

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

Thiele Osvaldt Rosales

**ENVOLVIMENTO DA CINASE DE RECEPTOR ACOPLADO À
PROTEÍNA G 2 (GRK2) E DO RECEPTOR α_1 ADRENÉRGICO
RENAL NA SEPSE: UM MECANISMO PARA FALÊNCIA
RENAL?**

Florianópolis

2017

Thiele Osvaldt Rosales

**ENVOLVIMENTO DA CINASE DE RECEPTOR ACOPLADO À
PROTEÍNA G 2 (GRK2) E DO RECEPTOR α_1 ADRENÉRGICO
RENAL NA SEPSE: UM MECANISMO PARA FALÊNCIA
RENAL?**

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

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy
Co-orientadora: Dra. Verônica
Vargas Horewicz

Florianópolis

2017

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

Rosales, Thiele Osvaldt

Envolvimento da cinase de receptor acoplado à
proteína G 2 (GRK2) e do receptor al adrenérgico
renal na sepse: um mecanismo para falência renal? /
Thiele Osvaldt Rosales ; orientador, Jamil
Assreuy; coorientadora, Verônica Vargas Horewicz -
SC, 2017.
110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, , Programa de Pós-Graduação em ,
Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

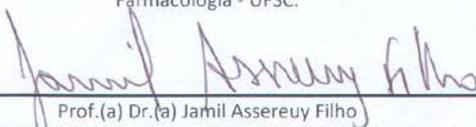
1. . 2. Sepse. 3. Disfunção renal . 4. GRK2. 5.
Óxido nítrico. I. Assreuy, Jamil. II. Horewicz,
Verônica Vargas. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em . IV. Título.

"Envolvimento da cinase de receptor acoplado à proteína G 2 (GRK2) e do receptor α 1 adrenérgico renal na sepse: um mecanismo para falência renal?"

Por

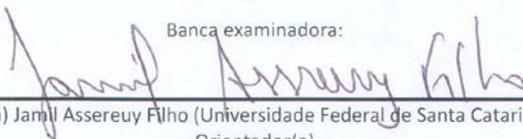
Thiele Osvaldt Rosales

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (09/PPGFMC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia - UFSC.

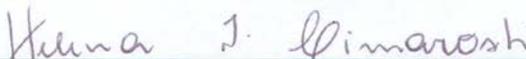


Prof. (a) Dr. (a) Jamil Assereuy Filho
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

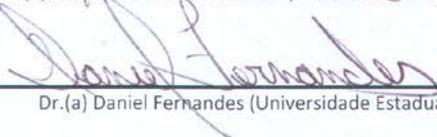
Banca examinadora:



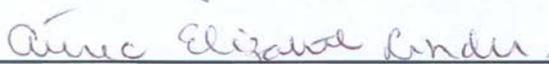
Dr. (a) Jamil Assereuy Filho (Universidade Federal de Santa Catarina)
Orientador(a)



Dr. (a) Helena Iturvides Cimarosti (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr. (a) Daniel Fernandes (Universidade Estadual de Ponta Grossa)



Dr. (a) Aurea Elizabeth Linder (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 22 de fevereiro de 2017.

Aos meus pais, Sergio e Darce, pelo amor incondicional, pelo incentivo recebido em todos esses anos de estudo e por proporcionarem essa conquista.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Sergio e Darce, por todo amor, por todo carinho, por sempre terem me incentivado a correr atrás dos meus sonhos e permitirem que isso fosse possível. Vocês são meus maiores exemplos! Amo muito vocês!

Aos meus irmãos, Thiécila e Gabriel, por todo carinho, por sempre estarem presentes na minha vida, por sempre me ajudarem e me orientarem! Amo vocês! Vocês são essenciais para mim!

Aos sobrinhos mais lindos e mais amados que alguém poderia ter, João Pedro e Ana Paula. Obrigada por trazerem alegria e bagunça para minha vida!

Ao meu namorado Bruno, pelo amor, companheirismo, compreensão nas horas de desânimo, ajuda nos finais de semana de experimentos e, principalmente, por todo chocolate fornecido durante os períodos de estresse! Obrigada por estar comigo e me apoiar! Amo você!

Ao meu orientador, Jamil, por toda confiança em mim depositada, orientação, paciência e disposição. Obrigada por todo o conhecimento passado, não apenas científico, mas de vida. Obrigada por todas as boas conversas no laboratório e por enriquecer essa jornada.

À minha co-orientadora, Vê, por toda ajuda, incentivo, paciência, apoio e por pegar no pé! Obrigada por todas as horas boas! Obrigada pela amizade construída nesse caminho e por estar sempre presente!

À Elaine, Duda e Ari por fazerem parte da minha vida, pelo apoio e por me trazerem alegria.

À minha dinda, Leonir, pelo amor e por me ajudar em momentos difíceis. Obrigada por ser minha segunda mãe!

Às minhas princesas Julia e Bela por serem tão lindas e tão maravilhosas! Vocês são muito especiais na minha vida!

À Adri, pelo exemplo de vida, por todo suporte e por toda ajuda no laboratório, principalmente no preparo de amostras! Obrigada por todas

as risadas, por tornar o dia-a-dia mais animado e por todos os bons momentos compartilhados!

À Maíra Bicca, por ser esse anjo que surgiu no meu caminho, por me ensinar e me ajudar! Obrigada pela inspiração e por compartilhar o seu amor pela ciência! Você é incrível!

Às minhas irmãs de coração, Paulinha, Ana Clara, Ana Julia e Kailla. Obrigada pela amizade e por entenderem os momentos de ausência. Obrigada por estarem presentes na minha vida e mostrarem que a distância não é capaz de diminuir o carinho e o apoio de cada uma!

Ao Ruy, pela amizade e pela ajuda na técnica de reatividade vascular renal.

À Jaine, pela ajuda no laboratório, pelas boas risadas e danças (risos)!

Aos amigos do NOlab e do LabCARDIO e a todos os demais colegas que a pós-graduação me presenteou.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Farmacologia, pela contribuição na minha formação e por disponibilizarem os seus laboratórios para os eventuais auxílios e empréstimos de materiais.

Aos funcionários do Lameb, que sempre foram muito solícitos e compartilharam momentos de frustração e de alegria.

Aos professores, Daniel Fernandes, Aurea Elizabeth Linder e Helena Cimarosti por aceitarem avaliar este trabalho de conclusão de mestrado.

Aos demais amigos e familiares que torceram por mim.

A todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para que eu chegasse até aqui e que estiveram ao meu lado.

Às agências de financiamento CNPq, CAPES e FAPESC pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

“Science never solves a problem
without creating ten more.”
George Bernard Shaw

RESUMO

Sepse é uma condição médica grave causada por uma ativação exacerbada do sistema imune em resposta à infecção. A sepsé é uma das principais causas de mortalidade e representa um grande desafio em unidades de terapia intensiva (UTIs). Sabe-se que a fisiopatologia da sepsé é caracterizada por hipotensão, vasodilatação, diminuição da resistência vascular, hiporreatividade a agentes vasoconstritores e que o NO é um importante mediador na disfunção cardiovascular. Em contraste, a vasculatura renal é marcada por vasoconstrição durante a sepsé. Cínases de receptores acoplados a proteína G (GRKs) fosforilam diversos receptores acoplados à proteína G (GPCRs), incluindo os receptores adrenérgicos, resultando na internalização destes. Dados prévios do laboratório demonstraram que a hiporreatividade às catecolaminas está associada com uma diminuição na densidade de receptores α e β na aorta e no coração, respectivamente, bem como à um aumento nos níveis de GRK2 e que o NO contribui para o aumento desta cinase na sepsé. Considerando a oposição da vasculatura renal com a circulação sistêmica o objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da GRK2 e investigar se há participação do NO (em termos de expressão de NOS-2) nessa regulação no rim de camundongos submetidos a sepsé pelo modelo de CLP. Nossos resultados mostram que a sepsé diminui substancialmente os níveis de GRK2 e aumenta a densidade de receptores α_1 adrenérgicos no tecido renal. Além disso, ocorreu aumento da expressão de NOS-2 renal. A inibição da NOS-2 com aminoguanidina evitou a queda do conteúdo de GRK2, enquanto o tratamento com doador NO reduziu substancialmente a GRK2 renal em animais com sepsé. Os achados sugerem que a falência renal na sepsé abrange um mecanismo com regulação negativa de GRK2 renal com consequente aumento na densidade de receptores α_1 adrenérgicos e que o NO parece estar envolvido nessa disfunção.

Palavras-chave: sepsé; disfunção renal; GRK2; receptor α_1 adrenérgico; óxido nítrico

ABSTRACT

Sepsis is a serious medical condition caused by an overwhelming immune response to infection. Sepsis is a major challenge in the intensive care unit, where it's one of the leading causes of death. Pathophysiology of sepsis is characterized by hypotension, vasodilatation, decrease systemic vascular resistance, impaired vascular reactivity to vasoconstrictors, being nitric oxide (NO) a prominent player in all these findings. In contrast, a renal vasculature is marked by vasoconstriction during sepsis. G protein-coupled receptor kinases (GRKs) phosphorylate several G protein-coupled receptors (GPCRs), including the adrenergic receptors, which results in their labeling for internalization. Previous data of our laboratory show that sepsis activates GRK in the aorta and heart, leading to the decrease in alpha-1 and beta adrenergic receptor density. Considering the opposite vascular status between the kidney and the systemic circulation during sepsis the present study aimed to evaluate the expression of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2), and the putative role of NO (in terms of NOS-2 expression) in renal tissue in sepsis induced by CLP model in mice. Our results show that sepsis decreases GRK2 levels and increases α_1 adrenergic receptors density contributing to a renal vasoconstrictor response. Sepsis induced increased NOS-2 expression in renal tissue. Inhibition of NOS-2 with aminoguanidine prevented a decrease in GRK2 level, whereas treatment with NO donor substantially reduce renal GRK2 in septic animals. The findings suggest that renal failure in sepsis includes a mechanism of negative regulation of GRK2 in kidney with consequent increase of α_1 adrenergic receptors density and that NO appears to be involved in this dysfunction.

Keywords: sepsis; renal dysfunction; GRK2; α_1 adrenergic receptor; nitric oxide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Vasoconstricção renal induzida no choque séptico.....	32
Figura 2 – Mecanismo de sinalização dos receptores α_1 adrenérgicos....	42
Figura 3 – Mecanismo de dessensibilização de GPCR através da GRK....	45
Figura 4 – Curva de sobrevivência após a cirurgia de CLP.....	61
Figura 5 – Dosagem plasmática de AST e ALT em camundongos submetidos a sepse polimicrobiana.....	62
Figura 6 – Dosagem plasmática de creatinina e ureia em camundongos submetidos a sepse polimicrobiana.....	63
Figura 7 – Resposta máxima à fenilefrina na vasculatura renal em camundongos submetidos a sepse polimicrobiana	64
Figura 8 – Avaliação temporal do nível de GRK2 em tecido renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana.....	65
Figura 9 – Análise dos níveis de GRK2 em tecido renal de camundongos sépticos.....	66
Figura 10 – Análise do nível de GRK2 no coração de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana	67
Figura 11 – Análise do nível de GRK2 no pulmão de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana	68
Figura 12 – Análise dos níveis de GRK2 no fígado de camundongos sépticos.....	69
Figura 13 – Análise da expressão de NOS-2 no rim de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana	70
Figura 14 – Mensuração de nitrito e nitrato (NOx) no plasma de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana	71
Figura 15 – Efeito do tratamento com 1400W nos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato (NOx) de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana.....	72
Figura 16 – Efeito do tratamento com 1400W na expressão de NOS-2 em tecido renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana.....	73
Figura 17 – Efeito do tratamento com 1400W no conteúdo de GRK2 em tecido renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana.....	74
Figura 18 – Efeito do tratamento com aminoguanidina no conteúdo de GRK2 renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana.....	70
Figura 19 – Efeito do tratamento com SNAP no conteúdo de GRK2 renal.....	77
Figura 20 – Análise por imunofluorescência do conteúdo renal de GRK2 em animais submetidos a sepse polimicrobiana	79

Figura 21 – Avaliação da distribuição de GRK2 no tecido renal em camundongos naive e sépticos.....	81
Figura 22 – Efeito do tratamento com SNAP no conteúdo de GRK2 em células HEK293 e MDCK.....	82
Figura 23 – Seletividade do composto QAPB para receptores α_1 adrenérgicos em rim de camundongos.....	83
Figura 24 – Densidade de receptores α_1 adrenérgicos em rim de camundongos sépticos.....	85
Figura 25 – Densidade de receptores α_1 adrenérgicos no fígado de camundongos sépticos.....	86
Figura 26 – Modulação de GRK2 cardíaca e renal na sepse.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Avaliação sequencial de falência de órgãos – SOFA 26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AF** – autofluorescência
AG – aminoguanidina
ALT – alaninaaminotransferase
AMpC – monofosfato cíclico de adenosina
AST – aspartatoaminotransferase
ATCC – coleção de micro-organismos norte americana (do inglês, *American Type Culture Collection*)
BSA – soro de albumina bovino (do inglês; *Bovine Serum Albumin*)
CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais
CLP – ligadura e perfuração do ceco
CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
DAG – diacilglicerol
DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol
DMEM – meio eagle modificado por Dulbecco (do inglês; *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*)
E. P. M. – erro padrão da média
GCs – guanilato ciclase solúvel
GMpC – guanosina monofosfato cíclico
GPCR – receptores acoplados a proteína G (do inglês; *G Protein-Coupled Receptor*)
GRK – Cinase de receptor acoplado a proteína G (do inglês, *G Protein-Coupled Receptor Kinase*)
GTP – guanosinatrifosfato
HEK – células embrionárias de rim humano
HONO₂ – peroxinitroso
i.p. – intraperitoneal
IP₃ – inositoltrifosfato
LPS – lipopolissacarideo
LRA – lesão renal aguda
MAPK – proteína cinase ativada por mitógenos
MDCK – células Madin-Darby de rim de cachorro
MLC – cadeia leve de miosina
MLCK – miosina de cadeia leve cinase (do inglês, *Myosin Light Chain Kinase*)
N₂O₃ – trióxido de dinitrogênio
N₂O₄ – tetróxido de dinitrogênio
NaCl – cloreto de sódio
NO – óxido nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*)

NO₂ – dióxido de nitrogênio
NOS – óxido nítrico sintase
NO_x – nitrato + nitrito
O₂⁻ – ânion superóxido
ONO₂⁻ – ânion peroxinitrito
PAMPs – (do inglês, *Pathogen-associated Molecular Patterns*)
PBS – tampão fosfato (do inglês, *Phosphate Buffered Solution*)
PDE – fosfodiesterase
PDGFR β – fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, *Platelet-derived Growth Factor Receptor- β*)
PFA – formaldeído tamponado
PKA – proteína cinase A
PKC – proteína cinase C
PKG – proteína cinase dependente de GMPc
PLC – fosfolipase C
PNF – prazosinã não fluorescente
PPVR – pressão de perfusão renal
QAPB – BODIPY[®] FL prazosina
RKIP – cinase Raf (do inglês, *Raf kinase inhibitory protein*)
SRAA – sistema renina-angiotensina-aldosterona
s.c. – subcutânea
SDS – dodecil sulfato de sódio (do inglês; *SodiumDodecyl Sulfate*)
SNAP – S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina
SNOs – S-nitrosotióis
SOFA – avaliação sequencial de falência de órgãos (o inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*)
TBS – solução salina tamponada com Tris (do inglês; *Tris-buffered Saline*)
TBS-T – solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 80 0,5 % (do inglês; *Tris-buffered Saline Tween*)
TLR – receptor Toll-like (do inglês, *Toll-like Receptor*)
UFC – unidade formadora de colônia
UI – unidades internacionais
VEIC – veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	SEPSE	25
1.1.1	Aspectos gerais.....	25
1.1.2	Epidemiologia	26
1.1.3	Fisiopatologia	28
1.1.4	Disfunção renal.....	29
1.2	ÓXIDO NÍTRICO	33
1.2.1	Biossíntese e bioquímica do Óxido Nítrico	33
1.2.2	O Óxido Nítrico e a seps.....	36
1.2.3	Reatividade vascular	37
1.3	RECEPTOR α_1 ADRENÉRGICO	41
1.4	CINASE DE RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G 2 (GRK2)	43
1.5	HIPÓTESE DO TRABALHO	48
2	OBJETIVOS	49
2.1	OBJETIVO GERAL.....	49
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	49
3	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1	ANIMAIS	51
3.2	MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POLIMICROBIANA POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP)	51
3.3	MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POR PNEUMONIA	51
3.4	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DOS ANIMAIS APÓS CLP	52
3.5	ANÁLISES BIOQUÍMICAS	52
3.5.1	Determinação dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO _x)	52
3.5.2	Dosagem plasmática de creatinina e ureia	53
3.5.3	Dosagem plasmática de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....	53
3.6	AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR RENAL À FENILEFRINA	54
3.7	ANÁLISES MOLECULARES	54
3.7.1	Western blot.....	54
3.7.1.1	Protocolos experimentais.....	54
3.7.1.2	Preparo de amostras.....	55
3.7.1.3	Separação de proteínas e imunodeteção.....	55
3.7.2	Ensaio de ligação de receptor α_1 adrenérgico	56
3.7.3	Imunofluorescência	58

3.7.4	Cultura celular	58
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
4	RESULTADOS.....	61
4.1	AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA APÓS A CIRURGIA DE CLP	61
4.2	ANÁLISE DO DANO DE ÓRGÃOS.....	62
4.2.1	Mensuração dos níveis de ALT e AST.....	62
4.2.2	Mensuração dos níveis de creatinina e ureia	62
4.3	REATIVIDADE VASCULAR RENAL À FENILEFRINA NA SEPSE	63
4.4	AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GRK2 NA SEPSE	64
4.4.1	Avaliação temporal do nível de GRK2 renal no modelo de sepsis por CLP.....	64
4.4.2	Análise dos níveis de GRK2 renal em dois modelos de sepsis	66
4.4.3	Análise do nível de GRK2 no coração	66
4.4.4	Análise do nível de GRK2 no pulmão.....	68
4.4.5	Análise dos níveis de GRK2 no fígado em dois modelos de sepsis	69
4.5	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE NOS-2.....	70
4.6	MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITO E NITRATO (NO _x)	71
4.7	AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM INIBIDOR DA NOS	72
4.7.1	Efeito do tratamento com 1400W nos níveis de NO_x.....	72
4.7.2	Efeito do tratamento com 1400W na expressão de NOS-2	73
4.7.3	Efeito do tratamento com 1400W no conteúdo de GRK2 renal	74
4.7.4	Efeito do tratamento com Aminoguanidina no conteúdo de GRK2 renal.....	75
4.8	EFEITO DO TRATAMENTO COM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A GRK2 RENAL	77
4.9	ANÁLISE DE GRK2 RENAL POR IMUNOFLOUORESCÊNCIA	78
4.10	ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GRK2 EM EPITÉLIO RENAL ...	81
4.11	AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTORES α_1 ADRENÉRGICOS.....	82
5	DISCUSSÃO.....	87
6	CONCLUSÃO	93
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

1.1.1 Aspectos gerais

Sepse é uma palavra de origem grega que significa putrefação. O termo sepsé foi instituído por Hipócrates no século IV a.C. para definir o processo de decomposição de matéria orgânica e desde o final do século XIX tem sido usado para definir um estado grave de toxicidade sistêmica associada à uma infecção (PETTIGREW, 2014). Atualmente, a sepsé é definida como uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta imune desregulada frente a uma infecção (SINGER *et al.*, 2016).

