

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

Jaine Grando

**EFEITO PARADOXAL DO ANTAGONISMO ALFA-1
ADRENÉRGICO NA DISFUNÇÃO VASCULAR DA SEPSE**

Florianópolis
2018

Jaine Grando

**EFEITO PARADOXAL DO ANTAGONISMO ALFA-1
ADRENÉRGICO NA DISFUNÇÃO VASCULAR DA SEPSE**

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

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis
2018

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

Grando, Jaine
Efeito paradoxal do antagonismo alfa-1
adrenérgico na disfunção vascular da sepsis / Jaine
Grando ; orientador, Jamil Assreuy, 2018.
86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas,
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia,
Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. sepsis. 3. receptor alfa-1
adrenérgico. 4. cloridrato de prazosina. 5.
disfunção cardiovascular. I. Assreuy, Jamil. II.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"Efeito paradoxal do antagonismo α_1 -Adrenérgico na disfunção vascular da retina"

Por

Jaine Grando

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (03/PPGFC/2018) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.



Prof. Dr. Jamil Assereuy Filho
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

Banca examinadora:



Dr. Jamil Assereuy Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr. André Serripa Pupo (Universidade Estadual de Maringá - SP)



Dr. José Eduardo de Silva Santos (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 20 de fevereiro de 2018.

Dedico este trabalho aos meus pais,
por todo apoio, incentivo e amor,
permitindo que eu conquistasse mais
este sonho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Jamil Assreuy, pelo ótimo convívio, pela confiança, paciência, apoio constante e dedicação em ensinar que as adversidades são vencidas com responsabilidade e ética.

Aos meus pais, Nadiomar e Jurací, por acreditarem em mim e permitirem que eu também acreditasse, fornecendo todo apoio para que eu pudesse obter mais essa conquista. Muito obrigada. Amo vocês!

Às minhas irmãs, Lisiane e Tassiana, pelo exemplo, carinho, compreensão pelas ausências e total incentivo. Love you sis!

Aos moleques mais lindos, meus sobrinhos, que mesmo longe me deram forças pra continuar, me proporcionaram a oportunidade de ser exemplo, de não desistir! Obrigada por todo amor e folia.

Aos meus bebês, Todi e Lupi, que estão comigo há muito tempo mostrando o real sentido de cumplicidade, amor e alegria.

Aos colegas e amigos de laboratório, pelo auxílio, pelos puxões de orelha e também por compartilhar conhecimentos, angústias e alegrias no dia-a-dia.

À Vê, que no início da minha caminhada me ensinou muito “o que fazer”, mas principalmente “o que não fazer”. Obrigada!

À Thiele, pelo auxílio prestado principalmente nos experimentos de fluorescência, além de todos os momentos de descontração.

À Adri, nossa mãezona, muito obrigada pelo exemplo de vida, pelos sorrisos de toda manhã, por todo auxílio prestado e por todos os bons momentos.

À técnica Daiane, por todo auxílio, incentivo e amizade.

À Daniela Dal-Secco, pelo auxílio prestado nos experimentos.

Ao Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos e a Prof. Dra. Áurea Elizabeth Linder, que abriram a porta de seus laboratórios e permitiram o uso de equipamentos essenciais para a realização deste trabalho.

Aos amigos que a pós-graduação me proporcionou, destacando aqui os colegas do LabCARDIO, obrigada por todo apoio sempre.

À querida amiga Angélica, pela atenção, carinho, cumplicidade e imprescindível auxílio durante os experimentos com órgão isolado.

À todos os funcionários do LAMEB.

Às minhas queridas amigas Vero, Samara, Vane, Nathi, Juli, Angela e Aline, por toda amizade, apoio e por fazerem parte da minha vida tanto tempo, tornando tudo mais leve. Obrigada meninas!

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, pela contribuição em minha formação e por todo auxílio prestado.

Ao professor Dr. Antonio de Pádua Carobrez, pela atenção e dedicação durante o Estágio Supervisionado em Docência do Programa.

Aos funcionários do Biotério pelo belo e importante trabalho que executam para manter a saúde dos animais para experimento.

Aos demais familiares e amigos que torceram por mim.

Aos professores Dr. André Sampaio Pupo e Dr. José Eduardo da Silva Santos e aos pós-doutorandos Dra. Verônica Vargas Horewicz e Dr. Eduardo Souza Silva, que aceitaram avaliar esse trabalho de conclusão de mestrado.

Ao CNPq e CAPES pelo apoio financeiro.

“Não é a paisagem que é pequena, é a janela através da qual olhamos para ela.”

(provérbio tibetano)

RESUMO

Apesar dos cuidados aos pacientes em estado crítico e do conhecimento sobre os mecanismos fisiopatológicos terem progredido significativamente nos últimos 50 anos, a mortalidade associada com a sepse permanece ainda muito alta. Sepse induz disfunção cardiovascular que é caracterizada por hipotensão e hiporresponsividade à vasoconstritores. Vários mecanismos parecem estar associados à esta disfunção e, mais especificamente, ao aspecto vascular. Dados prévios do laboratório demonstraram que a reatividade vascular prejudicada está associada com uma diminuição da densidade de receptores adrenérgicos, particularmente o subtipo alfa em tecidos vasculares. Partindo do racional efeito aparentemente paradoxal do uso de betabloqueadores na falência cardíaca, o presente estudo teve como objetivo avaliar se o bloqueio alfa-1 adrenérgico poderia ter impacto positivo no quadro geral de camundongos submetidos ao CLP, um modelo de sepse experimental. A resposta vasoconstritora para fenilefrina em anéis de aorta foi reduzida 24 h após CLP. O tratamento dos animais com prazosina ou doxazosina 1 mg/Kg 12 h após o CLP restaurou a reatividade dos anéis para fenilefrina. Dose maiores (5 mg/Kg) ou em tempos mais precoces (1 h após procedimento de CLP) não mostraram o efeito benéfico. O tratamento positivo também melhorou a hipotensão (medida com o animal acordado) da sepse, bem como melhorou índices de dano à órgãos. Por outro lado, o tratamento não causou alteração na mortalidade. Não foi observada uma diferença estatística na densidade de receptores alfa-1 adrenérgicos na aorta, porém possíveis explicações para o efeito benéfico dos bloqueadores alfa incluem melhora na transdução do sinal induzido pelo receptor alfa adrenérgico, reacoplamento de receptores aos sistemas de transdução de sinal ou outro mecanismo. Independente do mecanismo farmacológico, os achados sugerem que o bloqueio de receptores alfa-1 adrenérgicos induzido por prazosina ou doxazosina restaura a reatividade vascular, melhora a hipotensão e índices de danos de órgãos em animais sépticos.

Palavras-chave: sepse; receptor $\alpha 1$ adrenérgico; disfunção cardiovascular; cloridrato de prazosina.

ABSTRACT

In spite of the substantial increase in knowledge and care to critical patients in the last 50 years, sepsis-associated mortality still is very high. Cardiovascular dysfunction induced by sepsis includes hypotension and hyporesponsiveness to vasoconstrictors. Several mechanisms seem to underlie this dysfunction particularly in the vascular aspect. Previous data from our and other laboratories have shown that the reduction in the vascular reactivity is associated with a reduction in alpha adrenergic receptor density in the vascular tissue. Considering the rationale of the (paradoxical) benefits of beta blockage in cardiac failure, the present study was undertaken to evaluate the putative positive impact of alpha-1 adrenergic blockage in the condition of mice bearing experimental sepsis, induced by cecal ligation and puncture (CLP). The vasoconstrictor effect of phenylephrine in aorta rings was reduced 24 h after CLP. The treatment of animals with prazosin or doxazosin 1 mg/Kg 12 h after sepsis induction rescued the response of vessel rings back to normal levels. Higher dosage (5 mg/kg) or smaller intervals (1 h after CLP surgery) did not exhibit the beneficial effect. The treatment also improved the hypotension of septic animals (measured in awaken mice) and organ damage indexes. However, the mortality was unaltered. No statistical difference was observed in the density of alpha-1 adrenergic receptors in the aorta, however it might be that the beneficial effect of alpha blockage includes an improved signal transduction, a recoupling between receptor and signal transduction systems or other mechanism. Notwithstanding the pharmacological mechanism, our data suggest that the blockage of alpha-1 adrenergic receptors with prazosin or doxazosin recovers the vascular reactivity and improves hypotension and organ damage indexes of septic animals.

Keywords: sepsis; α 1 adrenergic receptors; cardiovascular dysfunction; prazosin hydrochloride.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeito da prazosina e doxazosina sobre reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos sépticos.....	52
Figura 2 - Efeito da prazosina e doxazosina sobre reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos sépticos.....	54
Figura 3 – Efeito da prazosina e doxazosina sobre reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos sépticos.....	56
Figura 4 – Efeito da prazosina e doxazosina sobre a pressão arterial de camundongos sépticos.....	58
Figura 5 – Efeito da prazosina sobre marcador bioquímico de dano cardíaco em camundongos sépticos.....	59
Figura 6 – Efeito da prazosina sobre marcador bioquímico de dano hepático em camundongos sépticos.....	60
Figura 7 – Seletividade do composto QAPB para receptores $\alpha 1$ adrenérgicos em aorta de camundongos.....	61
Figura 8 – Seletividade do composto QAPB para receptores $\alpha 1$ adrenérgicos em aorta de camundongos.....	61
Figura 9 – Ensaio de ligação para receptores $\alpha 1$ adrenérgicos (BODIPY FL-prazosin - QAPB) em aorta de camundongo.....	62
Figura 10 – Ensaio de ligação para receptores $\alpha 1$ adrenérgicos (BODIPY FL-prazosin - QAPB) em aorta de camundongo.....	63
Figura 11 – Efeito da prazosina e doxazosina sobre mortalidade em camundongos sépticos.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação sequencial de falência de órgãos – SOFA.....	29
Tabela 2 - Reatividade vascular da artéria aorta do grupo controle, CLP e CLP tratado com prazosina ou doxazosina 1mg/Kg 12 h após CLP.....	53
Tabela 3 - Reatividade vascular da artéria aorta do grupo controle, CLP e CLP tratado com prazosina ou doxazosina 5mg/Kg 12 h após CLP.....	55
Tabela 4 - Reatividade vascular da artéria aorta do grupo controle, CLP e CLP tratado com prazosina ou doxazosina 1mg/Kg 1 h após CLP.....	57

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 – Protocolos experimentais para medida da reatividade vascular <i>in vitro</i>	46
Esquema 2 – Protocolo experimental para aferição da pressão arterial por pletismografia de cauda	47
Esquema 3 – Protocolo experimental para avaliação da densidade de receptores α_1 adrenérgicos em aorta de animais sépticos.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α 1-AR	Receptores alfa 1 adrenérgicos
ARs	Receptores adrenérgicos
AF	Autofluorescência
ALT	Alaninaaminotransferase
cAMP	Monofosfato cíclico de adenosina
AST	Aspartatoaminotransferase
Ca ²⁺	Íons cálcio
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CLP	Ligadura e perfuração do ceco
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DOXA	Cloridrato de doxazosina
E. P. M.	Erro padrão da média
GCs	Guanilato ciclase solúvel
cGMP	Guanosina monofosfato cíclica
GPCR	Receptores acoplados a proteína G (do inglês; G Protein-Coupled Receptor)
GTP	Guanosinatrifosfato
IC	Insuficiência cardíaca
i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	Inositoltrisfosfato
mmHg	Milímetros de mercúrio
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NO	Óxido nítrico (do inglês <i>Nitric Oxide</i>)
NOS	Óxido nítrico sintase
i NOS	Óxido nítrico sintase induzida
LPS	Lipopolissacarídeo
PAM	Pressão arterial média
PBS	Salina tamponada com fosfato
PFA	Paraformaldeído tamponado
PNF	Prazosina não fluorescente
PRZ	Cloridrato de prazosina
QAPB	BODIPY® FL prazosina
s.c.	Subcutâneo
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SNS	Sistema nervoso simpático
SOFA	Avaliação sequencial de falência de órgãos (do inglês, <i>Sequential Organ Failure Assessment</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	25
1.1	SEPSE.....	25
1.1.1	Histórico.....	25
1.1.1.1	Sepse na antiguidade.....	25
1.1.1.2	Primeiros trabalhos sobre transmissão de doenças infecciosas.....	26
1.1.1.3	A era de ouro sobre a teoria dos germes.....	26
1.1.1.4	Os primeiros antibióticos.....	27
1.1.1.5	Descobertas importantes dos sistemas afetados na sepse.....	27
1.1.2	Conceito.....	28
1.1.3	Epidemiologia.....	30
1.1.4	Fisiopatologia.....	31
1.2	SISTEMA CARDIOVASCULAR NA SEPSE.....	33
1.3	RECEPTOR $\alpha 1$ ADRENÉRGICO.....	36
1.4	JUSTIFICATIVA.....	40
1.5	HIPÓTESE DE TRABALHO.....	40
2.	OBJETIVOS.....	41
2.1	OBJETIVO GERAL.....	41
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3.	MATERIAL E METODOS.....	43
3.1	ANIMAIS E RANDOMIZAÇÃO.....	43
3.2	MODELO EXPERIMENTAL: INDUÇÃO DA SEPSE POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP).....	43
3.3	AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA.....	44
3.4	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i> : REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA ISOLADOS.....	45
3.4.1	Remoção, preparação e montagem dos anéis de aorta em banho de órgão isolado.....	45
3.4.2	Protocolos experimentais.....	46
3.5	MEDIDA DE PRESSÃO ARTERIAL EM ANIMAIS ACORDADOS.....	47
3.6	DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	48
3.6.1	Creatina cinase fração MB (CK-MB).....	48
3.6.2	Dosagem de Alanina Transaminase (ALT).....	48
3.7	ANÁLISES MOLECULARES.....	49
3.7.1	Ensaio de ligação de receptor $\alpha 1$ adrenérgico.....	49
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
4.	RESULTADOS.....	51
4.1	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE À FENILEFRINA EM ANÉIS DE AORTA DE ANIMAIS SÉPTICOS TRATADOS COM PRAZOSINA E DOXAZOSINA.....	51
4.1.1	Tratamento 12 h após CLP com 1mg/Kg de prazosina ou doxazosina.....	51

4.1.2	Tratamento 12 h após CLP com 5mg/Kg de prazosina ou doxazosina.....	53
4.1.3	Tratamento 1 h após CLP com 1mg/Kg de prazosina ou doxazosina.....	55
4.2	EFEITO DO TRATAMENTO COM PRAZOSINA E DOXAZOSINA SOBRE PARAMETROS CARDIOVASCULARES.....	57
4.2.1	Mensuração da pressão arterial por pletismografia de cauda.....	57
4.3	EFEITO DA PRAZOSINA SOBRE DANO DE ÓRGÃOS..	58
4.3.1	Mensuração dos níveis de CK-MB.....	58
4.3.2	Mensuração dos níveis de ALT.....	59
4.4	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTOR α_1-ADRENÉRGICO EM AORTA.....	60
4.5	AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA.....	63
5.	DISCUSSÃO.....	65
6.	CONCLUSÃO.....	72
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	73

1. INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

1.1.1 Histórico

1.1.1.1 Sepsis na antiguidade

O termo sepsis originou-se do grego *sêpsis*, cujo significado é putrefação, referindo-se à decomposição animal, vegetal ou orgânica causada na presença de bactéria (GEROULANOS e DOUKA, 2006).

Desde 700 a.C. a palavra sepsis já era citada por Homero em seus poemas, onde seria derivada do verbo “sepo” que tem por significado “eu apodreço”. Hipócrates, um médico e filósofo da época, a descreveu como perigosa, uma “deterioração biológica” que poderia ocorrer no organismo (GEROULANOS e DOUKA, 2006). Ele foi, inclusive, um dos primeiros a examinar propriedades antissépticas de potenciais compostos medicinais como o álcool presente no vinho e o vinagre (FUNK et al., 2009).

Galeno, um médico e filósofo de origem grega cuja prática era dedicada principalmente à drenagem de abscessos, que teorizou que a formação de pus era fundamental para a cura dos tecidos lesados, foi outra figura histórica importante no estudo de teorias da sepsis, e foi considerado o fundador da fisiologia experimental. Porém sua verdadeira paixão era criar medicamentos para tratar doenças, tanto que sua coleção de medicamentos (chamado na época de apotheca) foi o precursor da “farmácia atual”. Na época, ele criou o “theriac”, mistura de mais de 70 substâncias utilizado para tratamento de várias desordens como envenenamento e inflamações por exemplo. Galeno contribuiu para a ciência médica mais do que qualquer outro homem e sua filosofia médica ainda persiste e contribui para a base filosófica da medicina atual (FUNK et al., 2009; THURSTON, 2000).

Já os romanos acreditavam que a sepsis resultava da ação de criaturas invisíveis, oriundas dos pântanos, que emitiam gases pútridos. Estes seres eram chamados de “miasma” ou “miasmata”. Um dos eventos impactantes ocorridos no século XIV foi a epidemia da peste, que em sua forma septicêmica dizimou um terço da população europeia (FUNK et al., 2009).

