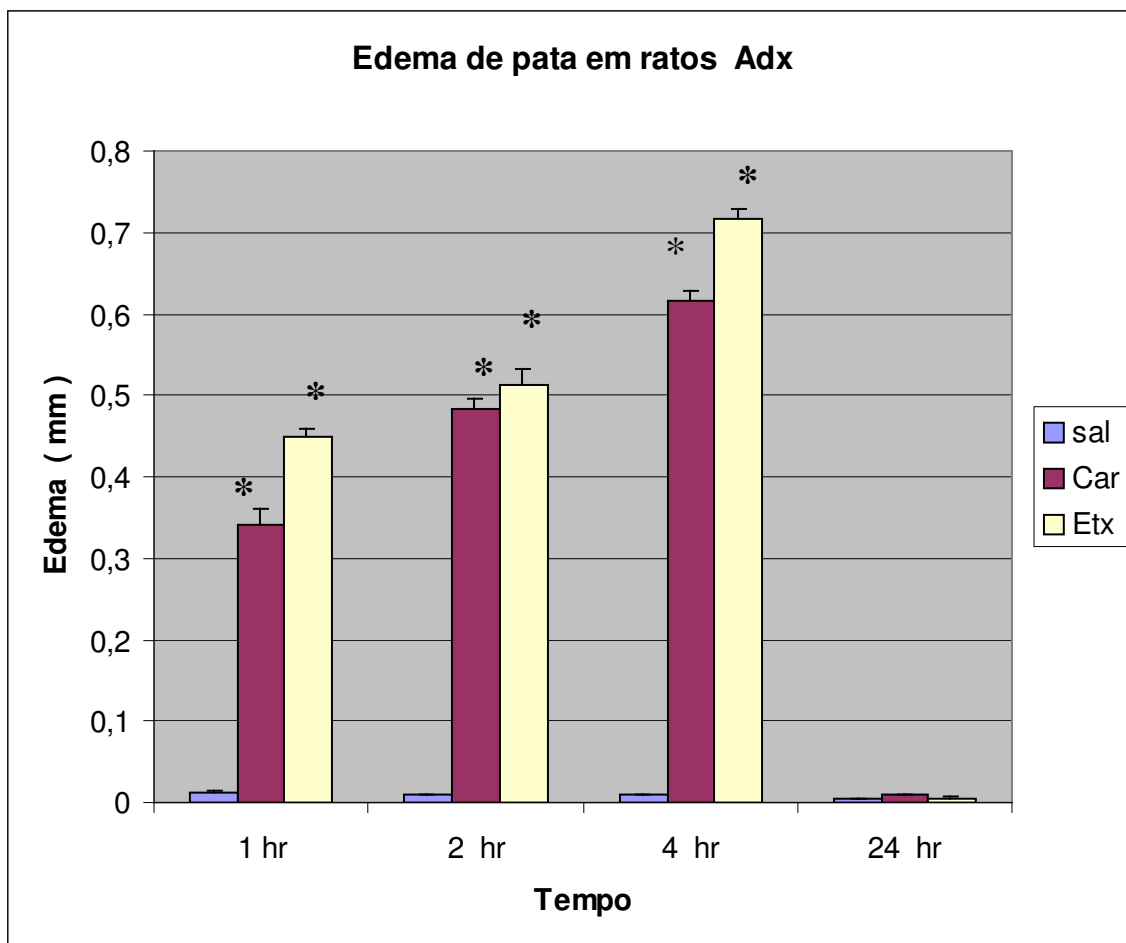
Na Figura 12 observamos os edemas de pata produzidos pela injeção de Etx e Car i.pl. na pata posterior direita do animal. Este edema foi caracterizado pelo aumento da espessura da pata, medido em mm com espessímetro Mitutoyo 2050 (Fracasso et al. 1996). Tanto a Etx como a Car foram hábeis na produção do edema que aumentou 1, 2 e 4 horas após a injeção i.pl., desaparecendo após 24 horas, como pode ser observado na Figura 12. A Etx apresentou uma potência edematogênica discretamente maior que a Car, pois os valores foram observados nas mesmas doses (100  $\mu$ g/pata/animal). O volume de injeção de salina (como controle) foi igual ao volume das soluções de ambas substâncias injetadas (0,1ml).



**Figura 12:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100  $\mu\text{g}/\text{animal}$  (Etx) carragenina 100  $\mu\text{g}/\text{animal}$  i. pl. (Car). Os controles foram injetados com salina 0,1 ml/ animal/pata i. pl. (sal) em animais normais. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM (n = 10). \*P < 0,05; comparados com os valores controle (sal).

### Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos Adx

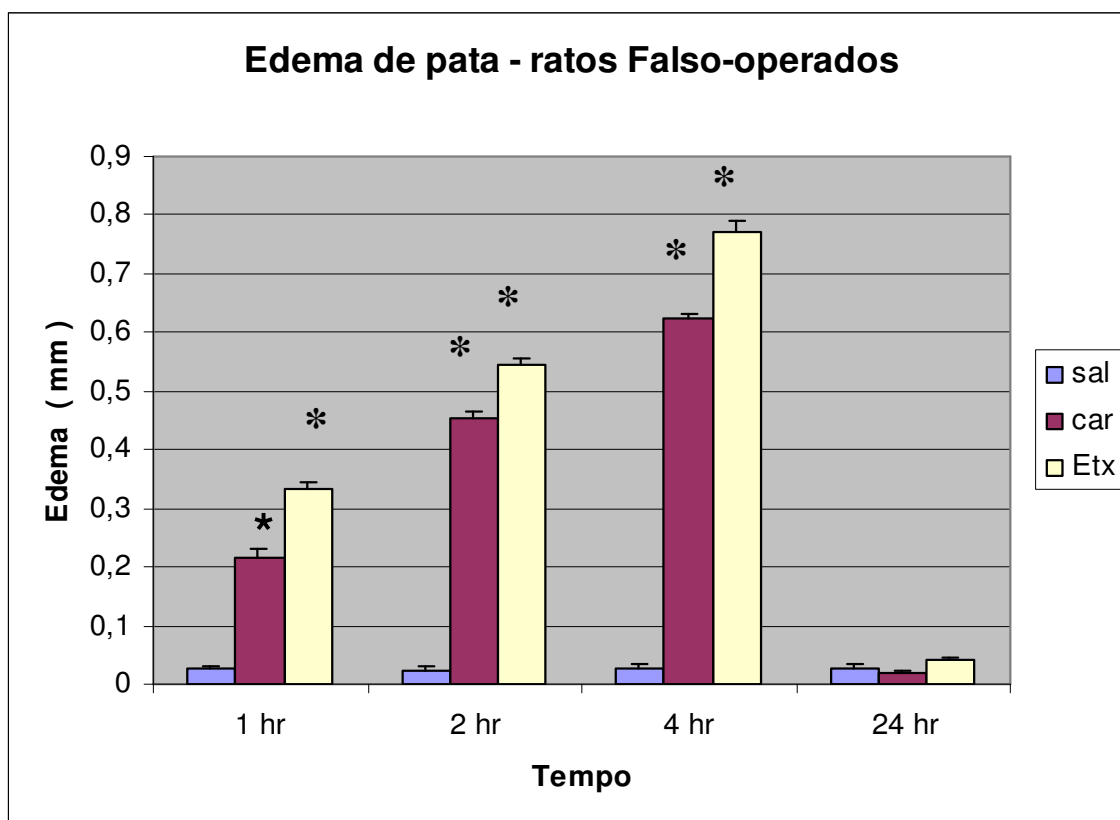
Na Figura 13 observamos que a potência edematogênica da Car e da Etx foram maiores nos ratos Adx, após a primeira hora da injeção i.pl. e não foram diferentes após 2, 4 e 24 horas se comprarmos com os animais controle da Figura 12.



**Figura 13:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100 µg/ animal i. pl. (Etx) e carragenina 100 µg/ animal i. pl. (Car). Os controles foram injetados com salina 0,1 ml/ animal i.pl. (sal) em animais Adx. Os resultados estão apresentados como a média ± EPM (n = 7). \*P< 0,05; comparados com o controle (sal).

### Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos falso-operados

Em animais falso-operados o edema produzido pela Etx e Car foram semelhantes aqueles observados nos animais controle, como podemos observar na Figura 14. A potência edematogênica da Car e Etx não foram diferentes após 1, 2, 4 e 24 horas da injeção i.pl., quando comparada com os resultados observados na Figura 12.



