

Ana Maria Favero

**PAPEL DO SISTEMA SIMPÁTICO NA DISFUNÇÃO
CARDIOVASCULAR DO CHOQUE SÉPTICO**

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

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis
2014

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

Favero, Ana Maria

Papel do sistema simpático na disfunção cardiovascular
do choque séptico / Ana Maria Favero ; orientador, Jamil
Assreuy - Florianópolis, SC, 2014.
102 p.

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

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Choque séptico. 3. Sistema
simpático. 4. Sepsis. 5. Bloqueio ganglionar. I. Assreuy,
Jamil. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

"O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher."

(Cora Coralina)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Seu amor incondicional, pelo cuidado com minha família, por me amparar em todos os momentos difíceis e por guiar minhas escolhas.

Ao meu orientador Professor Jamil Assreuy, pela oportunidade de crescer como profissional e como pessoa e pelo imenso aprendizado durante os anos como bolsista de iniciação científica e, mais recentemente, como mestrand. Pelos anos de orientação, dedicação e confiança a mim concedidos.

Aos meus heróis da vida real, meu pai Elói e minha mãe Salete, pelo incentivo em todas as escolhas que fiz, pelo suporte nos momentos mais duros da minha caminhada, pelo exemplo de coragem, superação, dignidade e humildade. Nada é tão contagioso quanto o bom exemplo de vida que ganhei de vocês.

Aos meus amados irmãos, João Luiz e Pedro Henrique, por toda felicidade e amor que me proporcionam. Ao João, especialmente, por “segurar as pontas” durante todos os anos da minha ausência em casa e por cuidar tão carinhosamente do nosso Pedra. Ao Pedro, nosso pequeno anjo sem asas, pelo infinito aprendizado que traz dia após dia à nossa família, pelo exemplo de força e coragem e por me ensinar que, apesar de todas as dificuldades e limitações, qualquer um é capaz de vencer e ser feliz.

Ao meu namorado Adroaldo, pela companhia e incentivo durante minha caminhada. Pelo amor, amizade e respeito ao longo dos nossos anos juntos.

A Regina de Sordi, pela amizade e pelo precioso apoio durante toda a jornada do mestrado. Por todas as discussões científicas, as quais sempre conduziam à novas ideias.

A Karin Scheschowitsch, pela preciosa ajuda com a técnica de imunofluorescência.

A Adriane Madeira, pela valiosa amizade, ajuda e pela alegria que todos os dias traz consigo.

Ao Geisson Nardi, pelos ensinamentos no início da minha caminhada científica.

A todos os colegas do NOLab, Patrícia, Verônica, Sandra, Edir, Guilherme, Muryel, Bete, Gustavo e Ronald, pela convivência e grande aprendizado durante todos esses anos.

A todos os Professores do Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da UFSC, pela contribuição na minha formação profissional e pessoal.

Aos Professores José Carlos Farias Alves Filho, Silvia Dal Bó, Giles Alexander Rae e José Eduardo da Silva Santos por terem aceitado avaliar este trabalho.

Ao CNPq, CAPES e FAPESC, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O choque séptico é um potente estímulo para a ativação de vários sistemas orgânicos e dentre eles, o sistema nervoso simpático (SNS) que, além dos efeitos nos vasos, também tem impacto no coração. Altas concentrações de adrenalina e noradrenalina são encontradas na circulação de pacientes com endotoxemia e sepse, sendo estes níveis diretamente relacionados com aumento da mortalidade dos indivíduos sépticos. Embora seja conhecido que a ativação simpática exacerbada é deletéria para a homeostase do organismo, ainda não é bem compreendido qual o papel da hiperativação simpática durante um quadro de choque séptico/sepse. Portanto, no presente trabalho nós estudamos o papel da transmissão ganglionar autonômica no que diz respeito à hiporeatividade α -adrenérgica do choque séptico, e, adicionalmente, examinamos as consequências do bloqueio ganglionar precoce na expressão de receptores α_{1D} -adrenérgicos na aorta torácica de ratos, bem como em parâmetros inflamatórios e bioquímicos. Para isso, o choque séptico foi induzido por uma ligadura e perfuração do ceco (modelo de CLP) em ratos Wistar fêmeas. Uma hora após o procedimento de CLP, os animais receberam hexametônio (um bloqueador ganglionar), pentolínio (um bloqueador ganglionar mais seletivo para o gânglio simpático) ou salina (PBS). Seis e 24 h após a cirurgia de indução do choque séptico a resposta cardiovascular a agonistas vasoconstritores foi avaliada. Adicionalmente, 24 h após o procedimento de CLP, parâmetros inflamatórios e bioquímicos, hemograma, expressão de receptores α_{1D} -adrenérgicos em aorta e curva de mortalidade foram avaliados. O choque séptico aumentou os níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x), ureia, creatinina, transaminases hepáticas (TGO e TGP), citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), bem como promoveu leucopenia e trombocitopenia. Além disso, os animais em choque séptico estavam hipotensos e hiporreativos à noradrenalina e fenilefrina. A hiporeatividade aos agentes vasoconstritores foi devida, pelo menos em parte, à redução na densidade dos receptores α_{1D} -adrenérgicos na aorta da ordem de 60%. Finalmente, o choque séptico resultou em elevada mortalidade. O tratamento precoce com pentolínio reduziu os níveis plasmáticos de NO_x e ureia, preveniu a hiporeatividade aos agonistas vasoconstritores, preservou a densidade dos receptores α_{1D} -adrenérgicos na aorta e aumentou a sobrevida dos animais. Apesar do tratamento precoce com o

hexametônio ter sido capaz de prevenir a hiporeatividade à noradrenalina e fenilefrina, sua administração não resultou em nenhum efeito benéfico adicional. Assim, nossos resultados mostram claramente que a interferência com a transmissão ganglionar e consequente redução da hiperativação simpática, tem importante impacto no resgate da reatividade vascular à agonistas vasoconstritores e na redução da letalidade do choque séptico induzido por ligação e perfuração do ceco em ratos. Esses efeitos benéficos estão relacionados, em parte, com a manutenção da densidade dos receptores α_{1D} -adrenérgicos nos vasos. Esses resultados podem levar à uma nova estratégia terapêutica no auxílio do tratamento do choque séptico/sepsis.

Palavras chave: Bloqueio ganglionar simpático; choque séptico; pentolínio; hiporeatividade vascular; hexametônio; óxido nítrico; receptores α -adrenérgicos.

ABSTRACT

Septic shock is a potent stimulus for the activation of several organic systems, including the sympathetic nervous system (SNS), which besides its effects on vessels, directly impacts on the heart. High circulating epinephrine and norepinephrine concentrations were reported during endotoxaemia and septic shock, being directly associated to high mortality in septic patients. Although it is known that sympathetic overstimulation is deleterious to homeostasis of the organism, the function of sympathetic hyperactivation during septic shock is poorly understood. Therefore, in this work we studied the role of autonomic ganglionic transmission with respect to α -adrenergic hyporeactivity in septic shock, and, additionally, examined the consequences of early ganglionic blockade on the density of α_{1D} -adrenergic receptors in rat thoracic aorta, as well as inflammatory and biochemical parameters. For this, septic shock was induced by cecal ligation and puncture (CLP model) in female Wistar rats. One hour after surgery, animals received hexamethonium (a ganglionic blocker), pentolinium (a ganglionic blocker with a higher selectivity for sympathetic ganglia) or saline (PBS). Six and 24 h after surgery, the cardiovascular responses to adrenergic agonists were evaluated. In addition, 24 h after surgery, inflammatory and biochemical parameters, hemogram, the density of α_{1D} -adrenergic receptors in aorta and survival were also evaluated. Septic shock increased plasma levels of nitrate and nitrite (NO_x), urea, creatinine, hepatic transaminases (TGO and TGP), pro-inflammatory cytokines ($\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$) and promoted leukopenia and thrombocytopenia in CLP animals. Furthermore, the septic animals were hypotensive and showed hyporeactivity to norepinephrine and phenylephrine. The hyporeactivity to vasoconstrictors agents was due, at least in part, to the reduction of $\sim 60\%$ in α_{1D} -adrenergic receptors density in the aorta. Septic shock also resulted in high mortality. Early treatment with pentolinium reduced plasma levels of NO_x and urea, prevented the hyporeactivity to vasoconstrictors agents, preserved the density of α_{1D} -adrenergic receptors in the aorta and increased survival. Notwithstanding the beneficial effect of the early treatment with hexamethonium on the hyporeactivity to noradrenaline and phenylephrine, no additional beneficial effects were observed. Thus, our results clearly show that interference, with the ganglionic transmission with the consequent reduction in sympathetic hyperactivation, has a

profound impact on the recovery of vascular reactivity to vasoconstrictor agonists and in reducing mortality of sepsis-induced by CLP in rats. These beneficial effects are related, in part, with the maintenance of the density of α_{1D} -adrenergic receptors in vessels. These results may lead to a new therapeutic strategy for the treatment of sepsis/septic shock.

Key words: Sympathetic ganglionic blockade; septic shock; pentolinium; vascular hyporeactivity; hexamethonium; nitric oxide, α -adrenergic receptors.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Pólos centrais da resposta inflamatória na sepse.....33
- Figura 2.** Principal via de transdução de sinal dos adrenoreceptores α .41
- Figura 3.** Efeitos das vias do Sistema Nervoso Autônomo na inflamação durante a sepse.....50
- Figura 4.** Hipótese de trabalho.....53
- Figura 5.** Efeito do hexametônio e pentolínio na pressão arterial média e na reatividade vascular 6 h após a cirurgia de CLP.....64
- Figura 6.** Efeito do hexametônio e pentolínio na pressão arterial média e na reatividade vascular 24 h após a cirurgia de CLP.....65
- Figura 7.** Efeito dos bloqueadores ganglionares na sobrevida dos animais sépticos.....67
- Figura 8.** Efeito dos bloqueadores ganglionares no nível plasmático de citocinas pró-inflamatórias.....68
- Figura 9.** Efeito dos bloqueadores ganglionares nos níveis plasmáticos de NO_x69
- Figura 10.** Efeito dos bloqueadores ganglionares na disfunção renal dos animais sépticos.....70
- Figura 11.** Efeito dos bloqueadores ganglionares na disfunção hepática de animais em choque séptico.....71
- Figura 12.** Efeito dos bloqueadores ganglionares no nível plasmático de lactato.....73
- Figura 13.** Efeito do hexametônio no hemograma de animais sépticos.....74
- Figura 14.** Efeito do pentolínio no hemograma de animais sépticos.....75

Figura 15. Imunofluorescência dos receptores α_{1D} -adrenérgicos na aorta torácica de animais controles e sépticos.....77

Figura 16. Hiperativação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) durante o choque séptico leva à dessensibilização dos receptores α_{1D} -adrenérgicos.....86

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α -GTP – α -trifosfato de guanosina

α_{1D} -AR – Receptor α_{1D} -adrenérgico

α_7 nAChRs – Receptores α_7 -nicotínico de acetilcolina

β ARK1 – Quinase tipo 2 de receptor acoplado à Proteína G

ACh – Acetilcolina

AMPC – Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico

ATP – Adenosina trifosfato

bpm – Batimentos por minuto

Ca²⁺ - Íon Cálcio

CEUA – Comitê de ética para uso de animais

CD11b/CD18 – Receptor de integrina tipo CD11b/CD18

CD14 – Receptor de reconhecimento padrão tipo CD14

CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CLP – Ligadura e perfuração do ceco

CO₂ – Dióxido de carbono

COOH- - Porção carboxi-terminal

DAG – Diacilglicerol

EPSP – Potencial excitatório pós-sináptico

G α_s – Proteína G tipo α_s

G α_i – Proteína G tipo α_i

G α_0 – Proteína G tipo α_0

G α_q – Proteína G tipo α_q

G $_{11}$ – Proteína G tipo 11

G $_{14}$ – Proteína G tipo 14

G $_{16}$ – Proteína G tipo 16

GCs – Guanilil ciclase solúvel

GDP – Guanosina difosfato

GMPc – Guanosina 3',5'-monofosfato cíclico

GPCRs – Receptores acoplados à Proteína G

G $_q$ – Proteína G tipo $_q$

GRK1 – Quinase tipo 1 de receptor acoplado à Proteína G

GRK2 – Quinase tipo 2 de receptor acoplado à Proteína G

GRKs – Quinases de receptores acoplados à Proteína G

GTP – Guanosina trifosfato

HEX – Hexametônio

HHA – Hipotálamo-hipófise-adrenal

HMGB1 – Proteína do grupo de alta mobilidade Box 1

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-10 – Interleucina 10

IL-4 – Interleucina 4

i.p. – Intraperitoneal

IP₃ – Inositol trifosfato

i.v. – Intravenoso

K⁺ - Íon Potássio

LPS – Lipopolissacarídeo

MAP – Proteína quinase ativada por mitógenos

MHC – Complexo de histocompatibilidade maior

MLCK – Quinase de cadeia leve de miosina

MMP-2 – Metaloproteinase de matriz tipo 2

MSR – Receptor *scavenger* de macrófagos

Na⁺-Ca²⁺ - Bomba de troca iônica sódio/cálcio

Na⁺-H⁺ - Bomba de troca iônica sódio/hidrogênio

NF-κB – Fator nuclear kappa B

NH₂- – Porção amino-terminal

NH₄⁺ - Íon amônio

NO – Óxido nítrico

NOS – Enzima óxido nítrico sintase

NOS-2 – Enzima óxido nítrico sintase tipo 2

NO_x – Nitrato + nitrito

PAM – Pressão arterial média

PAMb – Pressão arterial média basal

PAMPs – Padrões moleculares associados à patógenos

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PENT – Pentolínio

pH – Potencial hidrogeniônico

PKA – Proteína quinase A

PKG – Proteína quinase G

PLA – Fosfolipase A

PLC – Fosfolipase C

PLD – Fosfolipase D

RNA_m – RNA mensageiro

s.c. – Subcutâneo

SIDA – Síndrome da imunodeficiência adquirida

SIRS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SNA – Sistema nervoso autônomo

SNS – Sistema nervoso simpático

t_{1/2} – Tempo de meia vida

TEA – Tetraetilamônio

TGO – Transaminase oxalacética

TGP – Transaminase pirúvica

Th1 – Linfócito T helper tipo 1

Th2 – Linfócito T helper tipo 2

TLR – Receptor *Toll-Like*

TLR-2 – Receptor *Toll-Like* tipo 2

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

UV – Ultravioleta

VFC – Variação da frequência cardíaca

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	30
1.1	Sepse: conceito e epidemiologia.....	30
1.2	Fisiopatologia da seps e choque séptico.....	32
1.3	Tônus vascular: como é regulado?.....	34
1.4	Receptores acoplados à Proteína G.....	36
1.4.1	Aspectos gerais.....	36
1.4.2	Receptores α -adrenérgicos.....	38
1.4.2.1	Divisão, função e localização dos alfa-adrenoreceptores.....	38
1.4.2.2	Vias de transdução de sinal e seus efetores.....	40
1.4.2.3	Regulação de receptores α -adrenérgicos.....	42
1.4.2.4	Receptores α -adrenérgicos na contração do músculo liso vascular.....	43
1.5	Sistema Nervoso Autônomo e o choque séptico/seps.....	45
1.6	A neurotransmissão ganglionar e seu bloqueio.....	51
1.7	Hipótese de trabalho.....	52
2	OBJETIVOS.....	54
2.1	Objetivo Geral.....	54
2.2	Objetivos Específicos.....	54

3	MATERIAL E MÉTODOS.....	55
3.1	Animais.....	55
3.2	Procedimentos experimentais.....	55
3.2.1	Modelo de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP).....	55
3.2.2	Avaliação da pressão arterial.....	55
3.2.3	Determinação dos parâmetros bioquímicos, níveis de citocinas, do hemograma e coleta de tecido para imunofluorescência.....	56
3.2.4	Dosagens bioquímicas.....	57
3.2.4.1	Determinação dos níveis de nitrato e nitrito (NO _x) plasmático.....	57
3.2.4.2	Dosagem de lactato plasmático.....	58
3.2.4.3	Dosagem de transaminase oxalacética e pirúvica.....	58
3.2.4.4	Dosagem de ureia plasmática.....	58
3.2.4.5	Dosagem de creatinina plasmática.....	59
3.2.5	Dosagem de IL-1 β e TNF- α plasmática.....	59
3.2.6	Hemograma.....	59
3.2.7	Imunofluorescência.....	60
3.3	Protocolos experimentais.....	61
3.3.1	Efeito do hexametônio e pentolínio na resposta cardiovascular de animais submetidos ao CLP.....	61

3.3.2 Avaliação dos efeitos da administração de hexametônio pentolínio na sobrevida de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco.....	61
3.4 Análise dos resultados e testes estatísticos empregados.....	62
3.5 Compostos e reagentes utilizados.....	62
4 RESULTADOS.....	63
4.1 Efeito do hexametônio e pentolínio na pressão arterial média basal e na resposta vasoconstritora dos animais CLP.....	63
4.2 Efeito do bloqueio ganglionar na sobrevida dos animais submetidos ao CLP.....	66
4.3 Efeito dos bloqueadores ganglionares em parâmetros inflamatórios.....	68
4.4 Efeito dos bloqueadores ganglionares nos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO _x).....	69
4.5 Efeito dos bloqueadores ganglionares na disfunção renal.....	70
4.6 Efeito dos bloqueadores ganglionares na disfunção hepática.....	71
4.7 Efeito do bloqueio ganglionar nos níveis plasmáticos de lactato....	72
4.8 Efeito do bloqueio ganglionar no hemograma.....	73
4.9 Efeito dos bloqueadores ganglionares na expressão de receptores vasculares α_{1D} -adrenérgicos.....	76
5 DISCUSSÃO.....	79
6 CONCLUSÕES.....	88
7 REFERÊNCIAS.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sepsis: conceito e epidemiologia

As manifestações clínicas da sepsis já eram conhecidas por Hipócrates e outros quase meio século antes da era cristã. Ele introduziu o termo “ferida em putrefação/decomposição” para caracterizar a doença. Ibn Sina, conhecido como o pai da Medicina moderna e também chamado de *Avicenna*, observou que a septicemia era quase sempre acompanhada por febre. Em 1914, o médico alemão Hugo Schottmüller lançou as bases para a definição moderna de sepsis e foi o primeiro a descrever que a presença de um agente infeccioso é componente fundamental da doença. Porém, décadas mais tarde, as ideias de Lewis Thomas levaram a uma reviravolta no entendimento da sepsis por popularizar a teoria de que “é a resposta do hospedeiro que faz com que a doença se manifeste” (THOMAS, 1972). A partir de então, as pesquisas em sepsis tomaram um novo rumo, onde os esforços foram no sentido de compreender a resposta imune do hospedeiro e não apenas o agente infeccioso. Mas somente na década de 90, o pesquisador Roger Bone e seus colegas introduziram na prática clínica o conceito de sepsis como sendo uma resposta inflamatória sistêmica em decorrência de uma infecção (BONE *et al.*, 1992).

Assim, podemos perceber que a história por trás da sepsis é bem antiga. Porém, após várias décadas desde as primeiras observações de como a sepsis se manifesta, não houve avanço significativo no sentido de diagnosticar um paciente séptico de maneira rápida, não se tem um tratamento específico e ainda hoje os pacientes possuem mau prognóstico.

Bone e colaboradores definiram a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) quando o paciente possui dois ou mais dos seguintes sintomas clínicos: temperatura corporal acima de 38 °C ou abaixo de 36 °C; frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minuto (bpm); frequência respiratória acima de 20 movimentos/minuto; leucócitos totais acima de 12.000/mm³ ou abaixo de 4.000/mm³ ou ainda, presença de mais de 10% de bastonetes, as quais são células de defesa ainda imaturas (BONE *et al.*, 1992). A sepsis só ocorre quando o paciente desenvolve a SIRS secundariamente a um processo infeccioso. A partir do momento em que além da SIRS e do agente infeccioso tem-se falência de um ou mais órgãos, caracteriza-se a Sepsis Severa. Por último, o estágio mais crítico e que leva ao maior número de óbitos dos

pacientes, é o quadro de Choque Séptico. Nesse estágio mais avançado, há o desenvolvimento de hipotensão severa refratária a agentes vasoconstritores ou a reposição volêmica, bem como todos os outros sintomas descritos acima (BONE *et al.*, 1992).

A sepse é importante causa de hospitalização e a principal causa de morte em unidades de terapia intensiva (UTI) (ENGEL *et al.*, 2007). Em 1990, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) calculou que nos Estados Unidos houve uma incidência de 450 mil casos de sepse por ano e mais de 100 mil mortes (JAMA, 1990). Em 2001 Angus e colegas estudaram nos EUA mais de seis milhões de prontuários de altas hospitalares, em sete estados e avaliaram 751 mil casos de sepse grave por ano, com taxa de mortalidade de 28,6% (ANGUS *et al.*, 2001). Um estudo de revisão de dados, também realizado nos Estados Unidos, avaliou durante 22 anos casos de altas hospitalares em 750 milhões de admissões e revelou um número de mais de 10 milhões de casos de sepse, com aumento na incidência de 82,7/100.000 habitantes em 2000 (MARTIN *et al.*, 2003). Estudos feitos na Europa, Austrália e Nova Zelândia relataram que as taxas de prevalência de sepse em UTI variavam de 5,1% a 30% (ALBERTI *et al.*, 2002; FINFER *et al.*, 2004). O Estudo Bases – Estudo Brasileiro de Epidemiologia da Sepse – realizado em cinco UTIs, encontrou taxas de mortalidade de 11%, 33,9%, 46,9% e 52,2%, respectivamente, em pacientes com SIRS, sepse, sepse grave e choque séptico. Esse mesmo estudo ainda revela que, a cada dia, aproximadamente 57 de cada 1000 pacientes das Unidades de Terapia Intensiva desenvolvam sepse (SILVA *et al.*, 2004). As taxas de mortalidade globais de sepse diminuíram, porém mesmo taxas de 20% a 80% continuam inaceitavelmente altas. A maior incidência de sepse deve-se ao envelhecimento da população, a procedimentos mais invasivos, ao uso de fármacos imunossupressores e à maior prevalência de infecção pela síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) (ANNANE *et al.*, 2003). Os principais microrganismos responsáveis por um quadro de infecção são as bactérias - gram-negativas e gram-positivas - e fungos. As infecções em geral podem ter sua origem na comunidade ou então ser de origem nosocomial, ou seja, quando o paciente sem quadro de infecção durante a admissão no hospital desenvolve a infecção durante o período que está hospitalizado. A principal infecção, tanto de origem comunitária quanto de origem nosocomial, é a pneumonia. Outras origens frequentes de sepse são as

infecções abdominais, urinárias, cutâneas, entre outras (ALBERTI *et al.*, 2002).