1.1.1.2 Primeiros trabalhos sobre transmissão de doenças infecciosas

Marcus Terentius Varro, um escritor da época, era considerado o homem mais sábio de todos os lugares, pois escrevia seus livros sobre assuntos diversos, variando entre línguas, direito, filosofia, agricultura, poesia, teatro, negócios urbanos e até mesmo mares dos oceanos. Em seu livro “*De re rustica libri III*”, um dos principais do autor, foi o primeiro a articular a noção de contágio. Ele sugeriu que “pequenas criaturas invisíveis aos olhos estão presentes na atmosfera e ao serem inaladas provocam doenças perigosas”. Em 1546, Hieronymus Fracastorius apresentou, através do tratado “*De contagione et contagiosis morbis*”, o que conhecemos hoje como a “teoria dos germes”. Ele teorizou três tipos de contágio: por contato direto, indireto por artigos infectados e por distância (pelo ar) (THURSTON, 2000).

Anthony van Leeuwenhoek, que não possuía nenhuma formação médica ou científica, construiu seu próprio microscópio e fez uma série de descobertas que auxiliaram no avanço dos estudos de doenças infecciosas. Foi em 1674 que realizou a primeira descrição das formas esferas, hastes e espirais (cocos, bacilos e espiroquetas) dos microrganismos, abrindo assim caminho para que outros cientistas desenvolvessem a teoria dos germes (FUNK et al., 2009).

1.1.1.3 A era de ouro sobre a teoria dos germes

O século XIX introduziu uma era de crescimento exponencial no entendimento sobre a origem e transmissão de doenças infecciosas. Alguns médicos da época contribuíram para os avanços na compreensão da origem da sepse, como Joseph Lister, Louis Pasteur, Robert Koch e Ignaz Semmelweiss (FUNK et al., 2009). Semmelweiss trabalhava em uma maternidade e observou a ocorrência de várias mortes por febre pós-parto, o que na época foi chamado de sepse puerperal (DE COSTA, 2002). Curiosamente, isso ocorria mais quando as mulheres eram atendidas por residentes do que aquelas assistidas por parteiras. Foi constatado que os residentes realizavam a autópsia das mulheres falecidas no dia anterior e não lavavam as mãos antes de fazer os partos. Esta observação fez com que Semmelweiss instituisse uma política de lavagem de mãos e os casos de sepse diminuíram consideravelmente. Apesar dos ótimos resultados obtidos, os demais médicos não aceitaram esta política e Semmelweiss foi despedido. Anos mais tarde, morreu de sepse após laceração de um dedo. De modo irônico, acabou morrendo de

uma doença contra a qual tanto lutou (BARON et al. 2006; FUNK et al., 2009).

Foi no ano de 1878 que Pasteur apresentou a “Teoria dos Germes” para a academia francesa de Medicina e demonstrou que a responsável pela sepsé puerperal era o estreptococo. Neste mesmo período, os pesquisadores Robert Koch, Julius Petri, Erns von Bergmann e Curt Schimmelbusch tiveram grande participação acerca de técnicas de desinfecção e esterilização, as quais contribuíram para avanços significativos na mudança de paradigma sob a forma como a sepsé era vista (FUNK et al., 2009).

1.1.1.4 Os primeiros antibióticos

A era da “antibioticoterapia” moderna começou com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928. Porém antes disso, em 1907, Paul Erlich descobriu um composto que foi chamado na época “salvarsan”, que continha arsênico e era capaz de matar bactérias, e logo, já em 1910, começou a ser utilizado para tratamento da sífilis (THURSTON, 2000). A descoberta da penicilina por Fleming foi “ao acaso”. Ao estudar as propriedades de estafilococos, ele percebeu que não houve crescimento de bactérias nas placas que haviam sido acidentalmente contaminadas com um fungo, o *Penicillium notatum*, percebendo rapidamente que este fungo era capaz de inibir o crescimento bacteriano. Ele chamou esta substância de penicilina e publicou seu trabalho em 1929. Porém, Fleming não achou que isso seria uma contribuição muito relevante para o tratamento de infecções. Interessados, Ernest Chain e Howard Florey, um químico e um patologista respectivamente, estudaram este trabalho e conseguiram não apenas purificar a substância, o que estava sendo difícil para Fleming, mas também a produzir em massa (FUNK et al., 2009). Pela descoberta da penicilina e seus efeitos curativos em várias doenças infecciosas, Fleming, Chain e Florey receberam o prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1945 (FLEMING, 1945). Trinta anos depois surgiram as “sulfas” como agentes antimicrobianos (THURSTON, 2000).

1.1.1.5 Descobertas importantes dos sistemas afetados na sepsé

Desde muito cedo, no início da descrição de doenças infecciosas, há uma controvérsia sobre o verdadeiro mecanismo pelo qual a sepsé leva à morte. Como já mencionado, tais debates datam de tempos remotos, desde a época de Galeno e Hipócrates. Com base nas teorias já

existentes, iniciou-se uma busca pelos mecanismos de ação envolvidos na patologia da sepse. Seguiram-se diversos estudos relativos a elementos envolvidos na patologia da sepse, como a descoberta do papel da endotoxina bacteriana (revisado em BEUTLER e RIETSCHER, 2003), o sistema de coagulação, as citocinas, chegando finalmente na descoberta do óxido nítrico (NO), o qual foi primeiramente chamado EDRF (fator de relaxamento dependente de endotélio, do inglês *endothelial-derived relaxing factor*) por Robert Furchgott, o qual demonstrou que o EDRF causava o relaxamento da musculatura lisa (FURCHGOTT, 1980). Em 1986, Furchgott e Ignarro e colaboradores sugeriram que o EDRF poderia ser NO (FURCHGOTT 1988; IGNARRO et al., 1988). No ano de 1987, Moncada e colaboradores mostraram definitivamente que o EDRF era o NO (Moncada et al., 1988). Em 1998, Furchgott, Ignarro e Murad ganharam o prêmio Nobel de Medicina, pela sua participação na descoberta do NO e seu impacto na vasculatura.

1.1.2 Conceito

Atualmente, a sepse é definida como uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta imune desregulada frente a uma infecção (SINGER et al., 2016). Porém, por muitos anos existiu uma pluralidade de definições para sepse. Visando melhoras tanto na assistência quanto na área de pesquisas, a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e o *American College of Chest Physicians* (ACCP) reuniram-se para fazer modificações e esclarecer os conceitos. Ficou então definido Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica como um conjunto de manifestações clínicas em resposta a uma agressão na ausência de infecção, com a presença de dois ou mais dos sintomas: temperatura central $> 38,3^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; frequência cardíaca > 90 bpm; frequência respiratória > 20 rpm ou $\text{PaCO}_2 < 32$ mmHg ou necessidade de ventilação mecânica; leucócitos totais $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4.000/\text{mm}^3$ ou presença de formas jovens $> 10\%$; sepse como SRIS secundária a processo infeccioso confirmado ou suspeito, sem necessidade da identificação do agente infeccioso, enquanto a sepse grave seria presença dos critérios de sepse associada à disfunção orgânica ou sinais de hipoperfusão: hipotensão, hipoxemia, acidose láctica, oligúria e alteração aguda do estado mental; e choque séptico como estado de falência circulatória aguda caracterizada pela persistência de hipotensão arterial em paciente séptico, sendo hipotensão definida como pressão arterial sistólica < 90 mmHg, redução da linha de base > 40 mmHg, ou

pressão arterial média < 60 mmHg, a despeito de adequada reposição volêmica, com necessidade de vasopressores, na ausência de outras causas de hipotensão (SHORR et al., 2007).

Em 2016, após revisão, a Sociedade da Medicina Intensiva (SCCM) e a Sociedade Européia de Medicina Intensiva (ESICM), publicaram novas definições onde houve uma mudança conceitual (SINGER et al., 2016). A expressão sepse grave foi extinta, pois todos os casos de sepse devem ser considerados como doença grave, sendo utilizada agora apenas sepse, que passa a ser restrito aos pacientes já com disfunção orgânica e definida como “disfunção orgânica ameaçadora a vida secundária a resposta desregulada do hospedeiro a uma infecção”. Disfunção orgânica agora é definida quando o paciente apresenta aumento em 2 pontos no Avaliação Sequencial de Falência de Órgãos (SOFA). O SOFA, conforme tabela 1, quantifica anormalidades de acordo com achados clínicos, dados laboratoriais ou intervenções terapêuticas, e pode ser utilizado para estimar a gravidade da disfunção de órgãos (WIERSINGA et al., 2017).

Tabela 1: Avaliação sequencial de falência de órgãos - SOFA

Sistema	Pontuação				
	0	1	2	3	4
Respiratório PaO2/FIO2	≥400	>400	<300	<200 com suporte respiratório	<100 com suporte respiratório
Coagulação Plaquetas ×103 /μL	≥150	<150	<100	<50	<20
Hepático Bilirrubina Mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-5.9	6.0-11.9	>12.0
Cardiovascular	PAM≥70 mm Hg	PAM<70 mm Hg	Dopamina <5 ou dobutamina qualquer dose ^a	Dopamina 5.1-15 ou epinefrina ou norepinefrina ≤ 0.1 ^a	Dopamina< 15 ou epinefrina ou norepinefrina < 0.1 ^a
SNC (Escala de coma de Glasgow) ^b	15	13-14	10-12	6-9	<6
Renal Creatinina mg/dL	<1.2	1.2-1.9	2.0-3.4	3.5-4.9	>5.0
Diurese ml/dL				<500	<200

Abreviações: PaO2, pressão arterial de oxigênio; FIO2, fração inspirada de oxigênio; PAM, pressão arterial média; SNC, sistema nervoso central.

^{a)} Doses de catecolaminas dadas em $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min}$ por pelo menos 1 h. ^{b)} Escala de coma de Glasgow: pontuação de 3 a 15; alta pontuação indica melhor função neurológica

Adaptada de SINGER et al., 2016.

Mais simples que o SOFA, uma nova medida chamada *qSOFA* (do inglês *quick SOFA*), foi desenvolvida. É mais rápida, não requer exames laboratoriais e permite uma triagem dos pacientes que podem desenvolver uma infecção, tornando-se muito útil na beira do leito. Essa ferramenta engloba pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg, frequência respiratória maior ou igual a 22/min e diminuição da consciência (Escala de Coma de Glasgow < 15) (SINGER et al., 2016).

Ainda de acordo com o 3º Consenso Internacional para definição da sepse, o uso de dois ou mais critérios de SIRS para identificar a sepse foi considerado obsoleto, pois muitos pacientes hospitalizados apresentam sinais de SIRS sem nunca desenvolver uma infecção, enquanto alguns pacientes com infecção e falência de órgãos não apresentam dois ou mais sinais de SIRS para definir como sepse.

Também houve alteração na definição de choque séptico, onde agora foi incluído presença de hipotensão com necessidade de vasopressores para manter PAM ≥ 65 mmHg associada à lactato ≥ 2 mmol/L, após adequada ressuscitação volêmica (SINGER et al., 2016).

1.1.3 Epidemiologia

Sepse pode ser causada por vírus, fungos, protozoários ou bactérias tanto Gram positivas quanto Gram negativas. Os principais exemplos de bactérias *gram* positivas *S. aureus* e Enterococcus, e *gram* negativas *E. coli*, Enterobacter, Pseudomonas, Proteus, Acinetobacter e Klebsiella, são isoladas na maioria dos casos de pacientes com sepse. Em alguns casos, múltiplas bactérias podem ser responsáveis (SRISKANDAN e COHEN, 1995; RIVERS et al., 2005).

Atualmente, ocorre cerca de 18 milhões de casos por ano em todo o mundo e, apesar dos avanços nos cuidados intensivos e suporte tecnológico, e assim a mortalidade relacionada a esta condição ter diminuído, a sepse continua a ser a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTI), variando entre 20 a 80% de mortalidade. Essas taxas variam, essencialmente, de acordo com as características socioeconômicas do país (CHENG et al., 2015).

No Brasil, pesquisas lideradas pelo ILAS (Instituto Latino Americano da Sepse) mostram uma realidade alarmante: cerca de 30%

dos leitos das unidades de terapia intensiva são ocupados por pacientes com sepse grave e a taxa de mortalidade pode chegar a 55% dos pacientes que apresentam sepse em UTI.

Estima-se que no Brasil, os custos associados ao tratamento da sepse são de aproximadamente US\$ 9,6 mil por paciente (SOGAYAR, 2008). Estudos realizados tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos sugerem que entre 20% a 40% do custo total das UTI resulta de cuidados a pacientes com sepse, que estão relacionados com a gravidade e tempo de internação (GAIESKI et al., 2013; ILAS, 2016). Ano a ano, mais casos de sepse estão sendo reportados, provavelmente pelo fato do envelhecimento da população com mais co-morbididades e maior reconhecimento da doença.

Outro estudo realizado pelo ILAS demonstra que, no Brasil, a letalidade global da sepse está em torno de 46%, sendo que destes, 58,5% da letalidade está em instituições públicas comparado com 34,5% em privadas. Esse é um dado muito alarmante, pois muitas pessoas possuem acesso apenas ao sistema público de saúde.

Existem três eixos principais para que o quadro geral de sepse no Brasil seja melhorado. Primeiro está relacionado à ciência, procurando melhor conhecimento da doença e suas consequências. O segundo refere-se a ações políticas e o terceiro está voltado para aumentar a percepção sobre a gravidade da doença tanto para leigos como profissionais da saúde (ILAS, 2016).

1.1.4 Fisiopatologia

A sepse ocorre por uma resposta excessiva e irregular do hospedeiro contra uma infecção. Por muitos anos se acreditava que a invasão do patógeno era a responsável pelos danos ocorridos em virtude da sepse, porém hoje em dia já se sabe que isso ocorre principalmente devido a uma resposta incontrolável e exagerada do hospedeiro (SCHOUTEN et al., 2008; MERMUTLUOGLU et al., 2016).

A resposta do hospedeiro a uma infecção inicia quando células do sistema imune inato, principalmente macrófagos, mas também células dendríticas e neutrófilos, reconhecem e se ligam em componentes microbianos. Os PRRs (do inglês *pattern recognition receptors*) das células de defesa, tendo como principal a família dos receptores *toll like* (TLRs), podem reconhecer e se ligar aos PAMPs (do inglês *pathogen-associated molecular patterns*) dos microrganismos (CHEN e NUÑEZ, 2010), iniciando uma cascata de eventos resultando na fagocitose do patógeno ou seus produtos, e morte da bactéria. Esse processo leva a

ativação de um conjunto de genes levando a síntese de proteínas e cascata de sinalização (MEDZHITOV, 2001; NAU et al., 2002), que culmina na ativação de NF- κ B (do inglês *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*), tendo por consequência uma supra-regulação de genes pró-inflamatórios (HOESEL e SCHMID, 2013).

A resposta inflamatória na sepse é altamente influenciada por uma mistura de mediadores pró e anti-inflamatórios. As moléculas de sinalização induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucina-1 beta (IL-1 β), quimiocinas, como por exemplo, molécula de adesão intracelular-1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), e óxido nítrico, radicais livres de oxigênio, levando ao recrutamento de outras células inflamatórias, como neutrófilos, ao sítio da infecção, assim como a produção de interleucinas anti-inflamatórias como a interleucina-10 (IL-10) e indução de várias moléculas efetoras como a enzima óxido nítrico sintase induzida. Há também alterações importantes dos processos de coagulação e fibrinólise (van DER POLL e LOWRY, 1995; THOMAS et al., 2001).

O equilíbrio entre as respostas pró- e anti-inflamatórias define o estado imune geral, e um desequilíbrio entre esses mecanismos irá descontrolar a homeostasia e levar ao estado clínico da doença (BONE, 1996; SCHULTE et al., 2013). Tipicamente, a resposta imune inicial durante a sepse é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios em resposta a uma infecção de maneira exagerada, ultrapassando os limites de resposta locais, levando a uma resposta sistêmica, com produção incontrolável de mediadores pró-inflamatórios, as chamadas “tempestades de citocinas” (RITTIRSCH et al., 2008; PARRISH et al., 2008). Isso leva aos sinais clínicos de febre, taquicardia, taquipnéia, hipotensão, falência múltipla dos órgãos e morte (COHEN, 2002; ANNANE et al., 2005; BOSMANN e WARD, 2013). Apenas em uma minoria de casos, a resposta anti-inflamatória é predominante (MARIK e FLEMMER, 2012).

Acredita-se que a resposta imune generalizada seja o precursor da disfunção orgânica. Basicamente temos alterações celulares e circulatórias, tanto na circulação sistêmica como na microcirculação. Vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar são as principais alterações circulatórias, contribuindo para a hipotensão.