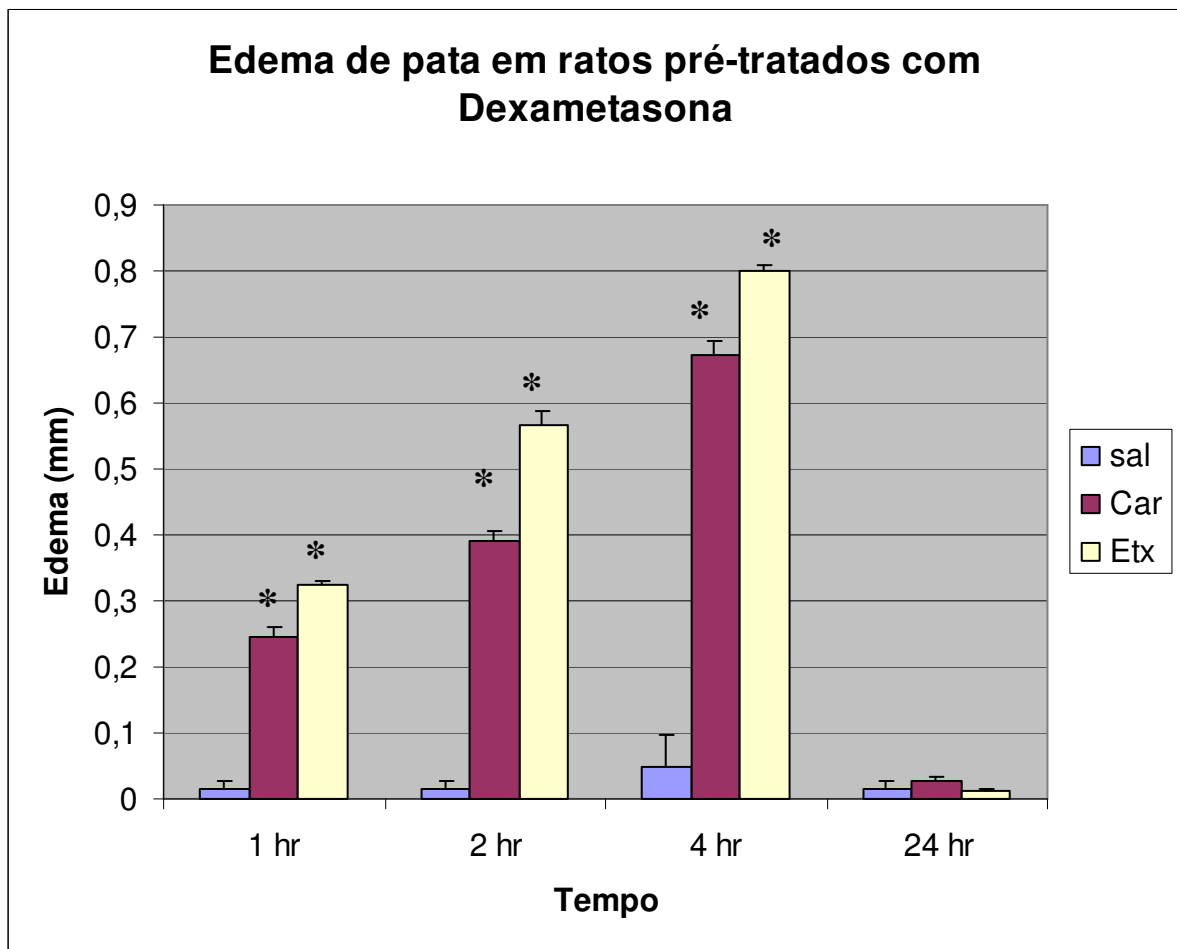
**Figura 14:** Edema de pata (mm) induzido pela injeção i. pl. de endotoxina 100 µg/ animal (Etx) e carragenina 100 µg/ animal (car). Nos controles foram injetados



salina 0,1 ml/ animal (sal) em animais falso-operados. Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM (n = 5). \*P< 0,05; comparados com o controle (sal).

### Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos pré-tratados com Dexa

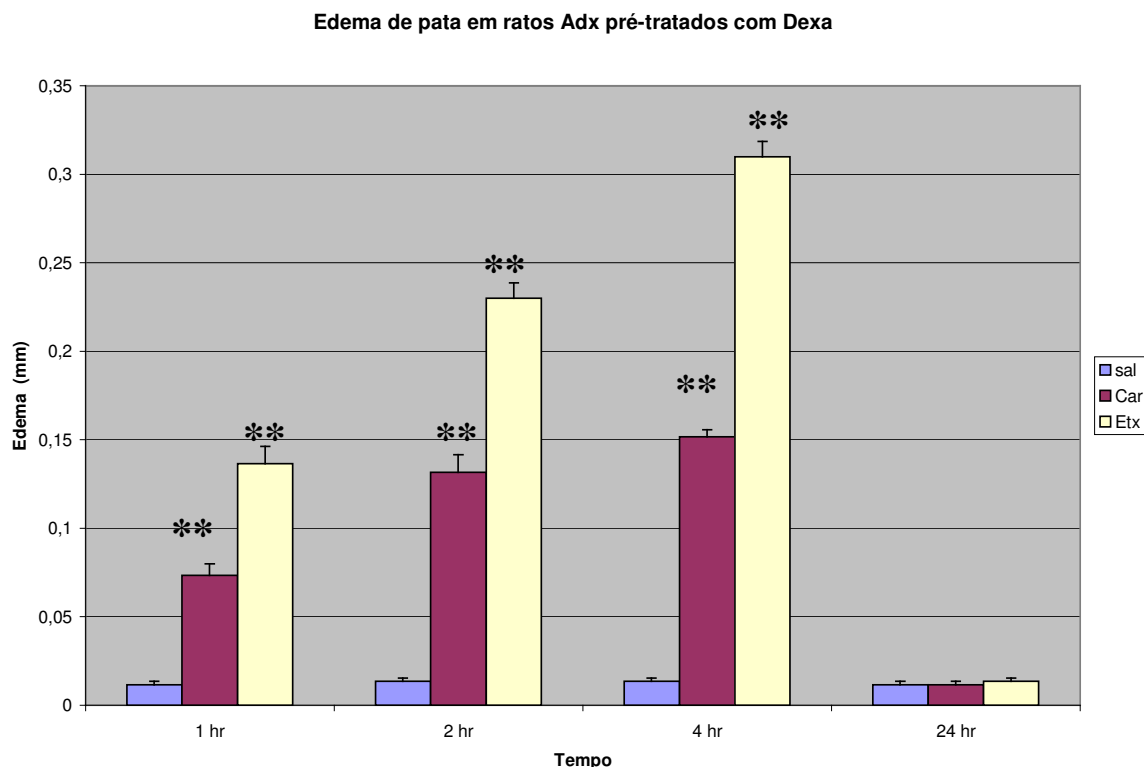
A Dexa administrada i. p. 1 hora antes da Etx e da Car i.pl. não reduziu as ações edematogênicas dessas substâncias como podemos observar na Figura 15. Este resultado se comparado com o resultado mostrado na Figura 12 não apresenta diferenças significativas.



**Figura 15:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100 µg/animal (Etx) carragenina 100 µg/ animal (Car) i.pl. (car). Os controles foram injetados com salina 0,1ml/animal i.pl. (sal). Os resultados estão apresentados como a média ± EPM (n = 5) em animais pré-tratados com Dexametasona (3 mg/kg ). \*P< 0,05; comparados com os controle (sal).

### Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos Adx pré-tratados com Dexametasona

Animais Adx pré-tratados com Dexa apresentaram uma redução significativa no edema de pata produzido pela Etx e pela Car embora o edema causado pela Etx após 1, 2 e 4 horas; tenha sido de menor amplitude conforme mostra a Figura 16. Estes valores se comparados com os valores observados em animais controle, apresentam redução, comparados com a Figura 12.

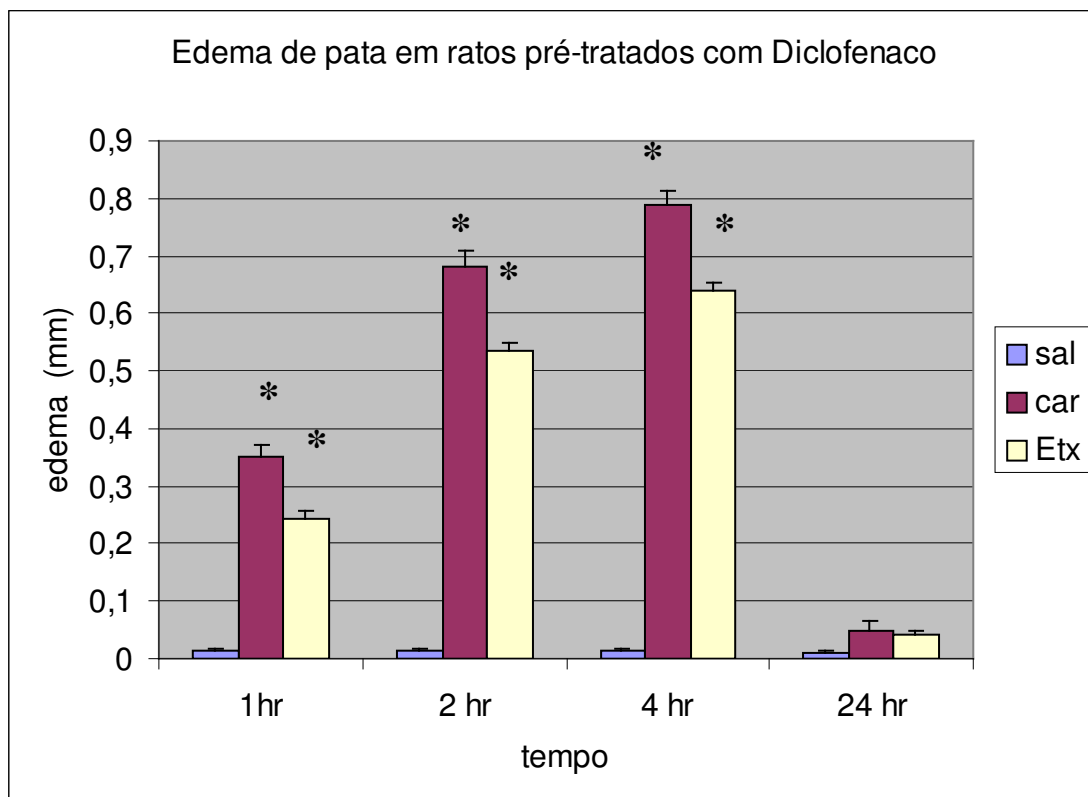


**Figura 16:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100 µg/ animal (Etx) e Carragenina 100 µg/ animal (Car) i.pl. (car). Os controles foram injetados

com salina 0,1 ml/animal i. pl. (sal). Os resultados estão apresentados como a média  $\pm$  EPM (n = 5) em animais Adx pré-tratados com Dexa (3 mg/kg i.p.). \*P< 0,05; comparados com os controles (sal).

### Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos pré-tratados com Diclofenaco

O diclofenaco alterou as respostas edematogênicas da Car e Etx, quando os animais foram pré-tratados com o Diclofenaco. A potência edematogênica da Etx foi significativamente reduzida após 1 e 4 horas da injeção i.pl. quando comparamos este efeito (Figura 17) com o efeito observado na Figura 12, não havendo diferenças após 2 horas da injeção i.pl. Em relação à potência edematogênica da Car, nestes animais, houve uma potencialização nos três intervalos de tempo analisados (1, 2 e 4 horas após a injeção i.pl.) quando comparamos os resultados observados nesta Figura 17 com aqueles da Figura 12.

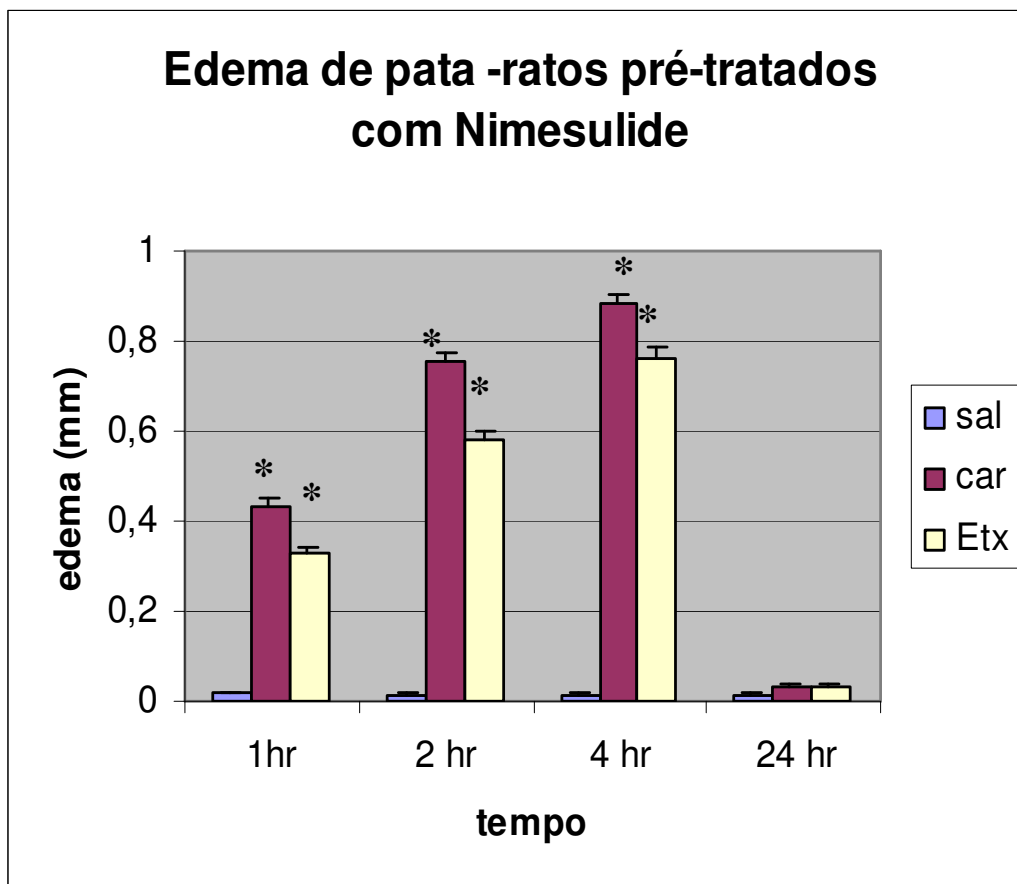


**Figura 17:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100 µg/ animal i. pl. (Etx) e carragenina 100 µg/ animal i. pl. (car) em animais pré-tratados com Diclo 60 mg/kg i.p. Os controles foram injetados salina 0,1 ml/ animal i. pl. (sal). Os resultados estão apresentados como a média ± EPM (n = 5).

\* P < 0,05 comparados com o controle (sal)

### Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos pré-tratados com Nimesulide

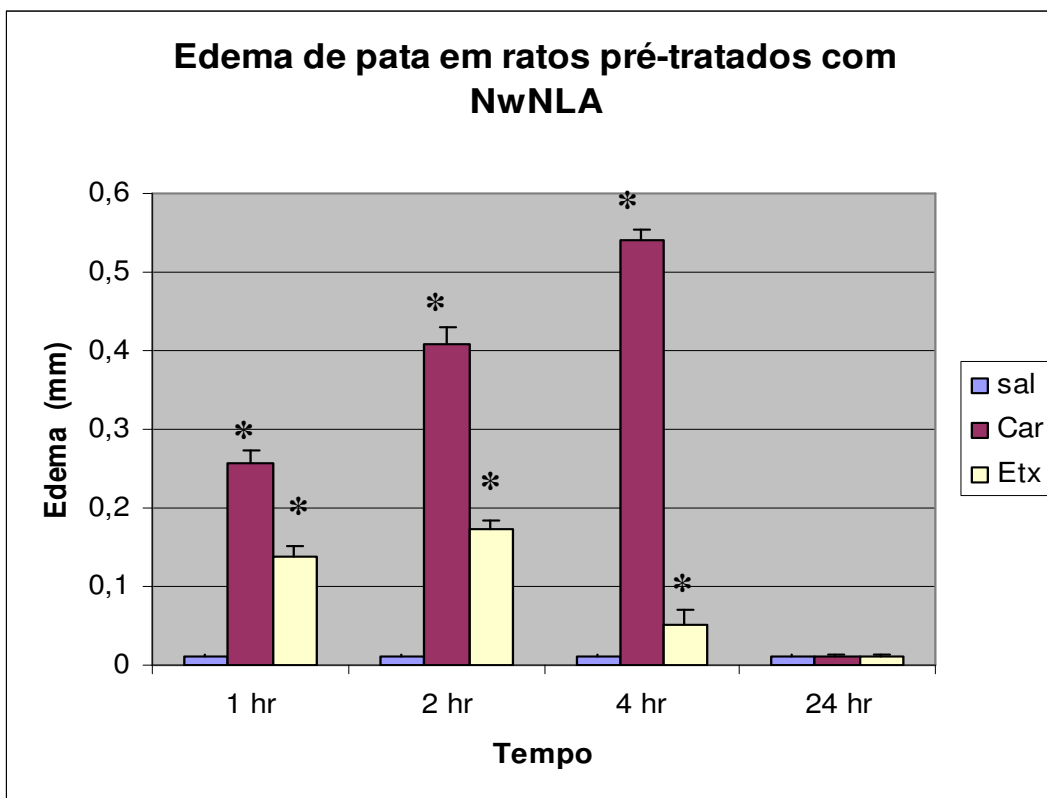
Os animais pré-tratados com Nimesulide na dose citada não modificou o edema de pata produzido pela Car ou Etx como podemos observar na Figura 18. O Nimesulide alterou as respostas edematogênicas. A potência edematogênica da Etx foi significativamente reduzida após 1 e 4 horas da injeção i.pl. quando comparamos este efeito com o observado na Figura 12, não havendo diferenças após 2 horas da injeção i.pl. Em relação à potência edematogênica da Car, neste animais, houve uma potencialização nos três intervalos de tempo analisados (1, 2 e 4 horas após a injeção i.pl.), quando comparamos os resultados observados nesta Figura 18 com aqueles da Figura 12.



**Figura 18:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100 µg/ animal i.pl. (Etx) e Carragenina 100 µg/ animal i. pl. (car). Os controles foram injetados salina 0,1 ml/ animal i. pl. (sal) em animais pré-tratados com Nimesulide 20 mg/kg i. p. Os resultados estão apresentados como a média ± EPM (n = 5). \*P< 0,05; comparados com o controle (sal).

Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos pré-tratados com NwNLA

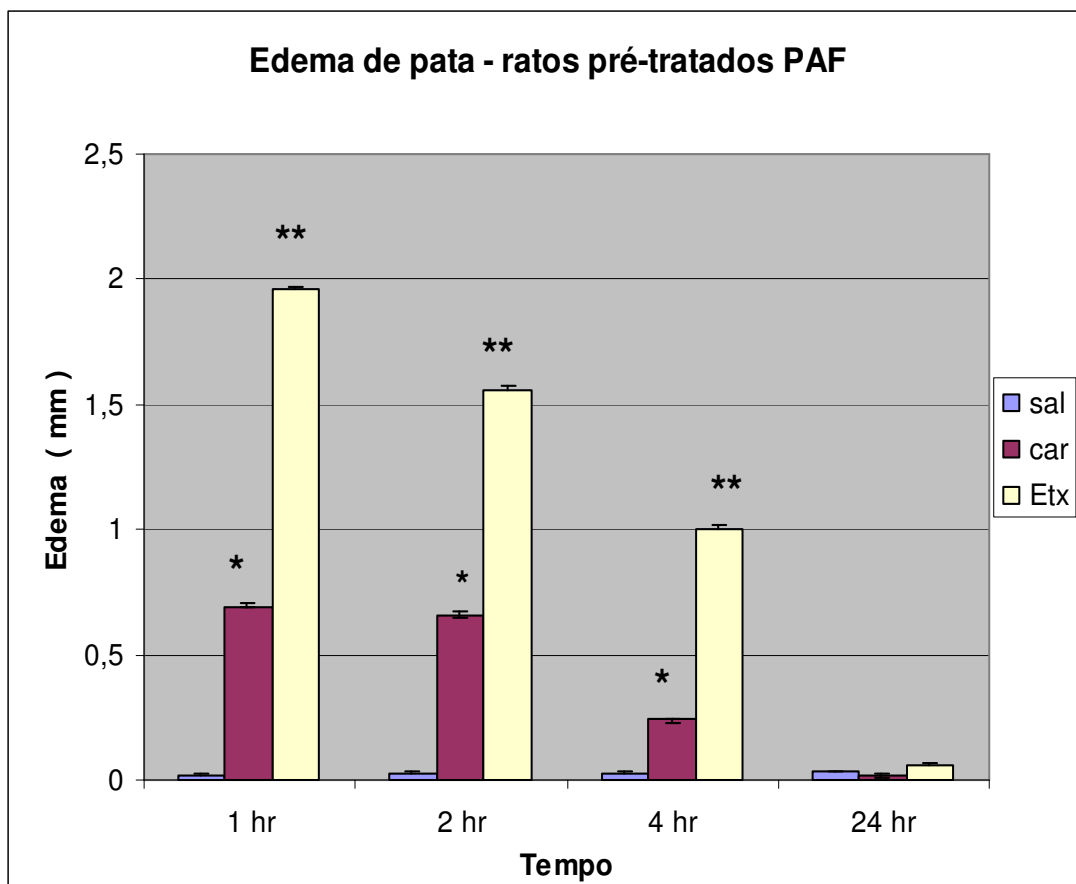
O NwNLA administrado 1 hora antes da injeção i.pl. de Etx e Car, reduziu significativamente o edema causado pela Car e em maior magnitude pela Etx como podemos observar na Figura 19. Estes resultados quando comparados com os resultados da Figura 12, demonstram uma redução acentuada da potência edematogênica da Etx (inibição).



**Figura 19:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100 µg/animal i. pl.(Etx) e carragenina 100 µg/ animal i. pl. (car). Os controles foram injetados salina 0,1 ml/ animal/pata i. pl. (sal) em animais pré-tratados com NωNLA 25 mg/kg. Os resultados estão apresentados como a média ± EPM (n = 4). \*P< 0,05; comparados com o controle (sal).

Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos pré-tratados com PAF

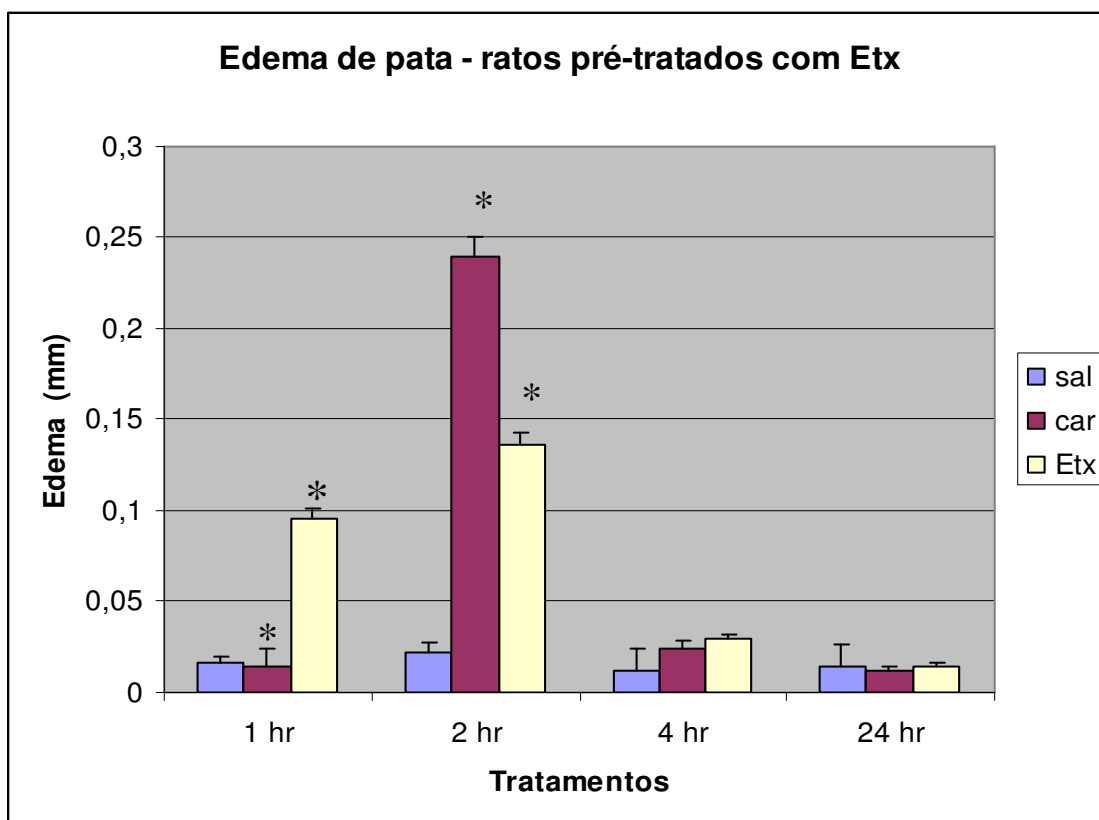
O PAF administrado 2 hr antes da indução do edema de pata aumentou significativamente o edema causado pela Car e Etx como observamos na Figura 20. Quando comparamos estes resultados com os resultados observados na Figura 12, a resposta edematogênica da Car é potencializada após 1 e 2 horas, enquanto a resposta da Etx é potencializada após 1, 2 e 4 horas da injeção i.pl..



**Figura 20:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100 µg/ animal i. pl. (Etx) e carragenina 100 µg/ animal i. pl. (car). Os controles foram injetados salina 0,1 ml/ animal/pata i. pl. (sal) em animais pré-tratados com PAF 3mg/kg. Os resultados estão apresentados como a média ± EPM (n = 4). \*P< 0,05; comparados com o controle (sal).

### Edema de pata induzido pela Etx e Car em ratos pré-tratados com Etx

A Etx administrada 2 hr antes da indução reduziu significativamente o edema de pata causado pela Car e em maior proporção pela Etx como observamos na Figura 21. Quando comparamos estes resultados com os resultados observados na Figura 12 (animais controles), podemos observar que a magnitude dos efeitos edematogênicos tanto da Car quanto da Etx estão reduzidos.



**Figura 21:** Edema de pata (mm) induzido pela endotoxina 100  $\mu\text{g}$ / animal i. pl. (Etx) e carragenina 100  $\mu\text{g}$ / animal i. pl. (car). Os controles foram injetados salina 0,1 ml/ animal/pata i. pl. (sal) em animais pré-tratados com Etx 10 mg/kg. Os resultados estão apresentados com a média  $\pm$  EPM (n =4). \*P< 0,05; comparados com o controle (sal).



## DISCUSSÃO

Uma constante e incansável busca para o tratamento da Sepsis está associada com a alta taxa de mortalidade a ela associada ( Lopez-Aguirrea and Páramo, 1999; Bernard et al, 2001). No tratamento clássico os sinais drásticos da hipotensão sistêmica, requeria a administração exógena de catecolaminas e substâncias relacionadas para elevar a pressão arterial sistêmica, melhorando indiretamente a perfusão tecidual debilitada. A reversão da hipoperfusão instalada na Sepsis porém, está limitada pela hiporreatividade associada às catecolaminas administradas exogenamente, como por exemplo a noradrenalina (Ambrósio & Fracasso, 2000). Foi demonstrado mais recentemente, que a hiporreatividade sistêmica e regional a vários agonistas adrenérgicos vasoconstritores após a administração de baixas doses de Etx é observada também em humanos (Pleiner et al, 2003). Esta hiporreatividade foi observada e talvez associada a um aumento na biosíntese e bioatividade do óxido nítrico (NO). Os mecanismos exatos que explicam esta hiporreatividade vascular ainda não são totalmente claros, mas há evidências de que o estresse oxidativo secundário ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (superóxidos) tem sido implicada em experimentos com animais (Macarthur et al, 2000) e mesmo em humanos ( Pleiner et al, 2003). O aumento dessas espécies reativas de oxigênio está presente também no processo inflamatório e essas espécies altamente reativas podem inativar mediadores biológicos, inclusive as próprias catecolaminas relacionadas com a desejável reversão da profunda hipotensão induzida nestas condições (Babior, 1992). Entretanto não é conhecido se a extensão da hiporreatividade vascular sistêmica a outros vasoconstritores durante a inflamação sistêmica aguda experimental produzida por exemplo pela

administração parenteral de Etx ocorre também em humanos ou mesmo em animais. Desse modo, como é conhecido o efeito causado pela Etx, desencadeando um quadro clínico semelhante àquele causado por uma infecção sistêmica, principalmente por bactérias Gram-negativas, é possível associarmos o envolvimento da via endógena formadora de NO, ou seja, a via L-arginina-NO com os sinais clássicos da inflamação, como a própria hipotensão e hiporreatividade aos vasoconstritores e mesmo até um aumento de sensibilidade a vários mediadores endógenos vasodilatadores, como por exemplo a Bk, que é parte do importante sistema cininas-caliceína (Calixto et al, 2000), também envolvido no processo inflamatório.