1.2 Fisiopatologia da sepse e choque séptico

A sepse resulta de uma complexa interação entre o microrganismo infectante e a resposta imune, pró-inflamatória e pró-coagulante do hospedeiro. As características do organismo infectante e a resposta do hospedeiro frente à infecção são as principais variáveis fisiopatológicas da sepse. De maneira simplificada, ocorre a progressão da sepse quando o hospedeiro não consegue conter a infecção primária por resistência à opsonização, à fagocitose, a antibióticos e presença de antígenos (RUSSELL, 2006).

A resposta imune inata é a responsável pelo processo inflamatório inicial da sepse. Ela é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão, como os receptores Toll-like (TLR) e o CD14, que reconhecem os patógenos ou seus produtos, os quais são identificados como PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos – do inglês *pathogen-associated molecular patterns*). Os receptores Toll-like do tipo 2 (TLR-2) reconhecem os peptidoglicanos das bactérias gram-positivas, enquanto os lipopolissacarídeos (LPS) das bactérias gram-negativas são reconhecidos pelos TLR-4. Outras moléculas de superfície celular também percebem o LPS, tal como canais iônicos, CD11b/CD18 e MSR – do inglês *macrophage scavenger receptor* (MEDZHITOV e JANEWAY, 2000a; MEDZHITOV e JANEWAY, 2000b; KORTGEN *et al.*, 2006; RUSSELL, 2006).

Uma vez ativados, os TLRs desencadeiam uma cascata de eventos intracelulares que culmina com a translocação nuclear do NF- κ B, o qual é um fator de transcrição que promove a expressão gênica de moléculas pró-inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-1 beta (IL-1 β) e também citocinas anti-inflamatórias como interleucina-10 (IL-10). O TNF- α e IL-1 β ativam a resposta imune adaptativa que é responsável pela amplificação da imunidade inata. Esta caracteriza-se pela ativação dos linfócitos B que liberam as imunoglobulinas facilitadoras da apresentação de antígenos para as células fagocitárias. Além disso, os linfócitos T helper tipo 1 (Th1) promovem um *feedback* positivo, secretando citocinas inflamatórias. Contrabalançando esse mecanismo, as células T helper tipo 2 (Th2) secretam interleucinas anti-inflamatórias, tal como IL-4 e IL-10. As citocinas pró-inflamatórias aumentam a expressão de moléculas de adesão em leucócitos e células endoteliais. Os neutrófilos ativados, além

de promoverem a destruição do microrganismo invasor, também causam aumento da permeabilidade vascular, o que ocasiona edema tecidual (BALDWIN, 2001; RUSSELL, 2006). A Figura 1 mostra de maneira simplificada os núcleos centrais da resposta inflamatória da sepse.

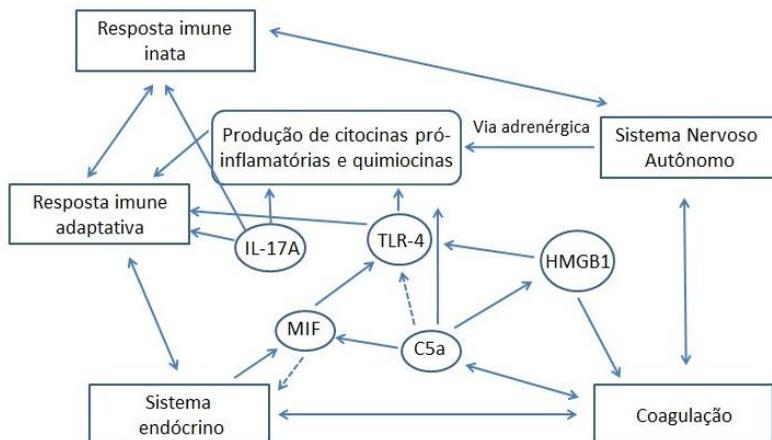


Figura 1. Pólos centrais da resposta inflamatória na sepse. O C5a é uma anafilotoxina do Sistema Complemento que é ativada pela cascata da coagulação. C5a desencadeia a liberação de alguns mediadores pró-inflamatórios, incluindo o fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) e o grupo de alta mobilidade box-1 (HMGB1), os quais ativam a cascata de coagulação através da expressão de fator tecidual (não representado). O HMGB1 é uma citocina pleiotrópica que se liga ao receptor do tipo Toll-like 4 (TLR-4) e promove liberação de mediadores pró-inflamatórios. As respostas mediadas pelo TLR-4 são reguladas negativamente pelo componente C5a (linhas tracejadas). As grandes quantidades de MIF liberadas durante a sepse amplificam a liberação de citocinas inflamatórias, através de maior expressão de TLR-4. O MIF, que pode ser produzido por leucócitos e pela hipófise, inibe os efeitos anti-inflamatórios dos glicocorticoides endógenos secretados pelo sistema endócrino. O sistema nervoso autônomo simpático também participa ativamente da via inflamatória na sepse. A interleucina-17A (IL-17A), por sua vez, faz a ponte entre as respostas imune adaptativa e inata. Adaptado de Rittirsch *et al.*, 2008.

Um dos eventos chaves no quadro de sepse é o aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS, do inglês *Nitric Oxide Synthase*), levando à liberação de óxido nítrico (NO). Por ser um potente vasodilatador, o NO promove relaxamento do músculo liso vascular bem como vasodilatação local e sistêmica (O'BRIEN *et al.*, 2007). A produção exacerbada de óxido nítrico contribui, pelo menos em parte, para a hipotensão, hiporeatividade vascular a agentes vasoativos e alterações cardiovasculares no choque séptico (MONCADA *et al.*, 1991; FERNANDES e ASSREUY, 2008). Szabó e colegas (1994) observaram que o uso de inibidores da NOS-2 (isoforma do tipo induzida) diminui a hipotensão e a hiporeatividade a agentes vasoconstritores e aumenta a sobrevivência dos animais endotoxêmicos (SZABO *et al.*, 1994). Corroborando esse estudo, nosso grupo demonstrou que inibidores da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs) – a qual é um dos alvos do NO – são eficazes em diminuir a hipotensão e a hiporeatividade vascular quando administrados nos períodos mais tardios da sepse, quando a expressão da GCs é mais elevada (FERNANDES *et al.*, 2009).

Além dos eventos citados acima, o choque séptico está associado com uma marcante hipoperfusão, disfunção orgânica e diminuição da atividade mitocondrial, resultando em prejuízo na extração de oxigênio. A produção desregulada de mediadores lipídicos como eicosanoides e fatores de ativação plaquetária, bem como de radicais livres de oxigênio e nitrogênio, também são responsáveis pelo quadro hiper-inflamatório da sepse (CINEL e OPAL, 2009; NDUKA e PARRILLO, 2011). Todos esses eventos podem, ainda, levar a disfunção cardiovascular na sepse, a qual é caracterizada por disfunção endotelial, débito cardíaco aumentado e diminuição da resistência periférica, devido à dilatação excessiva dos vasos de resistência sistêmica. Neste estágio mais avançado é onde se observa hipotensão refratária à expansão volêmica adequada e hiporeatividade a agentes vasopressores tais como angiotensina II, catecolaminas, vasopressina e serotonina (RANGEL-FRAUSTO, 2005).

1.3 Tônus vascular: como é regulado?

De maneira geral, duas formas de excitação iniciam a contração no músculo liso. A contração pode ocorrer devido à inervação e consequente despolarização do potencial de membrana de repouso – processo chamado de acoplamento eletromecânico – ou então pode ocorrer devido à ativação de ligantes nos receptores celulares – acoplamento chamado de farmacomecânico. O componente elétrico da

excitação da célula muscular lisa é caracterizado pelos potenciais de ação, os quais desencadeiam o influxo de cálcio através dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependentes. O aumento do cálcio intracelular pode levar também, por sua vez, à liberação de Ca^{2+} das vesículas de armazenamento intracelulares, em um processo chamado de liberação de cálcio dependente de cálcio (para revisão ver BOLTON *et al.*, 1999). Por outro lado, o acoplamento farmacomecânico envolve ativação dos receptores na superfície das células, o que também leva ao aumento de cálcio, seja pela liberação do Ca^{2+} das vesículas de armazenamento seja por vias de sinalização com segundos mensageiros. Um exemplo clássico é a ativação dos receptores α -adrenérgicos: uma vez ativados são capazes de modular a resposta das células musculares lisas através da ativação dos segundos mensageiros, inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) que por sua vez, causam liberação de cálcio dos estoques intracelulares (OGUT e BROZOVICH, 2003).

Acredita-se que o alvo primário do aumento de Ca^{2+} intracelular seja a calmodulina, membro da família de proteínas que se ligam ao cálcio. O complexo Ca^{2+} -calmodulina, vai interagir com a quinase de cadeia leve de miosina (MLCK). A calmodulina possui um domínio carboxi-terminal (COOH^-) e, uma vez ligada ao Ca^{2+} , é capaz de se ligar com o domínio amino-terminal (NH_2^-) da MLCK resultando numa mudança conformacional no complexo calmodulina-MLCK. No fim desses eventos, há ativação da MLCK e posterior fosforilação da mesma pela miosina fosfatase, sendo este último processo o primeiro evento regulatório para gerar a força necessária para o início da contração no músculo liso (OGUT e BROZOVICH, 2003).

Por outro lado, o relaxamento do músculo liso ocorre em consequência da diminuição de cálcio intracelular, reduzindo também a fosforilação da MLCK. Grande parte dos vasodilatadores agem sobre os níveis de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) e de guanosina 3',5'-monofosfato cíclico (GMPc), os quais ativam, respectivamente, a proteína quinase A (PKA) e a proteína quinase G (PKG). Ambas proteínas quinases fosforilam e inativam a MLCK, favorecendo a perda do tônus muscular. Estes são considerados estímulos químicos, porém alguns estímulos físicos também podem desencadear a vasodilatação. Nesse caso, um importante fator físico é o estresse de cisalhamento (*shear stress*, do inglês) que corresponde à força que o fluxo sanguíneo exerce nas células endoteliais e que gera a síntese e liberação de mediadores vasculares relaxantes (MATLUNG *et al.*, 2009).

O mais importante mediador secretado pelo endotélio e que promove relaxamento do músculo liso vascular é o óxido nítrico. O NO atua principalmente por dois mecanismos. O primeiro é a ativação da enzima guanilil ciclase solúvel (GCs), o que levará ao aumento da produção do segundo mensageiro GMPc na célula e posterior ativação da enzima PKG que, por sua vez, gera relaxamento através da inativação da MLCK. O segundo mecanismo consiste na abertura dos canais de potássio do músculo liso vascular, o que reduz o potencial de membrana e hiperpolariza a célula. Como consequência, há o fechamento dos canais de cálcio, diminuição de Ca^{2+} intracelular e vasodilatação (RANG e DALE, 2007).

A hiporeatividade vascular durante a sepse é provavelmente de origem multifatorial. A hipotensão observada nos pacientes sépticos é consequência de três anormalidades hemodinâmicas principais: hipovolemia, disfunção vascular e falência cardíaca (MERX e WEBER, 2007). A disfunção vascular, por sua vez, engloba disfunção microvascular, disfunção endotelial e diminuição do tônus vasoconstritor bem como hiporeatividade a agentes vasopressores (UMANS et al., 1993). As evidências clínicas que confirmam a hiporeatividade vascular em pacientes sépticos vieram de estudos que mostraram, por exemplo, 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).

1.4 Receptores acoplados à Proteína G

1.4.1 Aspectos gerais

O primeiro GPCR a ser totalmente caracterizado foi o receptor β -adrenérgico, o qual foi clonado em 1986. Subsequentemente, a biologia molecular alcançou muito rapidamente a farmacologia, e a maioria dos receptores que foram identificados por suas propriedades farmacológicas está agora clonada (RANG e DALE, 2007). Os receptores acoplados a proteínas G são divididos em três grandes famílias. Há uma considerável homologia de sequência entre membros de uma família, ao passo que não há nenhuma homologia entre diferentes famílias. A família 'A' é a maior de todas, compreendendo a maioria dos neurotransmissores aminados, muitos neuropeptídeos, purinas, prostanóides, canabinóides, entre outros. Essa família é conhecida como família da Rodopsina, cujos GPCRs possuem uma

cabeça extracelular (N terminal) curta e os ligantes para esses receptores ligam-se às hélices transmembranares ou a alças extracelulares (peptídeos). A família 'B' constitui, na sua grande maioria, os receptores de secretina, glucagon e calcitonina, os quais possuem uma cabeça N-terminal extracelular intermediária incorporando o domínio de ligação ao ligante. Por sua vez, a família 'C' é um grupo pequeno de GPCRs, englobando os receptores metabotrópicos de glutamato, receptores gabaérgicos do tipo B e receptores sensíveis ao cálcio. Essa família possui uma cabeça N-terminal extracelular longa, incorporando o domínio de ligação ao ligante (GRAHAM *et al.*, 1996).

As proteínas G triméricas são formadas por três subunidades, α , β e γ . Os nucleotídeos de guanina ligam-se à subunidade α , a qual possui atividade enzimática, catalisando a conversão do GTP a GDP. As subunidades β e γ permanecem unidas na forma de um complexo. Todas as três subunidades ficam ancoradas à membrana através de uma cadeia de ácidos graxos acoplada à proteína G por meio de uma reação conhecida como prenilação. No estado de "repouso", a proteína G aparece como um trímero $\alpha\beta\gamma$ não ligado, com o GDP ocupando o sítio na subunidade α . Quando um GPCR é ativado por uma molécula agonista, ocorre uma mudança conformacional envolvendo o domínio citoplasmático do receptor, levando-o a adquirir uma alta afinidade para o $\alpha\beta\gamma$, o que força a dissociação do GDP ligado e sua substituição por GTP. O GTP fica então ligado à subunidade α (α -GTP) e as subunidades $\beta\gamma$ ficam unidas, sendo estas as formas "ativas" da proteína G, as quais são capazes de se difundir na membrana e podem se associar a diversas enzimas e canais iônicos, causando ativação do alvo (RANG e DALE, 2007). Antigamente, pensava-se que somente a subunidade α tinha função sinalizadora, mas os estudos de Clapham e Neer demonstraram que, na verdade, as subunidades $\beta\gamma$ também são importantes no que diz respeito a controlar efetores na sinalização dos GPCRs. Em geral, parece que são necessárias maiores concentrações desse complexo do que das subunidades α , logo os efeitos mediados por $\beta\gamma$ ocorrem a níveis maiores de ocupação do receptor do que os efeitos mediados por α (CLAPHAM e NEER, 1997).

A associação das subunidades α com enzimas-alvo pode causar ativação ou inibição de determinada via sinalizadora, dependendo de qual proteína G esteja envolvida. O subtipo G_{α_s} promove estimulação da enzima adenilil ciclase, aumentando a formação de AMPc. Muitos receptores para aminas estão acoplados a esse subtipo de proteína G. O

subtipo $G\alpha_i$, por sua vez, promove inibição da enzima adenilil ciclase, diminuindo a formação de AMPc. Receptores para aminas também podem estar acoplados a esse subtipo, bem como receptores opióides. O subtipo cujas funções ainda não estão totalmente esclarecidas é o $G\alpha_o$, porém acredita-se que grande parte de seus efeitos se deve, na verdade, às subunidades $\beta\gamma$. Outro subtipo importante é $G\alpha_q$, o qual ativa a enzima fosfolipase C, aumentando a produção dos segundos mensageiros inositol trifosfato e diacilglicerol. Por fim, o subtipo $G\beta\gamma$ está associado a todos os GPCRs, e atua principalmente por ativação de canais de potássio, inibição de canais de cálcio controlados por voltagem, ativação de GPCR quinases e ativação da cascata de proteínas quinases ativadas por mitógenos (RANG e DALE, 2007).

1.4.2 Receptores α -adrenérgicos

Os receptores α -adrenérgicos, juntamente com os receptores β -adrenérgicos, são um grupo heterogêneo de GPCRs que medeiam as ações das catecolaminas, importantes mediadores do sistema nervoso simpático, estando particularmente envolvidos na homeostase cardiovascular. São importantes para a contração do músculo liso vascular e para a contração cardíaca. Estruturalmente, os receptores α -adrenérgicos possuem uma porção amino terminal, a qual fica localizada extracelularmente e possui sítios de glicosilação (ligados ao átomo de nitrogênio) (GRAHAM *et al.*, 1996). A outra porção, carboxiterminal, está localizada intracelularmente e contém sítios de fosforilação para uma grande diversidade de quinases (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1999). Tal como outros membros da família dos GPCRs, os receptores α_1 possuem cadeias simples de polipeptídeos, sendo que ao longo de todo seu comprimento há em torno de 429 a 561 aminoácidos. Essa cadeia polipeptídica pode ser modificada pós-transducionalmente por oligossacarídeos (e, provavelmente, também por ácidos graxos) bem como pode sofrer fosforilação. Cada um dos receptores contém sete domínios de 20 a 28 aminoácidos hidrofóbicos, sendo a sequência correta dos aminoácidos importante funcionalmente tanto para a ligação com moléculas correspondentes quanto para a ativação da via de sinalização. Os três subtipos de receptores α_1 (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}) possuem apenas uma pequena homologia nas suas regiões carboxiterminal, que consistem de resíduos de cisteína (GRAHAM *et al.*, 1996).

1.4.2.1 Divisão, função e localização dos alfa-adrenoceptores

Os receptores alfa adrenérgicos são classicamente divididos em α_1 e α_2 . Receptores α do tipo 1 geralmente medeiam respostas nos órgãos efetores, enquanto os receptores do tipo 2 estão localizados, em sua maior parte, pré-sinápticamente, modulando a liberação de neurotransmissores. Ambos os receptores α_1 e α_2 são ainda subdivididos (CALZADA e ARTINANO, 2001). As evidências iniciais de que havia subtipos de receptores α_1 vieram, principalmente, dos trabalhos de McGrath e Ruffolo a partir de estudos funcionais (McGRATH, 1982; RUFFOLO, 1985). Mais tarde, estudos de *binding* com radioligantes (agonistas ou antagonistas α -adrenérgicos) com afinidade variável, sugeriram a divisão desses receptores em α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} (MORROW e CREESE, 1986). São poucos os ligantes reconhecidos por apenas um subtipo de receptor α_1 com pelo menos 100 a 1000 vezes maior afinidade do que se tem pelos outros dois subtipos. O composto 5-metilurapidila, por exemplo, possui de 80 a 120 vezes maior afinidade por receptores do tipo α_{1A} do que pelos outros dois subtipos. A oximetazolina, um agonista de receptores α_1 adrenérgicos, também atua preferencialmente o subtipo α_{1A} . Um ligante cerca de 30 vezes mais seletivo para os receptores do tipo α_{1B} do que para os outros dois subtipos é o protótipo AH11110A. Os protótipos BMY7378 e SKF105854 são mais seletivos para os receptores α_{1D} , por terem afinidade cerca de 50 a 100 vezes maior quando comparados com os receptores α_{1A} e α_{1B} (GRAHAM *et al.*, 1996).

A distribuição tecidual dos receptores α_1 é variada e depende da espécie animal. Em trabalhos mais antigos, alguns resultados eram controversos quanto à localização desses receptores pelo fato de que técnicas diferentes foram utilizadas (CALZADA e ARTINANO, 2001). Por exemplo, a pesquisa dos subtipos alfa-adrenérgicos na região do hipocampo de ratos realizada pela técnica de autorradiografia, mostrou resultados homogêneos, porém, no hipocampo de humanos os subtipos α_{1A} e α_{1B} estavam distribuídos diferentemente (ZILLES *et al.*, 1991). Mais recentemente, a técnica de *Northern blot* foi introduzida no estudo dos subtipos desses receptores, sendo baseada na análise dos respectivos RNA mensageiros (RNAm) por eletroforese. Os resultados obtidos a partir destes estudos parecem ser consistentes com os estudos funcionais e de *binding*, o que gera maior segurança na pesquisa. O subtipo α_{1A} é principalmente encontrado na artéria renal, no ducto deferente, hipocampo e no córtex cerebral de ratos. Por outro lado, receptores do tipo α_{1B} são expressos principalmente no fígado, baço e córtex cerebral

de ratos, bem como em células de linhagem de músculo liso de hamster e de células de linhagem de tireoide de ratos (CALZADA e ARTINANO, 2001). O estudo em seres humanos de Price e colaboradores, mostra que o RNAm dos receptores do tipo α_{1A} predomina, principalmente, no coração, cerebelo, córtex cerebral e próstata. Já para o subtipo α_{1B} , o predomínio ocorre no baço e rins, enquanto que o RNAm para o subtipo α_{1D} é encontrado em altas concentrações na aorta (PRICE *et al.*, 1994). O que temos de ressaltar é que não necessariamente a presença de RNAm está correlacionada com a expressão e função de proteínas.

