

REGINA DE SORDI

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS DE POTÁSSIO NO
DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO
INFLAMATÓRIO E NAS ALTERAÇÕES
CARDIOVASCULARES QUE OCORREM DURANTE A
SEPSE / CHOQUE SÉPTICO**

FLORIANÓPOLIS

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

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

**PARTICIPAÇÃO DE CANAIS DE POTÁSSIO NO
DESENVOLVIMENTO DO PROCESSO
INFLAMATÓRIO E NAS ALTERAÇÕES
CARDIOVASCULARES QUE OCORREM DURANTE A
SEPSE / CHOQUE SÉPTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Co-Orientador: Prof. Dr. Daniel Fernandes

REGINA DE SORDI

SORDI, Regina. **Participação de canais de potássio no desenvolvimento do processo inflamatório e nas alterações cardiovasculares que ocorrem durante a sepse / choque séptico**. Florianópolis, 2009, 74p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Defesa: 06/02/2009

O óxido nítrico (NO) é um dos principais mediadores da vasodilatação e hiporeatividade a vasoconstritores que ocorre na sepse. Entretanto, a inibição não-seletiva das enzimas responsáveis por sua produção não se revelou uma alternativa de utilidade clínica. Há dados na literatura mostrando uma importante relação entre NO e canais de potássio durante a sepse. Através de um modelo experimental de sepse em ratos observamos que o bloqueio de canais de potássio com tetraetilamônio (TEA; bloqueador não seletivo de canais de potássio; 8 mg/kg; s.c.), quando administrado nos momentos iniciais da sepse em baixas doses, onde bloqueia preferencialmente canais de potássio sensíveis ao cálcio, reduziu a mortalidade. Este tratamento precoce com TEA reduziu a produção de NO bem como a expressão da NOS-2, melhorando o quadro de hipotensão e hiporeatividade a vasoconstritores, além de melhorar parâmetros de dano tecidual. Adicionalmente, o TEA foi capaz de manter os níveis glicêmicos dentro da normalidade nos animais sépticos, quando normalmente é vista uma grande hiperglicemia, seguida de hipoglicemia. A 4-aminopiridina (10 ou 100 µg/kg; s.c.), um bloqueador seletivo de canais de potássio dependentes de voltagem, quando administrada nos animais sépticos, não alterou a mortalidade dos animais. Já o tratamento com a glibenclamida (GLB; 1 mg/kg; s.c.; inibidor seletivo para canais de potássio dependentes de ATP; 4 horas após a cirurgia) além de não apresentar nenhuma proteção, precipitou a morte dos animais, um efeito que parece estar relacionado com a hipoglicemia causada por este composto. Assim, o bloqueio de canais de potássio dependentes de cálcio deve ser investigado como um possível alvo terapêutico para o tratamento da sepse.

Óxido nítrico, canais de potássio, tetraetilamônio, sepse, choque séptico, glibenclamida.

*“Não tenho um caminho novo.
O que eu tenho é um novo jeito de caminhar.”*

Thiago de Mello

Aos meus pais Aparecido E. de Sordi e Teresa H. de Sordi pelo amor e carinho, pelo apoio e incentivo e por me ensinarem o que realmente é importante.

Ao meu marido Daniel Fernandes que me acompanha desde o começo desta caminhada por todo amor, carinho e paciência.

Aos meus tios Mario H. Hirata e Rosário D. C. Hirata, professores da Universidade de São Paulo, por servirem de exemplo e me incentivarem a seguir esse caminho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar ao Prof. Dr. Jamil Assreuy pela confiança e oportunidade que me foi oferecida, mas principalmente pela amizade, pelos sorrisos e pelos excelentes ensinamentos que certamente foram muito além do científico e que contribuíram de maneira muito positiva para a minha formação profissional e pessoal. Muito obrigada!

Agradeço especialmente ao Daniel Fernandes, que caminha comigo e me auxilia desde a iniciação científica e que pela competência, (muita) paciência e dedicação, tornou-se co-orientador deste trabalho e meu marido. Não há palavras suficientes para agradecer por sempre acreditar em mim, e por todo o amor, carinho, amizade, companheirismo, incentivo e apoio durante todos esses anos.

Aos meus pais, pelo amor, apoio e carinho que nunca faltaram, mesmo tendo que lidar com a minha ausência em muitos momentos.

À minha irmã, Ângela de Sordi, pelo carinho e amizade de todos esses anos.

Aos meus padrinhos Paulo e Carmen Köpe por me auxiliarem desde o início da graduação e por sempre me apoiarem.

A toda minha família que sempre me auxiliou e me transmitiu força para seguir em frente.

Ao Prof. Dr. João Batista Calixto por disponibilizar equipamentos importantes para a realização deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Pós Graduação em Farmacologia da UFSC, pelos ricos ensinamentos transmitidos durante esse período.

À Prof^ª. Maria Claudia Santos Silva pela realização das dosagens de sódio e potássio.

À Adriane Madeira, pelo apoio técnico muito precioso, e principalmente pela amizade, carinho e por nunca perder o bom humor mesmo diante de inúmeras dificuldades.

À Bettina T. Heckert, pelo valioso auxílio nos experimentos de Western Blotting e pelas longas conversas.

À Letícia Kramer Pacheco pela boa amizade que nasceu nesse período de convivência e pela disposição em auxiliar em diversos experimentos.

Aos atuais e antigos colegas do Laboratório de Óxido Nítrico: Danielle Duma, Márcia Terluk, Gustavo Ramos, Renata Costa, Ângela Bet, Elisabete Bóf, Simone Kobe, Geisson Nardi, Ana Maria Favero, Ana Maria Della Justina, Lucas Souza, Edir Rezende, Silvia Dal Bó e Daniela Dal Secco pelo apoio, carinho, cervejas, conversas científicas ou não, e pela amizade que tornou esses anos muito produtivos e divertidos.

A todos os colegas do departamento, pelo bom convívio durante as disciplinas e pelas conversas nos corredores sempre muito produtivas.

À Cristália Produtos Farmacêuticos LTDA (São Paulo, Brasil) pela gentil doação da heparina utilizada nos experimentos.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia, principalmente à Diana Lenzi, pela ajuda prestada.

Aos funcionários do Biotério da Farmacologia pelo esforço e trabalho prestado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Membros do grupo de canais K_{Ca}	10
TABELA 2: Membros do grupo de canais K_{ATP}	17
TABELA 3: Efeito do tratamento com tetraetilamônio (TEA) em diversos parâmetros bioquímicos de animais submetidos à cirurgia de ligação e perfuração do ceco	40
TABELA 4: Efeito do tratamento com glibenclamida (GLB) em diversos parâmetros bioquímicos de animais submetidos à cirurgia de ligação e perfuração do ceco	41

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Efeito do tratamento com bloqueadores de canais de potássio 4 horas após a CLP na sobrevida de ratos	34
FIGURA 2: Efeito do tratamento com bloqueadores de canais de potássio 18 horas após a CLP na sobrevida de ratos	35
FIGURA 3: Efeito do tetraetilamônio (TEA) sobre parâmetros cardiovasculares de animais submetidos à CLP	37
FIGURA 4: Efeito da glibenclamida (GLB) sobre parâmetros cardiovasculares de animais submetidos à CLP	38
FIGURA 5: Efeito do tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) na atividade da enzima mieloperoxidase pulmonar de animais submetidos à CLP	42
FIGURA 6: Efeito do tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) nos níveis plasmáticos de nitrito + nitrato (NOx) de animais submetidos à CLP	43
FIGURA 7: Efeito do tetraetilamônio (TEA) na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS-2)	44
FIGURA 8: Efeito dos bloqueadores de canais de potássio no número de bactérias no sangue e no lavado peritoneal de animais sépticos	45
FIGURA 9: Efeito do bloqueio de canais de potássio nas variações glicêmicas induzidas pela CLP	46

LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	-	Difosfato de adenosina
ATP	-	Trifosfato de adenosina
NF- κ B	-	Fator nuclear kappa B
CLP	-	Ligadura e perfuração do ceco
cGMP	-	Monofosfato cíclico de guanosina
SIRS	-	Síndrome de resposta inflamatória sistêmica
GTP	-	Trifosfato de guanosina
IFN	-	Interferon
IL-1	-	Interleucina 1
MPO	-	Mieloperoxidase
NOD	-	Domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeo (do inglês, <i>nucleotide-binding oligomerization domain</i>)
LPS	-	Lipopolissacarídeo bacteriano
NO	-	Óxido nítrico
NOS	-	Óxido nítrico sintase
PBS	-	Salina tamponada com fosfato
sGC	-	Guanilato ciclase solúvel
TNF α	-	Fator de necrose tumoral α
K _{ATP}	-	Canais de potássio sensíveis ao ATP
K _{Ca}	-	Canais de potássio dependentes de cálcio
BK _{Ca}	-	Canais de potássio dependentes de cálcio de alta condutância
SK _{Ca}	-	Canais de potássio dependentes de cálcio de baixa condutância
IK _{Ca}	-	Canais de potássio dependentes de cálcio de condutância intermediária
K _V	-	Canais de potássio voltagem dependentes
K _{IR}	-	Canais de potássio de retificação interna
MPO	-	Mieloperoxidase
TGP	-	Transaminase pirúvica
TGO	-	Transaminase oxalacética
i.v.	-	Intravenoso

i.p.	-	Intraperitoneal
s.c.	-	Subcutâneo
TRAF6	-	Fator-6 ativado por receptor de TNF (do inglês, <i>TNF-receptor activated factor-6</i>)
IRAK	-	Receptor de IL-1 associado à quinase
mRNA	-	RNA mensageiro
K ⁺	-	Íon Potássio
E _m	-	Potencial de membrana
pS	-	Picosiemens
ChTx	-	Caribdotoxina
IbTx	-	Iberiotoxina
TEA	-	Tetraetilamônio
GLB	-	Glibenclamida
4-AP	-	4-aminopiridina
PKA	-	Proteínas quinases dependentes de cAMP
PKG	-	Proteínas quinases dependentes de cGMP
PGI ₂	-	Prostaciclina
EDHF	-	Fator hiperpolarizante derivado do endotélio
SUR	-	Receptor de Sulfoniluréia
MLCK	-	Quinase da cadeia leve da miosina
Ca ²⁺	-	Íons Cálcio
Ba ²⁺	-	Íons Bário

RESUMO

Vasodilatação e hiporeatividade a vasoconstritores estão entre as principais características do colapso cardiovascular na sepse. O óxido nítrico (NO) é um dos principais mediadores neste processo; apesar disso, a inibição não-seletiva das enzimas responsáveis por sua produção não se revelou uma alternativa de utilidade clínica já que ocasionou o aumento da morbimortalidade. Vários dados na literatura têm mostrado uma forte relação entre canais de potássio e NO durante a sepse. Neste estudo nós investigamos o efeito de bloqueadores de canais de potássio em um modelo experimental de sepse em ratos. Observamos que o bloqueio de canais de potássio com tetraetilamônio (TEA; 8 mg/kg; s.c.; 4 horas após a cirurgia), um bloqueador não seletivo destes canais que, em baixas doses, é preferencialmente seletivo para canais K_{Ca} , quando administrado nos momentos iniciais da sepse reduziu a mortalidade. Este tratamento precoce com TEA reduziu a produção de NO bem como a expressão da NOS-2, melhorando o quadro de hipotensão e hiporeatividade a vasoconstritores, além de melhorar parâmetros de dano tecidual. Adicionalmente, o TEA foi capaz de manter os níveis glicêmicos dentro da normalidade nos animais sépticos, quando normalmente é vista uma grande hiperglicemia, seguida de hipoglicemia. A 4-aminopiridina (10 ou 100 μ g/kg; s.c.), um bloqueador seletivo de canais de potássio dependentes de voltagem, quando administrada nos animais sépticos, não alterou a mortalidade dos animais mostrando que, pelo menos em relação a este parâmetro, esses canais não parecem estar envolvidos. Já o tratamento com a glibenclamida (GLB; 1 mg/kg; s.c.; inibidor seletivo para canais K_{ATP} ; 4 horas após a cirurgia) além de não apresentar nenhuma proteção, precipitou a morte dos animais, um efeito que parece estar relacionado com a hipoglicemia causada por este composto. Embora muitos trabalhos tenham demonstrado o envolvimento de canais de potássio nas alterações cardiovasculares que ocorrem na sepse, o bloqueio destes canais pode levar a alterações metabólicas deletérias. É fundamental, portanto, que estes canais continuem sendo estudados para que no futuro os efeitos benéficos e maléficos possam ser farmacologicamente dissociados. Assim, nosso trabalho mostra que o bloqueio de canais de potássio dependentes de cálcio deve ser investigado como um possível alvo terapêutico para o tratamento da sepse.

Palavras-chave: Óxido nítrico, canais de potássio, tetraetilamônio, sepse, choque séptico, glibenclamida.

ABSTRACT

Vasodilation and hyporeactivity to vasoconstrictors are amongst the main features of cardiovascular collapse in sepsis. Nitric oxide (NO) is an important mediator in this process; nevertheless non-selective NO synthase inhibition did not prove clinically useful since it increased morbidity and mortality. Potassium channels and nitric oxide have been shown to be related in sepsis. In this study, we investigated the effect of K⁺ channels blockers in a rat model of sepsis. We observed that early inhibition (4 hours after surgery) of K⁺ channels with low doses of tetraethylammonium (TEA; 8 mg/kg; s.c.; non selective potassium channels blocker) provided significant reduction in the mortality. At this low dosage, TEA is reported to block preferentially calcium-dependent potassium channels. Besides, this early treatment with TEA reduced NO production as well as NOS-2 protein expression, improved the hypotension and the hyporeactivity to vasoconstrictors. In addition, there was a significant improvement in hypoxia and tissue damage biochemical indicators. Early TEA treatment maintained glycemia at normal values, contrasting to the hyperglycemia followed by hypoglycemia observed in septic animals. 4-aminopyridine (10 or 100 µg/kg; s.c.), a selective voltage dependent potassium channels blocker did not improve survival indicating that, at least concerning mortality, this channel family do not seem to be involved. Treatment with selective K_{ATP} channel inhibitor glibenclamide (GLB; 1 mg/kg; s.c.) did not show any kind of protection, conversely, increase mortality rate probably because of the hypoglycemia. Blockade of K_{ATP} channel is associated with hemodynamic improvement in sepsis, but it is also associated with metabolic disturbance. Our study suggests that K_{Ca} channel blockade should be investigated as a possible therapeutic strategy in sepsis treatment.

Key-words: nitric oxide, potassium channels, tetraethylammonium, sepsis, septic shock, glibenclamide.

SUMÁRIO

Lista de Tabelas	i
Lista de Figuras	ii
Lista de Abreviaturas	iii
Resumo	v
Abstract	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Sepses	1
1.1.1. Breve histórico	1
1.1.2. Conceitos, definições e epidemiologia	1
1.1.3. Imunopatogênese da sepsis	3
1.1.4. Papel do óxido nítrico na sepsis	4
1.1.5. Canais de potássio no músculo liso arterial	7
1.1.5.1. Canais de potássio sensíveis ao cálcio (K_{Ca})	9
1.1.5.2. Canais de potássio dependentes de voltagem (K_V)	12
1.1.5.3. Canais de potássio de retificação interna (K_{IR})	13
1.1.5.4. Canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})	15
1.1.6. Papel dos canais de potássio na sepsis	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS	21
3.1. Animais	21
3.2. Procedimentos experimentais	21
3.2.1. Indução da sepsis: modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	21
3.2.2. Avaliação da sobrevivência dos animais	21
3.2.3. Avaliação da pressão arterial em ratos	22
3.2.4. Coleta de sangue e de órgãos	23

3.2.5. Dosagens plasmáticas	24
3.2.5.1. Dosagem de nitrato e nitrito (NOx)	24
3.2.5.2. Dosagem de uréia	24
3.2.5.3. Dosagem de creatinina	25
3.2.5.4. Dosagem de lactato	25
3.2.5.5. Dosagem da enzima transaminase oxalacética (TGO)	26
3.2.5.6. Dosagem da enzima transaminase pirúvica (TGP)	26
3.2.5.7. Dosagem de íons sódio e potássio	26
3.2.6. Dosagem de glicose	26
3.2.7. Contagem total de leucócitos	27
3.2.8. Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão	27
3.2.9. Imunoeletroforese (<i>Western Blotting</i>)	27
3.2.9.1. Preparação de amostras	27
3.2.9.2. Separação de proteínas e imunodeteção	28
3.2.10. Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias	29
3.2.10.1. Determinação do número de bactérias no sangue	29
3.2.10.2. Determinação do número de bactérias no lavado peritoneal	29
3.3. Protocolos experimentais	30
3.3.1. Avaliação dos efeitos de bloqueadores de canais de potássio na sobrevivência de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	30
3.3.2. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de potássio em parâmetros hemodinâmicos, inflamatórios e marcadores de dano tecidual em animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	31
3.3.3. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de potássio na glicemia de animais submetidos à cirurgia de perfuração e ligadura do ceco (CLP)	31
3.4. Análise estatística	32
3.5. Drogas e reagentes	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de potássio na sobrevivência de animais submetidos à cirurgia de perfuração e ligadura do ceco (CLP)	33
4.2. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e	

glibenclamida (GLB) sobre parâmetros cardiovasculares de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	36
4.3. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) nos níveis de marcadores de dano tecidual, número de leucócitos totais e eletrólitos de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	39
4.4. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) na resposta inflamatória de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	42
4.5. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) no crescimento de bactérias no sangue e no lavado peritoneal de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	44
4.6. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) nos valores de glicose sanguínea de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	46
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÕES	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sepses

1.1.1. Breve histórico

Referências sobre as manifestações clínicas da sepse podem ser encontradas até mesmo em textos de Hipócrates (460 - 377 a.C.) que relatou um processo de perigo, deterioração biológica fétida ou putrefação. Mas foi somente no século XVIII que o médico húngaro Ignaz Semmelweiss relacionou medidas simples de higiene por parte dos médicos e estudantes, como lavar as mãos antes do contato com pacientes, com uma redução expressiva da mortalidade de mulheres no puerpério. Entretanto, a comunidade científica viu com ceticismo tais resultados e não renovou seu contrato de trabalho. Semmelweiss foi vítima de depressão e distúrbios mentais em seus últimos anos de vida, vindo a óbito em um manicômio em Viena poucas semanas mais tarde, ironicamente, de uma síndrome muito semelhante à sepse puerperal, desencadeada por uma laceração no dedo (De Costa, 2002).

Em 1914, Hugo Schottmüller descreveu que a presença de uma infecção era o componente fundamental da doença (citado em Rittirsch et al., 2008). Décadas mais tarde, Lewis Thomas (1972) descreveu que *"It is our response to their presence that makes the disease. Our arsenal for fighting off bacteria are so powerful... that we are more in danger from them than the invaders"*. Essa teoria desviou o foco das pesquisas sobre sepse do agente infeccioso para a resposta imune do hospedeiro. Nos dias atuais, Bone e colaboradores (1992) definiram sepse como sendo uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica (SIRS) que pode ocorrer durante uma infecção.

1.1.2. Conceitos, definições e epidemiologia

A sepse é uma doença definida por critérios clínicos e no intuito de padronizar a nomenclatura, em 1991 foi realizada uma Conferência de Consenso para a classificação de sepse e doenças similares pela *Society of Critical Care Medicine* juntamente com o *American College of Chest* (Bone et al., 1992). Definições precisas são necessárias para um diagnóstico melhor e mais rápido, assim como para monitoração e tratamentos adequados dos pacientes sépticos. Dessa maneira, devemos nos familiarizar com os seguintes termos:

- **Infecção:** é definido como um processo patológico causado pela invasão de tecidos, fluidos ou cavidades normalmente estéreis por microorganismos patogênicos;
- **SIRS (Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica):** é definido quando dois ou mais dos seguintes sintomas clínicos são diagnosticados: temperatura corporal $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca > 90 bpm; frequência respiratória > 20 movimentos/minuto; leucometria $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4.000/\text{mm}^3$ ou ainda, presença de mais de 10% de bastonetes;
- **Sepse:** é definido como uma síndrome caracterizada pela presença de SIRS secundária a um processo infeccioso;
- **Septicemia:** o uso desse termo é desencorajado por ser ambíguo e freqüentemente utilizado inapropriadamente para designar bacteremia, que é a presença de bactérias viáveis no sangue;
- **Sepse severa:** é a sepse acompanhada de disfunção de órgãos e anormalidades de perfusão (acidose láctica, oligúria, etc) ou acompanhada de hipotensão responsiva à hidratação vigorosa;
- **Choque séptico:** é quando a hipotensão que ocorre na sepse severa persiste mesmo com adequada reposição volêmica e utilização de agentes vasopressores para estabilizar a pressão arterial;
- **Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (MODS):** presença de função anormal de três ou mais órgãos em pacientes críticos, no qual a homeostasia não pode ser mantida sem intervenção médica.

Apesar dos esforços para padronização da nomenclatura, separar pacientes sépticos em categorias resulta em populações bastante heterogêneas, o que é explicado pelo fato da sepse representar uma síndrome clínica e não uma doença. Essa heterogeneidade é refletida principalmente pelos diferentes locais de origem da infecção (pulmão, rins, etc), e ainda se a infecção ocorreu na admissão ou durante a estadia na UTI. Infecções pulmonares, abdominais, do trato urinário e de feridas operatórias são responsáveis por aproximadamente 85% dos casos (Alberti et al., 2002).

A sepse é uma das complicações mais freqüentes em pacientes cirúrgicos e uma das maiores causas de morte em unidades de terapia intensiva (Sands et al., 1997). A sepse grave e o choque séptico podem ser causados por diversos

microorganismos como bactérias Gram-negativas, e Gram-positivas, fungos e vírus, e estão associados a taxas de mortalidade de 40 a 60%. Sepses, SIRS e choque séptico, juntos, representam a causa mais importante de morte em UTI de adultos, superando até mesmo doenças cardiovasculares (Angus et al., 2001).

Dados indicam aproximadamente 750.000 casos de sepse por ano nos Estados Unidos. No Brasil, os dados também são alarmantes, e as estimativas nacionais são de que, a cada dia, aproximadamente 57 em cada 1000 pacientes das UTIs tem sepse, e ainda apresentam uma alta taxa de mortalidade. O estudo BASES (*Brazilian Sepsis Epidemiological Study*) também demonstrou que a sepse é a doença geradora de maiores custos aos setores públicos e privados do país (Silva et al., 2004).

1.1.3. Imunopatogênese da sepse

De acordo com a definição acima descrita, a sepse é um estado inflamatório generalizado que ocorre frente a uma infecção. Embora a ativação do sistema imune durante uma invasão microbiana seja geralmente protetora, a sepse se desenvolve em um grande número de pacientes como consequência de uma resposta imune excessiva ou mal regulada.

Os mecanismos de defesa do hospedeiro atuam contra os microorganismos invasores ou seus constituintes. Em bactérias Gram-negativas, o lipopolissacarídeo (LPS ou endotoxina) tem papel dominante. O principal mecanismo pelo qual o LPS atua é através de um complexo com a proteína ligadora de LPS sinalizando então através dos receptores Toll-like 4 (TLR-4). A sinalização intracelular depende da ligação do domínio intracelular do TLR-4 ao IRAK (do inglês, *IL-1 receptor-associated kinase*), um processo que é facilitado por proteínas adaptadoras, entre elas a MyD88 (do inglês, *myeloid differentiation protein 88*). Posteriormente ocorre ativação do TRAF6 (do inglês, *TNF-receptor activated factor-6*) que coordena a fosforilação do I κ B, inibidor do Fator nuclear kappa B (NF- κ B), por ativar o complexo IKK (I κ B quinase). A fosforilação do I κ B pelo IKK leva à sua degradação por proteossoma; o dímero NF- κ B citosólico é então liberado e translocado para o núcleo da célula, onde inicia a transcrição de diversos genes cujos produtos são imunomediadores reguladores da resposta inflamatória (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004; Cohen, 2002). Além da fosforilação do I κ B, o IKK também regula a transcrição por fosforilar diretamente

proteínas do NF- κ B (revisado em Ghosh e Hayden, 2008). As células também podem responder ao LPS através de receptores intracelulares denominados NOD (do inglês, *nucleotide-binding oligomerization domain*) (Inohara et al., 2001; Cohen, 2002).

Em bactérias Gram-positivas, não há endotoxina, mas suas paredes contêm peptidoglicanos e ácido lipoteicóico, que podem ligar-se aos receptores de superfície Toll-like 2 (TLR-2) tendo papel pró-inflamatório, embora menos pronunciado que o do LPS (Wang et al., 2000). Diversos componentes da parede celular de fungos também são reconhecidos por TLR-2 e TLR-4 (Netea et al., 2004).

Muitos mecanismos estão envolvidos na fisiopatologia da sepse e do choque séptico, incluindo liberação de citocinas, ativação de neutrófilos, monócitos e células endoteliais, bem como ativação de reflexos neuroendócrinos e sistemas de cascatas de proteínas plasmáticas, como o sistema complemento e os sistemas de coagulação e o fibrinolítico. Há interações complementares e sinérgicas de diferentes componentes dessas cascatas, o que dificulta o tratamento dessa síndrome. A manobra terapêutica prioritária tem sido a identificação e eliminação do foco infeccioso através de antibióticos e em casos extremos, a sua remoção cirúrgica (Hollenberg et al., 2004). A manutenção da pressão arterial e do débito cardíaco através de reposição de líquido e utilização de agentes inotrópicos e vasopressores pode ser necessária devido à descompensação hemodinâmica (Wheeler e Bernard, 1999).