A homeostase cardiovascular deve ser mantida e alguns componentes do importante sistema da coagulação são: fator de Hageman (FH), precaliceína plasmática, fator XI e cininogênio de alto peso molecular. Este sistema é ativado pela exposição do FH à superfícies carregadas negativamente como a superfície do vidro, sulfato de dextran (DXS) ou lipopolissacarídeos de parede bacteriana como a Etx (Siebeck et al., 1994). Durante o processo de ativação do FH a precaliceína é clivada proteoliticamente a caliceína plasmática. Esta, ativa o FH por mecanismo de **feedback** positivo e também cliva o cininogênio de alto peso molecular, gerando a Bk que é um potentíssimo vasodilatador (Watchefagel et al., 1993). A Etx provoca intensa liberação de vários outros fatores relaxantes do endotélio vascular, inclusive o próprio aumento da produção e liberação do NO. (Nava et al 1991; Pohlman & Harlan, 1992).

O NO é produzido endógenamente através da conversão do aminoácido não essencial L-Arginina para Citrulina pela ação catalítica da família das sintases de óxido nítrico (NOS). Há pelo menos duas isoformas destas enzimas bem caracterizadas: a NOS constitutiva (NOSc) presente em vários

tecidos, como o endotélio vascular, camada muscular lisa dos vasos de resistência e outros; a NOS induzível (NOSi) que apresenta-se inativa em condições fisiológicas, mas que pode ser ativada por condições patofisiológicas especiais, como o próprio quadro da Sepsis quando instalado. Um nível basal de produção de NO é sugerido ser parte do mecanismo de defesa do hospedeiro frente a um agente invasor. Tem sido sugerido que a superprodução de NO nestas condições, pode estar envolvida na hiporreatividade na Sepsis, sendo que a inibição dessa superprodução de NO poderia representar uma nova opção terapêutica (Millar et al, 1997; Thithradge, 1999).

Em nosso estudo, em que avaliamos a reatividade vascular à AII ao induzirmos uma condição de inflamação experimental pela administração de Etx, observamos os sinais característicos da hipotensão que se instala entre 10 e 60 min. após a sua administração parenteral e de forma dose-dependente (respostas não mostradas) com queda do tônus vascular e da reatividade vascular à AII que pode ser observada nas Figuras 1 e 2. Neste efeito hiporreativo da AII está claro o envolvimento da via L-Arginina-NO, pois como se observa após a administração do inibidor (N $\omega$ NLA) de ambas as isoformas de NOS, 60 min. após, há uma reversão completa da hiporreatividade vascular à AII (Figura 2). Porém se considerarmos que um aumento na produção de NO é parte de uma resposta normal do hospedeiro, é preciso uma avaliação das consequências que a inibição deste sistema pelo inibidor da NOS acarreta, embora este fato não tenha sido explorado. A Etx introduzida no interior do organismo estimula também a formação e ou liberação de outros mediadores, como as citocinas (interleucina-1, fator de necrose tumoral, fator de agregação plaquetária e outros (Nava et al, 1991;

Yoshikawa et al, 1998). Um efeito que pode ser atribuído à Etx é a sua capacidade de indução da isoforma NOS<sub>i</sub> presente no endotélio vascular, causando a síntese prolongada de NO, acima dos níveis basais, levando à típica vasodilatação (hipotensão) e queda da resistência vascular à ação dos vasoconstritores. Esse comentário é pertinente quando avaliamos que o DXS, que também causa hipotensão, não produziu hiporreatividade à AII (Figura 3). O DXS é um polissacarídeo que apresenta uma superfície carregada negativamente, portanto induz a ativação do FH e conseqüente ativação da cascata da coagulação. A influência destes efeitos do DXS não foram exaustivamente abordados no presente estudo. A infusão endovenosa de DXS induziu hipotensão arterial (Lecomte and Damas, 1968) por nós confirmada. Em nosso modelo de choque séptico induzido pel Etx, observamos a hipotensão acompanhada de hiporreatividade à AII, enquanto que a hipotensão induzida pelo DXS não foi acompanhada de hiporreatividade à AII. (Figura 3). Não aprofundamos estudos para elucidar este fato, porém é possível avaliarmos que apesar de ambos polissacarídeos (Etx e DXS) apresentarem algumas propriedades comuns eles apresentam diferenças mecânicas que merecem ser melhor investigadas. É possível haver o envolvimento de outros fatores vasculares e sistêmicos que justifiquem estas diferenças. Num outro modelo experimental em porcos, foi demonstrado que a hipotensão induzida pelo DXS em animais normais ocorre pela liberação de Bk e estimulação de receptores B<sub>2</sub>, que foi prevenida pelo antagonista seletivo de B<sub>2</sub>, HOE-140 (Hock et al., 1991) em dose de 30 µg/kg (Siebeck et al., 1994). Neste estudo os autores demonstraram que a hipotensão arterial pode ser também mediada pela estimulação de receptor B<sub>1</sub> que pode ser expressado e induzido pela Etx

(Schimid et al., 1998), já que não estão presentes normalmente nos tecidos em condições fisiológicas.

As cininas como a Bk e seu derivado Lys-BK e outros metabólitos biologicamente ativos são importantes mediadores de várias respostas fisiológicas e patológicas do sistema cardiovascular. As ações fisiológicas deste sistema cininas-caliceína são produzidas pela Bk e Lys-Bk formadas pela clivagem proteolítica do cininogênio plasmático de alto peso molecular ou tecidual que são metabolizados e desativados pela cininase I ou cininase II, essa também denominada de enzima conversora de AI em AII. As cininas produzem seus efeitos via ativação de receptores  $B_1$  e  $B_2$ . O receptor  $B_2$  é constitutivamente expressado e medeia a maioria das ações vasculares agudas da Bk endógena (Schimid et al., 1998). Em contraste, o receptor  $B_1$ , geralmente está ausente em vários tecidos, mas após um estímulo inflamatório, a expressão deste receptor é induzida em vários tipos celulares, incluindo células musculares lisas vasculares, células endoteliais e fibroblastos (MacLean et al., 2000).

O emprego de inibidores da via L-Arginina-NO foi eficaz, como anteriormente citado. Os inibidores da NOS são derivados da própria L-Arginina sendo que o L-NAME tem sido sugerido eficaz em inibir indistintamente as duas isoformas desta enzima. Como demonstramos, o N $\omega$ NLA que é um inibidor mais seletivo para a isoforma NOS<sub>i</sub>, reverteu completamente a hiporresponsividade à AII, sugerindo que esta isoforma está implicada nesta ação. Porém, há uma questão em aberto: os inibidores da NOS revertem a hipotensão e a hiporreatividade vascular, porém eles não protegem o animal destes efeitos, quando são administrados antes da indução do quadro da Sepsis pela Etx (resultados não mostrados).

Para avaliarmos o envolvimento de hormônios glicocorticóides (HGC) na hipotensão e na hiporreatividade vascular no nosso modelo de Sepsis induzido pela Etx, empregamos dois procedimentos. No primeiro avaliamos os efeitos causados pela adrenalectomia bilateral na responsividade à AII, onde removemos a fonte endógena importante, geradora de HGC fisiológica da região cortical das glândulas adrenais. Na Figura 4 observamos que os ratos Adx normalmente são hiporreativos à AII, quando comparados com animais controles (Figura 2). Observamos que as variações da PAM foram diferentes entre os grupos controle e Adx, antes da Etx; permitindo portanto a associação de uma provável relação entre a hipotensão e a adrenalectomia. Após a Etx, o tônus vascular basal atingiu níveis menores; a reatividade vascular à AII estava reduzida e adicionalmente, após o tratamento dos animais com N $\omega$ NLA não houve reversão do tônus e nem da hiporreatividade à AII comparadas com o controle. É possível que a reversão pelo N $\omega$ NLA depende da integridade das adrenais. Para afastarmos a possibilidade de que o ato cirúrgico de adrenalectomia pudesse interferir nas respostas avaliadas, na Figura 5 observamos que animais falso-operados (Sham) apresentaram o mesmo comportamento que os animais controle mostrados na Figura 2. Considerando que a porção cortical das adrenais responsável pela biosíntese de HGC, procuramos avaliar os efeitos da Dexa nos animais Adx. Observamos na Figura 7 que houve reversão do tônus e da reatividade vascular à AII, implicando desse modo uma relação entre a via L-arginina-NO com a via dos HGC. Estes efeitos foram semelhantes aos efeitos da Dexa em animais controle como pode ser comparado com as respostas da Figura 6. Porém, animais Adx pré-tratados com Dexa antes da administração da Etx,

não foram protegidos da hipotensão e da hiporreatividade vascular à AII e não apresentaram reversão pelo NωNLA (resultados não-mostrados).