1.4.2.2 Vias de transdução de sinal e seus efetores

Antigamente acreditava-se que a via de transdução de sinal de todos os receptores do tipo α_1 adrenérgicos estivesse acoplada obrigatoriamente ao *turnover* do trifosfato de inositol (IP_3) e do cálcio (Ca^{2+}). Porém, já se sabe que essa via (IP_3/Ca^{2+}) não é a única via de sinalização desses receptores, pois estes são capazes de estimular múltiplas vias de sinalização (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1999). Na grande maioria das células, a primeira resposta funcional da ativação de todos os subtipos de receptores α_1 é o aumento dos níveis de Ca^{2+} intracelular. Mas a estimulação desses receptores resulta ainda na ativação de várias enzimas efetoras, incluindo a fosfolipase C (PLC), fosfolipase A2 (PLA) e fosfolipase D (PLD), bem como ativação de canais de Ca^{2+} e bombas de troca de Na^+-H^+ e Na^+-Ca^{2+} . A estimulação desses receptores pode ainda ativar ou inibir canais de K^+ . Adicionalmente, a ativação dos receptores α_1 -adrenérgicos pode levar à transcrição lenta ou mais rápida de certos genes (GRAHAM *et al.*, 1996). A Figura 2 abaixo exemplifica de maneira resumida a principal via de sinalização dos receptores α_1 -adrenérgicos:

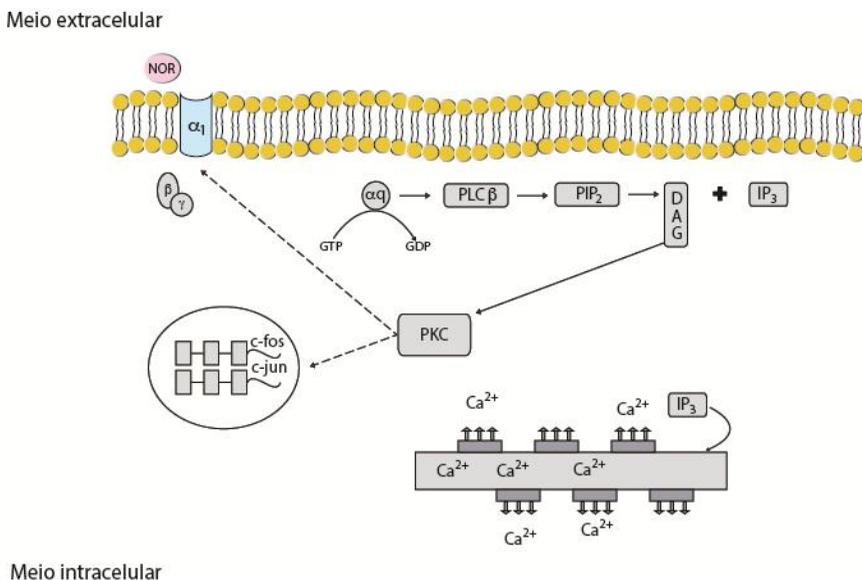


Figura 2. Principal via de transdução de sinal dos adrenoreceptores α_1 . A via clássica do *turnover* do trifosfato de inositol está representada: a ocupação do receptor por um agonista (noradrenalina – NOR) promove ativação do mesmo, favorecendo a troca da guanosina trifosfato (GTP) por guanosina difosfato (GDP). Subsequentemente há ativação da enzima fosfolipase C β (PLC β) e formação de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$), sendo este o principal substrato para formação de diacilglicerol (DAG) e trifosfato de inositol (IP $_3$). O DAG promove ativação da proteína quinase C (PKC), a qual pode fosforilar e inativar o receptor α -adrenérgico e os fatores de transcrição c-fos e c-jun (linhas tracejadas). O IP $_3$, por sua vez, atua nos receptores no retículo sarcoplasmático, promovendo a liberação de cálcio (Ca $^{2+}$). Adaptado de García-Sáinz *et al.*, 1999.

A ativação ou inibição de determinada via de sinalização é dependente dos diferentes tipos de proteína G acoplada aos α_1 -adrenoreceptores (GRAHAM *et al.*, 1996). A via do IP $_3$ /Ca $^{2+}$ pode ser ativada por ambos os três subtipos de receptores α_1 -adrenérgicos. Porém, evidências de que os subtipos tem diferente eficácia em ativar essa via, sugere diferente atividade intrínseca de subtipo para subtipo. De maneira geral, o que se observa é que o subtipo α_{1A} é mais efetivo na ativação da via fosfato de inositol/cálcio do que o subtipo α_{1B} , e que o

subtipo α_{1D} é o menos efetivos dos três (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1999). Receptores do tipo α_{1B} podem mediar a via do IP_3 tanto pelas proteínas G do tipo G_q , G_{11} , G_{14} quanto do tipo G_{16} , enquanto que os receptores do tipo α_{1D} acoplam apenas via G_q ou G_{11} (GRAHAM *et al.*, 1996).

1.4.2.3 Regulação de receptores α -adrenérgicos

A modulação das funções dos GPCRs é um processo importante e necessário para a homeostase celular como um todo. Entre tantos mecanismos de regulação, aparece o processo de fosforilação. Tal como nos receptores β_2 adrenérgicos, a fosforilação ocorre nos resíduos de serina, localizados no terceiro domínio transmembrana (ou seja, na cauda C-terminal). É um dos eventos iniciais da modulação α_1 -adrenérgica e altera diretamente a conformação do receptor, de tal maneira que seu acoplamento com a proteína G específica fica prejudicada (LEFKOWITZ, 1998). Diferentes processos celulares, incluindo o acoplamento incorreto com as proteínas G, internalização de receptor, reciclagem da membrana plasmática, degradação e regulação da expressão gênica do receptor são eventos chaves para adaptação das células às mudanças que ocorrem (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1999). A exposição prolongada de GPCRs a agonistas, geralmente conduz a uma série complexa de eventos, a fim de atenuar ou mesmo cessar a transdução de sinal e proteger a célula da estimulação excessiva. Assim, ocorre um processo de dessensibilização, ou seja, hiporeatividade aos agonistas do receptor (BENKE *et al.*, 2012).

Há dois tipos principais de dessensibilização dos α_1 -adrenoreceptores: homóloga e heteróloga. No tipo homóloga, a dessensibilização está relacionada à redução da capacidade de estimular as células quando um agonista está presente (hiporeatividade relacionada a agonista) (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1999). Por outro lado, a dessensibilização do tipo heteróloga ou “não-agonista específica”, é assim denominada porque qualquer estímulo que promova aumento dos níveis de AMPc (ou DAG no caso da PKC) tem a capacidade de causar fosforilação e dessensibilização de qualquer GPCR que contenha sítios específicos para a PKA e PKC. Três famílias de moléculas reguladoras participam do processo de dessensibilização dos receptores heptahelicoidais: i) segundo mensageiros regulados por quinases (tal como as proteínas PKA e PKC); ii) proteínas quinases dos GPCRs (as chamadas GRKs, como por exemplo a rodopsina quinase); iii) arrestinas (tal como a β -arrestina) (LEFKOWITZ *et al.*, 1998). Certamente, esta classificação é no sentido de facilitar o entendimento, uma vez que os

dois processos de dessensibilização podem ocorrer simultaneamente e, adicionalmente, implicações em relação ao mecanismo são importante objeto de estudo. Assim, na dessensibilização do tipo homóloga os receptores para hormônios e neurotransmissores parecem ser os alvos moleculares do processo, enquanto que na dessensibilização do tipo heteróloga, tanto receptores quanto outras vias de sinalização podem ser afetadas (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 2000).

Normalmente a dessensibilização homóloga envolve a fosforilação do receptor pelas GRKs. As quinases de receptores acoplados à proteína G são uma família de proteínas quinases com pelo menos seis resíduos de serina/treonina, as quais fosforilam o receptor apenas no sítio de ligação com o agonista. A família dessas proteínas é composta por seis membros (GRKs 1-6), sendo as mais investigadas a rodopsina quinase (GRK-1) e a β ARK1 (GRK-2) (LEFKOWITZ *et al.*, 1998). Esquemáticamente, quando o agonista ocupa o receptor há ativação da proteína G heterotrímica, com posterior liberação do complexo $\beta\gamma$ e ativação do segundo mensageiro efetor. Em seguida, o IP_3 (segundo mensageiro) se liga ao resíduo carboxiterminal da proteína GRK solúvel, particularmente na GRK-2, ativando-a. Uma vez ativada, a GRK promove fosforilação do receptor, o qual passa a ter maior afinidade por moléculas de arrestinas. A ligação arrestina-GPCR promove então um impedimento estérico do receptor, ou seja, o mesmo perde a capacidade de interação com outras moléculas, estabilizando o estado desacoplado do receptor. Adicionalmente, as β -arrestinas se ligam com alta afinidade às moléculas de clatrin. Esse processo dá início à internalização em vesículas dos receptores previamente fosforilados. A formação das clatrin, bem como o processo de formação das vesículas, depende da GTPase dinamina. Portanto, o “sequestro” e internalização de certos GPCRs é dependente da dinamina (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 2000).

1.4.2.4 Receptores α -adrenérgicos na contração do músculo liso vascular

Possivelmente, as artérias possuem os três tipos de receptores α_1 adrenérgicos, já que expressam RNAm para α_{1A} , α_{1B} e α_{1D} -adrenoreceptores. Porém, a maioria dos estudos de *binding* e estudos funcionais indicam o predomínio de um ou dois dos subtipos existentes (PIASCIK *et al.*, 1995), e a correlação entre essas diferentes abordagens

nem sempre é direta. Essas discrepâncias tem complicado muito a definição precisa dos papéis de cada subtipo nas principais funções do músculo liso vascular: contração e controle da pressão sanguínea (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1999).

A partir de estudos funcionais, se observou que os receptores adrenérgicos do tipo α_{1A} medeiam, pelo menos em parte, a contração das artérias caudal, renal e mesentérica de ratos. Esses resultados estão correlacionados com altas quantidades de RNAm de α_{1A} nesses vasos, sugerindo então que este subtipo de receptor está adicionalmente envolvido na contração. O papel do subtipo α_{1B} na contração vascular é menos claro, e estudos mais antigos sugeriam que seria o responsável pela contração na aorta de ratos. Porém, estudos recentes utilizando anticorpos contra receptores α_{1B} , oligonucleotídeos antisense ou antagonistas seletivos para os α_{1B} adrenoceptores, indicaram que esse subtipo não participa na contração de músculo liso vascular, exceto em artérias mesentéricas de resistência. O subtipo α_{1D} é funcionalmente expresso nas artérias aorta, ílfaca, carótida, mesentérica, femoral e renal. O predomínio desse subtipo na contração de artérias isoladas de ratos sugere uma maior importância do mesmo na regulação do tônus vascular periférico *in vivo* (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1999). Os estudos de Zhou e Vargas em 1996 e de Castillo e colaboradores em 1998 confirmam que a resistência vascular é quase que totalmente controlada pelos receptores do tipo α_{1D} . Utilizando ratos normotensos, esses autores demonstraram que a estimulação α_1 adrenérgica ou a estimulação neurogênica promoviam respostas de aumento de pressão. Porém, essa resposta pressórica era competitivamente bloqueada por antagonistas α_{1D} seletivos, indicando então a expressão funcional destes receptores no leito vascular responsável pela manutenção da pressão arterial (ZHOU e VARGAS, 1996; CASTILLO *et al.*, 1998). Além desses trabalhos, o estudo de Ibarra e Villalobos-Molina em 1996, com ratos Wistar normotensos e ratos espontaneamente hipertensos (SHR), também atribui a manutenção da pressão arterial aos receptores α_{1D} encontrados na carótida, aorta, artéria mesentérica e caudal, através de experimentos com agonistas e antagonistas seletivos para receptores α_{1D} em anéis de artérias isolados (VILLALOBOS-MOLINA e IBARRA, 1996). Corroborando esses estudos mais antigos, um trabalho mais recente, de Tanoue e colaboradores, mostra que camundongos *knockout* para o receptor α_{1D} -adrenérgico exibem redução da pressão arterial média e deficiência na resposta vasoconstritora à noradrenalina, sugerindo portanto importante papel desses receptores na manutenção da pressão arterial (TANOUE *et al.*, 2002).

1.5 Sistema Nervoso Autônomo e o choque séptico/seps

O sistema nervoso autônomo (SNA) constitui-se como parte do sistema nervoso periférico, o qual compreende três divisões anatômicas principais: parassimpática, simpática e o sistema nervoso entérico, sendo este último constituído de plexos nervosos intrínsecos do trato gastrointestinal, que são intimamente interconectados com os sistemas simpático e parassimpático. O SNA mantém a homeostase no corpo todo, através do controle de funções vitais, tais como frequência cardíaca, frequência respiratória, digestão, transpiração e temperatura (EDIS e SHEPHERD, 1970). Em meados do século XIX, o sistema nervoso periférico, e particularmente o sistema nervoso autônomo, recebeu bastante atenção dos cientistas da época. A observação de que a estimulação elétrica dos nervos era capaz de produzir uma grande variedade de efeitos fisiológicos – desde palidez cutânea até parada cardíaca – representou um verdadeiro desafio para a compreensão, em especial quanto ao modo pelo qual o sinal passava do nervo para o tecido efetuator (RANG e DALE, 2007).

Tradicionalmente, os sistemas simpático e parassimpático são ramos do SNA que atuam como antagonistas neuronais endógenos. O sistema nervoso autônomo conduz todas as informações provenientes do sistema nervoso central para o restante do corpo, exceto para a inervação motora dos músculos esqueléticos. Os sistemas simpático e parassimpático não são capazes de “trabalhar” sem o controle do sistema nervoso central, ou seja, estão fora da influência do controle voluntário. A via eferente autônoma é formada por dois neurônios dispostos em série, conhecidos respectivamente, como neurônio pré-ganglionar e pós-ganglionar. No sistema nervoso simpático as sinapses estão situadas em gânglios autônomos, que se localizam fora do sistema nervoso central e contêm as terminações nervosas das fibras pré-ganglionares e os corpos celulares dos neurônios pós-ganglionares. Na via parassimpática, as células pós-ganglionares são encontradas principalmente nos órgãos-alvo, e gânglios parassimpáticos isolados são encontrados somente na cabeça e pescoço (EDIS e SHEPHERD, 1970; HASSER e SCHADT, 1990).

Os neurotransmissores principais que operam no SNA são a acetilcolina e a noradrenalina. De maneira geral, todas as fibras nervosas motoras que deixam o sistema nervoso central liberam acetilcolina, a qual age nos receptores nicotínicos (porém, uma pequena parte da excitação é resultante da ativação de receptores muscarínicos), todas as fibras parassimpáticas pós-ganglionares liberam acetilcolina, a qual tem ação nos receptores do tipo muscarínico, e todas as fibras simpáticas pós-ganglionares – com exceção da inervação das glândulas sudoríparas – liberam noradrenalina, a qual atua em receptores adrenérgicos. A noradrenalina é liberada principalmente a partir dos neurônios pós-ganglionares e, em menor quantidade, da medula da glândula adrenal. A adrenalina, por sua vez, é secretada apenas pelas células cromafins da medula da adrenal. Além das ações no sistema cardiovascular, essas aminas biológicas desempenham suas ações também no metabolismo energético e na função endócrina, entre outras (EDIS e SHEPHERD, 1970; HASSER e SCHADT, 1990).

Recentes avanços na área da neuroimunologia demonstram que o sistema nervoso e o sistema imunológico “conversam” durante um quadro inflamatório, envolvendo principalmente a via hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso autônomo (ELENKOV *et al.*, 2000; STERNBERG, 2006). As células do sistema imune, durante uma inflamação podem, por exemplo, sintetizar e liberar neurotransmissores e ainda expressar receptores para estes mediadores. Assim ocorre um fluxo de “informação” bioquímica a partir destes neuromediadores, que permite que o organismo se adapte rapidamente a mudanças ambientais internas e externas (TRACEY, 2002; FLIERL *et al.*, 2007).

Os receptores colinérgicos expressos em fagócitos possuem um papel regulatório de grande importância durante a inflamação. Especificamente, são os receptores nicotínicos para acetilcolina do tipo α_7 (do inglês, *α_7 -nicotinic acetylcholine receptors (α_7 nAChRs)*), quando ativados diretamente por agonistas ou indiretamente pela ativação do nervo vago, que diminuem a síntese de citocinas por macrófagos e atenuam a resposta inflamatória. Em outras palavras, a inflamação está também sob controle neuronal, através do sistema nervoso autônomo parassimpático, o qual pode modular de maneira reflexa a resposta inflamatória pela inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias (WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004b). O estudo de Huston e colaboradores (2006) mostrou que o ramo do nervo vago que inerva o baço é crucial para a supressão na produção de citocinas na sepse.

O baço é uma importante fonte de produção de TNF- α durante a sepse e a cirurgia de esplenectomia diminui significativamente os níveis hepáticos e sistêmicos de TNF- α em camundongos sépticos (HUSTON *et al.*, 2006). Além disso, durante a sepse experimental, a ativação da via colinérgica anti-inflamatória inibe a produção de outros mediadores pró-inflamatórios, tal como HMGB1, e aumenta de forma significativa a sobrevivência dos animais, mesmo quando o tratamento com agonistas colinérgicos é iniciado 24 horas após o procedimento de indução de sepse (WANG *et al.*, 2004a; HUSTON *et al.*, 2007).

Annane e colaboradores mostraram que durante o choque séptico há ativação inapropriada do sistema simpático, levando ao aumento das catecolaminas circulantes e prejuízo na modulação simpática no coração e vasos. Essa disfunção de modulação simpática no choque séptico é caracterizada, entre outros fatores, pela redução da variabilidade de frequência cardíaca (ANNANE *et al.*, 1999). A variabilidade da frequência cardíaca (VFC) tem emergido como uma medida simples e não-invasiva dos impulsos autonômicos, representando um dos mais promissores marcadores quantitativos do balanço autonômico. Trata-se de uma medida que pode ser utilizada para avaliar a modulação do SNA sob condições fisiológicas e também em condições patológicas. Uma alta variabilidade na frequência cardíaca é sinal de boa adaptação, caracterizando um indivíduo saudável, com mecanismos autonômicos eficientes, enquanto que, baixa variabilidade é frequentemente um indicador de adaptação anormal e insuficiente do SNA, implicando a presença de mau funcionamento fisiológico no indivíduo (VANDERLEI *et al.*, 2009).

Enquanto o nível plasmático normal de adrenalina é na ordem de picogramas por mL, durante a sepse e parada cardíaca os níveis podem se elevar cerca de mil vezes (SCHMIDT *et al.*, 2005; DUNSER e HASIBEDER, 2009). Essa elevada concentração de catecolaminas circulantes caracteriza a fase inicial da sepse, que impulsiona a resposta inflamatória inicial. Mais tarde, quando já se tem instalado um quadro de choque séptico, a produção e liberação de catecolaminas pode se tornar baixa ou insuficiente, o que leva agora a um quadro de desequilíbrio na manutenção do sistema cardiovascular (RITTIRSCH *et al.*, 2008). O trabalho de Flierl e colegas (2008) mostra que essa depleção tardia de catecolaminas pode ser causada por apoptose das células da medula da glândula adrenal (FLIERL *et al.*, 2008). Além

disso, já se sabe de longa data que níveis aumentados e persistentes de catecolaminas foram observados em pacientes sépticos não sobreviventes, quando comparados aos sobreviventes, evidenciando que o aumento de noradrenalina e adrenalina na circulação está diretamente relacionado com o aumento na mortalidade dos pacientes (WORTSMAN *et al.*, 1984; JONES e ROMANO, 1989; BENEDICT e ROSE, 1992; BOLDT *et al.*, 1995).

Antigamente acreditava-se que somente neurônios simpáticos eram capazes de sintetizar catecolaminas, mas hoje já se demonstrou que os leucócitos também são fontes abundantes de catecolaminas. Os leucócitos também expressam receptores adrenérgicos, o que indica que as catecolaminas produzidas por ele podem exercer ações autócrinas e/ou parácrinas nas células do sistema imunológico. A ativação desses receptores adrenérgicos nos leucócitos desencadeia ativação de uma cascata de citocinas da resposta inflamatória, através de mecanismos dependentes da ativação de NF- κ B (BERGQUIST *et al.*, 1994; FLIERL *et al.*, 2007).

Durante a sepse, as catecolaminas promovem ainda efeitos imunomoduladores através dos receptores α - e β -adrenérgicos que são expressos nas células do sistema imunológico. A estimulação desses receptores altera o tráfego de linfócitos, perfusão vascular e proliferação e apoptose celular, afetando dessa maneira a resposta funcional dos leucócitos (SPENGLER *et al.*, 1990; KRADIN *et al.*, 2001; BERGMANN e SAUTNER, 2002; OBERBECK *et al.*, 2004). As catecolaminas podem contribuir também para os efeitos deletérios da sepse através de estimulação direta do crescimento bacteriano no sistema gastrointestinal, o que pode estimular a bacteremia pela translocação das bactérias entéricas para os vasos sanguíneos e linfáticos (LYTE e ERNST, 1992; LYTE *et al.*, 1996; FREESTONE *et al.*, 2002; FREESTONE *et al.*, 2003; FREESTONE *et al.*, 2007).

