

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA**

**ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA SEROTONINA REVERTE
A HIPOTENSÃO E A HIPOREATIVIDADE VASCULAR NO
CHOQUE ENDOTOXÊMICO EM RATOS.**

KIUANNE LINO LOBO METZKER

**Florianópolis
2015**

Kiuanne Lino Lobo Metzker

**ANTAGONISTA DO RECEPTOR DA SEROTONINA REVERTE
A HIPOTENSÃO E A HIPOREATIVIDADE VASCULAR NO
CHOQUE ENDOTOXÊMICO EM RATOS.**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Farmacologia da Universidade
Federal de Santa Catarina para a
obtenção do Grau de Mestre em
Farmacologia.

Orientadora: Profa. Dra. Áurea
Elizabeth Linder

Florianópolis
2015

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

Metzker, Kiuanne Lino Lobo

Antagonista do receptor da serotonina reverte a hipotensão e a hiporeatividade vascular no choque endotoxêmico em ratos. / Kiuanne Lino Lobo Metzker ; orientadora, Áurea Elizabeth Linder - Florianópolis, SC, 2015.

111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Sepse. 3. Serotonina. 4. Pressão arterial. 5. Contração vascular. I. Linder, Áurea Elizabeth. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"No final, conservaremos apenas o que amamos, amaremos apenas o que compreendemos, e compreenderemos apenas o que nos é ensinado"

Baba Dioum

Agradecimentos

A Deus pelo dom da vida e por todo cuidado e proteção para comigo, minha família e meus entes queridos.

A meus pais Eliede Sant'ana Lino Lobo e Iris Lobo Filho por ser minha base de sustentação durante toda minha vida e meu apoio em todas as horas.

Aos meus irmãos Ralf Lino Lobo e Rafael Lino Lobo por estarem sempre prontos a me ajudar em qualquer coisa.

Ao meu marido Naron Metzker pela sua dedicação e paciência durante toda a minha jornada, por sempre me apoiar em todas as minhas decisões e me dar forças para seguir em frente com meus sonhos.

A minha orientadora Aurea Elizabeth Linder por todos os conselhos durante a realização desse trabalho e por ser uma “mãezona” que tem me ajudado em todos os momentos.

Aos professores Jamil Assreuy e José Eduardo da Silva Santos pelo empréstimo de material e equipamentos.

A Giovana Hartmann Carioletti que me ajudou durante meus experimentos e me acompanhou durante todo o mestrado.

Aos meus colegas do LabCardio Giovana, Erick, Daiana, Angélica, Karla, Ronald, Rita, Priscila e Danillo pela convivência e por tornar meus dias de experimentos melhores e menos fatídicos.

Aos meus colegas do NOlab que sempre estiveram dispostos a me auxiliar.

A Adriane Madeira pela auxílio e apoio técnico nos experimentos.

Aos meus colegas de mestrado em Farmacologia 2013 pela amizade e momentos de descontração.

Aos professores Sandra Crestani, Domitila Augusta Huber, Jamil Assreuy e José Eduardo da Silva Santos por terem aceitado fazer parte da minha banca e avaliar este trabalho.

A todos os meus e amigos que torceram por mim, e que contribuíram de alguma maneira para a realização desse trabalho.

Ao apoio financeiro da CAPES e do CNPq.

Resumo

LOBO, K. L. Antagonista do receptor da serotonina reverte a hipotensão e a hiporeatividade vascular no choque endotoxêmico em ratos. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

O choque séptico é caracterizado principalmente por vasodilatação excessiva, hipotensão e hiporreatividade a vasoconstritores. A serotonina (5-hidroxitriptamina; 5-HT) é armazenada periféricamente em plaquetas e quando administrada cronicamente em ratos normotensos e hipertensos, induz uma queda na pressão arterial desses animais que é mediada por óxido nítrico (NO). O NO desempenha um papel proeminente na vasodilatação excessiva e na hiporeatividade vascular observadas na sepse ou choque séptico. Hipotetizamos que a serotonina pode ser liberada durante a agregação plaquetária descrita na sepse contribuindo para a queda na pressão arterial de animais sépticos por liberação de NO e, conseqüentemente, para a hiporreatividade a agentes vasoconstritores. Utilizamos o modelo experimental de endotoxemia induzido por lipopolissacarídeo (LPS). Antes, realizamos um protocolo de toxemia *in vitro*, onde anéis de aorta de ratos Wistar machos foram incubados em banho de órgão isolado por 12 horas com LPS. Alguns anéis de aorta, além da incubação com LPS, também foram incubados com diversos antagonistas de receptores da serotonina como o SB 269970, zacopride, WAY 100135, GR-127935, LY 266097 e ketanserina, antagonistas dos receptores 5-HT₇, 5-HT₃, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2A} respectivamente. A incubação dos anéis de aorta com LPS por 12 horas reduziu a contração induzida por noradrenalina quando comparada à obtida em anéis de aorta que não receberam LPS. A contração induzida por noradrenalina em aorta incubada com LPS por 12 horas foi significativamente aumentada na presença de todos os antagonistas de receptores da serotonina utilizados. Ratos receberam pré-tratamento com veículo (1 mL/Kg; ip) e depois de 5 minutos receberam tratamento com LPS (10 mg/Kg; ip) ou salina (1 mL/Kg; ip) para avaliação de vários parâmetros após 6 e 24 horas. Comparando os animais que receberam salina com os animais endotoxêmicos observamos que a aorta destes apresentaram hiporreatividade vascular induzida por noradrenalina e serotonina 6 horas após o tratamento com LPS e hiporreatividade induzida por noradrenalina, mas não por serotonina 24 horas após o tratamento com LPS. Os animais endotoxêmicos apresentaram diminuição na contagem de linfócitos e plaquetas, aumento na contagem de granulócitos e

aumento na concentração plasmática de NO 6 e 24 horas após o tratamento com LPS; diminuição na pressão arterial média (PAM) em 6, mas não em 24 horas após o tratamento com LPS, e diminuição do efeito pressórico induzido por noradrenalina apenas 24 horas após o tratamento com LPS. Os animais foram pré-tratados com ketanserina, antagonista 5-HT_{2A} (5 mg/Kg; ip) ou serotonina (2 mg/Kg), antes do tratamento com LPS (10 mg/Kg; ip) ou salina (1 mL/Kg; ip). O pré-tratamento com ketanserina aumentou a resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina 24 horas após o tratamento com LPS ou salina, respectivamente; diminuiu a concentração de NO plasmático e aumentou a concentração de plaquetas 6 horas após o tratamento com LPS; aumentou a PAM 6 e 24 horas após tratamento com LPS, porém não alterou a resposta pressórica induzida por noradrenalina nos tempos avaliados. Já o pré-tratamento com serotonina diminuiu a resposta contrátil induzida por noradrenalina 6 horas após o tratamento com salina e inibiu a resposta pressórica induzida por noradrenalina 6 horas após o tratamento com LPS. Esses resultados sugerem que a serotonina está envolvida na hipotensão e na hiporreatividade a agentes contráteis na sepse e que o tratamento de animais endotoxêmicos com ketanserina parece contribuir para restaurar a função cardiovascular no choque séptico.

Palavras chaves: Sepse, serotonina, ketanserina, contração vascular, pressão arterial.

Abstract

LOBO, K. L. Serotonin receptor antagonists reverses hypotension and vascular hyporeatividade in endotoxêmico shock in rats. 2015. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

Septic shock is particularly characterized by excessive vasodilatation, hypotension and hyporeactivity to vasoconstrictors. Serotonin (5-hydroxytryptamine; 5-HT) is stored in platelets and when peripherally administered in normotensive and hypertensive rats chronically, it induces a fall in the blood pressure of these animals mediated by nitric oxide (NO). NO plays a prominent role in excessive vasodilatation and vascular hyporeactivity observed in sepsis or septic shock. In our work we hypothesized that serotonin may be released during platelet aggregation described in sepsis contributing to the fall in blood pressure in septic animals by NO release and, consequently, to the hyporeactivity to vasoconstrictor agents. Endotoxemia induced by lipopolysaccharide (LPS) was the experimental model chosen for the present study. We performed an *in vitro* protocol of toxemia, in which rat aortic rings were incubated in an isolated organ bath for 12 hours with LPS. In addition to LPS, some preparations were also incubated with different serotonin receptor antagonists such as SB 269,970, zacopride, WAY 100135, GR-127935, LY 266 097 and ketanserin, antagonists of the 5-HT₇, 5-HT₃, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} /1D, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2A} receptors respectively. Incubation of aortic rings with LPS for 12 hours reduced norepinephrine-induced contraction compared to that obtained in the aortic rings that received no LPS. The contraction induced by norepinephrine in the aorta incubated with LPS for 12 hours was significantly enhanced in the presence of all serotonin receptor antagonists used. Male Wistar rats were pretreated with vehicle (1 ml / kg; ip) followed by treatment with LPS (10 mg / kg, ip) or saline (1 ml / kg; ip) after 5 minutes for evaluation of several parameters 6 and 24 hours after. Comparing the responses in aortic rings from rats that received saline with those from rats that received LPS, a blunted contraction induced by norepinephrine and serotonin 6 hours after treatment with LPS and a blunted contraction induced by norepinephrine, but not by serotonin 24 hours after LPS treatment were observed. Endotoxemic animals showed decreased lymphocyte and platelet counts, increased granulocyte count and increased plasma concentration of NO at 6 and 24 hours after LPS treatment; decreased mean arterial pressure (MAP) in 6 but not at 24 hours after LPS

treatment and decreased pressoric response induced by norepinephrine only 24 hours after treatment with LPS. Animals were pre-treated with ketanserin (5 mg / kg; ip) or serotonin (2 mg / kg; ip) before treatment with LPS (10 mg / kg; ip) or saline (1 ml / kg; ip). Pre-treatment with ketanserin increased the contractile response induced by norepinephrine and serotonin in aortic rings 24 hours after treatment with LPS and saline, respectively; decreased plasmatic NO concentration and increased platelet count 6 hours after LPS treatment; increased MAP 6 and 24 hours after LPS treatment, with no effect on norepinephrine-induced pressor response. Pre-treatment with serotonin induced a decrease in norepinephrine-induced contractile response 6 hours after treatment with saline and inhibited the pressoric response induced by norepinephrine 6 hours after LPS treatment. These results suggest that serotonin is involved in hypotension and hyporeactivity to contractile agents in sepsis and that ketanserin may represent a treatment to help restore the cardiovascular function in septic shock.

Key words: Sepsis, serotonin, ketanserin, vascular contraction, blood pressure.

Lista de Figuras

FIGURA 1. Resposta contrátil induzida por noradrenalina em anéis de aorta incubados na ausência e na presença de LPS <i>in vitro</i> por 12 horas.	61
FIGURA 2. Efeito do SB 269970 na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubada com LPS <i>in vitro</i> por 12 horas.	62
FIGURA 3. Efeito do zacopride na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubada com LPS <i>in vitro</i> por 12 horas.	63
FIGURA 4. Efeito do WAY 100135 na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubados com LPS <i>in vitro</i> por 12 horas.	64
FIGURA 5. Efeito do GR 127935 na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubados com LPS <i>in vitro</i> por 12 horas.	65
FIGURA 6. Efeito do LY 266097 na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubados com LPS <i>in vitro</i> por 12 horas.	66
FIGURA 7. Efeito do ketanserina na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubados com LPS <i>in vitro</i> por 12 horas.	67
FIGURA 8. Resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta de ratos que receberam LPS ou salina <i>in vivo</i> após pré-tratamento com veículo.	69
FIGURA 9. Efeito do pré-tratamento com ketanserina em animais que receberam LPS 6 horas antes da avaliação da resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta.	71
FIGURA 10. Efeito do pré-tratamento com ketanserina em animais tratados com LPS ou salina por 24 horas na resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta.	72
FIGURA 11. Efeito do pré-tratamento com serotonina em animais tratados com LPS ou salina por 6 horas na resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta.	73
FIGURA 12. Efeito do pré-tratamento com serotonina em animais tratados com LPS ou salina por 24 horas na resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta.	74
FIGURA 13. Pressão arterial média (PAM) de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com salina ou LPS e seu aumento induzido por noradrenalina.	75

FIGURA 14. Efeito do pré-tratamento com ketanserina e serotonina na pressão arterial média (PAM) de ratos em 6 e 24 horas após o tratamento com LPS.	77
FIGURA 15. Efeito do pré-tratamento com ketanserina e serotonina na resposta pressórica induzida por noradrenalina em ratos endotoxêmicos.	79
FIGURA 16. Hemograma de animais 6 e 24 horas após o tratamento com LPS e salina.	81
FIGURA 17. Efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina na contagem de plaquetas nos animais tratados com LPS e salina em 6 e 24 horas após os tratamentos.	82
FIGURA 18. Efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina na contagem de linfócitos nos animais tratados com LPS e salina em 6 e 24 horas após os tratamentos.	83
FIGURA 19. Efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina na contagem de granulócitos nos animais tratados com LPS e salina em 6 e 24 horas após os tratamentos.	84
FIGURA 20. Concentração do NOx plasmáticos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina.	85
FIGURA 21. Efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina na concentração plasmática de NOx nos animais tratados com LPS e salina em 6 e 24 horas após os tratamentos.	86

Lista de Quadros

QUADRO 1. Definição de infecção, sepse, sepse grave, choque séptico e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos.	39
QUADRO 2. Composição da solução salina fisiológica (SSF)	53
QUADRO 3. Antagonistas de receptores da serotonina utilizados nos protocolos de avaliação da reatividade vascular de aorta de ratos do Grupo I.	55

Lista de Esquemas

ESQUEMA 1. Relação entre a infecção, sepse, sepse severa e choque séptico.....	38
ESQUEMA 2 - Síntese e metabolismo da 5-HT.....	44

Lista de Tabelas

TABELA 1. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de SB 269970.....	62
TABELA 2. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de zacopride.....	63
TABELA 3. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de WAY 100135.....	64
TABELA 4. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de GR 127935.....	65
TABELA 5. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de LY 266097.....	66
TABELA 6. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida por noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de ketanserina.....	67
TABELA 7. Pressão arterial média 6 e 24 horas após os tratamentos.....	76
TABELA 8. Efeito pressórico da noradrenalina 6 e 24 horas após os tratamentos.....	76

Lista de Abreviações

5-HT	-	<i>Serotonina</i>
5-HIAA	-	Ácido 5-hidroindolacético
5-HTP	-	Hidroxitriptofano
CCRC	-	Curva concentração-resposta cumulativa
CLP	-	Ligadura e punção e ceco
CO ₂	-	Dióxido de carbono
CEUA	-	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAG	-	Diacilglicerol
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
EDTA	-	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPM	-	Erro padrão da média
g	-	Unidade de medida grama
H ₂ O ₂	-	Peroxido de hidrogênio
IP	-	Via intraperitoneal
IP ₃	-	Trifosfato de inositol
KCl	-	Cloreto de potássio
KH ₂ PO ₄	-	Fosfato de potássio monobásico
LPS	-	Lipopolissacarideo.
mg	-	Unidade de medida miligrama
mL	-	Unidade de medida mililitro
M	-	Unidade de concentração molar
MAO	-	Monoamina oxidase
MgSO ₄ .7H ₂ O	-	Sulfato de magnésio heptahidratado
mM	-	Unidade de concentração milimolar
MODS	-	Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos
µM	-	Unidade de concentração micromolar
n	-	Número de amostras utilizadas
NA	-	Noradrenalina
NaCl	-	Cloreto de sódio
NaHCO ₃	-	Bicarbonato de sódio
eNOs	-	Óxido nítrico endotelial
iNOs	-	Óxido nítrico induzível
nNOs	-	Óxido nítrico neuronal
nM	-	Unidade de concentração nanomolar
NO	-	Óxido nítrico
NOS	-	Óxido nítrico sintase
O ₂	-	Gás oxigênio
PAM	-	Pressão arterial média
PAMP	-	Padrões moleculares associados a patógenos
SNC	-	Sistema nervoso central

SNP	-	Sistema nervoso periférico
SSF	-	Solução salina fisiológica
SERT	-	Transportador de serotonina
TPH	-	Triptofano hidroxilase
UTI	-	Unidade de terapia intensiva

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	37
1.1 Sepsis: Definição e epidemiologia.....	38
1.2 Fisiopatogênese da sepsis.....	40
1.3 Modelos experimentais.....	41
1.4 Tratamentos.....	42
1.5 Serotonina.....	43
1.6 Receptores de serotonina no sistema cardiovascular.....	45
2. OBJETIVO.....	49
2.1 Objetivo geral.....	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1 Animais.....	52
3.2 Grupos experimentais.....	52
3.2.1 Tratamento <i>in vivo</i>	52
3.3 Procedimentos experimentais.....	53
3.3.1 Medidas de tensão isométrica.....	53
3.3.1.1 Coleta e preparação de aorta em banho de órgão isolado.....	53
3.3.1.2 Avaliação da reatividade vascular de ratos do Grupo I.....	54
3.3.1.3 Avaliação da reatividade vascular de ratos do Grupo II.....	55
3.3.2 Coleta de amostras de sangue.....	55
3.3.2.1 Hemograma.....	55
3.3.2.2 Dosagens de NOx.....	56
3.3.3 Avaliação da Pressão Arterial.....	56
3.4 Análise estatística.....	57
3.5 Compostos e reagentes.....	57
4. RESULTADOS.....	59
4.1 Medidas de tensão isométrica em aorta de ratos.....	60
4.1.1 Reatividade vascular de anéis de aorta incubados com LPS <i>in vitro</i>	60
4.1.1.1 Efeito de antagonistas de receptores da serotonina na hiporreatividade vascular de aorta de ratos induzida por incubação com LPS <i>in vitro</i>	61
4.2 Reatividade vascular em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos.....	68
4.2.1 Reatividade vascular em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos pré-tratados com veículo.....	68
4.2.2 Reatividade vascular em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos pré-tratados com ketanserina.....	69
4.2.3 Reatividade vascular em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos pré-tratados com serotonina.....	72
4.3 Avaliação de pressão arterial.....	74
4.4 Avaliação de hemograma.....	80

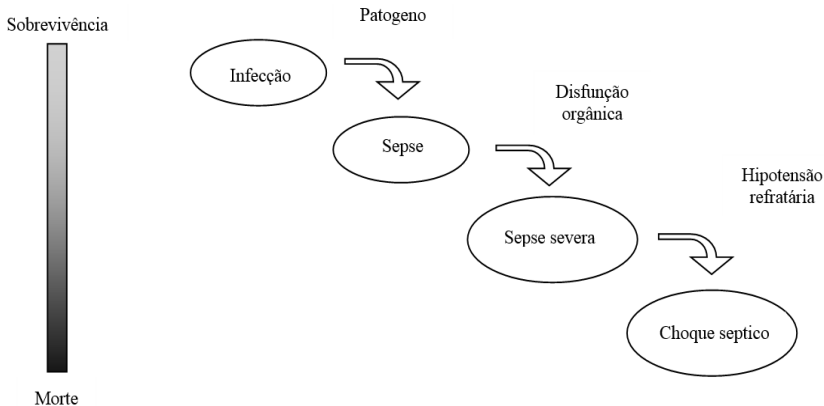
4.5 Avaliação do NOx.....	85
5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÃO	97
7. REFERÊNCIAS.....	99

1. Introdução

1.1 Seps: Definição e epidemiologia.

Seps é uma palavra grega que significa "decomposição de animais ou matéria orgânica vegetal na presença de bactérias" (Geroulanos; Douka, 2006). A seps está associada à resposta inflamatória sistêmica como resultado de uma resposta excessiva do hospedeiro a uma infecção. Os sinais clínicos incluem: febre, confusão mental, hipotensão transitória, oligúria e trombocitopenia. (Cohen, 2002). Em um grande número de casos, o quadro pode evoluir podendo causar falência respiratória ou renal, anormalidades na coagulação e hipotensão profunda e não-responsiva a medicamentos vasopressores o que leva muitos pacientes a apresentar falência de múltiplos órgãos (Goldenberg *et al.*, 2011; Pravda, 2014).