Mecanismos de lesão celular incluem isquemia tecidual, lesão citopática e uma taxa de apoptose alterada, resultando em lesão endotelial, trombose microvascular, lacunas entre as células endoteliais

(TAEB et al., 2017). Disfunção endotelial é importante nesse quadro, pois leva à hipotensão, perfusão inadequada dos órgãos, choque e morte (ANGUS e van DER POLL, 2013).

A combinação destes mecanismos contribui para redução da densidade capilar funcional, anormalidades no fluxo sanguíneo microcirculatório, aumento da permeabilidade capilar e trombose na microcirculação. Todos esses acontecimentos contribuem para a redução da oferta tecidual de oxigênio, com aumento de metabolismo anaeróbico e hiperlactatemia, levando à disfunção orgânica (TAEB et al., 2017). Nenhum sistema de órgãos está protegido das consequências da sepse.

1.2 SISTEMA CARDIOVASCULAR NA SEPSE

Desde os anos 80, já foi reconhecido que a sepse afeta o sistema cardiovascular, podendo causar insuficiência circulatória aguda. A disfunção cardiovascular é, inclusive, considerada a manifestação mais grave do quadro séptico (PARKER et al., 1984).

O sistema vascular é composto principalmente pela aorta e suas ramificações primárias. O sangue é ejetado a cada batimento cardíaco do ventrículo esquerdo para a aorta, de onde flui rapidamente para os órgãos através das grandes artérias de condução. As artérias são vasos eferentes em relação ao coração, e diminuem de calibre à medida que se ramificam distalmente com término nos vasos capilares, onde ocorrem trocas gasosas e de nutrientes (RANG, 2007c; DE SOUZA, 2010).

O controle da pressão sanguínea é determinado por mecanismos diversos. Dentre eles, temos o controle mediado pelo tônus vascular, isto é, pela contratilidade das células do músculo liso da parede dos vasos através do aumento de cálcio intracelular (LEVY et al., 2010). Esse aumento de cálcio pode se dar basicamente pela ação de ligantes neurais ou hormonais como noradrenalina ou angiotensina II via receptores de membrana específicos ou ainda pela mudança no potencial de membrana destas células, pois quando ocorre a despolarização, canais de cálcio voltagem dependente se abrem e ocorre o influxo de cálcio extracelular para o meio intracelular (OGUT e BROZOVICH, 2003; LEVY et al., 2010).

Já o relaxamento das células do músculo liso dos vasos ocorre pela diminuição da concentração de cálcio citoplasmático, que pode ocorrer por expulsão do meio intracelular para o meio extracelular ou pela recaptação pelo retículo sarcoplasmático. Mediadores como o óxido nítrico, acetilcolina, serotonina e histamina levam à ativação de

guanilato ciclase e adenilato ciclase, que provocam um aumento de cGMP e cAMP respectivamente, levando ao relaxamento do vaso (LEVY et al., 2010).

Sabe-se que pacientes em choque apresentam elevados níveis de nitrito/nitrato, que são compostos estáveis gerados a partir do NO, e este excesso de produção de NO, induzido principalmente por uma isoforma de NOS independente de Ca^{2+} , a iNOS, parece ser o principal responsável pela hiporreatividade vascular observada na sepse (FERNANDES e ASSREUY, 2008; SHARAWY, 2014). Há uma grande quantidade de dados implicando o NO como um mediador chave na disfunção cardiovascular durante a sepse e choque séptico (para revisão ver ASSREUY, 2006). Isso associado com a diminuição do tônus vascular parecem ser os fatores mais importantes na fisiopatologia desse quadro (COHN et al., 2008; SHARAWY, 2014).

NO produzido pelo endotélio ou pelo próprio músculo liso se difunde para o músculo liso vascular adjacente induzindo vasodilatação por estimular a guanilato ciclase solúvel, resultando em aumento da concentração de cGMP, principalmente na fase tardia da sepse. Isso pode ser confirmado através de trabalhos que, ao inibir GCs, promoveram melhora na responsividade aos vasoconstritores em modelo animal (REES et al., 1998; FERNANDES et al., 2006; FERNANDES et al., 2009).

Além da GCs, outro sistema enzimático importante em mecanismos de contração/relaxamento é o do Rho-A/Rho cinase (ROCK), onde a ativação da Rho-A, que é uma proteína envolvida na contração vascular, estimula ROCK promove a fosforilação da cadeia leve de miosina através da fosforilação, e conseqüentemente inativação de sua fosfatase, favorecendo sua interação actina/miosina e contração celular (AMANO et al., 1996). A sepse pode estar alterando também esta via, pois foi demonstrado que o cGMP produzido via NO inibe este sistema, o que também poderia contribuir para a vasodilatação ou hiporreatividade vascular (DA SILVA-SANTOS et al., 2009).

O prejuízo da reatividade vascular, com desequilíbrio entre o tônus vasoconstritor e vasodilatador, levará a uma perfusão heterogênea, que pode alterar o fluxo sanguíneo para órgãos vitais, de modo que a fálência, culminando muitas vezes na morte do paciente, poderá ocorrer (MATSUDA e HATTORI, 2007).

Hiporreatividade vascular na sepse é um evento multifatorial e pode ser observada experimentalmente em vasos isolados, expondo-os a agentes vasopressores, ou na clínica. Neste último caso, a hiporreatividade vascular é definida por um menor aumento da pressão

sanguínea do paciente hipotenso (ANNANE et al., 2005). A hipotensão associada ao choque séptico é refratária e necessita administração de agentes vasopressores para manter a pressão arterial dentro dos níveis normais, mesmo que seja observado, em pacientes nesse quadro, um grande aumento na concentração endógena de noradrenalina (BENEDICT e ROSE, 1992).

Os mecanismos fundamentais da hipotensão na sepse não estão plenamente compreendidos, porém sabe-se que ela pode ser consequência de três desordens hemodinâmicas: hipovolemia, disfunção vascular (redução da resistência vascular sistêmica) ou cardíaca (MERX e WEBER, 2007), e é secundária à vasodilatação, apesar da administração de vasoconstritores adrenérgicos, e diminuição nas pressões de enchimento das câmaras cardíacas (LEVIN et al., 2009; SHARAWY, 2014). Entende-se disfunção vascular, neste contexto, a disfunção microvascular, endotelial e diminuição do tônus vasoconstritor assim como hiporresponsividade a agentes vasopressores como catecolaminas, vasopressina, angiotensina II e serotonina (UMANS et al., 1993).

O sistema nervoso autônomo simpático também tem papel importante na regulação do tônus da circulação periférica e assim, sob a pressão arterial. No coração, a atividade simpática altera o débito cardíaco por alterar a frequência cardíaca e o volume sistólico. E nos vasos sanguíneos, o SNS é capaz de modular a resistência periférica total e o retorno venoso através da regulação do tônus vascular, efeito esse mediado pela ação das catecolaminas endógenas, que agem nos diferentes tipos de receptores adrenérgicos encontrados no endotélio e no músculo liso de diferentes leitos vasculares. Elas ativam os receptores $\alpha 1$ adrenérgicos causando contração do músculo liso vascular por exemplo (HOFFMAN e LEFKOWITZ, 1996).

A maioria dos agentes vasoativos usados na clínica tem seu efeito pela interação com receptores adrenérgicos no coração e vasos (TRIPOSKIADIS et al., 2009; BANGASH et al., 2012). As drogas normalmente utilizadas para manter as funções hemodinâmicas em pacientes sépticos são noradrenalina, dopamina e vasopressina (SHARMA e DELLINGER, 2003; KLINZING et al., 2003; VINCENT e BACKER, 2005).

Em muitos casos, porém, a responsividade a esses vasoconstritores está diminuída. Benedict e Rose confirmaram, em um estudo clínico de hiporreatividade vascular em pacientes sépticos, que apesar da terapia de reposição volêmica e dos níveis elevados de catecolaminas endógenas e exógenas e da máxima ativação do sistema

renina-angiotensina-aldosterona, os pacientes ainda permaneciam hipotensos (BENEDICT E ROSE, 1992). Muitos estudos confirmam que pacientes com sepse exibem um aumento nas concentrações circulantes de catecolaminas, resultando em vasoconstrição periférica e taquicardia, e que esta fase é seguida por uma vasodilatação progressiva associada com aumento do débito cardíaco e resistência vascular diminuída e, em alguns casos, vasoplegia.

A vasoplegia, que é considerada o fator chave responsável pela hipotensão irreversível e persistente no quadro de sepse (SHARAWY, 2014), é um dos principais aspectos da fase hipodinâmica da sepse. Lembrando que a sepse é caracterizada por uma fase inicial hiperdinâmica, seguida pela fase hipodinâmica, também conhecida como fase tardia. O modelo de CLP utilizado simula esse quadro natural da sepse observada em humanos (HUBBARD et al., 2005).

Kandasamy e colaboradores demonstraram em um trabalho publicado em 2011, que a vasoplegia na sepse está associada a uma diminuição da expressão de mRNA para o subtipo α_1D em aorta de ratos, e que a constante estimulação dos receptores com vasopressores promove a fosforilação destes receptores causando a dessensibilização (KANDASAMY et al., 2011).

Hosoda e colaboradores demonstraram a presença de α_1A , α_1B e α_1D mRNA em aorta de rato. De acordo com seu estudo, os subtipos responsáveis pela constrição nesse vaso variam de acordo com a expressão de mRNA que é $\alpha_1D > \alpha_1B > \alpha_1A$ (HOSODA et al., 2005).

Os mecanismos que levam à hiporreatividade vascular, à hipotensão e à vasoplegia na sepse ainda não são totalmente entendidos, e conseqüentemente, ainda não há nenhum tratamento efetivo.

1.3 RECEPTOR α_1 ADRENÉRGICO

Os adrenoceptores pertencem a uma família de receptores de membrana, acoplados a proteína G (GPCRs, do inglês, *G Protein Coupled Receptors*), que respondem às catecolaminas, sejam naturais como adrenalina e noradrenalina, importantes mediadores do sistema nervoso simpático, ou sintéticas, como o isoproterenol.

Os receptores adrenérgicos são divididos em duas grandes subcategorias: α e β , que são ainda subdivididos em α_1A , α_1B , α_1D , α_2A , α_2B , α_2C e β_1 , β_2 , β_3 . Receptores α_1 normalmente medeiam respostas no órgão efêtor enquanto α_2 estão localizados principalmente na membrana pré-sináptica e regulam a liberação de neurotransmissores, mas também estão presentes em membranas pós-sinápticas.

Pela sua fundamental participação no controle da pressão arterial, os receptores alfa têm sido muito estudados. Além da pressão arterial, os receptores alfa-adrenérgicos também estão envolvidos na modulação renal, micção, digestão, reprodução, processos endócrinos, metabólicos e comportamentais (DOCHERTY, 1998; RANG et al., 2007a).

Os receptores α_1 estão acoplados à fosfolipase C, gerando assim inositoltrisfosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) como segundos mensageiros, e têm seus efeitos mediados principalmente pela liberação de Ca^{2+} intracelular. Já os receptores α_2 estão negativamente acoplados à adenilato ciclase, promovendo sua inibição, reduzindo assim a formação de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e inibindo canais de cálcio. Já os receptores β agem por estimular adenilato ciclase (RANG et al., 2007b).

Com elevadas concentrações citosólicas, o cálcio forma um complexo com a calmodulina, que é capaz de ativar a enzima responsável pela fosforilação das cadeias (regulatórias) leves de miosina (MLCK, do inglês, *Myosin Light Chain Kinase*). A fosforilação da miosina permite que estas se liguem aos filamentos de actina levando à contração muscular. Ao contrário, o relaxamento ocorre quando vasodilatadores como o NO, por exemplo, ativam a cinase que, interagindo com miosina fosfatase, desfosforila miosina prevenindo a contração (SURKS, 1999; OGUT e BROZOVICH, 2003).

O subtipo $\alpha 1A$ é principalmente encontrado na artéria renal, no ducto deferente, hipocampo e no córtex cerebral de ratos. Por outro lado, receptores do tipo $\alpha 1B$ são expressos principalmente no fígado, baço e coração e córtex cerebral de ratos, bem como em células de linhagem de músculo liso de hamster e de células de linhagem de tireóide de ratos (CALZADA e ARTINANO, 2001). O estudo em seres humanos de Price e colaboradores mostra que o mRNA dos receptores do tipo $\alpha 1A$ predomina, principalmente, no coração, cerebelo, córtex cerebral e próstata. Já para o subtipo $\alpha 1B$, o predomínio ocorre no baço e rins, enquanto que o mRNA para o subtipo $\alpha 1D$ é encontrado em altas concentrações na aorta, pulmão e córtex cerebral de ratos (PRICE et al., 1994). O que temos de ressaltar é que não necessariamente a presença de mRNA está correlacionada com a expressão e função de proteínas.

Os receptores adrenérgicos estão sujeitos a uma regulação dinâmica por uma variedade de mecanismos, incluindo fosforilação, interações proteína-proteína, tráfico de proteínas e transcrição. Um dos mais intensamente estudados desses mecanismos é a dessensibilização (MICHELOTTI et al., 2000).

O termo dessensibilização é utilizado para se referir a uma variedade de processos pelos quais a interação funcional de um receptor e sua proteína G são prejudicadas, e pode ser dividido quanto ao estímulo causal (homólogo ou heterólogo), quanto à duração (rápido – minutos ou lento – horas), e quanto ao mecanismo envolvido (perda da função sinalizadora receptora, redução do número de receptores ou *down-regulation*).

Dessensibilização homóloga refere-se à fosforilação do receptor por cinases acopladas à proteína G (GRK), aumentando a afinidade dos receptores por moléculas de β -arrestina. Essa ligação impede a interação do receptor com a proteína G, inativando-o. A β -arrestina por sua vez, liga-se com alta afinidade às moléculas de clatrina, iniciando a internalização do receptor fosforilado. A arrestina pode ligar-se também à proteína G do receptor constituindo assim uma via de dessensibilização independente de fosforilação (ZHANG, 1996).

Dessensibilização via retroalimentação negativa por segundos mensageiros desencadeados por cinases (PKA e PKC) caracteriza fosforilação heteróloga, uma vez que qualquer estímulo que seja capaz de aumentar AMPc ou diacilglicerol, apresenta potencial para induzir dessensibilização. Há também o processo de dimerização, onde a heterodimerização pode afetar a expressão de receptores na superfície celular, como por exemplo, receptor α_1D adrenérgico normalmente não é expresso na superfície da maioria das células, a não ser que ocorra dimerização com receptores α_1B . Afeta também a taxa de dessensibilização do receptor e efeito dos agonistas na transdução de sinal, resultando em consequências ainda não totalmente estabelecidas na função destes receptores (UBERTI et al. 2005; HAGUE et al. 2006; MCGRAW et al. 2006).

Os dois processos principais envolvidos na dessensibilização de receptores acoplados à proteína G são a mudança no estado funcional (fosforilação) e número de receptores na membrana (internalização) (LOHSE, 1993; RANG et al., 2007a).

Uma variedade de fármacos, doenças e estados fisiológicos estão associados a um aumento ou diminuição de receptores adrenérgicos em células alvo (MAHAN et al., 1987). Um dos casos é o que ocorre na falência cardíaca, onde o aumento da atividade simpática é uma das respostas neuro-humorais mais precoces e um dos fatores mais importantes no remodelamento progressivo que induz ao declínio da função miocárdica e conseqüentemente um mau prognóstico destes pacientes. A ativação simpática eleva a frequência cardíaca, causa vasoconstrição arteriolar, aumento da resistência vascular periférica e

renal, reduz o fluxo sanguíneo e a excreção de sódio, com o consequente aumento das pressões e dos volumes ventriculares. O trabalho cardíaco e o consumo de oxigênio miocárdico aumentam. Além disso, estimulando o crescimento e o estresse oxidativo em células terminais diferenciadas, a noradrenalina pode desencadear apoptose (KANAI, 1997; COMMUNAL et al., 1998).

Se um agonista beta-adrenérgico aumenta a contratilidade, seria esperado um benefício de seu uso na insuficiência cardíaca, pelo aumento na força de contração do músculo cardíaco. Por outro lado, qualquer fármaco que inibisse os receptores beta-adrenérgicos deveria piorar a insuficiência cardíaca. Este foi o pensamento até os primeiros anos da década de 80. Entretanto, a partir dos resultados favoráveis obtidos por um grupo sueco (WAAGSTEIN et al., 1975) na década de 1970 até as conclusões de pesquisas mais recentes, esse dogma já pode ser considerado ultrapassado.

O reconhecimento dos efeitos deletérios do sistema nervoso simpático na disfunção ventricular e a potencialidade da inibição da estimulação simpático-adrenérgica pelo tratamento crônico com betabloqueadores levaram à utilização crescente desses compostos na falência cardíaca. Os betabloqueadores são recomendados com o objetivo de melhorar os sintomas e reduzir o risco de morte e hospitalização nos casos de IC leve a moderada. O tratamento com betabloqueadores deve ser iniciado com a menor dose efetiva, em um intervalo de 12 horas, e aumento gradativamente conforme tolerado.