Na prática clínica, a disfunção orgânica é identificada através da pontuação SOFA (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*), onde um aumento agudo de dois pontos ou mais caracteriza o quadro séptico. Os critérios SOFA (Tabela 1) têm como objetivo especificar o diagnóstico de sepsé e quantificar a gravidade da doença com base no grau de disfunção orgânica ao longo do tempo e uma pontuação alta está associada com um aumento na probabilidade de mortalidade (SINGER *et al.*, 2016).

Entretanto, a pontuação SOFA requer diversos testes laboratoriais e pode não estar disponível em tempo hábil. Além disso, países com poucos recursos não possuem condições necessárias para que a avaliação seja realizada. Desta forma, desenvolveu-se o *quickSOFA* (qSOFA) que não utiliza variáveis laboratoriais e permite uma triagem dos pacientes que correm o risco de desenvolver a sepsé, tornando essa ferramenta útil à beira do leito. Os critérios utilizados no qSOFA são: pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg, frequência respiratória maior que 22/min e rebaixamento do nível de consciência (Escala de coma de Glasgow < 15). Se pelo menos duas variáveis forem encontradas, recomenda-se a utilização do SOFA e há indício de mortalidade ou permanência prolongada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (SEYMOUR *et al.*, 2016; SHANKAR-HARI *et al.*, 2016; SINGER *et al.*, 2016).

Tabela 1. Avaliação sequencial de falência de órgãos – SOFA

Sistema	Pontuação				
	0	1	2	3	4
Respiração PaO ₂ /FIO ₂ (mm Hg) SaO ₂ /FIO ₂	> 400	< 400 221 - 301	< 300 142 - 220	< 200 67 - 141	< 100 <67
Coagulação Plaquetas x10 ³ /mm ³	> 150	< 150	< 100	< 50	< 20
Fígado Bilirrubina (mg/dL)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 5.9	6.0 – 11.9	> 12.0
Cardiovascular Hipotensão	Sem hipotensão (PAM ≥70 mm Hg)	PAM < 70 mm Hg	Dopamina ≤ 5 ou dobutamina (qualquer dose) ^a	Dopamina > 5 ou norepinefrina ≤ 0.1 ^a	Dopamina > 5 ou norepinefrina > 0.1 ^a
SNC Escala de coma de Glasgow ^b	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
Renal Creatinina (mg/dL) ou débito urinário (mg/dL)	< 1.2	1.2 – 1.9	2.0 – 3.4	3.5 – 4.9 ou < 500	> 5.0 ou < 200

Abreviações: PaO₂, pressão arterial de oxigênio; FIO₂, fração inspirada de oxigênio; SaO₂, saturação arterial de oxigênio; PAM, pressão arterial média; SNC, sistema nervoso central.

^aDoses de catecolaminas dadas em µg/Kg/min por pelo menos 1 h.

^bEscala de coma de Glasgow: pontuação de 3 a 15; alta pontuação indica melhor função neurológica

Adaptada de (SINGER *et al.*, 2016).

Nesse contexto, o choque séptico é a evolução do quadro de sepse acompanhado por anormalidades circulatória e celulares/metabólicas que aumentam substancialmente a mortalidade. De acordo com os critérios clínicos, o choque séptico é definido como a presença de hipotensão com necessidade de vasopressores para manter pressão arterial média ≥ 65 mmHg associada a lactato plasmático ≥ 2 mmol/L, após reposição volêmica (SINGER *et al.*, 2016).

1.1.2 Epidemiologia

O quadro séptico é decorrente de uma infecção, seja por bactérias, fungos, vírus ou protozoários e vem adquirindo uma crescente importância devido ao aumento de sua incidência (NDUKA; PARRILLO, 2009).

Há cerca de 30 anos, a mortalidade do choque séptico era maior que 80%. Entretanto, com a monitorização e o suporte intensivos, o

diagnóstico e tratamento precoces, esse número decaiu para 20-30% em países desenvolvidos (KUMAR *et al.*, 2011). É importante ressaltar que, apesar dos ensaios clínicos já realizados, nenhuma nova intervenção terapêutica foi bem sucedida e o tratamento continua fundamentado em suporte hemodinâmico, terapia antimicrobiana e remoção do foco infeccioso quando possível (ANGUS, 2011; COHEN, 2002; WENZEL; EDMOND, 2012; WILLIAMS, 2012).

A sepse é uma das principais causas de mortalidade e estima-se que ocorram cerca de 17 milhões de casos anualmente em todo o mundo (ADHIKARI *et al.*, 2010). Nos Estados Unidos, a sepse resulta na morte de 250.000 a 375.000 pessoas a cada ano e a estimativa para 2020 é de mais de 1 milhão de casos (GAIESKI *et al.*, 2013; O'BRIEN *et al.*, 2007). Em UTIs não cardiológicas, a sepse é a principal causa de mortalidade e apresenta elevadas taxas de letalidade (SOGAYAR *et al.*, 2008). Na Austrália, a incidência anual de sepse na população adulta tratada em UTIs é estimada em 0,77/1000, o que corresponde a 15700 novos casos (FINFER *et al.*, 2004).

No Brasil, os dados disponíveis mostram alta taxa de letalidade, principalmente em hospitais públicos vinculados ao Sistema Único de Saúde (SUS). Em 2010, Kauss e colaboradores identificaram que entre os 1179 pacientes admitidos em UTIs de hospitais públicos, 554 (47%) estavam com sepse. Um estudo de prevalência realizado em cerca de 230 UTIs brasileiras, aleatoriamente selecionadas e representativas das condições do país, apontou que 30% dos leitos estão ocupados com pacientes sépticos a cada dia (SALES *et al.*, 2006; SOGAYAR *et al.*, 2008).

Em relação as infecções mais comumente causadoras de sepse, pode-se citar as pneumonias, infecções abdominais, urinárias, de pele e sanguíneas. Ainda, são frequentes infecções relacionadas a cateteres, abscessos de partes moles, meningites, endocardites, entre outros (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

Os agentes etiológicos mais frequentes são as bactérias, seguidas dos fungos. De acordo com o registro internacional de sepse, entre os 12881 casos registrados, as infecções por bactérias gram-negativas são as mais comuns (41,4%), seguidas das gram-positivas (32,4%), das infecções fúngicas (8,7%) e virais (1,3%) (BEALE *et al.*, 2009)

Os achados laboratoriais mostram que o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus pneumoniae* são as bactérias gram-positivas prevalentes, enquanto que as gram-negativas mais isoladas são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. As espécies de

Candida são as principais causadoras das infecções fúngicas, as quais têm demonstrado crescimento nos casos de sepse (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

Os fatores determinantes para a letalidade ainda não estão totalmente compreendidos. Sabe-se que além do perfil do agente agressor, características ligadas ao paciente são importantes. A presença de imunossupressão decorrente de neoplasias, infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida ou uso de imunossupressores são fatores clássicos. Além disso, características genéticas do paciente que estão associadas à modulação da resposta imune e às oportunidades de intervenções terapêuticas também são fatores determinantes (ANGUS; WAX, 2001; ANGUS; VAN DER POLL, 2013). Idade, sexo e raça são outros fatores relevantes na incidência do quadro séptico, onde a maior ocorrência é em bebês e idosos, homens e na população negra (ANGUS *et al.*, 2001; MAYR *et al.*, 2010).

1.1.3 Fisiopatologia

A sepse decorre de uma interação entre o micro-organismo e os mecanismos de defesa do hospedeiro (HOTCHKISS; KARL, 2003). A resposta imune inata é a responsável pelo processo inflamatório inicial da sepse e é mediada por receptores de reconhecimento, como os receptores *Toll-like* (TLR) e o CD14, que reconhecem os patógenos ou seus produtos, os quais são coletivamente chamados de PAMPs (do inglês, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) (SALVADOR *et al.*, 2016).

Uma vez que ocorra o reconhecimento de PAMPs, uma cascata de eventos intracelulares é desencadeada, promovendo 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). Ocorre aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase (NOS; do inglês *Nitric Oxide Synthase*), levando a geração de óxido nítrico (NO; do inglês, *Nitric Oxide*) e produção dos metabólitos do ácido araquidônico, como as prostaglandinas e os leucotrienos (O'BRIEN *et al.*, 2007). As citocinas pró-inflamatórias são liberadas na circulação sanguínea levando a ativação de células, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais. Vários outros sistemas compostos de proteínas plasmáticas, como complemento, coagulação e sistema fibrinolítico, também são ativados. Admite-se que a excessiva ativação do sistema complemento estimule a destruição tecidual na sepse e que a ativação do sistema de coagulação

(via intrínseca e extrínseca) acarrete depósitos intravasculares de fibrina, trombose, coagulação intravascular disseminada e diminuição dos níveis de antitrombina e proteínas C e S (ARRIETA; RODRIGUEZ-REYNA; SOTELO, 2000; DELLINGER *et al.*, 2004). Portanto, o equilíbrio entre as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias é fundamental na recuperação do paciente e um desequilíbrio entre esses mecanismos resulta em disfunções orgânicas (SOGAYAR *et al.*, 2008).

As manifestações clínicas da sepse são variáveis e dependem do foco inicial da doença, do agente etiológico, do estado de saúde do paciente e, ainda, das intervenções terapêuticas iniciais. Entretanto, a falência dos sistemas respiratório e cardiovascular é frequente e são observadas alterações celulares e hemodinâmicas, tanto na circulação sistêmica como na microcirculação. Em relação as alterações circulatórias, observa-se vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar, contribuindo para um quadro de hipovolemia relativa, hipotensão e depressão miocárdica. Além disso, sabe-se que ocorre uma diminuição da resposta sistêmica a agentes vasoconstritores, resultando em hipotensão refratária. Do ponto de vista micro circulatório, há heterogeneidade de fluxo com redução da densidade capilar, trombose, edema intersticial e alterações reológicas no sangue. Desta forma, esses fatores contribuem para a redução da oferta tecidual de oxigênio e, conseqüentemente, para o desequilíbrio entre oferta e consumo de oxigênio, resultando no aumento do metabolismo anaeróbico e hiperlactatemia. Ainda, fenômenos celulares de apoptose e hipóxia citopática contribuem para a disfunção leve ou total do órgão (LUSH; KVIETYS, 2000; MIRANDA *et al.*, 2016). Sabe-se que o risco de mortalidade da sepse aumenta de acordo com o número de órgãos acometidos e esse risco duplica quando há falência renal (FERREIRA *et al.*, 2001; OPPERT *et al.*, 2008).

1.1.4 Disfunção renal

A lesão renal aguda (LRA) é uma das complicações mais frequentes e graves em pacientes sépticos e aumenta substancialmente o risco de morte. A sepse induz insuficiência renal em 30 a 60% dos pacientes, dos quais pelo menos metade, necessita de diálise. A LRA em pacientes sépticos indica um mau prognóstico, com taxas de mortalidade de 80% (TAKASU *et al.*, 2013; ZARJOU; AGARWAL, 2011). Uma vez que o débito urinário normal é comprometido, desenvolve-se rapidamente

uma sobrecarga líquida que leva a um aumento do líquido extravascular nos pulmões com piora considerável nas trocas gasosas (AWAD, 2003).

A LRA é caracterizada por uma falha aguda dos rins em filtrar o sangue adequadamente, regular o balanço de água e de íons e gerar urina. Embora exista terapia de suporte para o tratamento da sepse associada à LRA, os mecanismos subjacentes ainda não são compreendidos (ERGIN *et al.*, 2015). Acredita-se que na sepse a fisiopatologia da LRA envolve um mecanismo complexo, englobando componentes de lesão de isquemia e reperfusão, lesão inflamatória direta, disfunção da coagulação e de células endoteliais e apoptose. Sabe-se que o grau de apoptose, necrose ou autofagia, contribui para a disfunção renal. (PELTE; CHAWLA, 2009; TAKASU *et al.*, 2013).

Os rins recebem grande porção do débito cardíaco e filtram grandes volumes de plasma a cada hora. Desta forma, os túbulos renais de pacientes sépticos são expostos continuamente a PAMPs, espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, citocinas e outros fatores produzidos em resposta a infecção. No entanto, apesar da perda de função, comumente observada na sepse, evidências histológicas mostram que as lesões celulares são escassas (MÅRTENSSON; BELLOMO, 2015).

Entre as principais consequências da ação dos mediadores inflamatórios no tecido renal, estão as lesões de células glomerulares e tubulares e a produção, proliferação e migração de fibroblastos, levando ao acúmulo da matriz extracelular, fibrose e, conseqüentemente, perda de néfrons (DINIZ, 2011).

Desde o início da sepse, a hipoperfusão tecidual e a lesão inflamatória resultam em um dano isquêmico e disfunção tubular renal. A ressuscitação clínica inicial, com restauração da volemia e uso de drogas vasoativas, pode reverter o processo e evitar a necrose tubular aguda (ALBAIDI *et al.*, 2015).

Muitos estudos indicam que a LRA induzida na sepse é iniciada pela disfunção da microcirculação renal (SCHRIER; WANG, 2004; TAKASU *et al.*, 2013). A disfunção microvascular renal pode limitar a oxigenação necessária para a produção de ATP, prejudicando a função da bomba Na^+/K^+ ATPase e causar um desbalanço iônico celular (ERGIN *et al.*, 2015).

A disfunção cardiovascular que ocorre durante a sepse influencia na função renal, gerando hipoperfusão glomerular induzida por vasodilatação e desregulação da circulação na rede capilar peritubular. Também, ocorrem reações inflamatórias por citocinas sistêmicas ou de

produção local e disfunção tubular devido ao estresse oxidativo. Todos esses efeitos afetam a microcirculação renal e a disponibilidade de oxigênio nas células renais (ERGIN *et al.*, 2015). Além disso, a fisiopatologia da LRA caracteriza-se por apoptose e necrose, extravasamento capilar, trombose, oligúria, disfunção endotelial e diminuição no tônus vascular durante o quadro de sepse (ZARJOU; AGARWAL, 2011).

No que se refere ao papel do NO, sugere-se que a queda substancial do ritmo de filtração glomerular após a administração de LPS decorre do efeito inibitório do NO produzido pela NOS-2 sobre a atividade da NOS-3, levando à vasoconstrição (SCHWARTZ; BLANTZ, 1999).

Adicionalmente, em contraste com os demais órgãos, a NOS-2 é expressa constitutivamente nas células do túbulo renal e contribui para as mudanças hemodinâmicas e para a redução da filtração glomerular subsequentes durante o choque séptico. Entretanto, a excessiva produção de espécies reativas de nitrogênio induz ao estresse nitrosativo, resultando em disfunção do fluxo sanguíneo e da resposta arterial, comprometimento da circulação sanguínea nos capilares e danos na função celular (ERGIN *et al.*, 2015).

Ainda, em resposta a alta produção de NO e ao quadro de vasodilatação, alguns mecanismos fisiológicos são ativados a fim de controlar a pressão arterial. Como resultado da depleção do volume arterial, os barorreceptores são sensibilizados e aumentam a atividade simpática e a produção de angiotensina e de arginina-vasopressina, resultando em uma vasoconstrição renal, diminuição da taxa de filtração glomerular e retenção de água (Figura 1) (SCHRIER; WANG, 2004).

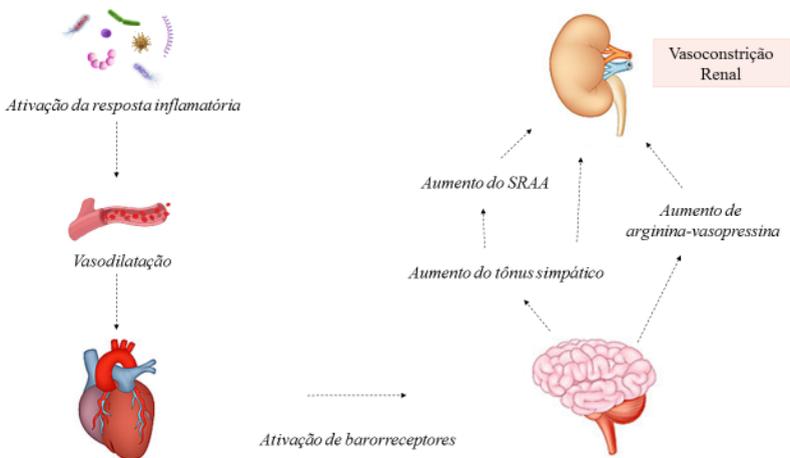


Figura 1. Vasoconstrição renal induzida no choque séptico. A infecção gera uma resposta inflamatória com produção de NO e consequente vasodilatação. Adicionalmente, a hipovolemia e hipotensão contribuem para a ativação de barorreceptores, resultando no aumento do tônus simpático e na ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), bem como na liberação de arginina-vasopressina. Esse aumento da atividade simpática gera vasoconstrição renal, retenção de água e predispõe à falência renal.

Na sepse, a microvasculatura renal contrapõe a circulação sistêmica, pois apresenta reatividade normal ou aumentada aos agentes constritores, resultando na diminuição do fluxo sanguíneo renal e da taxa de filtração glomerular (BOFFA; ARENDSHORST, 2005). Assim, é importante ressaltar que no choque séptico há uma ativação inapropriada do sistema simpático, o que leva ao aumento das catecolaminas circulantes (ANNANE *et al.*, 1999; DÜNSER; HASIBEDER, 2009). Por exemplo, em condições fisiológicas, os níveis de adrenalina correspondem a ordem de picograma por ml de sangue, enquanto que na sepse, esses níveis podem aumentar mil vezes. Com isso, a associação dos altos níveis circulantes de catecolaminas, aliada a diminuição da resposta sistêmica à estas, gera uma ação exacerbada do sistema simpático no rim (já que o órgão mantém sua resposta normal à vasoconstritores), o que

contribui para a LRA e a letalidade na sepse (JONES; ROMANO, 1989; SCHMIDT *et al.*, 2005; WORTSMAN; FRANK; CRYER, 1984).

1.2 ÓXIDO NÍTRICO

1.2.1 Biossíntese e bioquímica do Óxido Nítrico

O NO é uma molécula de estrutura simples, que possui um elétron desemparelhado e é reativo com radicais livres e metais de transição (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Na temperatura e pressão ambiente, é um gás incolor, com solubilidade máxima em água de aproximadamente 2 mM, apresentando solubilidade de 6 a 8 vezes maior em solventes apolares. Por essa razão, tende a se concentrar em membranas lipídicas e domínios hidrofóbicos de proteínas em sistemas biológicos (FUKUTO; CHO; SWITZER, 2000).

O NO é produzido por diversos tipos celulares e é um mediador em muitos processos fisiológicos, como regulação do tônus vascular, inibição da agregação plaquetária, neurotransmissão, nocicepção, respostas imunológicas e função erétil (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

A produção do NO ocorre através da oxidação da L-arginina em L-citrulina pela enzima NOS. Existem três isoformas de NOS, derivadas de genes distintos, onde a óxido nítrico sintase tipo 1 (NOS-1) e a óxido nítrico sintase tipo 3 (NOS-3) são expressas constitutivamente, ou seja, estão presentes em condições fisiológicas, enquanto a óxido nítrico sintase tipo 2 (NOS-2) tem sua expressão estimulada em processos inflamatórios. Apesar de catalisarem a mesma reação, as três isoformas diferem na regulação, amplitude e duração da produção de NO, além da distribuição celular e tecidual (FÖRSTERMANN; BOISSEL; KLEINERT, 1998).

A regulação da atividade das NOS está relacionada com diferentes mecanismos pós-traducionais, incluindo dimerização da proteína, fosforilação de sítios da proteína e ligação de cofatores, além da biodisponibilidade de oxigênio molecular (O₂) e de L-arginina (AKTAN, 2004; FLEMING; BUSSE, 1999).