Como pode ser visto no **ESQUEMA 1**, a progressão de uma resposta inflamatória sistêmica exagerada na seps pode ser responsável pelo desenvolvimento, por exemplo, da seps severa evoluindo ao choque séptico (Pravda, 2014). A evolução para o choque séptico, caracterizado principalmente por uma vasodilatação excessiva e hiporreatividade a vasoconstritores (Zhang *et al.*, 2014) é paralela a uma diminuição na sobrevida do indivíduo como pode ser observado no (ESQUEMA 1).



ESQUEMA 1. Relação entre a infecção, seps, seps severa e choque séptico. Adaptado de Chiche *et. al.*, 2011.

Para a classificação da sepse e doenças similares, a *American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine* realizaram uma Conferência de Consenso com a finalidade de facilitar a identificação da evolução da doença nos pacientes (**QUADRO 1**).

QUADRO 1. Definição de infecção, sepse, sepse grave, choque séptico e síndrome da disfunção de múltiplos órgãos.

Infecção: Fenômeno microbiano caracteriza-se por uma resposta inflamatória à presença de microrganismos ou a invasão do tecido hospedeiro.
Sepse: Resposta sistêmica a infecção que se manifesta por dois ou mais das seguintes condições como resultado de uma infecção: temperatura > 38 °C ou < 36 °C; b) frequência cardíaca > 90 bpm; c) frequência respiratória > 20 movimentos/minuto; d) leucometria > 12.000/mm ³ ou < 4.000/mm ³ , ou ainda, presença de > 10% de bastonetes.
Sepse grave: Sepse associada à disfunção orgânica, hipoperfusão e hipotensão.
Choque séptico: Sepse associada á hipotensão e alteração perfusional, refratárias à reposição volêmica. A hipotensão persiste mesmo com a utilização de agentes vasopressores.
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.

Fonte: adaptado de Bone *et al.*, 1992.

A sepse é a principal causa de morte em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e estima-se que existem mais de um milhão de casos de sepse entre pacientes hospitalizados a cada ano nos EUA (Martin, 2012). Na América Latina, um estudo epidemiológico feito por Silva *et al* (2004) mostrou que a incidência de infecção no momento da internação em um hospital é de 21%. Os dados demonstram que a sepse é um problema de saúde pública importante, com altos índices de incidência e mortalidade. A taxa de mortalidade de pacientes com sepse é de 33,9% e para a sepse severa é de 46,9%. No entanto a maior taxa de mortalidade é para pacientes com choque séptico que chega a ser 52,2% (Silva *et al*, 2004).

Os hospitais públicos apresentaram uma maior taxa de infecção quando comparados com os hospitais particulares. Estes apresentaram

uma incidência de sepse grave de 16% enquanto que em hospitais públicos este índice subiu para 35%. Uma das explicações para esta diferença de incidência de infecção pode ser por que os pacientes de hospitais públicos são admitidos em um estado mais tardio da infecção (Silva *et al.*, 2004).

A incidência da sepse tende a ser maior em pacientes com idade avançada, com enfermidades graves e que tenham passado por procedimentos invasivos (Angus *et al.*, 2001; Rangel-Frausto, 2005). As fontes mais comuns de infecção são de origem pulmonar, abdominal, urinária, cutânea e através de cateteres vasculares. Os microrganismos causadores são na grande maioria bactérias, embora uma parcela dos casos seja originada por infecções virais ou fúngicas (Alberti *et al.*, 2002).

1.2 Fisiopatogênese da sepse

A sepse é uma infecção desencadeada geralmente por bactérias que são capazes de interagir com o sistema imune do hospedeiro e produzir uma resposta inflamatória que leva à liberação de inúmeros mediadores desencadeando uma resposta sistêmica. Os efeitos dessa inflamação incluem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, depressão do miocárdio e insuficiência da cascata de coagulação. Esses efeitos podem resultar ainda em um desequilíbrio sistêmico no fornecimento de oxigênio e a uma imunossupressão que pode levar à disfunção de múltiplos órgãos (Tupchong; Koyfman; Foran, 2014).

As bactérias gram-negativas são responsáveis por cerca de 60% dos casos de sepse. Os componentes estruturais das bactérias comumente chamados de PAMP (Padrões moleculares associados a patógenos; do inglês *Pathogen-associated molecular pattern*) são um dos mecanismos responsáveis por iniciar o processo séptico (Cohen, 2002). O lipopolissacarídeo (LPS) é um dos PAMP mais estudados. O reconhecimento do LPS pelo sistema imune induz o recrutamento de leucócitos e à liberação de inúmeros mediadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias, interleucina-1 (IL-1), IL-6 e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α , do inglês *Tumor necrosis factor*) e uma variedade de outras citocinas incluindo IL-12, IL-15 e IL-18 (Dinarello, 1997; Ramnath, 2006).

A sepse pode perturbar o equilíbrio entre os mecanismos pró-coagulantes e anticoagulantes. Através do aumento na expressão do fator tecidual reforçando a produção de fibrina que é uma proteína fibrosa importante na coagulação sanguínea. Os aumentos da fibrina

juntamente com uma diminuição de sua degradação favorecem os mecanismos pró-coagulantes. Esses mecanismos associados à diminuição dos níveis de proteínas anticoagulantes naturais que ocorre na sepse resulta na formação de coágulos dificultando a oxigenação dos tecidos e levando à deterioração celular (Cohen, 2002).

A patogênese da sepse é acompanhada por um estado hipermetabólico causando uma depleção sistêmica de glutathiona que leva ao acúmulo de H_2O_2 (Peróxido de hidrogênio) nos tecidos. A difusão subsequente de H_2O_2 na corrente sanguínea resulta na falha microvascular e disfunção de órgãos. A disfunção microvascular leva à alteração na permeabilidade vascular e perda de proteínas. Além disso o H_2O_2 é um quimioatrativo de neutrófilos que é capaz de levar à infiltração de neutrófilos em múltiplos órgãos (Pravda, 2014).

A sepse também pode induzir a enzima óxido nítrico sintase que causa ainda mais instabilidade vascular. O óxido nítrico (NO) é um gás que tem uma miríade de funções, entre elas de causar vasodilatação (Ignarro *et al*, 1997; Kotsovolis; Kallaras, 2010). A produção de NO é feita pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) a partir do aminoácido L-arginina. A NOS compreende três isoformas, sendo elas a NOS endotelial (eNOS), a NOS neuronal (nNOS) e a NOS induzida (iNOS) que é a principal isoforma ativa durante o choque séptico. Apesar de uma quantidade impressionante de mediadores ser formada na sepse, o NO tem um papel proeminente na vasodilatação excessiva e na hiporreatividade vascular dentro das primeiras horas após a injeção de LPS ou bactérias em ratos (Schaeffer *et al*, 1990).

A vasodilatação excessiva e hiporeatividade vascular causada pelo choque séptico causado por LPS pode levar a hipotensão em ratos (Pravda, 2014). Shen *et al*, 2004 verificou ainda que a exposição de ratos ao LPS pode diminuir a função do baroreflexo que é o mecanismo responsável pelo controle da pressão arterial e essa diminuição na função do baroreflexo pode diminuir a sobrevida dos animais.

1.3 Modelos experimentais

Diversos modelos experimentais são utilizados para o estudo da sepse e choque séptico, sendo que um dos modelos de sepse utilizado é o de ligadura e perfuração do ceco (CLP) que é considerado o padrão ouro para estudo da sepse por produzir uma infecção polibacteriana em um foco localizado e ter uma grande similaridade com a progressão da sepse em humanos (Dejager *et al*, 2011). Em resumo, este modelo é utilizado principalmente em ratos onde é realizada uma laparotomia na

linha média, onde o ceco é exposto e é feita uma ligadura abaixo da válvula íleo-cecal. A ligadura cecal é seguida pela punção do ceco por uma agulha de tamanho definido, que fará a exposição de bactérias no organismo. Este processo é a fonte crônica de estímulos inflamatórios na progressão da doença (Schabbauer, 2012).

Outro modelo utilizado para o estudo da sepse é obtido com inóculo bacteriano, onde é implantado um inóculo de uma cultura bacteriana pura ou mista com várias bactérias do organismo. Podem ser utilizadas várias vias de inoculação como a via intraperitoneal ou a via pulmonar (Buras *et al.*, 2005). Este tipo de modelo avalia os mecanismos patogênicos do patógeno no hospedeiro. No entanto, nesse modelo não há um foco bacteriano intermitente e não reflete a diversidade de agentes infecciosos que ocorre na sepse humana (Dejager *et al.*, 2011).

Para o estudo do choque séptico é utilizado o modelo de administração de lipopolissacárideo de bactéria (LPS). Este método, apesar de não apresentar a bacteremia comum no choque séptico em humanos, é simples, reprodutível, bastante padronizado e induz respostas agudas como as observadas na sepse (Amersfoort; Berkel; Kuipel 2003, Dejager *et al.*, 2011). Além dos sintomas inflamatórios, o LPS causa hipotensão e hiporeatividade vascular (d'Emmanuele di Villa Bianca *et al.*, 2003). Por serem esses os sintomas de interesse para o nosso estudo, escolhemos como modelo experimental de sepse o de toxemia induzido por LPS.

1.4 Tratamentos

Um dos principais problemas na sepse é a vasodilatação excessiva que pode gerar hipotensão descontrolada, hipóxia tecidual, lesão e falência de órgãos. Por causa da hipotensão gerada na sepse, um dos principais tratamentos é o uso de drogas vasoativas que aumentam a pressão arterial média através da vasoconstrição (Hollenberg, 2011, Dellinger *et al.* 2008).

A noradrenalina, potente agonista α_1 -adrenérgico com efeitos β -adrenérgicos menos pronunciados, é uma das substâncias vasoativas mais utilizadas no tratamento da sepse. Mostra-se eficaz em aumentar a pressão arterial em pacientes com sepse, sem causar deterioração do índice cardíaco e da função do órgão. A fenilefrina, um agonista α_1 -adrenérgico seletivo, também é utilizada no tratamento da sepse, com função de aumentar a pressão arterial e a vasoconstrição. Seu efeito tem início rápido e de curta duração, mas há preocupações sobre o seu

potencial em reduzir o débito cardíaco nestes pacientes (Hollenberg, 2011). A hiporeatividade vascular a vasoconstritores também é um dos principais problemas na sepse pois dificulta um dos principais tratamentos da sepse que é o uso de drogas vasoativas (Levy *et al.*, 2010).

A combinação dos vasopressores com a reposição de líquidos também tem mostrado melhorar a sobrevida dos pacientes com choque séptico. A reposição de líquidos é feita com soluções colóides e cristalóides. As soluções cristalóides mais utilizadas são a solução de cloreto de sódio a 0,9% e solução de ringer com lactato (Dellinger *et al.*, 2008). Já os colóides podem ser classificados como naturais (albumina) ou artificiais (amidos, dextrans, gelatinas) e eles servem para aumentar a pressão oncótica no plasma. Devido ao seu peso molecular mais elevado permanecem no espaço intravascular por mais tempo, por isso têm um tempo de meia-vida intravascular mais longo que os cristalóides. A albumina, por exemplo, apresenta tempo de meia vida de 16 horas enquanto que o soro fisiológico e ringer com lactato têm meia-vida de 30 a 60 minutos (Rivers *et al.*, 2010).

A terapia anti-infecciosa é fundamental no tratamento da sepse e choque séptico. A seleção ideal de antibióticos para a sepse depende da epidemiologia da resistência local bem como fatores individuais de resistência (Vazquez-Grande; Kumar, 2015). Apesar do uso de antibiótico ser um dos tratamentos principais na sepse o seu uso pode causar lise de células bacterianas induzindo a liberação de mais patógenos como o LPS para a corrente sanguínea que podem contribuir para a cascata de eventos na sepse (Lepper *et al.*, 2002).

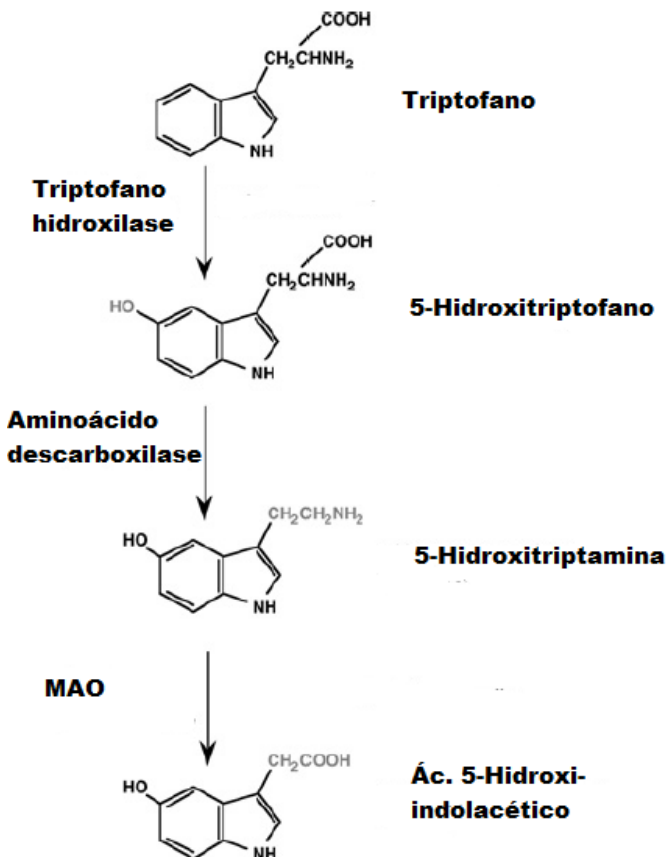
O tratamento da sepse vem sendo largamente estudado e uma variedade de agentes mantêm a promessa de novas terapias eficazes para a sepse. No entanto, ainda não se tem um tratamento eficaz para uso clínico (Hotchkiss, Karl, 2003).

1.5 Serotonina

A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é uma monoamina sintetizada principalmente nas células enterocromafins do intestino e em áreas discretas do cérebro. Ela pode estimular praticamente todos os principais sistemas fisiológicos, incluindo o sistema nervoso central, respiratório, gastrointestinal, geniturinário, imune e cardiovascular (Nichols; Nichols, 2008).

Como pode ser observado no **ESQUEMA 2**, o triptofano é o principal bloco de construção para a serotonina. Para a biossíntese da

serotonina, a enzima triptofano hidroxilase (TPH) transfere um grupo hidroxila para o aminoácido triptofano formando o 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Um grupo carboxila é retirado da estrutura pelo aminoácido aromático descarboxilase formando com isso a serotonina (Watts *et al.*, 2012).



ESQUEMA 2 - Síntese e metabolismo da 5-HT. MAO: monoamina oxidase; ác.: ácido. Adaptado de Watts *et al.*, 2012.

O metabolismo da serotonina ocorre através da monoamina oxidase (MAO) uma enzima intracelular que resulta na formação do

metabólito ácido 5-hidroxi-indol-acético (5-HIAA) (Walther *et al.*, 2003). O pulmão, intestino e células endoteliais são os tecidos que mais contribuem para o metabolismo da serotonina. A serotonina ainda pode ser metabolizada em células do músculo liso vascular (Linder *et al.*, 2008). Do meio extracelular, a serotonina pode ser captada principalmente pelo transportador de serotonina (SERT; do inglês *Serotonin transporter*). As plaquetas possuem SERT de alta eficiência que permite transportar, armazenar e em última análise liberar a serotonina em um evento trombótico (Watts *et al.*, 2012).

A serotonina interage com proteínas em um processo denominado serotonilação onde interage com proteínas intracelulares formando ligações covalentes (Walther *et al.*, 2003). A serotonilação de algumas proteínas nas plaquetas está associada à liberação de substâncias procoagulantes e de serotonina dos grânulos densos. Na musculatura lisa, pode ocorrer serotonilação de proteínas envolvidas no processo de contração do músculo liso vascular (Watts; Priestley; Thompson, 2009).

1.6 Receptores de serotonina no sistema cardiovascular

Os efeitos atribuídos à serotonina foram observados inicialmente no sistema cardiovascular em meados do século XIX. Naquela época foi relatada a existência de uma substância presente no soro quando o sangue é deixado coagular e que apresenta atividade em vasos sanguíneos e no coração (Rapport; Green; Page, 1948). A serotonina tem a capacidade de interagir com diferentes receptores no sistema cardiovascular podendo estimular a liberação de substâncias vasodilatadoras tais como óxido nítrico, através da ativação de receptores nas células endoteliais (Nuno *et al.*, 2007). Ainda, pode causar diversos efeitos e até antagônicos como bradicardia ou taquicardia, hipotensão ou hipertensão e vasodilatação ou vasoconstrição (Saxena; Villalón, 1990).

A serotonina é o ligante de uma das mais complexas famílias de receptores de neurotransmissores, com 7 famílias de receptores com um total de 14 subtipos. Seus receptores são encontrados tanto no sistema nervoso central (SNC), como também no sistema nervoso periférico (SNP). Esses receptores se encontram ligados à proteína G, com a exceção dos receptores da família 5-HT₃, que são acoplados a um canal iônico (Barnes, 1999).

A família dos receptores 5-HT₁ pode estar dividida em 5 subtipos (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} e 5-HT_{1F}) que atuam principalmente acoplados à proteína Gi/GO diminuindo a concentração de adenosina

monofosfato cíclica (AMPC). Os receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} e 5-HT_{1D} são considerados totalmente funcionais, sendo que o receptor 5-HT_{1A} é o mais extensivamente distribuído principalmente no SNC, mas também pode ser encontrado no sistema cardiovascular e ainda em outros lugares do corpo (Hannon, Hoyer, 2002). Kozhevnikova; Avdonin (2010) mostraram que a ativação de receptores 5HT_{1A} localizados nas células endoteliais pode causar vasodilatação, e que a ativação desses mesmos receptores localizados nas células musculares lisas pode causar vasoconstrição em aorta de ratos (Kozhevnikova; Avdonin, 2010). Nesta mesma família, os receptores 5-HT_{1B} estão associados à dilatação de vasos do cérebro, o que pode explicar, em parte, os efeitos analgésicos das drogas para o tratamento da migrânea como o sumatriptano, um agonista desses receptores. Ainda a ativação dos receptores 5-HT_{1D} desencadeia efeitos no SNC e está associada à constrição de vasos pulmonares (Berger, 2009; Pytliak, *et al.*, 2011).

A família de receptores 5-HT₂ tem três subtipos (5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} e 5-HT_{2C}) e estão preferencialmente ligados à proteína G com formação dos segundos mensageiros inositol trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) o que leva a um aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular (Hannon; Hoyer; Martir, 2002). O receptor 5-HT_{2A} é expresso em muitos tecidos periféricos e centrais. Além de mediar muitos efeitos no SNC, pode causar contração de músculo liso e ainda agregação plaquetária (Villalón; Cinturión, 2007). Na mesma família, o receptor 5-HT_{2B} pode atuar no SNC e também no SNP como no sistema cardiovascular induzindo relaxamento dependente do endotélio e no trato gastrointestinal causando contração muscular longitudinal no intestino (Hannon; Hoyer, Martir, 2002, Pytliak *et al.*, 2011). Já devido à falta de ligantes seletivos para o receptor 5-HT_{2C} não se tem muito conhecimento de sua ação, porém como os outros representantes da sua família, também pode atuar no SNC, sistema vascular e ainda no trato gastrointestinal (Hannon; Hoyer; Martir, 2002).