Sabendo que durante o choque séptico, a hiporresponsividade adrenérgica ocorre principalmente devido à internalização de receptores adrenérgicos (KATO e PINSKY, 2015), o que foi confirmado por dados de nosso laboratório (DAL-SECCO et al., dados não publicados), que também mostram que o comprometimento da reatividade vascular está associado a uma diminuição da abundância de receptores alfa-1 adrenérgicos na aorta durante a fase tardia da sepse, e tendo em vista este efeito paradoxo benéfico do uso de betabloqueadores na insuficiência cardíaca, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito de bloqueadores alfa adrenérgicos em animais submetidos ao modelo de CLP.

1.4 JUSTIFICATIVA

A reatividade vascular a vasoconstritores e vasodilatadores é reduzida após trauma, choque e sepse ou síndrome de disfunção de múltiplos órgãos. Essa redução da reatividade vascular interfere gravemente no tratamento destas condições, por isso é muito importante elucidar os mecanismos assim como procurar por tratamentos eficazes.

Muitos trabalhos publicados, assim como dados anteriores de nosso laboratório, mostraram que o comprometimento da reatividade vascular está associado a uma diminuição da densidade de receptores adrenérgicos ou internalização dos mesmos na aorta e no coração, durante a fase tardia da sepse.

1.5 HIPÓTESE DE TRABALHO

Dentro deste contexto, a hipótese deste projeto é que a administração de um antagonista alfa 1 seletivo é capaz de promover a regulação positiva dos receptores adrenérgicos alfa-1 melhorando a resposta vasoconstritora de animais sépticos.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Verificar se a administração de um antagonista alfa 1 seletivo (doxazosina ou prazosina) é capaz de promover a regulação positiva dos receptores adrenérgicos alfa-1 melhorando a resposta vasoconstritora à sepsse.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a) Avaliar as consequências dos tratamentos na sobrevida dos animais sépticos;

b) Verificar se o tratamento com antagonista alfa 1 (prazosina e doxazosina) irá promover alguma alteração da resposta vasopressora à fenilefrina, medindo o grau de contratilidade de vasos através do método de banho de órgão isolado;

c) Verificar se o tratamento irá promover alguma alteração na pressão arterial média dos animais;

d) Verificar possíveis danos teciduais através de testes bioquímicos e a ação dos tratamentos neste contexto;

e) Verificar se o tratamento com prazosina e doxazosina promove *up-regulation* dos receptores alfa na aorta, através de ensaio de densidade de receptores.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E RANDOMIZAÇÃO

Foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 45 e 50 g, com idade entre 2 e 3 meses, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina e mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia até a realização dos experimentos. Ao atingir a idade, os animais foram transferidos para o Biotério do laboratório para aclimação e desverminação preventiva. Foi adicionada uma quantidade de 7 mL/L do vermífugo albendazol 10% suspensão à água de beber, que foi mantido por 3 dias. Em seguida à água de beber foi adicionada vitamina Vitagold®, em concentração de 1000 UI/L por 4 dias. Em seguida, retornou-se à água normal e após uma semana do término da vitamina, os animais foram utilizados para os experimentos. Os animais foram mantidos em mini isoladores (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil), cinco por caixa, com livre acesso à ração e água em local com temperatura ambiente controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro (12/12h). Todos os procedimentos que utilizaram animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais/UFSC sob o protocolo número 5388190617 e de acordo com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Os animais foram numerados e por sorteio, alocados a cada grupo experimental.

As doses dos antagonistas utilizadas foram mapeadas através de experimentos prévios, em animais submetidos ao modelo de endotoxemia (LPS).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL: INDUÇÃO DA SEPSE POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP)

O modelo de sepse polimicrobiana utilizado para este trabalho foi o de ligação e perfuração do ceco (CLP), descrito inicialmente por Wichtermann e colaboradores (1980). Para isto, visando a redução do desconforto e sofrimento animal, os camundongos foram pré-anestesiados por via i.p. com xilazina (5 mg/Kg) e analgesiados com cloridrato de tramadol (10 mg/Kg). Em seguida, os animais foram anestesiados em câmara anestésica saturada com mistura de isoflurano (5% para anestesia e 2% para manutenção via máscara facial) e oxigênio a 100%. Todo procedimento foi realizado sobre uma cama aquecida a 37°C . Após

antisepsia da região abdominal com álcool 70%, os animais receberam infiltrações subcutâneas na linha alba (local da incisão cirúrgica) do anestésico local lidocaína (2%, sem vasoconstritor), no volume final de 100 µL para cada sítio de infiltração. Depois da confirmação da ausência de reações aos estímulos externos, foi efetuada uma laparotomia com incisão de aproximadamente 1 cm e subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco, abaixo da válvula íleocecal. Foi feita uma perfuração transfixante no ceco com agulhas 18G, seguido de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. O ceco foi realocado na cavidade abdominal e a musculatura e pele foram suturadas. Após a cirurgia, os animais recebem 30 mL/kg de salina tamponada com fosfatos (PBS; em mM: NaCl 137; KCl 2,7; KH₂PO₄ 1,5 e NaH₂PO₄ 10,8; pH 7,4) aquecida à 37°C por via s.c. para reposição fluidica. Os animais foram mantidos em ambiente aquecido para a recuperação total da cirurgia e foram acomodados novamente no biotério local do laboratório com livre acesso à água e ração. Para analgesia pós-cirúrgica, os animais receberam cloridrato de tramadol (5 mg/kg, s.c.) a cada 12 horas, até a 48 horas após a cirurgia.

3.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA

Para avaliação do grau de letalidade do modelo e eficácia dos tratamentos, grupos de animais submetidos à cirurgia, conforme item 3.2, foram tratados, por via subcutânea, com prazosina ou doxazosina (ou salina, no caso do grupo controle) 12 horas após a indução da sepse e observados a cada 24 horas por 96 horas. Os animais receberam tratamento de 1 mg/Kg de prazosina ou doxazosina 12 horas após a indução da sepse pelo modelo de CLP, uma única vez. Neste período, os animais foram mantidos em local com temperatura (22 ± 2 °C) e ciclo de luz claro/escuro (12/12 h) controlado automaticamente, com livre acesso à ração e água. Comparou-se a mortalidade entre os grupos submetidos ao CLP sem tratamento, tratados com inibidor seletivo dos receptores alfa-1 e animais controle (naïve).

3.4 EXPERIMENTOS *IN VITRO*: REATIVIDADE VASCULAR EM ANÉIS DE AORTA

3.4.1 Remoção, preparação e montagem dos anéis de aorta em banho de órgão isolado

Vinte e quatro horas depois do procedimento cirúrgico os animais foram eutanasiados com overdose anestésica de cetamina/xilazina (140/30 mg/kg, i.p., respectivamente). Com os animais posicionados em decúbito dorsal, realizou-se uma incisão da região torácica e dissecação da camada de pele e músculo, realizando-se um laparotomia para visualização dos órgãos internos. Os pulmões, coração e demais órgãos foram deslocados para visualização da aorta ao longo da coluna vertebral, sendo esta dissecada a partir da extremidade acima do diafragma até abaixo do arco aórtico, com muito cuidado e evitando-se estiramento excessivo ou torções.

As aortas foram removidas e colocadas em uma placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs (concentrações, em mM: NaCl 131,3; KCl 4,7; KH_2PO_4 1,18; MgSO_4 1,17; NaHCO_3 14,9; Dextrose 5,5; CaCl_2 1,6; EDTA 0,08) gelado para retirada cuidadosa dos tecidos adjacentes. Em seguida as artérias foram seccionadas em anéis de 3 a 4 mm de comprimento que foram acondicionados em hastes rígidas de aço inoxidável que estavam acoplados a um transdutor de força (modelo i-FOT 50SW) e amplificador (modelo BRAM-4B; todos da GlobalTown Microtech, Inc., Sarasota, FL, EUA) para registro da força de contração isométrica exercida pelos anéis. O sistema foi conectado a um polígrafo computadorizado (PowerLab 4/30®) e software de integração e registro (LabChart® Pro v. 7.3.3 ambos da AD Instruments, Austrália).

As hastes com os anéis foram mantidas em cubas de vidro (com capacidade máxima para 5 mL) contendo solução nutritiva de Krebs sob temperatura constante 37°C, pH 7,4 e aeradas continuamente com mistura carbogênica (95% O_2 /5% CO_2) para manutenção das condições funcionais do tecido. As preparações foram submetidas a uma tensão basal de 0,5 g e permaneceram em estabilização por um período de 1 hora. Durante esse período a solução nutritiva foi trocada de 15 em 15 minutos.

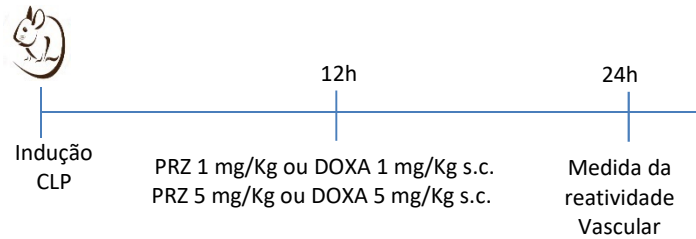
Após o período de estabilização, a solução de Krebs foi trocada por solução nutritiva contendo 120 mM de cloreto de potássio para teste da atividade biológica das preparações. Após as preparações foram lavadas 3 vezes com Krebs-Henseleit e passaram por um novo período

de estabilização de 30 minutos, onde o líquido nutritivo foi trocado em intervalos de 15 minutos. Em seguida, os anéis foram pré-contraídos com fenilefrina 1 μM e após atingirem a contração máxima, foi adicionada acetilcolina 1 μM . Um relaxamento de 70-80% confirmou a presença de endotélio intacto.

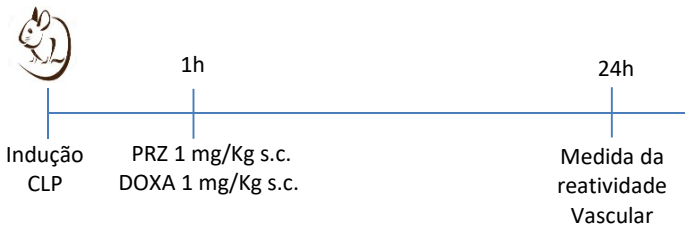
3.4.2 Protocolos experimentais

Os animais sépticos receberam prazosina ou doxazosina (ou salina, no caso do grupo controle) 1 hora ou 12 horas após a indução da sepse. No caso do tempo de 12 horas, também foram testadas duas doses (1 e 5 mg/Kg de cada antagonista). Vinte e quatro horas após a indução da sepse, as aortas foram obtidas conforme acima. Os protocolos estão mostrados abaixo:

Protocolo 1)



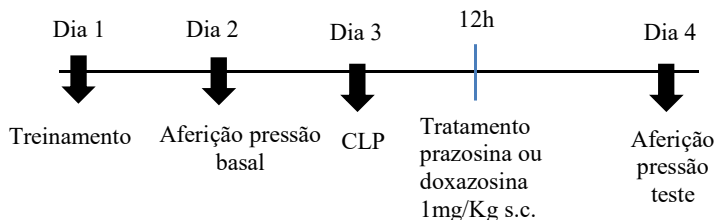
Protocolo 2)



Esquema 1: Protocolos experimentais para medida da reatividade vascular *in vitro*.

3.5 MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL EM ANIMAIS ACORDADOS

Para mensurar possíveis alterações provocadas pelos tratamentos, os animais foram avaliados antes da cirurgia (aferição pressão basal) e após 24 horas da cirurgia de CLP. Foram avaliados quatro grupos experimentais: animais controle (naïve, sem tratamento), CLP + tratamento com prazosina 1 mg/Kg, CLP + tratamento com doxazosina 1 mg/Kg e CLP tratado com salina. As medidas de pressão arterial foram realizadas na cauda dos animais, pelo método de pletismometria, também conhecido como *tail-cuff*. Primeiramente os animais passaram por uma adaptação (Dia 1). Nesta etapa, os mesmos foram condicionados na sala de experimentação com temperatura controlada (30° C) por 30 minutos antes do início do experimento. Neste modelo, a permanência em ambiente aquecido é importante para permitir a detecção do fluxo sanguíneo na cauda. Os animais foram então colocados em tubo cilíndrico de acrílico para contenção, e acomodados sobre uma placa aquecida. Uma presilha foi colocada na cauda dos animais e foram realizadas 5 medidas. Após essa sessão, os animais foram realocados em suas caixas e condicionados no biotério. No dia seguinte (Dia 2), os animais foram novamente condicionados em sala com temperatura controlada (30° C) e tiveram sua pressão arterial coletada (aferição controle). No Dia 3, os animais passaram pelo procedimento cirúrgico para indução da sepse. No Dia 4 (24 horas após CLP), sob as mesmas condições citadas acima, os animais tiveram novamente suas medidas de pressão arterial obtidas. Os resultados foram expressos em mmHg e a média dos valores obtidos foi comparada entre os grupos experimentais. Por ser um sistema de medida de pressão arterial não-invasivo, realizado em animais acordados, pode-se garantir a utilização de um único grupo de animais para avaliação antes e após a cirurgia. O Esquema 2 representa a linha do tempo do protocolo experimental.



Esquema 2: Protocolo experimental para aferição da pressão arterial por pletismografia de cauda.

3.6 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

3.6.1 Creatina cinase fração MB (CK-MB)

A determinação de CK-MB foi realizada através de kit comercial Labtest (Ref.:118, Labtest Diagnostica S/A, Lagoa Santa, MG, Brasil). É um sistema enzimático para determinação quantitativa da atividade da isoenzima MB da Creatina Cinase (CK-MB) em modo cinético em soro ou plasma, utilizado para avaliação de disfunção cardíaca. A amostra foi incubada com o reagente de trabalho, que contém um anticorpo específico capaz de inibir completamente a atividade enzimática do monômero CK-M. A atividade do monômero CK-B, que não é inibida pelo anticorpo, é medida pela desfosforilação da creatina fosfato pela CK-B com a formação de ATP, que reage com a glicose na presença da hexoquinase formando glicose-6-fosfato, que na presença da glicose-6-fosfato desidrogenase é oxidada a 6-fosfogluconato e reduz NADP a NADPH. A velocidade de incremento na absorbância em 340nm é proporcional à atividade da CK-B na amostra. O teste feito em placa de 96 poços teve a leitura realizada em leitor de placas (Multileitora SpectraMax Paradigm). Os valores foram calculados através de um fator de calibração, onde o resultado foi expresso em U/L.

3.6.2 Dosagem de Alanina Transaminase (ALT)

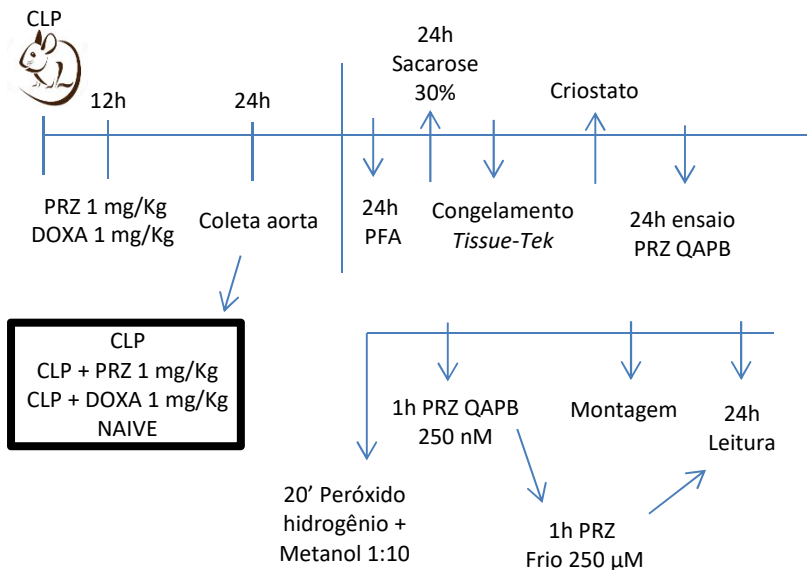
A determinação foi realizada através de kit comercial (Bioclin-K035, Belo Horizonte, MG, Brasil). É um método para determinação da transaminase pirúvica (ALT ou TGP), colorimétrico e somente para uso diagnóstico *in vitro*, utilizado para avaliar disfunção hepática. A transaminase catalisa a transferência do agrupamento amino de um alfa-aminoácido para um alfa-cetoácido. O piruvato reage com dinitrofenilhidrazina e a intensidade de coloração da hidrozona formada, em meio alcalino, é diretamente proporcional à quantidade de ALT na amostra. O teste feito em placa de 96 poços teve a leitura (505nm) realizada em leitor de placas (Multileitora SpectraMax Paradigm) e os resultados foram calculados em função de um fator de calibração e expressos em U/L.