Além dos efeitos nos vasos, a ativação do SNA durante a sepse também tem impacto no coração. Disfunção diastólica frequentemente ocorre em pacientes com choque séptico, e os pacientes que morrem, geralmente exibem uma disfunção diastólica ventricular esquerda mais severa do que os pacientes que sobrevivem (JAFRI *et al.*, 1990; MUNT *et al.*, 1998). A administração prévia de clonidina ou dexmedetomidina (drogas simpatolíticas de ação central) aumentam a sobrevida em modelo de sepse experimental (HOFER *et al.*, 2009). Além do sistema cardiovascular, a ativação do SNA também causa distúrbios na fisiolo-

gia do corpo como um todo. Por exemplo, o aumento na liberação de noradrenalina durante a sepse agrava a disfunção hepatocelular pela produção exacerbada de citocinas através da ativação de receptores α_{2A} -adrenérgicos, o que leva a ativação da via da MAP quinase p38 nas células de Kupffer (YANG *et al.*, 2001).

A hiperativação simpática e, portanto, liberação exacerbada de catecolaminas e outras substâncias relacionadas ao estresse pode, também, ativar a sinalização em linfócitos T helper 2 (Th2), levando a maior susceptibilidade do organismo em combater a infecção ou mudar o curso da infecção, uma vez que a defesa do hospedeiro se dá primariamente através dos mecanismos celulares através linfócitos T helper 1 (Th1). Além dessa potencialização de células Th2 e supressão de células Th1, a sepse também é marcada por prejuízo da proliferação linfocitária e aumento da expressão nas células do sistema imune de antígenos de superfície do tipo MHC (complexo de histocompatibilidade maior) de classe 2 e supressão da função dos neutrófilos – tal como quimiotaxia, fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (para revisão ver ELENKOV *et al.*, 2000).

No sistema de coagulação, a adrenalina age de forma dose-dependente ativando o fator VIII, o antígeno de von Willebrand – cuja função principal é ligar-se ao colágeno presente no subendotélio e nas plaquetas, promovendo a formação do tampão plaquetário no local da lesão endotelial –, o fator tecidual de plasminogênio e as plaquetas. Assim, o aumento das catecolaminas também contribui para formação de trombose, preferencialmente quando a função endotelial está comprometida, tal como em pacientes com aterosclerose e sepse severa (DE BACKER *et al.*, 2002). Os efeitos adversos dos níveis exacerbados de catecolaminas podem ainda ser vistos nos pulmões, na forma de edema pulmonar e aumento da pressão arterial pulmonar, com subsequente falência/disfunção cardíaca direta. Dessa forma, parece que o choque séptico e a lesão pulmonar aguda estão interligados por mecanismos fisiopatológicos, e não apenas através da inflamação sozinha (HUDSON *et al.*, 1995).

Os níveis elevados de adrenalina em pacientes com choque séptico estão, ainda, diretamente relacionados com aumento de lactato e diminuição de pH arterial (DAY *et al.*, 1996). Entretanto, esse aumento é transitório, voltando aos níveis basais após o decorrer do quadro inflamatório (LEVY *et al.*, 1997). O aumento do lactato na sepse não está relacionado com diminuição no nível de ATP tecidual, sugerindo

então que o mecanismo pelo qual a adrenalina induz hiperlactatemia está diretamente relacionado com efeitos no metabolismo de carboidratos, e não com hipóxia celular (LEVY *et al.*, 2003). A Figura 3 abaixo demonstra, resumidamente, as vias ativadas pelo sistema nervoso autônomo durante a sepse.

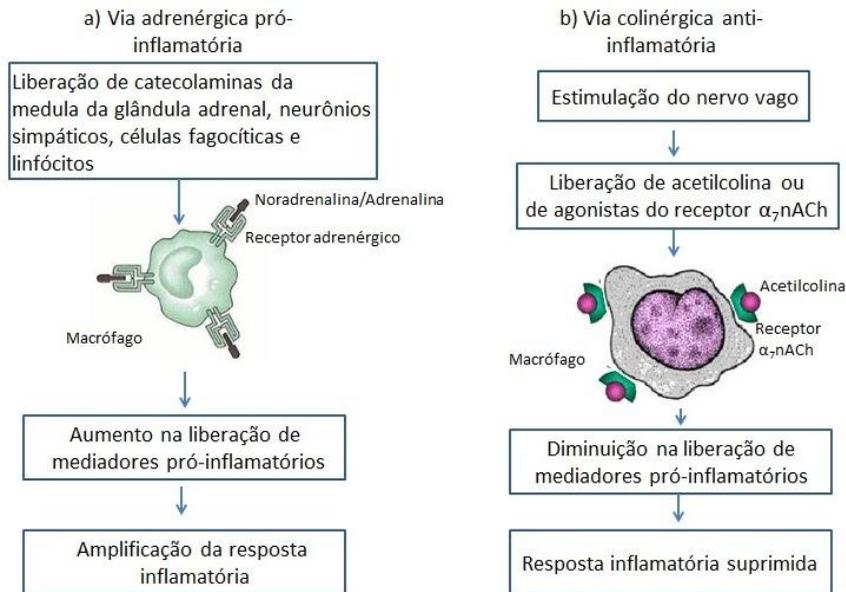


Figura 3. Efeitos das vias do Sistema Nervoso Autônomo na inflamação durante a sepse. O balanço entre os dois ramos do sistema nervoso autônomo (SNA) pode direcionar a resposta inflamatória para um desfecho pró- ou anti-inflamatório. Enquanto a ativação da via colinérgica tem efeito anti-inflamatório (atenua a inflamação), a estimulação da via adrenérgica leva à amplificação da resposta inflamatória. a) Elevadas concentrações de catecolaminas amplificam a resposta inflamatória inicial, particularmente na fase inicial da sepse. As catecolaminas exercem seus efeitos imunomodulatórios através dos receptores α - e β -adrenérgicos expressos em diferentes tipos celulares. b) Por outro lado, a ativação da via colinérgica durante a sepse tem papel anti-inflamatório, atenuando a inflamação. Estes efeitos são mediados pela ação da acetilcolina nos receptores nicotínicos do tipo α_7 (α_7 nAChR). A acetilcolina liberada pela estimulação do nervo vago, atua inibindo principalmente a síntese de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α e HMGB-1.

Portanto, a regulação fisiológica dos sistemas simpático-imune parece ser um tanto quanto complexa e exercida em diferentes níveis. O sistema nervoso simpático é afetado por diferentes vias de neurotransmissão, estresse, ritmos circadianos e das respostas do sistema imunológico. Diferentes citocinas regulam a liberação e plasticidade dos neurotransmissores.

1.6 A neurotransmissão ganglionar e seu bloqueio

O receptor nicotínico para a acetilcolina (ACh) pós-sináptico medeia a neurotransmissão na junção neuromuscular e nos gânglios autônomos periféricos. Distintos subtipos de receptores nicotínicos existem no gânglio e podem ser bloqueados por muitos agentes farmacológicos. Drogas bloqueadoras ganglionares podem ser classificadas em dois grupos: as de ação despolarizante e aquelas que prejudicam a transmissão competindo com a ACh pelos receptores nicotínicos ou apenas bloqueando o canal (também chamadas de não despolarizantes) (GOODMAN e GILMAN, 2006).

A neurotransmissão no gânglio autônomo é mais complexa do que antigamente se imaginava, a qual era explicada por um sistema único de neurotransmissor-receptor. Registros de potenciais de ação intracelular revelam ao menos quatro diferentes potenciais suscitados por estimulação do nervo pré-ganglionar (WEIGHT *et al.*, 1979). Resumidamente, o evento primário na neurotransmissão ganglionar envolve a rápida despolarização pós-sináptica, a partir da ligação da acetilcolina com seu receptor nicotínico. Essa ativação primária dá origem então ao potencial excitatório pós-sináptico inicial, do inglês EPSP – *excitatory postsynaptic potential*. Esta rápida despolarização é devida, principalmente, ao influxo de sódio (Na^+) e talvez da corrente de cálcio (Ca^{2+}) através dos canais nicotínicos. Após esse evento inicial, ocorrem sucessivas despolarizações e repolarizações do gânglio até que, em última instância, seja liberado um neurotransmissor específico (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Mantegazza, Tyler e Zaimes, em 1958, iniciaram os estudos de drogas com possível ação bloqueadora ganglionar. O hexametônio e pentolínio surgiram como as principais drogas nesse grupo, sendo ambos compostos de amônio quaternário que possuem a capacidade de bloquear a transmissão nos gânglios autônomos por competição com a

acetilcolina, ou seja, de maneira não-despolarizante (MANTEGAZZA *et al.*, 1958).

O hexametônio possui em sua estrutura seis grupos metilenos entre dois átomos de nitrogênio quaternário, tendo mínima atividade bloqueadora neuromuscular e muscarínica (GOODMAN e GILMAN, 2006). O pentolínio, por sua vez, foi desenvolvido com algumas vantagens em relação ao hexametônio: i) é um bloqueador ganglionar mais potente; ii) possui maior tempo de ação e iii) é levemente melhor absorvido por via oral (BOWMAN e RAND, 1980).

O hexametônio foi rapidamente introduzido na clínica médica como a primeira droga eficaz no tratamento da hipertensão (KATZUNG, 2006). Tanto o pentolínio quanto o hexametônio produzem efeitos bem descritos em diferentes órgãos de indivíduos saudáveis: em arteríolas produzem vasodilatação seguida de aumento no fluxo sanguíneo; nas veias promovem dilatação e conseqüente diminuição do retorno venoso e débito cardíaco; no coração produzem taquicardia e no trato gastrointestinal reduzem o tônus e a motilidade (GOODMAN e GILMAN, 2006).

Os estudos iniciais com esses fármacos sugeriam que o bloqueio autônomo era total, isto é, tanto o sistema nervoso simpático quanto parassimpático eram bloqueados na mesma proporção (BARTORELLI *et al.*, 1954; BROWN *et al.*, 1956; MANTEGAZZA *et al.*, 1958). Entretanto, estudos mais atuais referem-se ao pentolínio como sendo um bloqueador ganglionar preferencialmente simpático (BROWN *et al.*, 1981; MURPHY *et al.*, 1983; CORDER *et al.*, 1988), utilizando-o principalmente como ferramenta farmacológica em estudos em que o componente autonômico simpático deve ser abolido (DAVERN *et al.*, 2009; MORETTI *et al.*, 2009; RODRIGUEZ-GOMEZ *et al.*, 2010; CHAN *et al.*, 2012).

1.7 Hipótese de trabalho

Apesar de ser bem descrito na literatura que o aumento de catecolaminas durante um quadro de choque séptico e sepse é extremamente deletério para o indivíduo (MUNT *et al.*, 1998; RITTIRSCH *et al.*, 2008), são raros os estudos que interferem com o sistema autônomo simpático e descrevem os efeitos desse bloqueio durante o choque séptico, especialmente em relação aos receptores α -adrenérgicos. Sendo assim, nos perguntamos se a ativação exacerbada do sistema nervoso simpático durante a sepse e choque séptico, e

consequentemente, a maior liberação de catecolaminas, está associada também à mortalidade e hiporeatividade a agentes vasoconstritores, a fim de melhor compreendermos e, se possível, detalharmos vias adicionais na disfunção cardiovascular dessa patologia. A Figura 4 abaixo sumariza a investigação principal do nosso trabalho.

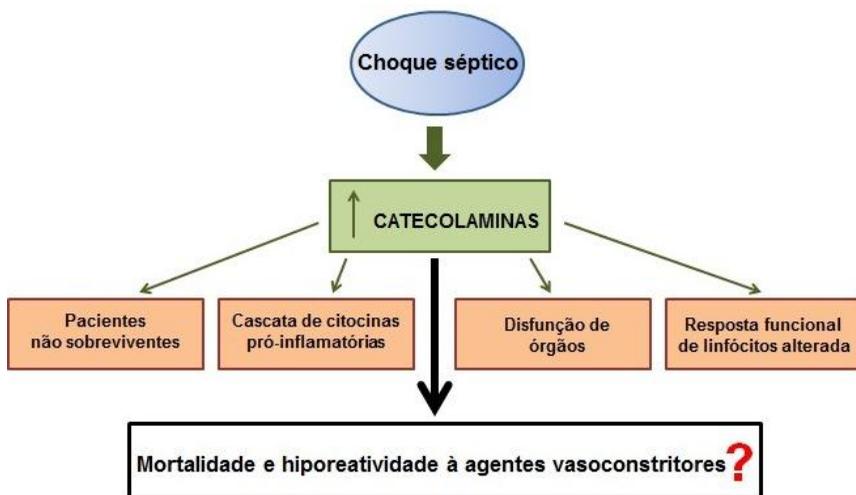


Figura 4. Hipótese de trabalho. O choque séptico é um importante estímulo para ativação do Sistema Nervoso Autônomo e liberação de catecolaminas. As catecolaminas, por sua vez, são encontradas em pacientes sépticos não sobreviventes em comparação aos sobreviventes, bem como ativam cascata de citocinas pró-inflamatórias, promovem disfunção de órgãos e ainda alteram as respostas imunes mediadas por linfócitos. Sendo assim, investigamos a participação das catecolaminas na mortalidade e na hiporeatividade a agentes vasoconstritores em ratos submetidos ao procedimento de choque séptico experimental.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

O objetivo geral do nosso trabalho foi verificar se o tônus simpático exacerbado durante o choque séptico está envolvido nas alterações hemodinâmicas e no processo inflamatório que ocorrem nessa síndrome de resposta inflamatória sistêmica, utilizando para isso o modelo de ligadura e perfuração do ceco em ratos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a influência do bloqueio precoce da transmissão ganglionar autônoma, com o uso de hexametônio, sobre a pressão arterial média e hiporeatividade a agonistas vasoconstritores em animais submetidos ao modelo de choque séptico experimental;
- Avaliar a influência do bloqueio precoce da transmissão ganglionar simpática, com o uso de pentolínio, sobre a pressão arterial média e hiporeatividade a vasoconstritores em animais submetidos ao modelo de choque séptico experimental;
- Avaliar a influência do bloqueio precoce - com o uso de hexametônio e pentolínio - e tardio da transmissão ganglionar - com o uso de pentolínio na sobrevivência dos animais submetidos ao modelo de choque séptico experimental;
- Avaliar a influência do bloqueio precoce da transmissão ganglionar, com o uso de hexametônio e pentolínio, sobre a resposta inflamatória, parâmetros bioquímicos e hemograma dos animais submetidos ao modelo de choque séptico experimental;
- Avaliar a influência do bloqueio precoce da transmissão ganglionar, com o uso de hexametônio e pentolínio, na expressão dos receptores α_{1D} -adrenérgicos em aorta torácica de ratos submetidos ao modelo de choque séptico experimental.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Todos os cuidados com os animais e procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) sob o protocolo PP00790. Foram utilizados ratos Wistar fêmeas de 3 meses, pesando entre 200-250 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central da UFSC e mantidos em local com temperatura e iluminação controladas ($23 \pm 2^\circ\text{C}$; ciclo claro/escuro 12/12 h), com livre acesso à ração e água.

3.2 Procedimentos experimentais

3.2.1 Modelo de sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP)

A sepse foi induzida pelo procedimento de CLP (do inglês, *Cecal Ligation and Puncture*) como descrito anteriormente (RITTIRSCH *et al.*, 2009). Resumidamente, os animais foram anestesiados com a mistura anestésica de ketamina/xilazina (90/15 mg/kg, i.p.). Em seguida, sob condições assépticas, foram submetidos a uma laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm e subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco, abaixo da válvula íleo-cecal. O ceco dos animais foi perfurado de maneira transfixante com agulha 14 G, seguido de compressão para assegurar o extravasamento do conteúdo cecal. Após a perfuração, o ceco foi recolocado na cavidade abdominal, seguindo-se a sutura da musculatura e da pele do local. Após a sutura, os animais receberam 30 mL/kg de salina estéril (PBS; em mM, 137 NaCl, 2,7 KCl, 1,5 KH_2PO_4 e 8,1 NaHPO_4 ; pH 7.4) para reposição fluídica, e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia (1 a 2 h). Os animais controle (Naïve) não passaram por procedimento cirúrgico.

3.2.2 Avaliação da pressão arterial

Os animais foram anestesiados com a mistura de ketamina e xilazina (90/15 mg/kg), administradas pela via intramuscular, e posicionados em decúbito dorsal sobre uma mesa cirúrgica aquecida a 37°C . Em todos os experimentos, a veia femoral esquerda foi dissecada para a inserção de uma agulha acoplada a uma cânula de polietileno (PE

50) e a uma seringa. Esse acesso venoso foi a via de administração para os fármacos utilizados, noradrenalina e fenilefrina. Para prevenir a formação de coágulos e obstrução das cânulas, foi feita administração de 30 UI de heparina sódica diluída em 100 μL de PBS, i.v. Os animais foram então submetidos a uma traqueostomia para facilitar a respiração espontânea e, em seguida, a artéria carótida esquerda foi localizada e cuidadosamente separada do nervo vago e tecidos adjacentes. O fluxo sanguíneo da carótida foi interrompido na extremidade distal através de ligadura com fio de sutura, enquanto que o fluxo da extremidade proximal foi temporariamente interrompido através de compressão com uma pinça curva. Um minúsculo corte foi realizado na região medial da porção da artéria carótida, cujo fluxo estava obstruído, servindo como via de inserção de um cateter de polietileno (Angiocath[®], 22 G), devidamente heparinizado. O cateter foi firmemente amarrado à artéria e conectado ao transdutor de pressão (Mikro-Tip[®], Millar Instruments, Inc., Huston, Texas, EUA) acoplado a um Powerlab 8/30 (ADInstruments Pty Ltda, Castle Hill, Austrália). Os valores de pressão arterial média (PAM) foram registrados em computador com sistema operacional Windows XP[™], (Microsoft Corporation, EUA) e analisados através do software de integração Chart 5[™].

A administração intravenosa de noradrenalina e fenilefrina foi iniciada somente após 20 minutos do término da manipulação cirúrgica, a fim de aguardar um período de estabilização da pressão arterial média (PAM), já que o procedimento cirúrgico, bem como a manipulação do nervo vago, podem gerar oscilações na PAM dos animais. Os agentes vasoativos estudados foram administrados lentamente com seringa Hamilton[®], a fim de garantir a administração correta da dose. Imediatamente após, mais 150 μL de PBS foram injetados para assegurar que nenhum resíduo da droga em uso permanecesse no interior da cânula de polietileno. A injeção lenta de até 200 μL de PBS, por si só, não foi capaz de alterar a pressão arterial média, o que nos garantiu que os efeitos observados eram realmente decorrentes das ações das drogas administradas. No final dos experimentos, todos os animais foram sacrificados através da administração de doses elevadas (overdose) de anestésicos.

3.2.3 Determinação dos parâmetros bioquímicos, níveis de citocinas, do hemograma e coleta de tecido para imunofluorescência

Os animais submetidos à cirurgia de CLP foram tratados com hexametônio (HEX, 15 mg/kg, s.c), pentolínio (PENT, 5 mg/kg, s.c) ou salina (PBS, 10 mL/kg, s.c), 1 h após o procedimento cirúrgico. Os animais controles (naïve) também receberam as mesmas doses de HEX, PENT ou salina. Vinte e quatro horas após o CLP, ou seja, 23 h após o tratamento com ambos os bloqueadores ganglionares, os animais foram anestesiados e através de punção cardíaca foi realizada a coleta de sangue. Os animais controle foram anestesiados e preparados para punção cardíaca 23 h após o tratamento. A aorta torácica desses animais também foi coletada e armazenada em freezer – 80° C para posterior exame através da técnica de imunofluorescência. O sangue coletado foi armazenado em diferentes microtubos (ependorfs) contendo heparina, sendo que para realização do hemograma utilizou-se o sangue total. Para a determinação dos parâmetros bioquímicos e de citocinas, procedeu-se à centrifugação em centrífuga refrigerada (4° C) à 3000 rpm por 8 minutos. Após, o plasma foi separado do sangue e colocado em dois microtubos diferentes: um para as dosagens bioquímicas, que foi armazenado em freezer -20° C, e outro para a dosagem de citocinas, que foi armazenado em freezer - 80° C.

3.2.4 Dosagens bioquímicas

3.2.4.1 Determinação dos níveis de nitrato e nitrito (NO_x) plasmático

De acordo com a metodologia de Granger e colaboradores (1990), a determinação da concentração plasmática de NO_x nos animais CLP 24 h e controle foi feita através da redução enzimática do nitrato pela enzima nitrato redutase, expressa em *Escherichia coli* cultivada em meio anaeróbico. Após a coleta, as amostras de plasma foram diluídas 1:1 em água Milli-Q e desproteinizadas pela adição de sulfato de zinco 20%. Para a conversão do nitrato a nitrito, as amostras foram incubadas a 37° C durante 2 horas, na presença da enzima nitrato redutase. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas, sendo 100 µL do sobrenadante misturados com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de α-naftil-etilenodiamina em água Milli-Q) e transferidos para placas de 96 poços. Em seguida, foi feita a leitura em leitor de placas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça) na faixa de 540 nm. Simultaneamente, foram feitas curvas padrão de nitrato e nitrito (0 a 150 µM). Nestas condições

experimentais, a conversão de nitrato para nitrito foi maior que 90% e, portanto, não foi realizada nenhuma correção dos resultados. Os valores plasmáticos foram calculados por meio de regressão linear e expressos como μM de NO_x .

3.2.4.2 Dosagem de lactato plasmático

O lactato plasmático, marcador de hipoperfusão tecidual, foi determinado no plasma de animais CLP 24 h e controles, através de kit comercial (Bioclin, Belo Horizonte, MG) pelo método UV enzimático. As dosagens foram realizadas em placas de leitura de 96 poços e registradas por absorbância a 340 nm em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mmol/L de lactato.

3.2.4.3 Dosagem de transaminase oxalacética e pirúvica

As dosagens das enzimas transaminase oxalacética (TGO) e transaminase pirúvica (TGP) nos animais CLP 24 h e controles, foram realizadas no plasma através de kit colorimétrico de acordo com as instruções do fabricante (Bioclin, Belo Horizonte, MG). As dosagens foram realizadas em placas de leitura de 96 poços e registradas por absorbância a 490 nm em um leitor de microplacas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL.