Os receptores 5-HT₃ são constituídos por 5 subunidades organizadas formando um canal de Na⁺/K⁺ e a ligação do neurotransmissor no receptor abre o canal levando a uma resposta excitatória neuronal. Para conseguir o efeito, é necessária a ativação dos dois subtipos da sua combinação heteromérica 5-HT_{3A} e 5-HT_{3B}. Esses receptores são encontrados no SNC e SNP. No sistema cardiovascular, estudos mostram que pode estar envolvido na indução da bradicardia vagal e hipotensão (Ramage; Villalón, 2008).

Sete variantes do receptor 5-HT₄ foram identificadas. No entanto, todas as variantes têm semelhante efeito farmacológico e estão

acopladas à proteína Gs aumentando a concentração de AMPc. Alguns agonistas desse receptor exibem efeitos bastante silenciosos ou antagonísticos, dependendo do nível de ativação da ligação. No sistema cardiovascular, pode modular a corrente de cálcio cardíaca causando taquicardia e vasodilatação (Villalón e Cinturión, 2007).

A família dos receptores 5-HT₅ possui dois subtipos de receptores (5-HT_{5A}, 5-HT_{5B}) que são acoplados à proteína Gi/GO e com isso diminuem a concentração de AMPc. Os efeitos farmacológicos desses receptores são em sua maioria desconhecidos. Há relatos de que podem inibir a ativação simpática cardíaca (Ramage; Villalón, 2008).

O receptor 5-HT₆ atua acoplado à proteína Gs aumentando a concentração intracelular de AMPc. Há ativação desses receptores no SNC, porém a sua função farmacológica ainda não está esclarecida. Não existem relatos de que sua ativação desencadeia efeitos no sistema cardiovascular (Pytliak *et al.*, 2011).

Os receptores 5-HT₇ são acoplados à proteína Gs aumentando a concentração de AMPc. Esse receptor é expresso abundantemente no sistema vascular e é responsável pelo relaxamento do músculo liso (Pytliak *et al.*, 2011).

A serotonina é armazenada principalmente em grânulos de plaquetas. Por isso, danos a uma área de tecido que provoque a agregação plaquetária resulta na secreção de serotonina. Na sepse, o LPS pode liberar a serotonina das plaquetas que é determinante para a agregação plaquetária e que contribui para a falha microvascular (Timmons *et al.*, 1986, Levi, 2005,). Não se sabe muito sobre a ação da serotonina na sepse. No entanto, um estudo realizado por Duerschmied *et al.* (2013) verificou que os animais que não produzem serotonina têm uma sobrevivência maior no choque séptico induzido por LPS, sugerindo, portanto, que a serotonina diminui a sobrevivência de animais sépticos (Duerschmied *et al.*, 2013). Além desse achado, sabe-se que a serotonina pode diminuir a pressão arterial média se administrada de forma crônica (Diaz *et al.*, 2008). Portanto, o presente trabalho procura testar a hipótese de que a liberação de serotonina no choque séptico causada provavelmente durante a agregação de plaquetas contribui para a hipotensão e para a hiporresponsividade vascular observadas na sepse.

2. Objetivo

2.1 Objetivo geral

Avaliar a participação da serotonina no modelo experimental de sepse induzido por endotoxemia

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a participação da serotonina na hiporreatividade vascular em aorta de ratos tratadas com LPS *in vitro* na presença de antagonistas de diferentes receptores da serotonina.
- Avaliar a participação da serotonina na hipotensão e na hiporreatividade vascular em ratos tratados com LPS *in vivo* através da administração do antagonista de receptor da serotonina selecionado no objetivo anterior.
- Avaliar o efeito da administração *in vivo* da serotonina e de seu antagonista no hemograma e dosagem de NO de ratos endotoxêmicos.

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Para a realização deste trabalho foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos pesando entre 260 e 320 g fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia onde eram acondicionados em gaiolas com livre acesso à ração e água e com controle de luminosidade, ciclo claro e escuro (12/12 h) como também controle de temperatura do ambiente ($22 \pm 2^\circ \text{C}$). Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais neste projeto foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de Animais da UFSC (CEUA, processo n° PP00706).

3.2 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 2 grandes grupos:

- Grupo I- Animais naive (sem tratamento). Desses animais, apenas a aorta foi removida após a eutanásia.
- Grupo II- Animais tratados *in vivo* com LPS ou salina após pré-tratamento com veículo, serotonina ou ketanserina. Após eutanásia, a aorta foi removida e o sangue foi coletado. E em alguns grupos foi avaliado a pressão arterial.

3.2.1 Tratamento *in vivo*

Os animais do grupo II foram divididos em 3 sub-grupos antes da administração de LPS conforme o pré-tratamento recebido, sendo eles:

- Veículo (1 mL/ Kg; i.p.);
- Serotonina (2 mg/Kg; i.p.);
- Ketanserina (5 mg/kg; i.p.).

Após 5 minutos destes pré-tratamentos, os animais foram tratados com LPS (10 mg/mL; i.p.) ou solução salina (1 mL/ Kg; i.p.). A aorta e o sangue destes animais foram coletados 6 e 24 horas após os tratamentos com LPS ou salina.

A ketanserina foi escolhida entre outros antagonistas de receptores serotoninérgicos após a análise dos resultados obtidos nos

experimentos realizados em anéis de aorta de animais naive tratadas com LPS *in vitro* conforme descrição posterior.

3.3 Procedimentos experimentais.

3.3.1 Medidas de tensão isométrica.

3.3.1.1 Coleta e preparação de aorta em banho de órgão isolado.

Os animais dos grupos I (não-tratados) e os animais do grupo II (6 ou 24 horas após tratamento com LPS ou salina) foram anestesiados com uma solução de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20mg/kg) por via intraperitoneal e em seguida foram eutanasiados por pneumotórax. A aorta foi removida e colocada em um recipiente com solução salina fisiológica (SSF) de composição descrita no **QUADRO 2** para retirada de tecidos adjacentes e para ser cortada em anéis de aproximadamente 3 a 4 mm de comprimento. Sangue foi coletado dos animais do grupo II.

QUADRO 2. Composição da solução salina fisiológica (SSF)

Substância	Concentração (mM)
NaCl	131,3
KCl	4,7
KH ₂ PO ₄	1,18
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,17
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1,6
Dextrose	5,6
NaHCO ₃	14,9
EDTA	0,08

Os anéis de aorta dos animais dos Grupos I e II foram então montados em banho de órgão isolado de aproximadamente 2 mL contendo SSF aerado com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂) e mantidos a temperatura de 37° C. Os anéis foram presos em hastes metálicas, ligadas a um transdutor de tensão isométrica, sendo que este transdutor emite sinais a um sistema de aquisição de dados permitindo registrar as variações de tensão exercidas pelo vaso durante o experimento. Foi aplicada uma tensão inicial ao tecido de 1 g e após 15 minutos a tensão foi aumentada para 3 g por mais 45 minutos. Durante

este tempo, a SSF foi substituída a cada 15 minutos. A viabilidade do tecido foi feita analisando a contração máxima induzida por despolarização de membrana com solução de cloreto de potássio (KCl) 120 mM durante 10 minutos. Em seguida, as preparações foram lavadas até o retorno à linha basal e estabilizadas por mais 30 minutos. A presença de endotélio funcional foi avaliada pela capacidade da acetilcolina (1 μ M) de induzir relaxamento de no mínimo 70 % na contração induzida por fenilefrina (1 μ M). Após a verificação da integridade do endotélio vascular, as preparações foram lavadas novamente e estabilizadas por mais 30 minutos para a realização dos protocolos experimentais.

3.3.1.2 Avaliação da reatividade vascular de ratos do Grupo I

Após os procedimentos descritos no item anterior, os anéis de aorta foram incubados por 12 horas na presença de LPS (10 μ g/mL). Como controle, alguns anéis foram incubados sem LPS por 12 horas na presença e na ausência de dexametasona (1 μ M). A dexametasona foi utilizada para preservar da função contrátil do vaso durante o tempo de incubação. Esse modelo de protocolo de incubação com LPS *in vitro* pode ser usado com a finalidade de reproduzir a indução da produção de NO e a hiporreatividade vascular característica do choque séptico (Da Silva-Santos *et al.*, 2002, Miyamoto *et al.*, 2005). Para verificar se a serotonina estaria envolvida na hiporresponsividade vascular no choque endotoxêmico, juntamente com a incubação com LPS os anéis de aorta foram também incubados com antagonistas dos receptores da serotonina em duas concentrações distintas conforme mostramos no **QUADRO 3**. Cada preparação recebeu apenas um dos antagonistas de receptores da serotonina listado em uma das concentrações utilizadas. Como controle, anéis de aorta passaram por procedimentos semelhantes com exceção da adição de LPS e dos antagonistas. Após esse período de incubação, uma curva concentração resposta cumulativa (CCRC) induzida por noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) foi construída e a força de contração do tecido em g de tensão a cada concentração administrada com intervalos de 3 minutos entre elas foi registrada. Essas concentrações de antagonistas foram obtidas com base em suas constantes de afinidade pelos receptores de interesse obtida pela PDSP Ki Database.

QUADRO 3. Antagonistas de receptores da serotonina utilizados nos protocolos de avaliação da reatividade vascular de aorta de ratos do Grupo I.

Fármacos	Concentração	Receptores em que atuam de acordo com o fabricante
Ketanserina	30 nM 100 nM	Antagonista 5-HT _{2A}
LY 266097	10 nM 30 nM	Antagonista 5-HT _{2B}
Way 100135	30 nM 100 nM	Potente e seletivo antagonista 5-HT _{1A}
GR 127935	3 nM 10 nM	Potente e seletivo antagonista 5-HT _{1B} e 5-HT _{1D} .
Zacopride	10 nM 30 nM	Potente antagonista 5-HT ₃
SB 269970	10 nM 30 nM	Potente e seletivo antagonista 5-HT ₇

3.3.1.3 Avaliação da reatividade vascular de ratos do Grupo II

Após realização dos procedimentos descritos nos itens 3.2.1 (Tratamento *in vivo*) e 3.3.1.1 (Coleta e preparação de aorta em banho de órgão isolado) foram feitas CCRC induzidas por noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) ou serotonina (10^{-9} M a 3×10^{-4} M) com um intervalo de 3 minutos entre cada concentração e foi registrada a força de contração do tecido em g a cada concentração administrada.

3.3.2 Coleta de amostras de sangue

Os animais do Grupo II que receberam uma injeção com solução de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (20mg/kg) por via intraperitoneal, para retirada da aorta também tiveram sangue coletado (1 mL aproximadamente) por punção cardíaca em tubo contendo 40 µL de EDTA 5 % após a completa anestesia e abertura da cavidade torácica.

3.3.2.1 Hemograma

Após a coleta do sangue foi feita a contagem de plaquetas e diferencial das células com o contador hematológico automatizado Horiba Abx Micros 60, Shandong, China.

3.3.2.2 Dosagens de NOx

Após a realização do hemograma as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 4.000 RPM para separação do plasma. O plasma foi coletado e armazenado a temperatura de -80 °C até o momento da análise. A determinação dos níveis de NO plasmático foi feita pelo método de Griess, como previamente descrito em Bryan e Grisham (2007). Por este método, níveis de NO foram quantificados mensurando-se a soma das concentrações de nitrato + nitrito (NOx), que são metabolitos do NO. Inicialmente as amostras plasmáticas foram diluídas e desproteinizadas com sulfato de zinco (1:10). Após a desproteíntização, as amostras foram incubadas a temperatura de 0 °C por 1 hora e centrifugadas a 10.000 RPM a 4° C por 15 minutos. As curvas padrão de nitrito e nitrato foram preparadas (0 a 150 µM) em duplicata e condicionadas juntamente com 200 µL de cada amostra em placas de 96 poços. Essas placas foram previamente incubadas com *Escherichia coli* a 37 °C por 3 horas para a conversão de nitrato a nitrito e ao final da conversão as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 10 minutos. Em outra placa de 96 poços, 100 µl do reagente de Griess foi adicionado a mesmo volume do sobrenadante obtido formando uma reação que produz coloração visível que pode ser mensurada a 543 nm em Multileitora Infinite M200 depois de 10 min.

3.3.3 Avaliação da Pressão Arterial

Para a avaliação da pressão arterial os animais do Grupo II foram anestesiados com cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg) administrados por via intraperitoneal (i.p) 6 ou 24 horas após tratamento com LPS ou salina e receberam doses suplementares a cada 40 minutos com cetamina (30 mg/Kg) e xilazina (7 mg/Kg) quando necessário (i.m). A veia jugular foi isolada e foi inserida uma agulha com polietileno conectado em uma seringa de 1 mL. Este acesso foi obtido para a administração de drogas e para administração inicial de 6 UI de heparina em 300 µL de salina, para evitar a formação de coágulos nas agulhas. Em seguida, a artéria carótida foi isolada e o seu fluxo sanguíneo na parte posterior foi totalmente interrompido por um cordão que foi amarrado à artéria enquanto que o fluxo sanguíneo na parte inferior foi temporariamente interrompido com uma pinça. No meio da artéria foi feito um corte onde um cateter de polietileno heparinizado foi inserido e depois amarrado junto com a carótida. Em seguida, a pinça foi retirada para voltar o fluxo de sangue através do cateter. O cateter foi então

conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema de aquisição de dados Power Lab no qual os valores de pressão arterial média (PAM), sistólica e diastólica (em mm Hg) e da frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm), foram mensurados e registrados através do software LabChart versão 7.2. Após 20 minutos de estabilização foi feita uma curva dose resposta induzida por noradrenalina nas doses de 1, 3 e 10 nmol/Kg.

3.4 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) de n experimentos. E os gráficos e análises estatísticas foram realizados com o programa GraphPad Prim® versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

A análise estatística dos resultados foi realizada por meio do teste de análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, complementados com o pós-teste de Bonferroni e também pelo teste t de Student para amostras pareadas. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3.5 Compostos e reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas neste trabalho: cetamina e xilazina (Ceva, São Paulo, Brasil); LY 266097, WAY 100135, GR 127935, zacopride, SB 269970 (ToCris Bioscience, United Kingdom); LPS de *Escherichia coli* sorotipo tipo 1 O111:B4, acetilcolina, fenilefrina, noradrenalina ketanserina, dexametasona, Na₂EDTA₂H₂O, NaCl, KCl, CaCl₂, MgSO₄7H₂O, KH₂PO₄, NaHCO₃, dextrose anidra e dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, EUA); Heparina sódica 5000 UI/mL (Hemofol).

Os sais utilizados para a preparação da SSF e a maioria das drogas foram diluídas em água destilada, com exceção da LY 266097 e ketanserina que foram diluídas em dimetil sulfóxido (DMSO; solução final 15%).

4. Resultados

4.1 Medidas de tensão isométrica em aorta de ratos

4.1.1 Reatividade vascular de anéis de aorta incubados com LPS *in vitro*.

Para verificar a hiporreatividade vascular observada na sepse, avaliamos primeiramente a hiporreatividade vascular em anéis de aorta incubados por 12 horas com LPS *in vitro*. O objetivo da realização deste protocolo experimental foi de verificar a hiporreatividade vascular frente à exposição de LPS *in vitro* para que pudéssemos depois avaliar essa resposta contrátil na presença de diferentes antagonistas de receptores da serotonina. Os anéis de aorta que foram mantidos por 12 horas em câmara para órgão isolado na presença ou ausência de dexametasona produziram contração dependente da concentração de noradrenalina (FIGURA 1) que foi administrada em doses cumulativas. A contração induzida por noradrenalina foi maior na presença de dexametasona por que a dexametasona é capaz de preservar a função contrátil do vaso mesmo após 12 horas de incubação. Na presença de LPS, a noradrenalina induziu contração dependente da concentração, porém significativamente reduzida quando comparada às contrações obtidas nos anéis de aorta que não foram expostos ao LPS.

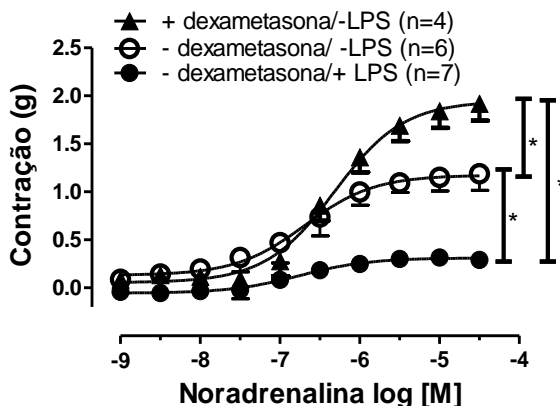


FIGURA 1. Resposta contrátil induzida por noradrenalina em anéis de aorta incubados na ausência e na presença de LPS *in vitro* por 12 horas. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado com solução salina fisiológica para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) foram adicionadas às preparações na presença de LPS (●) e nas preparações sem LPS e sem dexametasona (○), e sem LPS mas com dexametasona (▲) e as respostas obtidas foram registradas. Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. -dexametasona/+LPS ou -dexametasona/-LPS (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

4.1.1.1 Efeito de antagonistas de receptores da serotonina na hiporreatividade vascular de aorta de ratos induzida por incubação com LPS *in vitro*.

Neste item serão mostrados nas figuras de 2 a 7 os resultados obtidos nos anéis de aorta de ratos do Grupo I (não-tratados) que foram incubados por 12 horas com LPS na ausência e na presença de antagonistas de receptores da serotonina antes do início da CCRC induzida por noradrenalina. Os resultados obtidos na ausência dos antagonistas (0 nM) é o que foi apresentado anteriormente na FIGURA 1A como -dexametasona/+LPS e que será repetido nas figuras de 2 a 7 para efeitos de comparação.

Na presença de LPS, a incubação de anéis de aorta com SB 269970 (FIGURA 2), antagonista do receptor 5-HT₇ nas concentrações de 10 e 30 nM causou um aumento na contração induzida por noradrenalina quando comparada à contração obtida na ausência do antagonista. A menor concentração de SB 269970 foi mais eficaz em

aumentar a contração induzida por noradrenalina do que em sua maior concentração como podemos observar pelo efeito contrátil máximo induzido pela noradrenalina (TABELA 1).

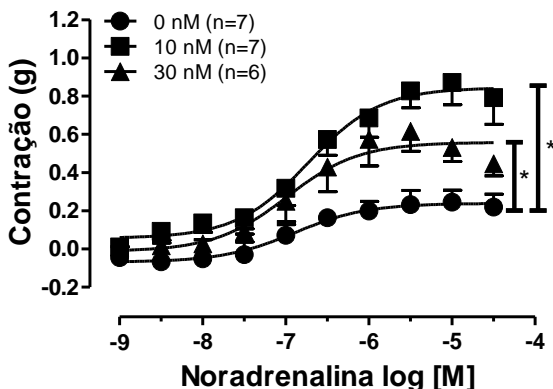


FIGURA 2. Efeito do SB 269970 na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubada com LPS *in vitro* por 12 horas. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica e as respostas obtidas foram registradas. Concentrações crescentes de noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) foram adicionadas em preparações previamente incubadas por 12 horas com LPS na ausência (0 nM; ●) e na presença de SB 269970, antagonista de receptores 5-HT₇, nas concentrações de 10 nM (■) e de 30 nM (▲). Os pontos representam a média ± EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. 0 nM (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

TABELA 1. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de SB 269970.