3.7 ANÁLISES MOLECULARES

3.7.1 Ensaio de ligação de receptor $\alpha 1$ adrenérgico

Para avaliação da densidade de receptores alfa, os animais foram divididos em três grupos: controle (naïve), CLP e CLP tratado com prazosina. A aorta foi coletada 24 horas após a cirurgia de CLP. Os animais foram anestesiados com uma combinação anestésica de cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg) por via i.p. Seguiu-se com a perfusão transcardíaca com solução salina 0,9% por 7 minutos e após, com solução de formaldeído tamponado a 4% por 3 minutos. Os tecidos coletados foram fixados em solução de formaldeído 4% por 24 horas, em temperatura ambiente, e depois imersos em solução de sacarose 30% por mais 24 horas (solução crioprotetora) a 4°C. Em seguida o material foi colocado em blocos de Tissue-Tek O.C.T (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, Estados Unidos) e congelados em freezer -80° C. Os blocos foram cortados em fatias transversais em criostato (Criostato Thermo Scientific HM525 NX; Thermo Fisher Scientific, EUA) com espessura de 7 μ m, e colocadas em lâminas pré-tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). As lâminas foram mergulhadas em solução de peróxido de hidrogênio e metanol, em uma concentração de 1:10 e mantidas por 20 minutos, sob proteção da luz, em temperatura ambiente. Passado o tempo, os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), limpos com água destilada para tirar qualquer resíduo e incubados com prazosina fluorescente, BODIPY® FL prazosina (QAPB; Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos) 250 nM por 90 minutos a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS, o corte foi coberto por lamínula usando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). Como controle de seletividade do QABP, em outro grupo de lâminas foi acrescentado um antagonista alfa-1 não fluorescente, o hidrocloreto de prazosina 250 μ M (PNF; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), logo após o tratamento com QABP. Lâminas sem nenhum tratamento foram utilizadas como controle de autofluorescência. Para a leitura, utilizou-se microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000B®) e as imagens foram capturadas através do software LAS AF Lite® (ambos da empresa Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Alemanha). Todos os testes foram feitos em duplicata com dois cortes do mesmo tecido para cada grupo experimental. A intensidade de fluorescência foi determinada com o programa ImageJ® (versão 1.36b; NIH; Bethesda,

MD, Estados Unidos) e os valores foram expressos como unidades arbitrárias. O esquema 3 representa passo a passo o protocolo experimental.



Esquema 3: Protocolo experimental. Avaliação do efeito do tratamento com prazosina ou doxazosina na densidade de receptores α_1 adrenérgicos na aorta de animais sépticos.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A curva de sobrevida foi analisada pelo teste de *log-rank* e a diferença entre as curvas representativas de cada grupo experimental foi considerada significativamente diferente quando $p < 0,05$. Os demais resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média e foram empregadas a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, conforme protocolo experimental, seguida pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni de múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism® versão 5.0 (San Diego, CA, USA).

4.0 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE À FENILEFRINA EM ANÉIS DE AORTA DE ANIMAIS SÉPTICOS TRATADOS COM PRAZOSINA E DOXAZOSINA

4.1.1 Tratamento feito 12 h após CLP com 1 mg/Kg de prazosina ou doxazosina

Investigamos qual o efeito do tratamento com antagonistas seletivos de receptores alfa-1 adrenérgicos, com uma dose de 1 mg/Kg, no tempo de 12 horas pós-cirurgia, na hiporresponsividade a vasoconstritores observada em animais sépticos.

Conforme mostrado na Figura 1 e tabela 2, podemos observar que há uma redução na contratilidade frente à fenilefrina da artéria aorta de animais sépticos quando comparados aos animais controle, sem alterar potência (CE50) e Emax. Essa diferença desapareceu e os valores voltaram próximos aos de animais controle (naïve), quando tratados com prazosina ou doxazosina 12 h após CLP. Não houve nenhuma alteração da resposta contrátil dos anéis de aorta de animais controle (naïve) tratados com prazosina 1, 3, 5 e 10 mg/Kg (dados não mostrados).

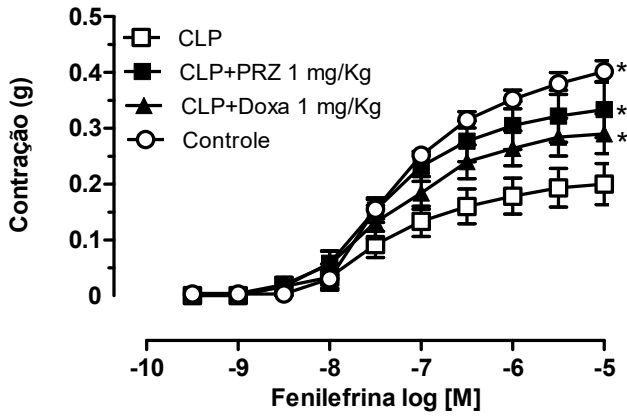


Figura 1. Efeito da prazosina e doxazosina sobre reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos sépticos. Os animais foram tratados com prazosina ou doxazosina (1 mg/Kg, s.c.) 12 horas após a cirurgia. Vinte e quatro horas após o CLP, as aortas foram coletadas e montadas em banho de órgão isolado. As barras representam média + E.P.M de 6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

Tabela 2. Reatividade vascular da artéria aorta do grupo controle, CLP e CLP tratado com prazosina ou doxazosina 1mg/Kg 12 h após CLP

	Fenilefrina
Controle	
Emax (g)	0,39 ± 0,009
CE50 (µM)	0,054
CLP	
Emax (g)	0,19 ± 0,014
CE50 (µM)	0,04
CLP+PRZ	
Emax (g)	0,32 ± 0,016
CE50 (µM)	0,038
CLP+DOXA	
Emax (g)	0,28 ± 0,014
CE50 (µM)	0,044

Emax = Efeito máximo contrátil. CE50 = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

4.1.2 Tratamento feito 12 h após CLP com 5 mg/Kg de prazosina ou doxazosina

Também investigamos se o tratamento com uma dose maior dos antagonistas (5 mg/Kg), no tempo de 12 h pós cirurgia, resultaria em efeito maior na hiporresponsividade a vasoconstritores observada em animais sépticos.

Conforme a Figura 2 e tabela 3, podemos observar que há uma redução na contratilidade frente à fenilefrina em anéis de aorta obtidas de animais sépticos, sem alterar potência (CE50) e Emax com os tratamentos. Curiosamente, o tratamento com doses maiores de ambos antagonistas não foram capazes de reverter esse quadro.

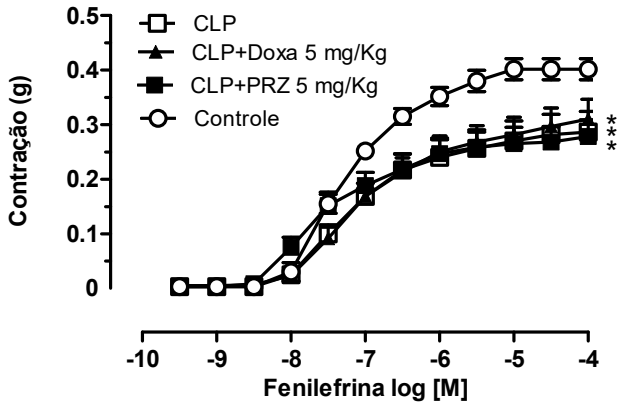


Figura 2. Efeito da prazosina e doxazosina sobre reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos sépticos. Os animais foram tratados com prazosina ou doxazosina (5 mg/Kg s.c.) 12 horas após a cirurgia. Vinte e quatro horas após CLP, as aortas foram coletadas e montadas em banho de órgão isolado. As barras representam média + E.P.M. de 5-6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (naïve); ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

Tabela 3. Reatividade vascular da artéria aorta do grupo controle, CLP e CLP tratado com prazosina ou doxazosina 5mg/Kg 12 h após CLP

	Fenilefrina
Controle	
E _{max} (g)	0,393 ± 0,007
CE50 (μM)	0,057
CLP	
E _{max} (g)	0,271 ± 0,01
CE50 (μM)	0,064
CLP+PRZ	
E _{max} (g)	0,261 ± 0,01
CE50 (μM)	0,028
CLP+DOXA	
E _{max} (g)	0,287 ± 0,01
CE50 (μM)	0,082

E_{max} = Efeito máximo contrátil. CE50 = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

4.1.3 Tratamento feito 1 h após CLP com 1 mg/Kg de prazosina ou doxazosina

Tendo em vista os diferentes tempos de meia vida dos dois antagonistas (prazosina 11 horas e doxazosina 22 horas), investigamos qual a consequência do tratamento em um tempo diferente (1 hora após CLP).

Conforme a Figura 3 e tabela 4, podemos observar que há uma redução na contratilidade da aorta de animais sépticos, mas que o tratamento tanto com prazosina quanto com doxazosina (1 mg/Kg) não foi capaz de reverter esse quadro. Não houve alterações significativas nas potências (CE50) e E_{max}.

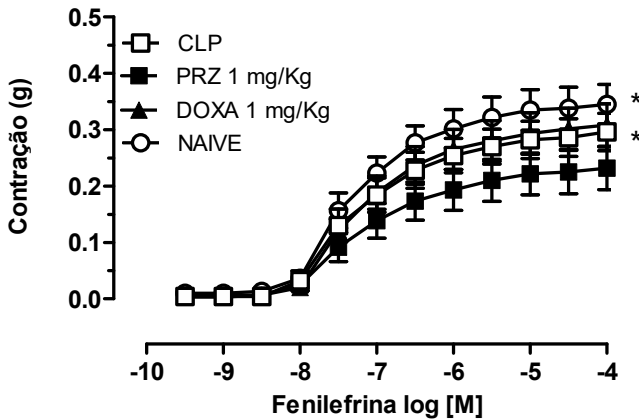


Figura 3. Efeito da prazosina e doxazosina sobre reatividade vascular à fenilefrina em anéis de aorta de camundongos sépticos. Os animais foram tratados com prazosina ou doxazosina (1 mg/Kg s.c.) 1 hora após a cirurgia. Vinte e quatro horas após CLP, as aortas foram coletadas e montadas em banho de órgão isolado. As barras representam média + E.P.M de 6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (naïve); ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

Tabela 4. Reatividade vascular da artéria aorta do grupo controle, CLP e CLP tratado com prazosina ou doxazosina 1mg/Kg 1 h após CLP

	Fenilefrina
Controle	
Emax (g)	0,332 ± 0,012
CE50 (µM)	0,047
CLP	
Emax (g)	0,280 ± 0,011
CE50 (µM)	0,048
CLP+PRZ	
Emax (g)	0,219 ± 0,012
CE50 (µM)	0,057
CLP+DOXA	
Emax (g)	0,294 ± 0,012
CE50 (µM)	0,057

Emax = Efeito máximo contrátil. CE50 = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. As análises estatísticas foram realizadas por meio de ANOVA de duas vias seguida de Bonferroni.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO COM PRAZOSINA E DOXAZOSINA SOBRE PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

4.2.1 Mensuração da pressão arterial por pletismografia de cauda

Considerando a melhora na contratilidade dos vasos com tratamento de 1 mg/Kg dos antagonistas, 12 h após CLP, o passo a seguir foi avaliar se esta melhora ocorreria também de forma sistêmica. Para isso foi verificada a pressão arterial utilizando o método de pletismografia de cauda.

A Figura 4 mostra que 24 horas após CLP, há uma queda na pressão arterial, e que o tratamento tanto com prazosina quanto com doxazosina administrado na dose de 1 mg/Kg 12 horas após cirurgia, foram capazes de reverter esse quadro, prevenindo a queda da pressão arterial.

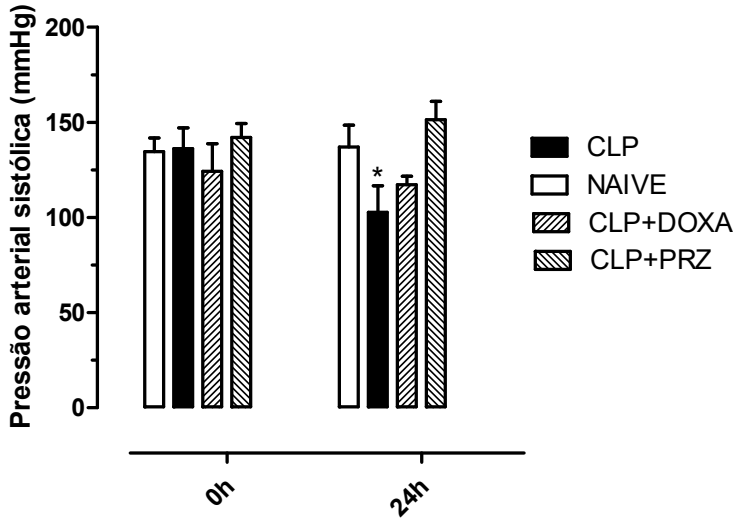


Figura 4. Efeito da prazosina e doxazosina sobre a pressão arterial de camundongos sépticos. Os animais foram tratados com prazosina ou doxazosina (1 mg/Kg) 12 horas após a cirurgia. Vinte e quatro horas após CLP, a pressão arterial sistólica foi avaliada por pletismografia. As barras representam média + E.P.M de 5-6 animais. * $p < 0,05$ em relação ao grupo tempo “zero” hora. ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.3 EFEITO DA PRAZOSINA SOBRE DANO DE ÓRGÃOS

4.3.1 Mensuração dos níveis de CK-MB

É um marcador bioquímico utilizado para o diagnóstico de lesão miocárdica. Nos animais sépticos, notamos um aumento deste parâmetro. O tratamento com prazosina indica redução de dano cardíaco, visto que houve uma redução nos níveis plasmáticos de CK-MB com o tratamento, conforme demonstrado na Figura 5.

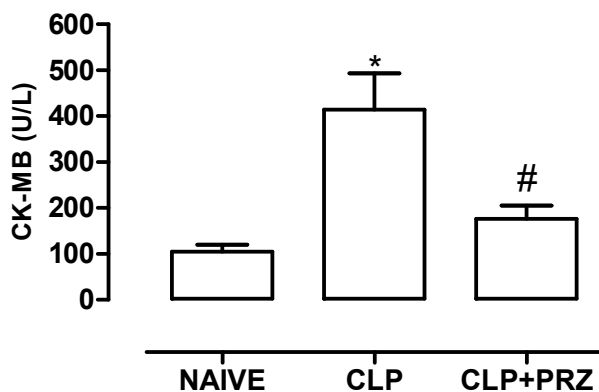


Figura 5. Efeito da prazosina sobre marcador bioquímico de dano cardíaco em camundongos sépticos. Os animais foram tratados com prazosina 12 horas após a cirurgia e o sangue foi coletado 24 horas após CLP para análise dos níveis plasmáticos de CK-MB. As barras representam média + E.P.M de 5 animais, e os valores foram expressos como U/L. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (naïve) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.3.2 Mensuração dos níveis de ALT

ALT é um biomarcador principalmente da atividade hepática. Nos animais sépticos, notamos um aumento deste parâmetro. O tratamento com prazosina indica redução do dano hepático, visto que houve uma redução plasmática destas enzimas, conforme demonstrado na Figura 6.

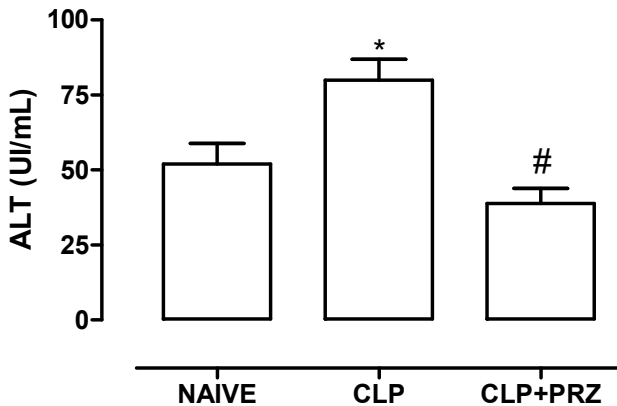


Figura 6. Efeito da prazosina sobre marcador bioquímico de dano hepático em camundongos sépticos. Os animais foram tratados com prazosina 12 horas após a cirurgia e o sangue foi coletado 24 horas após CLP para análise dos níveis plasmáticos de ALT. As barras representam média + E.P.M. de 5 animais, e os valores foram expressos como U/mL. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (naïve) e # $p < 0,05$ em relação ao grupo CLP; ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.4 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTOR α_1 -ADRENÉRGICO EM AORTA

Com a finalidade de validar nossa hipótese, realizamos este ensaio para avaliar a densidade de receptores α_1 adrenérgicos nos tecidos de artéria aorta.

Para validação do método, verificamos a seletividade do composto fluorescente, o BODIPY® FL prazosina (QAPB), que é um antagonista alfa-1 ligado a um fluoróforo, através do ensaio de ligação com um antagonista α_1 adrenérgico não fluorescente, o cloridrato de prazosina (PNF).