A NOS-1 e a NOS-3 têm sua atividade dependente da presença de cofatores (NADPH, FAD, FMN e BH₄) e necessitam da ligação cálcio-calmodulina para sua atividade catalítica, isto é, dependem de cálcio. A produção de NO pelas isoformas constitutivas ocorre em concentrações nanomolares e por curtos períodos de tempo (segundos a minutos). A

NOS-1 é encontrada em células neuronais, epiteliais, endoteliais, miócitos esqueléticos, neutrófilos e mastócitos. O NO proveniente desta isoforma atua na regulação da transmissão simpática no sistema nervoso central, na regulação central da pressão sanguínea, no relaxamento do músculo liso e na dilatação via nervos periféricos. Ainda, regula o fluxo sanguíneo cerebral local e está envolvido na formação da memória. A NOS-3 é expressa em vários tipos celulares, como em células endoteliais, leucócitos, plaquetas, cardiomiócitos, em células do hipocampo, pulmão e fígado. Sua atividade é regulada por tensão de cisalhamento de fluidos, hipóxia, fosforilação e localização celular, podendo ser encontrada no citosol, complexo de Golgi, no contato entre as células, mas é nas cavéolas da membrana plasmática que parece ter a maior importância na produção de NO. O NO proveniente da NOS-3 participa de processos de vasodilatação, proliferação de células musculares lisas, permeabilidade endotelial e agregação e adesão plaquetária (FLEMING; BUSSE, 1999; FÖRSTERMANN; BOISSEL; KLEINERT, 1998; FÖRSTERMANN *et al.*, 1994).

A NOS-2 tem sua expressão induzida por citocinas ou por combinação destas com componentes bacterianos, tais como o LPS. Assim como as isoformas constitutivas, a NOS-2 tem sua atividade dependente da presença de cofatores, porém requer uma concentração nanomolar de cálcio (100 nM, concentração equivalente ao nível basal intracelular) para o seu funcionamento e por isso é classificada como sendo independente de cálcio. Inicialmente, a NOS-2 foi identificada em macrófagos, mas hoje sabe-se que mediante estimulação, uma variedade de células pode expressá-la. Leucócitos, células endoteliais e epiteliais, queratinócitos, fibroblastos, osteócitos, plaquetas e neurônios podem expressar a NOS-2. Esta enzima produz e libera NO em concentrações micromolares e durante longos períodos de tempo. O NO produzido por essa isoforma, geralmente, tem ação citotóxica e microbicida. Entretanto, a produção excessiva de NO pela NOS-2 está relacionada com algumas patologias, como artrite reumatoide, miocardite, colite, glomerulonefrite, choque séptico e doenças neurodegenerativas (AKTAN, 2004; FÖRSTERMANN *et al.*, 1994; HECKER; CATTARUZZA; WAGNER, 1999).

O NO pode atuar em diversos alvos, dependendo da sua concentração e do seu local de produção. Seus efeitos podem ser classificados como diretos e indiretos. Os efeitos diretos envolvem a interação do NO com outros ligantes, como complexos metálicos, sendo o grupo heme o maior exemplo. Esta reação requer baixas concentrações

de NO e sugere-se que seja responsável pelos efeitos fisiológicos deste composto. Efeitos indiretos decorrem da produção de compostos intermediários, geralmente derivados da interação de altas concentrações de NO com oxigênio e superóxido. Os efeitos indiretos são consequência do estresse nitrosativo e estresse oxidativo causados por estes compostos intermediários e são considerados responsáveis pelos efeitos patológicos do NO (FUKUTO; CHO; SWITZER, 2000; WINK; MITCHELL, 1998; WINK *et al.*, 2000).

O NO apresenta variações no número de elétrons nos orbitais atômicos, determinando a existência de diferentes formas redox como NO. (radical monóxido de nitrogênio), o NO⁺ (cátion nitrosônio) e o NO⁻ (ânion nitroxil), com diferentes propriedades químicas e distintos alvos moleculares. Desta forma, o NO pode atuar através da ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), da interação com metalo-proteínas e com moléculas possuidoras de resíduos tióis e da ativação de canais de potássio dependentes de Ca²⁺ (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992).

Como segundo mensageiro, o NO age ativando a GCs através de sua interação com o grupo heme, o que gera mudança conformacional da enzima, havendo exposição do sítio catalítico da guanosina trifosfato (GTP) e magnésio, permitindo a formação de guanosina monofosfato cíclico (GMPc). Por sua vez, o GMPc formado pode agir sobre a fosfodiesterase (PDE), sobre canais iônicos e sobre a proteína quinase dependente de GMPc (PKG) (HUSSAIN; HOBBS; MACALLISTER, 1999; STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992).

Por ser um radical livre e relativamente reativo, o NO pode reagir com outros radicais, formando espécies tão ou mais biologicamente ativas do que a molécula original. Assim, o NO pode reagir com o O₂ formando dióxido de nitrogênio (NO₂). Uma vez produzido, o NO₂ pode reagir com outra molécula de NO e produzir trióxido de dinitrogênio (N₂O₃) ou com o próprio NO₂, gerando tetróxido de dinitrogênio (N₂O₄) que, após dismutação, geram íons nitrito e nitrato. Tanto o N₂O₃ como o N₂O₄ são considerados potenciais doadores de nitrosônio (NO⁺) e esta molécula pode ser transferida para uma variedade de nucleófilos presentes em biomoléculas, como hidroxilas, aminas ou tióis, levando à formação de nitrito, N-nitrosaminas e S-nitrosotióis, respectivamente (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992; WINK *et al.*, 2000).

Ainda, altas concentração de NO favorecem sua reação com o ânion superóxido (O₂⁻), gerado pelas NADPH oxidases, formando o ânion peroxinitrito (ONO₂⁻). O peroxinitrito é rapidamente protonado,

formando o ácido peroxinitroso (HONO₂). Devido a sua instabilidade, o ácido peroxinitroso se decompõe e produz dióxido de nitrogênio e o radical hidroxila, capaz de iniciar a peroxidação de lipídeos, bem como o radical NO₂, o qual pode promover nitração de resíduos de aminoácidos aromáticos, como tirosina e triptofano. O peroxinitrito, o ácido peroxinitroso e seus produtos de decomposição, participam do crescimento, migração, proliferação celular e rearranjo do citoesqueleto. Entretanto, essas espécies podem ser extremamente danosas às biomoléculas e estão associadas a danos teciduais (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

As reações do NO• com metais de transição são rápidas, uma vez que existe doação de densidade eletrônica da molécula para o metal e/ou vice-versa, consistindo um processo chamado de retro-doação. Esta reação forma complexos nitrosil-metálicos como ocorre na hemoglobina, mioglobina e citocromo oxidase, as quais contêm ferro no grupo heme. O NO⁺ pode ainda nitrosilar substratos protéicos, levando a modificação pós-traducional de proteínas (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992; WINK *et al.*, 2000).

1.2.2 O Óxido Nítrico e a sepse

Já está bem estabelecido que o NO desempenha um papel central na fisiopatologia da sepse e do choque séptico. As primeiras evidências da participação do NO nesta patologia vieram com a observação de níveis elevados de nitrato e nitrito em pacientes sépticos (EVANS *et al.*, 1993; OCHOA *et al.*, 1991) e que o uso de inibidores da NOS é capaz de atenuar sintomas desses pacientes. Vários trabalhos mostraram que os inibidores de NOS normalizam a queda da pressão arterial (KILBOURN *et al.*, 1990), aumentam a sobrevivência (WU *et al.*, 1995) e atenuam a falência de múltiplos órgãos na sepse experimental em ratos (WU, CHIN-CHEN; RUETTEN; THIEMERMANN, 1996). Isto é, há uma grande quantidade de dados implicando o NO como um mediador chave na disfunção cardiovascular durante a sepse e choque séptico (para revisão ver ASSREUY, 2006).

Sabe-se que a maioria do NO relevante na sepse é proveniente da NOS-2. Este fato é reforçado pela demonstração de que camundongos *knockout* para o gene da NOS-2 respondem melhor a vasoconstritores e apresentam menor mortalidade em modelos de sepse (KILBOURN; SZABÓ; TRABER, 1997). Entretanto, já foi observado que o NO derivado da NOS-3 induz a translocação nuclear de NF-κB,

demonstrando sua participação na patologia (SZABÓ, 1995). Ainda, o NO produzido pela NOS-1 atua como sinal de disparo no desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica (DUMA *et al.*, 2011). Em células musculares lisas, a atividade da NOS-1 também induz a translocação de NF- κ B para o núcleo, levando a expressão da NOS-2 e sugerindo sua participação na disfunção vascular da sepse (SCHESCHOWITSCH *et al.*, 2015).

Há uma produção contínua e elevada de NO pela NOS-2 durante a sepse e o choque séptico, o que influi na hipotensão, na hiporreatividade a vasoconstritores, na depressão da função miocárdica, na inibição da coagulação sanguínea e adesão leucocitária, na indução de apoptose e em outras funções ditas deletérias do NO (COBB; DANNER, 1996; VINCENT *et al.*, 2000).

Nesse contexto, o uso de inibidores da NOS na sepse parecia ser promissor. Porém, o NO é importante na modulação da resposta inflamatória e na defesa contra micro-organismos e sua inibição reflete na capacidade do hospedeiro em combater a infecção subjacente. Outro importante problema em lidar com a inibição da NOS-2 é que todos os inibidores das NOS testados até agora no ambiente clínico não são suficientemente seletivos para esta isoforma. Esta foi possivelmente a razão porque um estudo de Fase III com um inibidor de NOS em sepse humana teve que ser interrompido antes do término, já que a mortalidade aumentou no grupo de pacientes que recebeu o inibidor (LÓPEZ *et al.*, 2004).

Adicionalmente, o envolvimento das espécies reativas de nitrogênio, tais como os S-nitrosotióis, já foi observado no modelo de endotoxemia em ratos. A injeção de LPS causa um aumento nas concentrações de S-nitroalbumina e S-nitrosohemoglobina em 3 a 25 vezes acima dos animais controle, respectivamente (JOURD'HEUIL; GRAY; GRISHAM, 2000). Também, já foi demonstrado que o aumento da expressão de NOS-2 está associado com o aumento da nitrosilação de proteínas e que os S-nitrosotióis contribuem para a patogênese da sepse nos modelos de CLP e endotoxemia em ratos (FOSTER; MCMAHON; STAMLER, 2003; LIU *et al.*, 2004; MARSHALL; STAMLER, 2002).

1.2.3 Reatividade vascular

O papel do NO na hipotensão observada na sepse também já está bem descrito, sendo que a maioria dos estudos realizados deixa claro que a produção de NO é a principal causa da queda de pressão arterial

(EVANS *et al.*, 1993; FERNANDES; ASSREUY, 2008; VINCENT *et al.*, 2000).

Sabe-se que a pressão sanguínea é determinada, principalmente, pelo tônus vascular, isto é, pela contratilidade das células do músculo liso da parede dos vasos, as quais são reguladas pela sua concentração intracelular de cálcio. A concentração de cálcio, por sua vez, pode ser regulada por alterações no potencial de repouso da membrana, induzindo a abertura de canais de cálcio voltagem-dependente e influxo de cálcio extracelular da célula muscular lisa ou por ativação de receptores específicos da membrana celular através de ligantes tais como catecolaminas, angiotensina II e endotelina I. Um exemplo clássico é a ativação dos receptores α -adrenérgicos que, uma vez ativados, são capazes de modular a resposta das células musculares lisas através da ativação dos segundos mensageiros, inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) que por sua vez, causam liberação de cálcio dos estoques intracelulares (OGUT; BROZOVICH, 2003). Na célula, o cálcio se liga à calmodulina, formando um complexo capaz de ativar a miosina de cadeia leve cinase (MLCK, do inglês, *Myosin Light Chain Kinase*), que é a enzima responsável pela fosforilação das cadeias leves de miosina (cadeias regulatórias). Assim, quando a cadeia regulatória é fosforilada, as cabeças de miosina são capazes de se ligar repetitivamente aos filamentos de actina, promovendo a contração (HOROWITZ *et al.*, 1996). Em contrapartida, o relaxamento ocorre em consequência da diminuição do cálcio intracelular, reduzindo a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) pela miosina fosfatase. Diversos vasodilatadores agem sobre os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e de GMPc, os quais ativam respectivamente a proteína cinase A (PKA) e a PKG. A PKA e a PKG fosforilam e inativam a MLCK, favorecendo a perda do tônus muscular.

Além dos estímulos químicos, existe ainda um importante estímulo físico, o estresse de cisalhamento, que corresponde à força que o fluxo sanguíneo exerce nas células endoteliais e que gera a síntese e liberação de mediadores relaxantes vasculares (MATLUNG; BAKKER; VANBAVEL, 2009). Fisiologicamente, o endotélio relaxa a musculatura lisa vascular por meio de três mediadores principais: o NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1993; MONCADA; HIGGS, 2006), a prostaciclina (MONCADA *et al.*, 1976)

e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FELETOU; VANHOUTTE, 1988).

O NO encontra-se entre os mediadores locais liberados no ambiente onde a célula do músculo liso está inserida, sendo considerado um importante regulador fisiológico do relaxamento do músculo liso vascular e não vascular. No caso do músculo liso vascular, o relaxamento induzido por NO ocorre basicamente por dois mecanismos distintos: a) o NO pode abrir canais de potássio no músculo liso vascular, o que reduz o potencial de membrana, hiperpolariza a célula e fecha os canais de cálcio, assim reduzindo o cálcio intracelular e levando à vasodilatação; b) o NO pode interagir com a GCs, aumentando a produção de GMPc na célula e ativando a PKG (LUCAS *et al.*, 2000; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; BEAVO; BRUNTON, 2002).

Na sepse, a ativação excessiva da via NO-GCs-GMPc foi demonstrada pelo aumento da expressão da GCs e consequente produção de GMPc, principalmente, nas fases tardias da sepse e a inibição da GCs melhorou a resposta a agentes vasoconstritores (FERNANDES *et al.*, 2006, 2009). Foi demonstrado que o GMPc produzido via NO derivado da NOS-2, inibe a via Rho-A/Rhocinase, prejudicando a fosforilação da miosina fosfatase e, consequentemente, reduzindo a contratilidade vascular (DA SILVA-SANTOS *et al.*, 2009).

Em modelos de endotoxemia, a administração de LPS em ratos anestesiados causa significativa redução da resposta vasoconstritora e, portanto, queda da pressão arterial (SZABÓ *et al.*, 1993). Vários estudos mostraram que o LPS reduz a resposta contrátil à noradrenalina (JULOU-SCHAEFFER *et al.*, 1990), ao U46619 (STOCLET *et al.*, 1999), ao cloreto de potássio (UENO; LEE, 1993), à fenilefrina (HO; KWAN; BOURREAU, 1996), entre outros agonistas. Trabalhos demonstraram que a hiporreatividade a vasoconstritores mediada pelo LPS é decorrente da expressão de NOS-2 e da acentuada produção de NO (SZABÓ *et al.*, 1993). Ainda, as artérias mesentérica superior, renal, hepática e coronária são alguns exemplos de diferentes segmentos vasculares nos quais a expressão da NOS-2 e as modificações da reatividade estão associadas ao LPS e ao NO (PIEPOT *et al.*, 2002). Em estudo do decurso temporal, a hiporreatividade às catecolaminas causada pelo LPS revelou duas fases distintas: a fase inicial (até uma hora após o LPS) e a fase tardia (pelo menos 5 horas após o LPS). Em ambas as fases existe a participação do NO, sendo que na fase inicial o NO é liberado pelo endotélio e na fase

tardia o NO é produzido em grande quantidade no músculo liso, resultante da expressão da NOS-2 (PAYA *et al.*, 1995).

No modelo de sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) observa-se hiporreatividade a agentes vasoconstritores (fenilefrina, serotonina e altas concentrações de K+) e a hiperreatividade a agentes vasodilatadores (acetilcolina e trinitrato de glicerila) em artéria mesentérica (CHEN; WU; YEN, 1994). Entretanto, é importante destacar que no choque séptico, os vasos pertencentes a microcirculação (arteríolas, vênulas e capilares) são os mais afetados (HINSHAW, 1996).

Portanto, a hipotensão observada no quadro de sepse é consequência de anormalidade hemodinâmicas, tais como hipovolemia, falência cardíaca e disfunção vascular. Por sua vez, essa disfunção vascular tem origem multifatorial e engloba a disfunção microvascular, a disfunção endotelial e a diminuição da resposta a agentes vasopressores (MERX; WEBER, 2007).

As evidências clínicas que confirmam a hiporreatividade vascular em pacientes sépticos mostram 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; ROSE, 1992; UMANS *et al.*, 1993). Além disso, cardiomiócitos expostos ao plasma de pacientes sépticos apresentaram uma diminuição na densidade de receptores adrenérgicos, resultando na tolerância ao tratamento com noradrenalina (REITHMANN *et al.*, 1993). Desta forma, resultados sugerem que as alterações cardíacas observadas na sepse decorrem da dessensibilização de receptores adrenérgicos (JONES; ROMANO, 1990).

Entretanto, em contraste com a vasodilatação sistêmica e com a diminuição da resposta vascular a agentes constritores, o rim apresenta um quadro de vasoconstrição causada por uma resposta relativamente preservada aos vasoconstritores, o que contribui para a LRA observada na sepse (CHVOJKA *et al.*, 2008). Ainda, outro aspecto em relação a reatividade vascular na sepse, é que na vasculatura pulmonar ocorre uma hipertensão local, a despeito da queda generalizada da pressão arterial (ROJAS *et al.*, 2005). No entanto, os mecanismos envolvidos nas respostas vasculares renais e não renais ainda permanecem desconhecidos e demandam maiores estudos.

1.3 RECEPTOR α_1 ADRENÉRGICO

Os receptores adrenérgicos pertencem a família dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs, do inglês, *G Protein Coupled Receptors*). Os GPCRs consistem em uma única cadeia polipeptídica de até 1100 resíduos, cuja estrutura compreende sete α -hélices transmembrana com um domínio N-terminal extracelular de tamanho variável e um domínio C-terminal intracelular, sendo que a terceira alça citoplasmática longa corresponde a região da molécula que se acopla a proteína G (RANG *et al.*, 2007a).

As proteínas G são formadas por três subunidades α , β e γ e sua função é reconhecer os GPCRs ativados e transmitir a mensagem para os sistemas efetores que geram as respostas celulares. Quando não estimuladas, a subunidade α possui uma guanosina difosfato (GDP) ligada, e a proteína G está inativa. Quando estimulada por um receptor ativado, isto é, pela ação de um agonista, a subunidade α libera seu GDP, permitindo que a guanosina trifosfato (GTP) se ligue no seu lugar. Essa troca causa a dissociação do trímero em dois componentes ativados – uma subunidade α -GTP e um complexo $\beta\gamma$. Estas são as formas ativas da proteína G, que se difundem na membrana e podem se associar a diversas enzimas e canais iônicos causando ativação do alvo. Dependendo do tipo de proteína G envolvida, a associação das subunidades α ou $\beta\gamma$ com enzimas-alvo ou canais pode causar a ativação ou inibição de determinada via sinalizadora. Os principais alvos das proteínas G, através dos quais os GPCRs controlam diferentes aspectos da função celular, são: adenililciclase, responsável por formar AMPc; fosfolipase C (PLC), responsável pela formação de IP_3 e DAG; canais iônicos, particularmente os canais de cálcio e de potássio; Rho A/Rhocinase, sistema que controla a atividade das muitas vias de sinalização responsáveis pelo crescimento e proliferação celular e da contração da musculatura lisa; e proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), sistema que controla várias funções celulares, incluindo a divisão celular (ALBERTS, 2006; RANG *et al.*, 2007b).