3.2.4.4 Dosagem de ureia plasmática

Os níveis plasmáticos de ureia nos animais CLP 24 h e controles foram determinados por teste enzimático colorimétrico utilizando-se o kit Bioclin (referência K047, Belo Horizonte, MG). O princípio básico da reação é a hidrólise da ureia a íons amônio (NH_4^{+}) e dióxido de carbono (CO_2), por ação da enzima urease. Em pH alcalino e na presença de salicilato e hipoclorito de sódio, a amônia origina um composto esverdeado, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração de ureia na amostra analisada. Esse ensaio foi adaptado para ser realizado em placas de 96 poços – utilizando-se 1 μL de amostra para um volume final de reação de 200 μL – ao invés da análise

em tubos de ensaio. A leitura da absorbância foi feita a 630 nm em leitor de placas (Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). A partir dos valores encontrados, o cálculo procedeu com base em um fator de calibração e a concentração de ureia foi expressa em mg/dL.

3.2.4.5 Dosagem de creatinina plasmática

Os níveis de creatinina plasmática dos animais CLP 24 h e controles foram determinados por teste colorimétrico, através do kit Bioclin (referência K016-1, Belo Horizonte, MG). Em meio alcalino a creatinina reage com o ácido pícrico, formando um complexo de cor amarelo-avermelhada, o qual é medido em espectrofotômetro (absorbância a 490 nm em leitor de placas Infinite M200, Tecan Group Ltd, Suíça). A partir da adição de um reagente ácido, há queda do pH da solução e a cor referente à creatinina é desfeita, permanecendo apenas a cor referente aos cromógenos, que também foi registrada por absorbância a 490 nm. Através da diferença entre as leituras obtidas no pH alcalino e no pH ácido, obtém-se o valor real da concentração de creatinina nas amostras. Esse ensaio foi adaptado para ser realizado em placa de 96 poços – utilizando-se 20 μ L de amostra para um volume final de reação de 200 μ L. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e a concentração de creatinina expressa em mg/dL.

3.2.5 Dosagem de IL-1 β e TNF- α plasmática

Foram realizadas, de acordo com as recomendações do fabricante, as dosagens das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β) das amostras de plasma de animais CLP 24 h e controles, através de kit de ELISA (do inglês, *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*; PeproTech Inc, New Jersey, USA).

3.2.6 Hemograma

Foi realizado o hemograma dos animais CLP 24 h e controles em amostra de sangue total. As contagens foram realizadas em contador hematológico Horiba Abx Micros 60 (Shandong, China). Os parâmetros avaliados foram: leucócitos totais ($\times 10^3/\mu$ L), linfócitos totais (\times

$10^3/\mu\text{L}$), monócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$), granulócitos totais ($\times 10^3/\mu\text{L}$), plaquetas ($\times 10^3/\mu\text{L}$) e hematócrito (expresso em porcentagem).

3.2.7 Imunofluorescência

Os animais CLP 24 h e controles foram anestesiados com ketamina e xilazina (90 e 15 mg.kg^{-1} , respectivamente, i.p.) e perfundidos com salina gelada ($\text{NaCl } 0,9\%$). A aorta torácica foi localizada, removida e congelada em Tissue-Tek (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, EUA). Com o auxílio de um criostato Leica CM 1850 (UV Biosystems, Leica, Wetzlar, Alemanha) foram obtidos cortes transversais de $7 \mu\text{m}$ em lâminas previamente gelatinizadas. Os cortes foram fixados com acetona 100% por 10 minutos em temperatura ambiente e, logo após, foram permeabilizados com PBS-Tween $0,5\%$ e bloqueados durante 1 h com soro fetal bovino a 5% . Após o bloqueio, as lâminas foram incubadas durante a noite com o anticorpo primário anti-rabbit $\alpha_{1D}\text{-AR}$ (número de catálogo 10721 ; $1:200$, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA) à temperatura ambiente. No dia seguinte após a incubação, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS-Tween $0,1\%$ durante 5 minutos sob agitação e incubadas durante 1 h com o anticorpo secundário anti-IgG, o qual já estava conjugado com o anticorpo anti-coelho Alexa Fluor 488 goat ($1:1000$; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Cortes incubados sem o anticorpo primário serviram como controle negativo. Após o período de incubação com o anticorpo secundário, as lâminas foram novamente lavadas e montadas com lamínulas em meio de gel aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As lâminas foram então armazenadas em ambiente escuro e úmido, sendo mantidas a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da leitura.

A microscopia de fluorescência foi realizada (Olympus BX41, Olympus, Japão) e as imagens foram capturadas usando o software QCapture Pro 5.1 (QImaging, Surrey, BC, Canadá). Pelo menos dois cortes da aorta (espaçados aproximadamente $100 \mu\text{m}$) de cada animal em cada grupo experimental ($n = 3$ por grupo) foram obtidos. A imunomarcção foi avaliada em pelo menos 5 locais diferentes de cada corte (ou seja, ao menos 5 imagens por seção). Todas as imagens foram obtidas pelo mesmo microscópio e com os mesmos parâmetros de configuração do mesmo. A quantificação relativa de intensidade de fluorescência foi realizada por análise de densitometria óptica, com o auxílio do programa ImageJ® (versão $1,36 \text{ bi}$, NIH, Bethesda, MD,

EUA), e os valores foram expressos como intensidade de fluorescência relativa ao grupo controle.

3.3 Protocolos experimentais

3.3.1 Efeito do hexametônio e pentolínio na resposta cardiovascular de animais submetidos ao CLP

Os animais que foram submetidos à cirurgia de CLP foram tratados com hexametônio (HEX, 15 mg/kg, s.c), pentolínio (PENT, 5 mg/kg, s.c) ou salina (PBS, 10 mL/kg, s.c), 1 h após o procedimento cirúrgico. Os animais foram então anestesiados e preparados para o registro da pressão arterial e administração de drogas, conforme descrito no item 3.2.2, nos tempos de 6 h e 24 h após a cirurgia, ou seja, 5 h e 23 h após o tratamento. Os animais controle receberam as mesmas doses de HEX, PENT ou salina, 5 h ou 23 h antes do registro da pressão arterial. Para ambos os tratamentos foi avaliada a capacidade vasoconstritora dos animais frente a injeção de doses crescentes de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/kg) e noradrenalina (1, 3 e 10 nmol/kg).

3.3.2 Avaliação dos efeitos da administração de hexametônio e pentolínio na sobrevivência de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco

A dose escolhida de ambos agentes bloqueadores ganglionares foi baseada em experimentos prévios. Após a primeira hora decorrida da cirurgia de indução de sepse, os animais receberam, de maneira aleatória, hexametônio (15 mg/kg, s.c), pentolínio (5 mg/kg, s.c.) ou salina (PBS, 10 mL/kg, s.c) e foram divididos em grupos (n=10 animais por grupo). Um grupo adicional de animais recebeu, também de maneira aleatória, a mesma dose de pentolínio ou salina 8 h após o procedimento de CLP, e foram divididos em grupos (n=8 animais por grupo). Os animais controles também receberam os mesmos tratamentos.

A taxa de sobrevivência dos animais em cada grupo foi determinada após a observação a cada 12 h durante 4 dias (96 h) consecutivos. Durante esse período, os animais foram mantidos em local com temperatura controlada ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12/12 h) com

livre acesso a ração e água. Ao término do período, os animais sobreviventes foram sacrificados por overdose de anestésico.

3.4 Análise dos resultados e testes estatísticos empregados

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média. Para os testes estatísticos utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, de acordo com a natureza do dado. As análises foram seguidas pelo teste *post-hoc* de Bonferroni. Os resultados do ensaio de imunofluorescência foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste *post-hoc* de Dunn, uma vez que os dados não apresentaram distribuição homogênea. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. As curvas de sobrevivência foram expressas como porcentagem de animais vivos, observados a cada 12 h durante 4 dias. Para a análise estatística das curvas foi utilizado o teste *log-rank*. As diferenças entre as curvas representativas de cada grupo experimental foram consideradas significativamente diferentes para $p < 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote estatístico GraphPad Prism (San Diego, CA, USA).

3.5 Compostos e reagentes utilizados

Os agentes anestésicos utilizados foram a ketamina (Dopalen™, Vetbrands, Brasil) e xilazina (Anasedan™, Vetbrands, Brasil). Outras substâncias utilizadas foram o cloridrato de hexametônio, tartarato de pentolínio, cloridrato de fenilefrina e bitartarato de noradrenalina, as quais foram compradas da empresa Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). A heparina sódica foi comprada dos Laboratórios Cristália (São Paulo, SP, Brasil).

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do hexametônio e pentolínio na pressão arterial média basal e na resposta vasoconstritora dos animais CLP

Os animais controle exibiram uma PAMb de $85 \pm 2,6$ mmHg. Seis horas após a indução de choque séptico, os animais sem tratamento estavam hipotensos, apresentando redução de cerca de 30% na pressão arterial média basal (Figuras 5A e 5B, barras pretas). O tratamento com hexametônio e pentolínio preveniu o desenvolvimento da hipotensão (Figuras 5A e 5B, barras hachuradas). Vinte e quatro horas após o procedimento de CLP, a PAMb dos animais sépticos sem tratamento ainda estava abaixo dos valores dos animais controles (Figuras 6A e 6B, barras pretas), e o tratamento com ambos os bloqueadores ganglionares 1 h após a indução de sepse não preveniu o desenvolvimento da hipotensão (Figuras 6A e 6B, barras hachuradas).

Com relação à reatividade vascular, o choque séptico induzido pelo modelo de CLP levou à hiporeatividade a agentes vasoconstritores de forma substancial e duradoura, particularmente à noradrenalina. Foi possível observar, por exemplo, que seis e vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP, a resposta vasoconstritora dos animais sépticos sem tratamento para a maior dose (10 nmol/kg) de noradrenalina foi reduzida em 60% e 45%, respectivamente (Figuras 5C e 5D; Figuras 6C e 6D, barras pretas). Por outro lado, o tratamento com hexametônio e pentolínio 1 h após o procedimento de CLP preveniu completamente a hiporeatividade vascular precoce (6 h após a indução de choque séptico) e tardia (24 h após a indução de choque séptico).

Distintamente da noradrenalina, a hiporeatividade vascular a fenilefrina nos animais submetidos ao CLP foi mais evidente 24 h após a indução de sepse (Figuras 5E e 5F; Figuras 6E e 6F, barras pretas). Da mesma maneira, o tratamento tanto com hexametônio quanto com pentolínio melhorou significativamente a reatividade dos animais sépticos (Figuras 5E e 5F; Figuras 6E e 6F, barras hachuradas).

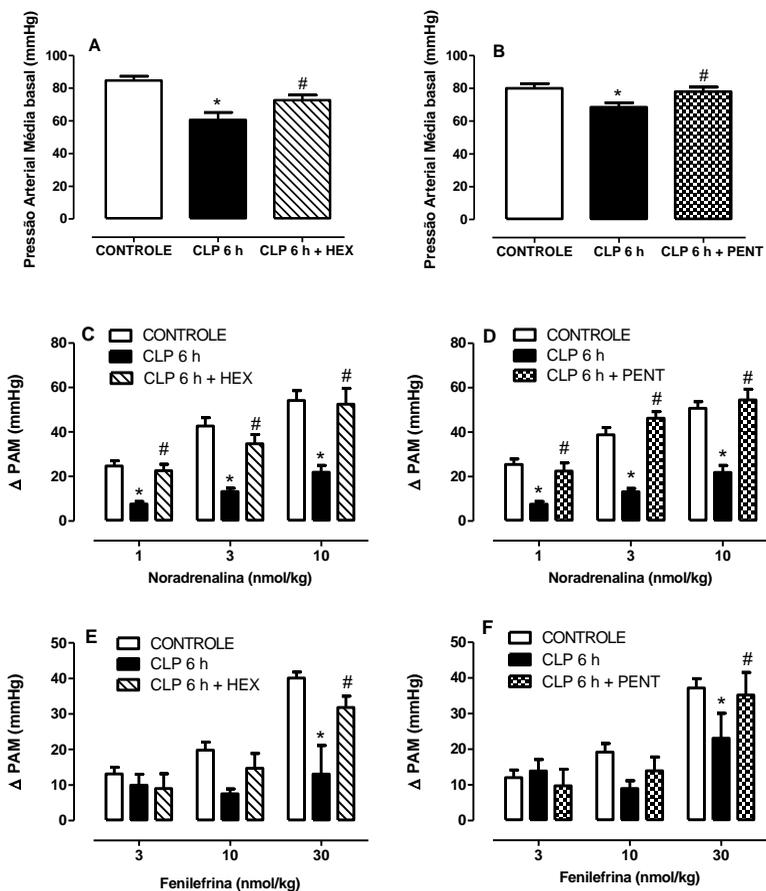


Figura 5. Efeito do hexametônio e pentolínio na pressão arterial média e na reatividade vascular 6 h após a cirurgia de CLP. Os animais foram tratados com hexametônio (HEX; 15 mg/kg, s.c), pentolínio (PENT; 5 mg/kg, s.c) ou salina (PBS; 10 mL/kg, s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os animais controles que receberam salina (veículo), hexametônio ou pentolínio foram agrupados em um só grupo, uma vez que não houve diferença entre suas respostas. Seis horas após o procedimento de CLP, a pressão arterial média basal (Painéis A e B), a resposta à noradrenalina (Painéis C e D) e a resposta à fenilefrina (Painéis E e F) foi avaliada. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 5 – 7 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni (Painéis A e B) ou ANOVA de duas vias

seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni (Painéis C, D, E e F). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 6 h + PBS.

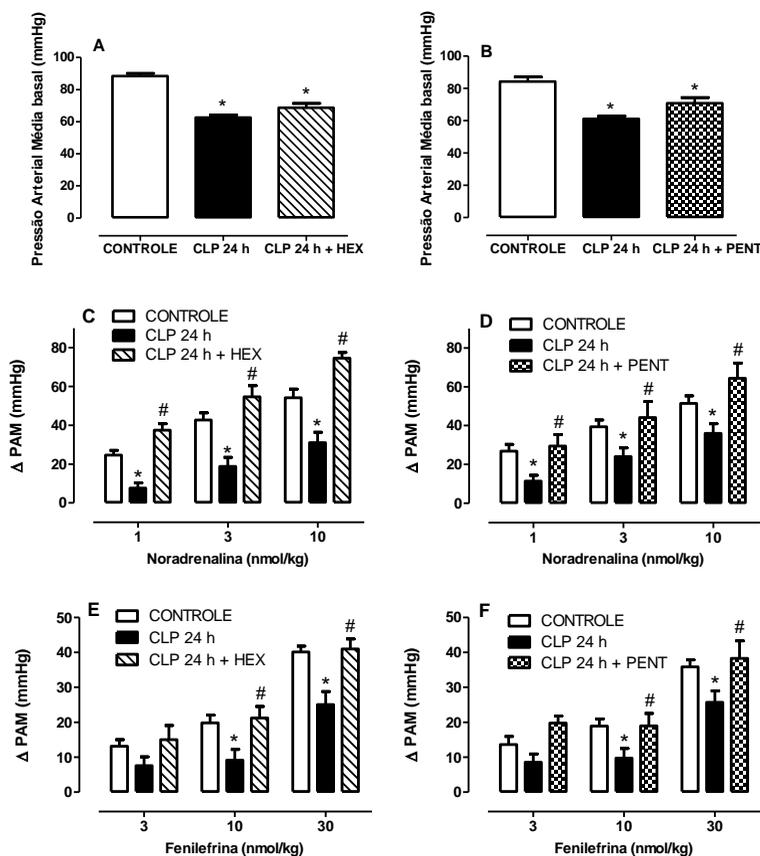


Figura 6. Efeitos do hexametônio e pentolínio na pressão arterial média e na reatividade vascular 24 h após a cirurgia de CLP. Os animais foram tratados com hexametônio (HEX; 15 mg/kg, s.c), pentolínio (PENT; 5 mg/kg, s.c) ou salina (PBS; 10 mL/kg, s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os animais controles que receberam salina (veículo), hexametônio ou pentolínio foram agrupados em um só grupo, uma vez que não houve diferença entre suas

respostas. Vinte e quatro horas após o procedimento de CLP, a pressão arterial média basal (Painéis A e B), a resposta à noradrenalina (Painéis C e D) e a resposta à fenilefrina (Painéis E e F) foi avaliada. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 5 – 7 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni (Painéis A e B) ou ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni (Painéis C, D, E e F). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 24 h + PBS.

4.2 Efeito do bloqueio ganglionar na sobrevida dos animais submetidos ao CLP

O choque séptico induzido pelo procedimento de CLP levou à alta mortalidade dos animais (Figura 7A). Vinte e quatro horas após a cirurgia, em torno de 80% dos animais sépticos sem tratamento morreram. Por outro lado, uma única dose de pentolínio administrada 1 h após a cirurgia de indução do choque séptico foi capaz de retardar substancialmente a mortalidade dos animais sépticos e 20% dos animais ainda permaneceram vivos 96 h após o CLP (Figura 7A). O hexametônio, por sua vez, não foi capaz de alterar a sobrevida dos animais.

Quando o tratamento dos animais sépticos com o pentolínio foi realizado 8 h após a cirurgia de CLP, não houve proteção significativa na sobrevida dos animais (Figura 7B).

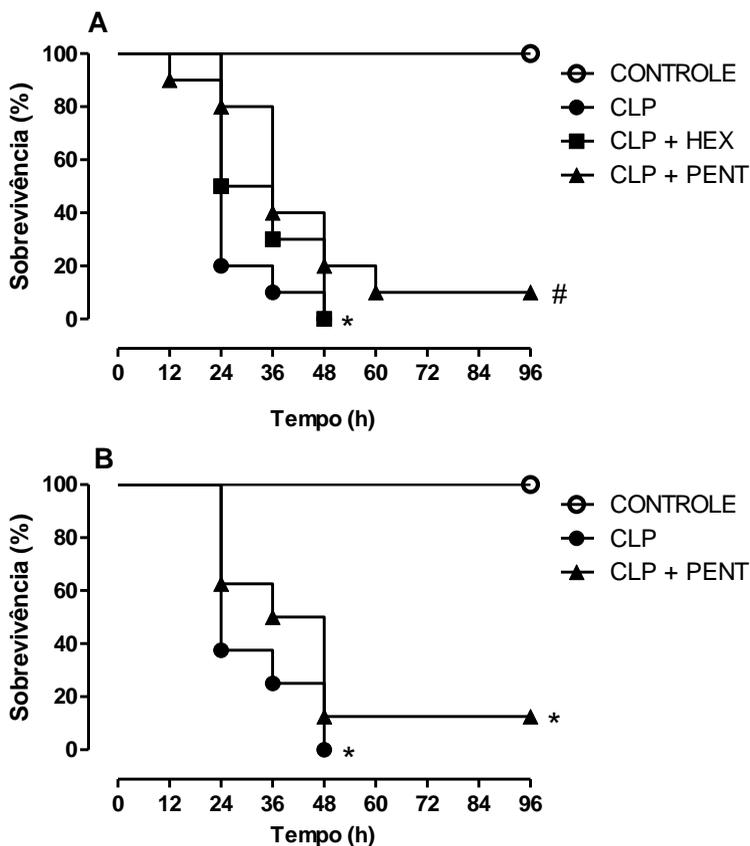


Figura 7. Efeito dos bloqueadores ganglionares na sobrevivência dos animais sépticos. Os animais foram submetidos ao procedimento de ligadura e perfuração do ceco (CLP) e tratados via subcutânea com salina (PBS) 10 mL/kg, HEX 15 mg/kg ou PENT 5 mg/kg 1 h após a cirurgia de indução do choque séptico (Painel A). Outro grupo de animais também foi submetido ao procedimento de CLP e tratado com as mesmas doses de salina ou PENT 8 h após a indução do choque séptico (Painel B). Os animais controles receberam as mesmas doses de salina, HEX ou PENT e, uma vez que não houve diferença entre esses grupos, seus valores foram agrupados com o grupo controle. A análise estatística foi realizada pelo teste log-rank. * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP sem tratamento. Os resultados foram expressos

como porcentagem de sobrevivência, n=10 por grupo (Painel A) e n=8 por grupo (Painel B).

4.3 Efeito dos bloqueadores ganglionares em parâmetros inflamatórios

Os níveis plasmáticos de TNF- α e IL-1 β aumentaram significativamente nos animais 24 h após serem submetidos ao procedimento de CLP, e nenhum dos bloqueadores ganglionares foi efetivo na redução dos níveis plasmáticos de ambas citocinas pró-inflamatórias (Figura 8).