CM ± EPM SB 269970 (0 nM)	CM ± EPM SB 269970 (10 nM)	CM ± EPM SB 269970 (30 nM)
0.372 ± 0.054 (7)	0.918 ± 0.112 (7) *	0.644 ± 0.119 (6)

CM: contração máxima. * $p < 0,05$ vs. SB 269970 (0 nM) (teste t de Student) (n).

Na FIGURA 3 podemos observar que o zacopride, antagonista de receptor 5-HT₃, causou um aumento na resposta contrátil induzida por noradrenalina na concentração de 10 nM, mas não na concentração de 30 nM quando comparada com a resposta na ausência do antagonista de serotonina. Este aumento na contração também pode ser visualizado pelos valores de efeito máximo na TABELA 2.

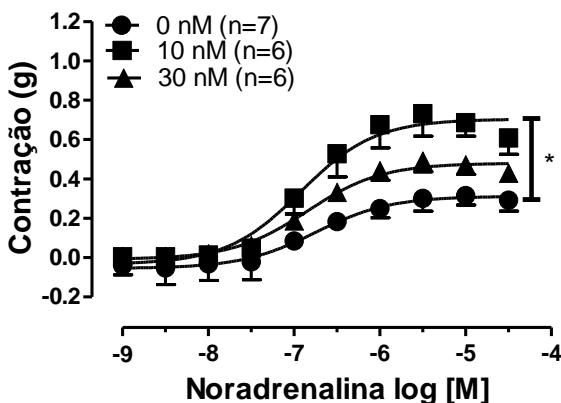


FIGURA 3. Efeito do zacopride na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubada com LPS *in vitro* por 12 horas. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica e as respostas obtidas foram registradas. Concentrações crescentes de noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) foram adicionadas em preparações previamente incubadas por 12 horas com LPS na ausência (0 nM; ●) e na presença de zacopride, antagonista de receptores 5-HT₃, nas concentrações de 10 nM (■) e de 30 nM (▲). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. 0 nM (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

TABELA 2. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de zacopride.

CM \pm EPM Zacopride (0 nM)	CM \pm EPM Zacopride (10 nM)	CM \pm EPM Zacopride (30 nM)
0.372 \pm 0.054 (7)	0.786 \pm 0.078 (6) *	0.499 \pm 0.054 (6)

CM: contração máxima. * $p < 0,05$ vs. 0 nM (teste t de Student) (n).

A incubação com o antagonista de receptores 5-HT_{1A}, WAY 100135, aumentou a resposta contrátil (FIGURA 4) e a contração máxima (TABELA 3) induzida por noradrenalina nas duas concentrações utilizadas quando comparada com a resposta obtida na ausência do antagonista de serotonina.

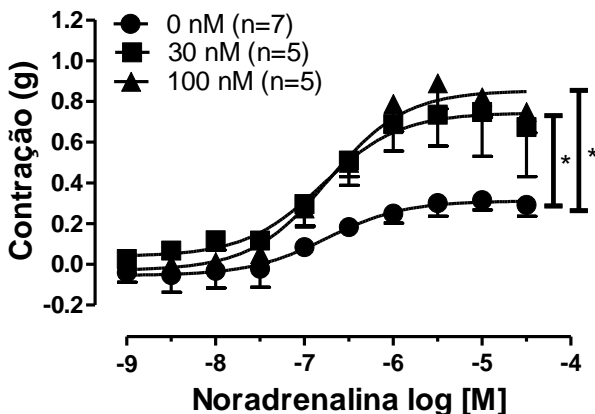


FIGURA 4. Efeito do WAY 100135 na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubados com LPS *in vitro* por 12 horas. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica e as respostas obtidas foram registradas. Concentrações crescentes de noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) foram adicionadas em preparações previamente incubadas por 12 horas com LPS na ausência (0 nM; ●) e na presença de WAY 100135, antagonista de receptores 5-HT_{1A}, nas concentrações de 30 nM (■) e de 100 nM (▲). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. 0 nM (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

TABELA 3. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de WAY 100135.

CM \pm EPM WAY100135 (0 nM)	CM \pm EPM WAY100135 (30 nM)	CM \pm EPM WAY100135 (100 nM)
0.372 \pm 0.054 (7)	0.859 \pm 0.182 N=5 *	0.894 \pm 0.125 N=5 *

CM: contração máxima. * $p < 0,05$ (teste t de Student) (n).

A incubação com GR 127935, antagonista de receptores 5-HT_{1B/1D}, aumentou a resposta contrátil (FIGURA 5) e a contração máxima (TABELA 4) induzidas pela noradrenalina em ambas as concentrações.

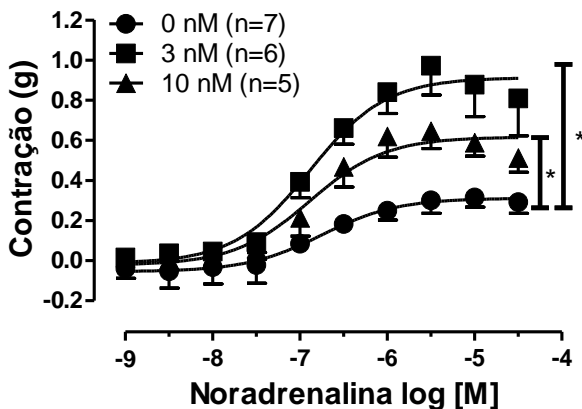


FIGURA 5. Efeito do GR 127935 na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubados com LPS *in vitro* por 12 horas. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica e as respostas obtidas foram registradas. Concentrações crescentes de noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) foram adicionadas em preparações previamente incubadas por 12 horas com LPS na ausência (0 nM; ●) e na presença de GR 127935, antagonista de receptores 5-HT_{1B/1D} nas concentrações de 3 nM (■) e de 10 nM (▲). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. 0 nM (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

TABELA 4. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de GR 127935.

CM \pm EPM GR 127935 (0 nM)	CM \pm EPM GR 127935 (3 nM)	CM \pm EPM GR 127935 (10 nM)
0.372 \pm 0.054 (7)	1.004 \pm 0.153 N=6 *	0.648 \pm 0.092 N=5 *

CM: contração máxima. * $p < 0,05$ vs. 0 nM (teste t de Student) (n).

A incubação com o antagonista de receptores 5-HT_{2B}, LY 266097, promoveu um aumento na CCRC induzida por noradrenalina, sendo este aumento mais pronunciado na concentração de 30 nM (FIGURA 6) e também na contração máxima (TABELA 5).

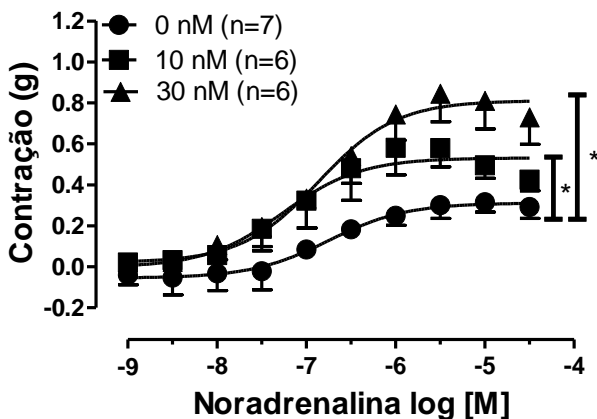


FIGURA 6. Efeito do LY 266097 na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubados com LPS *in vitro* por 12 horas. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica e as respostas obtidas foram registradas. Concentrações crescentes de noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) foram adicionadas em preparações previamente incubadas por 12 horas com LPS na ausência (0 nM; ●) e na presença de LY 266097, antagonista de receptores 5-HT_{2B} nas concentrações de 10 nM (■) e de 30 nM (▲). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. 0 nM (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

TABELA 5. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida pela noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de LY 266097.

CM \pm EPM LY 266097 (0 nM)	CM \pm EPM LY 266097 (10 nM)	CM \pm EPM LY 266097 (30 nM)
0.372 \pm 0.054 (7)	0.656 \pm 0.104 (6) *	0.845 \pm 0.138 (6) *

CM: contração máxima. * $p < 0,05$ (teste t de Student) (n).

Na presença de LPS, a incubação de anéis de aorta com ketanserina (FIGURA 7), antagonista do receptor 5-HT_{2A} nas concentrações de 30 e 100 nM causou um aumento na resposta contrátil induzida por noradrenalina quando comparada à contração obtida na ausência do antagonista. A contração máxima induzida por noradrenalina foi significativamente maior na presença de 100 nM de ketanserina, (TABELA 6).

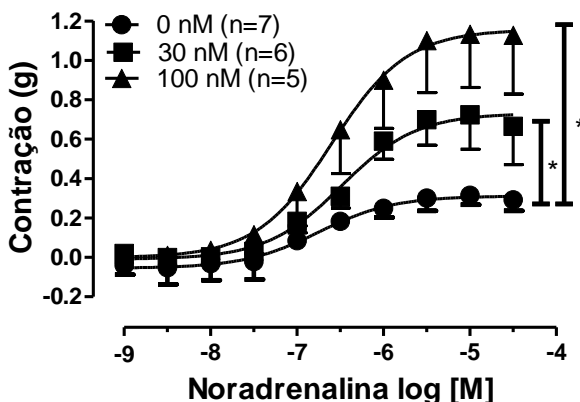


FIGURA 7. Efeito do ketanserina na resposta contrátil induzida por noradrenalina em aorta de ratos incubados com LPS *in vitro* por 12 horas. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica e as respostas obtidas foram registradas. Concentrações crescentes de noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) foram adicionadas em preparações previamente incubadas por 12 horas com LPS na ausência (0 nM; ●) e na presença de ketanserina, nas concentrações de 30 nM (■) e de 100 nM (▲). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. 0 nM (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de BONFERRONI).

TABELA 6. Valores de contração máxima obtidos na CCRC induzida por noradrenalina após a incubação por 12 horas com LPS na ausência e na presença de ketanserina.

CM \pm EPM Ketanserina (0 nM)	CM \pm EPM Ketanserina (30 nM)	CM \pm EPM Ketanserina (100 nM)
0.372 \pm 0.0542 (7)	0.776 \pm 0.159 (6)	1.193 \pm 0.277(5) *

CM: contração máxima. * $p < 0,05$ (teste t de Student) (n).

4.2 Reatividade vascular em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos.

4.2.1 Reatividade vascular em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos pré-tratados com veículo.

A reatividade vascular frente a estimulação com agentes contráteis foi investigada em anéis de aorta de ratos do Grupo II, ou seja, naqueles animais que receberam pré-tratamento com veículo e 5 minutos depois receberam o tratamento com LPS ou salina. A curva concentração resposta cumulativa (CCRC) induzida por noradrenalina foi significativamente reduzida nas preparações obtidas dos animais em 6 (FIGURA 8A) e 24 horas (FIGURA 8B) depois de receberem a injeção com LPS em comparação aos animais que receberam injeção com salina pelo mesmo tempo. A CCRC induzida por serotonina foi significativamente menor nas preparações dos animais que receberam 6 horas (FIGURA 8C) antes o LPS do que nos animais que receberam 6 horas antes salina. No entanto, a contração induzida por serotonina não foi reduzida nos animais que receberam LPS 24 horas (FIGURA 8D) antes dos procedimentos.

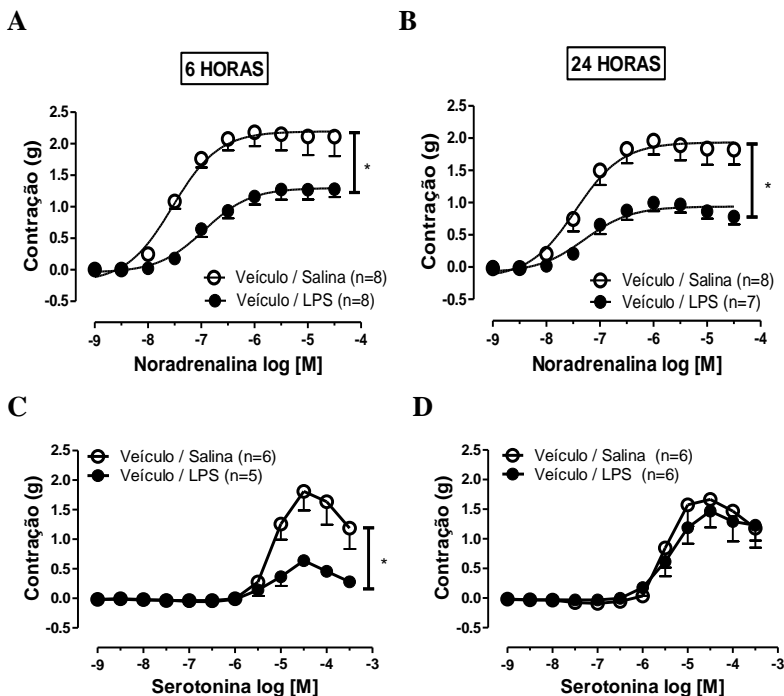


FIGURA 8. Resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta de ratos que receberam LPS ou salina *in vivo* após pré-tratamento com veículo. A reatividade vascular foi observada 6 (A,C) e 24 horas (B,D) depois dos animais receberem salina (1 ml/Kg; ○) ou LPS (10 mg/Kg; ●) depois de 5 minutos do pré-tratamento com veículo (1 ml/Kg). Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado com solução salina fisiológica para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) no gráfico A,B e serotonina (10^{-9} M a 3×10^{-4} M) no gráfico C,D foram adicionadas às preparações. Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. veículo/salina (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

4.2.2 Reatividade vascular em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos pré-tratados com ketanserina.

A ketanserina foi um dos antagonistas de receptores serotoninérgicos que se mostrou eficaz em aumentar a contração induzida por noradrenalina em anéis de aortas incubados com LPS *in vitro*. Com base na literatura de que o sarpogrelato, um antagonista de receptores 5-HT_{2A} assim como a ketanserina se mostrou eficaz em diminuir a

produção de citocinas e a mortalidade na sepse (Nishiyama, 2009), a ketanserina foi o antagonista de escolha para o nosso estudo *in vivo*. Foi feito um pré-tratamento *in vivo* com ketanserina 5 minutos antes dos animais receberem salina ou o LPS para induzir a toxemia e verificar se o pré-tratamento com ketanserina poderia aumentar a contração induzida por noradrenalina e serotonina em anéis de aorta.

O pré-tratamento com ketanserina não alterou a resposta contrátil induzida por noradrenalina (FIGURA 9A) e por serotonina (FIGURA 9B) em animais que receberam salina 6 horas antes dos procedimentos quando comparamos com as respostas obtidas em animais pré-tratados com veículo que também receberam salina.

Ainda, os animais que receberam 6 horas antes dos procedimentos LPS e pré-tratamento com ketanserina também não tiveram alteração na reatividade vascular à noradrenalina (FIGURA 9A) e à serotonina (FIGURA 9B) quando comparado aos animais que receberam LPS e foram pré-tratados com veículo.

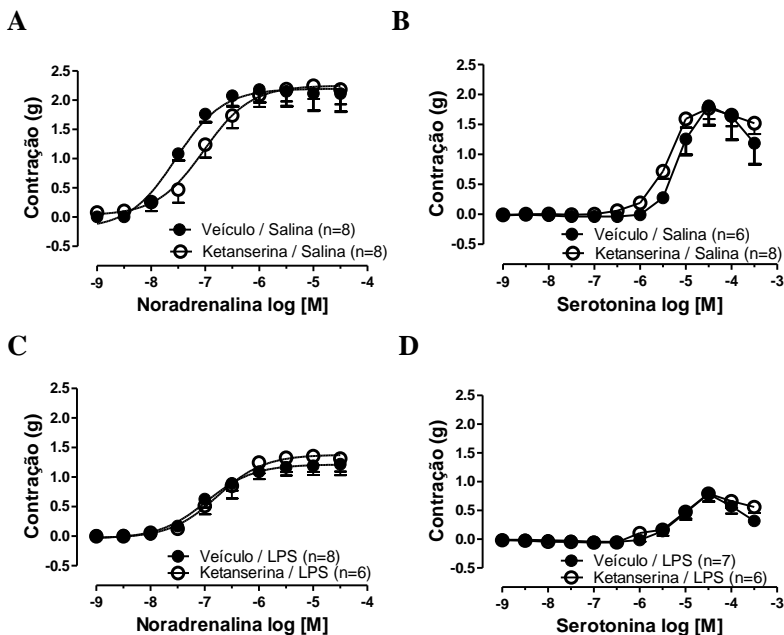


FIGURA 9. Efeito do pré-tratamento com ketanserina em animais que receberam LPS 6 horas antes da avaliação da resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de (A) noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) ou (B) serotonina (10^{-9} M a 3×10^{-4} M) foram adicionadas em anéis de aorta de ratos tratados com LPS depois do pré-tratamento com ketanserina (○) ou veículo (●). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos.

Em 24 horas após a exposição ao LPS os animais que tiveram pré-tratamento com ketanserina obtiveram uma resposta contrátil induzida por noradrenalina em anéis de aorta maior do que na dos animais expostos ao LPS que receberam pré-tratamento apenas com veículo (FIGURA 10A). Já o pré-tratamento com ketanserina em animais endotoxêmicos não aumentou a contração induzida por serotonina (FIGURA 10B).

Os animais não-endotoxêmicos, ou seja, que receberam salina no lugar de LPS 24 horas antes da avaliação da reatividade vascular, o pré-tratamento com ketanserina não alterou a contração induzida por

noradrenalina (FIGURA 10C), mas aumentou a contração induzida por serotonina (FIGURA 10D).

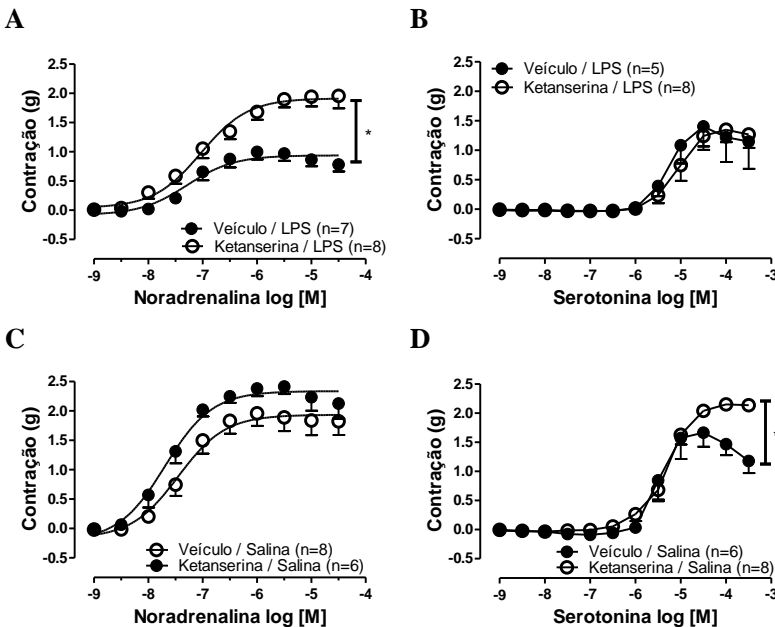


FIGURA 10. Efeito do pré-tratamento com ketanserina em animais tratados com LPS ou salina por 24 horas na resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de (A,C) noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) ou (B,D) serotonina (10^{-9} M a 3×10^{-4} M) foram adicionadas em anéis de aorta de ratos tratados com LPS (A,B) ou salina (C,D) depois do pré-tratamento com ketanserina (○) ou veículo (●). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. Pré-tratamento com veículo dentro do mesmo tratamento (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

4.2.3 Reatividade vascular em anéis de aorta de ratos endotoxêmicos pré-tratados com serotonina.

O pré-tratamento com serotonina em animais que receberam LPS 6 horas antes dos procedimentos para medidas da tensão isométrica não causou diferença nas CCRC induzidas por noradrenalina (FIGURA

11A) nem por serotonina (FIGURA 11B) quando comparadas com as CCRC dos animais que receberam pré-tratamento com veículo.