De acordo com as Figuras 7 e 8, podemos inferir que o PNF foi capaz de deslocar a ligação do QAPB.

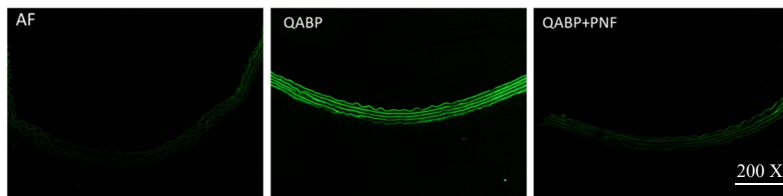


Figura 7. Seletividade do composto QAPB para receptores $\alpha 1$ adrenérgicos em aorta de camundongos. Imagens representativas de AF = autofluorescência, QAPB = antagonista fluorescente $\alpha 1$ adrenérgico e (QAPB + PNF) = deslocamento da ligação pelo antagonista não fluorescente $\alpha 1$ adrenérgico. Escala de 200 x.

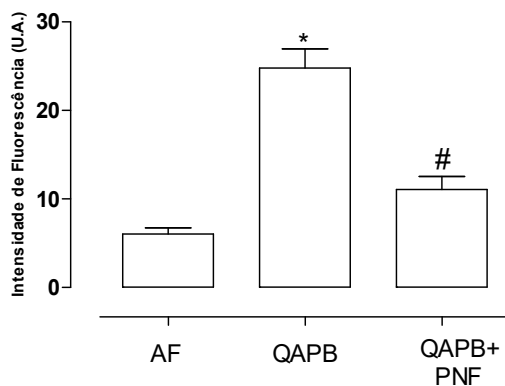


Figura 8. Seletividade do composto QAPB para receptores $\alpha 1$ adrenérgicos em aorta de camundongos. Representação gráfica da intensidade de fluorescência de QAPB em aorta de camundongo. O antagonista não fluorescente foi utilizado para competir com QAPB após ser estabelecido o equilíbrio. AF = autofluorescência, QAPB = antagonista fluorescente $\alpha 1$ adrenérgico, (QAPB + PNF) = deslocamento da ligação pelo antagonista não fluorescente $\alpha 1$ adrenérgico, U.A. unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M. de 3 experimentos independentes, n = 5; ANOVA de uma via, seguida pelo post hoc de Bonferroni; * p < 0,05 comparado com a AF; # p < 0,05 comparado com o QAPB.

Após avaliação da seletividade do composto QAPB para receptores α_1 adrenérgicos, foi avaliado a densidade destes receptores em aorta de animais controle, CLP e sépticos tratados com prazosina.

É importante ressaltar que neste experimento, estamos observando receptores tanto da superfície celular quanto perinucleares. Conforme a Figura 9, podemos observar que apesar de uma pequena queda na densidade dos receptores α_1 adrenérgicos observada na aorta, com restauração aos valores basais com o tratamento de 1 mg/Kg de cloridrato de prazosina, esta diferença não foi estatisticamente diferente. Os dados expostos nas Figuras 9 e 10, nos permitem sugerir que não ocorreu uma alteração significativa na densidade de receptores α_1 adrenérgicos na aorta de camundongos sépticos.

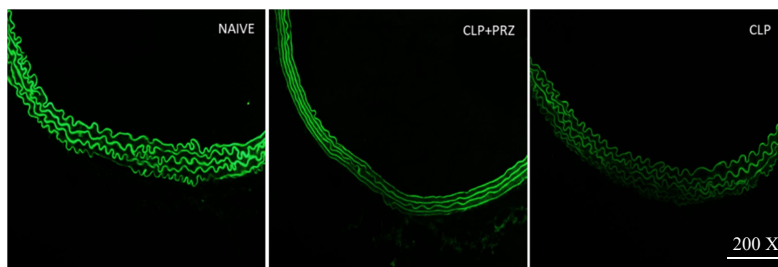


Figura 9. Ensaio de ligação com ligante fluorescente (BODIPY FL-prazosin - QAPB) em aorta de camundongo. Comparação da densidade de receptores α_1 adrenérgicos entre animais controle (naïve) e CLP e efeito do tratamento dos animais sépticos com cloridrato de prazosina 1 mg/Kg 12 horas após a cirurgia. Imagens representativas. Escala de 200x.

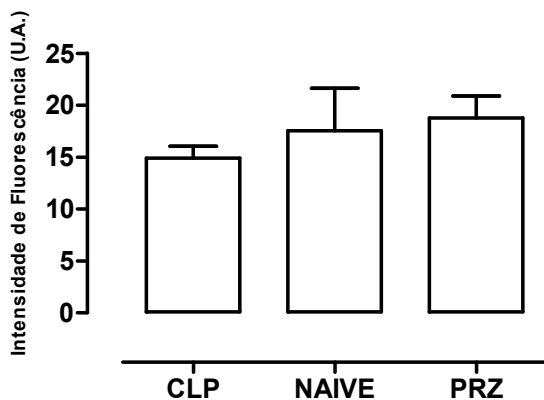


Figura 10. Ensaio de ligação com ligante fluorescente (BODIPY FL-prazosin - QAPB) em aorta de camundongos sépticos. Representação gráfica da intensidade de fluorescência de QAPB em aorta de camundongo. Comparação entre animais controle (naïve) e CLP e efeito do tratamento dos animais sépticos com cloridrato de prazosina 1 mg/Kg 12 horas após a cirurgia. U.A. = unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M. de 2 experimentos independentes, n = 5; ANOVA de uma via, seguida pelo post hoc de Bonferroni.

4.5 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

Como o tratamento com antagonistas alfa-1 adrenérgico induziu melhora na reatividade vascular frente à fenilefrina e nos parâmetros cardiovasculares, melhorando a disfunção de órgãos dos animais sépticos, investigamos se tais efeitos provocariam consequências benéficas na sobrevivência dos animais. Como pode ser observado na Figura 11, nenhum dos tratamentos modificou a mortalidade induzida pela sepse.

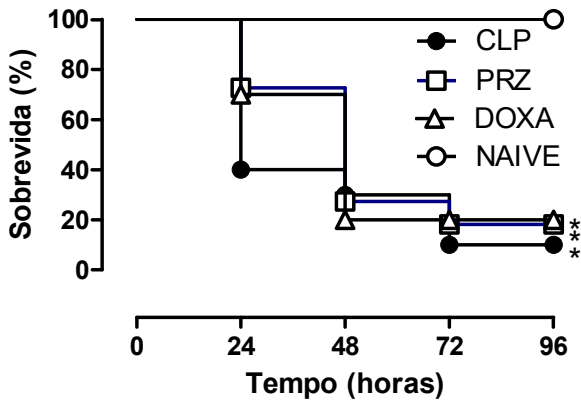


Figura 11. Efeito da prazosina e doxazosina sobre mortalidade em camundongos sépticos. Os animais foram tratados com prazosina ou doxazosina 1 mg/Kg 12 horas após a indução da sepse e a sobrevivência avaliada até 96 horas após CLP. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência e representam dois experimentos independentes. Teste de *Log-rank*; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (naïve); $n = 10$.

5. DISCUSSÃO

Mesmo com consideráveis avanços na terapêutica, o choque séptico é uma das causas mais comuns de morte em unidades de terapia intensiva. A fisiopatologia da sepse e do choque séptico é caracterizada por uma vasodilatação sistêmica, levando a uma hipotensão arterial, falência múltipla de órgãos e morte (BUCHER et al., 2003).

A hiporreatividade vascular às catecolaminas e outros fármacos vasoconstritores é um dos efeitos mais pronunciados do choque séptico humano e contribui para a alta taxa de mortalidade associada a esta condição. Sendo assim, encontrar medidas de tratamento eficazes torna-se muito importante, pois apesar de recomendado como melhora de sobrevida, o tratamento precoce com intervenções básicas e a aderência às medidas preconizadas nos protocolos de manuseio da sepse ainda são muito incipientes no Brasil.

Para este estudo, utilizamos como modelo de sepse o modelo de ligadura e perfuração do ceco. Todos os protocolos foram desenvolvidos com camundongos Swiss machos. Este modelo é o mais frequentemente utilizado pois se assemelha muito com as características da sepse em humanos, recriando a mesma progressão, com similares fases metabólicas e hemodinâmicas, com presença das fases hiper e hipodinâmica. Dessa maneira, facilita o estudo deste quadro, apesar de sabermos que nenhum modelo experimental mimetiza completamente a sepse humana. Outra característica importante é que este modelo pode produzir um espectro completo da gravidade da doença, variando de aguda e fatal a crônica, o que possibilita uma ampla gama de experimentação, assim como nos permite interferir na mortalidade. De acordo com trabalhos prévios do laboratório, ficou instituído uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50% dos animais em 24 h para padronizar o procedimento assim como garantir reprodutibilidade do modelo.

Maior heterogeneidade de perfusão causada por inadequada vasodilatação e vasoconstrição leva a uma diminuição do fornecimento de oxigênio, hipóxia tecidual e disfunção de órgãos. Nossos resultados mostraram que 24 h após a indução da sepse, os animais apresentaram profundas alterações cardiovasculares, evidenciadas pela hipotensão arterial, hiporreatividade à fenilefrina e aumento dos valores séricos de CK-MB.

Durante a sepse, aumento nos níveis de norepinefrina pode levar a um *down-regulation* dos receptores vasculares adrenérgicos α_1 ,

causando hiporresponsividade vascular, hipotensão, hipoperfusão tecidual e disfunção de múltiplos órgãos.

O racional do presente trabalho está baseado num aparentemente paradoxo clínico, que é o uso de β -bloqueadores em pacientes com falência cardíaca (FIRMIDA e MESQUITA, 2001). Importante lembrar que a densidade destes receptores (principalmente o β_1) está menor que o normal em virtude da grande ativação do sistema nervoso simpático, com vistas a elevar o débito cardíaco. Considerando que o coração em falência necessita muito de estimulação beta, o bloqueio destes receptores seria, em teoria, profundamente desvantajoso para o paciente (FOODY et al., 2002). Todavia, se antes contraindicados para esta patologia, hoje os β -bloqueadores são terapia de primeira escolha na falência cardíaca (BROPHY et al., 2001). Embora certamente não seja o único mecanismo responsável pelo benefício clínico dos β -bloqueadores na falência cardíaca, ao bloquear parte dos receptores β_1 cardíacos remanescentes, os β -bloqueadores induzem os miócitos a aumentarem a expressão de receptores beta cardíacos (BRISTOW, 1997).

Há uma grande série de medicamentos que visam mimetizar (agonistas) ou inibir (antagonistas) os efeitos das catecolaminas endógenas, e fazem parte do arsenal terapêutico disponível para tratamento de algumas doenças, como hipertensão e choque, por exemplo (AKINAGA et al., 2013). O cloridrato de prazosina, um antagonista alfa-1 seletivo, é indicado na clínica para o tratamento da hipertensão arterial essencial e secundária de todos os graus. A dosagem varia de 1 a 2 mg três vezes ao dia até o máximo de 20 mg/dia. Foi visto em alguns trabalhos, que os derivados de quinazolininas, como prazosina e doxazosina, produziram tolerância em seu efeito vasodilatador sugerindo que essas substâncias produzem *up-regulation* de α_1 -AR nos vasos (CAMBRIDGE & GREENGRASS, 1980; von BAHR et al., 1982).

A administração de prazosina, em dose de 1 mg/Kg e injetado 12 horas após a cirurgia, ou seja, com o quadro de sepse já instalado, foi capaz de não apenas aumentar a reatividade frente à fenilefrina em vasos isolados, mas também de prevenir a queda da pressão arterial média e de reduzir substancialmente os valores de marcadores de dano à órgão vitais, como coração e fígado.

A escolha da aorta como repórter da funcionalidade vascular, apesar de vaso de condutância, deveu-se aos fatos que a maioria das investigações de reatividade vascular usam tecido aórtico de roedores (JULOU-SCHAEFFER et al., 1990) e que, pelo menos no que se refere à estudos com sepse experimental, a aorta é um excelente marcador da

perda da funcionalidade da microcirculação (BENEDET et al., 2018). Utilizamos esta preparação para experimentos de dose- e de tempo-resposta. Os dois antagonistas do receptor alfa-1 adrenérgico, o cloridrato de prazosina e doxazosina, em doses de 1 e 5 mg/Kg e administrados, na dose de 1 mg/Kg, em dois tempos após a indução da sepse, 1 ou 12 horas após a cirurgia de CLP constituíram o protocolo de avaliação.

A utilização de uma dose maior (5 mg/Kg) dos antagonistas não foi capaz de produzir o efeito de melhora de contratilidade. Provavelmente, isto aconteceu porque na sepse já se tem um número reduzido de receptores e nessa dose, provavelmente os antagonistas bloquearam os poucos receptores ainda disponíveis, levando a uma piora do quadro geral. Ao utilizarmos a dose de 1 mg/Kg administrada 1 h após a cirurgia, também não houve melhora na contração à fenilefrina nas aortas de animais tratados com cloridrato de prazosina, provavelmente porque nesta fase inicial (hiperdinâmica) há uma maior quantidade de receptores e sendo assim, os antagonistas apenas fizeram seu efeito de impedir que as catecolaminas endógenas se ligassem. Outra possibilidade é que, como os testes foram feitos 24 h após a cirurgia, pode ser que nesse tempo o efeito dos antagonistas já tenha desaparecido, já que os animais tratados com cloridrato de doxazosina, que tem uma meia vida plasmática de 22 h, apresentaram uma melhora na contratilidade, porém os resultados demonstraram que não houve diferença estatística comparando tanto com os animais controle, quanto com os animais sépticos. Para confirmar essa hipótese, esses experimentos poderiam ser realizados com um intervalo de tempo um pouco menor entre o tratamento e as análises.

No caso da segunda possibilidade estar ocorrendo, isso nos leva a crer que o processo de internalização ou dimerização é rápido, pois quando tratamos o animal 1 h após a cirurgia, ao analisarmos 23 h depois, o efeito não é visto, ou seja, o mecanismo favorável que a prazosina e a doxazosina ativam só é visto quando o animal é tratado 12 h após CLP e analisado em 24 h, mas não quando o tratamento é dado 1 h após cirurgia. Destaca-se aqui que a meia-vida do cloridrato de prazosina é de aproximadamente 11 horas e da doxazosina 22 horas.

Isso também pode ser visto ao olharmos a curva de sobrevivência, onde os animais receberam prazosina ou doxazosina 12 h após cirurgia, apenas uma vez e, se observarmos os animais 12 h após tratamento (24 h após cirurgia), veremos que houve um menor número de mortes, mas comparando as 3 curvas totais (CLP, CLP+PRZ e CLP+DOXA) não houve diferença estatística. Isso pode ser explicado pelo fato de que o

mecanismo favorável que os antagonistas estão induzindo, ser um processo rápido e reversível. Uma maneira de confirmarmos esta hipótese seria tratar os animais de 12 em 12 h até o fim da curva de sobrevivência.

Na sepse ocorre, também, hipotensão refratária a vasoconstritores. Já está bem descrito na literatura que em todas as formas de choque vasodilatador, como ocorre normalmente no quadro de sepse, há um aumento na concentração de catecolaminas endógenas (SYLVESTER et al., 1979; BENEDICT e ROSE, 1992), e que, em geral, ativação excessiva do receptor por agonistas provoca *down-regulation*, enquanto o bloqueio por antagonistas leva a um *up-regulation* dos receptores (INSEL, 1989). Isso ocorre, pois, o estado ativo se torna mais suscetível à fosforilação resultando em dessensibilização e *down-regulation*, enquanto o estado inativo estabiliza o receptor resultando em *up-regulation* (BARKER et al., 1994; MILLIGAN e BOND, 1997; DE LIGT et al., 2000). Este pode justamente ser um dos fatores que contribui para a diminuição dos receptores adrenérgicos na chamada fase tardia da sepse, pois há muito tempo já se tem relatado que os receptores adrenérgicos são dessensibilizados após o choque e que a alta concentração de catecolaminas, além de isquemia induzida por hipóxia e a liberação de citocinas, podem resultar nessa dessensibilização (LIU et al., 1998), culminando em vasodilatação e hipotensão. Por isso ainda há controvérsias sobre a administração de vasoconstritores para tratamento da hipotensão na sepse, pois além de alguns pacientes não terem nenhuma melhora, poderia inclusive haver uma piora no quadro, não apenas cardiovascular, mas do organismo como um todo. Apesar de ser utilizada para elevar a pressão arterial, a administração de vasoconstritores pode ter um efeito bastante negativo na perfusão tecidual, já bastante prejudicada em pacientes e animais sépticos.

Como dito, o uso de antagonistas seletivo alfa-1 adrenérgico, prazosina ou doxazosina nesse caso, foi com o intuito de promover um *up-regulation* destes receptores melhorando a resposta contrátil frente a fenilefrina e, conseqüentemente, o quadro de hipotensão. Apesar de ter ocorrido uma diminuição dos receptores alfa1-adrenérgicos na aorta de animais sépticos, os dados do ensaio de ligação utilizando prazosina fluorescente mostra que a administração de antagonistas alfa1, apesar de terem melhorado a resposta na aorta e na pressão arterial, não mostrou aumento na densidade total de receptores alfa-1 adrenérgicos de cortes de aorta.