1.1.4. Papel do óxido nítrico na sepse

O tônus vascular e, portanto, a pressão sanguínea, é determinada principalmente pela contratilidade das células do músculo liso vascular na parede dos vasos, as quais por sua vez, são reguladas pela sua concentração intracelular de cálcio. O cálcio se liga à calmodulina, formando um complexo capaz de ativar a miosina quinase de cadeia leve (MLCK, do inglês *myosin light chain kinase*), a enzima responsável pela fosforilação das cadeias leves de miosina (cadeias regulatórias). Assim, quando a cadeia regulatória é fosforilada, as cabeças de miosina são capazes de se ligar repetitivamente aos filamentos de actina, promovendo a contração. Por sua vez, o óxido nítrico (NO) promove relaxamento (vasodilatação) do músculo liso vascular basicamente por dois mecanismos distintos: a) o NO pode abrir canais de potássio no músculo liso vascular, o que reduz o potencial de membrana,

hiperpolariza a célula e fecha os canais de cálcio, assim reduzindo o cálcio intracelular e levando à vasodilatação; b) o NO pode ativar a guanilato ciclase solúvel (sGC), aumentando a produção de cGMP na célula e ativando a proteína quinase G (PKG; Lucas et al., 2000). A PKG por sua vez gera relaxamento por reduzir a concentração de cálcio intracelular, ou por defosforilar a cadeia leve de miosina, o que pode ocorrer por ativação de fosfatases ou pela manutenção da MLCK em uma forma fosforilada que não é passível de ativação pelo complexo cálcio-calmodulina (Beavo e Brunton, 2002).

Do ponto de vista cardiovascular, a fase hiperdinâmica do choque séptico é caracterizada por aumento do débito cardíaco e redução da resistência vascular periférica devido à dilatação sistêmica dos vasos de resistência. A queda na resistência vascular periférica leva a uma hipotensão progressiva severa que é resistente à reposição volêmica e agentes vasoconstritores (Quezado e Natanson, 1992). Isso acarreta redistribuição do débito cardíaco com perfusão inadequada de órgãos, a qual contribui para falência e dano dos mesmos (Parrillo et al., 1990). Essas alterações hemodinâmicas vistas na sepse são atribuídas em grande parte à produção excessiva de óxido nítrico (NO) que ocorre principalmente devido ao aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS-2) (Alderton et al., 2001).

O NO é sintetizado a partir de oxigênio molecular e do aminoácido L-arginina por um grupo de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS). Existem pelo menos três isoformas de NOS, cada uma sendo produto de um gene distinto. A NOS neuronal (nNOS ou NOS-1), a NOS induzida (iNOS ou NOS-2) e a NOS endotelial (eNOS ou NOS-3).

A NOS-1 e a NOS-3 foram inicialmente descritas em cerebelo de rato e células endoteliais de aorta bovina, respectivamente. Entretanto, sua distribuição tecidual é bem mais ampla do que a sugerida pelos seus nomes. Estas duas enzimas são classificadas como NOS constitutivas, são dependentes de cálcio/calmodulina e liberam pequenas quantidades de NO (na faixa de nanomolar) por curtos períodos de tempo (segundos a minutos) em resposta ao estímulo de receptores ou estímulos físicos, tais como o estresse de cisalhamento. Por outro lado, a NOS-2 pode ser induzida em vários tipos celulares por citocinas ou combinações delas com lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). A NOS-2 requer concentração nanomolar de

cálcio (100 nM, concentração equivalente ao nível basal intracelular) e por isso é classificada como independente de cálcio. Outra importante diferença é que a NOS-2 produz e libera grandes quantidades de NO (na ordem de micromolar) durante longos períodos quando comparada às NOS constitutivas, e geralmente está associada aos efeitos citotóxicos e às ações que promovem as patologias vasculares relacionadas ao NO (revisado em Alderton et al., 2001). A maior parte do NO importante no quadro de choque séptico tem origem na indução da NOS-2 (Rees et al., 1990; Salter et al., 1991). O aumento na expressão de NOS-2 (proteína) e de seu mRNA durante a endotoxemia é observada em vários tipos celulares, como células endoteliais, células de Kupffer, hepatócitos, células da musculatura lisa vascular, células renais, condrócitos, miócitos e fibroblastos (Moncada et al., 1991).

Existe um número substancial de evidências indicando que o NO é um importante efector na sepse e no choque séptico (Fleming et al., 1991; Feihl et al., 2001). As primeiras evidências de que o NO teria um envolvimento na fisiopatologia da sepse vieram com a observação de níveis elevados de nitrato e nitrito em pacientes sépticos (Ochoa et al., 1991; Evans et al., 1993). Vários sintomas dessa condição são atenuados com o uso de inibidores das NOS, o que evidencia a relevância do NO derivado da NOS-2 no choque séptico. Há trabalhos mostrando que os inibidores de NOS normalizam a queda da pressão arterial (Kilbourn et al., 1990), aumentam a sobrevivência (Wu et al., 1995) e atenuam a falência de múltiplos órgãos na sepse experimental em ratos (Wu et al., 1996). O papel do NO derivado da NOS-2 na sepse foi reforçado ainda pela demonstração de que camundongos *knockout* para o gene da NOS-2 respondem melhor a vasoconstritores e apresentam menor mortalidade em modelos relevantes de sepse (para revisão ver Kilbourn, 1999). Há, portanto uma grande quantidade de dados implicando o NO como um mediador chave na disfunção cardiovascular durante a sepse e choque séptico (para revisão ver Fernandes e Assreuy, 2008).

Levando-se em consideração os já bem conhecidos efeitos do NO na pressão arterial e na reatividade vascular na sepse, o uso de inibidores da NOS-2 para o tratamento do choque séptico parecia ser uma opção correta e fadada ao sucesso (Avontuur et al., 1998). De posse do conhecimento reunido nos últimos anos, foi possível antecipar que a inibição da NOS-2 iria bloquear a capacidade do hospedeiro

em combater a infecção subjacente, já que o NO é uma das principais armas empregadas pelas células de defesa (Nathan e Shiloh, 2000). Outro importante problema em lidar com a inibição da NOS-2 na sepse e no choque séptico é que todos os inibidores das NOS testados até agora no ambiente clínico não são suficientemente seletivos para esta isoforma. Esta foi precisamente a razão porque um estudo de Fase III com um inibidor de NOS em sepse humana teve que ser interrompido antes do término, já que a mortalidade aumentou no grupo de pacientes que receberam o inibidor (Lopez et al., 2004). Neste sentido, uma alternativa interessante seria a modulação de alvos do NO, como os canais de potássio. A estratégia de intervir apropriadamente em alvos do NO responsáveis pelo colapso cardiovascular preservando, pelo menos em parte, a produção de NO e conseqüentemente seus efeitos benéficos, pode ser uma alternativa eficaz e segura no tratamento da sepse.

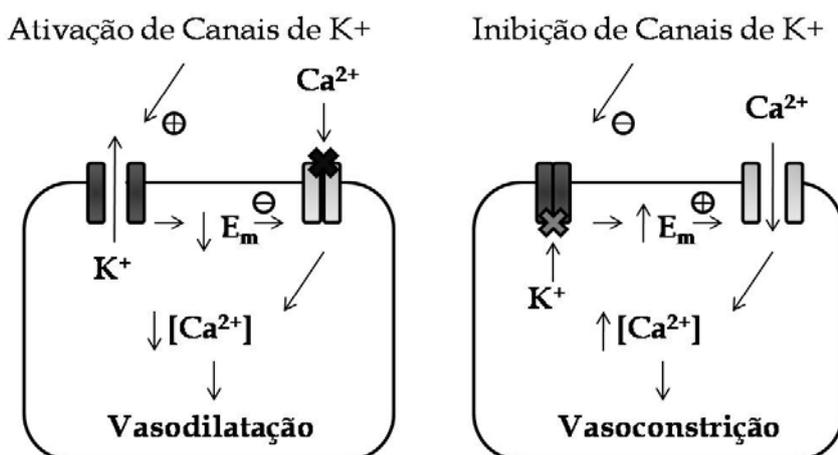
1.1.5. Canais de potássio no músculo liso arterial

O potencial de membrana é determinado pela sua permeabilidade diferencial aos diversos íons e pela distribuição relativa destas espécies iônicas (sódio, cloreto, cálcio, potássio, etc) em cada um dos compartimentos que a membrana separa. Os canais de potássio representam um diversificado grupo de canais iônicos encontrados na maioria das células eucarióticas de animais e plantas. Normalmente, existe uma alta concentração de potássio no meio intracelular (~140 mEq/L) e uma baixa concentração no meio extracelular (~4 mEq/L). Os canais de potássio são proteínas que permitem o movimento dos íons potássio (K⁺) através da membrana plasmática (Jan e Jan, 1992).

A abertura de canais de potássio da membrana de células do músculo liso em artérias aumenta o efluxo de potássio, causando um déficit relativo de cargas positivas no lado interno da célula, gerando um potencial negativo através da membrana, o que chamamos de hiperpolarização. Isso leva ao fechamento de canais de cálcio dependentes de voltagem, reduzindo a entrada de cálcio e causando vasodilatação (Esquema 1). Um grande número de vasodilatadores endógenos atua, pelo menos em parte, através da ativação de canais de potássio. Por outro lado, a inibição desses canais despolariza a membrana levando à abertura de canais de cálcio

ativados por voltagem, aumentando o cálcio citosólico e resultando em vasoconstrição (Esquema 1) (para revisão ver Nelson e Quayle, 1995).

A habilidade de um canal iônico permitir a passagem de um determinado íon é chamada de condutância; assim, quanto maior a condutância do canal de potássio, mais deste íon é capaz de atravessar a membrana celular em um determinado período de tempo. A condutância de canais iônicos é medida em picoSiemens (pS).

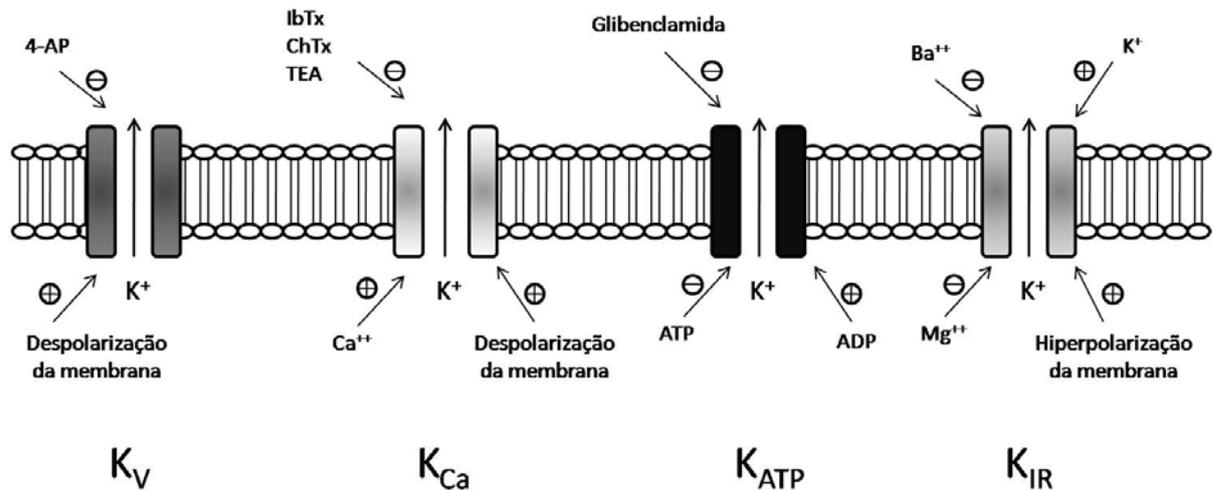


Esquema 1: Ilustração esquemática dos eventos envolvidos na resposta do músculo liso vascular à ativação (esquerda) ou inibição (direita) de canais de potássio. Esquerda: Abertura de canais de K⁺ na membrana da célula leva à saída de K⁺, causando redução do potencial de membrana (E_m), ou seja, hiperpolarização e conseqüente inibição dos canais de cálcio ativados por voltagem, redução do cálcio citosólico, resultando em relaxamento do músculo liso vascular (vasodilatação). Direita: A inibição de canais de K⁺ do músculo liso vascular reduz a saída de K⁺ e, portanto, aumenta o potencial de membrana (E_m) despolarizando a célula. Ocorre abertura dos canais de cálcio ativados por voltagem, permitindo a entrada de cálcio com aumento dos níveis de cálcio citosólico resultando em vasoconstrição. Adaptado de *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001; 21:28-38.

O nosso conhecimento sobre canais de potássio no músculo liso arterial aumentou substancialmente nos últimos 20 anos graças a avanços de duas técnicas principais: 1) isolamento de células de músculo liso a partir de pequenas artérias; e 2) técnica de *patch-clamp*, que permite a mensuração de correntes iônicas em pequenos fragmentos de membrana plasmática, facilitando a individualização de canais iônicos de um determinado tipo. As manifestações funcionais da ativação ou inibição de canais de potássio também podem ser monitoradas através de mudanças no potencial de membrana (mensuradas com o uso de microeletrodos), mudanças na

força isométrica de segmentos de anéis de artérias, e através de mudanças no diâmetro de artérias pressurizadas (Nelson e Quayle, 1995).

Quatro tipos distintos de canais de K^+ foram identificados no músculo liso arterial: 1) canais de potássio sensíveis ao cálcio (K_{Ca}); 2) canais de potássio dependentes de voltagem (K_V); 3) canais de potássio de retificação interna (K_{IR}) e 4) canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP}) (Esquema 2).



Esquema 2: Os quatro tipos de canais de potássio no músculo liso arterial. K_V : canais de potássio dependentes de voltagem; K_{Ca} : canais de potássio sensíveis ao cálcio; K_{ATP} : canais de potássio sensíveis ao ATP; K_{IR} : canais de potássio de retificação interna; IbTx: iberiotoxina; ChTx: caribdotoxina; TEA: tetraetilamônio; 4-AP: 4-aminopiridina; +: ativação do canal; -: inibição do canal. Adaptado de *Am J Physiol.* 1995; 268:C799-822.

1.1.5.1. Canais de potássio sensíveis ao cálcio (K_{Ca})

Os canais de potássio que são ativados pela elevação do cálcio intracelular (K_{Ca}) e pela despolarização da membrana são particularmente abundantes nas células do músculo liso vascular. A Tabela 1 ilustra os nomes dos membros desse grupo conforme a União Internacional de Farmacologia (IUPHAR) (Wei et al., 2005). Estima-se que há entre 1.000 a 10.000 canais K_{Ca} e K_V em cada célula do músculo liso arterial e aproximadamente 100 a 500 canais K_{ATP} e K_{IR} (Nelson e Quayle, 1995). Os canais K_{Ca} do músculo liso vascular (K_{Ca} 1.1.) são canais de alta condutância (30 a 100 os) e são chamados também de canais Maxi K ou BK.

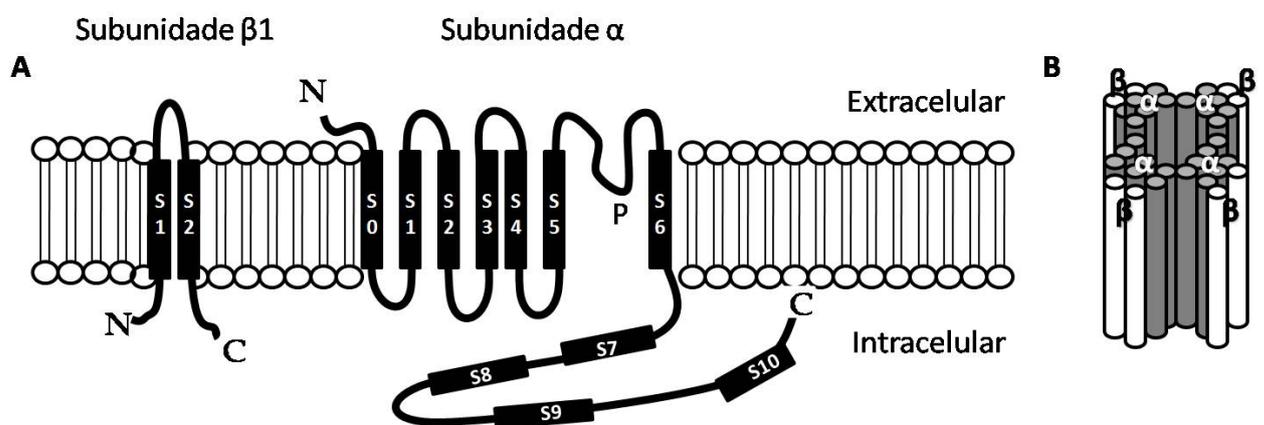
Os canais BK_{Ca} são compostos de quatro subunidades α e quatro subunidades β . A subunidade α é a porção formadora do poro do canal e consiste de 11 domínios

hidrofóbicos (S0-S10). O domínio transmembrana (S0-S6) constitui o núcleo da subunidade α com uma cauda NH_2 terminal. Os quatro demais domínios (S7-S10) são localizados no citoplasma e forma a cauda COOH terminal da proteína (Esquema 3). As subunidades α podem associar-se com diferentes subunidades β , o que explica diferentes propriedades dos BK_{Ca} em diferentes tecidos (Paulson e Newman, 1987; Boyle et al., 1992). A subunidade β é composta por dois domínios transmembrana com uma grande alça extracelular, e as caudas NH_2 e COOH terminais são localizadas no citoplasma. Mais de oito subunidades β foram identificadas, mas a isoforma $\beta 1$ é a que predomina nas células do músculo liso vascular (para revisão ver Ledoux et al., 2006).

TABELA 1: Membros do grupo de canais K_{Ca}

<i>Nome (IUPHAR)</i>	<i>Outros nomes</i>	<i>Distribuição do canal</i>
K_{Ca} 1.1.	BK, Maxi K, Slo1, Slo	Cérebro, músculo esquelético, epitélio renal, músculo liso (bexiga, vascular, uterino), córtex adrenal
K_{Ca} 2.1.	$\text{SK}_{\text{Ca}1}$, SK1	Cérebro (amígdala, hipocampo, cerebelo), tumores gástricos, glioblastoma, aorta, oligodendroglioma
K_{Ca} 2.2.	$\text{SK}_{\text{Ca}2}$, SK2	Cérebro, pituitária, melanócito, melanoma, próstata, fígado, coração, músculo esquelético, miométrio
K_{Ca} 2.3.	$\text{SK}_{\text{Ca}3}$, SK3	Cérebro, linfócitos, músculo esquelético, miométrio, próstata, rim, coração, fígado, endotélio vascular
K_{Ca} 3.1.	$\text{IK}_{\text{Ca}1}$, SK4, $\text{K}_{\text{Ca}4}$, IK1	Placenta, próstata, eritrócitos, linfócitos, fígado, pâncreas, endotélio vascular, melanomas, colon
K_{Ca} 4.1.	Slack, Slo2.2	Cérebro, rim, testículo
K_{Ca} 4.2.	Slick, Slo2.1	Cérebro (bulbo olfatório, hipocampo), coração
K_{Ca} 5.1.	Slo3	Testículos, espermatozóides

O aumento da pressão intravascular despolariza as células do músculo liso das artérias de resistência e causa vasoconstrição; esse tônus é chamado de tônus miogênico, e é o principal determinante da resistência periférica. Os canais BK_{Ca} exibem um importante papel no controle do tônus miogênico pois a despolarização da membrana que ocorre ativa esses canais, o que leva ao aumento da saída de potássio, conseqüentemente reduzindo a despolarização e a contração causadas pela pressão intravascular e por agentes vasoconstritores (Nelson e Brayden, 1993). A ativação dos canais BK_{Ca} hiperpolariza as células do músculo liso e causa relaxamento. Vasodilatadores que levam ao aumento intracelular de cAMP e cGMP podem atuar ativando esses canais. A estimulação β-adrenérgica é capaz de ativar canais BK_{Ca} nas células do músculo liso das artérias coronárias e nas vias aéreas pela fosforilação mediada por PKA (proteínas quinases dependentes de cAMP) (Sadoshima et al., 1988; Kume et al., 1989), bem como diretamente pela proteína G (Scornik et al., 1993).



Esquema 3: A: Estrutura das subunidades α e β dos canais BK_{Ca}. A subunidade β (representada por β1) consiste de 2 domínios transmembrana e a subunidade α de 11 domínios hidrofóbicos (S0-S10), com S0-S6 localizado na membrana citoplasmática e a região do poro entre S5 e S6. B: Associação de quatro subunidades α e quatro subunidades β1 dos canais BK_{Ca}. N, amino terminal; C, carboxi terminal; P, região do poro. Adaptado de *Physiology*. 2006; 21:69-78.

Outra classe de canais K_{Ca} compreende os canais de potássio sensíveis ao cálcio de baixa condutância (SK_{Ca}) que apresentam condutância de 2 a 24 pS e foram primeiramente descritos no cérebro. Foram identificados pelo menos quatro membros (SK1 - SK4), incluindo um canal K_{Ca} que foi previamente identificado em

eritrócitos e linfócitos como canal de potássio sensível ao cálcio de condutância intermediária (IK_{Ca}), que apresenta condutância entre 25 a 100 pS. Entretanto, o IK_{Ca} é agora considerado o SK4 devido ao grande grau de similaridade aos outros canais SK_{Ca} . Diferente dos BK_{Ca} , a abertura do poro dos canais SK_{Ca} é independente do potencial de membrana, mas estritamente dependente da concentração de cálcio intracelular. O padrão de expressão desses canais também difere dos canais BK_{Ca} (ver tabela 1), e embora expressos em diversos tipos de músculo liso, os canais SK_{Ca} não são expressos em células do músculo liso vascular. Entretanto, não se poderia deixar de citá-los, já que o endotélio vascular tem um importante papel na regulação do tônus vasomotor através da liberação de vasoconstritores (endotelina) e através da produção e liberação de NO, prostaciclina (PGI_2) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (EDHF) (para revisão ver Ledoux et al., 2006).

Agentes farmacológicos comumente utilizados para inibir a atividade dos canais BK_{Ca} incluem tetraetilamônio (TEA), paxiline, caribdotoxina e iberiotoxina.

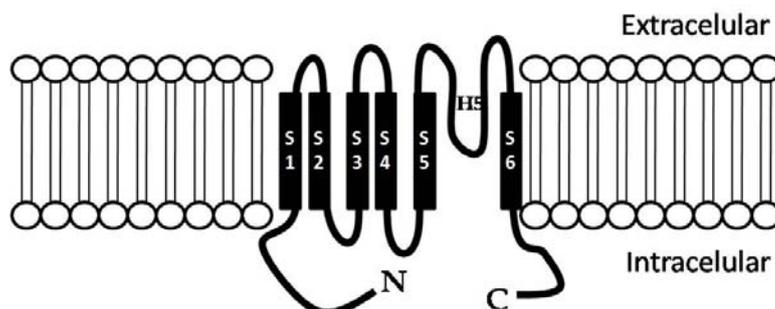
1.1.5.2. Canais de potássio dependentes de voltagem (K_V)

Os canais de potássio dependentes de voltagem do músculo liso vascular são ativados pela despolarização da membrana. São canais importantes na fase de repolarização do potencial de ação de muitas células excitáveis. Entretanto, muitas células do músculo liso arterial não geram potenciais de ação, mas respondem aos estímulos com mudanças no potencial de membrana. Assim, os canais K_V atuam principalmente limitando a despolarização da membrana nessas artérias em resposta à pressão intravascular ou à ação de vasoconstritores (Nelson e Quayle, 1995).

Diversas famílias de K_V foram identificadas (Roberds et al., 1993) e algumas são expressas nas células do músculo liso vascular renal (Gelband e Hume, 1992), mesentérico (Smirnov e Aaronson, 1992), cerebral (Bonnet et al., 1991), coronário (Ishikawa et al., 1993; LeBlanc et al., 1994) e leito pulmonar (Clapp e Gurney, 1991).

Cada canal é composto de quatro subunidades, sendo que cada subunidade possui seis regiões hidrofóbicas (S1-S6), que formam o domínio transmembrana; essas regiões hidrofóbicas são ligadas por seqüências de aminoácidos hidrofílicos, os quais são expostos no espaço intra- ou extracelular. Cada subunidade contém um domínio carboxi- e amino-terminal citoplasmático. A região S4 é carregada, contendo

um aminoácido básico (lisina ou arginina) a cada três resíduos, sendo essa região um importante componente do sensor de voltagem do canal (Esquema 4). A via de permeação do canal é formada, em parte, pela região de ligação das seqüências transmembrana S5 e S6 e é chamada de H5 ou região do poro (Jan e Jan, 1992).



Esquema 4: Estrutura da subunidade dos canais K_V . A subunidade consiste de 6 regiões hidrofóbicas (S1-S6) localizadas na membrana citoplasmática e a região do poro localiza-se entre S5 e S6 (H5). N, amino terminal; C, carboxi terminal. Adaptado de *Am J Physiol.* 1995; 268:C799-822.