Os receptores adrenérgicos respondem pelas ações das catecolaminas, tais como a adrenalina e a noradrenalina, importantes mediadores do sistema nervoso simpático. Eles são classificados em α e β , os quais possuem subtipos, α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} e β_1 , β_2 , β_3 . Todos os subtipos de receptores β estimulam a adenililciclase, enquanto que os α_2 inibem a atividade da adenililciclase, ativam os canais de K^+ operados por receptores e inibem os canais de Ca^{2+} . Já os subtipos de receptores α_1

acoplam-se a diferentes sistemas efetores, sendo a via da PLC um importante efector (RANG *et al.*, 2007b). O principal mecanismo de ativação dos receptores α_1 adrenérgicos está ilustrado na Figura 2.

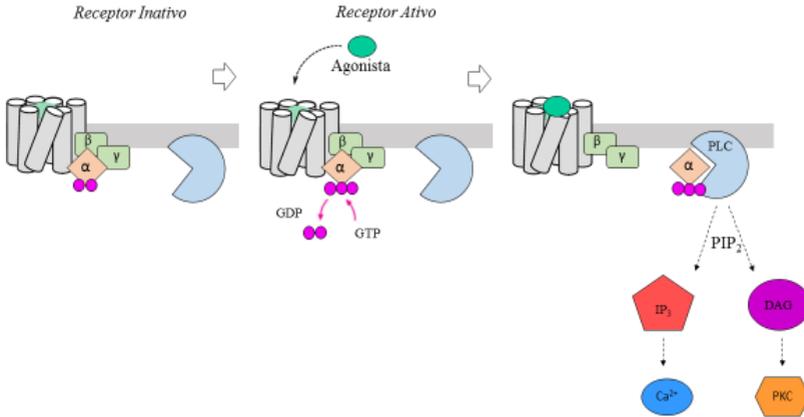


Figura 2. Mecanismo de sinalização dos receptores α_1 adrenérgicos. No estado inativo, a proteína G fica ancorada à membrana plasmática através de resíduos de lipídeos. A ocupação do receptor por um agonista promove a troca do GDP por GTP intracelular, causando o deslocamento do complexo α -GTP. O complexo α -GTP interage com a proteína alvo, PLC, que catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP_2) em IP_3 e DAG. O IP_3 se difunde no citosol e se liga na membrana do retículo endoplasmático, causando a liberação de Ca^{2+} dos reservatórios e aumentando sua concentração no citosol. Já o DAG é responsável por ativar a PKC, que é capaz de fosforilar diversos tipos de proteína.

Os receptores α_1 adrenérgicos são encontrados, principalmente, na musculatura lisa vascular. Como resultado da ativação desses receptores, ocorre vasoconstricção e, conseqüentemente, aumento na pressão arterial. Entretanto, também são observados efeitos na contração do músculo liso do útero, contração do esfíncter da bexiga, inotropismo cardíaco, relaxamento da musculatura lisa gastrointestinal, secreção salivar e glicogenólise hepática (RANG *et al.*, 2007b). Em relação a localização dos subtipos de receptores α_1 observa-se que o RNAm do subtipo α_{1A} é encontrado, 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).

É importante ressaltar que a densidade e a proporção de receptores adrenérgicos são importantes fatores na resposta da célula ou órgão às aminas simpaticomiméticas. Além disso, a modulação da função desses receptores é necessária para a homeostase celular e, por isso, a célula possui mecanismos de regulação. Isto é, para atenuar ou cessar a transdução de sinal e proteger a célula da ação excessiva de agonistas, ocorre um processo de dessensibilização dos receptores. A dessensibilização dos GPCRs envolve os processos de fosforilação e internalização dos receptores (RANG *et al.*, 2007a).

A sequência dos GPCRs inclui certos resíduos que podem ser fosforilados por cinases, como a PKA, PKC e cinases de GPCRs (GRKs) específicas ligadas a membrana. A fosforilação efetuada pela PKA e PKC geralmente resulta no bloqueio do acoplamento entre o receptor ativado e a proteína G com conseqüente redução do efeito do agonista. Essas cinases não são muito seletivas, de modo que outros receptores, além daqueles para o agonista dessensibilizante, também são afetados. Esse efeito no qual um agonista pode dessensibilizar outros receptores é conhecido como dessensibilização heteróloga e, em geral, é pouco intenso e de curta duração. A fosforilação pelas GRKs é específica em maior ou menor grau para determinados receptores e afeta principalmente receptores no estado ativado, isto é, na presença do agonista. Neste caso, o processo é conhecido como dessensibilização homóloga e resulta na internalização do receptor (RANG *et al.*, 2007a).

A dessensibilização de receptores adrenérgicos também está envolvida em processos patológicos, tais como sepse (SCHMIDT, CHRISTOPH *et al.*, 2009), hipertensão pulmonar (RYAN *et al.*, 2015), artrite reumatoide (LORTON *et al.*, 2013) e isquemia cardíaca (HUANG *et al.*, 2013).

1.4 CINASE DE RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G 2 (GRK2)

As GRKs compõem uma família de proteínas composta por sete isoformas (1 a 7) e são importantes reguladoras dos GPCRs (MÉTAYÉ *et al.*, 2005).

Todas as isoformas possuem uma organização estrutural semelhante (~60-80 kDa), com um domínio amino-terminal (~185 aminoácidos), um domínio catalítico (~270 aminoácidos) e um domínio

carboxi-terminal (~105 a 230 aminoácidos). Com base na homologia das seqüências, as GRKs são divididas em três subfamílias: as GRKs visuais, 1 e 7 (descritas como cinases de rodopsina), as GRKs 2 e 3 (anteriormente ditas cinases de receptores adrenérgicos β) e as GRKs 4, 5 e 6 (MÉTAYÉ *et al.*, 2005).

As isoformas de GRKs 2, 3, 5 e 6 são encontradas ubiquamente em todos os tecidos, enquanto que a GRK1 é encontrada em bastonetes, na retina e glândula pineal, a GRK7 em cones e a GRK4 nos testículos, rim e cerebelo. As GRKs 2, 3, 4, 5 e 6 também são diferenciadas em relação à sua localização subcelular. As GRK4 e GRK6 possuem sítios de palmitoilação, que facilitam sua localização na membrana, além de possuírem sítios de interação com lipídeos. A GRK5 encontra-se ancorada à membrana plasmática, pois possui sítios de interação com lipídeos em sua porção carboxi-terminal. As GRK2 e GRK3 são encontradas no citoplasma e são recrutadas à membrana somente após a ativação do receptor, pois sua ancoragem depende da interação com o complexo $\beta\gamma$ da proteína G. Mas também possuem um sítio de interação com a subunidade α , localizado no domínio de regulação de sinalização da proteína G, e essa interação diminui a hidrólise dos fosfolipídeos e, conseqüentemente, a produção dos segundos mensageiros IP_3 e DAG (GUREVICH *et al.*, 2012; PITCHER *et al.*, 1992).

As GRKs só fosforilam o receptor em sua forma ativada e os resíduos fosforilados são diferentes daqueles que são alvos de outras cinases. O receptor fosforilado expõe um sítio para ligação de β -arrestinas, proteínas intracelulares que bloqueiam a interação com as proteínas G e também direcionam o receptor para a internalização, produzindo uma dessensibilização mais profunda e de maior duração. A ligação da β -arrestina sinaliza o receptor para internalização através de vesículas revestidas por clatrina. Além de promover a internalização e a regulação negativa (*downregulation*) do receptor, a β -arrestina também contribui sinalizando para a cascata das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK; do inglês, *Mitogen Activated Protein Kinases*), que migram para o núcleo celular e iniciam os processos de transcrição e proliferação celular. O receptor internalizado pode, então, ser defosforilado e reinserido na membrana plasmática (ressensibilização) ou encaminhado para os lisossomos, onde é degradado (inativação) (ALBERTS, 2006; EICHEL; JULLIÉ; VON ZASTROW, 2016; GUREVICH *et al.*, 1995; RANG *et al.*, 2007a). Esse mecanismo está ilustrado na Figura 3.

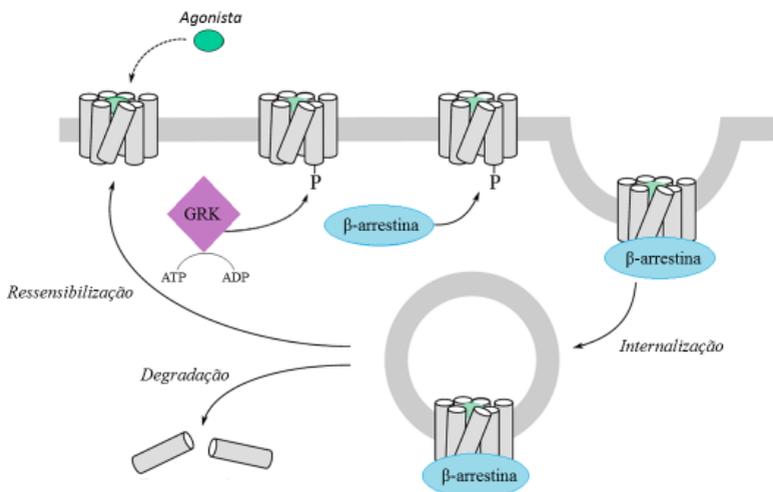


Figura 3. Mecanismo de dessensibilização de GPCR através da GRK. Uma vez ativados, os receptores GPCR sofrem fosforilação pela GRK sinalizando para a ligação da β -arrestina. A ligação da β -arrestina ao receptor fosforilado impede sua interação com a proteína G e promove sua internalização por vesículas recobertas por clatrina. Em seguida, os receptores podem ser degradados pelos lisossomos ou reinsertidos na membrana plasmática.

As GRKS são proteínas de vida curta (meia vida de ~ 1 h), que sofrem ubiquitinação e são degradadas por proteassoma. Recentemente, foi demonstrado que a fosforilação de GRKS mediada pela via MAPK também resulta na degradação proteolítica. Além disso, observou-se que a produção de espécies reativas de oxigênio em modelos de inflamação resultou na degradação de GRKS. Linfócitos expostos ao estresse oxidativo também apresentaram decréscimo nos níveis de GRK2. Outras evidências demonstram que a diminuição de GRK2 induzida por H_2O_2 foi prevenida pela inibição da atividade de calpaína, mas não do proteassoma, sugerindo que a calpaína desempenha um papel importante na degradação. Entretanto, as possíveis vias de degradação das GRKS ainda não estão bem elucidadas e demandam novas investigações (LOMBARDI *et al.*, 2002; PENELA, P *et al.*, 1998; PENELA; RIBAS; MAYOR, 2003).

Os níveis de expressão bem como a atividade das GRKS são regulados, principalmente, pela interação direta com os receptores GPCR.

Já foi demonstrado que os níveis circulantes de catecolaminas e a interação dos agonistas com receptores β adrenérgicos estão correlacionados com a expressão de GRK2 no coração, visto que a infusão de agonistas ou antagonistas β adrenérgicos leva ao aumento ou diminuição da quantidade de RNAm e proteínas de GRK2, respectivamente. No entanto, existem outros mecanismos de regulação já estabelecidos como, por exemplo, o aumento da transcrição de GRK2 em células do músculo liso de aorta por agentes que promovem vasoconstrição e hipertrofia, tais como ésteres de forbol (GUREVICH *et al.*, 2012).

Devido à ubiquidade da GRK2 e o seu envolvimento na modulação de diversos GPCRs, diversos estudos têm sido realizados a fim de entender os processos de expressão/ativação relativos à esta isoforma (DESAI *et al.*, 2006; INAGAKI *et al.*, 2015; KRASEL *et al.*, 2001; LYMPEROPOULOS; RENGU; KOCH, 2012; PENELA *et al.*, 2010).

Sabe-se que a GRK2 é altamente expressa no cérebro, leucócitos, coração e baço, seguida por pulmão e rim. Em células do músculo liso vascular, a GRK2 é a principal isoforma encontrada participando da regulação de diversos GPCR, dentre eles, os receptores adrenérgicos. Desta forma, observa-se que a GRK2 está envolvida em ações simpaticomiméticas, como a regulação do tônus vascular e é a isoforma mais relevante no sistema cardiovascular. Além disso, sugere-se que está isoforma tem um importante papel na neurotransmissão e na resposta imune e inflamatória (ARAGAY *et al.*, 1998; PENELA; RIBAS, 2003).

A atividade da GRK2 pode ser regulada através da fosforilação por outras cinases. Por exemplo, a PKA pode fosforilar o resíduo Ser685 da GRK2 e aumentar a sua ligação com o complexo $G\beta\gamma$ do receptor e, conseqüentemente, aumentar sua translocação para a membrana e a fosforilação do receptor (CONG *et al.*, 2001). Já a atividade da PKC, resulta na fosforilação do resíduo Ser29 da GRK2, abolindo sua inibição induzida por calmodulina (KRASEL *et al.*, 2001). O fator de crescimento derivado de plaquetas β (PDGFR β ; do inglês, *Platelet-derived growth factor receptor- β*) fosforila e ativa a GRK2, aumentando a sua interação com o receptor (WU *et al.*, 2005). A fosforilação no resíduo Ser670, pode ser mediada pela via da ERK1/2 e resulta na redução da atividade da GRK2 (ELORZA; SARNAGO; MAYOR, 2000). A interação da GRK2 com a caveolina, com a calmodulina ou com proteínas inibitórias da cinase Raf (RKIP; do inglês, *Raf kinase inhibitory protein*) resulta na diminuição da habilidade de fosforilação do receptor pela GRK2 (CARMAN *et al.*, 1999; HAGA; TSUGA; HAGA, 1997; LORENZ;

LOHSE; QUITTERER, 2003). Ainda, o NO e/ou S-nitrosotióis (SNOs) causam a inibição da atividade da GRK2. Neste caso, o resíduo Cis340 da GRK2 é S-nitrosilado, inibindo a fosforilação do receptor, o recrutamento da β -arrestina e a internalização do receptor (WHALEN *et al.*, 2007).

Na literatura, um crescente número de trabalhos ilustra a importância da GRK2, assim como das β -arrestinas. Foi demonstrado que camundongos heterozigotos para GRK2 (GRK2^{+/-}) apresentam alterações da função cardíaca, com aumento da resposta contrátil miocárdica às catecolaminas por intermédio de receptores β adrenérgicos (ROCKMAN *et al.*, 1998). Além disso, camundongos deficientes em β -arrestina também apresentam resposta cardíaca aumentada (aumento da fração de ejeção) após estimulação com um agonista adrenérgico (CONNER *et al.*, 1997). Em contrapartida, existem evidências demonstrando que camundongos transgênicos com alta expressão de GRK2 apresentam hiporresponsividade aos receptores beta adrenérgicos vasculares, contribuindo para o quadro de hipertensão (ECKHART *et al.*, 2002). Ainda, foi observado que em pacientes sépticos há um aumento nos níveis de GRK2 e GRK5 em neutrófilos, o que se correlaciona com a dessensibilização de receptores quimiotáxicos CXCR1 e CXCR2 e consequente falência na migração de neutrófilos para o foco infeccioso (ARRAES *et al.*, 2006). Também, a excessiva produção de NO durante a sepse foi associada a dessensibilização de receptores CXCR2 nos neutrófilos (RIOS-SANTOS *et al.*, 2007).

Dados prévios do laboratório demonstraram que a hiporreatividade às catecolaminas está associada com uma diminuição na densidade de receptores α e β na aorta e no coração, respectivamente, bem como à um aumento nos níveis de GRK2 (Dal-Secco *et al.*, resultados não publicados). Foi observado que o tratamento com 1400W e aminoguanidina, inibidores da NOS-2, reverteu o quadro de hiporreatividade vascular e cardíaca às catecolaminas e restaurou os níveis de GRK2 na sepse. Esses dados sugerem que o aumento do NO, proveniente da NOS-2, contribui para o aumento da GRK2 no tecido cardíaco e vascular, com consequente redução de receptores adrenérgicos, levando a uma diminuição na resposta simpática e contribuindo para a mortalidade dos animais sépticos (Dal-Secco *et al.*, resultados não publicados). Cabe ressaltar que, apesar das evidências demonstrarem a importância da atividade da GRK2 no controle da reatividade vascular, não há dados sobre o papel dessa cinase na disfunção renal observada no choque séptico.

1.5 HIPÓTESE DE TRABALHO

Sabe-se que o choque séptico é caracterizado por hipotensão, diminuição da resistência vascular e hiporreatividade a agentes vasoconstritores, sendo o NO um importante mediador dessa disfunção. Entretanto, em contraste com a circulação sistêmica, o rim apresenta vasoconstrição durante a sepse.

Resultados prévios do laboratório demonstraram que a hiporreatividade vascular está relacionada com um aumento nos níveis de GRK2, resultando na diminuição da densidade de receptores adrenérgicos no coração e aorta de animais sépticos e que a inibição do NO proveniente da NOS-2 é capaz de reverter esse quadro.

Com base no exposto, a hipótese de trabalho é que a GRK2 é modulada negativamente no tecido renal e conseqüentemente não faz a regulação negativa de receptores adrenérgicos e hiporreatividade, contribuindo para a vasoconstrição renal observada no choque séptico e que o NO participa dessa regulação.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a modulação da GRK2 no tecido renal e investigar se o NO participa dessa regulação, a fim de compreender os mecanismos que envolvem a manutenção da resposta vasoconstritora renal em camundongos submetidos à sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a resposta vascular renal à agentes constritores em animais submetidos a sepse polimicrobiana;
- b) Verificar o nível de GRK2 no rim;
- c) Comparar o nível de GRK2 no coração, fígado e pulmão de animais sépticos com o do rim;
- d) Investigar se há relação entre a GRK2 e o NO, proveniente da NOS-2, no tecido renal;
- e) Avaliar a densidade de receptores $\alpha 1$ adrenérgicos no tecido renal de animais sépticos;
- f) Investigar a modulação de GRK2 em cultura de células com características de epitélio renal;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas e machos, pesando entre 35 e 40g e 45 e 50g, respectivamente, de três meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram mantidos em mini isoladores (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil), cinco por caixa, com temperatura controlada ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), ciclo de luz claro/escuro (12/12h) e com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o protocolo PP0790 e seguiram as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POLIMICROBIANA POR LIGADURA E PERFURAÇÃO DO CECO (CLP)

Fêmeas foram pré-anestesiadas com xilazina (15 mg/Kg; i.p) e analgesiadas com tramadol (15 mg/Kg; s.c). Em seguida, foram anestesiadas com isoflurano (5% para indução e 2,5% para manutenção) e mantidas sobre cama aquecida a 37°C . Posteriormente, foi realizada uma laparotomia, de aproximadamente 1 cm, com subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco. O ceco foi submetido a uma perfuração transfixante, com agulha 21G, seguida de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Depois, o ceco foi recolocado na cavidade abdominal e a musculatura e a pele foram suturadas. Após a cirurgia, os animais receberam tampão fosfato (PBS; em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH_2PO_4 1,5 e NaH_2PO_4 10,8; pH 7,4), 30 ml/kg (s.c) para reposição fluidica e tramadol a cada 12 h para analgesia. Os animais foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia.