Down-regulation de receptores inclui dois processos. No primeiro, ocorre diminuição do número de receptores na superfície da membrana celular, mas a quantidade total de receptor em cada célula não é alterada. O segundo passo é a diminuição da quantidade total de receptores. No estágio inicial do choque a dessensibilização do receptor pode ser atribuída principalmente à diminuição da quantidade de receptores na membrana celular, e em alguns trabalhos, isto foi possível de ser correlacionado com a internalização dos mesmos (MAISEL et al., 1987). A real *down-regulation*, que é a degradação dos receptores internalizados e diminuição da expressão, aparece de 3-5 horas até mesmo 1-2 dias após primeira etapa (DUAN et al., 2015).

Estudos avaliando a densidade de receptor alfa 1 no fígado (HWANG et al., 1993) e no coração (WU et al., 1997) de animais submetidos ao modelo de CLP, mostraram que estes são externalizados das vesículas para membrana celular na fase inicial da sepse (9 h após cirurgia) e internalizados na fase tardia (18 h após a cirurgia). Como estamos vendo receptores de membrana e receptores intracelulares em nosso trabalho, pode estar ocorrendo este mesmo processo de internalização dos receptores observado nos animais sépticos, processo o qual é inibido pelos tratamentos. Isso explicaria o motivo de não estarmos vendo diferença na densidade total de receptores, pois o número de receptores não alterou, apenas o local onde se encontram (membrana e citoplasma).

Outra possibilidade seria que a prazosina poderia estar se ligando mais em um subtipo específico, visto que são poucos os ligantes reconhecidos por atuar apenas um subtipo de receptor α_1 , que apresentem pelo menos 100 a 1000 vezes maior afinidade do que se tem pelos outros dois subtipos (GRAHAM et al., 1996), e deixando mais disponível um subtipo que sofra menos dessensibilização frente a vasoconstritores endógenos e exógenos. Alguns estudos inclusive já sugeriram que mRNA α_1D pode apenas ser traduzido em resposta a estímulos específicos, como a perda de outros subtipos de ARs (TURNBULL et al., 2003).

Sabe-se que os receptores α_1 estão sujeitos a fosforilação, internalização e dessensibilização com exposição a norepinefrina, epinefrina e fenilefrina. Entretanto, há uma diferença no grau em que acontecem entre os subtipos de receptores α_1 (VAZQUEZ-PRADO et al., 2000; GARCIA-SAINZ et al., 2004; CABRERA-WROOMAN et al., 2010). Por exemplo, já está bem estabelecido que receptores α_1A são menos fosforilados, dessensibilizados e internalizados quando expostos às catecolaminas acima mencionadas do que os subtipos α_1B

e $\alpha 1D$ (CHALOTHORN et al., 2002; STANASILA et al., 2008; CABRERA-WROOMAN et al., 2010; VAZQUEZ-PRADO e GARCIA-SAINZ, 1996; VAZQUEZ-PRADO et al., 2000), e a fosforilação dos dois últimos apresenta repercussões funcionais. Em contrapartida, o subtipo $\alpha 1A$, que é fosforilado de forma mais lenta, apresenta apenas significância funcional marginal quando de sua fosforilação (GARCIA-SAINZ et al., 2001). Portanto, no que diz respeito à fosforilação, dessensibilização e internalização do receptor, a visão de que os $\alpha 1A$ são menos regulados do que os outros dois subtipos é aceitável (para revisão ver COTECCHIA, 2010).

Receptores $\alpha 1D$ são expressos constitutivamente em várias artérias e são importantes na regulação do tônus vascular *in vivo* e está associado com a hipertensão (VILLALOBOS-MOLINA et al., 1999). Esse é o principal subtipo de receptor $\alpha 1$ encontrado na aorta. Segundo GARCIA-SAINZ e colaboradores, o subtipo $\alpha 1D$ está sujeito a dessensibilização homóloga e heteróloga. Ainda, noradrenalina induz rápido, porém pequeno, aumento no cálcio intracelular ao se ligar aos receptores $\alpha 1D$, quando comparado com os outros subtipos (VAZQUEZ-PRADO e GARCIA-SAINZ, 1996; VAZQUEZ-PRADO et al., 2000). Portanto, a hipótese de que pode estar ocorrendo dimerização de receptores alfa-1, provocando alterações na resposta contrátil frente a fenilefrina com o tratamento, sem alteração significativa na densidade dos receptores, é aceitável.

O chamado choque vasodilatador é caracterizado não somente pela hipotensão por vasodilatação periférica, mas também pela má resposta ao tratamento com drogas vasopressoras (LANDRY, 2001). Sendo assim, ao provocar alterações nos subtipos de receptores alfa-1 adrenérgicos ativos, estaríamos interferindo também na ação destes sem precisar que a quantidade total de receptores alfa-1 seja alterada. Para confirmação desta hipótese, a realização de um ensaio de ligação com isótopo radioativo seria essencial.

No modelo utilizado, além do dano cardiovascular, podemos inferir também dano hepático, observado pelo aumento das concentrações séricas de ALT. Os mecanismos de lesão hepática na sepse são complexos e envolvem a interação de múltiplos processos fisiológicos. O fígado tem papel importante na patogênese da sepse, tanto como fonte tecidual para citocinas como TNF e IL-6, quanto como órgão alvo destes mediadores mediando a lesão hepática (ABRAHAM e SINGER, 2007). Células de Kupffer, que são macrófagos hepáticos, produzem quando ativados, mediadores inflamatórios de maneira excessiva, como IL-1, IL-6, TNF, óxido nítrico e espécies reativas de

oxigênio que, ao serem liberados para a circulação sistêmica, contribuem para lesão de vários órgãos assim como podem interagir com hepatócitos e células endoteliais mediando dano do próprio fígado (FENG et al., 2017). Níveis de AST e ALT, indicadores de dano hepático, estão aumentados em pacientes sépticos (KOSKINAS, 2008). Alterações bioquímicas e histológicas semelhantes são reproduzidas em animais submetidos ao modelo de CLP (LIANG et al., 2015) o que também foi demonstrado em nossos resultados.

A disfunção hepática induzida pela sepse está intimamente relacionada com maior mortalidade. Persistência ou desenvolvimento de falência hepática após início da sepse está associado com pior prognóstico (FENG et al., 2017). O desenvolvimento de falência de um ou mais órgãos ameaça a sobrevivência de pacientes com sepse, e a mortalidade normalmente está associada à disfunção múltipla de órgãos (MARSHALL et al., 1995). Portanto, o desencadeamento da sepse pode ser melhorado prevenindo lesões hepáticas. O tratamento com cloridrato de prazosina 12 horas após CLP, ou seja, com quadro de sepse já instalado, parece ter sido capaz de prevenir dano hepático, já que os níveis do biomarcador ALT permaneceram próximos ao basal com o tratamento.

Finalmente, nosso conjunto de dados demonstra que na sepse há um comprometimento cardiovascular com dano de órgãos que foram prevenidos com o tratamento dos animais na sepse já em curso, com um antagonista alfa-1 adrenérgico.

6. CONCLUSÃO

Embora os principais objetivos da terapia hemodinâmica no choque séptico sejam restaurar a pressão arterial média, o débito cardíaco e a unidade microcirculatória efetiva, nenhuma terapia vascular provou sua eficiência. O entendimento dos fatores e mecanismos contribuintes poderia ajudar na seleção de metas terapêuticas significativas.

Nossos resultados indicam, pela primeira vez, que o tratamento de camundongos com antagonistas α_1 adrenérgicos, o cloridrato de prazosina ou doxazosina, é uma estratégia efetiva contra os danos induzidos pelo modelo de sepse polimicrobiana. Entretanto, mais estudos são necessários para determinar a importância destes tratamentos na sepse, porém, os dados atuais fornecem novas perspectivas sobre as atividades farmacológicas destas substâncias como uma estratégia complementar para o tratamento da sepse.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM E, SINGER M. Mechanisms of sepsis-induced organ dysfunction. **Crit Care Med.** v. 35, n. 10, p. 2408–2416, Oct. 2007.

AKINAGA J, LIMA V, KIGUTI LR DE A, HEBELER-BARBOSA F, ALCÁNTARA-HERNÁNDEZ R, GARCÍA-SÁINZ JA, PUPO AS. Differential phosphorylation, desensitization, and internalization of α 1A-adrenoceptors activated by norepinephrine and oxymetazoline. **Mol Pharmacol.** v. 83, n. 4, p. 870–881, Apr. 2013.

AMANO M, ITO M, KIMURA K, FUKATA Y, CHIHARA K, NAKANO T, et al. Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho-kinase). **J Biol Chem.** v. 271, n. 34, p. 20246–20249, Jun. 1996.

ANNANE D, BELLISSANT E, CAVAILLON JM. Septic shock. **Lancet.** v. 365, n. 9453, p. 63–78, Jan. 2005.

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

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

BANGASH MN, KONG ML, PEARSE RM. Use of inotropes and vasopressor agents in critically ill patients. **Br J Pharmacol.** v.165, n. 7, p. 2015-2033, Apr. 2012.

BARKER, E.L., WESTPHAL, R.S., SCHMIDT, D., SANDERS-BUSH, E. Constitutively active 5-hydroxytryptamine_{2C} receptors reveal novel inverse agonist activity receptor ligands. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 16, 1p.1687-11690, Apr. 1994.

BARON RM, BARON MJ, PERRELLA MA. Pathobiology of sepsis: are we still asking the same questions? **Am J Respir Cell Mol Biol** v.34, n.2, p. 129-34, Feb. 2006.

BENEDET, P.O., MENEGATTI, A.C.O., GONÇALVES, M.C., TERENCE, H., ASSREUY, J. The therapeutic value of protein (de)nitrosylation in experimental septic shock. **Biochim Biophys Acta** v. 1864, n. 1, p. 307–316 Jan. 2018.

BENEDICT, C R; ROSE, J A. Arterial norepinephrine changes in patients with septic shock. **Circulatory shock** v. 38, n. 3, p. 165-172, Nov. 1992.

BEUTLER B, RIETSCHEL ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nat Rev Immunol** v. 3, p. 169-76, Feb 2003.

BONE RC. Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). **Ann Intern Med.** v. 125, n. 8, p. 680-687, Oct 1996.

BOSMANN M, WARD PA. The inflammatory response in sepsis. **Trends Immunol.** v. 34, n. 3, p. 129–136, Mar. 2013.

BRISTOW M R. Mechanism of action of beta-blocking agents in heart failure. **Am J. Cardiol.** v. 80, n. 11, p. 26-40, Dec. 1997.

BROPHY J M; JOSEPH L; ROULEAL J L. Beta-blockers in congestive heart failure: a Bayesian meta-analysis. **Ann Intern Med.** v. 134, n. 7, p. 550-560, Apr. 2001.

BUCHER M, KEES F, TAEGER K, KURTZ A. Cytokines down-regulate alpha1-adrenergic receptor expression during endotoxemia. **Crit Care Med.** v. 31, n. 2, p. 566–571, Feb. 2003.

CABRERA-WROOMAN A, ROMERO-ÁVILA MT, GARCÍA-SÁINZ JA. Roles of the α 1A-adrenergic receptor carboxyl tail in protein kinase C-induced phosphorylation and desensitization. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.** V. 382, p. 499-510, Dec. 2010.

CHALOTHORN D, MCCUNE DF, EDELMANN SE, GARCÍA-CAZARÍN ML, TSUJIMOTO G, PIASCIK MT. Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of

the $\alpha(1)$ -adrenoceptor subtypes. **Mol Pharmacol.** v. 61, n. 5, p. 1006-1016, May. 2002.

CHEN GY, NUÑEZ G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol.** v. 10, n. 12, p. 826-837, Dec. 2010.

CHENG B., HOEFT AH., BOOK M., SHU Q., PASTORES SM. Sepsis: Pathogenesis, Biomarkers, and Treatment. **Biomed Res Int.** v. 2015, Mar 2015.

CALZADA BC, ARTIÑANO AA. Alpha-adrenoceptor subtypes. **Pharmacol Res.** v. 44, n. 3, p. 195-208, Sep. 2001.

CAMBRIDGE D., GREENGRASS P.M. Differential α 1-adrenoceptor response to acute and chronic α 1-blockade in adult normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Blood Vessels.** v. 17, n. 3, 1980. COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* v. 420, n. 6917, p. 885-891, Dez. 2002.

COHN HI, HARRIS DM, PESANT S, et al. Inhibition of vascular smooth muscle G protein-coupled receptor kinase 2 enhances α 1D-adrenergic receptor constriction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 2008; v. 295, n. 4, p. 1695-1704, Oct. 2008.

COMMUNAL C et al. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the b-adrenergic pathway. **Circulation.** v.98, n. 13, p.1329-1334, Sep. 1998.

COTECCHIA, S. Constitutive activity and inverse agonism at the $\alpha(1a)$ and $\alpha(1b)$ adrenergic receptor subtypes. **Methods Enzymol.** v. 485, p. 123-138, 2010.

DA SILVA-SANTOS, J E et al. The Rho-A/Rho-kinase pathway is upregulated but remains inhibited by cyclic guanosine monophosphatedependent mechanisms during endotoxemia in small mesenteric arteries. **Critical Care Medicine** v. 37, n. 5, p. 1716-1723, May. 2009.

DE COSTA CM. “The contagiousness of childbed fever:” a short history of puerperal sepsis and its treatment. **Med J Aust v. 177, p. 668-671**, 2002.

DE LIGT, R.A., KOUROUNAKIS, A.P., IJZERMAN, A.P. Inverse agonism at G protein-coupled receptors: (patho)physiological relevance and implications for drug discovery. **Br. J. Pharmacol.**, v. 130, n. 1, p. 1-12, May. 2000.

DE SOUZA, S.C. Lições de anatomia: manual de esplanologia. Salvador: **EDUFBA**, 500p, 2010.

DOCHERTY, R.J. Subtypes of functional α - and α -adrenoceptors. **European Journal of Pharmacology**. v. 361, n. 1, p. 1–15, Nov. 1998.

DUAN C, YANG G, LI T, LIU L. Advances in vascular hyporeactivity after shock: the mechanisms and managements. **Shock**. v. 44, n. 6, p. 524–534., Dec. 2015.

FENG H, CHEN J, WANG H, CHENG Y, ZOU Z, ZHONG Q, et al. Roflumilast reverses polymicrobial sepsis-induced liver damage by inhibiting inflammation in mice. **Lab Invest**. v. 97, p. 1008-1009, Jun. 2017.

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

FERNANDES, D; ASSREUY, J. Nitric oxide and vascular reactivity in sepsis. **Shock** v. 30 Suppl 1, p. 10-13, Out. 2008.

FERNANDES, D et al. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 328, n. 3, p. 991-999, Mar. 2009.

FIRMIDA, C C; MESQUITA, T E. O paradoxo do tratamento da ICC com betabloqueadores. Implicação para pacientes hipertensos. **Rev. Bras. Hipertens**. v. 8, n. 4, p. 458-465, Nov. 2001.

FLEMING, A. The Official Web Site of the Nobel Prize. Disponível em https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/. Acessado em 15 de dezembro de 2017.

FOODY, J M; FARRELL, M H; KRUMHOLZ, H M. β -Blocker Therapy in Heart Failure. **JAMA** v. 287, n. 7, p. 883-889, Feb. 2002.

FUNK, D. J., J. E. PARRILLO, et al. Sepsis and septic shock: a history. **Critical Care Clinics**, v.25, n.1, p.83-101, 2009.

FURCHGOTT, R F; ZAWADZKI, J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** v. 288, n. 5789, p. 373-376, 27 nov. 1980.

FURCHGOTT RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM, ed. Mechanisms of vasodilatation; vol 4. New York: **Raven Press**, 1988.

GAIESKI DF, EDWARDS JM, KALLAN MJ, CARR BG. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Crit Care Med**. v. 41, n. 5, p. 1167-1174, may 2013.

GARCIA-SAINZ JA, VAZQUEZ-CUEVAS FG, ROMERO-AVILA MT. Phosphorylation and desensitization of α 1D-adrenergic receptors. **Biochem J**. v. 353, n. 3, p. 603-610, 2001.

GARCIA-SAINZ, J. A., RODRIGUEZ-PEREZ, C. E., ROMERO ÁVILA, M. T. Human α -1D adrenoceptor phosphorylation and desensitization. **Biochem. Pharmacol.** v. 67, p. 1853–1858, 2004.

GEROULANOS S, DOUKA ET. Historical perspective of the word “sepsis.” **Intensive Care Med** v. 32, n.12, p. 2077, oct. 2006.