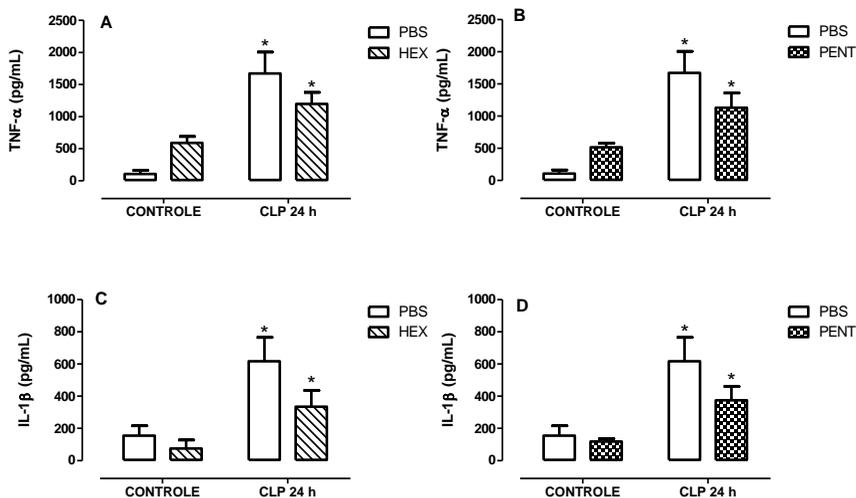


Figura 8. Efeito dos bloqueadores ganglionares no nível plasmático de citocinas pró-inflamatórias. Os animais sépticos receberam salina (PBS), hexametônio (HEX; Painéis A e C; 15 mg/kg; s.c) ou pentolínio (PENT; Painéis B e D; 5 mg/kg; s.c) 1 h após a cirurgia de CLP. Os animais controles também receberam as mesmas doses de PBS, HEX ou PENT. Vinte e quatro horas após a indução do choque séptico, amostras de sangue foram coletadas e utilizadas para dosagem plasmática de TNF- α (Painéis A e B) e IL-1 β (Painéis C e D). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 6 – 8 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + PBS.

4.4 Efeito dos bloqueadores ganglionares nos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x)

Os níveis plasmáticos de NO_x aumentaram significativamente nos animais sépticos (Figura 9). O tratamento precoce com pentolínio (Figura 9B), mas não com hexametônio (Figura 9A), foi efetivo em reduzir parcialmente os níveis de NO_x no plasma dos animais em choque séptico.

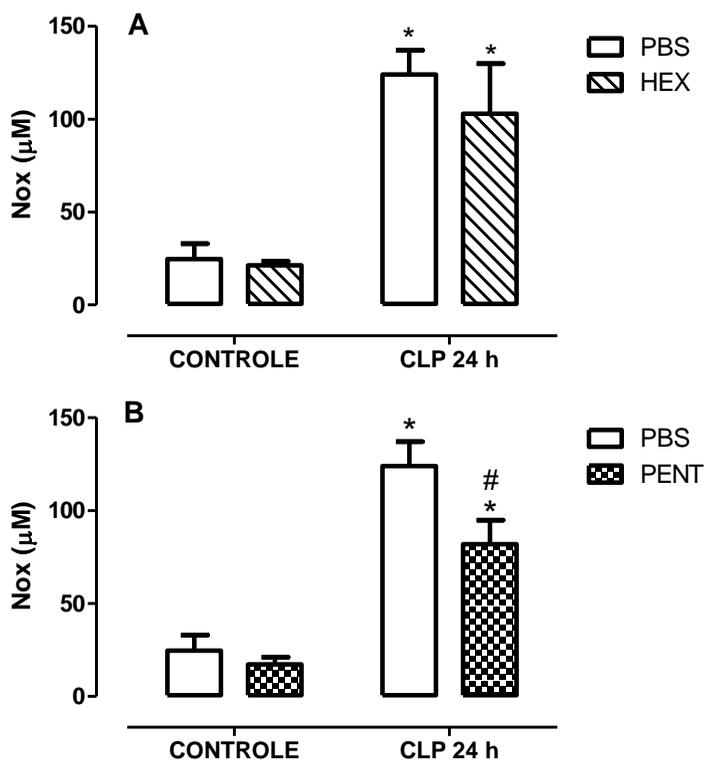


Figura 9. Efeito dos bloqueadores ganglionares nos níveis plasmáticos de NO_x. Os animais sépticos foram tratados com salina (PBS; 10 mL/kg; s.c), hexametônio (HEX; Painel A; 15 mg/kg; s.c) ou pentolínio (PENT; Painel B; 5 mg/kg; s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os animais controles também receberam as mesmas doses de PBS, HEX ou PENT. Vinte e quatro horas após a cirurgia de indução do choque séptico, amostras de sangue foram coletadas e

utilizadas para dosagem plasmática de NO_x . Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 – 10 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + PBS; # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 24 h + PBS.

4.5 Efeito dos bloqueadores ganglionares na disfunção renal

A partir dos níveis plasmáticos de ureia e creatinina podemos observar que o choque séptico induziu disfunção renal nos animais submetidos ao CLP (Figura 10). O tratamento com ambos os bloqueadores ganglionares foi capaz de reduzir apenas os níveis de ureia (Figuras 10A e 10B). Por outro lado, o tratamento tanto com hexametônio quanto com pentolínio, não foi efetivo em reduzir os níveis de creatinina (Figuras 10C e 10D) dos animais sépticos, bem como foi capaz de interferir na função renal dos animais controle.

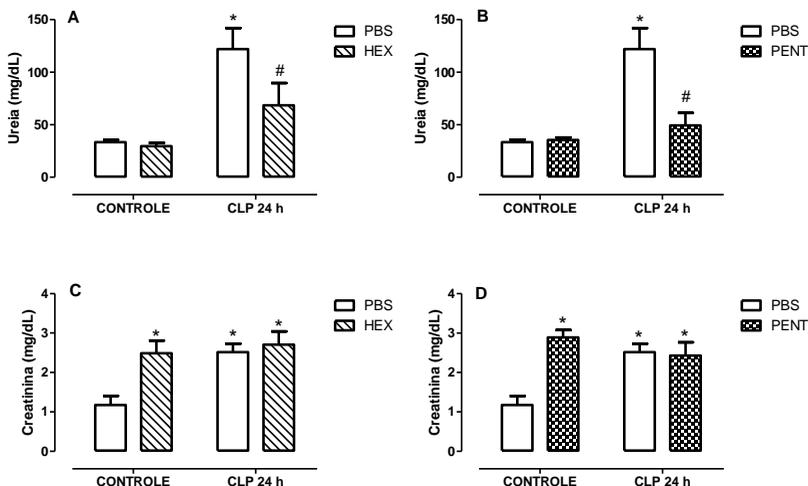


Figura 10. Efeito dos bloqueadores ganglionares na disfunção renal dos animais sépticos. Os animais sépticos foram tratados com salina (PBS; 10 mL/kg; s.c), hexametônio (HEX; Painéis A e C; 15 mg/kg; s.c) ou pentolínio (PENT; Painéis B e D; 5 mg/kg; s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os animais controles também receberam as mesmas doses de PBS, HEX ou PENT. Vinte e quatro horas após a cirurgia de indução de choque séptico, amostras de sangue foram coletadas e utilizadas para dosagem plasmática dos níveis de ureia

(Painéis A e B) e creatinina (Painéis C e D). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 – 10 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 24 h + PBS.

4.6 Efeito dos bloqueadores ganglionares na disfunção hepática

Os níveis plasmáticos das enzimas hepáticas aumentaram significativamente nos animais submetidos ao procedimento de CLP, indicando disfunção hepática (Figura 11). O tratamento com ambos bloqueadores ganglionares não resultou na diminuição dos níveis da transaminase oxalacética (TGO; Figuras 11A e 11B) nem da enzima transaminase pirúvica (TGP; Figuras 11C e 11D). Os animais controles tratados com hexametônio ou pentolínio apresentaram aumento nos níveis plasmáticos de TGP (Figuras 11C e 11D), sendo este aumento possivelmente relacionado com toxicidade hepática dos bloqueadores ganglionares.

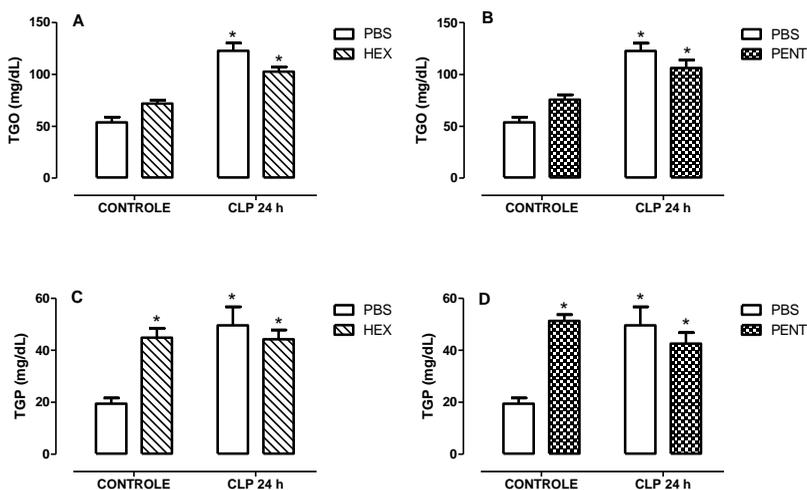


Figura 11. Efeito dos bloqueadores ganglionares na disfunção hepática de animais em choque séptico. Os animais sépticos foram tratados com salina (PBS; 10 mL/kg; s.c), hexametônio (HEX; Painéis A e C; 15 mg/kg; s.c) ou

pentolínio (PENT; Painéis B e D; 5 mg/kg; s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os animais controles também receberam as mesmas doses de PBS, HEX ou PENT. Vinte e quatro horas após a cirurgia de indução do choque séptico, amostras de sangue foram coletadas e utilizadas para dosagem plasmática dos níveis de TGO (Painéis A e B) e TGP (Painéis C e D). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 – 10 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle + PBS.

4.7 Efeito do bloqueio ganglionar nos níveis plasmáticos de lactato

Os animais submetidos à cirurgia de CLP não apresentaram aumento do nível plasmático de lactato 24 h após a indução do choque séptico (Figura 12), e o tratamento precoce tanto com hexametônio (Figura 12A) quanto com pentolínio (Figura 12B) não modificou o nível de lactato dos animais sépticos.

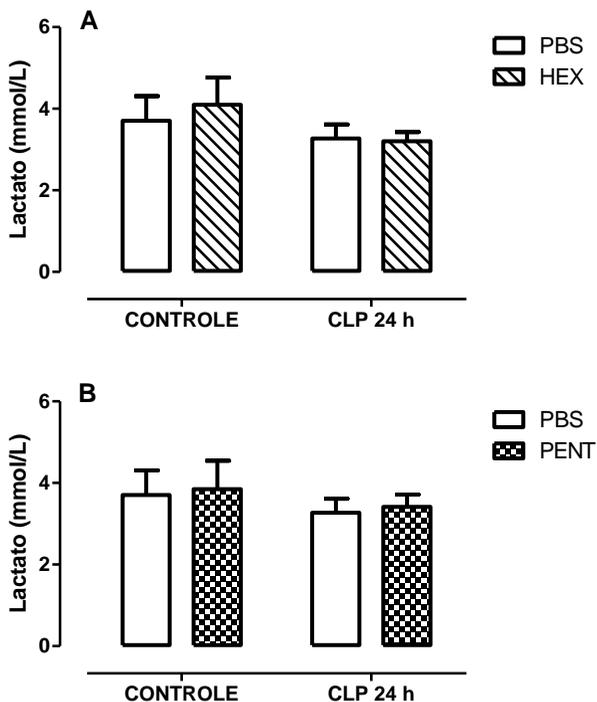


Figura 12. Efeito dos bloqueadores ganglionares no nível plasmático de lactato. Os animais sépticos foram tratados com salina (PBS; 10 mL/kg; s.c), hexametônio (HEX; Painei A; 15 mg/kg; s.c) ou pentolínio (PENT; Painei B; 5 mg/kg; s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os animais controles também receberam as mesmas doses de PBS, HEX ou PENT. Vinte e quatro horas após a cirurgia de indução do choque séptico, amostras de sangue foram coletadas e utilizadas para dosagem de lactato plasmático. Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 – 10 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni.

4.8 Efeito do bloqueio ganglionar no hemograma

Os animais submetidos ao procedimento de CLP apresentaram alterações no hemograma condizentes com um quadro de choque séptico: leucopenia (Figuras 13A e 14A), linfocitopenia (Figuras 13B e

14B), monocitopenia (Figuras 13C e 14C), granulocitopenia (Figuras 13D e 14D), trombocitopenia (Figuras 13E e 14E) e aumento do hematócrito (Figuras 13F e 14F). O tratamento precoce com o hexametônio (Figura 13) preveniu o desenvolvimento da granulocitopenia (Figura 13D) e aumento do hematócrito (Figura 13 F), enquanto que o tratamento com o pentolínio (Figura 14) preveniu a granulocitopenia (Figura 14D) bem como evitou o aumento do hematócrito dos animais em choque séptico (Figura 14F), sugerindo menor extravasamento plasmático, o qual levaria à hemoconcentração.

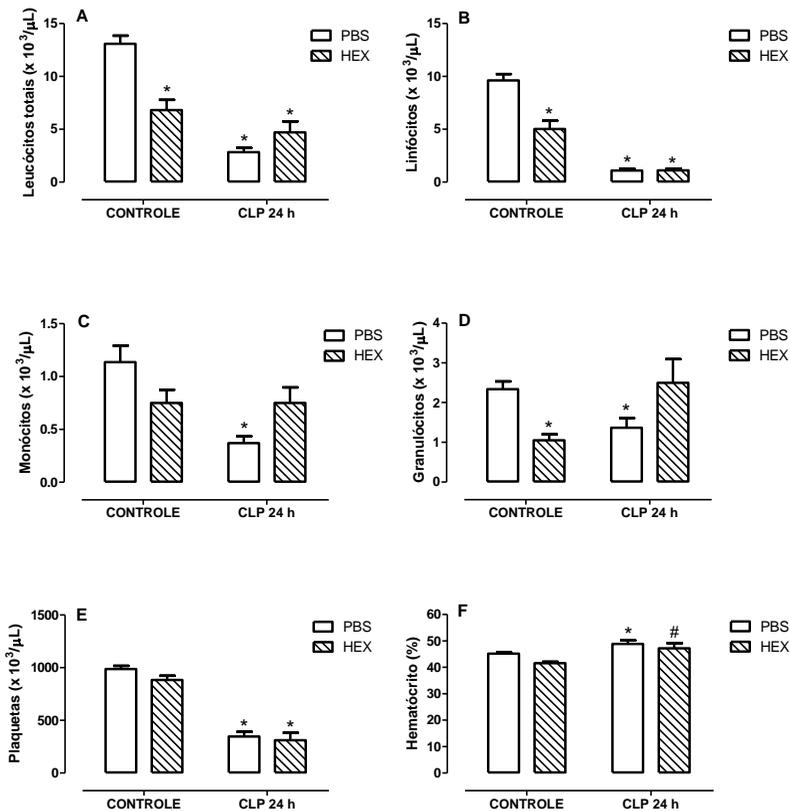


Figura 13. Efeito do hexametônio no hemograma de animais sépticos. Os animais sépticos foram tratados com salina (PBS; 10 mL/kg; s.c) ou hexametônio (HEX; 15 mg/kg; s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os

animais controles também receberam as mesmas doses de PBS ou HEX. Vinte e quatro horas após a cirurgia de indução do choque séptico, amostras de sangue total foram coletadas e utilizadas para avaliação do hemograma, incluindo a dosagem de leucócitos totais (Painel A), linfócitos totais (Painel B), monócitos totais (Painel C), granulócitos totais (Painel D), plaquetas (Painel E) e hematócrito (Painel F). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 – 10 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 24 h + PBS.

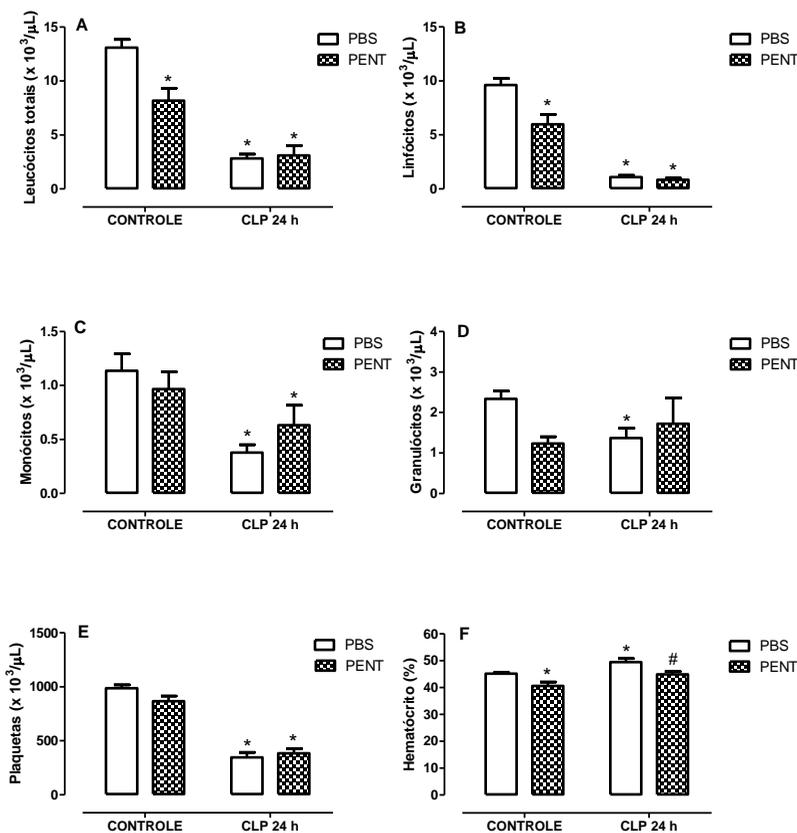


Figura 14. Efeito do pentolínio no hemograma de animais sépticos. Os animais sépticos foram tratados com salina (PBS; 10 mL/kg; s.c) ou pentolínio (PENT; 5 mg/kg; s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os animais controles

também receberam as mesmas doses de PBS ou PENT. Vinte e quatro horas após a cirurgia de indução do choque séptico, amostras de sangue total foram coletadas e utilizadas para avaliação do hemograma, incluindo a dosagem de leucócitos totais (Painel A), linfócitos totais (Painel B), monócitos totais (Painel C), granulócitos totais (Painel D), plaquetas (Painel E) e hematócrito (Painel F). Os resultados representam a média \pm erro padrão da média de 8 – 10 animais. As análises estatísticas foram realizadas por ANOVA de duas vias seguida pelo teste *post hoc* de Bonferroni. * $p < 0,05$ comparado ao grupo Controle; # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 24 h + PBS.

4.9 Efeito dos bloqueadores ganglionares na expressão de receptores vasculares α_{1D} -adrenérgicos

O choque séptico promoveu diminuição de cerca de 60% na expressão de receptores α_{1D} -adrenérgicos na aorta torácica dos animais submetidos à cirurgia de CLP (Figura 15). O tratamento precoce com o pentolínio preveniu de maneira significativa essa perda α_{1D} -adrenérgica nos animais sépticos (Figuras 15A e 15B). Por outro lado, o tratamento precoce com o hexametônio não foi efetivo para prevenir a perda induzida pelo choque séptico dos receptores α_{1D} -adrenérgicos.

A

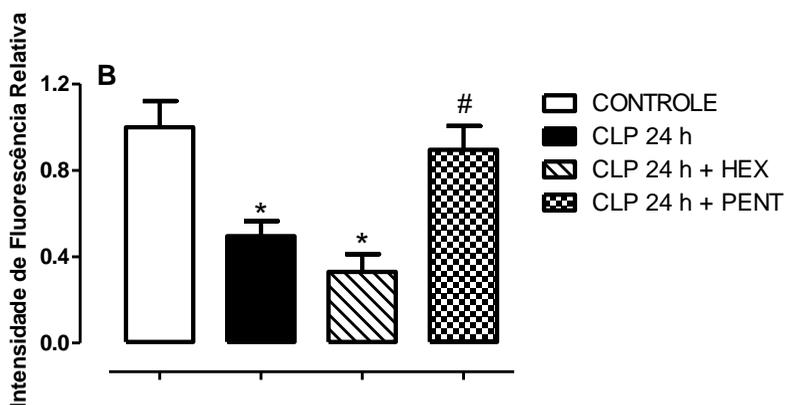
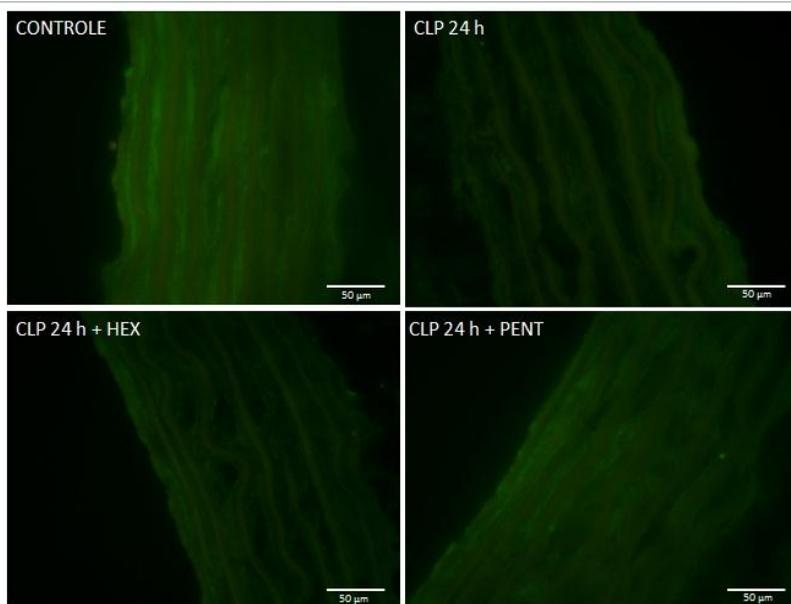


Figura 15. Imunofluorescência dos receptores α_{1D} -adrenérgicos na aorta torácica de animais controles e sépticos. Os animais sépticos foram tratados com salina (PBS; Painel A, no topo à direita; 10 mL/kg; s.c), hexametônio (HEX; Painel A, abaixo à esquerda; 15 mg/kg; s.c) ou pentolínio (PENT; Painel

A, abaixo à direita; 5 mg/kg; s.c) 1 h após o procedimento de CLP. Os animais controles também receberam as mesmas doses de PBS (Painel A, no topo à esquerda), HEX (dado não mostrado) ou PENT (dado não mostrado). As aortas foram coletadas 24 h após a cirurgia de indução do choque séptico. A análise quantitativa da intensidade de fluorescência da expressão dos receptores α_{1D} -adrenérgicos foi calculada em relação ao grupo controle (intensidade de fluorescência relativa), sendo mostrada no Painel B. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste *post hoc* de Dunn. Não houve diferença estatística entre os grupos controles que receberam PBS, HEX ou PENT (dados não mostrados).