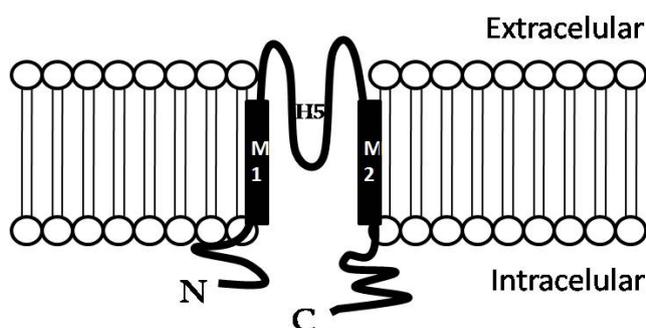
O inibidor mais seletivo de canais K_V no músculo liso vascular é a 4-aminopiridina (4-AP), que é utilizada para separar as correntes de K_V das correntes de K_{Ca} , que também são ativadas pela despolarização da membrana (Beech e Bolton, 1989a; Gelband e Hume, 1992; Ishikawa et al., 1993). A 4-AP causa despolarização e contração arterial, sugerindo que há atividade do canal em alguns vasos sanguíneos em condições basais (Robertson e Nelson, 1994; Sobey e Faraci, 1999). Outros agentes que inibem canais K_V incluem a fenciclidina e quinidina (Beech e Bolton, 1989b). O TEA também inibe canais K_V , embora em concentrações muito superiores às necessárias para inibir K_{Ca} (Beech e Bolton, 1989a; Ishikawa et al., 1993, Okabe et al., 1987, Robertson e Nelson, 1994).

1.1.5.3. Canais de potássio de retificação interna (K_{IR})

Esses canais são assim chamados por conduzirem correntes de K^+ para o interior da célula muito mais prontamente do que para o exterior. Esses canais são ativados pela hiperpolarização da membrana, por valores mais negativos que o potencial de equilíbrio do potássio, diferindo dos canais K_V e K_{Ca} , que são ativados pela despolarização da membrana.

Os canais K_{IR} possuem dois domínios transmembrana (M1 e M2) e entre eles há uma região altamente conservada (H5) que mergulha na membrana pelo lado

extracelular, e forma parte do poro do canal. As regiões carboxi- e amino-terminais estão no lado intracelular da membrana (Esquema 5). Os canais K_{IR} não possuem os domínios transmembrana que equivalem ao S1 ao S4 que estão presentes nos canais K_V . Algumas evidências apontam que, assim como os canais K_V , quatro subunidades K_{IR} se agregam para formam um canal funcional, e tanto homotetrâmeros como heterotetrâmeros podem ser funcionais (Yang et al., 1995).



Esquema 5: Estrutura dos canais K_{IR} . O canal possui dois domínios transmembrana (M1 e M2) e a região do poro (H5). N, amino terminal; C, carboxi terminal. Adaptado de *Am J Physiol.* 1995; 268:C799-822.

As proteínas que formam tanto o poro dos canais K_{IR} quanto dos K_{ATP} pertencem à mesma família estrutural, a família de canais de potássio de retificação interna (Kir), porém pertencem a diferentes subfamílias. Seis subfamílias diferentes são reconhecidas, denominadas Kir1.0 a Kir6.0 (para revisão ver Quayle et al., 1997), e em relação ao músculo liso, duas subfamílias são de interesse: Kir2.0 e Kir6.0, sendo que o último forma, juntamente com proteínas receptoras de sulfoniluréias (SUR), os canais K_{ATP} , que serão abordados mais adiante.

No músculo liso arterial, foram identificados canais K_{IR} apenas em arteríolas e pequenas artérias. Embora a exata função desses canais no músculo liso vascular não seja conhecida, há basicamente, duas possibilidades. A primeira é que os canais K_{IR} contribuam para o potencial de repouso da membrana no músculo liso de vasos de pequeno calibre. Estudos mostram que há contração de artérias cerebrais e coronárias de pequeno calibre em resposta ao Ba^{2+} , um inibidor desses canais (Park et al., 2007a; Park et al., 2007b). A segunda, é que a ativação dos canais K_{IR} em resposta a aumentos moderados de K^+ extracelular pode causar vasodilatação. Essa hipótese vem do fato de que a vasodilatação pode ser prevenida por Ba^{2+} mas não pela

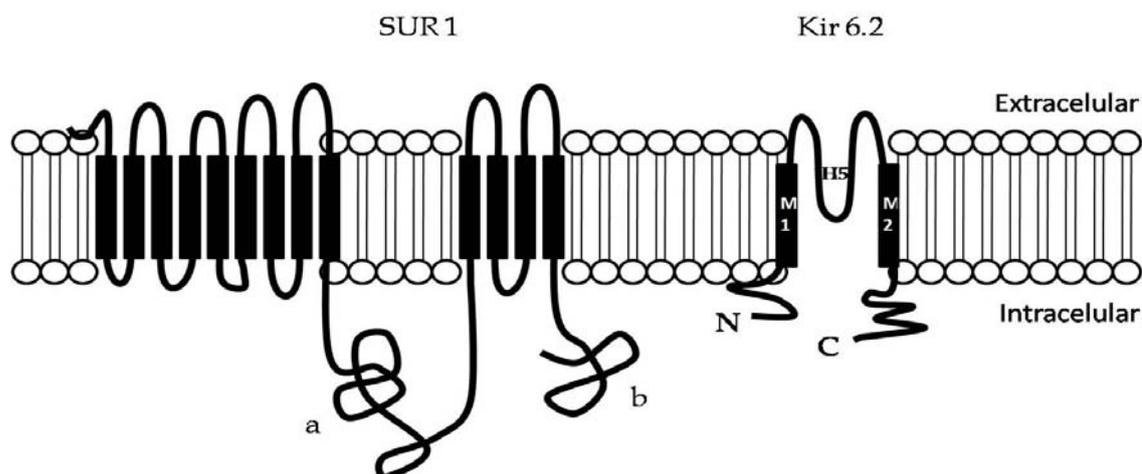
retirada do endotélio ou por inibidores de outros canais de potássio (Chrissobolis et al., 2000; Park et al., 2007b).

A quantidade de trabalhos sobre os canais K_{IR} no músculo liso é bastante escassa. O Ba^{2+} bloqueia os canais K_{IR} de células do músculo liso vascular, e embora seja menos efetivo, também bloqueia K_{ATP} , K_V e K_{Ca} . A falta de bloqueadores seletivos para canais K_{IR} torna os estudos sobre esses canais muito difíceis, embora as suas funções nas células do músculo liso vascular pareçam ser de qualquer forma, mais limitadas do que os demais canais (Quayle et al., 1997).

1.1.5.4. Canais de potássio sensíveis ao ATP (K_{ATP})

Os canais K_{ATP} foram assim chamados devido à sensibilidade ao ATP intracelular, que os fecha. Em contraste, difosfatos de nucleotídeos (NDP) como adenosina difosfato (ADP) ativam o canal. Assim, a razão ATP/NDP é um dos fatores determinantes para a atividade do canal. Durante o estresse metabólico, os níveis de ATP caem e os de ADP aumentam, promovendo abertura substancial desses canais nessas condições. Além do metabolismo celular, os canais são regulados por outros fatores como quinases, fosfatases e proteínas G (para revisão, ver Buckley et al., 2006).

Os canais K_{ATP} são um complexo de pelo menos duas proteínas, o receptor de sulfoniluréias (SUR; ver esquema 6) associado a uma subunidade formadora do poro que pertence à família Kir6.0 (ver item 1.1.5.3). A estequiometria do canal consiste de um tetrâmero de subunidades Kir6.0 (principalmente Kir6.1 e Kir6.2), que forma o poro do canal, rodeada de quatro proteínas SUR. Para formar um canal funcional, ambas as subunidades SUR e Kir6.1 ou Kir6.2 são essenciais, já que nenhum canal é formado quando essas proteínas são expressas sozinhas. São as subunidades SUR que conferem ao canal sensibilidade às sulfoniluréias e aos abridores do canal, como o diazóxido, e uma vez que essas subunidades possuem o domínio de ligação de nucleotídeos, elas também conferem sensibilidade ao ATP (Standen, 1997).



Esquema 6: Estrutura dos canais K_{ATP} . À esquerda está representado o receptor de sulfoniluréias (SUR1) que possui 13 (9 + 4) segmentos transmembrana juntamente com 2 domínios de ligação de nucleotídeos intracelulares chamados *a* e *b*. A subunidade Kir (representado por Kir6.2), à direita, também forma o canal (ver esquema 4 para detalhes). Adaptado de *Journal of Physiology* (1997), 498:1.

Diferentes combinações das subunidades formadoras do poro (Kir) e SUR conferem características específicas de cada tecido. Por exemplo, os canais K_{ATP} do músculo liso vascular (Kir6.1/SUR2B) são relativamente insensíveis ao ATP, entretanto são ativados por NDPs. Kir6.2 juntamente com SUR1 formam o canal K_{ATP} das células β do pâncreas (Rodrigo e Standen, 2005). A Tabela 2 ilustra algumas combinações e funções dos canais K_{ATP} em alguns tecidos.

O papel melhor caracterizado dos canais K_{ATP} é o controle da liberação de insulina das células β pancreáticas. Durante o jejum, os canais são mantidos abertos em decorrência dos baixos níveis de glicose sanguínea. Após o desjejum, os níveis de glicose aumentam elevando o ATP intracelular, resultando em fechamento dos canais K_{ATP} e despolarização da membrana das células β . Isso por sua vez, abre canais de cálcio dependentes de voltagem permitindo que o cálcio entre na célula, o que leva à exocitose de grânulos que contem insulina e, portanto, estimula a liberação de insulina (Seino e Miki, 2003).

No músculo liso vascular, a principal função dos canais é a manutenção do potencial de repouso da membrana e do fluxo sanguíneo local. Os canais influenciam o tônus vascular já que uma pequena despolarização é capaz de gerar grandes mudanças no influxo de cálcio através dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Isso promove a contração das células do músculo liso vascular (ver Esquema 1).

TABELA 2: Membros do grupo de canais K_{ATP}

<i>Subunidades</i>	<i>Localização</i>	<i>Principal Função</i>
Kir6.2/SUR1	Células do pâncreas	Liberação de insulina
Kir6.2/SUR2A	Cardiomiócitos	Baixa probabilidade de abertura em estado fisiológico normal
Kir6.2/SUR2B	Músculo liso	Modulação da contração no cólon, bexiga e vias aéreas
Kir6.1/SUR2B	Músculo liso vascular	Potencial de repouso da membrana

É bem estabelecido que substâncias vasoativas modulam a atividade dos canais K_{ATP} . Vasodilatadores que aumentam o cAMP, como adenosina e prostaciclina, ativam os canais K_{ATP} e produzem relaxamento e hipotensão (Rodrigo e Standen, 2005; Quayle et al., 1997). Agentes que aumentam o cGMP também podem ativar os canais K_{ATP} no músculo liso vascular (revisado em Quayle et al., 1997) e em cardiomiócitos (Han et al., 2002), o que envolve PKG. Por outro lado, vasoconstritores como noradrenalina, vasopressina, endotelina e angiotensina II, inibem os canais K_{ATP} via ativação de PKC e aumento da síntese de ATP (Rodrigo e Standen, 2005; Quayle et al., 1997).

Os canais K_{ATP} do músculo liso são inibidos pelas sulfoniluréias como glibenclamida e tolbutamida, e por Ba^{2+} (Ashcroft e Ashcroft, 1990; Clapp e Gurney, 1991; Dart e Standen, 1993). Não são bloqueados por inibidores dos canais K_{Ca} , como caribdotoxina e iberiotoxina, e são relativamente insensíveis ao TEA (Nelson et al., 1990). Abridores dos canais K_{ATP} incluem compostos que foram utilizados como anti-hipertensivos, como o sulfato de minoxidil e o diazóxido, e outras drogas como pinacidil, nicorandil e cromakalim. A ação de todos esses vasodilatadores é bloqueada pela glibenclamida (Standen et al., 1989).

1.1.6. Papel dos canais de potássio na sepse

Alterações na função dos canais de K^+ do músculo liso estão envolvidas em condições patológicas da vasculatura, como alterações da reatividade vascular que ocorrem na hipertensão, no diabetes, na aterosclerose (Sobey, 2001), além de estar

implicado na hipotensão e hiporeatividade a vasoconstritores que ocorre durante o choque endotóxico (Ledoux et al., 2006).

As primeiras evidências ligando canais de potássio e sepsse foram descritas em um artigo mostrando que um bloqueador de K_{ATP} restaurou a pressão arterial em cães com acidose láctica induzida por LPS (Landry e Oliver, 1992). Sabe-se que o NO pode abrir canais BK_{Ca} (Williams et al., 1988; Fujino et al., 1991), um efeito que pode ser mediado por cGMP produzido pela estimulação da guanilato ciclase (Hall et al., 1996; Wu et al., 1998, Robertson et al., 1993; Archer et al., 1994) ou diretamente pelo NO (Bolotina et al., 1994). A via NO/cGMP também pode ativar canais K_V em alguns vasos sanguíneos (Yuan et al., 1996).

Aortas de rato incubadas com LPS ou obtidas de animais injetados com LPS mostram uma característica perda de resposta a agentes vasoconstritores, a qual é atribuída à ativação de canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}) pelo NO (Hall et al., 1996; Chen et al., 2000b; Terluk et al., 2000). O envolvimento de canais de potássio ativados pelo NO (principalmente K_{ATP} e K_{Ca}) também foi mostrado na hipotensão e na hiporeatividade vascular causada pelo LPS em ratos (Chen et al., 1999; Gardiner et al., 1999; Silva-Santos et al., 2002) e na diminuição do potencial de ação cardíaco em cobaias (Chen et al., 2000a). A relevância de canais K_{ATP} nas alterações vasculares causadas pelo LPS foram confirmadas em suínos (Vanelli et al., 1997) e em ratos (Sorrentino et al., 1999). Pelo menos alguns dos efeitos causados pelo LPS no sistema vascular são relacionados ao aumento da expressão de genes que codificam canais de potássio (Sorrentino et al., 1999, Czaika et al., 2000).

Dados prévios do nosso laboratório indicam que a hiporeatividade a agentes vasoconstritores dependente de NO persiste por longos períodos de tempo, mesmo quando a atividade da NOS-2 já desapareceu (ver item 1.1.4) (Silva-Santos e Assreuy, 1999; Terluk et al., 2000). Assim, os efeitos vasculares duradouros podem ser resultantes de uma complexa interação entre os canais de potássio e o óxido nítrico (Silva-Santos et al., 2002).

Uma recente publicação mostrou que a vasodilatação induzida pela ativação de canais K_{ATP} está relacionada a uma importante redução das respostas vasoconstritoras em humanos não-sépticos à noradrenalina. De acordo com os autores do trabalho, os dados indicam que a ativação de canais K_{ATP} pode ser um dos

responsáveis pela hiporeatividade à noradrenalina em pacientes sépticos (Pickkers et al., 2004).

Tanto a expressão como a funcionalidade de alguns subtipos de canais de potássio pode ser modificada após um estímulo inflamatório (Autieri et al., 1997; Czaika et al., 2000; Rus et al., 2005). Estes dados permitem especular que estas alterações também podem acontecer durante a sepse/choque séptico, e estes efeitos podem inclusive ser modulados pelo próprio NO. Ainda, não só o NO é capaz de modular a atividade dos canais de potássio, como estes parecem ter importante papel na sinalização da expressão da NOS-2 e conseqüente produção de NO. Os canais de potássio parecem ter um importante papel na sinalização intracelular de cascatas inflamatórias. Por exemplo, a liberação de TNF- α por macrófagos é dependente do potencial de membrana (Haslberger et al., 1992) e pode ser inibida por bloqueadores de canais de potássio (Maruyama et al., 1994; Blunck et al., 2001; Seydel et al., 2001). Além disso, já foi demonstrado que o efluxo de potássio tem um importante papel na síntese de IL-1 β em monócitos estimulados por LPS (Walev et al., 1995), bem como na expressão da NOS-2 e produção de NO (Lowry et al., 1998; Wu et al., 1998).

Dessa forma, observamos que os dados da literatura são vastos e ilustram o envolvimento de diferentes tipos de canais de K⁺ nas alterações vasculares que ocorrem na sepse. Entretanto, faltam dados sobre as conseqüências e/ou benefícios sobre um possível tratamento com inibidores desses canais, além de controvérsias a respeito do subtipo de canal de potássio envolvido nessas alterações.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Considerando que os canais de potássio têm papel central em várias alterações hemodinâmicas induzidas pelo NO durante a sepse, e ainda, que os canais de potássio podem estar envolvidos na sinalização da expressão da NOS-2, e conseqüentemente da produção de NO, este trabalho objetiva uma melhor compreensão das conseqüências de possíveis tratamentos com bloqueadores de diferentes subtipos de canais de potássio em um modelo de sepse experimental em ratos.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar as conseqüências do tratamento com bloqueadores de canais K_{Ca} , K_V e K_{ATP} na sobrevivência de animais após a indução da sepse;
- Avaliar o envolvimento de canais de potássio em alterações hemodinâmicas, inflamatórias e de dano tecidual em animais sépticos;
- Estudar o padrão de expressão da NOS-2 e produção de NO após o tratamento de animais sépticos com bloqueadores de canais de potássio.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar (fêmeas), de 2,5 a 3 meses, pesando entre 200-300 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de claro/escuro (12/12 h) controlados automaticamente. Os animais tiveram livre acesso a alimentação e água até o momento do experimento. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA/UFSC) e estão de acordo com as Diretrizes de Cuidados com Animais de Laboratório dos Institutos Nacionais de Saúde, dos Estados Unidos da América (NIH; USA).

3.2. Procedimentos experimentais

3.2.1. Indução da sepse: modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina (90/15 mg/kg, i.p.). Em seguida foram submetidos a uma laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm e subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco. O ceco dos animais foi exposto e perfurado 20 vezes com agulhas 18G, seguido de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Após a perfuração do ceco o intestino foi recolocado na cavidade abdominal, e a musculatura e a pele do animal foram suturadas. Os animais receberam 2 ml de salina s.c. para reposição fluídica (Benjamin et al., 2000) e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (60 a 120 minutos). Os animais controles foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos não sofrendo, contudo, ligadura e perfurações no ceco (animais falso-operados ou Sham).

3.2.2. Avaliação da sobrevivência dos animais

A avaliação da sobrevivência dos animais Sham ou CLP foi acompanhada a cada 12 horas, durante 72 horas. Neste período, os animais foram mantidos em local com temperatura ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h) controlado automaticamente, com livre acesso à ração e água.

3.2.3. Avaliação da pressão arterial em ratos

Neste estudo, utilizamos o modelo de medida direta da pressão arterial de animais anestesiados. Foi utilizado como anestésico uma mistura contendo cetamina (90 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), injetada pela via intramuscular. A associação dessas drogas é capaz de gerar uma anestesia profunda, sem nenhuma depressão cardiovascular ou respiratória aparente, com padrão de resposta para vasoconstritores melhor do que o obtido com outros anestésicos clássicos, como por exemplo a uretana (Gratton et al., 1995). Nos experimentos mais prolongados, pequenas doses de reforço (30 e 7 mg/kg, i.m., de cetamina e xilazina, respectivamente) foram administradas a cada 60-75 minutos, também pela via intramuscular.

Uma vez anestesiados, os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida (temperatura de 37 °C). Em todos os experimentos, a veia femoral esquerda foi dissecada para a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE 50) e seringa. Esse acesso venoso foi utilizado como via de administração para muitos dos compostos. Imediatamente após a canulação da veia femoral, 30 UI de heparina sódica, diluída em 100 µl de solução salina tamponada com fosfato, segundo a formulação de Dulbecco (PBS, composição em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5, NaHPO₄ 8,1; pH 7,4), foi injetada pela via intravenosa para prevenir a formação de coágulos e a obstrução das cânulas. Para facilitar a respiração espontânea, todos os animais foram submetidos à traqueotomia. Na seqüência, a artéria carótida esquerda foi localizada e, de forma cuidadosa e rápida, separada do nervo vago e tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da artéria carótida foi interrompido na extremidade distal ao coração através da ligadura com fio de sutura, enquanto o fluxo da extremidade proximal foi temporariamente suprimido por compressão com uma pinça curva. Um pequeno corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida clampeada, servindo como via de inserção de um catéter de polietileno (Angiocath®, número 19), devidamente heparinizado. Este cateter foi firmemente amarrado na artéria e conectado ao transdutor de pressão (Mikro-Tip®, Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, USA) conectado a um equipamento de análise de pressão arterial Powerlab 8/30 (AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Australia). Os valores de pressão arterial

média (PAM; em mmHg) e da frequência cardíaca (em batimentos por minuto, bpm) foram registrados em um computador (sistema operacional Windows XP®, Microsoft Corporation, EUA) por um software de integração (Chart 5®) do fabricante.

A administração intravenosa dos compostos de interesse, bem como a avaliação das respostas cardiovasculares em nossos experimentos *in vivo*, foi iniciada entre 20 a 30 minutos após o término da manipulação cirúrgica. Esse período mostrou-se suficiente para a estabilização da pressão arterial média, geralmente elevada pelo estresse cirúrgico.

O agente vasoativo estudado foi o agonista seletivo $\alpha 1$ -adrenérgico, a fenilefrina, a qual foi dissolvida em PBS e administrada lentamente (volume final de 50 μ l). Imediatamente após, mais 150 μ l de PBS foram injetados para garantir que nenhum resíduo da droga em uso permanecesse na cânula de polietileno. A injeção lenta de 200 μ l de PBS, por si só, não foi capaz de alterar a pressão arterial média, o que nos garantiu que os efeitos observados foram resultados das ações das drogas administradas. A reatividade vascular foi avaliada através da injeção de três doses crescentes. A elevação da pressão arterial média iniciava-se imediatamente após a administração do composto vasoativo, perdurando por períodos entre 10 segundos a 4 minutos, sendo o pico do efeito observado sempre ao longo do primeiro minuto.

Ao término dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através da administração intravenosa de xilocaína.

3.2.4. Coleta de sangue e de órgãos

Para coleta das amostras de sangue e de órgãos os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (15 mg/kg), injetada pela via intraperitoneal. Adicionalmente, cada animal recebeu 30 UI de heparina pela mesma via. Após abertura da cavidade torácica, aproximadamente 2 ml de sangue foram coletados por punção cardíaca em tubo contendo heparina, 5 UI /ml de sangue. Parte do sangue coletado foi utilizada para algumas determinações e o restante centrifugado por 10 minutos a 3.000 g para separação do plasma. Amostras de pulmão e de músculo esquelético da coxa dos animais foram coletados para serem utilizados nos ensaios de mieloperoxidase e *Western blotting*. O plasma e os tecidos

coletados foram imediatamente congelados e armazenados em freezer -80°C até o momento das análises, por um período nunca superior a 2 semanas.

3.2.5. Dosagens plasmáticas

3.2.5.1. Dosagem de nitrato e nitrito (NO_x)

A metodologia utilizada para a dosagem dos valores de NO_x já foi descrita detalhadamente (Granger et al., 1990). Os níveis de NO foram quantificados mensurando-se a soma das concentrações de nitrato + nitrito, utilizando o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftil-etilenodiamina em água de Milli-Q). Após a conversão enzimática do nitrato a nitrito, a adição do reagente de Griess produz cor lilás (leitura em 540 nm). O plasma foi diluído 1:1 com água Milli-Q e desproteínizado pela adição de sulfato de zinco (2%). Para a conversão do nitrato para nitrito, as amostras foram incubadas a 37°C durante 2 horas, em presença da nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* cultivada em anaerobiose. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas para a remoção das bactérias, e 100 μl do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess em placas de 96 poços para leitura a 540 nm num leitor de microplacas (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). Curvas-padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 μM) foram realizadas simultaneamente. Como nestas condições a conversão de nitrato para nitrito foi sempre maior que 90%, não foram realizadas correções dos resultados. Finalmente, por meio de regressão linear, os valores foram expressos como μM de NO_x (nitrato e nitrito).

3.2.5.2. Dosagem de uréia

A uréia constitui uma indicação do estado da função renal (Jacobs et al., 1996). A dosagem de uréia no plasma foi determinada através do kit Bioclin (K047, Belo Horizonte, MG). A uréia é hidrolisada pela enzima urease, com formação de íons amônio (NH_4^+) e dióxido de carbono (CO_2). Em pH alcalino, a amônia origina um composto esverdeado, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de uréia na amostra analisada. Utilizou-se 1 μl de amostra para um volume final de reação de 200 μl . As dosagens foram realizadas em placas de leitura de 96 poços e registradas

por absorvância a 630 nm em um leitor de microplacas (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL de uréia.

3.2.5.3. Dosagem de creatinina

A creatinina é produzida e excretada em um ritmo constante e é considerada um marcador mais confiável de dano renal (Jacobs et al., 1996). A determinação da concentração de creatinina nas amostras de plasma foi realizada através do kit Bioclin (K016, Belo Horizonte, MG). Em meio alcalino, a creatinina reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhada, que é medido fotometricamente (absorvância a 490 nm). Com adição de um reagente ácido o pH é diminuído e a cor referente à creatinina é desfeita, permanecendo apenas a cor devida aos cromogênios, também registrada por absorvância a 490 nm. Por diferença entre as leituras obtidas no pH alcalino e no pH ácido obtém-se o valor real da concentração de creatinina nas amostras. A reação utilizou 20 µl de amostra para um volume final de 200 µl, e foi feita em placas de leitura de 96 poços em um leitor de microplacas (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL de creatinina.