GRAHAM RM, PEREZ DM, HWA J, PIASCIK MT. Alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. **Circ Res.** v. 78, n. 5, p. 737-749, May. 1996.

HAGUE C, UBERTI MA, CHEN Z, HALL RA, MINNEMAN KP. Cell surface expression of α 1D-adrenergic receptors is controlled by heterodimerization with α 1B-adrenergic receptors. **J Biol Chem** v. 279, n. 15, p.15541–15549, Jan. 2004.

HAGUE, C., et al. Heterodimers of α 1B and α 1D adrenergic receptors form a single functional entity. **Mol. Pharmacol.** v. 69, n.1, p. 45–55, 2006.

HOESEL B, SCHMID JA. The complexity of NF- κ B signaling in inflammation and cancer. **Mol Cancer.** v. 12, n. 86, p. 1-15, Aug. 2013.

HOFFMAN, B.B AND LEFKOWITZ, R.J, Catecholamines, Sympathomimetic Drugs, and Adrenergic Receptor Antagonists, In, Goodman and Gillman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, (Hardman, J.G, Limbird, L.E, Molinoff, P.B., Ruddon, R.W, and Gilman, A.G., eds) The McGraw-Hill Companies, Inc., p.199-248, 1996.

HOSODA C, TANOUE A, SHIBANO M, et al. Correlation between vasoconstrictor roles and mRNA expression of α 1-adrenoceptor subtypes in blood vessels of genetically engineered mice. **Br J Pharmacol.** v. 146, n. 3, p. 456-466, Aug. 2005.

HUBBARD WJ, CHOUDHRY M, SCHWACHA MG, et al. Cecal ligation and puncture. **Shock.** V. 24, n. 1, p. 52-57, Dec. 2005.

HWANG TL , LAU YT, CHEN MF, TANG C, LIU MS. Biphasic intracellular redistribution of alpha 1-adrenergic receptors in rat liver during sepsis. **Am J Physiol.** v. 265, n. 2, p. R385-R391, Aug. 1993. .

IGNARRO LJ, BYRNS RE, WOOD KS. Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its simlanty to nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM, ed. Mechanisms of vasodilatation; vol 4 New York: **Raven Press**, 1988.

INSEL, P.A. Structure and function of α -adrenergic receptors. **Am. J. Med.** v.,87, n. 2A, p. 12S±18S, Aug. 1989.

ILAS - INSTITUTO LATINO-AMERICANO PARA ESTUDOS DA SEPSE E CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Sepsis: um problema de saúde pública. Brasília, 2016.

JULOU-SCHAEFFER G, GRAY GA, FLEMING I, SCHOTT C, PARRATT JR, STOCLET JC. Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves Larginine pathway. **Am J Physiol.** v. 259, n. 4, p. H1038–H1043, Oct. 1990.

KANAI AJ et al. Beta-adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. **Am J Physiol.** v. 273, p.: C1371-C1377, Oct. 1997.

KANDASAMY K et al. Atorvastatin prevents vascular hyporeactivity to norepinephrine in sepsis: role of nitric oxide and α_1 -adrenoceptor mRNA expression.. **Shock.** v. 36, n. 1, p. 76-82, Mar. 2011.

KATO, R., PINSKY, M.R. Personalizing blood pressure management in septic shock. **Ann Intensive Care.** v. 5, n. 41, p. 1-10, Nov. 2015.

KLINZING S, SIMON M, REINHART K, BREDLE DL, MEIER-HELLMANN A. High-dose vasopressin is not superior to norepinephrine in septic shock. **Crit Care Med.** v. 31, n. 11, p. 2646-2650, 2003.

KOSKINAS J. Liver histology in ICU patients dying from sepsis: a clinicopathological study. **World J Gastroenterol.** v. 14, n. 9, p. 1389-1393, Mar. 2008.

LANDRY, D.W, OLIVER, J. The pathogenesis of vasodilatory shock. **The New England Journal of Medicine.** v. 345, N. 8, Aug. 2001.

LEVIN MA, LIN HM, CASTILLO JG, et al. Early on-cardiopulmonary bypass hypotension and other factors associated with vasoplegic syndrome. **Circulation** v. 120, n. 17, p. 1664 – 1671, Oct. 2009.

LEVY B, COLLIN S, SENNOUN N, DUCROCQ N, KIMMOUN A, ASFAR P, et al. Vascular hyporesponsiveness to vasopressors in septic shock: from bench to bedside. **Intensive Care Med.** v. 36, n. 12, p. 2019–2029, Dec. 2010.

LIANG D, HOU Y, LOU X et al. *Decoy receptor 3 improves survival in experimental sepsis by suppressing the inflammatory response and lymphocyte apoptosis.* **PLOS ONE** v. 10, n. 6, Jun. 2015.

LIU LM, HU DY, CHEN HS. Advances of the desensitization of adrenergic receptors during circulatory shock. **Chin J Pathophysiol.** v. 14, p.100–103, 1998.

LOHSE, M.J. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. **Biochim Biophys Acta.** v. 1179, n. 2, p. 171-188, Nov. 1993.

MAHAN LC, MCKERNAN RM, INSEL PA. Metabolism of alpha- and beta-adrenergic receptors in vitro and in vivo. **Annu Rev Pharmacol Toxicol.** v. 27, p. 215–235, 1987.

MAISEL AS, MOTULSKY HJ, ZIEGLER MG, INSEL PA. Ischemia- and agonist-induced changes in alpha and beta-adrenergic receptor traffic in guinea pig hearts. **Am J Physiol.** v. 253, n. 5, p. 1159–1166, Nov. 1987.

MARIK PE, FLEMMER M. The immune response to surgery and trauma: implications for treatment. **J Trauma Acute Care Surg.** V. 73, n. 4, p. 801-808, Oct. 2012.

MARSHALL, J.C., COOK, D.J., CHRISTOU, N.V., BERNARD, G.R., SPRUNG, C.L., SIBBALD, W.J. Multiple organ dysfunction score: a reliable descriptor of a complex clinical outcome. **Crit Care Med.** v. 23, n. 10, p. 1638-1652, Oct. 1995.

MATSUDA N, HATTORI Y. Vascular biology in sepsis: pathophysiological and therapeutic significance of vascular dysfunction. **J Smooth Muscle Res** v. 43, n. 3, p. 117 – 137, Aug. 2007.

MCGRAW, D.W. et al. 2006. Airway smooth muscle prostaglandin -EP1 receptors directly modulate β 2-adrenergic receptors within a

unique heterodimeric complex. **J. Clin. Invest.** v. 116, n. 1, p.1400–1409, 2006.

MEDZHITOV RUSLAN. Toll-like receptors and innate immunity. **Nature** v. 1, p.135-145, 2001.

MERMUTLUOGLU C, DEVECI O, DAYAN S, ASLAN E, BOZKURT F, TEKIN R. Antifungal susceptibility and risk factors in patients with candidemia. **Eurasian J Med.** v. 48, n. 3, p. 199–203, Oct. 2016.

MERX, M W; WEBER, C. Sepsis and the heart. **Circulation** v. 116, n. 7, p. 793-802, Aug. 2007.

MICHELOTTI GA, PRICE DT, SCHWINN DA. α_1 -Adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. **Pharmacology & Therapeutics.** v. 88, n.3, p. 281-309, Dec. 2000.

MILLIGAN, G., BOND, R.A. Inverse agonism and the regulation of receptor number. **Trends Pharmacol. Sci.**, v. 18, n. 12, p. 468-474, Dec. 1997.

MILLIGAN G, PEDIANI J, FIDOCK M, LOPEZ-GIMENEZ JF. Dimerization of alpha1-adrenoceptors. **Biochem Soc Trans.** v. 32, n. 5, p. 847– 850, 2004.

MONCADA, S., RADOMSKI, M.W., PALMER, R.M. Endothelium-derived relaxing factor. Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. **Biochem Pharmacol** v. 37, n. 13, p. 2495–2501, Jul. 1988.

NAU GJ, RICHMOND JFL, SCHLESINGER A, JENNINGS EG, LANDER ES, YOUNG RA. Human macrophage activation programs induced by bacterial pathogens. **Proc Natl Acad Sci (PNAS)** v. 99, n. 3, p. 1503-1508, Feb. 2002.

OGUT, O, BROZOVICH, F V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 35, n. 4, p. 347-355, Abr. 2003.

PARKER MM, SHELHAMER JH, BACHARACH SL, et al. Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. **Ann Intern Med** v. 100, n. 4, p. 483–490, Apr. 1984.

PARRISH WR, GALLOWITSCH-PUERTA M, CZURA CJ, TRACEY KJ. Experimental therapeutic strategies for severe sepsis: mediators and mechanisms. **Ann N Y Acad Sci.** v.1144, n. 1, p. 210-236, Nov. 2008.

PRICE, D T et al. Expression of alpha 1-adrenergic receptor subtype mRNA in rat tissues and human SK-N-MC neuronal cells: implications for alpha 1-adrenergic receptor subtype classification. **Molecular Pharmacology** v. 46, n. 2, p. 221-226, Aug. 1994.

PRINSTER SC, HAGUE C, HALL RA. Heterodimerization of G-protein coupled receptors: specificity and functional significance. **Pharmacol Rev.** v. 57, n. 3, p. 289–298, Sep. 2005.

RANG, HP et al. How drugs act: molecular aspects. Rang & Dale's Pharmacology. [S.l.]: Elsevier, p. 24-53, 2007a.

RANG, HP et al. Noradrenergic transmission. Rang & Dale's Pharmacology. [S.l.]: Elsevier, p. 168-188, 2007b.

RANG, HP et al. The vascular system. Rang & Dale's Pharmacology. [S.l.]: Elsevier, p. 298-320, 2007c.

REES DD, MONKHOUSE JE, CAMBRIDGE D, MONCADA S. Nitric oxide and the haemodynamic profile of endotoxin shock in the conscious mouse. **Br J Pharmacol** v. 124, n. 3, p.540–546, Jun. 1998.

RITTIRSCH D, FLIERL MA, WARD PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n. 10, p. 776-787, Oct. 2008.

RIVERS EP, MCINTYRE L, MORRO DC, RIVERS KK. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. **CMAJ.** v. 173, n. 9, p. 1054-1065, Oct. 2005.

SCHOUTEN M, WIERSINGA WJ, LEVI M, van DER POLL T. Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. **J Leukoc Biol.** v. 83, p. 536-545, Mar 2008.

SCHULTE W, BERNHAGEN J, BUCALA R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. **Mediators Inflamm.** v. 2013, n. 6, p. 1-16, May. 2013.

SHARAWY N. Vasoplegia in septic shock: do we really fight the right enemy? **J Crit Care.** v. 29, n. 1, p. 83–87, Feb. 2014.

SHARMA VK, DELLINGER RP. The International Sepsis Forum’s controversies in sepsis: my initial vasopressor agent in septic shock is norepinephrine rather than dopamine. **Crit Care.** v. 7, n. 1, p. 3-5, Feb. 2003.

SHORR AF, MICEK ST, JACKSON WL, JR., KOLLEF MH. Economic implications of an evidence-based sepsis protocol: can we improve outcomes and lower costs? **Crit Care Med.** v. 35, n. 5, p. 1257-1262, May 2007.

SINGER, M et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **The Journal of the American Medical Association** v. 315, n. 8, p. 801-810, 23 fev. 2016.

SOGAYAR, A M C et al. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **PharmacoEconomics** v. 26, n. 5, p. 425-434, 2008.

STANASILA L., ABUIN L., DEY J., COTECCHIA, S. Different Internalization Properties of the α 1a- and α 1b-Adrenergic Receptor Subtypes: The Potential Role of Receptor Interaction with β -Arrestins and AP50. **Molecular Pharmacology.** v. 74, n. 3, p. 562-573, Sep. 2008.

SRISKANDAN S, COHEN J. The pathogenesis of septic shock. **J Infect.** v.30, n. 3, p. 201-206, May 1995.

SURKS HK, MOCHIZUKI N, KASAI Y, et al. Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP-dependent protein kinase I α . **Science.** v. 286, n. 5444, p. 1583-1587, Nov. 1999.

SYLVESTER JT, SCHARF SM, GILBERT RD, FITZGERALD RS, TRAYSTMAN RJ. Hypoxic and CO hypoxia in dogs: hemodynamics,

carotid reflexes, and catecholamines. **Am J Physiol.** v. 236, n. 1, p. H22-H28, Jan. 1979.

TAEB, AM, MD; HOOPER, MH; MARIK, PE. Sepsis: Current Definition, Pathophysiology, Diagnosis, and Management. **Nutrition in Clinical Practice.** v. 32, n. 3, p. 296-308, Jun. 2017.

TERRILLON S., BOUVIER M. Roles of G-protein-coupled receptor dimerization. **EMBO Rep.** v. 5, n.1 p. 30-34, Jan. 2004.

THOMAS, S.; RAMACHANDAN, A.; PATRA, S.; VIDYASAGAR, S.; BALASUBRAMANIAN, K.A. Nitric oxide protects the intestine from the damage induced by laparotomy and gut manipulation. **Journal of Surgical Research,** v.99, n. 1, p.25-32, Jul. 2001.

THURSTON AJ. Of blood, inflammation and gunshot wounds: the history of the control of sepsis. **Aust N Z J Surg** v. 70, n. 12, p. 855-861, Dec. 2000.

TRIPOSKIADIS F, KARAYANNIS G, GIAMOZIS G, SKOULARIGIS J, LOURIDAS G, BUTLER J. The sympathetic nervous system in heart failure physiology, pathophysiology, and clinical implications. **J Am Coll Cardiol.** v. 54, n. 19, p. 1747-1762, Nov. 2009.

TURNBULL L, MCCLOSKEY DT, O'CONNELL TD, SIMPSON PC, BAKER AJ. Alpha 1-adrenergic receptor responses in alpha 1A-AR knockout mouse hearts suggest the presence of alpha 1D-AR. **Am J Physiol** v. 284, n. 4, p. H1104 –H1109, Apr. 2002.

UBERTI, M.A., HAGUE, C., OLLER, H., MINNEMAN, K.P., HALL, R.A. Heterodimerization with β_2 adrenergic receptors promotes surface expression and functional activity of α_1D -adrenergic receptors. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 313, n. 1, p.16–23, Jan. 2005.

UMANS, J G et al. Effects of endotoxin in vivo on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta. **The American Review of Respiratory Disease** v. 148, n. 6, p. 1638-1645, Dez. 1993.

van DER POLL T, LOWRY SF. Tumor necrosis factor in sepsis: mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? **Shock**. v. 3, n. 1, p. 1-12 Jan. 1995.

VAZQUEZ-PRADO, J., GARCIA-SAINZ, J. A. Effect of phorbol myristate acetate on $\alpha 1$ -adrenergic action in cells expressing recombinant $\alpha 1$ -adrenoceptor subtypes. **Mol. Pharmacol.** v. 50, p. 17–22, 1996.

VAZQUEZ-PRADO, J., MEDINA, L. C., ROMERO, M. T., GONZALEZ-ESPINOSA, C., GARCIA-SAINZ, J. A. Norepinephrine and phorbol ester-induced phosphorylation of $\alpha 1a$ -adrenergic receptors. **Functional aspects. J. Biol. Chem.** v. 275, n. 9, p. 6553–6559, Mar. 2000.

VILLALOBOS-MOLINA, R., LOPEZ-GUERRERO, J. J., IBARRA, M. Functional evidence of $\alpha 1D$ -adrenoceptors in the vasculature of young and adult spontaneously hypertensive rats. **Br. J. Pharmacol.** v. 126, n. 7, p. 1534–1536, Apr. 1999.

VINCENT JL, BACKER D. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. **Crit Care.** v. 9, n. 4, p. 9-12, Aug. 2005.

VON BAHR C., LINDSTROM B., SEIDEMAN P. α -receptor function changes after the first dose of prazosin. **Clin. Pharmacol. Ther.** v. 32, p. 41–47, 1982.

WAAGSTEIN F et al. Effect of chronic betaadrenergic receptor blockade in congestive cardiomyopathy. **Br Heart J.** v.37, n. 10, p.1022-1036, Oct. 1975.

WICHTERMANN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. **Journal of Surgery Research**, v. 29, n. 2, p. 189-201, Aug. 1980.

WIERSINGA WJ, VAN ZANTEN ARH, KAASJAGER KA, van DER POLL T. [Sepsis: new insights, new definition]. **Ned Tijdschr Geneesk.** v.161, n.0, p. 1551, 2017.

WU LL , TANG C, LIU MS. Hyper- and hypocardiodynamic states are associated with externalization and internalization, respectively, of alpha-adrenergic 1 receptors in rat heart during sepsis. **Shock**. v. 7, n. 5, p. 318-323, May. 1997.

ZHANG, J, FERGUSON SSG, BARAK LS, MENÁRD L, CARON MG. Dynamin and β -arrestin reveal distinct mechanisms for G-protein-coupled receptor internalization. **J Biol Chem**. v. 271, n. 31, p. 18302-18305, May. 1996.