5 DISCUSSÃO

As principais contribuições do nosso trabalho são três. A primeira é que o bloqueio ganglionar, principalmente do sistema simpático, teve impacto significativo na manutenção da pressão arterial dos animais submetidos ao choque séptico experimental, bem como preservou a resposta vasoconstritora. Tão importante quanto esse achado, foi o resultado de redução da mortalidade dos animais em choque séptico quando tratados precocemente com o bloqueador mais seletivo para o gânglio simpático, o pentolínio. Adicionalmente, nossos resultados mostram que o efeito protetor do bloqueio ganglionar parece ser dependente da preservação da expressão dos receptores α_{1D} -adrenérgicos no vaso.

O sistema nervoso simpático e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) são fundamentais para a manutenção da homeostase basal em resposta a um quadro de estresse. Quando a homeostasia sofre algum tipo de perturbação, há ativação imediata desses sistemas, resultando em liberação de catecolaminas e glicocorticoides, os quais irão atuar no sentido de restaurar o estado de equilíbrio interno (ELENKOV *et al.*, 2000). A sepse e choque séptico induzem um distúrbio intenso dos sistemas biológicos representando, portanto, importante estímulo estressor e culminando na ativação de diferentes vias de sinalização.

Nossos resultados mostram que o bloqueio precoce da transmissão ganglionar foi efetivo em restaurar a níveis normais a pressão arterial média dos animais submetidos à indução do choque séptico, quando avaliados 6 h após a cirurgia de CLP. Entretanto, essa capacidade dos bloqueadores ganglionares de manter a pressão arterial média em níveis normais, não foi observada 24 h após a indução do choque séptico. Provavelmente, esse efeito transitório foi devido ao tempo de meia vida ($t_{1/2}$) curto de ambos bloqueadores ganglionares, sendo que o hexametônio possui um $t_{1/2}$ de 1 – 2 h (TAHERI *et al.*, 1995), enquanto o $t_{1/2}$ do pentolínio é de 2 – 2,5 h (WIEN e MASON, 1953; FERRER *et al.*, 1955). Mais importante, porém, foi a capacidade de ambos os bloqueadores resgatarem a habilidade dos animais em choque séptico de responder adequadamente aos agentes vasoconstritores, tanto 6 h quanto 24 h após o procedimento de CLP. Tendo esse resultado em mãos e sabendo que o tempo de meia vida dos bloqueadores é curto, e ainda, considerando que uma única dose de hexametônio e pentolínio foi administrada aos animais, há evidências claras indicando que a ativação

simpática é um evento precoce e importante no choque séptico. Assim, essa ativação precoce tem consequências tardias no choque séptico, as quais parecem estar diretamente ligadas à melhora cardiovascular dos animais sépticos tratados com hexametônio e pentolínio.

Outro importante resultado encontrado no nosso trabalho é que o tratamento precoce com pentolínio, mas não com hexametônio, aumentou significativamente a sobrevivência dos animais sépticos quando comparados aos animais sépticos sem tratamento. Por um lado, 80% dos animais CLP sem tratamento morreram nas primeiras 24 h, enquanto o tratamento com uma única dose de pentolínio reduziu significativamente a taxa de mortalidade para 20% nas primeiras 24 h. E ao final do período de 96 h, 20% dos animais tratados com pentolínio ainda estavam vivos. O tratamento com hexametônio também reduziu a taxa de mortalidade dos animais nas primeiras 24 h decorrentes da cirurgia de CLP, porém não foi de maneira significativa. Uma possível explicação para essa diferença (e outras que serão discutidas mais adiante) entre os bloqueadores ganglionares, é que o pentolínio é mais seletivo em bloquear o gânglio autônomo simpático quando comparado ao hexametônio (MURPHY *et al.*, 1983; DAVERN *et al.*, 2009; CHAN *et al.*, 2012). Além disso, devido à ação pouco seletiva do hexametônio, o mesmo possui ação pronunciada também no gânglio autônomo parassimpático, e já se sabe que o sistema parassimpático é uma importante via anti-inflamatória na sepse (WANG *et al.*, 2003; WANG *et al.*, 2004a). Sendo assim, parece que há um balanço entre efeitos benéficos (atuando no bloqueio de tônus simpático) e maléficos (atuando no bloqueio de tônus parassimpático) com o uso de hexametônio, contribuindo para essa ausência de efeito na sobrevivência dos animais submetidos ao CLP.

Devido à ação protetora do tratamento precoce com pentolínio na sobrevivência dos animais, nos perguntamos se o tratamento mais tardio teria o mesmo efeito protetor. Porém, quando os animais foram tratados 8 h após a indução do choque séptico, o pentolínio não foi capaz de melhorar a sobrevivência dos animais sépticos. Esse resultado constitui mais um indício de que o tônus simpático promove alguma alteração importante nas horas iniciais do choque séptico e essa ação está diretamente relacionada com a disfunção cardiovascular da sepse e choque séptico.

Embora já se tenha evidências de que o aumento das catecolaminas circulantes durante a sepse e choque séptico é deletério para o organismo (MUNT *et al.*, 1998; RITTIRSCH *et al.*, 2008), ainda são raros os estudos na literatura que interferem com o sistema simpático

durante o choque séptico. E de acordo com os estudos da literatura, o efeito protetor das drogas simpato-líticas de ação central em um quadro de sepse, é decorrente da ação anti-inflamatória das mesmas (HOFER *et al.*, 2009; ACKLAND *et al.*, 2010). Assim, nosso próximo passo foi verificar se a proteção cardiovascular do tratamento com pentolínio e hexametônio seria resultado de uma ação anti-inflamatória. Nossos resultados, porém, mostram que a melhora da reatividade vascular, bem como o aumento da sobrevivência dos animais em choque séptico, parece não ser dependente da redução de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que os níveis plasmáticos de IL-1 β e TNF- α não reduziram de maneira significativa nos animais sépticos tratados com ambos bloqueadores ganglionares.

Adicionalmente, avaliamos se o tratamento com ambos bloqueadores ganglionares afetaria a produção do NO. De maneira interessante, o pentolínio reduziu parcialmente os níveis plasmáticos dos metabólitos do NO. Já é conhecido de longa data que o NO está diretamente relacionado com a hipotensão e hiporeatividade aos agentes vasoativos durante a sepse e choque séptico (MONCADA *et al.*, 1991; ASSREUY, 2006; FERNANDES e ASSREUY, 2008) e a diminuição dos níveis de NO está associada com a melhora clínica de animais sépticos (KILBOURN *et al.*, 1990; SZABO *et al.*, 1994; FERNANDES *et al.*, 2006; SORDI *et al.*, 2011). Além disso, um estudo de Nozik-Grayck e colegas, em 2006, demonstrou que o NO é capaz de inibir a resposta vasoconstritora à fenilefrina da aorta pulmonar isolada de rato, sendo essa inibição consequência da nitrosilação que o NO promove nos receptores α_1 -adrenérgicos (NOZIK-GRAYCK *et al.*, 2006). Corroborando esse estudo, dados ainda não publicados do nosso grupo utilizando a técnica de *binding*, mostram que camundongos sépticos tratados com um agente inibidor da enzima NOS-2 apresentam a resposta vasoconstritora, via receptores α_1 -adrenérgicos, preservada, sendo um mecanismo dependente de GRK-2, a qual é uma quinase responsável por dessensibilização de receptores acoplados à proteína G. Portanto, parte do efeito protetor do pentolínio nos animais em choque séptico, pode estar relacionado à diminuição da produção de NO e, assim, consequente redução do processo de nitrosilação e da ativação de GRK-2, o que impede então a perda de função dos receptores α_1 -adrenérgicos. Porém, ainda não sabemos qual o mecanismo envolvido na produção de NO pelo tônus simpático.

Sabendo que em um quadro de choque séptico temos disfunção de múltiplos órgãos, nos perguntamos se o tratamento com pentolínio e hexametônio também interferiria com essa perda de funções orgânicas. Para isso, avaliamos função renal, hepática e nível de lactato plasmático, o qual é um indicativo indireto de perfusão tecidual. Os animais sépticos sem tratamento apresentaram disfunção renal e hepática, porém níveis normais de lactato. Ambos os bloqueadores ganglionares promoveram redução do nível plasmático de ureia, mas não de creatinina. Tanto a ureia quanto a creatinina são importantes marcadores de função renal e devem ser avaliados em conjunto, uma vez que a concentração sanguínea de ureia e creatinina pode sofrer variações de acordo o estado nutricional, insuficiência hepática e sangramentos gastrointestinais (PATEL *et al.*, 2002). Assim, a julgar pela redução da concentração plasmática de ureia, os animais sépticos tratados com pentolínio e hexametônio tiveram melhora na função renal. Os animais controles que receberam ambos os bloqueadores ganglionares apresentaram aumento do nível plasmático de creatinina, o que pode ser um efeito colateral do uso desses agentes, uma vez que bloqueadores ganglionares podem levar a uma série de efeitos adversos, inclusive renais (GOODMAN e GILMAN, 2006; RANG e DALE, 2007).

Além da disfunção renal, os animais sépticos apresentaram disfunção hepática, avaliada a partir dos níveis plasmáticos aumentados de TGO e TGP. O tratamento com ambos os bloqueadores ganglionares não impediu a instalação de falência hepática. Da mesma maneira que o tratamento dos animais controles com pentolínio ou hexametônio levou ao aumento do nível plasmático de creatinina, também o nível plasmático de TGP desses animais teve aumento. Novamente, acreditamos que esse efeito pode ser um efeito adverso do uso dessas drogas, as quais podem gerar toxicidade hepática (GOODMAN e GILMAN, 2006; RANG e DALE, 2007). Justamente por conta de possíveis efeitos colaterais importantes é que o uso de bloqueadores ganglionares na clínica se tornou obsoleto.

Quando avaliamos os níveis de lactato plasmático 24 h após a cirurgia de indução do choque séptico, observamos que não houve aumento desses níveis nos animais sépticos sem tratamento e também naqueles que receberam pentolínio ou hexametônio. O aumento dos níveis de lactato nos quadros de sepse e choque séptico ocorre geralmente precocemente, ou seja, nas horas iniciais decorrentes do processo infeccioso e inflamatório, sendo portanto, um aumento transitório, voltando aos níveis basais após o decorrer do quadro inflamatório (LEVY *et al.*, 1997; HERNANDEZ *et al.*, 2012).

Provavelmente o fato do aumento dos níveis de lactato ser transitório durante o quadro de sepse e choque séptico, seja causa de não termos observado alterações desses níveis nos animais submetidos ao nosso modelo experimental.

A partir dos dados do hemograma, observamos que a redução do número total de linfócitos, monócitos e granulócitos, levou os animais sépticos a desenvolver severa leucopenia. Além disso, os animais apresentaram trombocitopenia e aumento do hematócrito. O tratamento com hexametônio preveniu a granulocitopenia, monocitopenia e não aumentou o hematócrito dos animais em choque séptico. O tratamento com pentolínio também foi efetivo em prevenir a granulocitopenia e o aumento do hematócrito. Os granulócitos, principalmente os neutrófilos, são importantes células de defesa do organismo no combate a agentes infecciosos e, particularmente na sepse, a granulocitopenia está relacionada ao pior prognóstico do paciente (DELLINGER *et al.*, 2008; LITTLEWOOD *et al.*, 2013). Outro item bastante importante quando se analisa o hemograma de pacientes em choque séptico é o resultado do hematócrito, o qual sugere, indiretamente, que um aumento nos seus níveis está relacionado com maior extravasamento plasmático e hemoconcentração, indicando a necessidade de terapia de reposição fluidica ao paciente (ASTIZ *et al.*, 1993; SU *et al.*, 2013). Assim, parece que uma parte dos efeitos benéficos do tratamento dos animais sépticos com ambos os bloqueadores ganglionares é relacionado à manutenção dos níveis de granulócitos e do hematócrito.

Sabendo então que o bloqueio ganglionar precoce, especialmente o bloqueio mais seletivo do sistema simpático, traz benefício importante e que perdura até horas mais tardias após a indução do choque séptico tanto resgatando a resposta vasoconstritora quanto melhorando a sobrevivência dos animais, nos perguntamos qual seria o principal mecanismo envolvido nessa ação protetora. É bem descrito que a exposição demasiada e prolongada dos GPCRs aos seus agonistas leva à uma série de eventos complexos na tentativa de reduzir ou até mesmo cessar a sinalização intracelular, protegendo a célula da estimulação excessiva. Desse modo, ocorre o processo de dessensibilização, ou seja, de hiporeatividade a agonistas (GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 1999; GARCÍA-SÁINZ *et al.*, 2000; CALZADA *et al.*, 2001), como já descrito anteriormente (item 1.4.2.3). Nossos resultados mostram que os animais sépticos exibem uma perda significativa na densidade de receptores α_{1D} -adrenérgicos, sendo essa perda em torno de 60%. Por

outro lado, o tratamento com pentolínio, mas não com hexametônio, promoveu redução na dessensibilização e internalização dos receptores α_{1D} -adrenérgicos, confirmado pela alta densidade desses receptores na musculatura lisa de aorta dos animais com choque séptico. É importante ressaltar que os receptores adrenérgicos do tipo α_{1D} estão intimamente relacionados ao controle e manutenção da pressão arterial (VILLALOBOS-MOLINA e IBARRA, 1996; ZHOU e VARGAS, 1996; CASTILLO *et al.*, 1998; TANOUE *et al.*, 2002), por isso a escolha por realizarmos o estudo com esses receptores. Dessa maneira, acreditamos que por ocorrer estimulação simpática excessiva durante a sepse e choque séptico e o pentolínio promover bloqueio desse tônus, bloqueamos também as etapas que levariam à dessensibilização e internalização dos receptores α_{1D} -adrenérgicos, protegendo-os e deixando-os funcionais. Dessa maneira, se isso for verdade, quando se fizer necessário o uso de agentes vasoativos no decorrer do curso de um choque séptico ou sepse, a resposta vasoconstritora estará preservada.

De maneira diferente do pentolínio, o tratamento com hexametônio melhorou a reatividade cardiovascular dos animais sépticos através de um mecanismo que independente da preservação dos receptores α_{1D} -adrenérgicos. O hexametônio é um derivado do tetraetilamônio (TEA), o qual é um bloqueador não seletivo de canais de potássio (K^+) (WONG e ADLER, 1986; LANG e RITCHIE, 1990; HEGINBOTHAM e MACKINNON, 1992). Devido ao fato do hexametônio ser um derivado do TEA, suas estruturas químicas e funções são similares (MITCHELL e CLARK, 1952). Kawai e colaboradores, em 1985, observaram que o hexametônio, assim como o TEA, possui habilidade de bloquear canais de K^+ (KAWAI *et al.*, 1985). Na sepse e choque séptico o bloqueio de canais de potássio está diretamente relacionado com a melhora da disfunção cardiovascular e de órgãos (LANGE *et al.*, 2007; SORDI *et al.*, 2010; SORDI *et al.*, 2011). Desse modo, acreditamos que a melhora cardiovascular dos animais sépticos tratados com hexametônio se deve, além da ação bloqueadora ganglionar, à ação de bloqueio dos canais de K^+ .

A melhora do quadro cardiovascular dos animais tratados com pentolínio não foi avaliada em termos de receptores cardíacos β -adrenérgicos, mas não podemos excluir a possível participação desses receptores no benefício observado com o tratamento com pentolínio, uma vez que a liberação simpática exacerbada de catecolaminas nas horas iniciais do choque séptico ou mesmo a administração prolongada das mesmas promovem danos à maquinaria contrátil do coração (RONA, 1985; RADERMACHER *et al.*, 2013; RUDIGER e SINGER,

2013). Ademais, os estudos de Suzuki e colaboradores em 2005, de Rudiger em 2010 e de Morelli e colaboradores, em 2013, mostram que o bloqueio β -adrenérgico atenua significativamente a disfunção miocárdica do choque séptico e sepse (SUZUKI *et al.*, 2005; RUDIGER, 2010; MORELLI *et al.*, 2013), além de ainda modular favoravelmente o sistema imunológico, metabólico e de coagulação (DE MONTMOLLIN *et al.*, 2009).

As catecolaminas, especialmente a noradrenalina, são também potentes indutores do crescimento bacteriano (LYTE e ERNST, 1992; LYTE *et al.*, 1996; STRAUB *et al.*, 2000). Esse fato tem importante implicação no contexto do choque séptico, uma vez que o grupo catecol (quimicamente chamado de 3,4-dihidroxibenzol) das catecolaminas facilita a remoção dos íons de ferro armazenados em moléculas de lactoferrina e transferrina, favorecendo assim a aquisição e incorporação do ferro pelas bactérias, principalmente *Escherichia coli* comensais (FREESTONE *et al.*, 2002; FREESTONE *et al.*, 2003; FREESTONE *et al.*, 2007). Apesar de não termos estudado no nosso modelo experimental as consequências do bloqueio ganglionar no crescimento bacteriano, não descartamos que uma parte da melhora dos animais sépticos tratados com pentolínio e hexametônio seja devida, também, à possível inibição do crescimento bacteriano das bactérias intestinais e, consequentemente, atenuação da infecção. Além do mais, o benefício do bloqueio ganglionar durante nosso modelo experimental de choque séptico, particularmente o bloqueio simpático, pode ser devido ainda à diminuição do nível e atividade de metaloproteinases de matriz. A ativação neuro-hormonal simpática está diretamente associada à ativação dessas enzimas, especialmente à metaloproteinase de matriz tipo 2 (MMP-2) (BANFI *et al.*, 2005). Já se sabe que a inibição da MMP-2 em modelos de endotoxemia, está diretamente relacionada com a proteção contra o desenvolvimento da hiporeatividade vascular à agentes vasoativos (CENA *et al.*, 2010). Embora não tenhamos estudado no nosso modelo de choque séptico experimental a ativação de metaloproteinases pelo tônus simpático, possivelmente o bloqueio ganglionar preferencialmente simpático, através do uso do pentolínio, esteja bloqueando também a maior ativação das MMP-2 e assim melhorando a resposta vascular à noradrenalina e fenilefrina.

Ao final do nosso conjunto de experimentos, acreditamos que o mais importante achado do nosso trabalho é que uma única dose do pentolínio foi capaz de melhorar a sobrevida e reatividade

cardiovascular dos animais em choque séptico, principalmente em um mecanismo dependente da manutenção do número/função dos receptores α_{1D} -adrenérgicos na vasculatura. Por fim, elaboramos uma Figura que ilustra resumidamente o que acreditamos ser o principal mecanismo protetor do pentolínio.

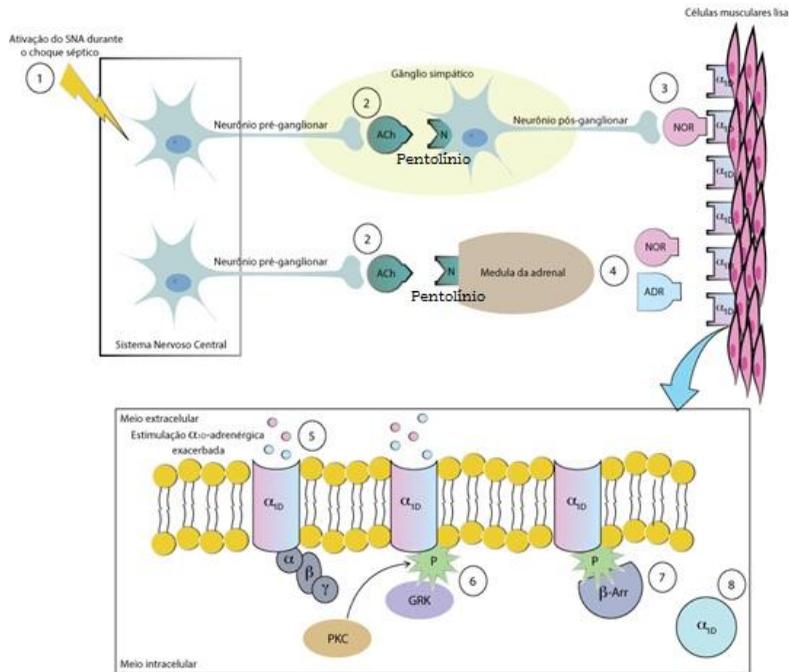


Figura 16. Hiperativação do Sistema Nervoso Autônomo (SNA) durante o choque séptico leva à dessensibilização dos receptores α_{1D} -adrenérgicos. O choque séptico é um potente estímulo para ativação do SNA, particularmente do sistema simpático (1). Com essa ativação, há liberação de acetilcolina (ACh) pelos neurônios pré-ganglionares (2), a qual atuará nos receptores nicotínicos (N) presentes nos neurônios pós-ganglionares e na medula da glândula adrenal. Após a ligação da ACh aos seus receptores N, inicia o potencial pós-sináptico excitatório nos gânglios periféricos e também na membrana celular das células da medula da adrenal, o que culminará com a liberação de noradrenalina (NOR) dos neurônios pós-ganglionares (3) e de adrenalina (ADR) e NOR da glândula adrenal (4). A intensa estimulação dessas catecolaminas nos receptores α_{1D} -adrenérgicos promove o desmembramento do dímero $\beta\gamma$ da proteína G (5), deixando o receptor mais suscetível à ação das quinases de receptores acoplados

à proteínas G (GRK) e de outras quinases, tal como a proteína quinase C (PKC). Dessa forma, essas quinases fosforilam o receptor (6) e dão início ao processo de dessensibilização. A fosforilação do receptor aumenta a afinidade do mesmo por moléculas de β -arrestina (β -Arr), e a ligação dessas moléculas ao receptor (7) promove um impedimento estérico que interdita a ligação do receptor com sua proteína G específica, estabilizando então o estado desacoplado do mesmo. Assim, esse estado do receptor favorece a sua internalização em vesículas (8), a fim de proteger o mesmo da estimulação excessiva. O pentolínio, por sua vez, age bloqueando o receptor nicotínico da ACh, o que bloqueia então toda a cascata que levaria à internalização dos receptores α_{1D} -adrenérgicos e hiporesponsividade a agentes vasoconstritores durante o choque séptico.