3.2.5.4. Dosagem de lactato

Lactato é o produto final da glicólise anaeróbia e é utilizado como indicador do estado de oxigenação em tecidos celulares (Jacobs et al., 1996). O lactato plasmático foi determinado através do kit Bioclin (K084, Belo Horizonte, MG) pelo método UV enzimático. O princípio dessa mensuração consiste na conversão do lactato a piruvato pela ação da lactato desidrogenase, ocorrendo consumo de NAD⁺ com formação estequiométrica de NADH. A absorvância do NADH produzido é proporcional à concentração de lactato na amostra. Foram utilizados 2 µl de amostra de plasma para um volume final de 200 µl. A absorvância foi detectada por U.V. em 340 nm em espectrofotômetro. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL de lactato.

3.2.5.5. Dosagem da enzima transaminase oxalacética (TGO)

A atividade da TGO plasmática foi mensurada pelo uso do kit Bioclin (K034, Belo Horizonte, MG) e usada com índice de dano hepático (Jacobs et al., 1996). A transaminase catalisa a transferência do grupamento amino do aspartato para o cetoglutarato com formação de glutamato e oxalacetato. O oxalacetato reage com a dinitrofenilhidrazina formando a hidrazona que adquire coloração máxima quando em meio alcalino. A coloração é diretamente proporcional à atividade enzimática da amostra. Foram utilizados 8 µl de amostra para um volume final de reação de 200 µl. As dosagens foram realizadas em placas de 96 poços para leitura da absorbância a 490 nm em um leitor de placas (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em U/mL de TGO.

3.2.5.6. Dosagem da enzima transaminase pirúvica (TGP)

Esta enzima também foi utilizada como índice de dano hepático (Jacobs et al., 1996). A reação da enzima com seu substrato tem como resultado a geração de piruvato, que reage formando um composto de cor. Em pH alcalino, a intensidade de coloração formada é diretamente proporcional à quantidade de piruvato, que por sua vez é função da atividade enzimática. Utilizou-se 4 µl de amostra para um volume final de reação de 200 µl. As dosagens foram realizadas em placas de 96 poços para leitura da absorbância a 490 nm em um leitor de placas (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em U/mL de TGP.

3.2.5.7. Dosagem de íons sódio e potássio

A dosagem do sódio e potássio foi realizada pelo método de ISE (Eletrodo íon seletivo) pelo sistema de química clínica Dimension®XL (Dade Behring, Newark, USA). Os valores foram expressos em mEq/L.

3.2.6. Dosagem de glicose

A glicose foi mensurada eletroquimicamente por meio do sistema de monitoramento da glicemia TrackEASE Smart System (Home Diagnostics, Inc.; Fort

Lauderdale, Florida, USA). Foi utilizada uma gota de sangue da cauda dos animais, e os resultados foram obtidos em mg/dL.

3.2.7. Contagem total de leucócitos

A amostra de sangue total foi diluída em líquido de Türk numa proporção de 1:40. Em seguida, a contagem de células foi feita em câmara de Neubauer. O número de leucócitos foi expresso como células $\times 10^3/\text{mm}^3$.

3.2.8. Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) em pulmão

O recrutamento de neutrófilos para o pulmão foi quantificado indiretamente através da medida da atividade enzimática da MPO (Mullane et al., 1985). Os órgãos foram homogeneizados em solução de tampão fosfato de sódio (80 mM; pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB; 0,5 %, p/v). O homogenato resultante foi então centrifugado (20 min, 10.000g, 4°C) e o sobrenadante foi utilizado para o ensaio de determinação da atividade da enzima MPO. Para o ensaio enzimático foi utilizada uma alíquota de 25 μL do sobrenadante. A reação enzimática foi desenvolvida na presença de tetrametilbenzidina (1,6 mM) e H_2O_2 0,5 mM (em solução tampão fosfato 80 mM; pH 5,4) por 3 minutos em um volume final de 200 μL . A reação foi interrompida com H_2SO_4 1M. A absorbância foi medida em um leitor de placas a 490 nm (Ultra microplate reader EL 808, Biot-Tek Instruments, INC., EUA). A quantidade de proteína total foi estimada pelo método de Bradford (Bradford, 1976) e os valores foram apresentados na forma de unidades de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

3.2.9. Imunoeletroforese (*Western Blotting*)

3.2.9.1. Preparação de amostras

Amostras de pulmão e músculo esquelético foram homogeneizados em tampão mantido a 4°C, composto por Hepes 50 mM, MgCl_2 1 mM, EDTA 10 mM e Triton X-100 1%, pH 6,4. No momento da homogeneização foram adicionados ao tampão os seguintes inibidores de proteases: aprotinina 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, inibidor de tripsina do feijão de soja (SBTI) 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ e PMSF 1 mM. Os homogenatos foram centrifugados a 4°C por 40 minutos, 14.000 g. Após a

centrifugação, foi coletado o sobrenadante de cada amostra e deste foi separada uma alíquota para dosagem de proteínas. Ao restante do sobrenadante, foi adicionado 1/5 do volume da amostra de tampão de amostra 5X concentrado (glicerol 25%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl pH 7,5, 60 mM e SDS 2%). As amostras foram fervidas por 5 minutos e permaneceram armazenadas a -20°C até o momento do uso. A concentração de proteínas de cada amostra foi determinada através do método de Bradford (Bradford, 1976).

3.2.9.2. Separação de proteínas e imunodeteção

As proteínas (75 µg/poço) foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida) contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Foi utilizado um gel de separação (acrilamida 8%, bis-acrilamida 0,2%, Tris 375 mM, SDS 0,1%, TEMED 0,06% e persulfato de amônia 0,04%; pH 8,8) e um gel de entrada (acrilamida 4%, bis-acrilamida 0,09%, Tris 125 mM, SDS 0,1%, TEMED 0,08% e persulfato de amônia 0,03%; pH 6,8). A eletroforese foi realizada a 4°C com corrente máxima de 25 mA por placa e voltagem fixa de 140 V, por aproximadamente 2 horas e trinta minutos, utilizando-se tampão de corrida composto de glicina 192 mM, Tris 12,5 mM e SDS 1%, numa cuba (Amersham, Buckinghamshire, UK). Após a eletroforese, os géis foram equilibrados por 15 minutos sob agitação em tampão de eletrotransferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, pH 8,3). Membranas de polifluoreto de vinilideno (PVDF) foram imersas em metanol 100%, lavadas com água destilada e também mantidas em tampão de transferência. As proteínas foram transferidas do gel para a membrana num aparato de eletrotransferência (sistema semi-dry, Amersham, Buckinghamshire, UK), no sentido do pólo negativo para o positivo, a uma corrente constante de 0,8 mA/cm² de membrana e voltagem máxima de 15 V. Em seguida as membranas foram coradas (vermelho de Ponceau 0,2%, ácido tricloroacético 3%) para visualização das proteínas. Após lavagens em PBS/Tween (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 20 mM, Tween-20 0,05%) para a retirada do excesso do corante, iniciou-se o bloqueio de sítios não-ocupados nas membranas. Para tanto, foi feita uma incubação com PBS contendo leite desnatado 5% por 1 hora a temperatura ambiente e, após lavagens em PBS/Tween, outra incubação de 1 hora em PBS contendo gelatina 2%. Em seguida as membranas foram novamente lavadas

e então incubadas com anticorpos específicos anti-NOS-2 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) ou anti-actina (1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) durante a noite a 4°C. Ao término do período de incubação e lavagem com PBS/Tween, as amostras foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG ligado a biotina (Amersham, diluição 1:1000 em PBS/Tween). A seguir, a membrana foi novamente lavada com PBS/Tween e incubada com estreptavidina conjugada com peroxidase (Amersham, diluição 1:1000 em PBS/Tween) por 1 h em temperatura ambiente. O excesso de anticorpo foi retirado através de lavagens em PBS/Tween e PBS para então realizar-se a revelação através de kit de quimiluminescência (ECL-Amersham®, Buckinghamshire, UK). As medidas de imunoconteúdo das proteínas de interesse foram determinadas por densitometria das bandas, através do programa Scion Image®.

3.2.10. Quantificação de unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias

3.2.10.1. Determinação do número de bactérias no sangue

A quantificação de bactérias no sangue foi realizada 24 horas após a cirurgia de CLP. Os animais foram anestesiados e 1,5 mL de sangue foram obtidos conforme descrito no item 3.2.4., no qual foram adicionadas 5 UI de heparina sódica. Foi semeado 10 µL de sangue total ou na diluição 1:10 em PBS estéril, em placas de Petri contendo meio ágar Mueller-Hinton. Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas a 37°C por 24 h e contado o número de colônias, que foi expresso como log de unidades formadoras de colônias por ml de sangue (log de UFC/mL).

3.2.10.2. Determinação do número de bactérias no lavado peritoneal

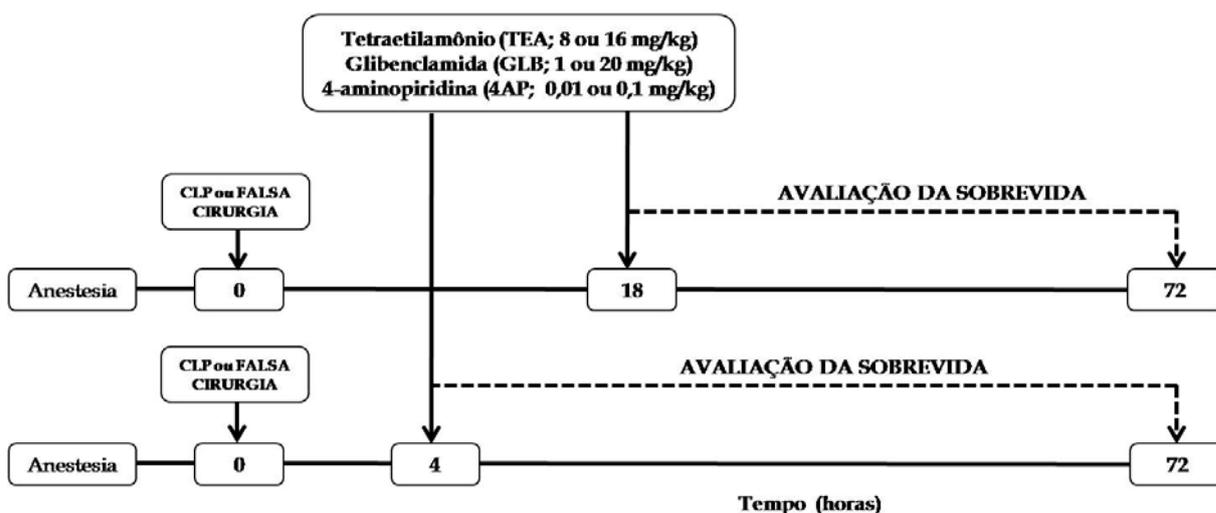
Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP, os animais foram sacrificados e o abdome foi desinfetado com álcool 70% e um pedaço da pele foi retirado sem lesionar o músculo. Foram injetados 3 mL de PBS estéril na cavidade peritoneal, a qual foi massageada por 1 minuto e então o lavado foi obtido por aspiração. O lavado foi diluído (1:100 e 1:1000) em PBS estéril e 10 µL da solução foi semeada em placas de Petri contendo meio ágar Mueller-Hinton. Todo o procedimento foi feito sob condições estéreis. Após a semeadura, as placas foram incubadas por 24 h a 37°C

e contado o número de colônias, que foi expresso como log de unidades formadoras de colônias por cavidade (log de UFC/cavidade).

3.3. Protocolos experimentais

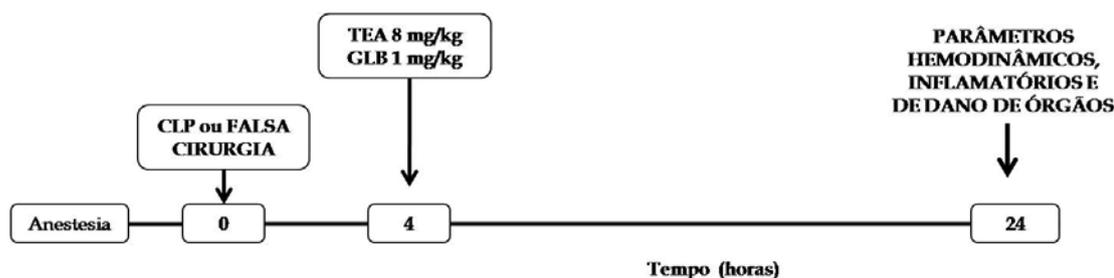
3.3.1. Avaliação dos efeitos de bloqueadores de canais de potássio na sobrevida de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Os animais receberam glibenclamida (GLB, bloqueador de canal de potássio ATP-dependente; 1 ou 20 mg/kg, s.c.), 4-aminopiridina (4-AP, bloqueador de canal de potássio voltagem-dependente; 10 ou 100 µg/kg, s.c.) ou tetraetilamônio (TEA, bloqueador não-seletivo de canais potássio; 8 ou 16 mg/kg, s.c.) 4 h ou 18h após o procedimento cirúrgico de CLP. O grupo CLP utilizado como controle recebeu veículo no mesmo tempo (4 h ou 18 h após a CLP). Os animais falso-operados (Sham) foram divididos em dois grupos, a metade dos animais recebeu GLB, 4-AP ou TEA na maior dose e a outra metade recebeu apenas veículo no tempo de 4 horas. A GLB foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) e foi injetada em um volume que não ultrapassou 0,5 ml/kg. O TEA e a 4-AP foram dissolvidos em PBS. As doses foram baseadas em trabalhos prévios do nosso laboratório (Silva-Santos e Assreuy, 1999; Silva-Santos et al., 2002), bem como em outros trabalhos (Sorrentino et al., 1999). A sobrevida foi avaliada ao longo de 72 horas.



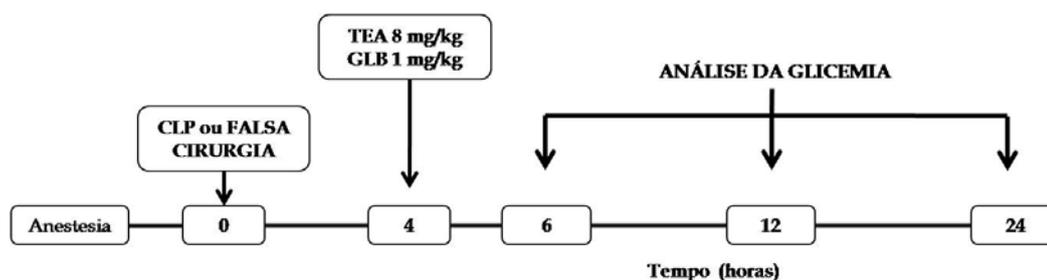
3.3.2. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de potássio em parâmetros hemodinâmicos, inflamatórios e marcadores de dano tecidual em animais submetidos à CLP

Os animais receberam tetraetilamônio (8 mg/kg, s.c.), glibenclamida (1 mg/kg, s.c.) ou veículo 4 h após o procedimento cirúrgico de CLP ou a falsa-cirurgia (Sham). Vinte e quatro horas após o procedimento cirúrgico, isto é, 20 horas após o tratamento, os animais foram preparados para análise da pressão arterial média, frequência cardíaca e resposta à fenilefrina como descrito no item 3.2.3. Após análise dos parâmetros hemodinâmicos, os animais foram sacrificados, o sangue, o pulmão e o músculo esquelético foram coletados para dosagens posteriores.



3.3.3. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de potássio na glicemia de animais submetidos à CLP

Os animais submetidos ao procedimento de CLP tiveram a glicemia mensurada em tempos determinados (0, 6, 12 e 24 h após CLP). Os grupos de animais receberam tetraetilamônio (8 mg/kg, s.c.), glibenclamida (1 mg/kg, s.c.) ou veículo 4 h após o procedimento cirúrgico de CLP ou a falsa-cirurgia (Sham).



3.4. Análise estatística

As análises estatísticas das curvas de sobrevivência foram realizadas pelo teste de *log-rank*. As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes quando $p < 0,05$. Os demais resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas foram realizadas pela análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni. Em alguns grupos foi aplicado o teste t de Student para amostras não-pareadas. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A análise de variância de duas vias foi feita utilizando-se o pacote estatístico Statistica® (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA) e os demais testes estatísticos foram realizados com o programa GraphPad Prism® (San Diego, CA, USA).

3.5. Drogas e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas neste estudo: tetraetilamônio, 4-aminopiridina, glibenclamida e fenilefrina (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA); anticorpos anti-NOS2 e anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA); cetamina (Parke-Davis, São Paulo, SP, Brasil); xilazina (Ronpum™, Bayer; São Paulo, SP, Brasil). A heparina foi gentilmente doada pela indústria farmacêutica Cristália (São Paulo, SP, Brazil). O restante dos sais e compostos foi adquirido de companhias com comprovada certificação de qualidade. Os sais e reagentes utilizados nos ensaios realizados foram dissolvidos em água destilada. Os compostos utilizados para o tratamento de animais foram diluídos em PBS, com exceção da glibenclamida (diluída em DMSO).

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de potássio na sobrevida de animais submetidos à cirurgia de perfuração e ligadura do ceco (CLP)

Os animais submetidos à cirurgia de CLP, logo após a recuperação da anestesia, apresentaram piloereção, tremores, sangramento ocular, prostração, atonia muscular e diminuição da movimentação, sinais da instalação do quadro de sepse.

Ao final de 72 horas de análise, não houve sobreviventes no grupo CLP que recebeu PBS (controle) (Figura 1, Painel A). A dose de tetraetilamônio de 16 mg/kg administrada 4 horas após a cirurgia de CLP não alterou a taxa de mortalidade quando comparada ao grupo CLP. Por outro lado, no grupo dos animais que recebeu a dose mais baixa de TEA (8 mg/kg) no tempo de 4 horas após o CLP, a mortalidade final foi de 50%, sendo significativamente menor quando comparada ao grupo CLP (Figura 1, Painel A). Surpreendentemente, a glibenclamida, também administrada 4 horas após o CLP, tanto na dose de 1 como de 20 mg/kg, aumentou a taxa de mortalidade, causando 100% de morte em 60 e 48 horas respectivamente (Figura 1, painel B).

A 4-aminopiridina não alterou a mortalidade quando comparada ao grupo CLP controle (Figura 1, Painel C). Por esta razão, não foram realizados mais estudos com esse bloqueador de canais de potássio dependentes de voltagem.

Foram realizados estudos de sobrevida administrando os bloqueadores de canais de potássio 18 horas após a cirurgia de CLP. Entretanto, nenhum dos bloqueadores utilizados em nenhuma das doses estudadas alterou a sobrevida quando comparado ao grupo CLP controle (Figura 2).

Dessa forma, os estudos subseqüentes foram realizados apenas com tratamentos realizados 4 horas após a cirurgia de indução de sepse (CLP), com a dose de 8 mg/kg de tetraetilamônio (que promoveu aumento da sobrevida dos animais) e com a dose de 1 mg/kg de glibenclamida.

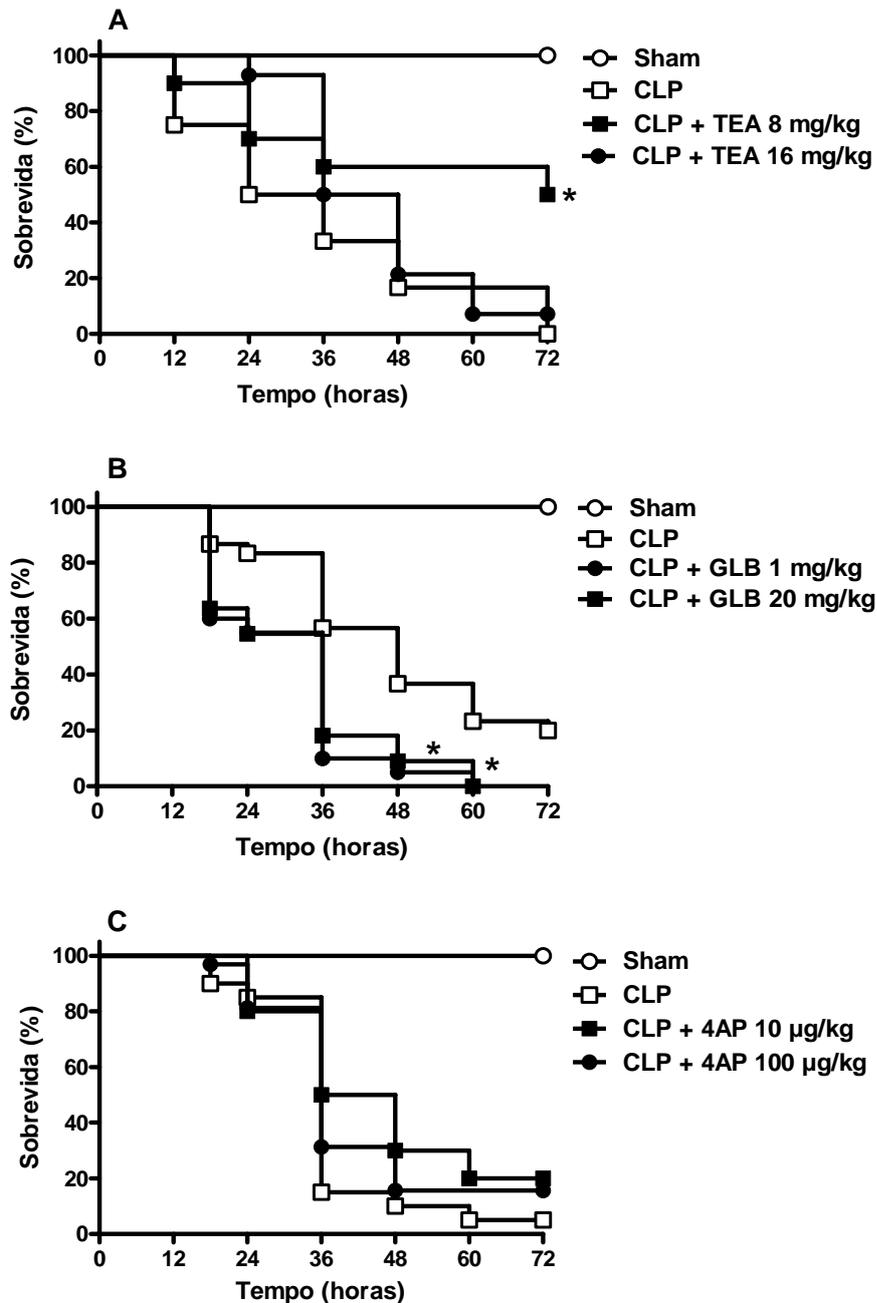


FIGURA 1: Efeito do tratamento com bloqueadores de canais de potássio 4 horas após a CLP na sobrevivência de ratos. Paineis A, B e C: Os animais submetidos ao CLP foram randomicamente divididos para receber tetraetilamônio (TEA; 8 ou 16 mg/kg, s.c.; Paineis A), glibenclamida (GLB; 1 ou 20 mg/kg, s.c.; Paineis B), 4-aminopiridina (4-AP; 10 ou 100 µg/kg, s.c.; Paineis C) ou veículo (PBS) no tempo de 4 horas após o procedimento cirúrgico. Cada grupo experimental foi comparado ao seu respectivo grupo CLP controle. O grupo Sham foi submetido à anestesia e abertura do abdome, mas não sofreu ligadura nem perfuração do ceco, e recebeu a dose mais elevada do bloqueador de canal de potássio pertinente ou veículo. Como não houve diferença entre os animais falso-operados, estes foram agrupados. A sobrevivência foi avaliada ao longo de 72 horas. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; comparados pelo teste log-rank, $n = 20$ para cada grupo CLP (veículo, TEA, 4-AP, GLB), $n = 5$ para cada grupo Sham (veículo, TEA, 4-AP, GLB)).