3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POR PNEUMONIA

Para a indução de sepse por pneumonia, foi utilizada a bactéria *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 700603; American Type Culture Collection, Rockville, MD, Estados Unidos). Inicialmente, alíquotas individuais da bactéria foram descongeladas e lavadas em PBS estéril. Depois, foram colocadas em caldo BHI e incubadas por 18 h a 37°C . Após, o caldo foi centrifugado e o *pellet* resultante foi lavado (2 vezes) e

suspendido em 0,5 ml de PBS estéril. A concentração de bactérias na suspensão foi determinada através da interpolação da medida da absorbância (600 nm) em uma regressão linear previamente obtida. Finalmente, a suspensão de bactérias foi diluída em PBS estéril na concentração necessária para a inoculação.

Camundongos machos foram anestesiados com uma solução composta por cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg), administrada por via i.p. e colocados em posição supina. Assepticamente, foi realizada uma incisão de 5 mm na pele da região ventral do pescoço e a musculatura foi levemente afastada para exposição e identificação da traqueia. Em seguida, pela via intratraqueal, foi inoculado 0,05 ml da suspensão de bactérias, correspondendo a 1×10^9 UFC de *Klebsiella pneumoniae* por animal. A pele foi suturada e os animais receberam PBS (30 ml/kg; s.c.) para reposição fluidica e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação da anestesia.

3.4 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA DOS ANIMAIS APÓS CLP

A avaliação da sobrevivência dos animais após o CLP foi realizada a cada 12 h, por um período de 96 h. Os animais controles foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligadura e a perfuração cecal (animais falso-operados ou *Sham*).

3.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.5.1 Determinação dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x)

A concentração de NO foi determinada no plasma de fêmeas naïve e sépticas 6, 12 e 24 h após a cirurgia de CLP. Ainda, o NO foi determinado no plasma de animais tratados (30 min antes e 12 h após a cirurgia) com o inibidor da NOS-2, 1400W (1 mg/Kg; s.c; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), 24 h após a indução da sepse. A dosagem de NO foi realizada, indiretamente, através da mensuração de nitrito e nitrato (NO_x), conforme a metodologia descrita por Granger e colaboradores (GRANGER *et al.*, 1990). Após a coleta, as amostras de plasma foram diluídas (1:1) em água destilada e desproteinizadas pela adição de sulfato de zinco 20% (1 h; em banho de gelo). As amostras foram centrifugadas a 4°C, por 20 min, a 10000 g e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, o nitrato foi reduzido a nitrito, através da enzima nitrato redutase, expressa em *Escherichia coli* quando cultivada em meio

anaeróbico. Para isso, as amostras foram incubadas com alíquotas da bactéria, a 37°C, durante 3 h. Então, as amostras foram centrifugadas (3700 rpm; 20 min) e o sobrenadante foi misturado com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de α -naftil-etilenodiamina em água destilada), na proporção de 1:1. Finalmente, a mistura foi transferida para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura da absorbância em leitor de placas modelo Infinite M200 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suíça), na faixa de 540 nm. Simultaneamente, foram feitas curvas padrão de nitrato e nitrito (0 a 150 μ M). 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 μ M de NOx.

3.5.2 Dosagem plasmática de creatinina e ureia

As dosagens plasmáticas de creatinina e ureia foram realizadas em animais naïve e sépticos (24 h após a cirurgia de CLP) e seguiram de acordo com as instruções do fabricante, através de kits comercialmente disponíveis (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As leituras foram feitas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram registradas através de um leitor de placas modelo Infinite M200, em 510 nm para creatinina e 600 nm para ureia. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dl.

3.5.3 Dosagem plasmática de aspartatoaminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

As dosagens plasmáticas de AST e ALT foram realizadas em animais naïve e sépticos (24 h após a cirurgia de CLP) e seguiram de acordo com as instruções do fabricante, através de kits comercialmente disponíveis (Bioclin, Belo Horizonte, MG, Brasil). As leituras foram feitas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram registradas através de um leitor de placas modelo Infinite M200, em 505 nm. Os valores foram calculados com base em uma curva de calibração e expressos em mg/dl.

3.6 AVALIAÇÃO DA REATIVIDADE VASCULAR RENAL À FENILEFRINA

A avaliação da reatividade vascular renal foi realizada 24 horas após a indução da sepse por CLP e fêmeas naive foram utilizadas como controle. Os animais foram anestesiados com uma solução composta por cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg), administrada por via i.p., heparinizados (100 UI, i.p), posicionados em decúbito dorsal e uma laparotomia foi realizada para exposição dos órgãos abdominais. Em seguida, foi efetuada uma ligadura no ureter esquerdo, a aorta abdominal foi isolada da veia e de seus tecidos conectivos e outra ligadura foi posicionada abaixo da artéria renal direita e acima da artéria renal esquerda. Após, um cateter acoplado a uma bomba de perfusão foi inserido na porção distal da aorta. O fluxo sanguíneo foi interrompido por meio de ligadura e o rim esquerdo foi perfundido com solução Krebs-Henseleit (em mM, NaCl 131,3; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,18; MgSO₄.7H₂O 1,17; NaHCO₃ 14,9; Dextrose 5,5; CaCl₂.2H₂O 1,6; EDTA 0,08). O órgão foi removido da cavidade abdominal e inserido a um sistema de perfusão, com fluxo de 4 ml/min, 37°C, aerado com mistura carbogênica (95% O₂/5% CO₂) e acoplado a um transdutor de pressão. Após o período de estabilização (1 h), foi realizada uma curva concentração-resposta para fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico). Foram utilizadas concentrações de 3, 10 e 30 nmol, dadas em intervalos de 15 min. Alterações na pressão de perfusão vascular renal (PPVR, em mmHg) foram registradas e os estados contráteis dos vasos foram determinados através de um sistema de aquisição (modelo PowerLab, AD Instruments, Austrália).

3.7 ANÁLISES MOLECULARES

3.7.1 Western blot

3.7.1.1 Protocolos experimentais

As análises por Western blot foram realizadas em animais naive e em animais submetidos a sepse por CLP ou por pneumonia. Os animais submetidos a sepse por CLP foram tratados ou não com 1400W (1 mg/Kg) ou aminoguanidina (50 mg/Kg; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), 30 min antes e 12 h após a cirurgia. Amostras do rim,

fígado, pulmão e coração foram coletadas 6, 12 e 24 h após a indução da sepse.

Em outro grupo experimental, fêmeas foram tratadas com S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP; 10 mg/Kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos) e após 4 h amostras do rim foram obtidas.

Todos os animais foram anestesiados com uma solução composta por cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg), administrada por via i.p. e perfundidos, via intracardíaca, com solução salina 0,9% a 4°C. Os órgãos foram coletados e congelados, imediatamente, em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

3.7.1.2 Preparo de amostras

Para o preparo das amostras, os tecidos congelados foram pulverizados e homogeneizados em tampão de lise [coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), ortovanadato 100 mM, fluoreto de fenil-metano-sulfonil (PMSF) 100 mM em T-Per (do inglês, *Tissue protein Extraction Reagent*; Thermo Scientific, Rockford, IL, Estados Unidos)], por 1 h, a 4°C, seguido por sonicação (60 Watts, 5 seg). Os homogenatos foram centrifugados a 10000 g, por 20 min, a 4°C e o sobrenadante foi obtido. Em seguida, foi separada uma alíquota do sobrenadante para dosagem de proteínas e o restante foi misturado com tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas (95°C; 8 min) e armazenadas a -20°C até o momento da eletroforese. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando uma curva padrão de BSA, em duplicata, para interpolação dos resultados.

3.7.1.3 Separação de proteínas e imunodeteção

Para separação de proteínas, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Foi utilizado um gel de separação de 10% e um gel de entrada de 5%. As amostras (100 µg/poço) e o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, Estados Unidos) foram aplicados nos géis. A eletroforese foi realizada em cuba específica, contendo tampão de corrida com voltagem fixa de 90 V, por aproximadamente 3 horas. Após a

eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose. A transferência de proteínas foi realizada em um aparato de eletrotransferência contendo tampão de transferência no sentido do polo negativo para o polo positivo, com uma voltagem fixa de 100 V, durante 1 h, a 4°C. Em seguida, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau 0,2% (v/v) em ácido tricloroacético 3% (v/v) para visualização das proteínas e para controle de carregamento. Para retirada do excesso do corante, as membranas foram lavadas três vezes (10 min), sob agitação, com TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, contendo 0,05% (v/v) de Tween 20, pH 7,5). Então, as possíveis ligações inespecíficas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em TBS-T, durante 1 h, em temperatura ambiente, sob agitação. Depois, as membranas foram incubadas por 18 h, a 4 °C, com os anticorpos primários específicos: policlonal coelho anti-GRK2 (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos), monoclonal camundongo anti- α -actina (1:45000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, Estados Unidos) e monoclonal camundongo anti-NOS-2 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). Foram realizadas três lavagens (10 min), sob agitação, com TBS-T e os anticorpos secundários conjugados à peroxidase específicos para cada anticorpo primário foram incubados (cabra anti-coelho ou cavalo anti-camundongo; ambos usados na concentração de 1:5000 (CellSignalling Tech, Danvers, MA, Estados Unidos).

Novamente, foram realizadas lavagens e os imunocomplexos foram revelados usando um sistema de detecção de substrato quimioluminescente, Super Signal West Femto (Thermo Scientific, Rockford, IL, Estados Unidos). As membranas foram expostas ao sistema de fotodocumentação ChemiDoc MP e as análises foram realizadas utilizando o ImageLab™ Software (ambos da empresa Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, Estados Unidos). Os resultados foram determinados através da quantificação da densidade óptica das bandas, normalizados utilizando os valores obtidos para as bandas de α -actina ou coradas com vermelho de Ponceau (ROMERO-CALVO et al., 2010) e expressos graficamente como unidades arbitrárias.

3.7.2 Ensaio de ligação de receptor α_1 adrenérgico

Para avaliar a densidade de receptores α_1 adrenérgicos, os animais foram submetidos ao CLP e, após 24 h, o rim e o fígado foram coletados. Animais naïve e sépticos foram anestesiados com uma solução composta

por cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg), administrada por via i.p. Após, foi realizada perfusão transcardíaca com solução salina 0,9%, durante 10 min, seguida de solução de formaldeído tamponado (PFA 4% em PBS), durante 5 min. As amostras foram coletadas e fixadas em PFA 4% em PBS (24 h; a temperatura ambiente) e imersos em solução crioprotetora de sacarose 30% (24 h a 4°C). Em seguida, os órgãos foram incluídos em blocos de Tissue-Tek O.C.T (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, Estados Unidos) e congelados a -80°C. Secções transversais, com espessura de 5 µm, foram obtidas com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850 UV; Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), colocadas em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) e fixadas com acetona, por 5 min, a -20°C. As secções foram imersas em uma solução de metanol com peróxido de hidrogênio 3% por 20 min, a temperatura ambiente lavadas com PBS. Os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) e incubados com um antagonista α_1 adrenérgico fluorescente, BODIPY® FL prazosina (QAPB; Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos), 250 nM, por 1 h, a temperatura ambiente e com DAPI (Sigma-Aldrich, St Loius, MO, Estados Unidos), por 5 min, a temperatura ambiente. Como um controle de seletividade do QAPB, nas secções dos animais controles, foi utilizado um antagonista α_1 adrenérgico não fluorescente, hidrocloreto de prazosina (PNF; Sigma-Aldrich, St Loius, MO, Estados Unidos). Após estabelecido o equilíbrio da ligação do QAPB (1 h), as secções foram incubadas com PNF (250 µM, 1 h, a temperatura ambiente). Finalmente, as seções foram lavadas com PBS e lamínulas foram colocadas sobre as lâminas utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos). Lâminas sem a presença de ligantes foram utilizadas para controle da autofluorescência do tecido. Para a leitura, foi utilizado o microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000B®) e as imagens foram capturadas através do software LAS AF Lite® (ambos da empresa Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Alemanha). Foram realizados pelo menos três cortes de cada tecido (n = 3 a 5) e adquiridas imagens de três regiões diferentes em cada seção. A intensidade de fluorescência foi quantificada usando o software ImageJ® (versão 1.36b; NIH; Bethesda, MD, Estados Unidos) e os valores foram expressos como unidades arbitrárias.

3.7.3 Imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para dupla marcação de GRK2 e I-CAM (do inglês, *Intercellular adhesion molecule-1*) em rim de animais naïve e sépticos, 24 h após a cirurgia de CLP. Os cortes foram obtidos conforme descrito em 3.7.2. Após fixação com acetona (5 min; a -20°C), as secções foram imersas em uma solução de metanol com peróxido de hidrogênio 3% (20 min; a temperatura ambiente) e lavadas com PBS. Os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica e as possíveis ligações inespecíficas foram bloqueadas com soro de albumina bovina 5% (BSA), por 1 h, a temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas com os anticorpos primários policlonal coelho anti-GRK2 e policlonal cabra anti-I-CAM, por 18 h, a 4°C. Ambos os anticorpos primários foram usados na concentração de 1:50 e foram obtidos na empresa Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, Estados Unidos), por 18 h a 4°C. Então, as secções foram lavadas com uma solução de PBS-Tween 0,1% por três vezes de 5 min e incubadas com o anticorpo secundário macaco anti-cabra alexa fluor 594, por 1 h, a temperatura ambiente. Foi realizada lavagem com solução de PBS-Tween 0,1 % por três vezes de 5 min e foi incubado o anticorpo secundário cabra anti-coelho alexa fluor 488, por 1 h, a temperatura ambiente. Ambos os anticorpos secundários foram utilizados na concentração de 1:2000 e obtidos da empresa Thermo Scientific (Rockford, IL, Estados Unidos). Novamente, foi realizada a lavagem e o núcleo das células foi corado com DAPI, por 5 min, a temperatura ambiente. Como controles negativos, foram utilizadas lâminas contendo apenas os anticorpos secundários e lâminas sem a presença de nenhum anticorpo foram usadas para descontar a autofluorescência do tecido. Finalmente, as secções foram lavadas e lamínulas foram colocadas sobre as lâminas utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™. A análise de imagens seguiu conforme descrito no item 3.7.2.

3.7.4 Cultura celular

Neste trabalho, foram utilizadas células das linhagens HEK293 (células embrionárias de rim humano; ATCC CRL-1573) e MDCK (células Madin-Darby de rim de cachorro; ATCC CCL-34). As células foram cultivadas em placas de Petri descartáveis, próprias para cultura, contendo meio DMEM suplementado com 10% (v/v) de BSA, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina, 2 mM de glutamina e 10 mM

de HEPES, pH 7,4 (doravante chamado apenas de DMEM completo) e mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram cultivadas sendo os repiques realizados a cada 2 a 3 dias, tempo aproximado para as células tornarem-se confluentes.

Para a realização dos repiques todo meio de cultura foi removido e as placas foram lavadas com 6 ml de PBS estéril pré-aquecido. Após a remoção do PBS, cada placa recebeu 1 ml de solução de tripsina (0,25% v/v)/EDTA (0,03% v/v) pré-aquecida a 37°C. Após a digestão enzimática com leve agitação da placa, as células foram transferidas para um tubo cônico contendo 1 ml de DMEM completo que foi centrifugado por 10 minutos à temperatura ambiente (250 g). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 1 ml de DMEM completo, o qual foi utilizado para contagem do número de células, preparação do protocolo experimental e manutenção da cultura adicionando uma alíquota da suspensão de células em uma nova placa de Petri acrescida de 9 ml de DMEM completo pré-aquecido.

Para o protocolo experimental, as células foram incubadas em meio com SNAP (100 nM), durante 12 horas. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram preparadas para análise por Western blot. Para isso, as células foram homogeneizadas em tampão de lise, durante 15 min, a 4°C e transferidas para eppendorfs com o auxílio de um raspador. Os eppendorfs foram mantidos no gelo, durante 40 min e, em seguida, centrifugados (10000 g; 15 min; 4°C). Após, foi separada uma alíquota do sobrenadante para dosagem de proteínas e o restante foi misturado com tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas (95°C; 8 min) e armazenadas a -20 °C até o momento da eletroforese. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando uma curva padrão de BSA, em duplicata, para interpolação dos resultados. A eletroforese e a imunodeteção foram realizadas conforme descrito no item 3.7.1.3 para GRK2.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos de maneira singular para cada protocolo experimental, e as análises estatísticas realizadas de acordo com a necessidade e pertinência.

A curva de sobrevida foi analisada pelo teste de log-rank e a diferença entre as curvas representativas de cada grupo experimental foi

considerada significativamente diferente quando $p \leq 0,05$. Os demais resultados foram expressos como a média + erro padrão da média (E.P.M) e foram empregados o teste de Student, a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo *post-hoc* de Tukey ou Dunnett e ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni de múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos e todos os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism® versão 7.0 (San Diego, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA APÓS A CIRURGIA DE CLP

Buscando a padronização do modelo de CLP e a adequação do quadro de sepse, bem como a reprodutibilidade do modelo, realizamos uma curva de avaliação da sobrevida em camundongos.

Os animais foram submetidos a cirurgia de CLP e, ao final de 24h, observamos uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50%. Após 96 h, apenas 20% dos animais sobreviveram. No grupo controle da cirurgia (*Sham*) não houve mortalidade, conforme pode ser observado na Figura 4.

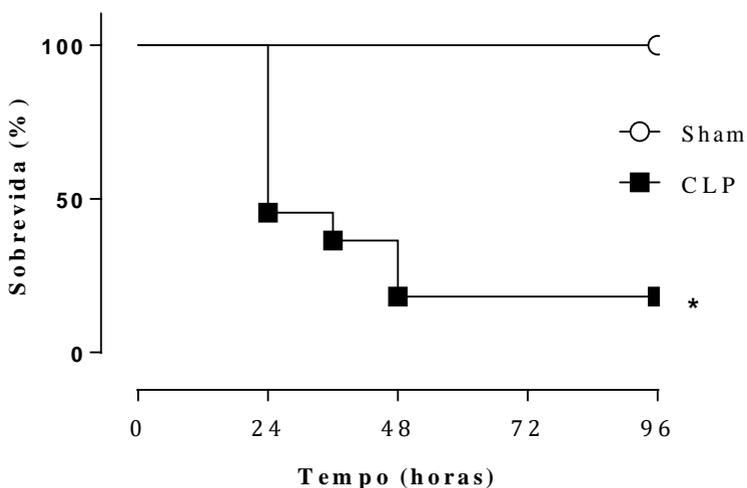


Figura 4: Curva de sobrevivência após a cirurgia de CLP. Após a indução da sepse, a sobrevivência foi avaliada por até 96 h. O grupo controle (*Sham*) passou pelo mesmo procedimento cirúrgico, porém sem a ligadura e a perfuração do ceco. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência e representam 2 experimentos independentes; teste de Log-rank; * $p < 0,05$ comparado com o grupo *Sham*; $n = 10$.

4.2 ANÁLISE DO DANO DE ÓRGÃOS

4.2.1 Mensuração dos níveis de ALT e AST

As enzimas AST e ALT são importantes biomarcadores, principalmente, da atividade hepática. Nos animais submetidos a sepse notamos um aumento nos níveis plasmáticos de AST e ALT, quando comparados com o grupo controle (naïve), conforme exposto na Figura 5.

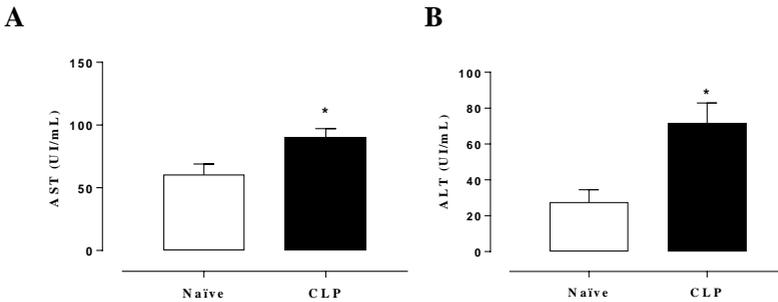


Figura 5. Dosagem plasmática de AST e ALT em camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. O plasma foi obtido 24 h após a cirurgia de CLP e foram dosados os níveis de AST (painel A) e ALT (painel B). As barras representam a média + E.P.M e os valores foram expressos como UI/ml; teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Naïve). Os gráficos representam a análise de 2 experimentos independentes; $n = 5$.