Os animais falso-operados não apresentaram nenhuma modificação nas respostas vasculares à AII, nas condições controle, após Etx e mesmo na reversão após NωNLA (Figura 4). Este procedimento foi feito para que se afastasse possível hipótese acerca de que após a cirurgia de remoção bilateral das glândulas adrenais, apenas o ato cirúrgico viesse a causar alguma alteração no tônus basal e na reatividade vascular, por uma reação inflamatória inespecífica.

Afim de explorarmos mais o envolvimento dos glicocorticóides, um grupo de animais foi pré-tratado com Dexa 2 horas antes do experimento. Os animais controle e pré-tratados com Dexa não apresentaram diferenças significativas na hipotensão induzida pela Etx e nem na reversão da hiporreatividade causada pelo NωNLA (Figura 5). O mesmo ocorreu com os animais Adx pré-tratados com Dexa. É possível que nos animais Adx a Dexa tenha sido responsável pela reversão da reatividade vascular à AII (Figura 6) ausente em animais apenas Adx (Figura 3).

Em outros estudos (Ambrósio & Fracasso, 2000) mostraram que a Dexa preveniu a hiporreatividade à Noradrenalina, mas não à hipotensão que se manteve após o tratamento com este antiinflamatório corticóide, mas não foi hábil em reverter o processo após instalado. No nosso estudo a Dexa foi parcialmente eficaz, porém ela impediu que o NωNLA produzisse a reversão da hipotensão e da hiporreatividade à AII, como o que ocorreu nos animais controle. Já havia sido sugerido o uso de glicocorticóides na Sepsis, mas há observações conflitantes a este respeito. Sugere-se que os efeitos benéficos dos glicocorticóides na Sepsis sejam dependentes do momento adequado que

sejam administrados, pois como observamos, eles previnem os sinais e sintomas, mas não os revertem após instalados (Paya, 1993). O mais provável é que outros fatores ainda desconhecidos estejam envolvidos. Nem mesmo o  $\text{N}\omega\text{NLA}$  foi eficaz em prevenir ou mesmo reverter a hipotensão e a hiporreatividade à AII nos animais Adx (Figura 3), mesmo porque nesses animais os efeitos da Etx são mais pronunciados (aumento de sensibilidade à Etx), quando comparados com os animais controle ou mesmo com os animais falso-operados (Figura 5). Os HGC endógenos, bem como exogenamente administrados agem para modular os mecanismos de defesa naturais do hospedeiro, que normalmente são desencadeados após um estímulo inflamatório, prevenindo consequências mais drásticas na homeostasia (Paya et al., 1993).

A injeção e.v. de dose subletal de Etx (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) estimula a síntese de Cox, resultando num aumento de 4 vezes na produção de prostaglandinas (PG). A restauração dos HGC com Dexametasona (Dexa), inibe completamente a elevação da Cox e protege estes animais da morte induzida pela Etx em doses letais (Michie et al., 1988). A Dexa não afeta a atividade da Cox constitutiva. Esses dados indicam a existência de Cox constitutiva que está normalmente presente em mastócitos e outros tecidos e que não é afetada pelos esteróides e uma isoforma Cox induzível que é expressada somente na inflamação e é modulada pelos HGC. A depleção dos HGC ou a presença de um estímulo inflamatório com a Etx causa uma rápida indução desta isoforma resultando numa resposta inflamatória exacerbada que pode ser letal (Masferrer et., 1992).

Os AINES como o Diclofenaco (Diclo) e o Nimesulide (Nime), não modificaram o tônus e nem as respostas vasculares à AII e não interferiram nos efeitos de reversão do tônus basal e da reatividade produzidos pelo



N $\omega$ NLA (Figuras 8 e 9 respectivamente) que permaneceram semelhantes aos animais controle (Figura 2). Observações semelhantes haviam sido feitas para outro AINE, a Dipirona, em relação aos efeitos vasculares da Noradrenalina (Ambrósio e Fracasso, 2000). O processo inflamatório sistêmico desenvolvido pela Etx na Sepsis envolve a ativação da via fosfolipase-ácido araquidônico levando a ativação das Cox<sub>1</sub> e Cox<sub>2</sub>, com a consequente formação de seus derivados: prostaglandinas (PG), leucotrienos e tromboxanos ( Goodman & Gilman`s, 2002), que portanto estariam sujeitos às ações dos AINES, fato este que não pudemos confirmar neste modelo. Está proposto que o Diclo apresenta afinidade maior pela Cox-1 embora tenha uma discreta afinidade para a Cox<sub>2</sub>; já o Nime, apresenta uma afinidade inversa, maior para Cox<sub>2</sub> e menor para Cox<sub>1</sub> (Goodman & Gilman`s, 2002). Como esses AINES não reduziram e nem reverteram a hipotensão e a hiporreatividade vascular à AII neste nosso modelo de Sepsis, tanto em animais controle, quanto em animais Adx (Figuras 8 e 10), o mais provável é que outros fatores importantes estejam envolvidos nesta prevenção ou reversão.

Nos animais adrenodemedulados procuramos avaliar especialmente o envolvimento da liberação de catecolaminas endógenas na hipotensão e hiporreatividade à AII no estudo. Porém observamos na Figura 11 que não foi significativo o efeito da remoção da medula das glândulas adrenais, quando comparamos com as respostas dos animais controle (Figura 2) e conseqüentemente, a reversão da hiporreatividade vascular à AII não está relacionada a síntese e/ou liberação destas substâncias endógenas vasoconstritoras. Portanto, se houver alguma participação ela é muito discreta e não foi amplamente explorada neste estudo.

A Sepsis pode ser considerada como uma reação inflamatória sistêmica, com múltiplo envolvimento de mediadores (Klosterhalfen and Bhadhvaj, 1998). Com isso tornou-se complexo um estudo mais amplo destes envolvimento, levando-se a buscar modelos mais compartimentalizados com maior possibilidade de controle, mas capazes de fornecerem informações possíveis de serem amplificados.

Desse modo, nos experimentos que envolveram o estudo do edema de pata, procuramos avaliar a extensão das reações inflamatórias regionais causadas pela injeção i. pl. de Carragenina (Car) amplamente conhecida como edematogênica (Lalenti et al, 1992; Lazarini et al, 1996; Fracasso et al, 1996; Thitheradge, 1999) e muito útil em vários estudos de hiperalgesia e inflamação por sua habilidade em causar injúria tecidual local e a Etx que injetada localmente apresenta propriedades semelhantes à Car. A injeção i.pl. de Etx ou Car, desencadeia uma resposta local cuja análise pode ser extensiva, guardadas as devidas proporções, de forma sistêmica. Foi sugerido que a injeção i.pl. de Etx, semelhantemente a Car produza o desenvolvimento de um edema mensurável pelo volume (plestimógrafo) ou mesmo pela variação da espessura da pata com espessímetro Mitutoyo 2050 (Fracasso et al, 1996). O edema pode se desenvolver sob duas fases temporais distintas: uma fase rápida (até 75 min. após a injeção) e outra fase mais lenta ( de 75 min. a 7 horas após a injeção) [Fracasso et al, 1996)]. Foi sugerido que na fase aguda a formação de PG parece estar envolvida em maior proporção no edema (Fracasso et al, 1996), pois a Dipirona e a Indometacina (AINES com maior afinidade para Cox-1) antagonizaram parcialmente estes efeitos, enquanto a fase tardia foi resistente a estas drogas. É provável que a ativação da cascata das cininas pela Etx e Car induzam a liberação de outros mediadores que

podem estar envolvidos na fase tardia . Em nossos experimentos de edema de pata, avaliamos a capacidade edematogênica da Etx e da Car 1, 2, 4 e 24 horas após a injeção i.pl. Em todos os protocolos houve a formação de edema após a primeira, segunda e quarta hora, com reversão ao volume basal da pata injetada após as 24 hs. Para avaliarmos a extensão do edema utilizamos vários procedimentos. Nos animais controle, a potência edematogênica da Etx foi cerca de 15-20% maior que a Car nos tres intervalos de tempo mensurados ( 1, 2 e 4 horas retornando aos valores basais após 24 horas (Figura 12). Os edemas foram significativamente maiores que a injeção i. pl. de NaCl (0,15 M). O edema causado pela Car em outro protocolo estudado, foi caracterizado por uma fase rápida (1 – 2 horas) seguida por uma fase tardia (3 – 4 horas) [DiRosa, 1991]. Nós estudamos a evolução temporal do edema de pata induzido pela Etx e pela Car, onde mostramos algumas semelhanças de efeitos edematogênicos, que aumentam até a quarta hora e desaparecem após 24 hrs. É possível que este edema seja desencadeado pela ação inflamatória local da Car e da Etx com a liberação de mediadores inflamatórios capazes de aumentarem a permeabilidade vascular com consequente extravazamento de constituintes plasmáticos (Goodman & Gilman`s, 2002).