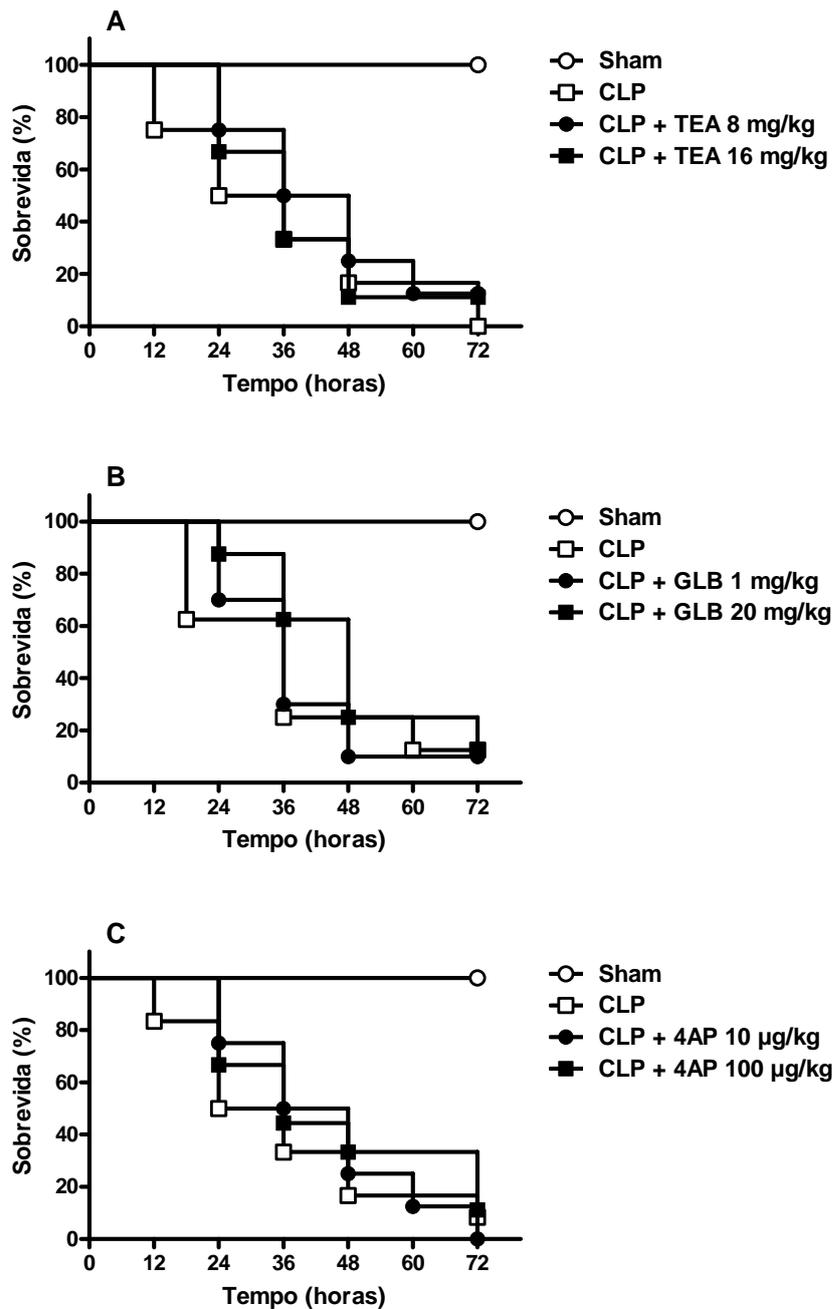


FIGURA 2: Efeito do tratamento com bloqueadores de canais de potássio 18 horas após a CLP na sobrevivência de ratos. Paineis A, B e C mostram a sobrevivência (%) dos ratos ao longo de 72 horas para diferentes tratamentos com bloqueadores de canais de potássio (TEA, GLB e 4-AP) em comparação com o grupo CLP controle e o grupo Sham. O grupo Sham foi submetido à anestesia e abertura do abdome, mas não sofreu ligadura nem perfuração do ceco, e recebeu a dose mais elevada do bloqueador de canal de potássio pertinente ou veículo. Como não houve diferença entre os animais falso-operados, estes foram agrupados. A sobrevivência foi avaliada ao longo de 72 horas. (* $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; comparados pelo teste log-rank, $n = 20$ para cada grupo CLP (veículo, TEA, 4-AP, GLB), $n = 5$ para cada grupo Sham (veículo, TEA, 4-AP, GLB).

4.2. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) sobre parâmetros cardiovasculares de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Os animais submetidos ao CLP apresentaram hipotensão e acentuado prejuízo na resposta vasoconstritora à fenilefrina no tempo de 24 horas após o procedimento cirúrgico (Figura 2), reproduzindo assim características importantes do choque séptico humano.

O tratamento com TEA na dose de 8 mg/kg quatro horas após o CLP além de reduzir a mortalidade melhorou a condição hemodinâmica dos animais. Como pode ser verificado na Figura 3, o tratamento com TEA preservou os valores de pressão arterial média (Painel A), frequência cardíaca (Painel B) e resposta vasoconstritora à fenilefrina (Painel C).

A glibenclamida não alterou nenhum dos parâmetros hemodinâmicos avaliados (Figura 4).

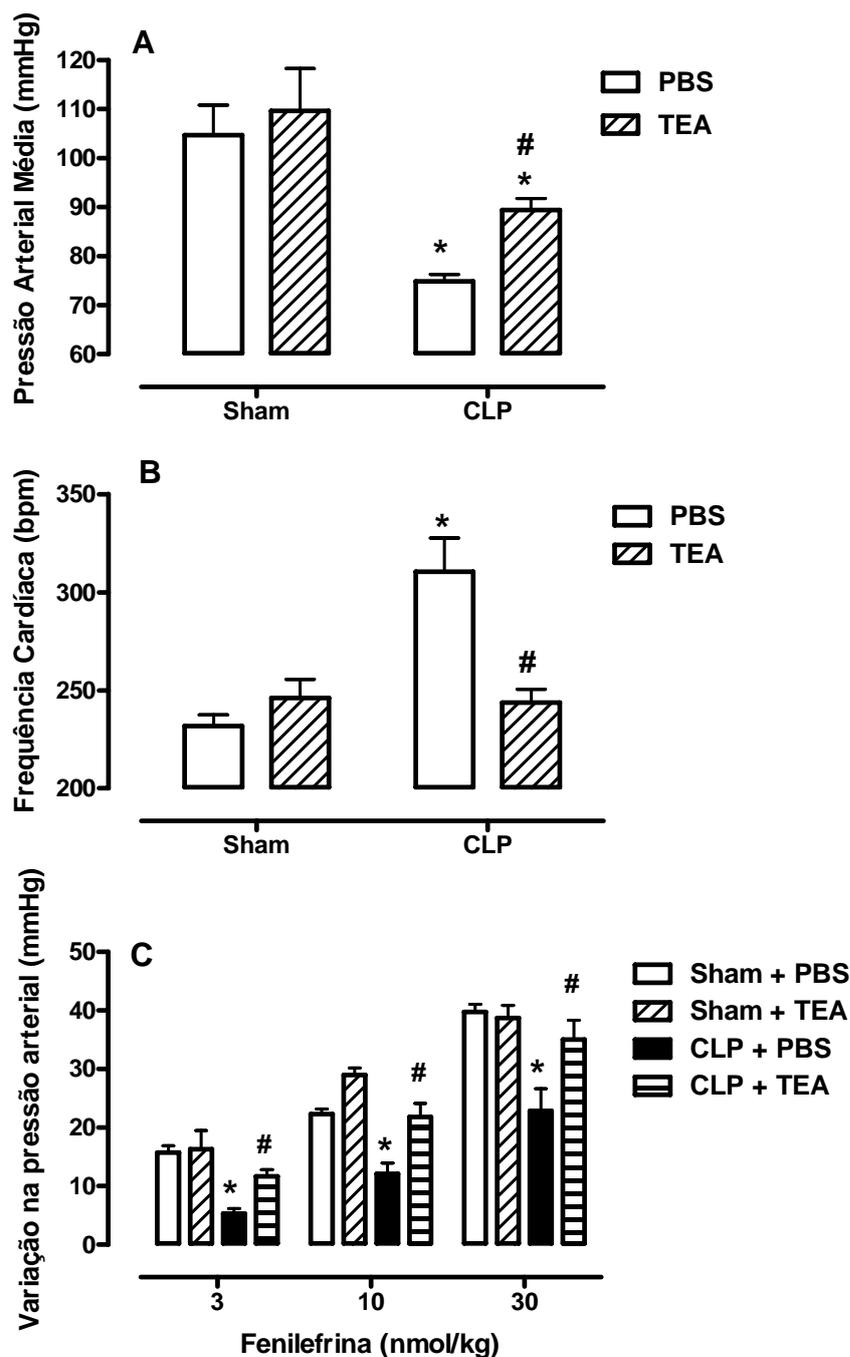


FIGURA 3: Efeito do tetraetilamônio (TEA) sobre parâmetros cardiovasculares de animais submetidos à CLP. Os animais receberam uma injeção de veículo (PBS) ou tetraetilamônio (TEA; 8 mg/kg, s.c.) 4 horas após o procedimento cirúrgico. Dezoito horas após o tratamento com PBS ou TEA (ou seja, 24 h após o procedimento cirúrgico) os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média (Painel A), frequência cardíaca (Painel B) e tiveram uma curva de fenilefrina registrada (Painel C). Os grupos sham representam os animais falso-operados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 4 a 6 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo sham, # $p < 0,05$, em relação ao grupo CLP (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni).

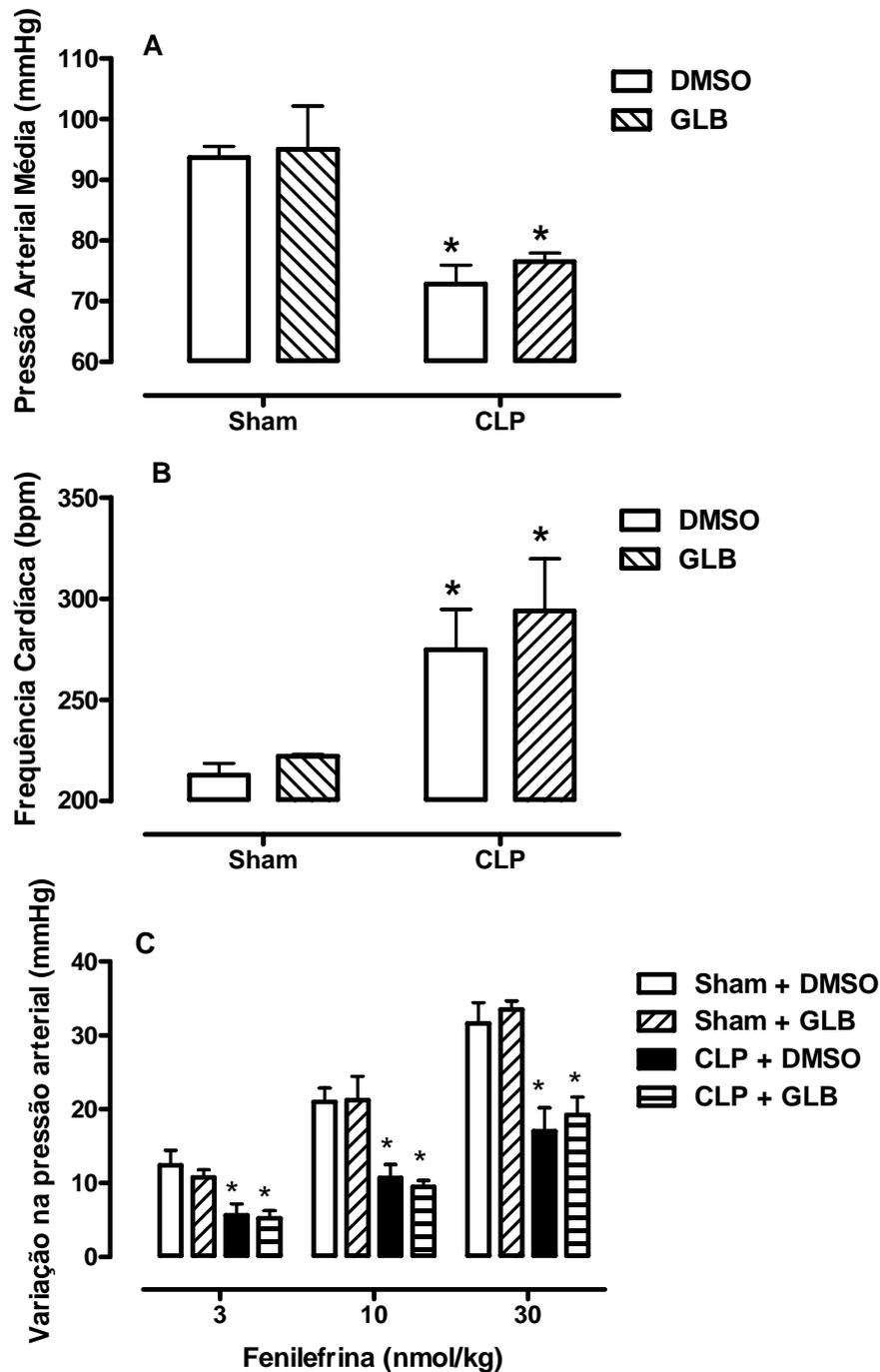


FIGURA 4: Efeito da glibenclamida (GLB) sobre parâmetros cardiovasculares de animais submetidos à CLP. Os animais receberam uma injeção de GLB (1 mg/kg, s.c.) ou veículo (DMSO) 4 horas após o procedimento cirúrgico. Dezoito horas após o tratamento com GLB ou veículo (portanto 24 h após o procedimento cirúrgico) os animais foram anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial média (Painel A), frequência cardíaca (Painel B) e tiveram uma curva de fenilefrina registrada (Painel C). Os grupos sham representam os animais falso-operados. Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 4 a 6 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo sham, # $p < 0,05$, em relação ao grupo CLP (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.3. Avaliação do efeito de bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) nos níveis de marcadores de dano tecidual, número de leucócitos totais e eletrólitos de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Nas Tabelas 3 e 4 podemos observar que os animais CLP exibiram aumento dos níveis de uréia e creatinina, sugestivos de dano renal, dos níveis de lactato, marcador de hipóxia tecidual, e da transaminase oxalacética (TGO), indicadora de comprometimento hepático. O tratamento com TEA 8 mg/kg foi capaz de reduzir os valores de uréia, creatinina e lactato, quando comparado ao grupo CLP controle (Tabela 3) e não alterou os valores de TGO. A glibenclamida não alterou nenhuma destas variáveis (Tabela 4).

A transaminase pirúvica e os eletrólitos sódio e potássio foram avaliados e não houve diferença entre os animais CLP e falso-operados. Entretanto os animais CLP+GLB desenvolveram hiponatremia quando comparado aos animais falso-operados.

Observamos também, comparado aos animais falso-operados, que os animais sépticos desenvolveram leucopenia, e que nenhum dos bloqueadores de canais de potássio foi capaz de alterar essa resposta (Tabelas 3 e 4).

TABELA 3: Efeito do tratamento com tetraetilamônio (TEA) em diversos parâmetros bioquímicos de animais submetidos à cirurgia de ligação e perfuração do ceco

PARÂMETROS	Sham		CLP	
	VEÍCULO	TEA	VEÍCULO	TEA
Uréia	21,7 ± 1,5	22,2 ± 2,7	39,0 ± 5,1*	24,7 ± 2,3#
Creatinina	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,04	0,44 ± 0,04*	0,31 ± 0,02*#
Lactato	9,1 ± 3,2	7,5 ± 1,4	22,1 ± 2,6*	12,9 ± 1,6#
TGO	119,3 ± 7,4	109,7 ± 10,2	161,2 ± 4,0*	155,0 ± 5,0*
TGP	63,7 ± 3,2	58,5 ± 3,6	60,1 ± 2,0	61,3 ± 3,5
Sódio	141,3 ± 1,2	142,3 ± 0,9	138,8 ± 1,1	140,2 ± 2,0
Potássio	4,6 ± 0,5	4,2 ± 0,3	5,1 ± 0,3	5,3 ± 0,3
Leucócitos	7,7 ± 0,7	8,0 ± 0,5	4,6 ± 0,5*	4,9 ± 0,7*

Ratos foram injetados com PBS ou tetraetilamônio (TEA, 8 mg/Kg, s.c.) 4 horas após o CLP ou falsa cirurgia (Sham). Vinte e quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram obtidas. Parâmetros avaliados: uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL), lactato (mg/dl), transaminase oxalacética (TGO; U/mL), transaminase pirúvica (TGP; U/mL), sódio (mEq/L), potássio (mEq/L) e número de leucócitos totais (n° células $\times 10^3/\text{mm}^3$). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média, n=6. * p < 0,05, em relação ao grupo Sham, # p < 0,05, em relação ao grupo CLP (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni).

TABELA 4: Efeito do tratamento com glibenclamida (GLB) em diversos parâmetros bioquímicos de animais submetidos à cirurgia de ligação e perfuração do ceco

PARÂMETROS	Sham		CLP	
	VEÍCULO	GLB	VEÍCULO	GLB
Uréia	28,4 ± 1,7	31,2 ± 3,1	61,5 ± 15,1*	42,9 ± 6,6*
Creatinina	0,17 ± 0,05	0,19 ± 0,04	0,39 ± 0,05*	0,34 ± 0,04*
Lactato	24,5 ± 1,7	22,6 ± 2,4	35,7 ± 2,8*	34,0 ± 1,1*
TGO	109,1 ± 7,0	112,1 ± 9,6	166,2 ± 3,7*	169,4 ± 9,0*
TGP	63,2 ± 3,1	64,9 ± 5,2	60,0 ± 1,9	66,0 ± 4,3
Sódio	140,1 ± 1,1	143,0 ± 2,1	139,1 ± 1,1	136,5 ± 0,95*
Potássio	4,5 ± 0,2	4,2 ± 0,3	5,0 ± 0,1	4,8 ± 0,24
Leucócitos	7,7 ± 0,7	7,1 ± 0,2	4,7 ± 0,1*	5,1 ± 0,5*

Ratos foram injetados com PBS ou glibenclamida (GLB, 1 mg/Kg, s.c.) 4 horas após o CLP ou falsa cirurgia (Sham). Vinte e quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram obtidas. Parâmetros avaliados: uréia (mg/dL), creatinina (mg/dL), lactato (mg/dl), transaminase oxalacética (TGO; U/mL), transaminase pirúvica (TGP; U/mL), sódio (mEq/L), potássio (mEq/L) e número de leucócitos totais (nº células x 10³/mm³). Os resultados representam a média ± erro padrão da média, n=6. * p < 0,05, em relação ao grupo Sham (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.4. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) na resposta inflamatória de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A cirurgia de CLP desencadeia uma inflamação sistêmica, ocorrendo recrutamento de neutrófilos para diversos tecidos, que foi quantificado indiretamente através da atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão dos animais. Observou-se que houve um aumento da MPO no pulmão dos animais submetidos ao CLP, e o tratamento dos animais com TEA reduziu os níveis de MPO de maneira significativa (Figura 5, painel A). Entretanto, o tratamento com a glibenclamida não alterou os níveis da enzima (Figura 5, painel B).

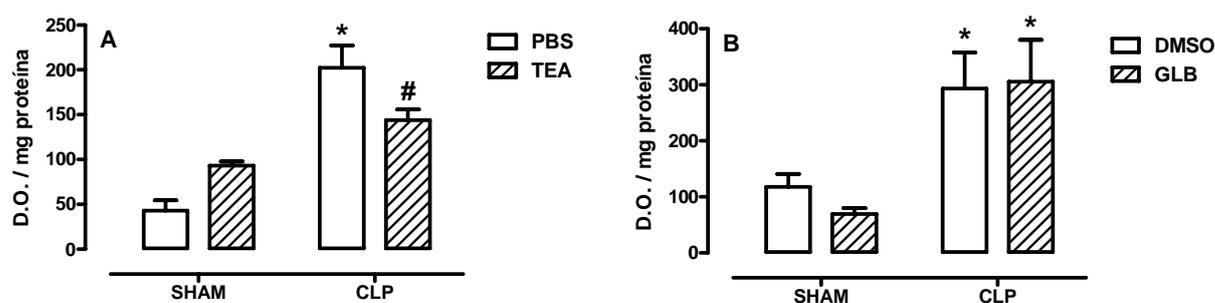


FIGURA 5: Efeito do tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) na atividade da enzima mieloperoxidase pulmonar de animais submetidos à CLP. Os ratos foram injetados com veículo (barras brancas), TEA (Painel A, 8 mg/kg, s.c., barras hachuradas) ou GLB (Painel B, 1 mg/kg, s.c., barras hachuradas) 4 horas após o CLP ou falsa cirurgia (Sham). Vinte e quatro horas após a cirurgia os animais foram sacrificados e amostras de tecido pulmonar foram obtidas e processadas para avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 4 a 6 animais por grupo experimental. * $p < 0,05$, em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$, em relação ao grupo CLP (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni).

Outro importante evento inflamatório que ocorre nos animais sépticos é o aumento da expressão da enzima NOS-2 com conseqüente elevação dos níveis plasmáticos de nitrato+nitrito (NOx). A Figura 6, Painel A, nos mostra que o TEA quando administrado na dose de 8 mg/kg nos animais sépticos reduziu os níveis de NOx. De acordo com a redução dos níveis plasmáticos de NOx, o tratamento com TEA também reduziu a expressão da enzima NOS-2, tanto em tecido pulmonar como em músculo esquelético (Figura 7). O tratamento com a glibenclamida não alterou os

níveis de NOx plasmático (Figura 6, Painel B), e assim, não foi realizado o estudo da expressão da NOS-2 nesse grupo de animais.

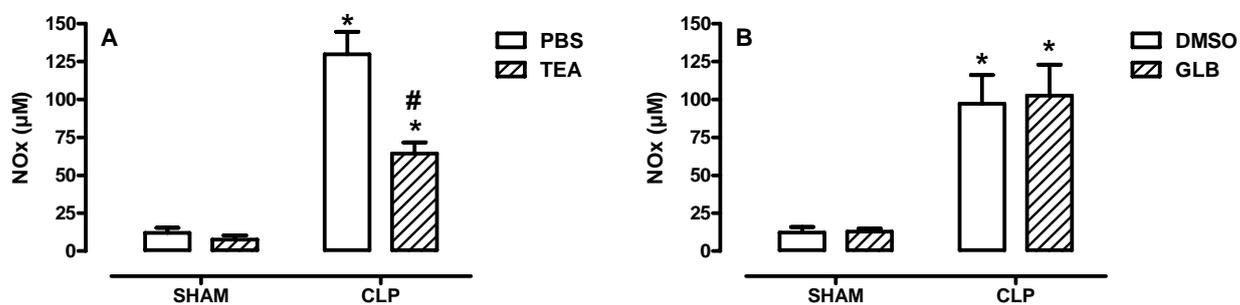


FIGURA 6: Efeito do tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) nos níveis plasmáticos de nitrito + nitrato (NOx) de animais submetidos à CLP. Quatro horas após o procedimento cirúrgico (CLP ou Sham) os animais foram tratados com veículo (barras brancas), tetraetilamônio (8 mg/kg, s.c., Painel A, barras hachuradas) ou glibenclamida (1 mg/kg, s.c., Painel B, barras hachuradas). Dezoito horas após o tratamento (portanto 24 h após a cirurgia) o sangue foi coletado e processado para a quantificação da concentração de NOx pelo método de Griess. Cada barra representa a média \pm erro padrão da média, $n = 8$. * $p < 0,05$, em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$, em relação ao grupo CLP (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni).

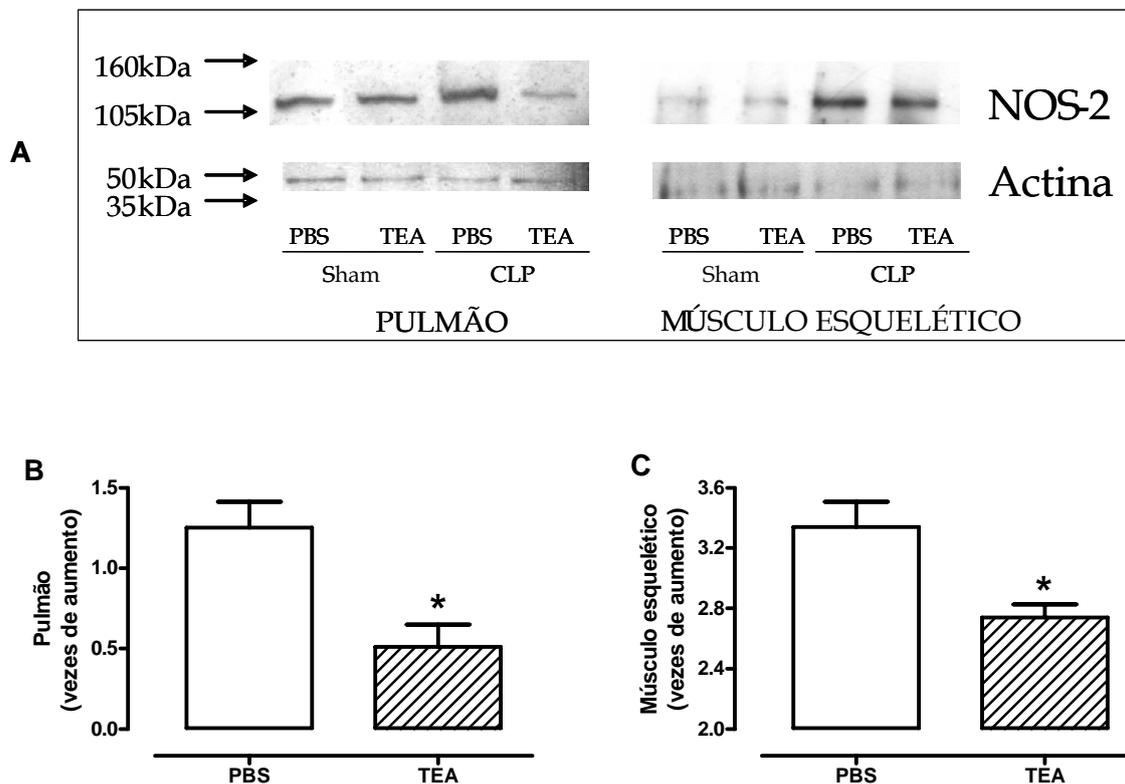


FIGURA 7: Efeito do tetraetilamônio (TEA) na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS-2). Quatro horas após o procedimento cirúrgico os animais foram tratados com tetraetilamônio (8 mg/kg, s.c.). Vinte e quatro horas após a cirurgia, os animais foram sacrificados para coleta dos tecidos (pulmão e músculo esquelético). Painel A: Imunoeletroforese representativa para NOS-2 (130 kDa) e actina (43 kDa). As proteínas (75 µg) foram separadas em gel de acrilamida/bis-acrilamida 8% (SDS-PAGE) e eletrotransferidas para uma membrana de PVDF. Após o bloqueio as membranas foram incubadas com anticorpos específicos e em seguida com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. A revelação foi feita por quimioluminescência. Painel B e C: Densitometria do pulmão e músculo esquelético respectivamente. A densidade das bandas foi medida através do programa Scion Image®. Os resultados estão expressos em vezes de aumento em relação ao grupo Sham. Cada barra representa a média ± erro padrão da média, n = 4. * p < 0,05, em relação ao grupo PBS (ANOVA de uma via seguida pelo teste t student).