4.2.2 Mensuração dos níveis de creatinina e ureia

A creatinina e a ureia são biomarcadores que se acumulam no sangue quando há lesão ou diminuição no processo de filtração. Com base nesse conhecimento, verificamos que há um aumento nos valores plasmáticos de creatinina e de ureia em animais sépticos, quando comparados ao grupo controle (Figura 6).

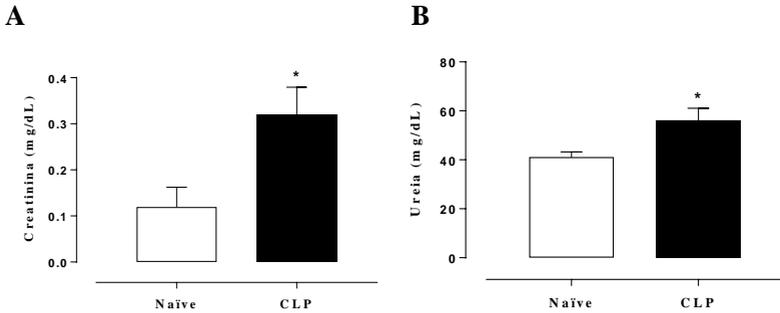


Figura 6. Dosagem plasmática de creatinina e ureia em camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. O plasma foi obtido 24 h após a cirurgia de CLP e foram dosados os níveis de creatinina (painel A) e ureia (painel B). As barras representam a média + E.P.M e os valores foram expressos como mg/dl; teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (Naive). Os gráficos representam a análise de 2 experimentos independentes; n = 5.

4.3 REATIVIDADE VASCULAR RENAL À FENILEFRINA NA SEPSE

A sepse gera um quadro de hiporreatividade a agentes vasoconstritores, como noradrenalina, adrenalina e fenilefrina. Porém, em contraste com esta disfunção, o leito renal apresenta resposta normal ou aumentada a estes agentes. Desta forma, investigamos a reatividade vascular renal à fenilefrina (agonista α_1 adrenérgico), 24 h após a indução da sepse no modelo de CLP.

Observamos que as alterações na pressão de perfusão vascular renal, induzidas pela fenilefrina, foram semelhantes entre os grupos séptico e naive. Isto é, quando comparamos a resposta à fenilefrina entre os grupos, não houve diferença significativa em nenhuma das concentrações utilizadas (3, 10 e 30 nmol). A resposta basal média da vasculatura renal foi de 42 mmHg em ambos os grupos. A Figura 7 demonstra a resposta máxima à fenilefrina (30 nmol) na vasculatura renal.

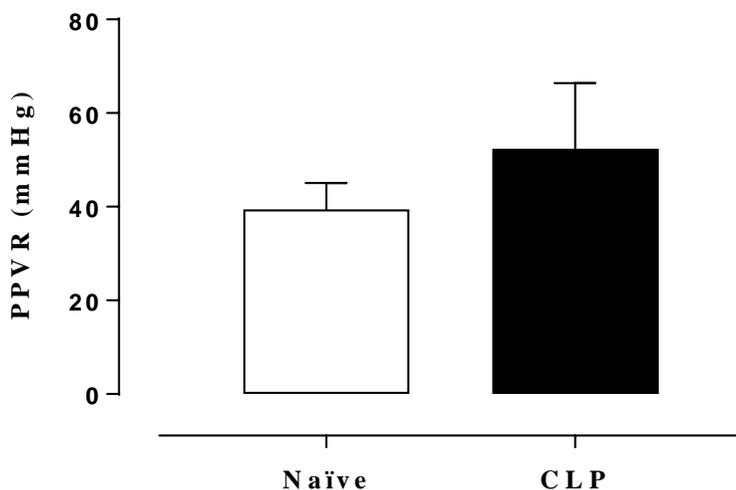


Figura 7. Resposta máxima à fenilefrina na vasculatura renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. O efeito da fenilefrina na vasculatura renal foi avaliado 24 h após a cirurgia de CLP e as alterações na pressão de perfusão vascular renal (PPVR) foram expressas em mmHg. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; não houve diferença estatística entre os grupos (naïve e CLP), $p > 0,05$; $n = 4$.

4.4 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE GRK2 NA SEPSE

4.4.1 Avaliação temporal do nível de GRK2 renal no modelo de sepse por CLP

Com a finalidade de melhor compreender os mecanismos envolvidos nas respostas vasculares renais, realizamos uma análise temporal da quantidade de GRK2 renal durante a evolução do quadro de sepse. Como observado na Figura 8, constatamos que ocorre uma diminuição do conteúdo renal de GRK2 a partir de 6 h após a indução da sepse polimicrobiana, persistindo nos tempos de 12 e 24 h.

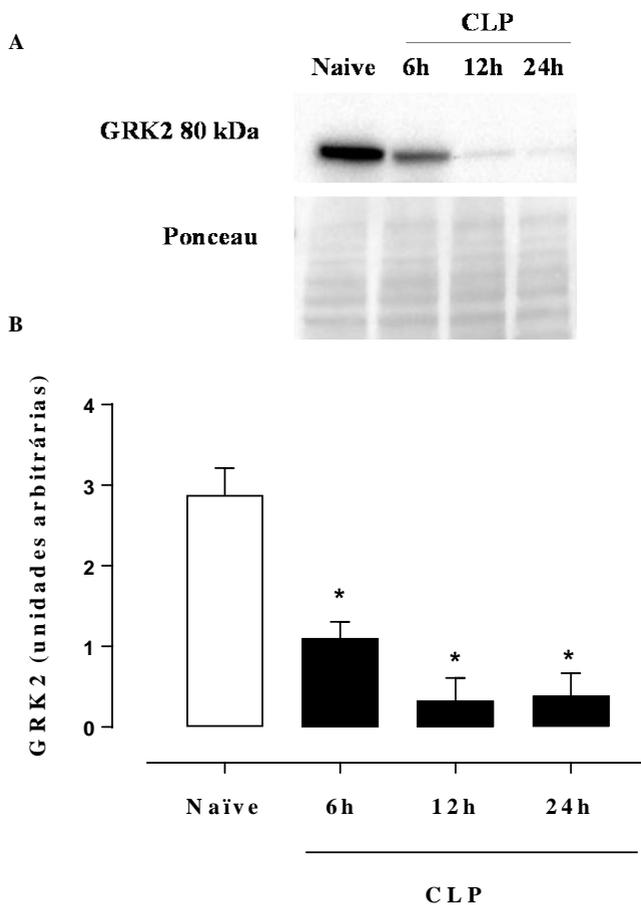


Figura 8. Avaliação temporal do nível de GRK2 em tecido renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. Imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 renal no modelo de sepse por CLP (painel A) e representação gráfica dos níveis de GRK2 (painel B) nos tempos 6, 12 e 24 h após a indução da sepse. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Dunnett; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Naïve). O gráfico representa a análise de 3 experimentos independentes; $n = 6$.

4.4.2 Análise dos níveis de GRK2 renal em dois modelos de sepse

Em vista do resultado anterior, delineamos os próximos experimentos no tempo de 24 h após a indução da sepse.

Os níveis de GRK2 foram avaliados no tecido renal de animais submetidos à sepse por CLP ou por pneumonia. Na Figura 9 é possível observar que houve uma diminuição nos níveis de GRK2 renal em ambos os modelos de sepse utilizados.

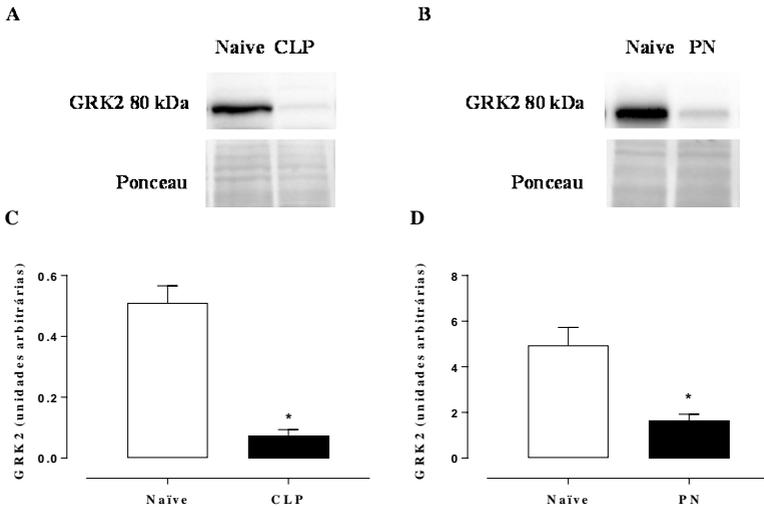
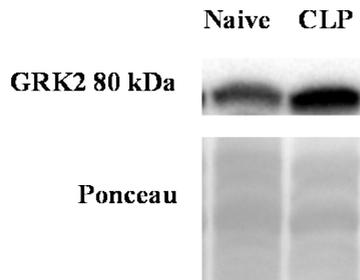


Figura 9. Análise dos níveis de GRK2 em tecido renal de camundongos sépticos. Representação gráfica dos níveis de GRK2 renal e imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 renal no modelo de sepse por CLP (painel A e C) e por pneumosepse (painel B e D), 24 h após a indução da sepse. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Naïve). Os gráficos representam a análise de 3 experimentos independentes; $n = 6$.

4.4.3 Análise do nível de GRK2 no coração

Com o propósito de verificar a reprodutibilidade dos dados prévios do laboratório, realizamos a análise do conteúdo de GRK2 no coração. Os dados apresentados na Figura 10 evidenciam que ocorre um aumento no nível de GRK2 durante a sepse polimicrobiana.

A



B

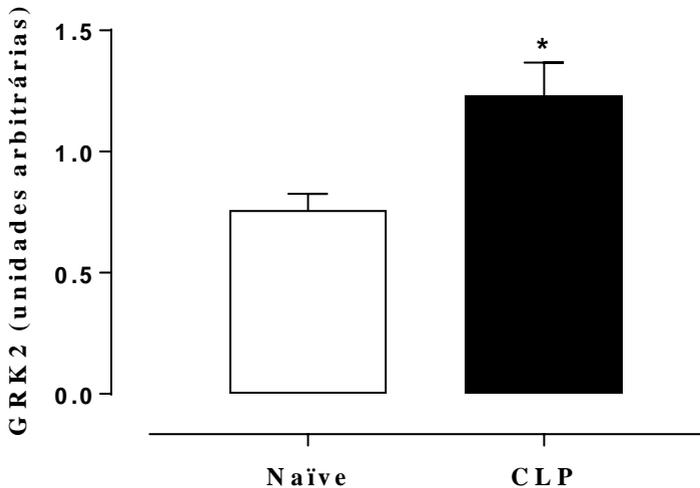


Figura 10. Análise do nível de GRK2 no coração de camundongos submetidos a sepsé polimicrobiana. Imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 no coração no modelo de sepsé por CLP (painel A) e representação gráfica dos níveis de GRK2 (painel B), 24 h após a indução da sepsé. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; testes *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Naive). O gráfico representa a análise de 2 experimentos independentes; $n = 4$.

4.4.4 Análise do nível de GRK2 no pulmão

Quando investigamos o pulmão de camundongos submetidos à sepse polimicrobiana, notamos que a quantidade de GRK2 é menor, quando comparada com animais naïve (Figura 11).

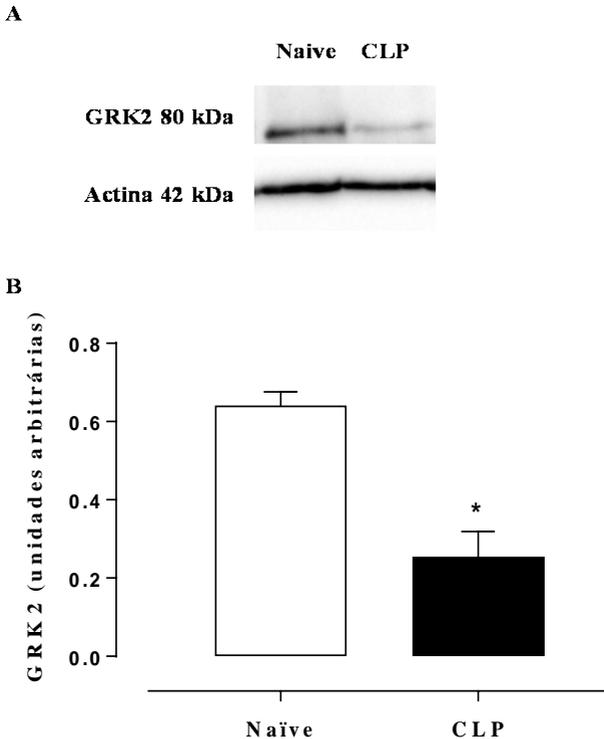


Figura 11. Análise do nível de GRK2 no pulmão de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. Imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 no pulmão no modelo de sepse por CLP (painel A) e representação gráfica dos níveis de GRK2 (painel B), 24 h após a indução da sepse. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (Naive). O gráfico representa a análise de 1 experimento; n = 3.

4.4.5 Análise dos níveis de GRK2 no fígado em dois modelos de sepse

Investigamos a quantidade de GRK2 no fígado nos modelos de sepse por CLP e por pneumonia. As análises apontaram que não há uma diferença significativa no conteúdo de GRK2 no fígado entre os animais sépticos e naïve (Figura 12).

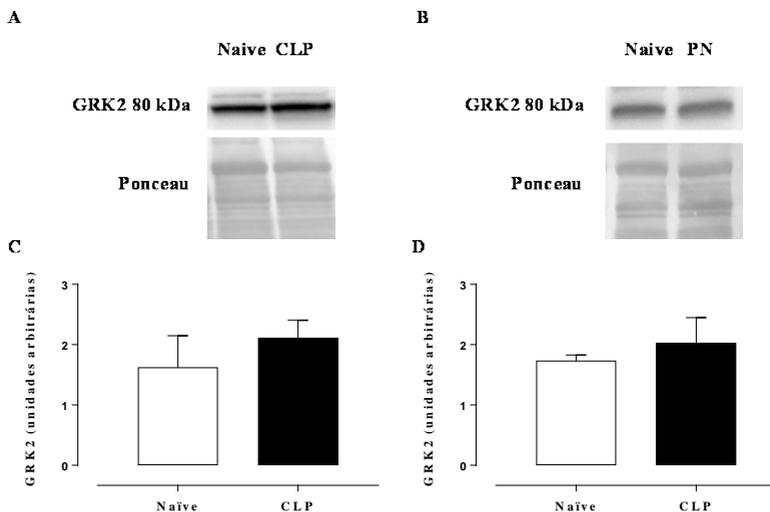


Figura 12. Análise dos níveis de GRK2 no fígado de camundongos sépticos. Representação gráfica dos níveis de GRK2 no fígado e imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 no fígado no modelo de sepse por CLP (painel A e C) e por pneumosepse (painel B e D), 24 h após a indução da sepse. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M.; teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (Naïve). Os gráficos representam a análise de 2 experimentos independentes; *n* = 4.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE NOS-2

Sabemos que o NO é um importante marcador na sepse, principalmente em termos da atividade de NOS-2, pois está relacionado com a hipotensão e a com a hiporreatividade a vasoconstritores observadas na doença. Assim, nosso próximo objetivo foi investigar a expressão de NOS-2 no tecido renal e como podemos observar na Figura

13, há um aumento na expressão de NOS-2 no tecido renal de animais sépticos.

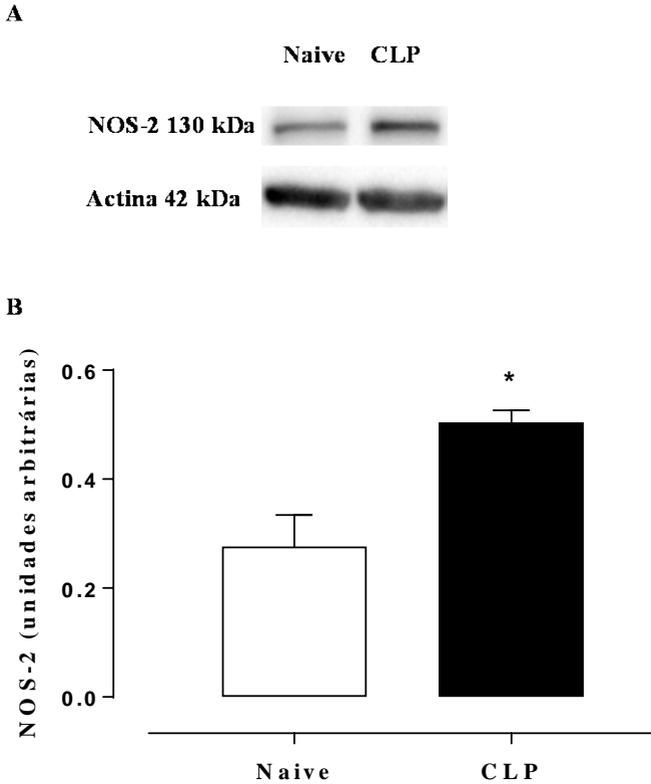


Figura 13. Análise da expressão de NOS-2 no rim de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. Imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para NOS-2 no rim no modelo de sepse por CLP (painel A) e representação gráfica dos níveis de NOS-2 (painel B), 24 h após a indução da sepse. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Naïve). O gráfico representa a análise de 3 experimentos independentes; $n = 4$.

4.6 MENSURAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NITRITO E NITRATO (NOx)

Com base no resultado anterior, avaliamos a produção de NO em camundongos submetidos à sepse polimicrobiana. Verificamos que houve um aumento nos níveis dos metabólitos de NO, nitrato e nitrito (NOx), no plasma de animais sépticos, a partir de 6h após a cirurgia de CLP. Na Figura 14, podemos observar que os valores de NOx permaneceram elevados nos tempos de 12 e 24 h, quando comparados com animais naïve.

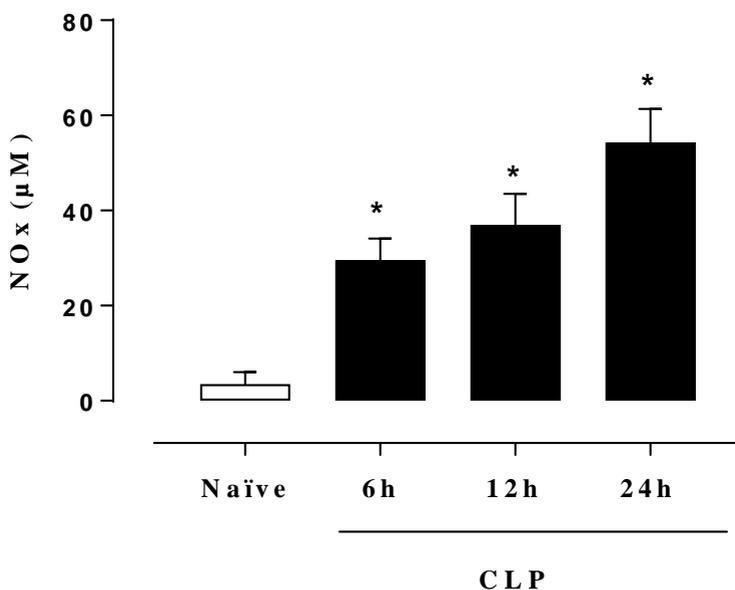


Figura 14. Mensuração de nitrito e nitrato (NOx) no plasma de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. O plasma foi coletado 6, 12 e 24 h após a cirurgia de CLP e processado para quantificação de NOx pelo método de Griess. Os valores obtidos foram expressos em µM. As barras representam a média + E.P.M; ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Dunnett; *p< 0,05 comparado com o grupo controle (Naïve). Os gráficos representam a análise de 2 experimentos independentes; n = 6.