Como o edema é um dos sinais do processo inflamatório, no edema de pata procuramos avaliar a influência de drogas antiinflamatórias. Embora a dipirona tenha inibido de forma dose-dependente o edema induzido pela Etx (Fracasso et al, 1996), nossos resultados não foram idênticos, quando usamos outros AINES como mostram as Figuras 15, 16, 17 e 18. Nos animais controle pré-tratados, o Diclo ou Nime não interferiram na evolução temporal do edema causado tanto pela Car quanto pela Etx (Figuras 17 e 18). É possível que a dose de Etx que empregamos (100 µg) por pata, maior que a empregada

por Fracasso et al, 1996 (2,5 µg) possa ter influenciado. Nenhuma alteração significativa foi observada nos animais controle pré-tratados com Dexa (Figura 15), um potente AIES.

Não foi possível avaliarmos substancialmente a influência das glândulas adrenais no edema, mas nos animais Adx (Figura 13), observamos discreta redução nas diferenças de potência edematogênica em favor da Etx, quando comparada à Car e com os animais controle (Figura 12). Nestes protocolos onde exploramos o envolvimento dos HGC, nos animais Adx pré-tratados com Dexa, observamos diferenças significativas (Figuras 15 e 16).

Para afastarmos a hipótese de que o ato cirúrgico da adrenalectomia pudesse produzir reações **per si** neste modelo, animais falso-operados foram utilizados e tiveram respostas semelhantes aos animais controles (Figura 14), sugerindo que após os 5-6 dias da cirurgia, ou falsa cirurgia, os animais apresentam condição fisiológica basal.

Adicionalmente, estudamos o envolvimento do NO endógeno na produção do edema, empregando o inibidor da enzima NOS, N $\omega$ NLA e também procedimentos cirúrgicos como a adrenalectomia. O L-NAME, inibidor de ambas isoformas de NOS inibiu o edema de pata induzido pela Car (Lalenti, 1992), mas o N $\omega$ NLA não foi capaz de bloquear este edema, porém inibiu parcialmente o edema induzido pela Etx em nosso estudo (Figura 17). Em nossos experimentos o N $\omega$ NLA foi administrado por via i. p., enquanto nos experimentos de Lalenti (1992) e Fracasso et al (1996) a injeção foi i.pl. Como os resultados não foram semelhantes, isto sugere que outros mediadores endógenos devem estar envolvidos no mecanismo destes edemas e que há diferenças entre eles para a Etx e a Car.

A Etx induz diretamente a Cox<sub>2</sub> (Mitchell et al, 1994) e a indometacina tem atividades inibidora menos seletiva para Cox<sub>2</sub> e mais seletiva para Cox<sub>1</sub> (Vane, 1994). Entretanto, as evidências sugerem que as potências dos AINES como inibidores de Cox<sub>1</sub> e Cox<sub>2</sub>, variam de espécie para espécie animal (Mitchell et al, 1994). A indometacina representa uma notável exceção, pois é o AINE mais potente empregado nos testes inflamatórios nos ensaios de inibição enzimática em ratos (Insel, 1996). Fujii et al (1996) investigaram a participação do NO e das PG mediando o aumento da permeabilidade vascular induzido pela Etx. Devido a Cox<sub>2</sub> estar induzida na migração celular no estímulo inflamatório e por citocinas, é atrativo sugerir que as ações inflamatórias da Etx podem ser devidas a ativação da Cox<sub>2</sub>. É possível que a síntese de PG seja importante na fase rápida das primeiras 4 horas onde o edema aumenta e a síntese de NO está aumentada, conforme proposto por Fracasso et al., 1996.

Para avaliarmos a participação dos HGC na gênese e/ou reversão do edema de pata utilizamos ratos Adx e o pré-tratamento com a Dexa, um AIES. Nos animais Adx tanto a Etx quanto a Car apresentaram um aumento no edema após 1 hora (Figura 13), quando comparamos estas respostas com as respostas da Figura 12 (animais controle). A Dexa inibiu parcialmente o edema induzido pela Etx e em menor extensão aquele induzido pela Car nos animais Adx pré-tratados (figura 16, quando comparados com animais controle (Figura 12). Para descartarmos a possibilidade de que o ato cirúrgico da adrenalectomia **per se** pudesse estar afetando o edema, procedemos o uso de animais falso-operados (Sham) [Figura 14]; que não mostraram diferenças quando comparados com os ratos controle (Figura 12). Deste modo, observamos que as glândulas adrenais, principalmente o cortex (relacionado

aos HGC) são importantes e estão relacionados com a evolução do edema, pois animais Adx tratados com dexta apresentaram significativa diminuição na evolução do edema.

Curiosamente, animais controle pré-tratados com Etx i.p. 2 horas antes da injeção i.pl. de Car e Etx, apresentaram uma redução significativa do edema, em todos os três intervalos de tempo analisados (1, 2 e 4 horas), sugerindo assim que a Etx promova a liberação localizada de mediadores da injúria tecidual local causada por esses agentes edematogênicos (Figura 21).

Por outro lado, animais controles pré-tratados com fator de agregação plaquetária (PAF), apresentaram uma potencialização nos efeitos edematogênicos significativamente maiores para a Etx comparados com a Car (Figura 20). O PAF contribuiu para o aumento do edema, provavelmente pelo aumento ou exacerbação da liberação de mediadores edematogênicos (Yoshikawa, et al., 1994).

O emprego de antagonistas de receptores de cininas foi proposto como um novo procedimento para o tratamento da dor inflamatória (Belichard et al, 2000). Esses investigadores avaliaram o envolvimento de cininas e mediadores álgicos no modelo de dor inflamatória induzida pelo edema de pata induzido pelo zimosan, onde [Leu<sup>8</sup>] des-Arg<sup>9</sup>-Brdicininina, antagonista de receptor B<sub>1</sub> da Bk, foi capaz de inibir a hiperalgesia produzida pelo zimosan em ratos (Belichard et al, 2000). Desse modo confirmou-se fortemente o envolvimento das cininas liberadas no processo inflamatório, portanto a busca de drogas antagonistas dos receptores envolvidos nessa via adicionalmente, tornou-se um alvo tentador (Calixto et al, 2000). Esses aspectos não foram por nós abordados. Em nossos experimentos, não

avaliamos de forma sistemática o envolvimento desta via, no entanto em próximas etapas desta linha de pesquisa tornam-se muito desejáveis.

As ações biológicas do PAF são complexas (Yoshikawa, 1988). Foi proposto que a Etx, além de estimular a formação de citocinas e reproduzir muitos dos fenômenos cardiovasculares na Sepsis tanto em animais como no homem, ela pode causar relaxamento vascular e hipotensão, sugerindo que o bloqueio de seus receptores pode atenuar esses efeitos, embora esta avaliação tenha sido feita em outro modelo experimental (Yoshikawa, 1988). No nosso modelo de edema de pata o pré-tratamento dos animais com PAF acentuou discretamente o efeito edematogênico da Car enquanto acentuou drasticamente o edema induzido pela Etx (Figura 20) quando comparados com animais controle (Figura 12). Não encontramos uma justificativa plausível para este fato. Por outro lado, o pré-tratamento dos animais com Etx i.p. com dose semelhante a do PAF, causou uma redução significativa da potência da Car e mais acentuada redução desta potência edematogênica da Etx i.pl. (Figura 21). É provável que o pré-tratamento 1 hora antes com a Etx i.p. leve a uma mobilização de mediadores locais mais eficazes e preventivos da reação inflamatória edematogênica local.

Portanto, concluímos que a hipotensão e a hiporreatividade vascular à AII causadas pela Etx no nosso modelo de Sepsis apresenta algumas semelhanças de efeitos, frente a outros mediadores vasoconstritores, como a Nor, envolvem a via L-Arginina-NO, são parcialmente afetadas pelos HGC não sendo afetadas pelo Diclofenaco e nimesulide que no processo inflamatório avaliado no modelo de edema de pata causado pela Etx e pela Car i.pl. apresentam mecanismos edematogênicos diferentes, onde a Etx está relacionada em maiores proporções com a maior produção de NO; sendo

pouco afetados pelos AINES e HGC, enquanto são amplamente influenciados pelo PAF administrado exógenamente.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSIO, A. E.; FRACASSO, J. F. - Efeito do  $\text{N}\omega\text{NLA}$  ou Dexametasona, na hiporreatividade induzida pela endotoxina de *E. coli*, em ratos adrenalectomizados ou falso-operados. **Rev. Ciênc. Farm.** 21 (2):265-275, 2000.

BABIOR, B.M. - The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** 65: 49-95, 1992.

BELICHARD, P.; LANDRY, M.; FAYE, P.; BACHVAROV, D. R.; BOUTHILLIER, J.; PRUNEAU, D. & MARCEAU, F. – Inflammatory hyperalgesia induced by zymosan in plantar tissue of the rat: effect of kinin receptor antagonists. **Immunopharmacology** 46: 139-147, 2000.

BEN-ARI, E. T. ; GARRISSON, J. C. – Regulation of angiotensinogen mRNA accumulation in rat hepatocytes. **Am. J. Physiol.**, 255: E70-E79, 1988.

BERNARD, G. R.; VINCENT, J.L. & LATERRE, H. – Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. **N. Engl. J. Med.** 344: 699-709, 2001.