Em aorta de animais, que foram tratados com salina 6 horas antes dos procedimentos experimentais, tendo como pré-tratamento a serotonina observamos diminuição na CCRC induzida por noradrenalina (FIGURA 11C), mas não observamos diferença na CCRC induzida por serotonina (FIGURA 11D).

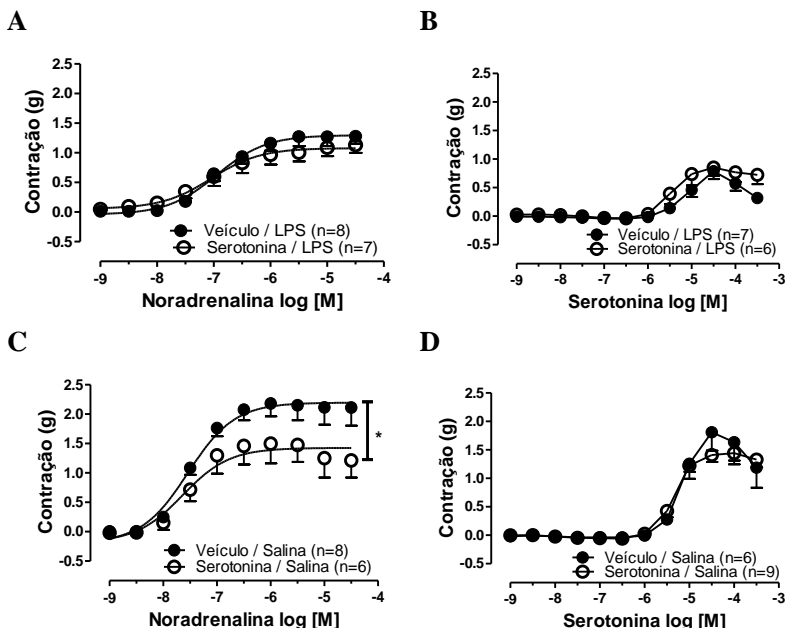


FIGURA 11. Efeito do pré-tratamento com serotonina em animais tratados com LPS ou salina por 6 horas na resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de (A,C) noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) ou (B,D) serotonina (10^{-9} M a 3×10^{-4} M) foram adicionadas em anéis de aorta de ratos tratados com LPS (A,B) ou salina (C,D) depois do pré-tratamento com serotonina (○) ou veículo (●). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos. * indica $p < 0,05$ vs. Pré-tratamento com veículo dentro do mesmo tratamento (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

O pré-tratamento com serotonina não alterou as CCRC induzidas por noradrenalina (FIGURA 12 A,C) e por serotonina (FIGURA 12

B,D) em aorta dos animais que receberam LPS (FIGURA 12 A,B) ou salina (FIGURA 12 C,D) 24 horas antes dos procedimentos quando comparado aos animais pré-tratados com veículo.

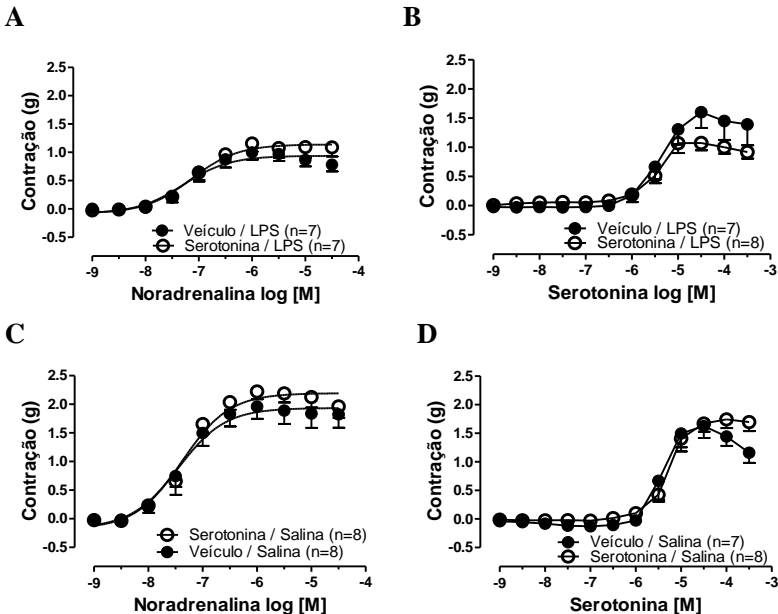


FIGURA 12. Efeito do pré-tratamento com serotonina em animais tratados com LPS ou salina por 24 horas na resposta contrátil induzida por noradrenalina e serotonina em aorta. Anéis de aorta foram montados em câmara para órgão isolado para medidas de tensão isométrica. Concentrações crescentes de (A,C) noradrenalina (10^{-9} M a 3×10^{-5} M) ou (B,D) serotonina (10^{-9} M a 3×10^{-4} M) foram adicionadas em anéis de aorta de ratos tratados com (A,B) ou salina (C,D) depois do pré-tratamento com serotonina (○) ou veículo (●). Os pontos representam a média \pm EPM da tensão mensurada em g de contração de (n) experimentos.

4.3 Avaliação de pressão arterial.

Como pode ser observado na FIGURA 13A, o tratamento com LPS diminuiu a pressão arterial média (PAM) de ratos 6 horas após a sua administração, sendo que a PAM dos animais tratados com LPS 6 horas antes das medidas pressóricas foi de $68,2 \pm 1,9$ mmHg e a dos animais que receberam salina pelo mesmo tempo foi de $83,8 \pm 2,8$ mmHg como observado na TABELA 7. Já FIGURA 13B, nós podemos

observar que não houve diferença na PAM entre os animais tratados 24 horas antes com LPS ou salina.

Avaliando o efeito da administração de doses crescentes de noradrenalina na PAM de ratos, não observamos diferença no aumento da PAM induzido por noradrenalina em animais tratados com LPS ou salina 6 horas antes dos procedimentos (FIGURA 13C). No entanto, na FIGURA 13D e na TABELA 8 pode ser visto que, nas duas maiores doses de noradrenalina utilizadas, ocorre uma diminuição na resposta pressórica induzido por noradrenalina em animais tratados 24 horas antes com LPS do que naqueles que receberam salina pelo mesmo tempo.

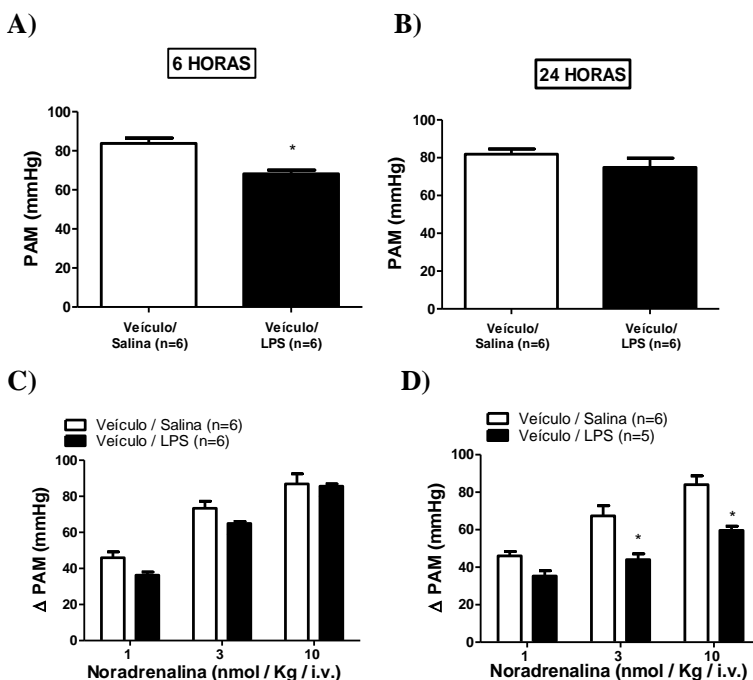


FIGURA 13. Pressão arterial média (PAM) de ratos 6 e 24 horas após o tratamento com salina ou LPS e seu aumento induzido por noradrenalina. PAM (A,B) e aumento da PAM (Δ PAM) induzido por noradrenalina (C,D) de animais que receberam LPS (10 mg/kg, i.p.) ou salina (1 ml/kg, i.p) em 6 (A,C) e 24 horas (B,D) antes dos procedimentos. Os resultados representam a média \pm EPM de n experimentos. * indica valor de $p < 0,05$ vs veículo / salina (teste t de Student) em PAM e ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni em Δ PAM.

TABELA 7. Pressão arterial média 6 e 24 horas após os tratamentos.

Tratamento	Salina 6 horas	LPS 6 horas	Salina 24 horas	LPS 24 horas
PAM	83,8 ± 2,8	68,2 ± 1,9 *	81,9 ± 3,0	74,9 ± 5,3

Valores da PAM em mm Hg, 6 ou 24 horas após a administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou salina (1 ml/kg, i.p.). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. * indica valor de ($p < 0,05$) vs salina 6 horas (teste t de Student).

TABELA 8. Efeito pressórico da noradrenalina 6 e 24 horas após os tratamentos.

NA [pmol/kg]	Salina 6 horas	LPS 6 horas	Salina 24 horas	LPS 24 horas
1	45,9 ± 3,2	36,2 ± 1,7	46,0 ± 2,4	35,3 ± 2,6
3	73,4 ± 3,9	64,9 ± 1,2	67,3 ± 5,4	46,5 ± 1,5*
10	86,8 ± 5,8	85,5 ± 1,3	84,0 ± 4,7	59,6 ± 2,1*

Valores do aumento da PAM (Δ PAM) em mm Hg induzidos pela administração endovenosa de noradrenalina (NA), 6 ou 24 horas após a administração de LPS (10 mg/kg, i.p.) ou salina (1 ml/kg, i.p.). Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. * indica valor de ($p < 0,05$) vs. salina 24 horas (ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni).

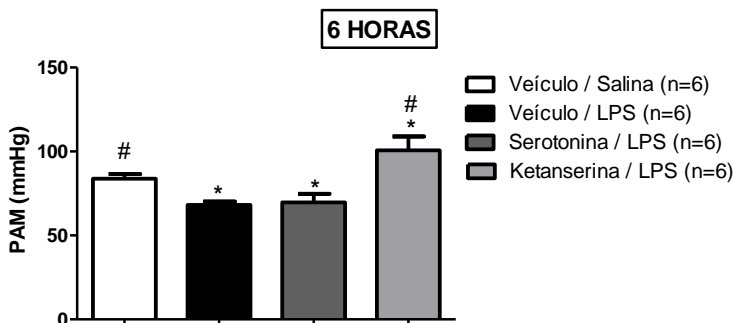
Para avaliar os efeitos dos pré-tratamentos com ketanserina ou serotonina na pressão arterial média (PAM) de ratos, foram feitas avaliações da PAM em 6 e 24 horas depois dos animais receberem LPS.

Como pode ser observado na FIGURA 14A os animais que receberam LPS 6 horas antes dos procedimentos (animais endotoxêmicos) e foram pré-tratados com veículo e serotonina tem uma PAM menor que dos animais que receberam salina (não-endotoxêmicos). No entanto nos animais que receberam LPS 24 horas antes (Animais endotoxêmicos) e foram pré-tratados com veículo e serotonina a PAM permanece semelhante ao dos animais que receberam salina (Animais não-endotoxêmicos) como podemos observar na FIGURA 14B.

O pré-tratamento com ketanserina nos animais endotoxêmicos em 6 (FIGURA 14A) e 24 horas (FIGURA 14B) aumentou a PAM quando comparado aos animais endotoxêmicos que receberam pré-tratamento com veículo, além disso os animais endotoxêmicos pré-tratados com ketanserina tiveram a PAM mais alta até que os animais não-

endotoxêmicos pré-tratado com veículo. No pré-tratamento com serotonina em animais que receberam LPS em 6 e 24 antes dos procedimentos não houve alteração na PAM quando comparado aos animais endotoxêmicos pré-tratados com veículo.

A



B

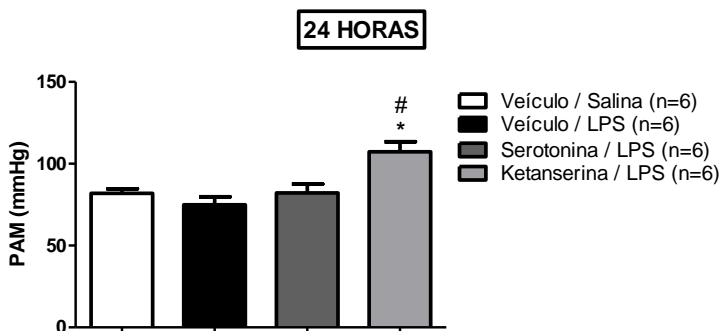
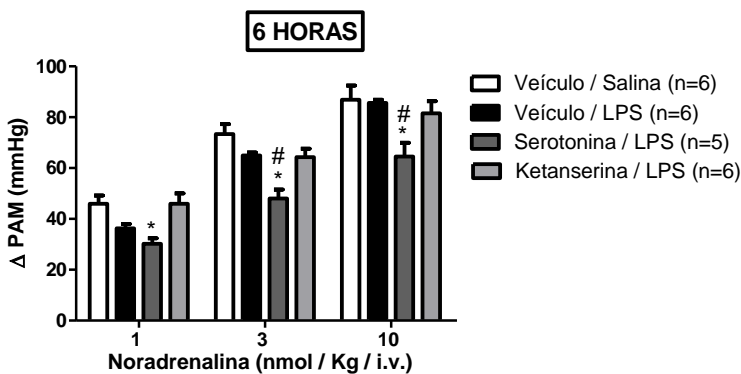


FIGURA 14. Efeito do pré-tratamento com ketanserina e serotonina na pressão arterial média (PAM) de ratos em 6 e 24 horas após o tratamento com LPS. Medidas da PAM em animais que receberam LPS (10 mg/kg, i.p.) depois do pré-tratamento com veículo (barra preta), serotonina (barra cinza escuro) e ketanserina (barra cinza claro) 6 (A) e 24 horas (B) antes dos procedimentos. Os resultados representam a média \pm EPM da PAM de n experimentos. * indica valor de $p < 0,05$ vs Veículo/Salina e # indica valor de $p < 0,05$ vs Veículo/LPS (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

Avaliamos o efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina nos efeitos pressóricos induzidos por noradrenalina nos animais tratados com LPS e comparamos com os efeitos induzidos pela noradrenalina na PAM de ratos tratados com LPS depois do pré-tratamento com veículo. Como pode ser observado na FIGURA 15A o pré-tratamento com ketanserina não aumentou a resposta pressórica induzida por noradrenalina em 6 e em 24 horas após a exposição ao LPS. Podemos também observar que o pré-tratamento com serotonina reduziu a resposta pressórica induzido por noradrenalina nas doses de 3 e 10 nM/Kg nos animais tratados com LPS em 6 horas após o tratamento, mas não em 24 horas após o tratamento.

A



B

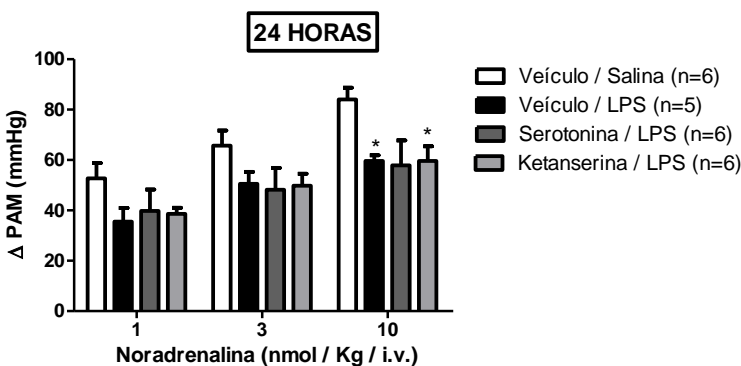


FIGURA 15. Efeito do pré-tratamento com ketanserina e serotonina na resposta pressórica induzida por noradrenalina em ratos endotoxêmicos. Aumento na PAM (Δ PAM) induzido por noradrenalina em animais pré-tratados com ketanserina (barra cinza-claro), serotonina (barra cinza escuro) e veículo (barra preta) seguido de tratamento com LPS (10 mg/kg, i.p.) 6 (A) e 24 horas (B) antes dos procedimentos. Os resultados representam a média \pm EPM do aumento (Δ) na PAM em mmHg de n experimentos. * indica valor de $p < 0,05$ vs veículo/salina e # indica valor de $p < 0,05$ vs veículo/LPS (ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Bonferroni).

4.4 Avaliação de hemograma.

Ao analisar o hemograma dos animais endotoxêmicos comparados com o dos animais que receberam salina, observamos uma diminuição significativa na contagem de plaquetas e de linfócitos em 6 (FIGURAS 16A, C, respectivamente) e 24 horas (FIGURAS 16B, D, respectivamente). Por outro lado, houve um aumento significativo na contagem de granulócitos dos animais tratados com LPS em 6 (FIGURA 16E) e 24 horas (FIGURA 16F) após o tratamento em comparação aos animais tratados com salina. No entanto, podemos observar que em 24 horas após o tratamento com LPS a contagem de plaquetas e linfócitos permanecem diminuídas enquanto que a contagem de granulócitos parece estar retornando a valores próximos da contagem dos animais tratados com salina.

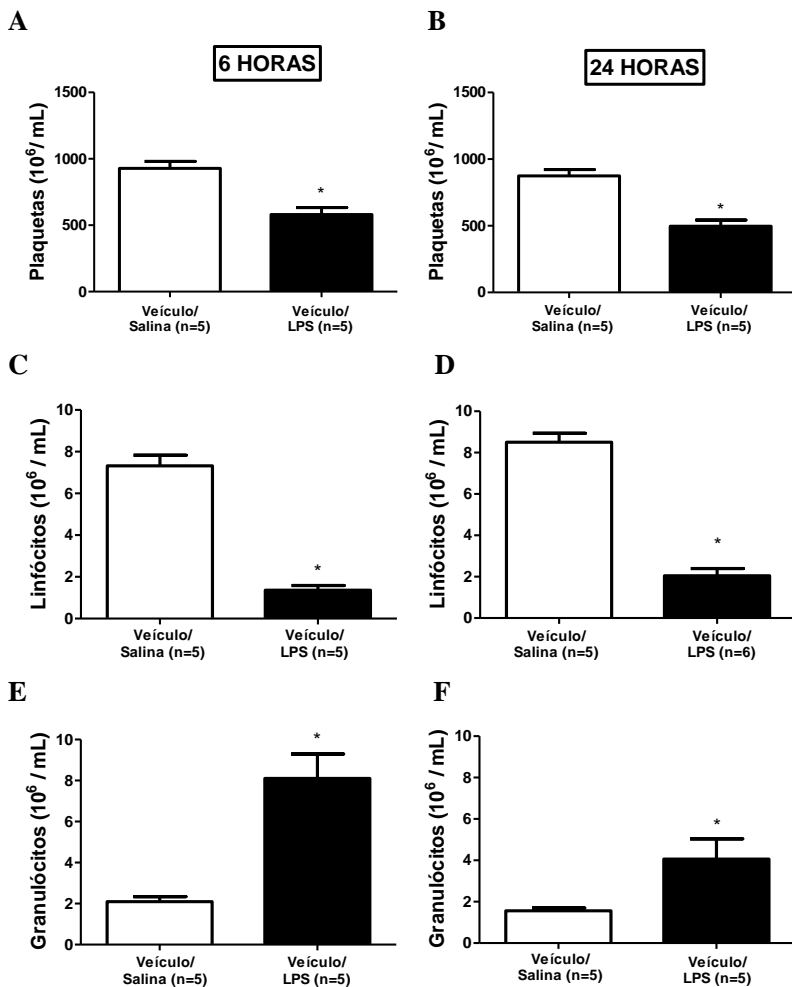


FIGURA 16. Hemograma de animais 6 e 24 horas após o tratamento com LPS e salina. A contagem de células foi realizada por método automatizado, onde foi avaliada a contagem de plaquetas (A,B), linfócitos (C,D) e granulócitos (E,F). Os animais receberam salina (Barra branca) ou LPS (Barra preta) após o tratamento com veículo e o hemograma foi realizado 6 (A,C,E) ou 24 horas (B,D,F) horas após o tratamento. Os resultados representam a média \pm EPM de n experimentos. * indica valor de $p < 0,05$ vs. Veículo / Salina (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni).