4.5. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) no crescimento de bactérias no sangue e no lavado peritoneal de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A Figura 8 ilustra a contagem de bactérias no sangue (Painel A) e no lavado peritoneal (Painel B) dos animais CLP e falso-operados (Sham). Nos animais submetidos ao CLP houve um grande crescimento de bactérias no sangue e no lavado peritoneal, e os tratamentos com tetraetilamônio e glibenclamida não

alteraram o número de bactérias de maneira significativa. Não houve crescimento de bactérias no sangue ou no lavado peritoneal dos animais Sham tratados ou não com os bloqueadores de canais de potássio.

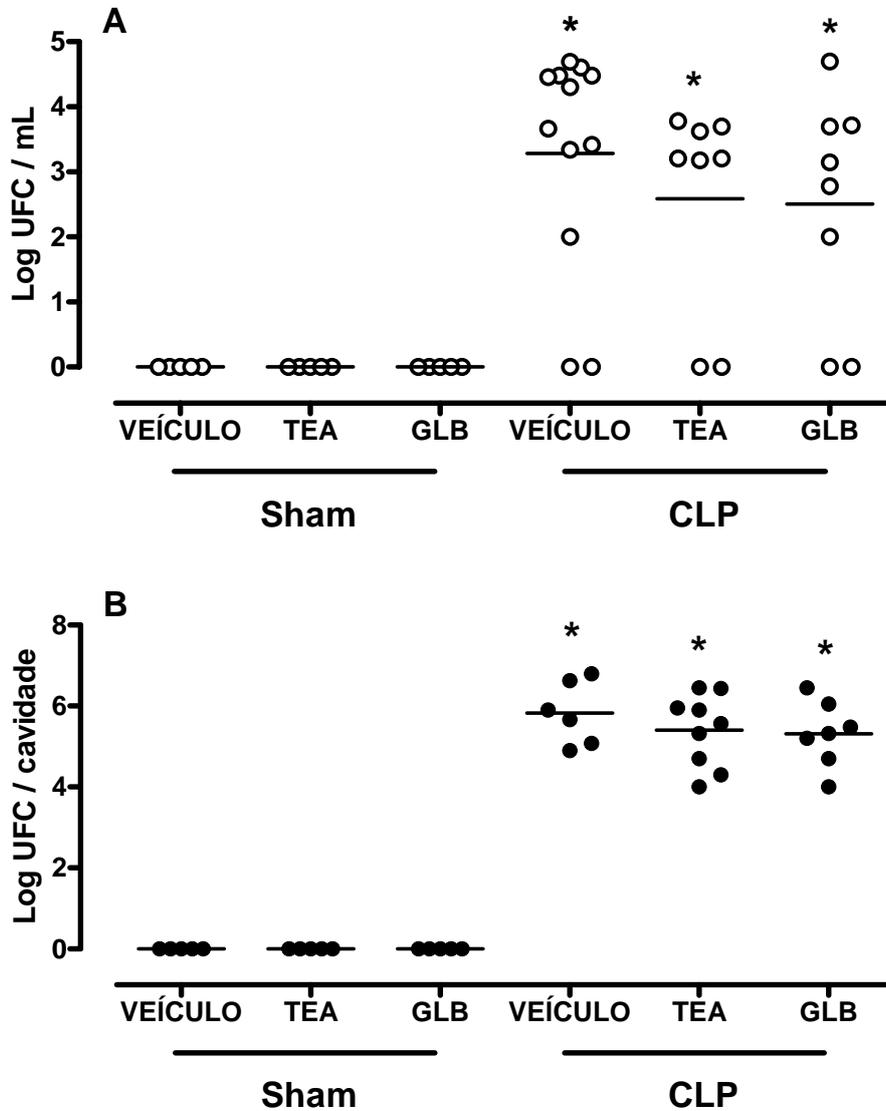


FIGURA 8: Efeito dos bloqueadores de canais de potássio no número de bactérias no sangue e no lavado peritoneal de animais sépticos. Quatro horas após a cirurgia de CLP ou a falsa cirurgia, foi administrado tetraetilamônio (TEA; 8 mg/kg; s.c.) ou glibenclamida (GLB; 1 mg/kg; s.c.) nos animais. Vinte e quatro horas após a cirurgia foram obtidas amostras de sangue (Painel A) e lavado peritoneal (Painel B) dos animais, as quais foram diluídas e semeadas em ágar Mueller-Hinton e incubadas por 24 h. Os animais CLP e Sham controles receberam DMSO ou PBS, e como não houve diferença, foram agrupados (veículo). Os resultados foram expressos como log de unidades formadoras de colônias por mL de sangue ou por cavidade, n = 5 a 12 animais por grupo experimental. * p < 0,05, em relação ao grupo Sham (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni).

4.6. Efeito dos bloqueadores de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) e glibenclamida (GLB) nos valores de glicose sanguínea de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A glibenclamida é utilizada na clínica como hipoglicemiante oral em pacientes diabéticos. Dessa maneira fomos investigar se a glibenclamida e o tetraetilamônio estariam interferindo na glicemia dos animais. Observamos na Figura 9 que os animais sépticos desenvolvem uma fase hiperglicêmica que é seguida por uma fase hipoglicêmica (Painel A). De maneira surpreendente, o TEA impediu o desenvolvimento das fases hiper- e hipoglicêmica (Painel C) dos animais CLP, e não alterou os valores de glicose dos animais falso-operados (Painel B). Já o tratamento dos animais com glibenclamida causou hipoglicemia nos animais falso-operados (Painel D), entretanto, embora tenha agravado a hipoglicemia tardia, não alterou a fase hiperglicêmica dos animais CLP (Painel E).

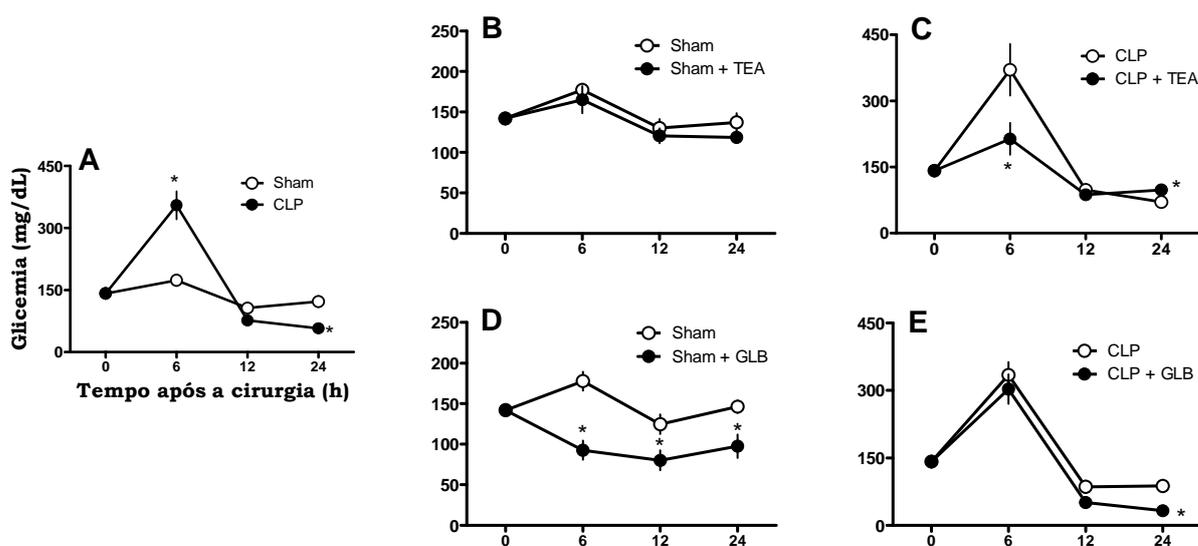


FIGURA 9: Efeito do bloqueio de canais de potássio nas variações glicêmicas induzidas pela CLP. Painel A: Decurso temporal dos níveis glicêmicos de animais falso-operados (Sham) ou submetidos ao procedimento cirúrgico de CLP. Painéis B-D: Os animais falso-operados foram randomizados e tratados 4 h depois da cirurgia com TEA 8 mg/kg (Painel B; círculos cheios), GLB 1 mg/kg (Painel D; círculos cheios) ou veículo (Painéis B e D; círculos abertos). Os animais CLP foram randomizados e tratados 4 h após a cirurgia com TEA 8 mg/kg (Painel C; círculos cheios), GLB 1 mg/kg (Painel E; círculos cheios) ou veículo (Painel C and E; círculos abertos). Os valores representam a média \pm erro padrão da média de 4 a 6 animais. * $p < 0,05$, em relação ao grupo Sham, # $p < 0,05$, em relação ao grupo CLP (ANOVA de duas vias seguida pelo teste t de Bonferroni para medidas repetidas).

5. DISCUSSÃO

A sepse ainda é acompanhada de uma alta taxa de mortalidade e compreender melhor a fisiopatologia dessa síndrome tem sido o objetivo de muitos pesquisadores. E apesar dos avanços alcançados, muitos mecanismos elucidados em modelos animais ainda permanecem sem confirmação em pacientes.

Os modelos animais de sepse podem ser divididos em três categorias básicas: i) administração exógena de toxinas (como LPS e zymosan), ii) administração exógena de patógenos viáveis (por exemplo, bactérias) ou iii) alterações nas barreiras protetoras endógenas dos animais, o que permite a translocação de bactérias, como o que ocorre na técnica de CASP (do inglês, *colon ascendens stent peritonitis*) e de CLP (do inglês, *caecal ligation and puncture*). A translocação, ou migração de bactérias para locais extra-intestinais é um dos fatores que contribuem para a geração ou amplificação da sepse (Koh et al., 2006). Apesar de alguns inconvenientes destes modelos animais, todos têm contribuído em maior ou menor grau para o entendimento dos mecanismos da resposta do hospedeiro à infecção, e o papel de vários mediadores tanto pró- como anti-inflamatórios na sepse.

O modelo de CLP é considerado padrão ouro na pesquisa de sepse, e mimetiza uma ruptura do apêndice ou perfuração intestinal. A técnica envolve uma laparotomia, ligação abaixo da válvula íleo-cecal e perfuração do ceco. Desta maneira, este procedimento gera um extravasamento do conteúdo cecal no peritônio, gerando uma infecção com microbiota diversa (para detalhes ver Buras et al., 2005). O CLP tem ganhado popularidade por sua maior similaridade com a sepse humana do que a dos demais modelos. Notavelmente, o perfil de citocinas observado no modelo de CLP é semelhante ao observado em pacientes, recriando as fases hemodinâmicas e metabólicas observadas na prática clínica (Remick et al., 2000).

No modelo de CLP utilizado, observamos as alterações hemodinâmicas características do choque séptico, que são a hipotensão e hiporeatividade a vasoconstritores, as quais são as principais causas da elevada mortalidade que acompanha essa síndrome. Aproximadamente 80% dos pacientes que não sobrevivem ao choque séptico, morrem devido ao desenvolvimento de hipotensão refratária durante a primeira semana da doença (Parker et al., 1987).

Em paralelo a estes eventos ocorre nos animais submetidos ao CLP, um expressivo aumento dos níveis de NOx, indicando uma elevada produção de NO, bem como elevação dos níveis de lactato plasmático, indicativo de inadequada perfusão tecidual, e dos marcadores de dano renal uréia e creatinina, sugestivos de disfunções orgânicas. Os animais sépticos também desenvolveram leucopenia. Essa redução marcante no número de leucócitos circulantes foi descrita pela primeira vez por Zappert (1893), sendo um importante marcador de infecção aguda (Abidi et al., 2008). Recentemente foi realizado um estudo mostrando que a leucopenia representa um bom marcador para o diagnóstico de sepse na admissão dos pacientes nas Unidades de Terapia Intensiva (Abidi et al., 2008). Estes eventos se assemelham às condições humanas, e confirmam que este modelo é confiável, relevante e de boa aplicabilidade para o estudo da sepse.

De uma maneira geral, os resultados aqui contidos mostram que o tratamento com o bloqueador de canais de potássio tetraetilamônio (TEA) em momentos iniciais da sepse, reduziu a mortalidade, diminuiu a produção de NOx e a expressão da NOS-2, manteve os níveis de glicose sanguínea normais, e melhorou parâmetros cardiovasculares, inflamatórios bem como variáveis bioquímicas indicadoras de disfunção orgânica dos animais sépticos. Por outro lado, a glibenclamida, um bloqueador seletivo de canais K_{ATP} , não melhorou quaisquer das variáveis analisadas e ainda precipitou a morte dos animais.

Esses resultados são um tanto surpreendentes, já que uma grande quantidade de trabalhos tem apontado o envolvimento dos canais K_{ATP} nas alterações hemodinâmicas durante a sepse, e sugerido bloqueadores desses canais como importantes ferramentas no manejo do choque séptico (para revisão ver Buckley et al., 2006).

As primeiras evidências ligando canais de potássio e sepse foram descritas em um trabalho mostrando que a glibenclamida, um bloqueador de canais K_{ATP} , restaurou a pressão arterial em cães com acidose láctica induzida por LPS (Landry e Oliver, 1992). A relevância dos canais K_{ATP} nas alterações vasculares causadas pelo LPS foi confirmada em suínos (Vanelli et al., 1997) e em ratos (Wu et al., 1995; Gardiner et al., 1999; Sorrentino et al., 1999). Mais recentemente, utilizando a glipizida, outra sulfoniluréia, estes dados foram confirmados em um modelo de

endotoxemia em ovinos (Lange et al., 2007). Estes dados em conjunto, sugerem que a abertura de canais K_{ATP} é importante na vasodilatação e hiporeatividade a vasoconstritores durante o choque séptico.

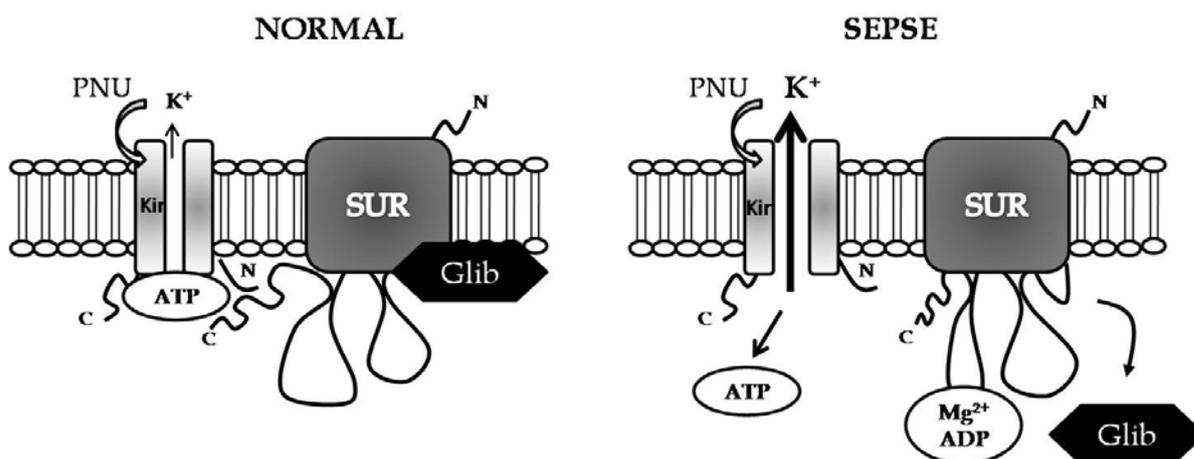
Recentemente, Warrillow e colaboradores tentaram transpor os conhecimentos pré-clínicos sobre bloqueadores de canais K_{ATP} para a prática. Entretanto, os autores mostraram que a glibenclamida falhou em reduzir o suporte noradrenérgico em pacientes sépticos e sugeriram que os bloqueadores de canais K_{ATP} não apresentam um efeito significativo no tônus vasomotor (Warrillow et al., 2006). No mesmo ano, Pickkers e colaboradores (2006) avaliando a resposta vascular à noradrenalina no antebraço de pacientes saudáveis injetados com endotoxina (LPS, 2 ng/kg i.v.) mostraram que a tolbutamida, outro bloqueador de K_{ATP} , também falhou em reverter a hiporeatividade a esse vasoconstritor. Estes dados foram prontamente questionados, gerando uma grande discussão em torno da eficácia de bloqueadores de canais de potássio sensíveis ao ATP na sepse (Oliver e Landry, 2006).

Sob condições de aumento do metabolismo ou hipóxia tecidual, ocorre a ativação de canais K_{ATP} . Esses canais são ativados por redução da concentração de ATP e aumento de íons hidrogênio e de lactato, o que relaciona metabolismo celular com tônus vascular e fluxo sanguíneo. Embora na sepse também haja hipóxia tecidual, a produção exacerbada de NO pode ser o principal determinante do relaxamento que ocorre, justificando em parte, a falta de eficácia dos bloqueadores de canais K_{ATP} no ensaio clínico realizado já que, inclusive, os pacientes apresentavam aumento de lactato ausente ou moderado (Warrillow et al., 2006). Embora haja diversas evidências de que o NO também seja capaz de ativar canais K_{ATP} (Miyoshi et al., 1994; Murphy e Brayden, 1995; Chai e Lin, 2008; Sunouchi et al., 2008), esse talvez não seja o mecanismo mais importante de abertura desses canais. Há trabalhos que sugerem que os canais K_{ATP} têm um importante papel no relaxamento vascular que ocorre na hipóxia (Landry e Oliver, 1992; Khan et al., 1993) e no relaxamento induzido por algumas drogas anti-hipertensivas, como minoxidil e pinacidil, e que os canais K_{Ca} teriam um papel significante na regulação do tônus vascular pelo endotélio, como em resposta ao NO (Khan et al., 1993). Há diversos grupos que estudam a ativação de K_{Ca} pelo NO na sepse (Taguchi et al., 1996; Cauwels e Brouckaert, 2007). Em humanos, Pickkers et al. (2006) apontam que a perda da

resposta vasoconstritora à noradrenalina que ocorre devido à infusão de LPS é devida à ativação de canais K_{Ca} na parede vascular pelo NO. O NO pode ativar canais K_{Ca} por dois mecanismos, pela nitrosilação¹ direta do canal ou por ativar PKG. Independente do mecanismo, a ativação de canais K_{Ca} pelo NO certamente contribui para a vasodilatação e perda de resposta a vasoconstritores que ocorre no choque séptico, e isso pode ocorrer mesmo quando os níveis de lactato ainda não apresentam uma elevação importante.

Além disso, o que pode explicar o insucesso do ensaio clínico realizado com a glibenclamida é o fato de endotoxinas serem capazes de alterar a comunicação entre as subunidades formadoras dos canais K_{ATP} (Wilson e Clapp, 2002). Como descrito na Introdução (ver item 1.1.5.4), esses canais são formados pela subunidade receptora de sulfoniluréias (SUR) e pela unidade formadora do poro do canal (Kir 6.x). O que tem sido sugerido é que a via NO/cGMP pode desacoplar o poro e a subunidade SUR, fazendo com que bloqueadores da subunidade SUR, como a glibenclamida, percam sua eficácia (Ver Esquema 7). Isso abriu a possibilidade de se estudar bloqueadores seletivos do poro do canal, como a droga PNU-37883A. Inclusive, alguns trabalhos mostraram que esses inibidores de poro são mais efetivos do que as sulfoniluréias em reverter a hiporeatividade vascular induzida pelo LPS (Wilson e Clapp, 2002; O'Brien et al., 2008). Ainda, um estudo *in vivo* recente demonstrou que ratos injetados com LPS que receberam o inibidor de poro PNU-37883A ou altas doses de glibenclamida apresentaram significativo aumento da pressão arterial quando comparado ao grupo controle; já a glibenclamida em baixas doses não foi efetiva (O'Brien et al., 2008). Foi mostrado que a glibenclamida em altas doses é capaz de atuar na unidade formadora do poro do canal (Bryan e Aguilar-Bryan, 1999), justificando os diferentes efeitos com doses distintas da mesma droga.

¹ Embora o termo químico correto para a interação do NO com grupamentos sulfidríla seja nitrosação, o termo nitrosilação vem sendo amplamente utilizado na área biológica para designar esta reação.



Esquema 7: Possível alteração estrutural dos canais K_{ATP} na sepse. As subunidades SUR e Kir interagem em seus domínios C e N terminais, respectivamente. Em condições fisiológicas, a abertura dos canais K_{ATP} não é muito freqüente. Na sepse há a ativação dos canais devido à queda na razão ATP/ADP ou devido à alteração no citoesqueleto. Isso parece causar mudanças na conformação do canal, reduzindo a ligação e eficácia dos inibidores das subunidades SUR, com pouco ou nenhum efeito na interação do PNU-37883A (PNU) com o poro do canal. Glib, glibenclamida. Adaptado de *Cardiovascular Research* 2006; 72:220-230.

Nos nossos experimentos, começamos com uma dose alta de glibenclamida (20 mg/kg), mas essa dose levou ao aumento expressivo da mortalidade. Doses altas de glibenclamida, embora estejam implicadas em aumento de pressão arterial em diversos trabalhos, levam a conseqüências desastrosas nos animais sépticos. Embora a dose de 1 mg/kg de glibenclamida também tenha aumentado a taxa de mortalidade, optamos por estudá-la pois essa é uma dose possível de se utilizar em humanos, e também nos interessamos em estudar o que poderia estar ocasionando esse aumento da mortalidade. Nenhum dos trabalhos utilizando bloqueadores de canais K_{ATP} em modelos de sepse estudou a mortalidade dos animais (Wu et al., 1995; Lange et al., 2007). Há um trabalho onde foi analisado apenas o pré-tratamento com glibenclamida na mortalidade por TNF e LPS, e não foi visto alteração alguma (Cauwels e Brouckaert, 2008). Assim, pensando pretensiosamente em uma possível abordagem clínica, a princípio nos perguntamos se apesar dos bloqueadores de canais K_{ATP} serem capazes de promover aumento de pressão e também de aumentar a resposta a agonistas α -adrenérgicos, o que o bloqueio desses canais ocasionaria aos animais sépticos algum tempo depois? Como mostram nos resultados obtidos, o tratamento com a glibenclamida não acarretou quaisquer benefícios, nem na dose que é capaz de bloquear o poro (20 mg/kg; Bryan e Aguilar-Bryan, 1999), nem em

uma dose mais baixa (1 mg/kg). Embora de acordo com a literatura o bloqueio desses canais seja capaz de promover um aumento passageiro da pressão arterial dos animais sépticos, isso não está relacionado a benefícios de modo geral. Além disso, podemos especular que esse aumento transitório da pressão arterial observado possa ser inespecífico, já que a meia-vida da glibenclamida é de aproximadamente 10 horas, e os trabalhos mostram elevação da pressão arterial por apenas 30 minutos (Vanelli et al., 1997) ou por no máximo 2 horas (Wu et al., 1995).

Contudo, apenas a falta de eficácia do tratamento com a glibenclamida no nosso trabalho não justifica o aumento da taxa de mortalidade dos animais. A explicação mais plausível seria o agravamento da hipoglicemia que ocorreu nos animais CLP tratados com esse bloqueador. A regulação da glicose sanguínea envolve a interação entre células beta pancreáticas e o hipotálamo, com a ativação dos canais K_{ATP} controlando a secreção de insulina e glucagon. O controle da liberação de insulina pelas células β pancreáticas foi detalhado no item 1.1.5.4., entretanto os canais K_{ATP} localizados no hipotálamo também estão envolvidos na homeostasia da glicose. Os neurônios sensíveis à glicose no hipotálamo ventromedial respondem à hiperglicemia, reduzindo a secreção de glucagon e, portanto diminuindo a glicose. Além disso, os canais K_{ATP} também regulam a captação de glicose pelo músculo esquelético. Dessa forma, a excessiva ativação dos canais K_{ATP} pode resultar em altos níveis de glucagon circulante, redução da liberação de insulina e redução do consumo de glicose no músculo esquelético, todos contribuindo para o desenvolvimento da hiperglicemia e resistência à insulina na sepse (Miki e Seino, 2005). Durante a sepse, o desarranjo do metabolismo celular certamente contribui para o desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos. A ocorrência de hiperglicemia associada com resistência à insulina é um fator bastante comum na fase inicial da sepse, ou fase hiperdinâmica, que é caracterizada por um estado hipermetabólico; já a fase tardia, ou hipodinâmica, é caracterizada por um estado hipometabólico, que muitas vezes é acompanhada do desenvolvimento de hipoglicemia (Tsiotou et al., 2005). Assim, em acordo com os dados da literatura, no nosso modelo experimental observamos a ocorrência de hiperglicemia nos animais CLP nas primeiras horas após a cirurgia, que foi seguida pelo desenvolvimento de hipoglicemia.

Os mecanismos pelos quais ocorre hipoglicemia na sepse não são bem definidos, entretanto, entre os fatores que contribuem estão depleção dos estoques de glicose, impedimento da gliconeogênese e aumento da utilização periférica de glicose (Miller et al., 1980). Geralmente o desenvolvimento de hipoglicemia está associado a um mau prognóstico, ocorrendo principalmente em pacientes terminais (Preyra e Worster, 2003). Inclusive, Van den Berghe e colaboradores (2001) demonstraram que o controle dos níveis glicêmicos numa faixa estreita entre 80 e 110 mg/dL, mediante o tratamento com insulina endovenosa foi capaz de reduzir a mortalidade em pacientes sépticos. Dessa forma, nem hiper nem hipoglicemia acentuada é recomendada. Assim, a hipoglicemia agravada pelo uso da glibenclamida pode justificar o aumento da mortalidade. O bloqueio destes canais pode levar a alterações metabólicas deletérias, e isso também foi observado no ensaio clínico de Warrillow e colaboradores (2006), que apontou os bloqueadores de K_{ATP} como alternativas pouco atraentes e até perigosas no tratamento da vasoplegia e hipotensão na sepse.