6 CONCLUSÕES

Em síntese, com nosso trabalho podemos concluir que a ativação simpática exagerada durante a sepse/choque séptico contribui de maneira bastante significativa para a perda da resposta vascular à agonistas adrenérgicos. A hiperativação simpática na sepse também é responsável pela mortalidade, alteração de função renal e produção de óxido nítrico nos animais submetidos à cirurgia de CLP.

Assim, nossos resultados mostram claramente que a interferência com a transmissão ganglionar, especialmente com o tônus simpático, tem importante impacto no resgate da reatividade vascular à agonistas vasoconstritores e na redução da letalidade do choque séptico induzido por ligação e perfuração do ceco em ratos. Esses efeitos benéficos estão relacionados, em parte, com a manutenção da densidade dos receptores α_{1D} -adrenérgicos, principalmente como consequência da redução da ativação simpática exacerbada causada pelo estresse do quadro séptico. Sendo assim, essa nova descoberta pode conduzir à estratégias terapêuticas adicionais no tratamento da sepse e choque séptico.

7 REFERÊNCIAS

ACKLAND, G. L., et al. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 2, p. 388-394, 2010.

ALBERTI, C., et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 28, n. 2, p. 108-121, 2002.

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

ANNANE, D., et al. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 160, n. 2, p. 458-465, 1999.

ANNANE, D., et al. Current epidemiology of septic shock: the CUB-Rea Network. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 168, n. 2, p. 165-172, 2003.

ASSREUY, J. Nitric oxide and cardiovascular dysfunction in sepsis. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 165-173, 2006.

ASTIZ, M. E., GALERA-SANTIAGO, A., RACKOW, E. C. Intravascular volume and fluid therapy for severe sepsis. **New Horizons**, v. 1, n. 1, p. 127-136, 1993.

BALDWIN, A. S. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 107, n. 1, p. 3-6, 2001.

BANFI, C. et al. Neurohormonal activation is associated with increased levels of plasma matrix metalloproteinase-2 in human heart failure. **European Heart Journal**, v. 26, n. 5, p. 481-488, 2005.

BARTORELLI, C., CARPI, A., CAVALCA, L. Potentiation of the pressor action of noradrenaline by hexamethonium, tetraethylammonium, and methantheline. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 9, n. 4, p. 476-480, 1954.

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

BENKE, D., ZEMOURA, K., MAIER, P. J. Modulation of cell surface GABA(B) receptors by desensitization, trafficking and regulated degradation. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 3, n. 4, p. 61-72, 2012.

BERGMANN, M., SAUTNER, T. Immunomodulatory effects of vasoactive catecholamines. **Wiener Klinische Wochenschrift**, v. 114, n. 17-18, p. 752-761, 2002.

BERGQUIST, J. et al. Discovery of endogenous catecholamines in lymphocytes and evidence for catecholamine regulation of lymphocyte function via an autocrine loop. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12912-12916, 1994.

BOLDT, J. et al. Alterations in circulating vasoactive substances in the critically ill -a comparison between survivors and non-survivors. **Intensive Care Medicine**, v. 21, n. 3, p. 218-225, 1995.

BOLTON, T. B. et al. Excitation-contraction coupling in gastrointestinal and other smooth muscles. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 85-115, 1999.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-1655, 1992.

BOWMAN, W. C.; RAND, M. J. Textbook of Pharmacology. 2. ed. Londres: Blackwell, 1980.

BROWN, J. F. et al. The acute hemodynamic and metabolic response of hypertensive patients to pentolinium tartrate. **Circulation**, v. 14, n. 4 Part 1, p. 584-592, 1956.

BROWN, M. J. et al. Increased sensitivity and accuracy of phaeochromocytoma diagnosis achieved by use of plasma-adrenaline estimations and a pentolinium-suppression test. **Lancet**, v. 1, n. 8213, p. 174-177, 1981.

CASTILLO, E. F. et al. Alpha 1D-adrenoceptors contribute to the neurogenic vasopressor response in pithed rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 584-589, 1998.

CENA, J. J. et al. Inhibition of matrix metalloproteinase activity in vivo protects against vascular hyporeactivity in endotoxemia. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 298, n. 1, p. 45-51, 2010.

CHAN, Y. L. et al. Inhibition of vascular adenosine triphosphate-sensitive potassium channels by sympathetic tone during sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 4, p. 1261-1268, 2012.

CINEL, I., OPAL, S. M. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. **Critical Care Medicine**, v. 37, n. 1, p. 291-304, 2009.

CALZADA, C. B., DE ARTINANO A. A. Alpha-adrenoceptor subtypes. **Pharmacological Research: The Official Journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 44, n. 3, p. 195-208, 2001.

CLAPHAM, D. E., NEER, E. J. G protein beta gamma subunits. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 37, p. 167-203, 1997.

CORDER, R. et al. Effect of ganglion blockade with pentolinium on circulating neuropeptide Y levels in conscious rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 140-143, 1988.

DAVERN, P. J. et al. Role of the sympathetic nervous system in Schlager genetically hypertensive mice. **Hypertension**, v. 54, n. 4, p. 852-859, 2009.

DAY, N. P. et al. The effects of dopamine and adrenaline infusions on acid-base balance and systemic haemodynamics in severe infection. **Lancet**, v. 348, n. 9022, p. 219-223, 1996.

DE BACKER, D. et al. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 166, n. 1, p. 98-104, 2002.

DE MONTMOLLIN, E. et al. Bench-to-bedside review: Beta-adrenergic modulation in sepsis. **Critical Care**, v. 13, n. 5, p. 230-238, 2009.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 1, p. 296-327, 2008.

DUNSER, M. W., HASIBEDER, W. R. Sympathetic overstimulation during critical illness: adverse effects of adrenergic stress. **Journal of Intensive Care Medicine**, v. 24, n. 5, p. 293-316, 2009.

EDIS, A. J., SHEPHERD, J. T. Autonomic control of the peripheral vascular system. **Archives of Internal Medicine**, v. 125, n. 4, p. 716-724, 1970.

ELENKOV, I. J. et al. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 595-638, 2000.

ENGEL, C. et al. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. **Intensive Care Medicine**, v. 33, n. 4, p. 606-618, 2007.

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

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, 2006.

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, 2009.

FERRER, O. F., CASTRO, I. M., DE LA VEJA, R. L. Treatment of arterial hypertension with M & B 2050A (pentapyrrolidinium bitartrate). **Archivos Hospital Universitario General Calixto Garcia**, v. 7, n. 2, p. 113-119, 1955.

FINFER, S. et al. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. **Intensive Care Medicine**, v. 30, n. 4, p. 589-596, 2004.

FLIERL, M. A. et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. **Nature**, v. 449, n. 7163, p. 721-725, 2007.

FLIERL, M. A. et al. The complement anaphylatoxin C5a induces apoptosis in adrenomedullary cells during experimental sepsis. **PLoS One**, v. 3, n. 7, p. 2560, 2008.

FREESTONE, P. P. et al. Growth stimulation of intestinal commensal *Escherichia coli* by catecholamines: a possible contributory factor in trauma-induced sepsis. **Shock**, v. 18, n. 5, p. 465-470, 2002.

FREESTONE, P. P. et al. Involvement of enterobactin in norepinephrine-mediated iron supply from transferrin to enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 222, n. 1, p. 39-43, 2003.

FREESTONE, P. P., HAIGH, R. D., LYTE, M. Blockade of catecholamine-induced growth by adrenergic and dopaminergic receptor antagonists in *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica*. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 8, 2007.

GARCIA-SAINZ, J. A., VAZQUEZ-PRADO, J., VILLALOBOS-MOLINA, R. Alpha 1-adrenoceptors: subtypes, signaling, and roles in

health and disease. **Archives of Medical Research**, v. 30, n. 6, p. 449-458, 1999.

GARCIA-SAINZ, J. A., VAZQUEZ-PRADO, J., MEDINA, L. C. Alpha 1-adrenoceptors: function and phosphorylation. **European Journal of Pharmacology**, v. 389, n. 1, p. 1-12, 2000.

GRAHAM, R. M. et al. alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. **Circulation Research**, v. 78, n. 5, p. 737-749, 1996.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A. The Pharmacological Basis of Therapeutics. 11. ed. United States of America: McGraw Hill, 2006.

HASSER, E. M., SCHADT, J. C. Autonomic physiology. **Seminars in Veterinary Medicine and Surgery--small animal**, v. 5, n. 1, p. 12-16, 1990.

HEGINBOTHAM, L., MACKINNON, R. The aromatic binding site for tetraethylammonium ion on potassium channels. **Neuron**, v. 8, n. 3, p. 483-491, 1992.

HERNANDEZ, G. et al. Persistent Sepsis-Induced Hypotension without Hyperlactatemia: A Distinct Clinical and Physiological Profile within the Spectrum of Septic Shock. **Critical Care Research and Practice**, v. 2012, n. 536852, 2012.

HOFER, S. et al. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis. **Critical Care**, v. 13, n. 1, 2009.

HUDSON, L. D. et al. Clinical risks for development of the acute respiratory distress syndrome. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 151, n. 2 Pt 1, p. 293-301, 1995.

HUSTON J. M. et al. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, n. 7, p. 1623-1628, 2006.

HUSTON, J. M. et al. Transcutaneous vagus nerve stimulation reduces serum high mobility group box 1 levels and improves survival in murine sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 35, n. 12, p. 2762-2768, 2007.

JAFRI, S. M. et al. Left ventricular diastolic function in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 18, n. 7, p. 709-714, 1990.

JAMA, THE CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Increase in National Hospital Discharge Survey rates for septicemia -United States, 1979-1987. **JAMA : The Journal of the American Medical Association**, v. 263, n. 7, p. 937-938, 1990.

JONES, S. B., ROMANO, F. D. Dose- and time-dependent changes in plasma catecholamines in response to endotoxin in conscious rats. **Circulatory Shock**, v. 28, n. 1, p. 59-68, 1989.

KATZUNG, B.G. Farmacologia: Básica e Clínica. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

KAWAI, T., OKA, J., WATANABE, M. Hexamethonium increases the excitability of sympathetic neurons by the blockade of the Ca^{2+} -activated K^+ channels. **Life Sciences**, v. 36, n. 24, p. 2339-2346, 1985.

KILBOURN, R. G. et al. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 172, n. 3, p. 1132-1138, 1990.

KORTGEN, A., NIEDERPRUM, P., BAUER, M. Implementation of an evidence-based "standard operating procedure" and outcome in septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 34, n. 4, p. 943-949, 2006.

KRADIN R. et al. Epinephrine yields translocation of lymphocytes to the lung. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 70, n. 1, p. 1-6, 2001.

LANG, D. G., RITCHIE, A. K. Tetraethylammonium blockade of apamin-sensitive and insensitive $Ca^{2(+)}$ -activated K^+ channels in a pituitary cell line. **The Journal of physiology**, v. 425, p. 117-132, 1990.

LANGE, M. et al. Role of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel inhibition in shock states: physiology and clinical implications. **Shock**, v. 28, n. 4, p. 394-400, 2007.

LEFKOWITZ, R. J. G protein-coupled receptors. III. New roles for receptor kinases and beta-arrestins in receptor signaling and desensitization. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 30, p. 18677-18680, 1998.

LEFKOWITZ, R. J. et al. Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization and resensitization. **Advances in Pharmacology**, v. 42, p. 416-420, 1998.

LEVY, B. et al. Comparison of norepinephrine and dobutamine to epinephrine for hemodynamics, lactate metabolism, and gastric tonometric variables in septic shock: a prospective, randomized study. **Intensive Care Medicine**, v. 23, n. 3, p. 282-287, 1997.

LEVY, B. et al. Effects of epinephrine and norepinephrine on hemodynamics, oxidative metabolism, and organ energetics in endotoxemic rats. **Intensive Care Medicine**, v. 29, n. 2, p. 292-300, 2003.

LITTLEWOOD, T. J. et al. Neutropenic sepsis: management and complications. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 2, p. 185-187, 2013.

LYTE, M., ERNST, S. Catecholamine induced growth of gram negative bacteria. **Life Sciences**, v. 50, n. 3, p. 203-212, 1992.

LYTE, M., FRANK, C. D., GREEN, B. T. Production of an autoinducer of growth by norepinephrine cultured *Escherichia coli* O157:H7. **FEMS Microbiology Letters**, v. 139, n. 2-3, p. 155-159, 1996.

MANTEGAZZA, P., TYLER, C., ZAIMIS, K. The peripheral action of hexamethonium and of pentolinium. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 13, n. 4, p. 480-484, 1958.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 16, p. 1546-1554, 2003.

MATLUNG, H. L., BAKKER, E. N., VANBAVEL, E. Shear stress, reactive oxygen species, and arterial structure and function. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 7, p. 1699-1709, 2009.

McGRATH, J. C. Evidence for more than one type of post-junctional alpha-adrenoceptor. **Biochemical Pharmacology**, v. 31, n. 4, p. 467-484, 1982.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. **Immunological Reviews**, v. 173, p. 89-97, 2000a.

MEDZHITOV, R., JANEWAY, C. Innate immunity. **The New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000b.

Merx, M. W., Weber, C. Sepsis and the heart. **Circulation**, v. 116, n. 7, p. 793-802, 2007.

MITCHELL, R., CLARK, B. B. Determination of quaternary ammonium compounds including acetylcholine, tetraethylammonium, and hexamethonium. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 81, n. 1, p. 105-109, 1952.

MONCADA, S., PALMER, R. M., HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MORELLI, A. et al. Effect of heart rate control with esmolol on hemodynamic and clinical outcomes in patients with septic shock: a randomized clinical trial. **JAMA : The Journal of The American Medical Association**, v. 310, n. 16, p. 1683-1691, 2013.

MORETTI, J. L. et al. Enhanced responses to ganglion blockade do not reflect sympathetic nervous system contribution to angiotensin II-induced hypertension. **Journal of Hypertension**, v. 27, n. 9, p. 1838-1848, 2009.

MORROW, A. L., CREESE, I. Characterization of alpha 1-adrenergic receptor subtypes in rat brain: a reevaluation of [3H]WB4104 and [3H]prazosin binding. **Molecular Pharmacology**, v. 29, n. 4, p. 321-330, 1986.

MUNT, B. et al. Diastolic filling in human severe sepsis: an echocardiographic study. **Critical Care Medicine**, v. 26, n. 11, p. 1829-1833, 1998.

MURPHY, M. B. et al. The effects of pentolinium on sympathetic activity in hypertensives and normotensive controls. **International Journal of Clinical Pharmacology Research**, v. 3, n. 4, p. 227-232, 1983.

NDUKA, O. O., PARRILLO, J. E. The pathophysiology of septic shock. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 23, n. 1, p. 41-66, 2011.

NOZIK-GRAYCK E. et al. S-nitrosoglutathione inhibits alpha1-adrenergic receptor-mediated vasoconstriction and ligand binding in pulmonary artery. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 290, n. 1, p. 136-143, 2006.

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

OBERBECK, R. et al. Adrenergic modulation of survival and cellular immune functions during polymicrobial sepsis. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 4, p. 214-223, 2004.

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, 2003.

PATEL, S. S., KIMMEL, P. L., SINGH, A. New clinical practice guidelines for chronic kidney disease: a framework for K/DOQI. **Seminars in nephrology**, v. 22, n. 6, p. 449-458, 2002.

PIASCIK, M. T. et al. The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. **The**

Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 275, n. 3, p. 1583-1589, 1995.

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, 1994.

RADERMACHER, P., HUBER-LANG, M., THIEMERMANN, C. Catecholamines and the septic heart: opening Pandora's box? **Shock**, v. 39, n. 4, p. 404-405, 2013.

RANG, H.P.; DALE, M. M. *Farmacologia*. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RANGEL-FRAUSTO, M. S. Sepsis: still going strong. **Archives of Medical Research**, v. 36, n. 6, p. 672-681, 2005.

RITTIRSCH, D., FLIERL, M. A., WARD, P. A. HARMFUL MOLECULAR MECHANISMS IN SEPSIS. **Nature Reviews. Immunology**, V. 8, N. 10, P. 776-787, 2008.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 31-36, 2009.

RODRIGUEZ-GOMEZ, I. et al. Role of sympathetic tone in BSO-induced hypertension in mice. **American Journal of Hypertension**, v. 23, n. 8, p. 882-888, 2010.

RONA, G. Catecholamine cardiotoxicity. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 17, n. 4, p. 291-306, 1985.

RUDIGER, A. Beta-block the septic heart. **Critical Care Medicine**, v. 38, n. 10 Suppl, p. S608-612, 2010.

RUDIGER, A., SINGER, M. The heart in sepsis: from basic mechanisms to clinical management. **Current Vascular Pharmacology**, v. 11, n. 2, p. 187-195, 2013.

RUFFOLO, R. R. Relative agonist potency as a means of differentiating alpha-adrenoceptors and alpha-adrenergic mechanisms. **Clinical Science**, v. 68, p. 9s-14s, 1985.

RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **The New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699-1713, 2006.

SCHMIDT, H. et al. Autonomic dysfunction predicts mortality in patients with multiple organ dysfunction syndrome of different age groups. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 9, p. 1994-2002, 2005.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v. 8, n. 4, p. R251-260, 2004.

SORDI, R., FERNANDES, D., ASSREUY, J. Differential involvement of potassium channel subtypes in early and late sepsis-induced hyporesponsiveness to vasoconstrictors. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 184-189, 2010.

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

SPENGLER, R. N. et al. Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 5, p. 1430-1434, 1990.

STERNBERG, E. M. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 4, p. 318-328, 2006.

STRAUB, R. H. et al. A bacteria-induced switch of sympathetic effector mechanisms augments local inhibition of TNF-alpha and IL-6 secretion in the spleen. **FASEB Journal : Official Publication of The Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 14, n. 10, p. 1380-1388, 2000.

SU, G. et al. Effective treatment of mouse sepsis with an inhibitory antibody targeting integrin alphavbeta5. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 2, p. 546-553, 2013.

SUZUKI, T. et al. Infusion of the beta-adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 10, p. 2294-2301, 2005.

SZABO, C., SOUTHAN, G. J., THIEMERMANN, C. Beneficial effects and improved survival in rodent models of septic shock with S-methylisothiurea sulfate, a potent and selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 26, p. 12472-12476, 1994.

TAHERI, P. et al. Autonomic control of the regional hemodynamic response to scald. **Life Sciences**, v. 56, n. 9, p. 701-707, 1995.

TANOUE, A. et al. The alpha(1D)-adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 6, p. 765-775, 2002.

THOMAS, L. Germs. **The New England Journal of Medicine**, v. 287, n. 11, p. 553-555, 1972.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

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 Pt 1, p. 1638-1645, 1993.

VANDERLEI, L. C. M. et al. Noções básicas de variabilidade da frequência cardíaca e sua aplicabilidade clínica. **Revista Brasileira de Circulação Cardiovascular**, v. 24, n. 1, p. 205 - 217, 2009.

VILLALOBOS-MOLINA, R., IBARRA, M. Alpha 1-adrenoceptors mediating contraction in arteries of normotensive and spontaneously hypertensive rats are of the alpha 1D or alpha 1A subtypes. **European Journal of Pharmacology**, v. 298, n. 3, p. 257-263, 1996.

WANG, H. et al. Nicotinic acetylcholine receptor alpha7 subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**, v. 421, n. 6921, p. 384-388, 2003.

WANG, H. et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. **Nature Medicine**, v. 10, n. 11, p. 1216-1221, 2004a.

WANG, K. et al.. Regulation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor by SRC family tyrosine kinases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 10, p. 8779-8786, 2004b.

WEIGHT, F. F. et al. Long-lasting synaptic potentials and the modulation of synaptic transmission. **Federation Proceedings**, v. 38, n. 7, p. 2084-2094, 1979.

WIEN, R., MASON, D. F. Pharmacology of M. & B. 2050. **Lancet**, v. 1, n. 6758, p. 454-455, 1953.

WONG, B. S., ADLER, M. Tetraethylammonium blockade of calcium-activated potassium channels in clonal anterior pituitary cells. **European Journal of Physiology**, v. 407, n. 3, p. 279-284, 1986.

WORTSMAN, J., FRANK, S., CRYER, P. E. Adrenomedullary response to maximal stress in humans. **The American Journal of Medicine**, v. 77, n. 5, p. 779-784, 1984.

YANG, S. et al. Norepinephrine-induced hepatocellular dysfunction in early sepsis is mediated by activation of alpha2-adrenoceptors. **American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 281, n. 4, p. G1014-1021, 2001.

ZHOU, L., VARGAS, H. M. Vascular alpha 1D-adrenoceptors have a role in the pressor response to phenylephrine in the pithed rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 305, n. 1-3, p. 173-176, 1996.

ZILLES, K. et al. Regional and laminar distributions of alpha 1-adrenoceptors and their subtypes in human and rat hippocampus. **Neuroscience**, v. 40, n. 2, p. 307-320, 1991.