O pré-tratamento com ketanserina aumentou a contagem de plaquetas em 6 horas (FIGURA 17A) depois do tratamento com salina

quando comparado com animais tratados com salina e pré-tratados com veículo. No entanto, 24 horas (FIGURA 17B) após os animais receberem a salina, o pré-tratamento de ketanserina não alterou a contagem de plaquetas. Nos animais pré-tratados com ketanserina em 6 (FIGURA 17C) e em 24 horas (FIGURA 17D) depois do tratamento com LPS podemos observar um aumento na contagem de plaquetas em relação aos animais tratados com LPS e pré-tratados com veículo. Já o pré-tratamento com serotonina não foi capaz de alterar a contagem de plaquetas nos animais tratados em 6 e 24 horas com LPS (FIGURA 17C,D) ou salina (FIGURA 18A,B).

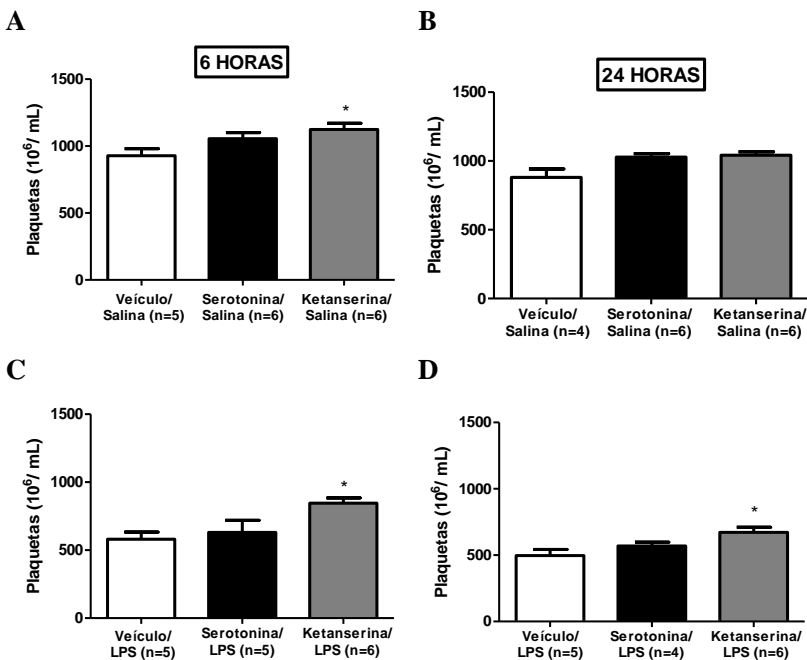


FIGURA 17. Efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina na contagem de plaquetas nos animais tratados com LPS e salina em 6 e 24 horas após os tratamentos. A contagem de plaquetas foi realizada por método automatizado. A quantificação foi realizada 6 (A,C) e 24 horas (B,D) depois dos tratamentos com salina (A,B) e LPS (C,D). Os animais receberam salina (A,B) ou LPS (C,D) depois do pré-tratamento com veículo (Barra branca), serotonina (Barra preta) e ketanserina (Barra cinza). Os resultados representam a média \pm EPM do número de plaquetas por ml de pelo menos 4 amostras de animais diferentes. * indica valor de $p < 0,05$ vs Veículo / LPS ou Veículo / salina (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni).

O pré-tratamento com ketanserina e serotonina não alterou a contagem de linfócitos nos animais tratados com salina ou LPS em 6 (FIGURA 18A,C) e 24 horas (FIGURA 18B,D) após os tratamentos quando comparado ao pré-tratamento com veículo. A contagem de linfócitos em todos os grupos de animais que receberam LPS (FIGURA 18C,D) foi menor do que a obtida nos animais que receberam tratamento com salina dentro do mesmo grupo de pré-tratamento(FIGURA 19A,B).

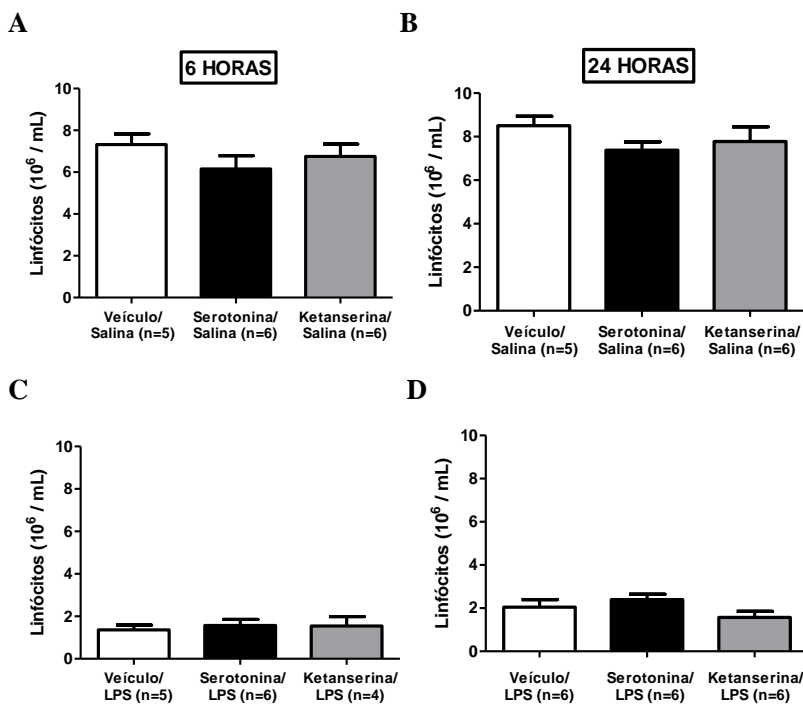


FIGURA 18. Efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina na contagem de linfócitos nos animais tratados com LPS e salina em 6 e 24 horas após os tratamentos. A contagem de linfócitos foi realizada por método automatizado. A quantificação foi realizada 6 (A,C) e 24 horas (B,D) depois dos tratamentos com salina (A,B) e LPS (C,D) e pré-tratamento com veículo (Barra branca), serotonina (Barra preta) e ketanserina (Barra cinza). Os resultados representam a média \pm EPM do número de linfócitos por ml de pelo menos 4 amostras de animais diferentes.

O pré-tratamento com ketanserina e serotonina não alterou a contagem de granulócitos em 6 (FIGURA 19A,C) e 24 horas (FIGURA 19B,D) após a exposição dos animais ao LPS ou salina, comparado com os animais dentro do mesmo tratamento porém pré-tratados com veículo. A contagem de granulócitos em todos os grupos que receberam LPS (FIGURA 19C,D) foi maior do que a obtida nos animais que receberam tratamento com salina dentro do mesmo grupo de pré-tratamento (FIGURA 19A,B).

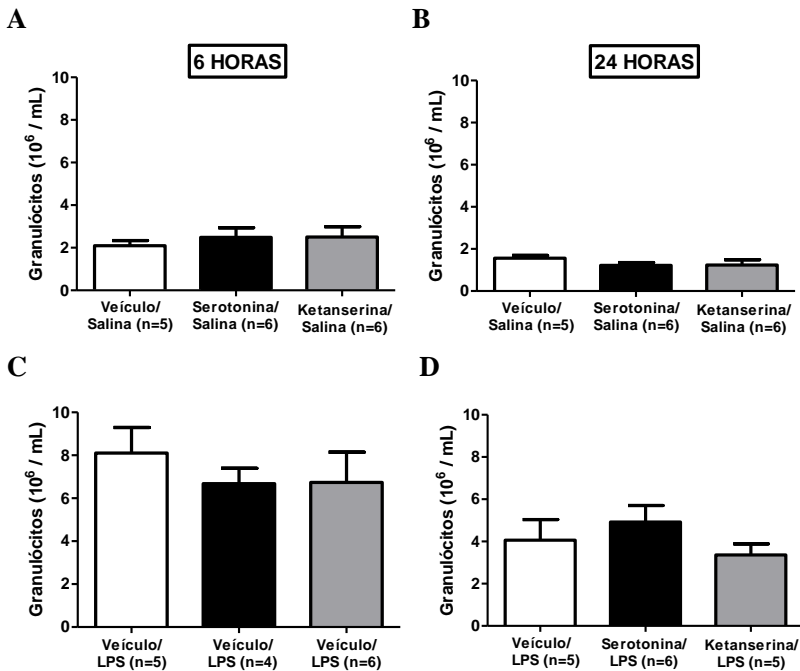
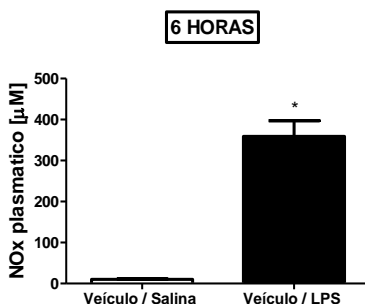


FIGURA 19. Efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina na contagem de granulocitos nos animais tratados com LPS e salina em 6 e 24 horas após os tratamentos. A contagem de granulocitos foi realizada por método automatizado. A quantificação foi realizada 6 (A,C) e 24 horas (B,D) depois dos tratamentos com salina (A,B) e LPS (C,D) e pré-tratamento com veículo (Barra branca), serotonina (Barra preta) e ketanserina (Barra cinza). Os resultados representam a média \pm EPM do número de granulócitos por ml de pelo menos 4 amostras de animais.

4.5 Avaliação do NOx.

A concentração de NOx plasmático, uma medida indireta da produção de óxido nítrico, mostrou-se significativamente aumentada nos animais tratados com LPS por 6 (FIGURA 20A) e 24 horas (FIGURA 20B) antes dos procedimentos em comparação com os animais tratados com salina. Como podemos observar, a concentração do NOx plasmático foi maior nos animais endotoxêmicos tratados 6 horas do que naqueles tratados 24 horas antes com LPS.

A



B

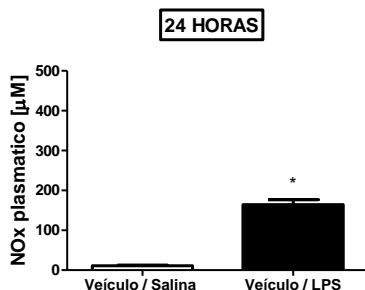


FIGURA 20. Concentração do NOx plasmáticos 6 e 24 horas após o tratamento com LPS ou salina. Análise da concentração do NOx plasmático em animais que foram tratados 6 (A) ou 24 horas (B) antes dos procedimentos com veículo e receberam LPS (barra preta) ou Salina (Barra branca). Os resultados representam a média \pm EPM da concentração do NOx em μM de $n=3$ experimentos. * indica valor de $p < 0,05$ vs Veículo / Salina (teste t de Student).

O pré-tratamento com serotonina nos animais que receberam LPS em 6 (Figura 21 A) e 24 horas (Figura 21 B) após o tratamento, não alterou a concentração plasmática de NOx quando comparado aos

animais pré-tratados com veículo no mesmo tempo. Os pré-tratamentos com serotonina e ketanserina não alteraram a concentração plasmática de NOx nos animais tratados com salina em 6 (Figura 21A) e 24 horas (Figura 21B) após os tratamentos. Já os animais que receberam LPS e pré-tratamento com ketanserina em 6 horas (FIGURA 21C) antes dos procedimentos tiveram o NOx diminuído. No entanto em 24 horas (Figura 21 D) depois do tratamento com LPS depois do pré-tratamento com ketanserina, a concentração plasmática de NOx não foi diferente do grupo que recebeu veículo no lugar de ketanserina.

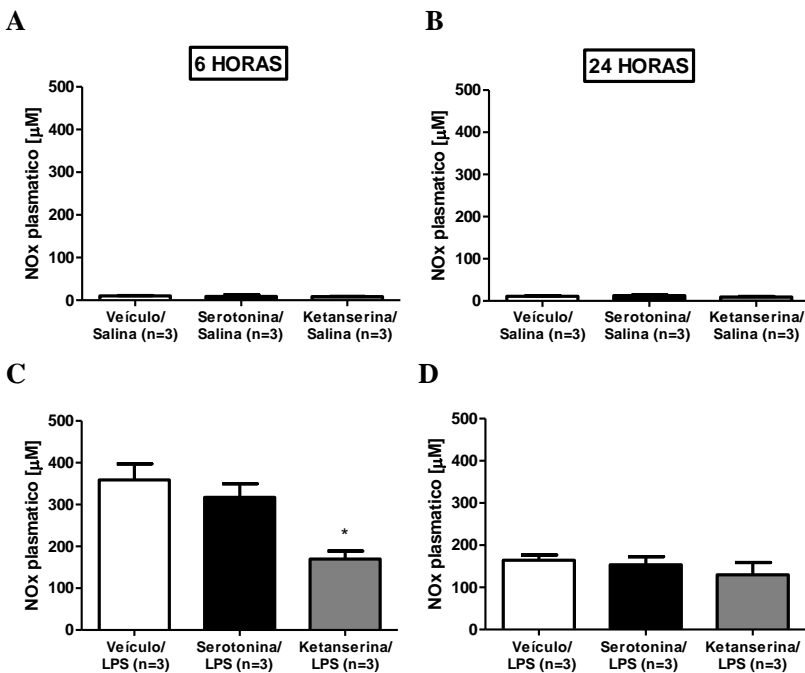


FIGURA 21. Efeito dos pré-tratamentos com ketanserina e serotonina na concentração plasmática de NOx nos animais tratados com LPS e salina em 6 e 24 horas após os tratamentos. A quantificação do NOx foi realizada 6 (A,C) e 24 horas (B,D) depois dos tratamentos com salina (A,B) e LPS (C,D) e do pré-tratamento com veículo (Barra branca), serotonina (Barra preta) e ketanserina (Barra cinza). Os resultados representam a média \pm EPM da concentração plasmática de NOx em μ M. * indica valor de $p < 0,05$ vs Veículo / LPS ou Veículo / salina (ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Bonferroni).

5. Discussão

O choque séptico é caracterizado por uma resposta inflamatória sistêmica e é uma das principais causas de mortalidade em UTI (Dellinger *et al.*, 2004). Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia do choque séptico não estão bem estabelecidos e ainda não é conhecido um tratamento eficaz para essa patologia.

O modelo de choque séptico utilizado neste estudo foi o de exposição à toxina LPS. No protocolo experimental de exposição de anéis de aorta à toxina *in vitro*, observamos hiporreatividade vascular a vasoconstritores, o que comumente ocorre em pacientes em choque séptico. Estes dados estão de acordo com os observados por Da Silva-Santos *et al.* (2002) que descrevem hiporresponsividade à fenilefrina, um agonista adrenérgico como a noradrenalina, em anéis de aorta incubados com LPS.

Como já foi descrito anteriormente, o choque séptico pode causar agregação plaquetária (Levi, 2005). Sabe-se ainda que as plaquetas são o principal reservatório de serotonina periférica e que a serotonina é liberada após a agregação de plaquetas (Watts *et al.*, 2012). Estudos apontam que a administração crônica de serotonina diminui a pressão arterial (Diaz *et al.*, 2012). Sendo assim, nós sugerimos que a concentração de serotonina periférica aumenta em decorrência da agregação plaquetária na sepse e esse aumento de serotonina contribui para a hipotensão no choque séptico. Apesar de não se saber o mecanismo pelo qual a serotonina diminui a pressão arterial, supõe-se que a alteração na pressão arterial possa ser devida à hiporeatividade vascular na sepse ou choque séptico. Para avaliar se a serotonina altera a reatividade vascular na sepse, foram utilizados antagonistas de receptores da serotonina no modelo de LPS *in vitro*.

Observamos que os diferentes antagonistas de receptores da serotonina utilizados foram capazes de aumentar a contração induzida por noradrenalina em anéis de aorta incubados com LPS *in vitro*. O SB 269970, antagonista 5-HT₇, aumentou a resposta contrátil induzida por noradrenalina. Este receptor tem sido mostrado em artérias tais como pulmonar, coronária e na aorta (Nilsson *et al.*, 1999; Ullmer *et al.* 1995). Tem sido relatado também que os receptores 5-HT₇ podem mediar ação hipotensora de longa duração e ainda mediar o relaxamento do músculo liso (Carter *et al.*, 1995). Deste modo, especulamos que o receptor 5-HT₇ pode regular a pressão arterial e ainda podemos sugerir que este receptor pode estar contribuindo para a hiporresponsividade a vasoconstritores no modelo de LPS *in vitro*. O receptor 5-HT₇ já foi estudado na sepse por Cardirise *et al.* (2013) e, ao contrário do nosso trabalho, foi utilizado

um agonista do receptor 5-HT₇ como tratamento em animais sépticos e este tratamento reduziu significativamente a inflamação e aumentou o tempo de sobrevivência dos animais (Cardirise *et al*, 2013). Este resultado parece controverso com nossos resultados, no entanto, o modelo de sepse utilizado por esses autores foi por CLP e foram avaliadas a inflamação e sobrevivência dos animais. Por outro lado, o nosso modelo foi de LPS *in vitro* e foi avaliada a reatividade vascular.

Os anéis de aorta incubados com LPS apresentaram um aumento na contração induzida por noradrenalina na presença de zacopride, antagonista 5-HT₃. Outro antagonista deste receptor bastante estudado é o tropisetron que é citado por apresentar efeitos anti-inflamatórios em doenças inflamatórias crônicas. Ainda, o mesmo pode inibir a estimulação simpática reduzindo o nível sérico de noradrenalina em modelo de sepse e diminuir o excesso de produção de citocinas na sepse (Mousavizadeh, 2009; Setoguchi, 2011; Fakhfour *et al*, 2012;). Estes dados podem resultar em um potencial terapêutico, visto que a produção excessiva de citocinas pode desenvolver complicações secundárias na sepse ou choque séptico (Schulte; Bernhagen; Bucala, 2013).

A contração induzida por noradrenalina em aorta incubada com LPS também foi maior na presença do antagonista seletivo de receptores 5-HT_{1A}, WAY 100135. Em modelo de inflamação induzido por LPS *in vivo*, a ativação do receptor 5-HT_{1A} pode prevenir a vasoconstrição cutânea e febre e o uso do antagonista do receptor 5-HT_{1A} reverter o efeito vasodilatador do receptor (Blessing, 2004). Sendo assim sugerimos que a antagonismo do receptor 5-HT_{1A} no modelo de choque endotoxêmico com LPS *in vitro* também pode estar prevenindo o efeito vasodilatador mediado por ativação deste receptor em aorta.