BUMPUS, F. M. et al., et al., - Nomenclature for angiotensin receptors. A report of the nomenclature committee of the council for high blood pressure research. **Hypertension** 17 : 720-721, 1991.

CALIXTO, J. B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J. and CAMPOS, M.M. kinins in pain inflammation. **Pain** 87: 1-5, 2000.

CAMPBELL, D. J. & HABENER, J. F., -Angiotensinogen gene is expressed and differentially regulated in multiple tissues of rat. **J. Clin. Invest.** 78: 31-39, 1986.

CASSIS, L. A. et al., Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. **Hypertension** , 11: 591-596, 1988.

CAULFIELD, M. et al., Lincage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. **N. Engl. J. Med.** 330: 1629-1633, 1994.

CHIU, A. T. et al., - Identification of angiotensin II receptor subtypes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 165: 196-203, 1989.

Di-ROSA, M.; GIROUD, J.P. and WILLOUGHBY, D.A. Studies of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **J. of Pathology** 104: 15-21, 1991.

DZAU, V. J. – Vascular renin-angiotensin system and vascular protection. **J. Cardio-vasc. Pharmacol.** 22 Suppl. 5: S1-S9, 1993.

DZAU, V.J.; SAMURA, H. and HEIN, L. Heterogeneity of angiotensin synthetic pathways and receptor subtypes: physiological and phamacological implications. **J. Hypertens.** 11: 513-518, 1993.

FERRARIO, C.M.; BRONSNIHAN, K.B.; DIZ, D.I.; JAISWAL, N.; KHOSLA, M.C.; MILSTED, A. and TALLANT, E. A. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. **Hypertension**, 18: 111-133, 1991.

FERRARIO, C.M.; LI, P. & BRONSNIHAN, K. B. Nonpeptide angiotensin II antagonist losartan inhibits thromboxan A<sub>2</sub> – induced contractions in canine coronary arteries. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 281:1065-70, 1997.

FLOHÉ, S. et al., Time course of IL-6 and TNF- $\alpha$  release during endotoxin-induced tolerance in rats. **Biochem. Pharmacol.** 41: 1607-1614, 1991.

FRACASSO, J. F.; NUNES DE SOUZA, R. L.; TEIXEIRA, C. E.; CASTRO, R. C.; LEPERA, E. Z. P.; SILVA, R. F. P. Effect of Dipyrone, L-NAME and L-arginine on endotoxin-induced rat paw edema. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 29, p. 1543-1548, 1996.

FUJII, E. ; IRIE, K.; OGAWA, A. ; OHBA, K. & MURAKI, T. Role of nitric oxide and prostaglandins in lipopolysaccharide-induced increase in vascular permeability in mouse skin. **Eur. J. Pharmacology** 297: 257-263, 1996.

Goodman & Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics**  
**11 th edn, McGraw-Hill, New York, 2002.**

GRAY, G. A. et al., -An L-arginine-derived factor mediates endotoxin-induced vascular hyposensitivity to calcium. **Eur. J. Pharmacol.**, 191: 89-92, 1990.

GRYGLEWSKI, R.J.; BOTTING, R.M. and VANE, J.R. Mediators produced by endothelial-cell. **Hypertension** 12: 530-548, 1988.

HALL, J. E. et al., - blood pressure and renal function during chronic changes in sodium intake: role angiotensin. **Am. J. Physiol.** 239: F271-F280, 1980.

Hata, A. Et al. -Angiotensinogen a risk factor for essential hypertension in Japan. **J. Clin. Invest.** 93: 1285-1287, 1994.

INSEL, P.A. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: Hardman, J.G., Gilman, A. G. & Limbrid, L.E. (Editors), Goodman & Gilman's **The Pharmacological Basis of Therapeutics 9 th edn, McGraw-Hill, New York, 1996.**

JEUNEMAITRE, X. et al., Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. **Cell**, 71: 169-180, 1992.

KAGEYAMA, R. et al. - Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. **Biochemistry**, 23: 3603-3609, 1984.

KAMBAYASHI, Y. et al. – Molecular structure and function of angiotensin type 2 receptor. **Kidney Int.** 46: 1502-1504, 1994.

KILPATRICK-SMITH, L. & ERECINSKA, M., Cellular effects of endotoxin “in vitro”. **Circ. Shock.**, 11: 85-99, 1990.

KIMURA, S. et al., High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. **EMBO, J.** 11: 821-827, 1992.

KLOSTERHALFEN, B.; BHARDHWAJ, R. J. – Septic shock. **Gen. Pharmac.** 31: 25-32, 1998.

LALENTI, A.; IANARO, A.; MONCADA, S. & DI-ROSA, M. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur. J. Pharmacology** 211: 15-21, 1992.

LINZ, W. & SCHOLKENS, B. A., role of bradykinin in the cardiac effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** 20 Supp. 9: S83-S90, 1992.

LÓPEZ-AGUIRREA, Y. & PÁRAMO, J. A. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. **Thromb. Res.**, 94: 95-101, 1999.

MACARTHUR, H.; WESTFALL, T. C.; RILEY, D. P.; MISKO, T. P. & SALVEMINI, D. – Inactivation of catecholamines by superoxide gives new

insights on the pathogenesis of septic shock. **Proc. Natl. Acad. Sci USA** 97: 9753-9758, 2000.

MITCHELL, J.A.; AKARASEREENONT, P., THIEMERMANN, G.; FLOWER, R.J. & VANE J.R.. Selectivity of nonsteroidal antiinflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. **Proced. Nat. Acad. Science, USA**, 90: 11693-11697, 1994.

MILLAR, G.M.; THIEMERMANN, C. No in septic shock, in : M.S. Goligorski; S Gross (Eds), Nitric oxide and the kidney. **Physiology and Pathophysiology, Chapman and Hall, New York**: 271-306, 1997.

MORRISSON, D. C. & ULEVITCH, R. J., The effects of bacterial endotoxins on host medication systems. **Am. J. Pathol.**, 93: 527-618, 1978.

MUKOYAMA, M; NAKAJIMA, T.; HORIUCHI, M.; SASAMURA, H.; PRATT, R.E. and DZAU, V.J. Expression cloning of type 2 angiotensin II receptor reveals a unique class of seven-transmembrane receptors. **J. Biol. Chem.** 268: 24539-24542, 1993.

MURPHY, T. J. et al., Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. **Nature**, 351: 233-236, 1991.

NAVA, E; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. – Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock : how much is beneficial? **Lancet** 338: 1555-1558, 1991.

NEME, B. & NESTAREZ, J. E. Choque séptico em obstetrícia. **Clin. Geral**, 12: 9-20, 1978.

PAYA, E. et al. – Effects of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by *E. coli* lipopolysaccharid in rats. **Circ. Shock**, 41: 103-112, 1993.

PLEINER, J. et al - Inflammation-induced vasoconstrictorhyporeactivity is caused by oxidative stress. **American College of Cardiology Foundation**. 22: 1656-1662, 2003.

POHLMAN, T. ; HARLAN, J. M. Endotoxin-endotelial cell interections. In: Morrison, D. C.; Ryan, J.L. – Bacterial endotoxic lipopolysaccarides: molecular biochemistry and cellular biology. **Boca raton: CRC Press**, v1, cap. 15: 347-371, 1992.

REES, D. D. et al., -Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effects on vascular tone: an insight into endotoxin shock. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, 173: 541-547, 1990.

SASAKI, K. et al. - Cloning and expression of a complementary DNA encoding a bovine adrenal angiotensin II type-1, receptor. **Nature** 351: 230-233, 1991.

SCHULLER, F. et al., Effects of endotoxin on circulating cyclic GMP in the rat. **Eur. J. Pharmacol.** 212: 93-96, 1992.

SZABO, C. Et al. – Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin in vivo. **Proc. Natl. Acad. Sci, USA**, 91: 271-275, 1994.

TANIMOTO, K. et al., Angiotensinogen-deficient mice with hipotension. **J. Biol. Chem.** 269: 31334-31337, 1994.

THIMERMANS, C. Et al - Nitric oxide in septic shock. **Gen. Phramacol.** 29: 159-166, 1993.

TITHERADGE, M. A. - Nitric oxide in shock. **Biochem. Biophys. Acta**, 1411: 437-455, 1999.

VANE, J. Towards a better aspirin. **Nature** 367: 215-218, 1994.

WACHEFAGEL, Y.T.; DeLA-CADENA, R.A. and COLMAN, R.W. Structural biology, cellular interactions and pathophysiology of the contact system. **Thromb. Res.** 72(1): 1-21, 1993.

WARD, K. et al., A molecular variant of angiotensinogen associated with preeclampsia. **Nat. Genet.** 4: 59-61, 1993.



WILLIAMS, T. A. et al., Identification of two active site residues in human angiotensin I –converting enzyme. **J. Biol. Chem.** 269: 29430-29434, 1994.

WINER, B.J.; BROW, D.R.; MICHELIS, K.M. **Statistical principles in experimental design.** 3<sup>a</sup> Ed. New York; McGraw Hill: 100-106, 1991.

YOSHIKAWA, D. – Platelet-activating factor receptor antagonist attenuates endotoxin-induced vascular hyporeactivity in the pithed rat. **Eur. J. Pharmacol.** 342: 241-245, 1998.

ZARROW, M. X. et al - **Exp. Endocrinol.** New York: Academic Press, 166-7; 194-6, 1964.