Contrariamente, o tratamento com o tetraetilamônio foi capaz de prevenir o desenvolvimento da hiperglicemia e subsequente hipoglicemia nos animais sépticos. Mais ainda e diferentemente do tratamento com a glibenclamida, não alterou a glicose sanguínea dos animais falso-operados, mais um indicativo de que essa droga não bloqueia os canais K_{ATP} , pelo menos na dose estudada. Dessa maneira, acreditamos que o TEA não esteja interferindo na glicemia dos animais por atuar sobre os canais K_{ATP} , mas sim que o TEA esteja reduzindo a produção ou liberação de mediadores inflamatórios que contribuem para a ocorrência destas alterações.

A moderada abertura de canais K_{ATP} pode proteger a função mitocondrial e prevenir apoptose de células do miocárdio. O levosimendan é um agente inotrópico e vasodilatador utilizado em pacientes com falência cardíaca que atua em parte por ativar canais K_{ATP} em miócitos dos ventrículos. A abertura desses canais nas mitocôndrias parece estar relacionada aos efeitos benéficos dessa droga na isquemia miocárdica (Pinto et al., 2008) e inclusive essa droga tem sido estudada na sepse/choque séptico. Há trabalhos mostrando melhoras hemodinâmicas, no transporte global de oxigênio, na circulação pulmonar e metabolismo celular. Os canais K_{ATP} são essenciais para manter a patência das artérias coronárias e perfusão do miocárdio durante a resposta a citocinas (Crocker et al., 2007). Assim, a ativação

dos canais K_{ATP} na sepse parece ser uma “faca de dois gumes”, já que a ativação excessiva desses canais no músculo liso vascular está associada à hiporeatividade vascular e vasodilatação, já a moderada ativação em outros locais, como no coração, parece exercer algum benefício e está implicada na redução da miocardiopatia séptica (Taguchi et al., 1999; Buckey et al., 2006). Em 2006 foi realizado um trabalho com animais *knockout* para o gene *KCNJ8* (que codifica a subunidade Kir6.1) mostrando que o Kir6.1 é um componente importante na endotoxemia, pois a sua inativação compromete o fluxo coronariano, precipitando o dano cardíaco e a morte de animais endotoxêmicos. O Kir6.1 parece ser o responsável pela manutenção da perfusão coronariana e da função cardíaca. Ainda, quando os autores administraram pinacidil, um ativador de canais K_{ATP} nos animais endotoxêmicos, ocorreu redução da mortalidade (Kane et al., 2006). Outro trabalho aponta para os benefícios da abertura de canais K_{ATP} em pacientes cardíacos. O nicorandil é um abridor de canais K_{ATP} que apresenta benefícios em pacientes infartados. Foi mostrado que ele é capaz de reduzir a ativação de NF- κ B, de moléculas de adesão e de citocinas pró-inflamatórias, o que pode contribuir para a redução do dano causado pelo processo de isquemia e reperfusão no grupo de pacientes que o utiliza (Kawamura et al., 2005). Dessa forma podemos pensar que a abertura moderada de canais K_{ATP} seria interessante, e não a sua inibição, já que no nosso trabalho também não observamos benefícios. Isso também pode ter contribuído para o aumento da mortalidade provocada pela glibenclamida.

Uma grande dificuldade no estudo de canais K_{ATP} é que estes canais são ubiquamente expressos (vasos, coração, pâncreas) possuindo particularidades em cada tecido. Entretanto, as principais ferramentas farmacológicas utilizadas, as sulfoniluréias, não são seletivas entre os tecidos. Assim, por exemplo, ao se tentar bloquear o canal K_{ATP} do vaso também se bloqueia o do pâncreas, e embora este bloqueio cause uma melhora hemodinâmica em curto prazo (já que a maioria dos trabalhos avalia apenas os efeitos em curto prazo), isto não se reflete em benefícios tardios (como por exemplo, o aumento da sobrevida) em decorrência das demais alterações provocadas, como cardíacas e metabólicas.

Outra possibilidade para explicar o possível aumento da mortalidade dos animais sépticos tratados com glibenclamida seria o desenvolvimento de

hiponatremia nesse grupo, já que a hiponatremia está associada com o aumento de morbidade e mortalidade em pacientes críticos (Nzerue et al., 2003). Foram encontrados valores semelhantes de sódio e potássio dos animais sépticos comparado aos animais falso-operados, e embora a diferença não tenha sido estatisticamente significativa do grupo CLP controle para o grupo CLP+GLB, quando comparado ao grupo falso-operado, os animais CLP+GLB desenvolveram hiponatremia. Embora a hiponatremia tenha sido de certo modo sutil apenas esse fato não ocasionaria aumento da mortalidade dos animais, no entanto, quando associado a outros fatores, como a severa hipoglicemia, pode ter contribuído para o agravamento do quadro, e conseqüentemente, para o aumento da mortalidade.

Diferente de nossos dados, um estudo mostrou que o TEA aumentou a mortalidade de animais com choque endotóxico (Clayton et al., 2005). Uma provável explicação para a discrepância entre nossos dados e esse estudo pode ser as diferentes doses utilizadas do inibidor TEA. De maneira muito interessante o TEA só foi capaz de reduzir a mortalidade no nosso estudo na menor dose utilizada, que equivale a aproximadamente a $\frac{1}{4}$ da dose utilizada no trabalho de Clayton e colaboradores (30 mg/kg). É importante salientar que embora seja um bloqueador de canais de potássio não seletivo, em baixas doses o TEA bloqueia preferencialmente canais de potássio dependentes de cálcio (Nelson e Quayle, 1995). Infelizmente, embora existam ferramentas para esse fim, não foi possível utilizar os bloqueadores seletivos de canais K_{Ca} do músculo liso, iberiotoxina e caribdotoxina. Essas ferramentas ainda apresentam um alto custo, dificultando a sua utilização em experimentos *in vivo*, principalmente quando se utiliza ratos, o que foi o nosso caso. Entretanto, a 4-aminopiridina, um bloqueador seletivo para canais K_V , também não apresentou nenhum efeito sobre a mortalidade dos animais sépticos. Em conjunto estes dados sugerem fortemente que o bloqueio de canais de potássio dependentes de cálcio (K_{Ca}) foi o responsável pela redução da mortalidade dos animais observada no nosso estudo, e que a dose mais elevada utilizada no trabalho de Clayton e colaboradores pode ser suficiente para inibir outros subtipos de canais importantes, como os canais K_{ATP} , aumentando assim a mortalidade dos animais.

Como citado anteriormente, no nosso estudo a 4-aminopiridina (bloqueador de canais K_V) não alterou a taxa de mortalidade dos animais CLP. Com base neste

resultado optamos por não continuar as análises com este bloqueador. Entretanto, embora este dado não aponte para o envolvimento deste subtipo de canal de potássio no nosso modelo experimental, não podemos subestimar a importância dos canais K_V no processo da sepse. Um trabalho publicado recentemente mostrou que a 4-aminopiridina é capaz de restaurar alterações na vasculatura pulmonar causadas pela administração de LPS (Spöhr et al., 2007). Assim mais estudos se fazem necessários para avaliar a real importância desse subtipo de canal na sepse.

Um dado bastante curioso foi que os níveis de nitrito+nitrato (NO_x) plasmático dos animais sépticos tratados com TEA, foram substancialmente menores quando comparados aos animais CLP controle. Concordando com esse fato, observamos também uma menor expressão da enzima NOS-2, tanto no músculo esquelético quanto no pulmão dos animais. A NOS-2 é a principal isoforma responsável pela produção exacerbada de NO na sepse. Embora certamente não seja o único mecanismo relevante, a redução de NO/NOS-2 pode ser considerada uma importante contribuição dos efeitos benéficos do TEA. Provavelmente devido à redução da produção excessiva de NO, os animais tratados com TEA não desenvolveram hipotensão tão severa, e foram capazes de responder adequadamente ao estímulo vasoconstritor. Os inibidores das NOS já se mostraram úteis em prevenir a falência circulatória em modelos animais. Entretanto a morbidade e mortalidade de pacientes sépticos não só não foram prevenidas, como foram agravadas, de forma que um ensaio clínico utilizando um inibidor das NOS teve que ser interrompido (Lopez et al., 2004). Devemos chamar atenção ao fato de que foi utilizado um inibidor não seletivo das NOS. Dessa forma, outros alvos terapêuticos envolvidos na regulação da pressão arterial começaram a chamar ainda mais atenção, como a guanilato ciclase e os canais de potássio.

Como descrito na Introdução, o NO promove vasodilatação por abrir canais de potássio no músculo liso vascular, ou por ativar a guanilil ciclase, levando à ativação de PKG (ver esquema 8). Dessa forma podemos pensar que o TEA poderia reduzir a hipotensão e a hiporeatividade a agentes vasoconstritores pela redução do NO disponível, através da regulação da expressão da NOS-2, gerando menor ativação dos seus alvos no músculo liso vascular, como os canais de potássio e a enzima guanilato ciclase, e, portanto uma menor vasodilatação (ver Esquema 9).

Embora não tenhamos mostrado uma menor expressão da NOS-2 especificamente no músculo liso vascular, mas sim no pulmão e músculo esquelético dos animais, acreditamos que a redução sistêmica da quantidade de NO disponível pode reduzir a ativação de seus alvos no músculo liso vascular.

Embora não tenha sido proposto nenhum mecanismo de como possa ter ocorrido essa redução da expressão da NOS-2, baseado em trabalhos que mostram que o bloqueio de canais K_{Ca} pode reduzir a produção de citocinas e de NO em macrófagos ativados por LPS (Maruyana et al., 1994; Blunck et al., 2001), nós acreditamos que os canais K_{Ca} são importantes no desenvolvimento da resposta inflamatória nos momentos iniciais do processo. Portanto, não apenas o NO é capaz de modular os canais de potássio, como estes podem estar de alguma forma interferindo na expressão da enzima NOS-2. A expressão do gene da NOS-2 envolve a ativação do NF- κ B (Xie et al.; 1994), e a expressão da NOS-2 *in vitro* ocasionada pelo LPS ou ácido lipoteicóico é prevenida por diversos agentes que interferem com a ativação do NF- κ B (Griscavage et al.; 1995). Interessantemente, IL-10, que aumentou a sobrevivência de animais em modelo de choque endotóxico, também preveniu a ativação do NF- κ B (Barnes e Karin, 1997). Assim, embora não demonstrado, podemos pensar que o TEA talvez possa interferir com a expressão da NOS-2 através da redução da ativação do NF- κ B. O nosso grupo tem interesse em realizar futuros estudos para esclarecer se (ou como) ocorre a modulação do NF- κ B através do bloqueio de canais de potássio. Mas por enquanto, esta é ainda uma pergunta sem resposta.

Seguindo o raciocínio de redução do processo inflamatório, o TEA realmente parece reduzir a inflamação sistêmica generalizada que ocorre na sepse, já que além da redução do NO/NOS-2, a atividade da enzima mieloperoxidase pulmonar, também se encontra reduzida nos animais CLP tratados com TEA em relação aos animais CLP controle. De certa forma, poderíamos especular que os animais CLP que receberam o tratamento com TEA não evoluíram para choque séptico, como ocorreu com os animais CLP que receberam apenas veículo. Não podemos esquecer que o choque séptico é caracterizado por hipotensão severa refratária a agentes vasoconstritores, e os animais tratados com esse bloqueador estavam menos hipotensos e responderam melhor à fenilefrina.

Ainda, reforçando a idéia de melhora da condição geral do animal, observamos que os níveis de lactato plasmático, um marcador de dano/hipóxia tecidual, e os níveis de uréia e creatinina no plasma, indicadores de dano renal, também foram menores nos animais que foram tratados com TEA. A combinação de falência renal aguda e sepse estão associadas com uma taxa de mortalidade de 70% quando comparada com 45% de mortalidade entre os pacientes apenas com falência renal aguda (para revisão, ver Schrier e Wang, 2004). Assim, essa combinação constitui um problema particularmente sério, e o fato do TEA não permitir ou prevenir o desenvolvimento de falência renal certamente também contribuiu para a menor mortalidade observada nesse grupo de animais.

Fazendo uma relação mais direta, podemos pensar que a melhora dos parâmetros hemodinâmicos provavelmente foi uma consequência direta da redução da resposta inflamatória, especialmente da redução da produção de NO, o que não causou hipotensão tão acentuada e permitiu uma resposta adequada a agentes vasoconstritores. Como consequência da melhora hemodinâmica, houve adequada perfusão dos tecidos, e observamos então a redução dos marcadores de dano renal e de hipóxia tecidual (lactato). Assim podemos observar uma relação pertinente de melhora entre os parâmetros avaliados dos animais CLP que receberam tratamento com TEA.

A enzima transaminase oxalacética (TGO) também estava aumentada nos animais CLP. Esta enzima é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, músculo esquelético e eritrócitos. Geralmente, quando acompanhada do aumento da enzima transaminase pirúvica (TGP), mais específica, indica comprometimento hepático. Entretanto, os níveis de TGP dos animais sépticos não foram diferentes do grupo falso-operado, e como a TGO é uma enzima inespecífica que está presente no citoplasma e também nas mitocôndrias, sua elevação nesse caso indica apenas um comprometimento celular mais profundo. Nenhum dos bloqueadores de canais de potássio estudado foi capaz de alterar os níveis de TGO, nem dos animais falso-operados, nem dos animais sépticos.

Além disso, nenhum dos bloqueadores foi capaz de reverter a leucopenia que se estabeleceu, e nem de alterar o número de bactérias no sangue ou no lavado peritoneal dos animais sépticos. Apesar do tratamento com o bloqueador TEA ter

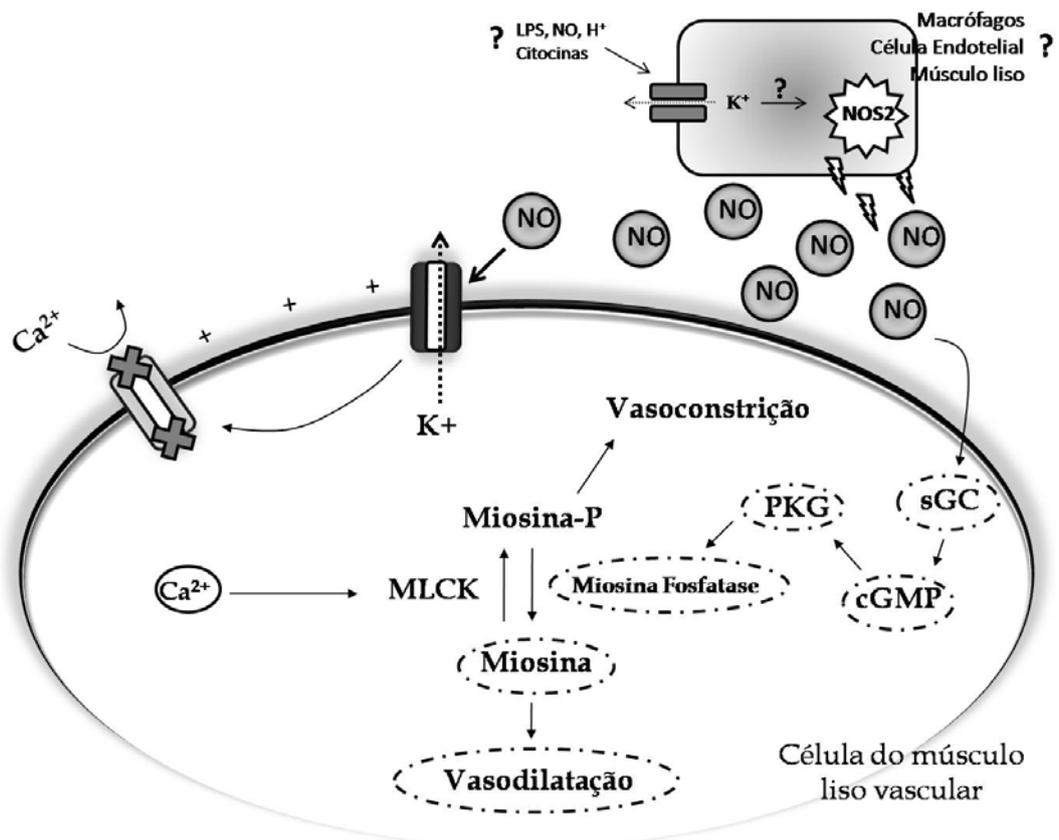
reduzido os níveis de NO dos animais, isso não levou ao aumento de bactérias no sangue e nem no lavado peritoneal, o que se esperaria em virtude dos potentes efeitos bactericidas do NO. Há dados na literatura que mostram que a inibição da NOS-2 pode impedir a capacidade dos neutrófilos de combaterem a infecção, entretanto, as bactérias podem ser controladas, assim como ocorre na clínica, através do emprego simultâneo de antibióticos (Torres-Dueñas et al., 2006). Isso é bastante interessante já que a redução de NO observada preveniu o colapso cardiovascular, e embora não tenha contribuído favoravelmente nesse aspecto, ao menos não reduziu a capacidade do hospedeiro de combater a infecção. Podemos pensar que o excesso de NO produzido na sepse poderia ser devido a uma tentativa errônea do hospedeiro em combater mais prontamente a infecção; errônea, pois quantidades menores de NO já se mostram suficientes para isso, e o que ocorre, contrariamente, é que o excesso de NO estaria apenas contribuindo para o agravamento do colapso cardiovascular.

Conforme citado na Introdução, pelo custo proibitivo, não pudemos avaliar os efeitos de bloqueadores seletivos para canais K_{IR} no decurso da sepse. Embora não possamos deixar de lado a importância desses canais no músculo liso, suas funções na sepse realmente parecem mais limitadas que as dos demais canais, não comprometendo dessa forma a discussão e conseqüentes conclusões do trabalho.

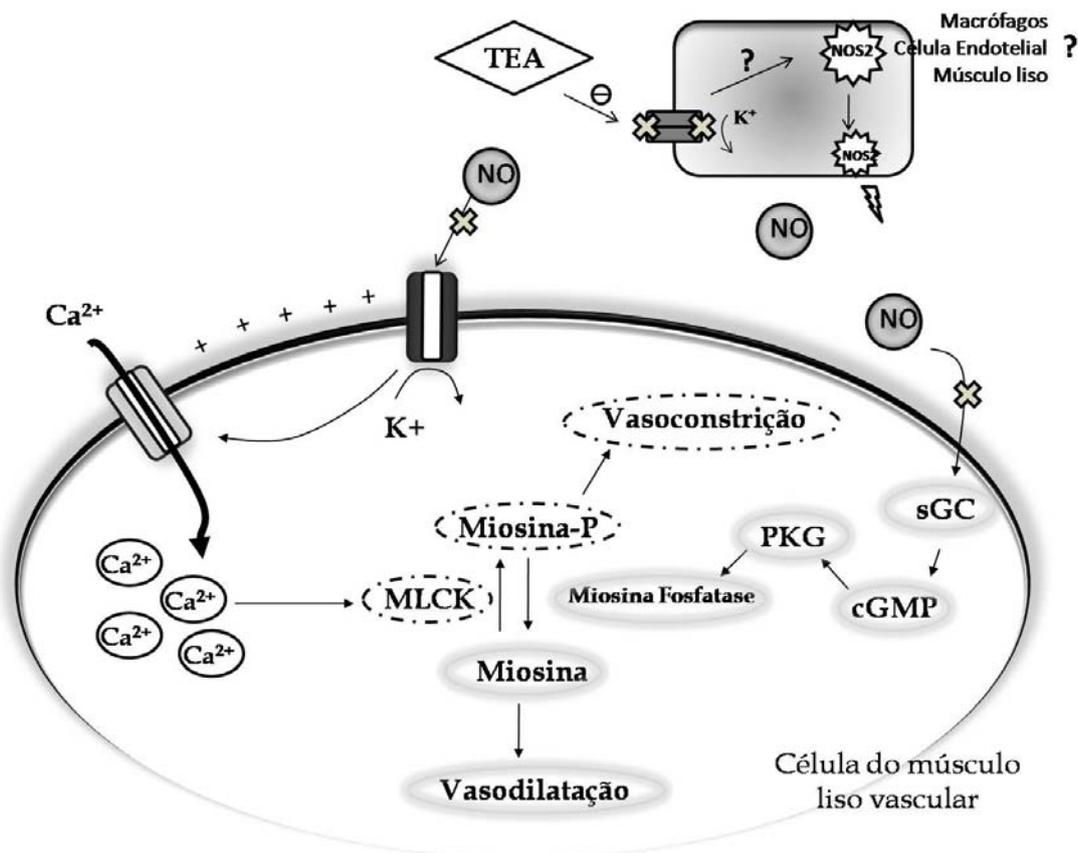
Em conjunto, os dados apontam que uma alternativa interessante talvez fosse o bloqueio de canais K_{Ca} no músculo liso vascular juntamente com a abertura moderada de canais K_{ATP} em outros locais. Os canais K_{ATP} parecem muito importantes para manter a homeostasia durante a sepse, e o bloqueio desses canais cada vez mais parece uma alternativa menos interessante. Isso é importante ser discutido principalmente diante do grande interesse no papel desses canais na sepse, chegando a ser até realizado um estudo clínico (Warrillow et al., 2006).

Finalmente, espera-se que os dados apresentados nesse estudo possam de alguma forma contribuir à melhor compreensão do envolvimento de diferentes subtipos de canais de potássio na sepse, e sugerir que o bloqueio seletivo de canais K_{Ca} possa vir a ser uma ferramenta de grande utilidade no manejo da sepse/choque séptico. E, ao invés de somente se procurar inibidores seletivos da NOS-2, que se procure estudar seus moduladores e também os alvos do NO com as ferramentas que

temos disponíveis, pois isso pode levar a surpresas e esclarecimentos. Com otimismo (que não costuma faltar principalmente nos pesquisadores brasileiros!), nossa expectativa é a de, com muito trabalho adicional, este estudo possa apontar novas abordagens experimentais e clínicas para o tratamento do choque séptico.



Esquema 8: Vias pelas quais o excesso de NO pode induzir vasodilatação na sepe. Estímulos inflamatórios podem ativar canais de potássio, que parecem participar da regulação da expressão da NOS-2, com conseqüente aumento da liberação do NO. Em tracejado: o NO pode ativar a guanilato ciclase, o que aumenta o cGMP, ativa PKG, ocasionando defosforilação da miosina, levando a vasodilatação. O NO também pode ativar canais de potássio diretamente, o que fecha canais de cálcio regulados por voltagem, reduzindo o cálcio intracelular, não permitindo a ocorrência de vasoconstrição, o que por sua vez, favorecerá a vasodilatação. MLCK: quinase da cadeia leve da miosina; NO: óxido nítrico; sGC: guanilase ciclase solúvel; Ca^{2+} : íons cálcio; K^+ : íons potássio; Miosina-P: miosina fosforilada.



Esquema 9: Vias pelas quais o tetraetilamônio pode levar à redução da vasodilatação causada pelo NO. O bloqueio de canais de potássio pode levar à redução da expressão da NOS-2, reduzindo o NO disponível. A menor quantidade de NO gera uma menor ativação dos seus alvos no músculo liso vascular, representado pela enzima guanilato ciclase (em sombreado), o que ocasiona em menor vasodilatação. Ao mesmo tempo, a menor abertura de canais de potássio do músculo liso vascular pelo NO, favorece o estado inativo ou fechado do canal, levando à abertura dos canais de cálcio dependentes de voltagem, aumento do cálcio intracelular, ativação da MLCK com fosforilação da cadeia leve de miosina, não mais favorecendo a vasodilatação, mas sim a vasoconstrição (em tracejado). MLCK: quinase da cadeia leve da miosina; NO: óxido nítrico; sGC: guanilase ciclase solúvel; Ca²⁺: íons cálcio; K⁺: íons potássio; Miosina-P: miosina fosforilada.

6. CONCLUSÕES

- Os canais de potássio parecem estar envolvidos na sepse tanto no início do processo inflamatório quanto no colapso cardiovascular que se desenvolve posteriormente;
- A administração de tetraetilamônio nos animais sépticos mostrou benefícios em alguns aspectos, como redução do processo inflamatório observado pela menor produção de NO e da expressão da NOS-2, menor atividade da enzima mieloperoxidase no pulmão, promoveu o reestabelecimento parcial da pressão arterial média e total da frequência cardíaca dos animais, além de permitir uma adequada resposta a agentes vasoconstritores, prevenir a hipóxia tecidual e falência renal, e contribuir para a manutenção dos níveis de glicose sanguínea dos animais;
- Os dados apontam que o tetraetilamônio estaria exercendo benefícios através do bloqueio de canais K_{Ca} ;
- O bloqueio de canais K_{ATP} nos animais CLP pela glibenclamida levou ao aumento da mortalidade, provavelmente pelo agravamento da hipoglicemia;
- Bloqueadores de canais K_{Ca} podem ser uma ferramenta interessante para o tratamento da sepse e do choque séptico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abidi K, Khoudri I, Belayachi J, Madani N, Zekraoui A, Zeggwagh AA, Abouqal R. Eosinopenia is a reliable marker of sepsis on admission to medical intensive care units. *Crit Care*. 12(2):R59; 2008.