O GR-127935 é um antagonista dos receptores 5-HT_{1B/1D} e esses receptores podem estar presentes no músculo liso e endotélio vascular. Observamos que o GR-127935 aumentou a reatividade vascular induzida por noradrenalina em aorta incubada com LPS. Em um estudo realizado por Terrón; Sánchez-Maldonado; Martínez-García (2007) foi concluído que a ativação de receptores 5-HT_{1B/1D} pode mediar a hipotensão em ratos anestesiados. Ainda vale notar que a ativação dos receptores 5-HT_{1B/1D} pode induzir vasodilatação mediada pelo óxido nítrico em artéria cerebral (Hansen-Schwartz *et al.*, 2003). Como este receptor pode mediar vasodilatação e hipotensão sugerimos que o antagonismo deste receptor pode melhorar a vasoconstrição e evitar a hipotensão no choque séptico.

Na literatura, há relatos de que a serotonina induz relaxamento vascular inclusive de aorta por ativação do receptor 5-HT_{2B} dependente

do endotélio (Ellis *et al.* 1995; Glusa e Ross, 1996, Russell, 2002). Estes relatos reforçam os resultados que encontramos no nosso trabalho, pois sugerimos que a ativação desde receptor pode estar contribuindo com algum mecanismo que impede a vasoconstrição, uma vez que no nosso trabalho o uso do LY 266097, um antagonista do receptor 5-HT_{2B}, aumentou a contração induzida por noradrenalina no modelo de LPS *in vitro*. Portanto sugerimos que o relaxamento induzido por ativação do receptor 5-HT_{2B} estava impedindo a contração vascular no nosso modelo experimental. Na literatura Watts e Fink (1999), relatam que o bloqueio do receptor 5-HT_{2B} *in vivo* reduz a PAM em animais hipertensos em que há uma “*up-regulation*” de receptores 5-HT_{2B} nos vasos. Com bases nesses dados, especulamos que apesar do bloqueio do receptor 5-HT_{2B} *in vitro* se mostrar eficaz em aumentar a contração vascular em aorta e com isso ser uma opção a ser estudada no tratamento do choque séptico, o bloqueio do receptor 5-HT_{2B} *in vivo* pode diminuir a PAM parecendo não ser uma boa opção na sepse que já tem uma diminuição de PAM.

A ketanserina, antagonista 5-HT_{2A} aumentou a contração induzida por noradrenalina em aorta incubada com LPS. Apesar da ketanserina reduzir a PAM em pacientes hipertensos (Vanhoutte *et al.*, 1988) e, por isso, não parecer ser um bom tratamento para o choque séptico, a ketanserina e outros antagonistas 5-HT_{2A} têm sido utilizados no choque endotoxêmico em diversos trabalhos para restaurar a função do barorreflexo na pressão arterial durante o choque endotoxêmico (Liu *et al.*, 2011). O tratamento com ketanserina no choque endotoxêmico diminui a permeabilidade vascular a leucócitos (Walther *et al.*, 2002; Walther, *et al.*, 2007) e, além disso, o sarpogrelato, outro antagonista 5-HT_{2A} tem se mostrado eficaz em diminuir as citocinas pró-inflamatórias, aumentar as citocinas anti-inflamatórias, e reduzir a mortalidade no choque endotoxêmico (Nishiyama, 2009).

Todos os antagonistas de serotonina aumentaram a reatividade vascular induzida por noradrenalina em aorta de ratos tratadas com LPS *in vitro*. No entanto, o antagonista escolhido para fazer o tratamento *in vivo* nos animais endotoxêmicos foi o de receptores 5-HT_{2A}, ou seja, a ketanserina com um tempo de meia vida de aproximadamente 19 horas (Kurowski, 1985), este antagonista foi o escolhido para comparação com dados da literatura, visto que o bloqueio do receptor 5-HT_{2A} tem sido utilizado em alguns estudos no choque endotoxêmico.

Além de fazer um tratamento com um antagonista de serotonina no modelo de LPS *in vivo*, também foi realizado um tratamento com serotonina em animais endotoxêmicos para avaliar se um aumento nos

níveis de serotonina favoreceria os efeitos comuns presentes durante a toxemia.

O protocolo experimental em que os animais foram tratados com LPS *in vivo*, 5 minutos depois do tratamento com o antagonista de receptores da 5-HT, a ketanserina, foi baseado no trabalho de Nishiyama, em 2009. De acordo com dados da literatura, observamos hiporreatividade a agentes vasoconstritores em aorta de animais endotoxêmicos. Enquanto a hiporreatividade à noradrenalina observada 6 horas após a indução da toxemia foi mantida após 24 horas da indução da toxemia, a hiporreatividade à serotonina foi reestabelecida em 24 horas. Como já descrito, o choque séptico está relacionado com hiporreatividade vascular não só às catecolaminas como a noradrenalina e a epinefrina, mas também a outras drogas vasoativas como vasopressina e serotonina (Szabo *et al*, 1993, Zhang *et al*, 2014). Muitos pesquisadores têm citado que a produção excessiva de NO é uma das principais causas da diminuição da capacidade de resposta a vasoconstritores durante o choque séptico, provavelmente por causa dos seus efeitos vasodilatadores (Scabo *et al*, 1993, Levy *et al*, 2010).

O tratamento com serotonina em animais que receberam salina (não-endotoxêmicos) diminuiu a contração induzida por noradrenalina 6 horas após o tratamento. Como a serotonina é capaz de estimular a liberação de substâncias vasorelaxantes como o óxido nítrico no sistema cardiovascular, especulamos que a serotonina possa estar induzindo a formação e liberação dessas substâncias, o que dificultaria a contração vascular (Nuno *et al*, 2007). Esses dados apoiam nossa hipótese de que a serotonina pode contribuir para a hiporreatividade vascular na sepse. Apesar do tratamento com serotonina ter diminuído a contração vascular em animais que receberam salina (não-endotoxêmicos), nos animais que receberam LPS (endotoxêmicos) o tratamento com serotonina não alterou a contração induzida por noradrenalina. Isso pode ser devido ao fato de que, durante a endotoxemia, ocorra um aumento de serotonina seja tão elevado que o tratamento desses animais com serotonina exógena não consiga contribuir para uma maior hiporreatividade vascular.

Apesar da serotonina ser um vasoconstritor, há relatos na literatura demonstrando que a serotonina pode induzir vasoconstrição em doses baixas e vasodilatação em doses mais altas quando na presença de noradrenalina (Li; Croce; Winqvist, 1992). No choque séptico há uma liberação de catecolaminas para tentar reverter a hipotensão (Hahn *et al*, 1995). Sendo assim, especulamos que no choque séptico, com a liberação maciça de catecolaminas, a serotonina induziria

um efeito vasodilatador e esse efeito contribuiria para a hiporreatividade e hipotensão na sepse.

Um dos resultados mais importantes do nosso trabalho mostra que o tratamento com ketanserina previniu a hiporreatividade à noradrenalina em aorta de animais endotoxêmicos 24 horas após o tratamento.

Na literatura é descrito que a administração crônica de serotonina diminui a PAM (Watts, 2012). Como já foi discutido anteriormente, as plaquetas são os principais reservatórios periféricos de serotonina. Baseado nestes dados, a hipótese de nosso trabalho sugere que a serotonina está envolvida na hipotensão observada no choque séptico visto que nesse processo patológico há intensa agregação plaquetária e, com isso, a liberação de serotonina contribuiria para a queda na PAM. Especulamos, então, que o tratamento com serotonina poderia induzir uma diminuição na pressão arterial de animais naive, mimetizando o que ocorreria pelo aumento de serotonina liberada pelas plaquetas durante a agregação plaquetária no choque séptico.

A pressão arterial é crucial para a perfusão tecidual, oxigenação e eliminação de metabólitos no tecido normal. Em pacientes sépticos, por causa da lesão endotelial e vasodilatação, é comum os pacientes apresentarem hipotensão (Kvolik *et al*, 2009). No presente trabalho, a pressão arterial média (PAM) se encontrou diminuída 6 horas após o tratamento com LPS, mas não 24 horas depois. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na literatura como no estudo de Guarido *et al.*, 2014 e corroboram com nossos resultados da recuperação da resposta contrátil à noradrenalina em aorta de animais endotoxêmicos em 24 horas após o tratamento com ketanserina.

Em um estudo realizado por Diaz *et al*, 2008 demonstra que o tratamento com serotonina diminui a pressão arterial (Diaz *et al.*, 2008). No entanto, esse resultado não se reproduziu em nosso estudo, provavelmente porque no tratamento realizado por esses autores, a administração de serotonina foi crônica (7 dias), enquanto que no nosso trabalho apenas uma dose de 2 mg / Kg foi utilizada. Por isso especulamos que a dose de serotonina utilizada não foi suficiente para observarmos a queda na PAM .

Por outro lado, a resposta pressórica à noradrenalina foi menor em animais endotoxêmicos tratados com serotonina. Portanto se a possível liberação de fatores relaxantes induzidos por serotonina está envolvida nessa diminuição da resposta pressórica à noradrenalina merece investigação adicional.

Apesar do aumento na resposta contrátil induzida por noradrenalina, o tratamento com ketanserina não melhorou a resposta pressórica induzida com por esse agonista adrenérgico. No entanto, apesar de não termos observado aumento na resposta pressórica à noradrenalina, na avaliação da PAM em 6 e 24 horas após o tratamento com LPS em animais que receberam ketanserina observamos uma elevação da PAM em relação ao grupo endotoxêmico que não recebeu tratamento com ketanserina. Sugerimos que a elevação na PAM induzida pela ketanserina seja decorrente da correção do barorreflexo que precede as alterações vasculares e que, a longo prazo, contribui para a manutenção do reestabelecimento da pressão arterial.

A resposta pressórica induzida por vasoconstritores é um parâmetro importante para estudo em modelos de sepse. O vasopressor utilizado para avaliar a resposta pressórica de animais endotoxêmicos foi a noradrenalina, um mediador endógeno do sistema nervoso simpático que atua como agonista α -adrenérgico potente com efeitos menos pronunciados nos receptores β -adrenérgicos. Este vasopressor foi o utilizado em nossos estudos por ser um dos tratamentos mais utilizados para reverter a hipotensão arterial em pacientes com choque séptico (Hollenberg, 2009).

Nós observamos que uma redução na resposta pressórica a noradrenalina em animais endotoxêmicos comparado aos animais não-endotoxêmicos. Nosso resultado difere do descrito por Guarido *et al.*, 2014. Enquanto mostramos redução na resposta pressórica em 24 horas após a exposição ao LPS, mas não em 6 horas após LPS, Guarido *et al.*, 2014 mostram redução da resposta pressórica em 6 horas após a exposição ao LPS. Contudo, esses autores utilizaram o agonista adrenérgico fenilefrina, enquanto no presente trabalho utilizamos noradrenalina, o que poderia ser a razão para a diferença entre as respostas devido à diferente seletividade aos receptores adrenérgicos.

A sepse induz depleção de linfócitos, causando com isso uma linfocitopenia que contribui para uma imunossupressão na sepse (Davani, 2006; Pablo *et al.*, 2014). O papel dos linfócitos na patogênese da sepsia não está bem estabelecido. No entanto, tem sido proposto que os linfócitos estimulam a produção de citocinas e estão envolvidos na resposta imune inata na sepse (Kelly-Scumpia *et al.*, 2011). A importância de avaliar a contagem de linfócitos é verificar a imunossupressão na sepse ou choque séptico. No presente trabalho, observamos uma diminuição na contagem de linfócitos em ambos os tempos de tratamento com LPS demonstrando com isso que o modelo escolhido reproduz a linfocitopenia no choque séptico. O choque

endotoxêmico aumentou a contagem de granulócitos no sangue periférico. Os granulócitos, especialmente neutrófilos, representam a primeira linha de defesa do hospedeiro contra bactérias e outros agentes patogênicos (Mocsai, 2013). Conseqüentemente, uma infecção aguda é capaz de recrutar neutrófilos da medula óssea para locais periféricos de infecção e esta ação é importante para a sobrevivência na sepse (Delano *et al.*, 2011).

A função plaquetária envolve a adesão, agregação, secreção e promoção da atividade pró-coagulante. Na sepse, pode haver alteração na contagem e na função plaquetária podendo gerar alteração na coagulação e na agregação das plaquetas (Yaguchi *et al.*, 2004). A trombocitopenia foi observada no modelo de choque séptico apresentado e geralmente essa diminuição no número de plaquetas indica agravamento da doença e alterações de coagulação (Strauss *et al.*, 2002).

No choque endotoxêmico podemos observar uma diminuição na contagem de plaquetas que foi revertida pelo tratamento com ketanserina. Como o receptor 5-HT_{2A} é responsável pela agregação plaquetária, supomos que o tratamento com ketanserina inibiu a depleção de plaquetas por inibição da agregação plaquetária através do antagonismo deste receptor, que é o principal receptor de serotonina nas plaquetas (Duerschmied, 2012). Portanto, propomos que o tratamento com ketanserina parece proteger o sistema cardiovascular no choque séptico visto que a serotonina induz o dano endotelial na sepse através da agregação plaquetária (Cerrito *et al.*, 1993; Walther *et al.*, 2004).

Vários estudos têm mostrado um aumento significativo dos níveis de NO durante o choque séptico (Santos *et al.*, 2012). Segundo alguns autores, essa hiperprodução de NO seria mediada pela iNOS e explicaria a vasodilatação e hiporreatividade a vasopressores nesta patologia (Kirkeboen e Straud, 1999). Assim sendo, a quantificação do NO plasmático foi um parâmetro importante para a validação do modelo experimental utilizado em nosso trabalho visto que este mimetiza a hiperprodução de NO no choque séptico, em 6 e 24 horas depois do tratamento com LPS.

Na célula do músculo liso vascular, o NO pode causar relaxamento sendo, por isso, um mediador crítico da hipotensão comum no choque séptico (Cauwels, 2007). Há relatos que mostram decréscimo da expressão do óxido nítrico sintase (NOS) mediante tratamento com ketanserina em choque endotoxêmico (Liu, 2011). Este estudo de Liu (2011) vai ao encontro de nossos resultados que demonstram que o tratamento com ketanserina em animais tratados com LPS diminui a concentração de NO plasmático. Juntos, esses resultados sugerem que o

tratamento de animais endotoxêmicos com ketanserina aumenta a PAM devido provavel restauração do baroreflexo e diminuição da concentração de NO.

6. Conclusão

Nosso estudo agrega informações para a compreensão dos possíveis efeitos da serotonina no choque endotoxêmico e de como essa monoamina pode afetar a pressão arterial e a reatividade vascular. De modo geral, nossos resultados nos levam a sugerir que a serotonina contribui para a hiperreatividade vascular a agentes vasoconstritores e para a hipotensão observados na sepse. No entanto, os mecanismos pelos quais isso acontece merece ser melhor elucidado em estudos futuros.

7. Referências

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**, v. 28, n. 2, p. 108-21, Feb 2002.

AMERSFOORT, E. S V., BERKEL, T. J. C. V., KUIPER, J. Receptors, Mediators, and Mechanisms Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. **Clin Microbiol Ver**, v. 16, n. 3, p. 379–414, Jul 2003.

ANGUS, D. C., LINDE-ZWIRBLE, W. T., LIDICKER, J., CLERMONT, G., CARCILLO, J., PINSKY, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: Analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med.**, v. 29, n. 7, p. 1303-1310, Jul 2001.

BARNES, N. M., SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083-1152, Aug 1999.

BERGER, M., GRAY, J. A., ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annu Rev Med**. 2009 v. 60, p. 355-66, 2009.

BLESSING, W. W. 5-hydroxytryptamine 1A receptor activation reduces cutaneous vasoconstriction and fever associated with the acute inflammatory response in rabbits. **Neuroscience**, v. 123, n. 1, p. 1-4, 2004.

BONE, R. C., BALK, R. A., CERRA, F. B., DELLINGER, R. P., FEIN, A. M., KNAUS, W. A., SCHEIN, R. M., SIBBALD, W. J. 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**. v. 101, n. 6, p. 1644-55, Jun 1992.

BRYAN, N. S., GRISHAM, M. B. Methods to detect nitric oxide and its metabolites in biological samples. **Free Radic Biol Med.**, v. 43, n. 5, p. 645-57, sep 2007.

BURAS, J. A., HOLZMANN, B., SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**. v. 4, n. 10, p. 854-65, Oct 2005.

CADIRCI, E., HALICI, Z., BAYIR, Y., ALBAYRAK, A., KARAKUS, E., POLAT, D., UNAL, D., ATAMANALP, S. S., AKSAK, S., GUNDOGDU, C. Peripheral 5-HT₇ receptors as a new target for prevention of lung injury and mortality in septic rats. **Immunobiology**, v. 218, n. 10, p. 1271–1283, Oct 2013.

CARTER, D., CHAMPNEY, M., HWANG, B., EGLIN, R. M. Characterization of a postjunctional 5-HT receptor mediating relaxation of guinea-pig isolated ileum. **Eur J Pharmacol**, v. 280, n. 3, p. 243-50, Jul 1995.

CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. **Kidney Int**, v. 72, n. 5, p. 557-65, Sep 2007.

CERRITO, F., LAZZARO, M. P., GAUDIO, E., ARMINIO, P., ALOISI, G. 5HT₂-receptors and serotonin release: their role in human platelet aggregation. **Life Sci**, v. 53, n. 3, p. 209-15, 1993.

CHICHE, L., FOREL, J. M., THOMAS, G., FARNARIER, C., VELY, F., BLÉRY, M., PAPAZIAN, L., VIVIER, E. The role of natural killer cells in sepsis. **J Biomed Biotechnol**. v. 2011, p. 1-8, Mai 2011.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-91, 2002.

DA SILVA-SANTOS, J. E., TERLUK, M. R., ASSREUY, J. Differential involvement of guanylate cyclase and potassium channels in nitric oxide-induced hyporesponsiveness to phenylephrine in endotoxemic rats. **Shock**, v. 17, n. 1, p. 70–76, 2002.

DAVANI, E. Y., BOYD, J. H., DORSCHIED, D. R., WANG, Y., MEREDITH, A., CHAU, E., SINGHERA, G. K., WALLEY, K. R. Cardiac ICAM-1 mediates leukocyte-dependent decreased ventricular contractility in endotoxemic mice. **Cardiovasc Res**, v. 72, n. 1, p. 134-42, Oct 2006.

DEJAGER, L., PINHEIRO, I., DEJONCKHEERE, E., LIBERT, C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends Microbiol**, v. 19, n. 4, p. 198-208, Abr 2011.

DELANO. M. J., KELLY-SCUMPIA, K. M., THAYER, T. C., WINFIELD, R. D., SCUMPIA, P. O., CUENCA A. G., HARRINGTON, P. B., O'MALLEY, K. A., WARNER, E., GABRILOVICH, S., MATHEWS, C. E., LAFACE, D., HEYWORTH, P. G., RAMPHAL, R., STRIETER, R. M., MOLDAWER, L. L., EFRON, P. A. Neutrophil mobilization from the bone marrow during polymicrobial sepsis is dependent on CXCL12 signaling. **J Immunol**, v. 187, n. 2, p. 911-8, Jul 2011.

DELLINGER, R. P., CARLET, J. M., MASUR, H., GERLACH, H., CALANDRA, T., COHEN, J., GEA-BANACLOCHE, J., KEH, D., MARSHALL, J. C., PARKER, M. M., RAMSAY, G., ZIMMERMAN, J. L., VINCENT, J. L., LEVY, M. M. Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med**, v. 32, n. 3, p. 858-73, Mar 2004.