4.7 AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM INIBIDOR DA NOS

Em vista do aumento da expressão de NOS-2 renal e do aumento de NOx plasmático, nossa próxima pergunta foi se o NO, proveniente desta isoforma, estaria interagindo com a GRK2 no tecido renal.

4.7.1 Efeito do tratamento com 1400W nos níveis de NOx

Inicialmente, avaliamos a inibição da isoforma NOS-2 renal através do tratamento com 1400W. Com a finalidade de ratificar o efeito do 1400W, realizamos a análise dos níveis de NOx no plasma. Os animais foram tratados com 1400W, 30 min antes e 12 h após a cirurgia de CLP.

Os dados apresentados na Figura 15 mostram que o tratamento com 1400W inibiu a produção de NOx nos animais submetidos a sepse polimicrobiana.

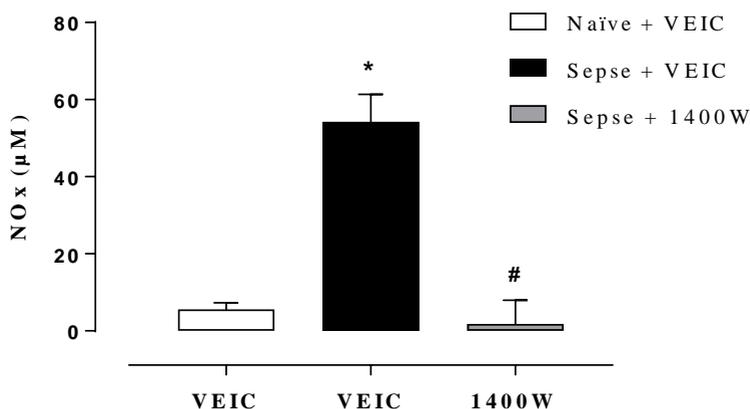


Figura 15. Efeito do tratamento com 1400W nos níveis plasmáticos de nitrito e nitrato (NOx) de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. O plasma foi coletado 24 h após a cirurgia de CLP e processado para quantificação de NOx pelo método de Griess; VEIC = veículo. Os valores obtidos foram expressos em µM. As barras representam a média + E.P.M; ANOVA de duas vias, seguida pelo *post hoc* de Bonferroni de múltiplas comparações; * $p < 0,05$ comparado com o grupo Naive + VEIC e # $p < 0,05$ comparado com grupo CLP + VEIC. O gráfico representa a análise de 2 experimentos independentes; $n = 6$.

4.7.2 Efeito do tratamento com 1400W na expressão de NOS-2

Em vista do dado anterior, nosso próximo objetivo foi avaliar se o tratamento com 1400W teria efeito sobre a expressão de NOS-2 no rim destes animais. Desta forma, encontramos que o 1400W reduz a expressão de NOS-2 no rim de animais sépticos (Figura 16).

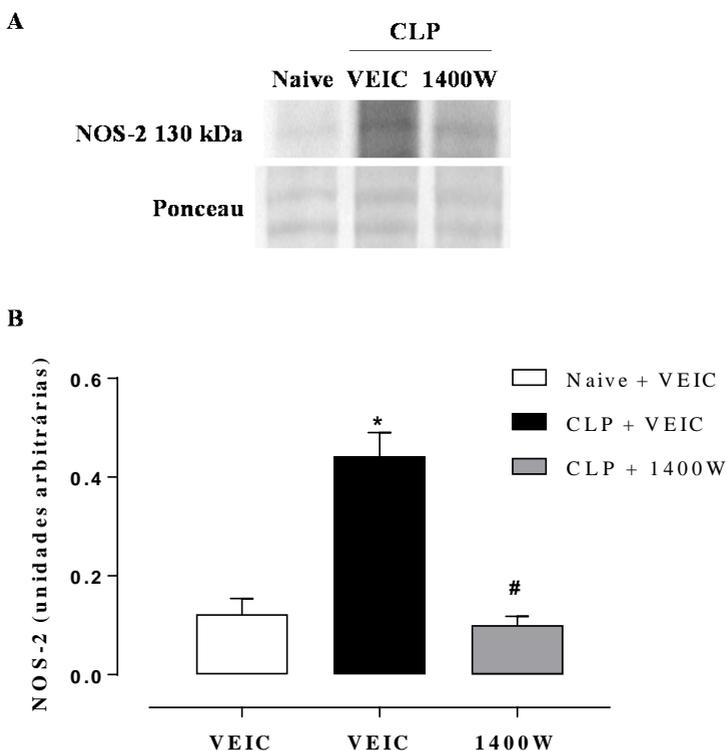


Figura 16. Efeito do tratamento com 1400W na expressão de NOS-2 em tecido renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. Imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para NOS-2 no rim no modelo de sepse por CLP (painel A) e representação gráfica dos níveis de NOS-2 (painel B), 24 h após a indução da sepse. VEIC = veículo. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; ANOVA de duas vias, seguida pelo *post hoc* de Bonferroni de múltiplas comparações; * $p < 0,05$ comparado com o grupo Naive + VEIC e # $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP + VEIC. O gráfico representa a análise de 3 experimentos independentes; $n = 4$.

4.7.3 Efeito do tratamento com 1400W no conteúdo de GRK2 renal

Analisamos o efeito da inibição da NOS-2 no nível de GRK2 renal. Observamos que o tratamento com 1400W não alterou o conteúdo de GRK2 durante o quadro de sepse. Isto é, a inibição da NOS-2 não restaurou os níveis de GRK2 no rim de animais sépticos (Figura 17).

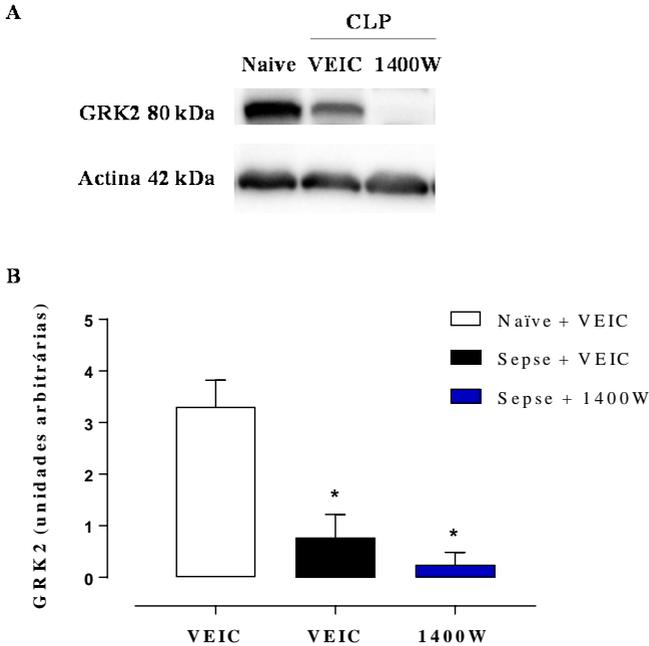


Figura 17. Efeito do tratamento com 1400W no conteúdo de GRK2 em tecido renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. Imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 no rim no modelo de sepse por CLP (painel A) e representação gráfica dos níveis de GRK2 (painel B), 24 h após a indução da sepse. VEIC = veículo. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; ANOVA de duas vias, seguida pelo *post hoc* de Bonferroni de múltiplas comparações; * $p < 0,05$ comparado com o grupo Naive + VEIC. O gráfico representa a análise de 3 experimentos independentes; $n = 3-4$

4.7.4 Efeito do tratamento com Aminoguanidina no conteúdo de GRK2 renal

Após constatarmos que o tratamento com 1400W não alterou o nível de GRK2 no rim séptico, decidimos investigar se esse efeito poderia ser resultado de uma ação indireta do composto ou se realmente era representativo da inibição da NOS-2. Por isso, realizamos o tratamento com aminoguanidina. Analisando os dados da Figura 18, notamos que a inibição da NOS-2, com aminoguanidina, restaurou o nível de GRK2 no rim séptico.

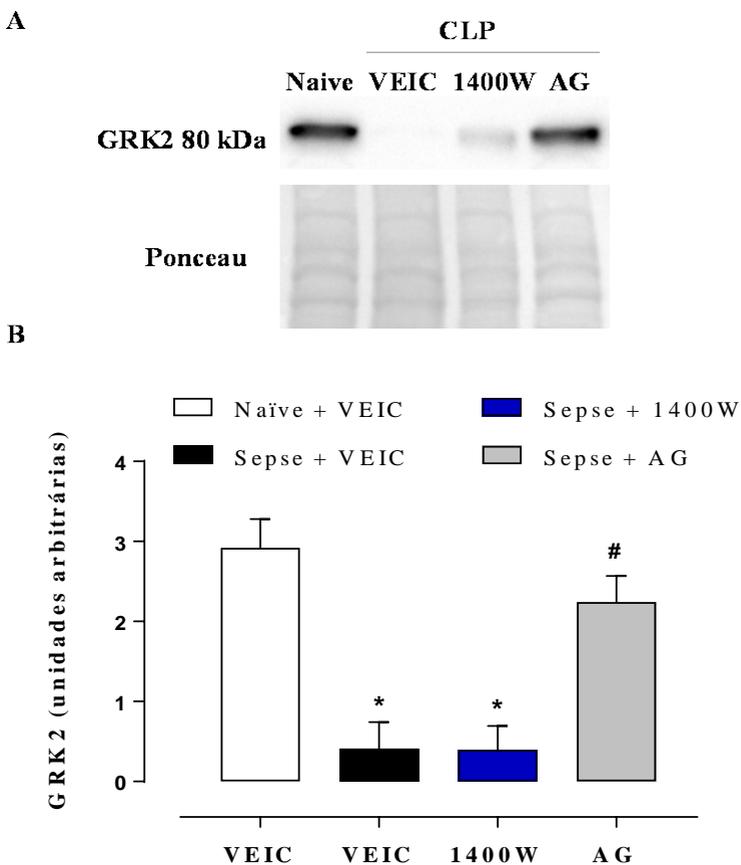


Figura 18. Efeito do tratamento com aminoguanidina no conteúdo de GRK2 renal de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana. Imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 no rim no modelo de sepse por CLP (painel A) e representação gráfica dos níveis de GRK2 (painel B), 24 h após a indução da sepse. VEIC = veículo; AG = aminoguanidina. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; ANOVA de duas vias, seguida pelo *post hoc* de Bonferroni de múltiplas comparações; * $p < 0,05$ comparado com o grupo Naive + VEIC e # $p < 0,05$ comparado com o grupo CLP + VEIC. O gráfico representa a análise de 1 experimento; $n = 4$.

4.8 EFEITO DO TRATAMENTO COM DOADOR DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE A GRK2 RENAL

Com a evidência de que a inibição da produção de NO, através do tratamento com aminoguanidina, altera o conteúdo de GRK2 renal, delineamos o próximo experimento, onde, animais naïve foram tratados com SNAP e, após 4 h, amostras do rim foram coletadas.

Conforme exposto na Figura 19, o tratamento com o doador de NO resultou na diminuição do nível de GRK2 renal.

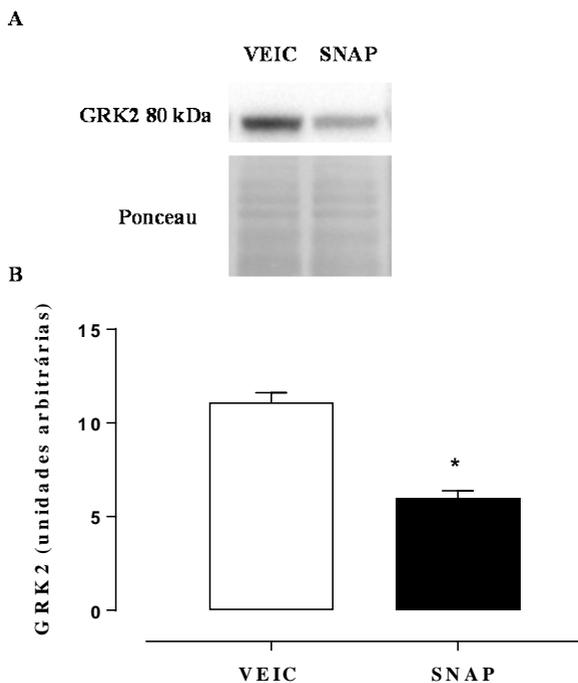


Figura 19. Efeito do tratamento com SNAP no conteúdo de GRK2 renal. Imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 (painel A) e representação gráfica dos níveis de GRK2 (painel B), 4 h após a administração de SNAP em animais naïve. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo que recebeu apenas o veículo. Os gráficos representam a análise de 2 experimentos independentes; $n = 4$.

4.9 ANÁLISE DE GRK2 RENAL POR IMUNOFLUORESCÊNCIA

Buscando demonstrar que a sepse promove uma diminuição do conteúdo de GRK2 renal e confirmar esse achado, utilizamos a técnica de imunofluorescência. Esse experimento nos permitiu visualizar, com mais clareza, que a GRK2 é modulada negativamente no rim de animais sépticos (Figura 20).

Também, na tentativa de caracterizar o perfil de distribuição da GRK2 no tecido renal, utilizamos a marcação com I-CAM, objetivando destacar o endotélio renal. As imagens de microscopia confocal, apresentadas na figura 21, nos mostram que a GRK2 está co-localizada com a I-CAM em diversas regiões do tecido.

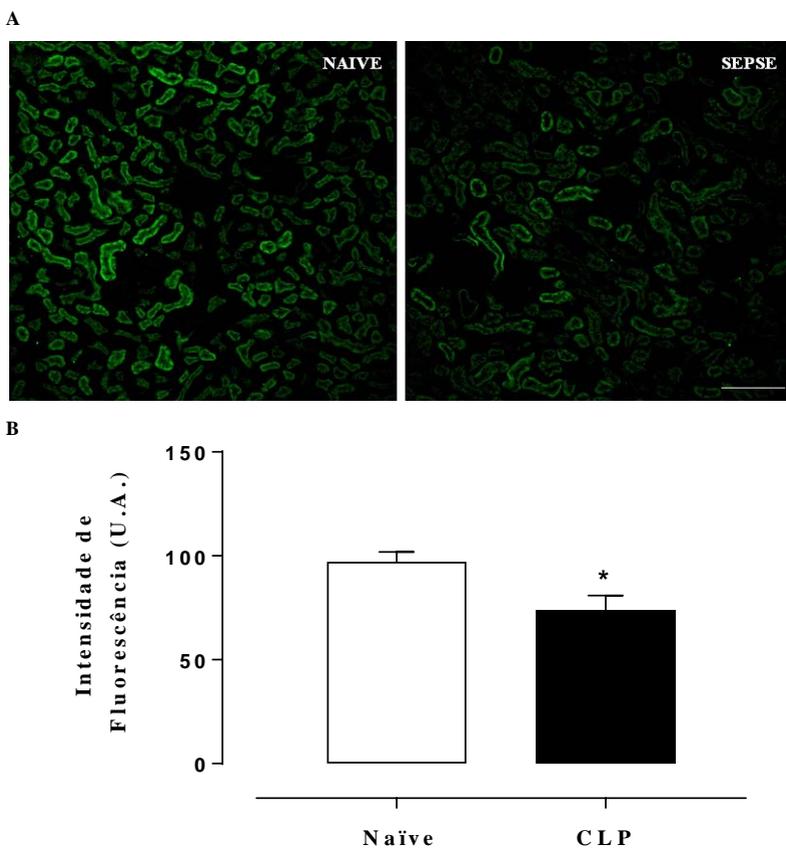
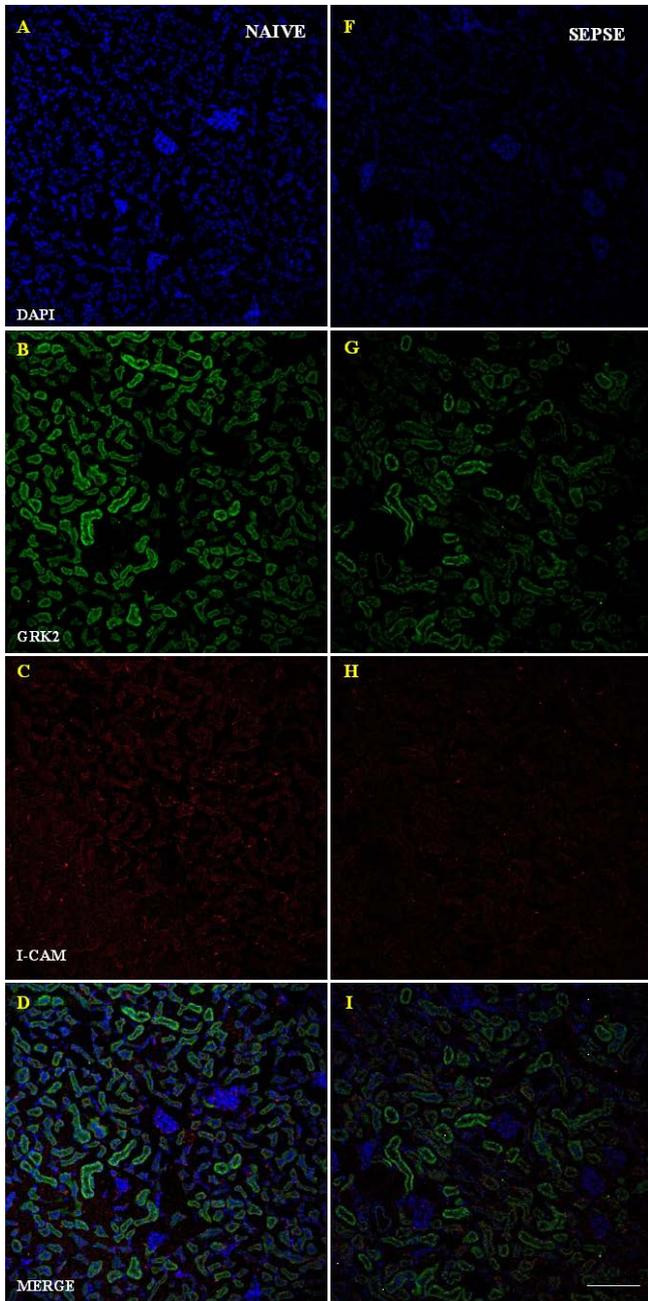


Figura 20. Análise por imunofluorescência do conteúdo renal de GRK2 em animais submetidos a sepse polimicrobiana. Imagens representativas da marcação de GRK2 (painel A) e representação gráfica da intensidade de fluorescência de GRK2 (painel B) no rim, 24 h após a indução da sepse polimicrobiana. U.A. = unidades arbitrárias. As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscopia confocal; escala de 100 μ M; aumento de 200x. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Naïve). O gráfico representa a análise de 2 experimentos independentes, $n = 4$.