Alberti C, Brun-Buisson C, Burchardi H, Martin C, Goodman S, Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno R, Boulmé R, Lepage E, Le Gall R. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med*. 28(2):108-21; 2002.

Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J*. 357:593-615; 2001.

Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care sepsis. *Crit. Care Med*. 29:1303-1310; 2001.

Archer SL, Huang JM, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of charybdotoxin-sensitive K channels by cGMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 91: 7583-7587; 1994.

Ashcroft SJ, Ashcroft FM. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signal*. 2(3):197-214; 1990.

Autieri MV, Belkowski SM, Constantinescu CS, Cohen JA, Prystowsky MB. Lymphocyte-specific inducible expression of potassium channel beta subunits. *J Neuroimmunol*. 77:8-16, 1997.

Avontuur JA, Tutein Noltheniu RP, Van Bodegom JW, Bruining HA. Prolonged inhibition of nitric oxide synthesis in severe septic shock: a clinical study. *Crit Care Med*. 26:660-667, 1998.

Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 336:1066-1071; 1997.

Beavo JA, Brunton LL. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3(9):710-8; 2002.

Beech DJ, Bolton TB. Two components of potassium current activated by depolarization of single smooth muscle cells from the rabbit portal vein. *J Physiol*. 418:293-309; 1989a.

Beech DJ, Bolton TB. Properties of the cromakalim-induced potassium conductance in smooth muscle cells isolated from the rabbit portal vein. *Br J Pharmacol*. 98(3):851-64; 1989b.

Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Role of nitric oxide in failure of neutrophil migration in sepsis. *J. Infect Dis.* 182: 214-223, 2000.

Blunck R, Scheel O, Müller M, Brandenburg K, Seitzer U, Seydel U. New insights into endotoxin-induced activation of macrophages: involvement of a K⁺ channel in transmembrane signaling. *J Immunol.* 166:1009-15, 2001.

Bolotina VM, Najibe S, Palacino JJ, Pagano JP, Cohen RA. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature.* 368: 850-853, 1994.

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knauss WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians / Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 101:1644-1655, 1992.

Bonnet P, Rusch NJ, Harder DR. Characterization of an outward K⁺ current in freshly dispersed cerebral arterial muscle cells. *Pflugers Arch.* 418(3):292-6; 1991.

Boyle JP, Tomasic M, Kotlikoff MI. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. *J Physiol.* 447:329-50; 1992.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-54; 1976.

Bryan J, Aguilar-Bryan L. Sulfonylurea receptors: ABC transporters that regulate ATP-sensitive K(+) channels. *Biochim Biophys Acta.* 1461(2):285-303; 1999.

Buckley JF, Singer M, Clapp LH. Role of KATP channels in sepsis. *Cardiovascular Research.* 72:220-230; 2006.

Buras JA, Holzmann B, Sitkovsky M. Animal models of sepsis: setting the stage. *Nat Rev Drug Discov.* 4(10):854-65; 2005.

Cauwels A, Brouckaert P. Critical role for small and large conductance calcium-dependent potassium channels in endotoxemia and TNF toxicity. *Shock.* 29(5):577-82; 2008.

Chai Y, Lin YF. Dual regulation of the ATP-sensitive potassium channel by activation of cGMP-dependent protein kinase. *Pflugers Arch.* 456(5):897-915, 2008.

Chen CC, Lin YC, Chen SA, Luk HN, Ding PY, Chang MS, Chiang CE. Shortening of cardiac action potentials in endotoxic shock in guinea pigs is caused by an increase in nitric oxide activity and activation of the adenosine triphosphate-sensitive potassium channel. *Crit. Care Med.* 28: 1713-1720, 2000a.

Chen SJ, Wu CC, Yang SN, Lin CI, Yen MH. Abnormal activation of K(+) channels in aortic smooth muscle of rats with endotoxic shock: electrophysiological and functional evidence. *Br. J. Pharmacol.* 131:213-222, 2000b.

Chen SJ, Wu CC, Yen MH. Role of nitric oxide and K⁺-channels in vascular hyporeactivity induced by endotoxin. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 359: 493-499, 1999.

Chrissobolis S, Ziogas J, Chu Y, Faraci FM and Sobey CG. Role of inwardly rectifying K⁺ channels in K⁺-induced cerebral vasodilatation in vivo. *Am. J. Physiol.* 279: H2704-H2712; 2000.

Clapp LH, Gurney AM. Outward currents in rabbit pulmonary artery cells dissociated with a new technique. *Exp Physiol.* 76(5):677-93; 1991.

Clayton NP, LeDuc BW, Kelly LJ. Effect of potassium channel and cytochrome P450 inhibition on transient hypotension and survival during lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in the rat. *Pharmacology.* 73(3):113-20; 2005.

Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature.* 420: 885-891, 2002.

Croker B, Crozat K, Berger M, Xia Y, Sovath S, Schaffer L, Eleftherianos I, Imler JL, Beutler B. ATP-sensitive potassium channels mediate survival during infection in mammals and insects. *Nat Genet.* 39(12):1453-60; 2007.

Czaika G, Gingras Y, Zhu E, Comtois AS. Induction of the ATP-sensitive potassium (uK(ATP)-1) channel by endotoxemia. *Muscle Nerve.* 23: 967-969; 2000.

Dart C, Standen NB. Adenosine-activated potassium current in smooth muscle cells isolated from the pig coronary artery. *J Physiol.* 471:767-86; 1993.

De Costa CM. "The contagiousness of childbed fever": a short history of puerperal sepsis and its treatment. *Med J Aust.* 177:668-71; 2002.

Evans T, Carpenter A, Kinderman H, Cohen J. Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. *Circ. Shock.* 41:77-81, 1993.

Feihl F, Waeber B, Liaudet L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? *Pharmacol Ther* 91:179-213, 2001.

Fernandes D, Assreuy J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. *Shock. Suppl* 1:10-3; 2008.

Fleming I, Julou-Schaeffer G, Gray GA, Parratt JR, Stoclet JC. Evidence that an L-arginine/nitric oxide dependent elevation of tissue cyclic GMP content is involved in depression of vascular reactivity by lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol.* 103:1047-1052, 1991.

Fujino K, Nakaya S, Wakatsuki T, Miyoshi Y, Nakaya Y, Mori H, Inoue I. Effects of nitroglycerin on ATP-induced Ca⁺⁺-mobilization, Ca⁺⁺-activated K channels and contraction of cultured smooth muscle cells of porcine coronary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 256:371-377, 1991.

Gardiner SM, Kemp PA, March JE, Bennett T. Regional haemodynamic responses to infusion of lipopolysaccharide in conscious rats: effects of pre- or post-treatment with glibenclamide. *Br. J. Pharmacol.* 128:1772-1778, 1999.

Gelband CH, Hume JR. Ionic currents in single smooth muscle cells of the canine renal artery. *Circ Res.* 71(4):745-58; 1992.

Ghosh S, Hayden MS. New regulators of NF-kappaB in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 8(11):837-848, 2008.

Granger DL, Hibbs JB, Perfect JR, Durack DT. Metabolic fate of L-arginine in relation to microbistatic capability of murine macrophages. *J Clin Invest* 85: 264-273, 1990.

Gratton JP, Maurice MC, Rae GA, D'Orléans-Juste P. Pharmacological properties of endothelins and big endothelins in ketamine/xylazine or urethane anesthetized rats. *Am J Hypertens.* 8(11):1121-7; 1995.

Griscavage JM, Wilk S, Ignarro LJ. Serine and cysteine proteinase inhibitors prevent nitric oxide production by activated macrophages by interfering with transcription of the inducible NO synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 215:721-729; 1995.

Hall S, Turcato S, Clapp L. Abnormal activation of K⁺ channels underlies relaxation to bacterial lipopolysaccharide in rat aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:184-190, 1996.

Han J, Kim N, Joo H, Kim E, Earm YE. ATP-sensitive K⁽⁺⁾ channel activation by nitric oxide and protein kinase G in rabbit ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283(4):H1545-54; 2002.

Haslberger A, Romanin C, Koerber R: Membrane potential modulates release of tumor necrosis factor in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages. *Mol Biol Cell.* 4:451-460, 1992.

Hollenberg SM, Ahrens TS, Annane D, Astiz ME, Chalfin DB, Dasta JF, Heard SO, Martin C, Napolitano LM, Susla GM, Totaro R, Vincent JL, Zanotti-Cavazzoni S. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. *Crit. Care Med.* 32(9): 1928-1948, 2004.

Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A, Nuñez G. Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem.* 276(4):2551-4; 2001.

Ishikawa T, Hume JR, Keef KD. Modulation of K⁺ and Ca²⁺ channels by histamine H1-receptor stimulation in rabbit coronary artery cells. *J Physiol.* 468:379-400; 1993.

Jacobs DS, DeMott WR, Grady HJ, Horvat RT, Huestis DW, Kasten Jr BL. Laboratory Test Handbook. 4^o ed. Hudson (Cleveland), Lexi-Comp Inc, 1996.

Jan LY, Jan YN. Structural elements involved in specific K⁺ channel functions. *Annu. Rev. Physiol.* 54:537-55; 1992.

Kane GC, Lam CF, O'Coilain F, Hodgson DM, Reyes S, Liu XK, Miki T, Seino S, Katusic ZS, Terzic A. Gene knockout of the KCNJ8-encoded Kir6.1 K(ATP) channel imparts fatal susceptibility to endotoxemia. *FASEB J.* 20(13):2271-80; 2006.

Kawamura T, Kadosaki M, Nara N, Wei J, Endo S, Inada K. Nicorandil attenuates NF-kappaB activation, adhesion molecule expression, and cytokine production in patients with coronary artery bypass surgery. *Shock.* 24(2):103-8; 2005.

Khan SA, Mathews WR, Meisheri KD. Role of calcium-activated K⁺ channels in vasodilation induced by nitroglycerine, acetylcholine and nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther.* 267(3):1327-35; 1993.

Kilbourn R. Nitric oxide synthase inhibitors--a mechanism-based treatment of septic shock. *Crit. Care Med.* 27:857-858, 1999.

Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J, Lodato RF. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biophys Res Commun.* 172:1132-1138, 1990.

Koh IH, Liberatore AM, Menchaca-Diaz JL, Ruiz-Silva M, Vilela-Oliveira L, Watanabe AY, Salomao R, Fagundes-Neto U, Silva RM. Bacterial translocation, microcirculation injury and sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.* 6(2):143-50; 2006.

Kume H, Takai A, Tokuno H, Tomita T. Regulation of Ca²⁺-dependent K⁺-channel activity in tracheal myocytes by phosphorylation. *Nature.* 341(6238):152-4; 1989.

Landry DW, Oliver JA. The ATP-sensitive K⁺ channel mediates hypotension in endotoxemia and hypoxic lactic acidosis in dog. *J Clin Invest.* 89:2071-2074; 1992.

Lange M, Williams W, Bone HG, Van Aken H, Bröking K, Morelli A, Hucklenbruch C, Daudel F, Ertmer C, Stubbe H, Traber DL, Westphal M. Continuously infused glipizide reverses the hyperdynamic circulation in ovine endotoxemia. *Shock.* 27(6):701-6; 2007.

LeBlanc N, Wan X, Leung PM. Physiological role of Ca(2+)-activated and voltage-dependent K⁺ currents in rabbit coronary myocytes. *Am J Physiol.* 266:C1523-37; 1994.

Ledoux J, Werner ME, Brayden JE, Nelson MT. Calcium-activated potassium channels and the regulation of vascular tone. *Physiology (Bethesda).* 21:69-78; 2006.

Lopez A, Lorente JA, Steingrub J, Bakker J, McLuckie A, Willatts S, Brockway M, Anzueto A, Holzapfel L, Breen D, Silverman, MS, Takala J, Donaldson J, Arneson C, Grove G, Grossman S, Grover R. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 32:21-30, 2004.

Lowry MA, Goldberg JL, Belosevic M: Induction of nitric oxide (NO) synthesis in murine macrophages requires potassium channel activity. *Clin Exp Immunol.* 111:597-603, 1998.

Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S, Ruiz-Stewart I, Park J, Schulz S, Chepenik KP, Waldman SA. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev.* 52(3):375-414; 2000.

Maruyama NK, Yasunori K, Yamauchi T, Aizawa T, Ohri M, Nara T, Oshiro L, Ohno G, Tanura S, Shimura et al. Quinine inhibits production of tumor necrosis factor- α from human alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 10:514, 1994.

Miller SI, Wallace RJ Jr, Musher DM, Septimus EJ, Kohl S, Baughn RE. Hypoglycemia as a manifestation of sepsis. *Am J Med.* 68(5):649-54; 1980.

Miki T, Seino S. Roles of K_{ATP} channels as metabolic sensors in acute metabolic changes. *J Mol Cell Cardiol.* 38(6):917-25; 2005.

Miyoshi H, Nakaya Y, Moritoki H. Nonendothelial-derived nitric oxide activates the ATP-sensitive K^+ channel of vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett.* 345(1):47-9; 1994.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109-142, 1991.

Mullane KM, Kraemer R, Smith B. Myeloperoxidase activity as a quantitative assessment of neutrophil infiltration into ischemic myocardium. *J Pharmacol Methods.* 14(3):157-67; 1985.

Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol.* 486:47-58; 1995.

Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci.* 97:8841-8848, 2000.

Nelson MT, Brayden JE. Regulation of arterial tone by calcium-dependent K^+ channels and ATP-sensitive K^+ channels. *Cardiovasc Drugs Ther. Suppl* 3:605-10; 1993.

Nelson MT, Patlak JB, Worley JF, Standen NB. Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone. *Am J Physiol.* 259:C3-18; 1990.

Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol.* 268:C799-822; 1995.

Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol.* 75(5):749-55; 2004.

Nzerue CM, Baffoe-Bonnie H, You W, Falana B, Dai S. Predictors of outcome in hospitalized patients with severe hyponatremia. *J Natl Med Assoc.* 95(5):335-43; 2003.

O'Brien A, Stidwill RP, Clapp LH, Singer M. Variable effects of inhibiting inducible nitric oxide synthase and closing the vascular atp-sensitive potassium channel (via its pore-forming and sulfonylurea receptor subunits) in endotoxic shock. *Shock.* 2008 [Epub ahead of print]

Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FR, Simons RL, Peitzman AB. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. *Ann. Surg.*, 214(5): 621-626, 1991.

Okabe K, Kitamura K, Kuriyama H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. *Pflugers Arch.* 409(6):561-8; 1987.

Oliver JA, Landry DW. Potassium channels and septic shock. *Crit. Care Med.*, 34:1255-1256, 2006.

Park WS, Ko JH, Kim NR, Son YK, Kang SH, Warda M, Jung ID, Park YM, Han J. Increased inhibition of inward rectifier K⁺ channels by angiotensin II in small-diameter coronary artery of isoproterenol-induced hypertrophied model. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27: 1768-1775; 2007a.

Park WS, Son YK, Kim NR, Ko JH, Kang SH, Warda M, Earm YE, Jung ID, Park YM, Han J. Acute hypoxia induces vasodilation and increases coronary blood flow by activating inward rectifier K⁺ channel. *Pflugers Arch.* 454: 1023-1030; 2007b.

Parker MM, Shelhamer JH, Natanson C, Alling DW, Parrillo JE. Serial cardiovascular variables in survivors and nonsurvivors of human septic shock: heart rate as an early predictor of prognosis. *Crit Care Med.* 15(10):923-9; 1987.

Parrillo JE, Parker MM, Natanson C, Suffredini AF, Danner RL, Cunnion RE, Ognibene FP. Septic shock in humans. Advances in the understanding of pathogenesis, cardiovascular dysfunction, and therapy. *Ann Intern Med.* 113(3):227-42; 1990.

Paulson OB, Newman EA. Does the release of potassium from astrocyte endfeet regulate cerebral blood flow? *Science*. 237(4817):896-8; 1987.

Pickkers P, Jansen Van Rosendaal AJ, Van Der Hoeven JG, Smits P. Activation of the ATP-dependent potassium channel attenuates norepinephrine-induced vasoconstriction in the human forearm. *Shock*. 22:320-325, 2004.

Pickkers P, Dorresteijn MJ, Bouw MP, van der Hoeven JG, Smits P. In vivo evidence for nitric oxide-mediated calcium-activated potassium-channel activation during human endotoxemia. *Circulation*. 114(5):414-21; 2006.

Preyra I, Worster A. Hypoglycemia in bacterial septicemia. *CJEM*. 5(4):268-70; 2003.

Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev*. 77(4):1165-232; 1997.

Quezado ZM, Natanson C. Systemic hemodynamic abnormalities and vasopressor therapy in sepsis and septic shock. *Am J Kidney Dis*. 20(3):214-22; 1992.

Rees, D. D.; Cellek, S.; Palmer, R. M. J., Moncada, S.. 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.

Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*. 13(2):110-6; 2000.

Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol*. 8(10):776-87; 2008.

Roberds SL, Knoth KM, Po S, Blair TA, Bennett PB, Hartshorne RP, Snyders DJ, Tamkun MM. Molecular biology of the voltage-gated potassium channels of the cardiovascular system. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 4(1):68-80; 1993.

Robertson BE, Nelson MT. Aminopyridine inhibition and voltage dependence of K⁺ currents in smooth muscle cells from cerebral arteries. *Am J Physiol*. 267:C1589-97; 1994.

Robertson BE, Schubert R, Hescheler J, Nelson MT. cGMP-dependent protein kinase activates Ca-activated K channels in cerebral artery smooth muscle cells. *Am. J. Physiol*. 265:C299-303, 1993.

Rodrigo GC, Standen NB. ATP-sensitive potassium channels. *Curr Pharm Des*. 11(15):1915-40; 2005.

Rus H, Pardo CA, Hu L, Darrah E, Cudrici C, Niculescu T, Niculescu F, Mullen KM, Allie R, Guo L, Wulff H, Beeton C, Judge SI, Kerr DA, Knaus HG, Chandy KG,

Calabresi PA. The voltage-gated potassium channel Kv1.3 is highly expressed on inflammatory infiltrates in multiple sclerosis brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102:11094-11099, 2005.

Sadoshima J, Akaike N, Kanaide H, Nakamura M. Cyclic AMP modulates Ca-activated K channel in cultured smooth muscle cells of rat aortas. *Am J Physiol.* 255:H754-9; 1988.

Salter M, Knowles RG, Moncada S. Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-independent nitric oxide synthases. *FEBS Lett.* 291: 145-149, 1991.

Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR, Black E, Schwartz JS, Moore R, Johnson BL Jr, Platt R; Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA.* 278(3):234-40; 1997.

Schrier RW; Wang W. Mechanisms of Disease: Acute Renal Failure and Sepsis. *N Engl J Med*, Volume 351(2) 159-169, 2004.

Scornik FS, Codina J, Birnbaumer L, Toro L. Modulation of coronary smooth muscle K_{Ca} channels by G_s alpha independent of phosphorylation by protein kinase A. *Am J Physiol.* 265(4 Pt 2):H1460-5; 1993.

Seino S, Miki T. Physiological and pathophysiological roles of ATP-sensitive K⁺ channels. *Prog Biophys Mol Biol.* 81(2):133-76; 2003.

Seydel U, Scheel O, Müller M, Brandenburg K, Blunck R. A K⁺ channel is involved in LPS signaling. *J Endotoxin Res.* 7:243-7, 2001.

Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 18(3):385-405; 2004.

Silva E, Pedro MA, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Correa AD, Vieira PC, Knobel E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). *Crit. Care.* 8: R251-260, 2004.

Silva-Santos JE, Assreuy J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 290: 380-7, 1999.

Silva-Santos JE, Terluk MR, Assreuy J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. *Shock* 17:70-76, 2002.

Smirnov SV, Aaronson PI. Ca(2+)-activated and voltage-gated K⁺ currents in smooth muscle cells isolated from human mesenteric arteries. *J. Physiol.* 457:431-54; 1992.

Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(1):28-38; 2001.

Sobey CG, Faraci FM. Inhibitory effect of 4-aminopyridine on responses of the basilar artery to nitric oxide. *Br J Pharmacol.* 126(6):1437-43; 1999.

Sorrentino R, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Lippolis L, Sorrentino L, Autore G, Pinto A. Involvement of ATP-sensitive potassium channels in a model of a delayed vascular hyporeactivity induced by lipopolysaccharide in rats. *Br. J. Pharmacol.* 127: 1447-1453, 1999.

Spöhr F, Busch CJ, Reich C, Motsch J, Gebhard MM, Kuebler WM, Bloch KD, Weimann J. 4-Aminopyridine restores impaired hypoxic pulmonary vasoconstriction in endotoxemic mice. *Anesthesiology.* 107:597-604; 2007.

Standen NB. Properties of cloned K_{ATP} channels mimic those of β-cells. *Journal of Physiology.* 498:1; 1997.

Standen NB, Quayle JM, Davies NW, Brayden JE, Huang Y, Nelson MT. Hyperpolarizing vasodilators activate ATP-sensitive K⁺ channels in arterial smooth muscle. *Science.* 245(4914):177-80; 1989.

Sunouchi T, Suzuki K, Nakayama K, Ishikawa T. Dual effect of nitric oxide on ATP-sensitive K⁺ channels in rat pancreatic beta cells. *Pflugers Arch.* 456(3):573-9; 2008.

Taguchi H, Heistad DD, Chu Y, Rios CD, Ooboshi H, Faraci FM. Vascular expression of inducible nitric oxide synthase is associated with activation of Ca(++)-dependent K⁺ channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 279(3):1514-9; 1996.

Taguchi T, Uchida W, Takenaka T, Takeo S. Cardioprotective effects of YM934, an ATP-sensitive potassium channel opener, on stunned myocardium in anesthetized dogs. *Gen Pharmacol.* 32(6):695-703; 1999.

Terluk MR, da Silva-Santos JE, Assreuy J. Involvement of soluble guanylate cyclase and calcium-activated potassium channels in the long-lasting hyporesponsiveness to phenylephrine induced by nitric oxide in rat aorta. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 361(5):477-83; 2000.

Thomas L. *Germes. N. Engl. J. Med.* 287: 553-555; 1972.

Torres-Dueñas D, Benjamim CF, Ferreira SH, Cunha FQ. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. *Shock.* 25(3):267-76; 2006.

- Tsiotou AG, Sakorafas GH, Anagnostopoulos G, Bramis J. Septic shock: current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit.* 11(3):RA76-85; 2005.
- Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med.* 345:1359-67, 2001.
- Vanelli G, Hussain SN, Dimori M, Aguggini G. Cardiovascular responses to glibenclamide during endotoxaemia in the pig. *Vet. Res. Commun.* 21:187-200, 1997.
- Walev I, Reske K, Palmer M, Valeva A, Bhakdi S. Potassium-inhibited processing of IL-1 beta in human monocytes. *EMBO J.* 14:1607-14, 1995.
- Wang JE, Jørgensen PF, Almlöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun.* 68(7):3965-70; 2000.
- Warrillow S, Egi M, Bellomo R. Randomized, double-blind, placebo-controlled crossover pilot study of a potassium channel blocker in patients with septic shock. *Crit Care Med.* 34:980-985, 2006.
- Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H. International Union of Pharmacology. LII. Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev.* 57(4):463-72; 2005.
- Wheeler AP, Bernard GR. Treating patients with severe sepsis. *N. Eng. J. Med.*, 340: 207-214, 1999.
- Williams DL, Katz GM, Roy-Contancin L, Reuben JP. Guanosine 5'-monophosphate modulates gating of high-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channels in vascular smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 9360-9364, 1988.
- Wilson AJ, Clapp LH. The molecular site of action of K_{ATP} channel inhibitors determines their ability to inhibit iNOS-mediated relaxation in rat aorta. *Cardiovasc Res* 56: 154-163; 2002.
- Wu CC, Thiemermann C, Vane JR. Glibenclamide-induced inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase in cultured macrophages and in the anaesthetized rat. *Br J Pharmacol.* 114(6):1273-81; 1995.
- Wu CC, Chen SJ, Yen MH. Nitric oxide-independent activation of soluble guanylyl cyclase contributes to endotoxin shock in rats. *Am. J. Physiol.* 275:H1148-1157, 1998.
- Wu CC, Ruetten H, Thiemermann C. Comparison of the effects of aminoguanidine and N omega-nitro-L-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 300:99-104, 1996.

Xie Q, Kashiwabara Y, Nathan C. Role of transcription factor NF-(B/Rel) in induction of nitric oxide. *J Biol Chem.* 269:4705–4708; 1994.

Yang J, Jan YN, Jan LY. Determination of the subunit stoichiometry of an inwardly rectifying potassium channel. *Neuron.* 15(6):1441-7; 1995.

Yuan X-J, Tod ML, Rubin LJ, Blaustein MP. NO hyperpolarizes pulmonary artery smooth muscle cells and decreases the intracellular Ca^{2+} concentration by activating voltage-gated K1 channels. *Proc Natl Acad Sci.* 93:10489 -10494; 1996.

Zappert J. Ueber das Vorkommen der Eosinophilen Zellen in menschlichen Blute. *Z Klin Med.* 23:227-308; 1893 *in:* Abidi K, Khoudri I, Belayachi J, Madani N, Zekraoui A, Zeggwagh AA, Abouqal R. Eosinopenia is a reliable marker of sepsis on admission to medical intensive care units. *Crit Care.* 12(2):R59; 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)