DELLINGER, R. P., LEVY, M. M., CARLET, J. M., BION, J., PARKER, M. M., JAESCHKE, R., REINHART, K., ANGUS, D. C., BRUN-BUISSON, C., BEALE, R., CALANDRA, T., DHAINAUT, J., GERLACH, H., HARVEY, M., MARINI, J. J., MARSHALL, J., RANIERI, M., RAMSAY, G., SEVRANSKY, J., THOMPSON, B. T., TOWNSEND, S., VENDER, J. S., ZIMMERMAN, J. L., VINCENT, J. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Intensive Care Med**, v. 34, n. 1, p. 17-60, Jan 2008.

DIAZ, J.; NI, W.; THOMPSON, J.; KING, A.; FINK, G. D.; WATTS, S. W. 5-Hydroxytryptamine lowers blood pressure in normotensive and hypertensive rats. **J Pharmacol Exp Ther**, v.325, p.1031-8, 2008.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112, n. 6, p. 321S-329S, Dez 1997.

DUERSCHMIED, D., SUIDAN, G. L., DEMERS, M., HERR, N., CARBO, C., BRILL, A., CIFUNI S. M., MAULER, M., CICKO, S., BADER, M., IDZKO, M., BODE, C., WAGNER, D. D. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. **Blood**, Feb 7 v. 121, n. 6, p. 1008-15, Feb 2013.

DUERSCHMIED, D., AHRENS, I., MAULER, M., BRANDT, C., WEIDNER, S., BODE, C., MOSER, M. Serotonin Antagonism Improves Platelet Inhibition in Clopidogrel Low-Responders after Coronary Stent Placement: An *In Vitro* Pilot Study. **PLoS One**. 2012 v. 7, n. 2, Feb 2012.

D'EMMANUELE DI VILLA BIANCA, R., LIPPOLIS, L., AUTORE, G., POPOLO, A., MARZOCCO, S., SORRENTINO, L., PINTO, A., SORRENTINO, R. Dexamethasone improves vascular hyporeactivity induced by LPS in vivo by modulating ATP-sensitive potassium channels activity. **Br J Pharmacol**, v. 140, n. 1, p. 91-96, Set 2003.

ELLIS, E. S., BYRNE, C., MURPHY, O. E., TILFORD, N. S., BAXTER, G. S. Mediation by 5-hydroxytryptamine_{2B} receptors of endothelium-dependent relaxation in rat jugular vein. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 2, p. 400-4, Jan 1995.

FAKHFOURI, G., RAHIMIAN, R., GHIA, J. E., KHAN, W. I., DEHPOUR, A. R. Impact of 5-HT₃ receptor antagonists on peripheral and central diseases. **Drug Discov Today**, v. 17, n. 13-14, p. 741-7, Jul 2012.

GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word "sepsis". **Intensive Care Med**, v. 32, n. 12, p. 2077, dez. 2006.

GLUSA E., ROOS A. Endothelial 5-HT receptors mediate relaxation of porcine pulmonary arteries in response to ergotamine and dihydroergotamine. **Br. J. Pharmacol**, v. 119, n. 2, p. 330-334, Sep 1996.

GOLDENBERG, N. M., STEINBERG, B. E., SLUTSKY, A. S., LEE, W. L., Broken barriers: a new take on sepsis pathogenesis. **Sci Transl Med**, v. 3, n. 88, p. 25, 2011.

GUARIDO, K. L., GONÇALVES, R. P., JÚNIOR, A. G., DA SILVA-SANTOS, J. E. Increased activation of the Rho-A/Rho-kinase pathway in the renal vascular system is responsible for the enhanced reactivity to exogenous vasopressin in endotoxemic rats. **Crit Care Med**, v. 42, n. 6, p. 461-71, Jun 2014.

HAHN, P. Y., WANG, P., TAIT, S. M., BA, Z. F., REICH, S. S., Chaudry, I. H. Sustained elevation in circulating catecholamine levels during polymicrobial sepsis. **Shock**, v. 4, n. 4, p. 269-73, Oct 1995.

HANNON, J., HOYER, D. Serotonin receptors and systems: endless diversity? **Acta Biologica Szegediensis**, v. 46, n. 1-2, p. 1-12, 2002.

HANSEN-SCHWARTZ, J., HOEL, N. L., XU, C. B., SVENDGAARD, N. A., EDVINSSON, L. Subarachnoid hemorrhage-induced upregulation of the 5-HT_{1B} receptor in cerebral arteries in rats. **J Neurosurg**, v. 99, n. 1, p. 115-20, Jul 2003.

HOLLENBERG, S. M. Inotrope and vasopressor therapy of septic shock. **Crit Care Nurs Clin North Am**. v. 23, n. 1, p. 127-148, Mar 2011.

HOTCHKISS, R. S., KARL, I. E. The Pathophysiology and Treatment of Sepsis. **N Engl J Med**, v. 348, p. 138-150, Jan 2003.

HOYER, D., HANNON, J. P., MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 71, n. 4, p. 533-54, Apr 2002.

IGNARRO, L. J., BUGA, G. M., WOOD, K. S., BYRNS, R. E., CHAUDHURI, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, Dez 1987.

JULOU-SCHAEFFER, G., GRAY, G. A., FLEMING, I., SCHOTT, C., PARRATT, J. R., STOCLET, J. C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **Am J Physiol**, v. 259, n. 4, p. 1038-1043, Out 1990.

KELLY-SCUMPIA, K. M., SCUMPIA, P. O., WEINSTEIN, J. S., DELANO, M. J., CUENCA, A. G., NACIONALES, D. C., WYNN, J. L., LEE, P. Y., KUMAGAI, Y., EFRON, P. A., AKIRA, S., WASSERFALL, C., ATKINSON, M. A., MOLDAWER, L. L. B cells enhance early innate immune responses during bacterial sepsis. **J Exp Med**, v. 208, n. 8, p. 1673-82, Aug 2011.

KIRKEBØEN, K. A., STRAND, O. A. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 43, n. 3, p. 275-88, Mar 1999.

KOTSOVOLIS, G., KALLARAS, K., The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. **Hippokratia**, v. 14, n. 2, p. 88-93, 2010.

KOZHEVNIKOVA, L. M., AVDONIN, P. V. Agonist of serotonin 5HT1A-receptors 8-OH-DPAT increases the force of contraction of rat aorta and mesenteric artery in the presence of endothelin-1 or vasopressin and causes relaxation of the vessels precontracted with noradrenaline. **Biology Bulletin**, v. 37, n. 1, p 35-43, Feb 2010.

KUROWSKI, M. Bioavailability and pharmacokinetics of ketanserin in elderly subjects. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 28, n. 4, p. 411-7, 1985.

KVOLIK, S., DRENJANČEVIĆ-PERIC, I., TAKAC, I., JUKIC, M., DRENJANČEVIC, D. Microcirculation impairment and blood pressure in sepsis. **Med Glas**, v. 6, n. 1, p. 32-41, 2009.

LEVI, M. Platelets. **Crit Care Med**, v. 33, n. 12, p. 523-525, Dec 2005.

LEVY, B., COLLIN, S., SENNOUN, N., DUCROCQ, N., KIMMOUN, A., ASFAR, P., PEREZ, P., MEZIANI, F., Vascular hyporesponsiveness to vasopressor in septic shock: from bench to bedside. **Intensive Care Med**, v. 36, n. 12, p. 2019-2029, 2010.

LEPPER, P. M., HELD, T. K., SCHNEIDER, E. M., BÖLKE, E., GERLACH, H., TRAUTMANN, M. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. **Intensive Care Med**, v. 28, n. 7, p. 824-33, Jul 2002.

LI, T., CROCE, K., WINQUIST, R. J. Vasoconstrictor and Vasodilator Effects of Serotonin in the Isolated Rabbit Kidney. **JPET**, v. 263 n. 3, p. 928-932, Dec 1992.

LINDER, A. E.; NI, W.; SZASZ, T.; BURNETT, R.; DIAZ, J.; GEDDES, T. J.; KUHN, D. M.; WATTS, S. W. A serotonergic system in veins: serotonin transporter-independent uptake. **J Pharmacol Exp Ther**, v.325, p.714-22, 2008.

LIU, C., ZHANG, G. F., SONG, S. W., CAI, G. J., LIU, W. H., MIAO, C. Y., SU, D. F. Effects of ketanserin on endotoxic shock and baroreflex function in rodents. **J Infect Dis**, v. 204, n. 10, p. 1605-12, Nov 2011.

MARTIN, G. S., Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. **Expert Rev Anti Infect Ther**. v. 10, n. 6, p. 701–706, Jun 2012.

MIYAMOTO, A., MORIKI, H., ISHIGURO, S., NISHIO, A. In vitro application of endotoxin enhances nitric oxide production in thoracic aortas from Mg-deficient rats. **Magnesium Research**, v. 18, n. 3, p. 155-62, 2005.

MÓCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **JEM**, v. 210, n. 7, p. 1283-1299, Jul 2013

MOUSAVIZADEH, K., RAHIMIAN, R., FAKHFOURI, G., ASLANI, F. S., GHAFOURIFAR, P. Anti-inflammatory effects of 5-HT receptor antagonist, tropisetron on experimental colitis in rats. **Eur J Clin Invest**, v. 39, n. 5, p. 375-83, May 2009.

NICHOLS, D. E., NICHOLS, C. D., Serotonin Receptors. **Chem. Rev**, v. 108, n. 5, p. 1614–1641, Out 2008.

NISHIYAMA, T. Acute effects of sarpogrelate, a 5-HT_{2A} receptor antagonist on cytokine production in endotoxin shock model of rats. **Eur J Pharmacol**, v. 614, n. 1-3, p. 122-7, Jul 2009.

NUNO, D. W., KOROVKINA, V. P., ENGLAND, S. K., LAMPING, K. G. RhoA activation contributes to sex differences in vascular contractions. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 9, p. 1934-40, Sep 2007.

PABLO, R., MONSERRAT, J., PRIETO, A., ALVAREZ-MON, M. Role of Circulating Lymphocytes in Patients with Sepsis. **BioMed Res Int**, v. 2014, p. 1-11, 2014.

PRAVDA, J., Metabolic theory of septic shock. **World J Crit Care Med**, v. 3, n. 2, p. 45-54, 2014.

PYTLIAK, M., VARGOVÁ, V., MECHÍROVÁ, V., FELŠŮCI, M. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. **Physiol Res**, v. 60, n. 1, p. 15-25, 2011.

RAMAGE, A. G., VILLALÓN, C. M. 5-hydroxytryptamine and cardiovascular regulation. **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 9, p. 472-81, Sep 2008.

RAMNATH, R. D., WEING, S., HE, M., SUN, J., ZHANG, H., BAWA, M. S., BHATIA, M. Inflammatory mediators in sepsis: Cytokines, chemokines, adhesion molecules and gases. **J Organ Dysfunct**, v. 2, n. 2, p. 80-92, 2006.

RANGEL-FRAUSTO, M.S. Sepsis: Still Going Strong. **Arch Med Res**, v. 36, n. 6, p. 672-681, Nov-Dez 2005.

RAPPORT, M. M., GREEN, A. A., PAGE, I. H. Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization. **J Biol Chem**, v. 176, n. 3, p. 1243-51, Dec 1948.

RIVERS, E. P., JAEHNE, A. K., EICHHORN-WHARRY, L., BROWN, S., AMPONSAH, D. Fluid therapy in septic shock. **Curr Opin Crit Care**. v. 16, n. 4, p. 297-308, Aug 2010.

RUSSELL, A., BANES, A., BERLIN, H., FINK, G. D., WATTS, S. W. 5-Hydroxytryptamine(2B) receptor function is enhanced in the N(omega)-nitro-L-arginine hypertensive rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 303, n. 1, p. 179-87, Oct 2002.

SANTOS, S. S., BRUNIALTI, M. K., RIGATO, O., MACHADO, F. R., SILVA, E., SALOMAO, R. Generation of nitric oxide and reactive oxygen species by neutrophils and monocytes from septic patients and association with outcomes. **Shock**, v. 38, n. 1, p. 18-23, Jul 2012.

SAXENA, P. R., VILLALON, C. M. Cardiovascular effects of serotonin agonists and antagonists. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 15, n. 7, p. S17-34, 1990.

SCHABBAUER, G. Polymicrobial sepsis models: CLP versus CASP. **Drug Discov Today: Dis Models**, v. 9, n. 1, p. e17–e21, 2012.

SCHAEFFER, G., GRAY G. A., FLEMING, I., SCHOTT, C., PARRATT, J. R., STOCLET J. C. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **Am J Physiol**, v. 259, n. 4, p. H1038-43, Oct 1990.

SCHULTE, W., BERNHAGEN, J., BUCALA, R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p.1-16, 2013.

SETOGUCHI, D., NAKAMURA, M., YATSUKI, H., WATANABE, E., TATEISHI, Y., KUWAKI, T., ODA S. Experimental examination of anti-inflammatory effects of a 5-HT₃ receptor antagonist, tropisetron, and concomitant effects on autonomic nervous function in a rat sepsis model. **Int Immunopharmacol**, v. 11, n. 12, p. 2073-8, Dec 2011.

SHEN, F. M., GUAN, Y. F., XIE, H. H., SU, D. F. Arterial baroreflex function determines the survival time in lipopolysaccharide-induced shock in rats. **Shock**, v.21, p. 556-60, 2004.

SHEN, F. M., WANG, J., NI, C. R., YU, J. G., WANG, W. Z., SU, D. F. Ketanserin-induced baroreflex enhancement in spontaneously hypertensive rats depends on central 5-HT_{2A} receptors. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n. 8, p. 702-7, Aug 2007.

SILVA, E., PEDRO, M. A., SOGAYAR, A. C., MOHOVIC, T., SILVA, C. L., JANISZEWSKI, M., CAL, R. G., DE SOUSA, E. F., ABE, T. P., DE ANDRADE, J., DE MATOS, J. D., REZENDE, E., ASSUNÇÃO, M., AVEZUM, A., ROCHA, P. C., DE MATOS, G. F., BENTO, A. M., CORRÊA, A. D., VIEIRA, P. C., KNOBEL, E.; Estudo epidemiológico brasileiro de sepse. **Crit Care**, v. 8, n. 4, p. R251-60, Ago 2004.

SONG, S., LIU, A., BAI, C., SU, B., MA, X., SHEN, F., DUAN, J., SU, D. Blood Pressure Reduction Combining Baroreflex Restoration for Stroke Prevention in Hypertension in Rats. **Front Pharmacol**, v. 1, n. 6, Jul 2010.

STRAUSS, R., WEHLER, M., MEHLER, K., KREUTZER, D., KOEBNICK, C., HAHN, E. G. Thrombocytopenia in patients in the medical intensive care unit: bleeding prevalence, transfusion requirements, and outcome. **Crit Care Med**, v. 30, n. 8, p. 1765-71, Aug 2002.

SZABÓ, C., MITCHELL, J. A., THIEMERMANN, C., VANE, J. R. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. **Br J Pharmacol**, v. 108, n. 3, p. 786-92, Mar 1993.

TERRÓN, J. Á., SÁNCHEZ-MALDONADO, C., MARTÍNEZ-GARCÍA, E. Pharmacological evidence that 5-HT_{1B/1D} receptors mediate hypotension in anesthetized rats. **Eur J Pharmacol**, v. 576, n. 1-3, p. 132-5, Dec 2007.

TIMMONS S, HUZOOR A, GRABAREK J, KLOCZEWIAK M, HAWIGER J. Mechanism of human platelet activation by endotoxic glycolipid-bearing mutant Re595 of *Salmonella minnesota*. **Blood**, v. 68, n. 5, p. 1015-1023, Nov 1986.

TORUN NILSSON, T., LONGMORE, J., SHAW, D., OLESEN, I. J., EDVINSSON, L. Contractile 5-HT_{1B} receptors in human cerebral arteries: pharmacological characterization and localization with immunocytochemistry. **Br J Pharmacol**, v. 128, n. 6, p. 1133-1140, Nov 1999

TUPCHONG, K., KOYFMAN A., FORAN, M. Sepsis, severe sepsis, and septic shock: A review of the literature. **Afr J Emerg Med**, Ago 2014.

ULLMER, C., SCHMUCK, K., KALKMAN, H. O., LÜBBERT, H. Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. **FEBS Lett**, v. 370, n. 3, p. 215–221, Aug 1995.

VANHOUTTE, P., AMERY, A., BIRKENHÄGER, W., BRECKENRIDGE, A., BÜHLER, F., DISTLER, A., DORMANDY, J., DOYLE, A., FROHLICH, E., HANSSON, L. Serotonergic mechanisms in hypertension. Focus on the effects of ketanserin. **Hypertension**, v. 11, n. 2, p. 111–133, Feb 1988.

VAZQUEZ-GRANDE, G., KUMAR, A. Optimizing antimicrobial therapy of sepsis and septic shock: focus on antibiotic combination therapy. **Semin Respir Crit Care Med**, v. 36, n. 1, p. 154–66, Feb 2015.

VILLALÓN, C. M., CENTURIÓN, D. Cardiovascular responses produced by 5-hydroxytryptamine: a pharmacological update on the receptors/mechanisms involved and therapeutic implications. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, v. 376, n. 1-2, p. 45-63, Oct 2007.

WALTHER, A., CZABANKA, M., GEBHARD, M. M., MARTIN, E. Glycoprotein IIB/IIIa-inhibition and microcirculatory alterations during experimental endotoxemia--an intravital microscopic study in the rat. **Microcirculation**, v. 11, n. 1, p. 79-88, Jan-Feb 2004.

WALTHER, A., PETER, C., SECCHI, A., GEBHARD, M. M., MARTIN, E., SCHMIDT, H. Selective serotonin receptor antagonism and leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia. **Microvasc Res**, v. 63, n. 1, p. 135-8, Jan 2002.

WALTHER, A., PETRI, E., PETER, C., CZABANKA, M., MARTIN, E. Selective serotonin-receptor antagonism and microcirculatory alterations during experimental endotoxemia. **J Surg Res**, v. 143, n. 2, p. 216-23, Dec 2007.

WALTHER, D. J., PETER, J. U., WINTER, S., HÖLTJE, M., PAULMANN, N., GROHMANN, M., VOWINCKEL, J., ALAMO-BETHENCOURT, V., WILHELM, C. S., AHNERT-HILGER, G., BADER, M. Serotonylation of small GTPases is a signal transduction pathway that triggers platelet alpha-granule release. **Cell**, v.115, n.7, p.851-62, Dec 2003.

WATTS, S. W., FINK, G. D. 5-HT_{2B}-receptor antagonist LY-272015 is antihypertensive in DOCA-salt-hypertensive rats. **Am J Physiol**, v. 276, n. 3, p. H944-52, Mar 1999.

WATTS, S. W., MORRISON, S. F., DAVIS, R. P., BARMAN, S. M. Serotonin and blood pressure regulation. **Pharmacol Rev**, v. 64, n. 2, p. 359-88, Abr 2012.

WATTS, S. W., PRIESTLEY, J. R., THOMPSON, J. M. Serotonylation of vascular proteins important to contraction. **PLoS One**, v.4, n.5, p. e5682, May 2009.

XIE, H. H., SHEN, F. M., CAO, Y. B., LI, H. L., SU, D. F. Effects of low-dose ketanserin on blood pressure variability, baroreflex sensitivity and end-organ damage in spontaneously hypertensive rats. **Clin Sci (Lond)**, v. 108, n. 6, p. 547-52, Jun 2005.

YAGUCHI, A., LOBO, F. L., VINCENT, J. L., PRADIER, O. Platelet function in sepsis. **J Thromb Haemost**, v. 2, n. 12, p. 2096-102, Dec 2004.

ZHANG, S., CUI, N., LI, S., GUO, L., WU, Y., ZHU, D., JIANG, C., Interception of the endotoxin-induced arterial hyporeactivity to vasoconstrictors, **Vascul. Pharmacol.** v. 62, n. 1, p. 15-23, Jul 2014.