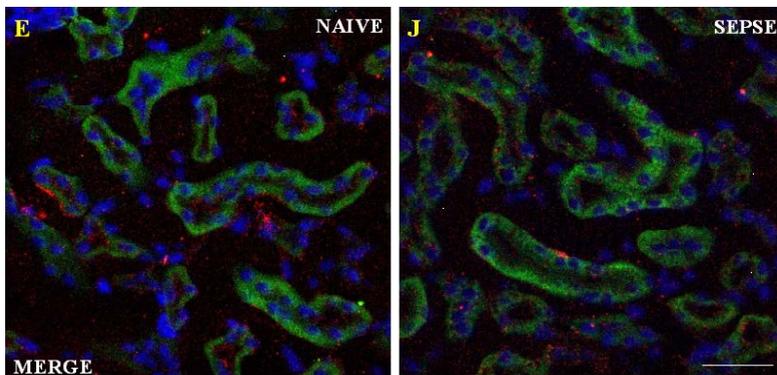


Figura 21. Avaliação da distribuição de GRK2 no tecido renal em camundongos naïve e sépticos. Imagens representativas da técnica de imunofluorescência para DAPI (azul), GRK2 (verde) e I-CAM (vermelho) em tecido renal de animais naïve (painéis A, B e C) e sépticos (painéis F, G e H), 24 h após a cirurgia de CLP. Os painéis D e I representam a co-localização entre azul, verde e vermelho no aumento de 200x (escala de 100 μM) e os painéis E e J, no aumento de 800x (escala de 20 μM). As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscopia confocal; foram realizados 2 experimentos independentes; n = 3.

4.10 ANÁLISE DOS NÍVEIS DE GRK2 EM EPITÉLIO RENAL

Os dados encontrados até aqui, sugerem que a produção de NO modula negativamente o conteúdo de GRK2 no rim de animais sépticos. Da mesma forma, as análises de imunofluorescência demonstraram que existem regiões de co-localização entre a GRK2 e o marcador do endotélio (I-CAM).

Desta forma, na tentativa de melhor investigar se a regulação negativa da GRK2 estaria acontecendo nas células do epitélio renal ou na vasculatura, planejamos um ensaio com células das linhagens HEK293 e MDCK, que possuem características similares ao epitélio renal. Para isso, as células foram incubadas com SNAP, 100 μM , durante 12 h. Nesse experimento, visualizamos que o tratamento com o SNAP não promove nenhuma alteração significativa no conteúdo de GRK2 (Figura 22).

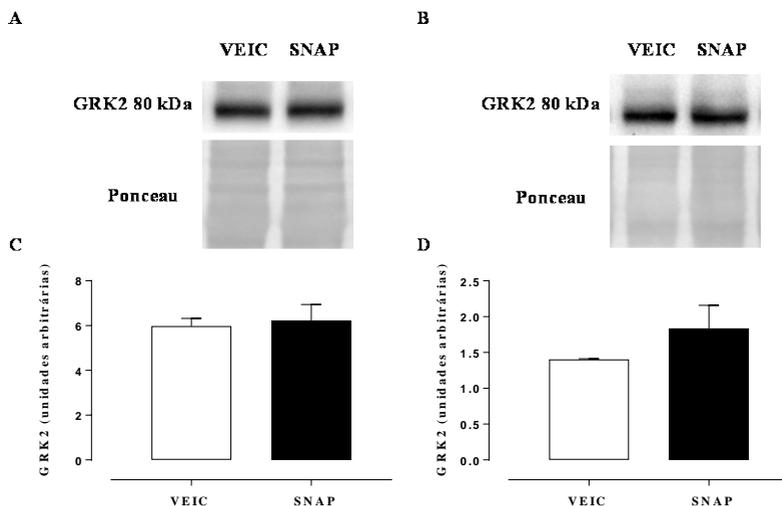


Figura 22. Efeito do tratamento com SNAP no conteúdo de GRK2 em células HEK293 e MDCK. Representação gráfica dos níveis de GRK2 e imagens representativas das bandas obtidas por Western blot para GRK2 em células HEK293 (painel A e C) e em células MDCK (painel B e D), 12 h após o tratamento com SNAP (100 μ M). VEIC = veículo. A densidade das bandas foi medida através do programa ImageJ® e expressa como unidades arbitrárias. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (VEIC). Os gráficos representam a análise de 1 experimento em triplicata.

4.11 AVALIAÇÃO DA DENSIDADE DE RECEPTORES α_1 ADRENÉRGICOS

A fim de validar nossa hipótese, realizamos o ensaio para avaliar a densidade de receptores α_1 adrenérgicos no tecido renal. Neste caso, utilizamos o BODIPY® FLprazosina (QAPB), que é um antagonista α_1 adrenérgico ligado a um fluoróforo.

Em primeiro lugar, verificamos a seletividade do composto, através do ensaio de ligação com um antagonista α_1 adrenérgico não fluorescente, hidrocloreto de prazosina (PNF). De acordo com os dados da Figura 23, podemos observar que o PNF foi capaz de deslocar a ligação do QAPB.

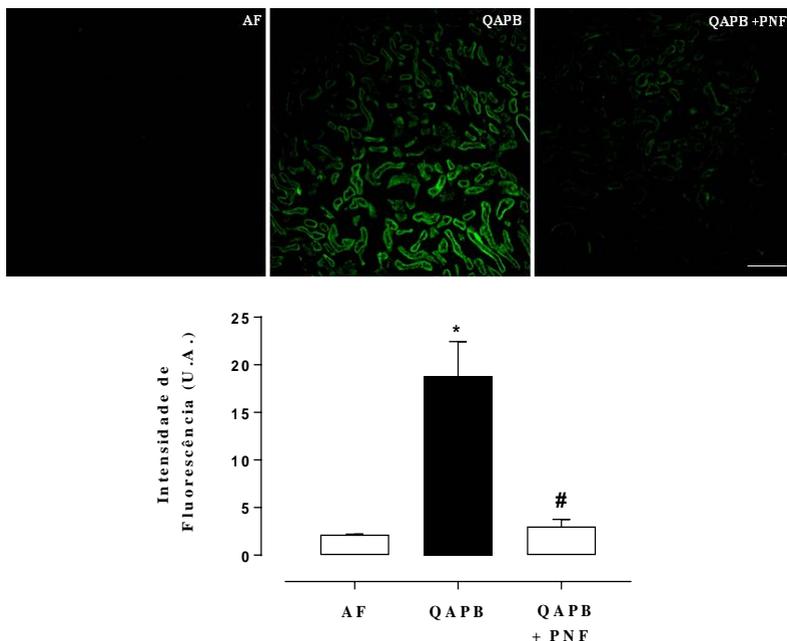


Figura 23. Seletividade do composto QAPB para receptores α_1 adrenérgicos em rim de camundongos. Imagens representativas da autofluorescência do tecido (AF), da ligação do antagonista fluorescente α_1 adrenérgico (QAPB) e do deslocamento da ligação pelo antagonista não fluorescente α_1 adrenérgico (QAPB + PNF) (painel A) e representação gráfica da intensidade de fluorescência de QAPB em rim de camundongos naive. PNF = prazosina não fluorescente, U.A. = unidades arbitrárias. As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscopia confocal; escala de 100 μ M e aumento de 200x. As barras representam a média + E.P.M; ANOVA de uma via, seguida pelo *post hoc* de Tukey; * $p < 0,05$ comparado com a AF; # $p < 0,05$ comparado com o QAPB. O gráfico representa a análise de 3 experimentos independentes, $n = 4$.

Enfim, o último experimento desenhado, consistiu em avaliar a densidade dos receptores α_1 adrenérgicos no rim e no fígado sépticos. Nesse caso, decidimos avaliar também o fígado como um comparativo para o rim, devido a sua complexidade e ao resultado exposto na Figura 12, que mostra que a GRK2 não está alterada nesse órgão na sepse.

Os resultados da análise revelaram que há um aumento na densidade dos receptores α_1 adrenérgicos no rim de camundongos submetidos a sepse polimicrobiana (Figura 24).

Os dados expostos na Figura 25, nos permitem visualizar que não ocorre uma alteração significativa na densidade de receptores α_1 adrenérgicos no fígado de camundongos sépticos.

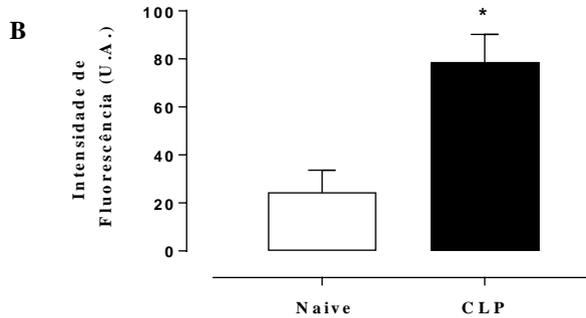
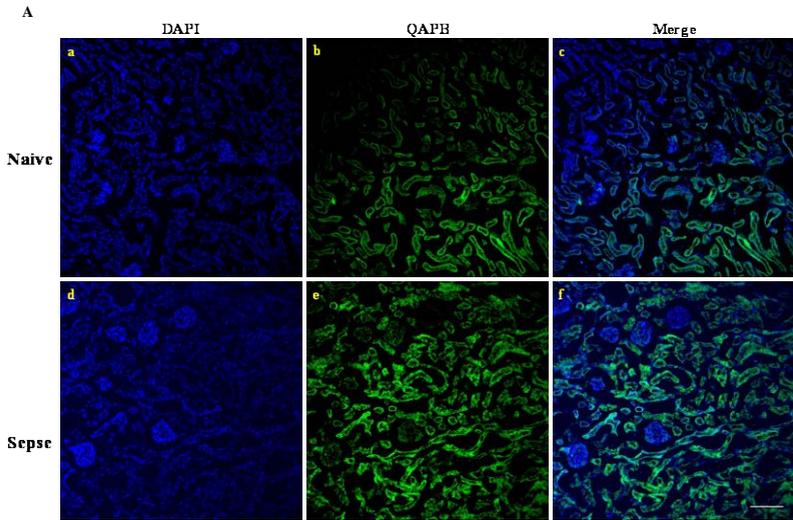


Figura 24. Densidade de receptores α_1 adrenérgicos em rim de camundongos sépticos. Painel A: imagens representativas da coloração com DAPI (azul) e da ligação com QAPB (verde) em rim de animais naive (painéis a e b) e sépticos (painéis d e e). As figuras c e f representam a sobreposição do azul e do verde. Painel B: representação gráfica da intensidade de fluorescência de QAPB em rim de animais sépticos. U.A. = unidades arbitrárias. As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscopia confocal; escala de 100 μ M e aumento de 200x. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (Naive). O gráfico representa a análise de 3 experimentos independentes, $n = 4$.

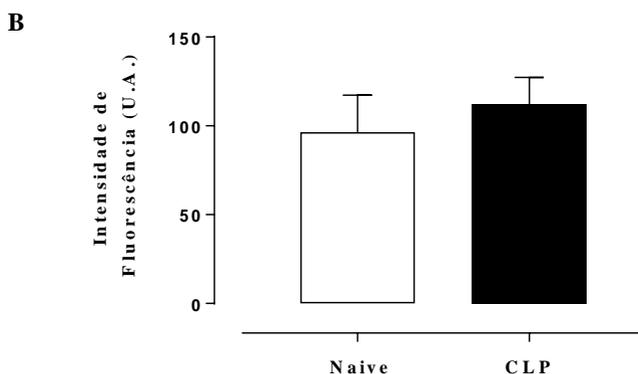
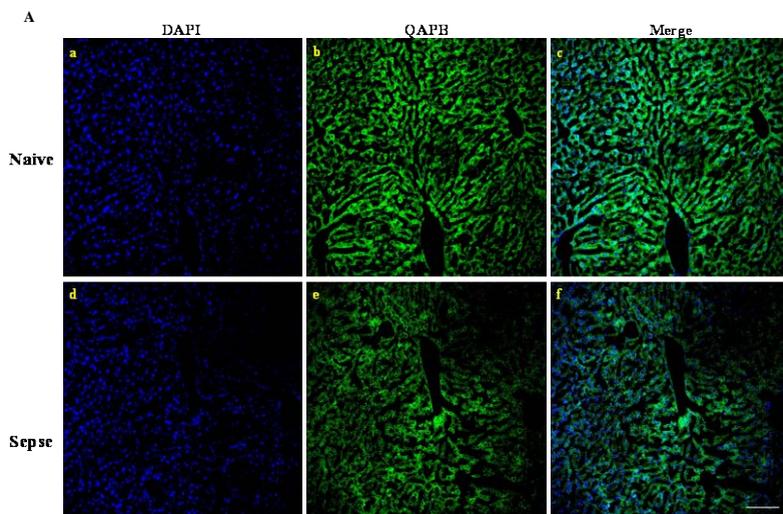


Figura 25. Densidade de receptores α_1 adrenérgicos no fígado de camundongos sépticos. Painel A: imagens representativas da coloração com DAPI (azul) e da ligação com QAPB (verde) em fígado de animais naïve (painéis a e b) e sépticos (painéis d e e). As figuras c e f representam a sobreposição do azul e do verde. Painel B: representação gráfica da intensidade de fluorescência de QAPB em fígado de animais sépticos. U.A. = unidades arbitrárias. As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscopia confocal; escala de 100 μ M e aumento de 200x. As barras representam a média + E.P.M; teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (Naïve). O gráfico representa a análise de 2 experimentos independentes, n = 4.

5 DISCUSSÃO

A sepse envolve uma complexa fisiopatologia e representa um desafio na clínica médica. Dentro deste contexto, ressaltamos o padrão de resposta da vasculatura renal, que vai em oposição a hipotensão refratária à reposição volêmica e a hiporreatividade a vasoconstritores. Essa condição contribui para a falência renal e diminui a sobrevida na sepse, sendo, portanto, uma importante linha de pesquisa. Em nosso trabalho, buscamos adquirir conhecimento e entendimento sobre os mecanismos que envolvem a disfunção renal na sepse. Para isso, enfatizamos a disfunção que ocorre na microcirculação renal e que é comumente observada em pacientes sépticos.

Nosso delineamento experimental envolveu o estudo da sepse através do modelo de CLP em camundongos. O modelo de sepse por CLP é capaz de mimetizar vários aspectos clínicos da doença em pacientes e permite a manipulação e o ajuste de acordo com o objetivo a ser estudando, podendo aumentar ou diminuir a gravidade da doença e, assim, interferir na mortalidade. Com base em dados prévios do laboratório, garantimos a reprodutibilidade do modelo e padronizamos a cirurgia com uma taxa de mortalidade de 50% dos animais em 24 h.

Neste modelo, observamos a ocorrência de falência de órgãos, cujos valores aumentados de ALT e AST no plasma indicam lesão hepática e, adicionalmente, sugerem lesão no músculo cardíaco e esquelético. As alterações nos valores plasmáticos de creatinina e ureia, associadas à oligúria, revelam a presença de disfunção renal. É interessante destacar que, em pacientes, uma duplicação dos valores de creatinina indica perda de 50% da função renal e nossos resultados mostraram um aumento de três vezes nesses valores em relação aos animais naive.

Na literatura, já está bem estabelecido que a vasculatura renal responde aos agentes constritores de maneira normal ou aumentada na sepse e que, em oposição, sistemicamente ocorre um quadro de hipotensão, vasodilatação e hiporreatividade a agentes vasoconstritores (FENTON; PARKER, 2016; MCCONNELL; COOPERSMITH, 2016). Em nosso trabalho, observamos que, apesar da disfunção renal, a capacidade de resposta a agentes vasoconstritores manteve-se na vasculatura renal nos camundongos sépticos. Corroborando com nossos dados, trabalhos já demonstraram que, em ratos submetidos ao CLP, a responsividade da artéria renal à fenilefrina e outros vasoconstritores, como noradrenalina e angiotensina II, é inalterada, embora ocorra

hiporresponsividade na artéria mesentérica superior e na artéria carótida (BERNARDELLI, 2015).

Evidências prévias do laboratório mostraram um aumento nos níveis de GRK2 no coração e na aorta de animais sépticos, o que explica, em parte, a diminuição da densidade de receptores β e α adrenérgicos e consequente hiporresponsividade às catecolaminas. Diferentemente deste quadro, a sepse causou uma redução substancial desta cinase no tecido renal. Verificamos que 6 h após o início da sepse esta redução já estava acentuada, sendo ainda maior em 12 ou 24 h.

Além do modelo de sepse por CLP, utilizamos o modelo de sepse induzida por pneumonia para avaliação do conteúdo de GRK2, pois as infecções mais comumente causadoras de sepse são as pneumonias e as abdominais. Assim, observamos que a queda do conteúdo de GRK2 renal ocorreu em ambos os modelos de sepse em camundongos e não é uma particularidade da sepse por CLP.

Os níveis de GRK2 também decresceram no pulmão de animais com sepse peritoneal, órgão cuja reatividade vascular é mantida durante a sepse. Esse dado é interessante, pois mostra que leitos que não apresentam hiporreatividade a agentes constritores na sepse possuem uma modulação negativa de GRK2 e vai ao encontro da nossa hipótese de trabalho. Curiosamente, no fígado, os valores de GRK2 permaneceram inalterados na sepse, sugerindo que o quadro de vasodilatação neste órgão deve ocorrer por um mecanismo independente de GRK2.

Sabe-se que o NO tem grande importância na disfunção cardiovascular da sepse. Ainda, os dados anteriores do laboratório revelaram que o NO, proveniente da NOS-2, possui ação modulatória sobre a GRK2 no coração e aorta de camundongos sépticos. Sendo assim, nosso próximo passo foi investigar a expressão de NOS-2 no tecido renal. Nossos resultados mostraram que ocorre um aumento na expressão desta isoforma 24 h após a indução da sepse, coincidindo com o alto nível de NOx encontrado. Considerando que os níveis de NOS-2 aumentaram no tecido renal de animais sépticos, verificamos a consequência da inibição da atividade da NOS-2 sobre a perda da GRK2 renal. O inibidor seletivo para a NOS-2, o 1400W, reduziu substancialmente os níveis plasmáticos de NOx confirmando que a elevação dos níveis de NOx plasmático decorre principalmente da atividade da NOS-2. O tratamento com 1400W não alterou a perda da GRK2 renal causada pela sepse. No entanto o 1400W inibiu quase totalmente a expressão da NOS-2 e, embora esse mecanismo ainda não seja compreendido, outros trabalhos relataram este mesmo padrão (EL-MAS; FAN; ABDEL-RAHMAN, 2008). Assim,

buscando uma melhor compreensão da atividade da NOS-2 sobre a GRK2, realizamos o tratamento com aminoguanidina, também inibidor da NOS-2, embora não tão seletivo e específico quanto o 1400W. Observamos que a aminoguanidina evitou a redução do conteúdo de GRK2 renal na sepse. Infelizmente não houve tempo para avaliar os níveis de NOS-2 e de NOx plasmático com o tratamento com a aminoguanidina. Apesar de não possuímos uma boa explicação deste efeito curioso do 1400W sobre a expressão da NOS-2, os resultados sugerem que a NOS-2 tem papel na redução dos níveis renais da GRK2 na sepse. Estes dados são relevantes porque se a ação da NOS-2 for diminuída, seja pela não-expressão dela ou pela inibição da sua atividade, o resultado deveria ser igual para os dois inibidores. O fato do efeito final ter sido tão diferente para os dois inibidores permite explorar várias possibilidades. Uma delas é que haja necessidade de contato direto proteína-proteína (e não somente via NO) entre a NOS-2 e a GRK2 para que a redução da cinase ocorra. Outra possibilidade seria que a inibição da NOS-2 através do 1400W tenha sido mais potente do que pela aminoguanidina, visto que sua ação é irreversível (GARVEY *et al.*, 1997), gerando uma atividade compensatória das isoformas NOS-1 e NOS-3. Todavia, as razões da disparidade entre os efeitos dos inibidores, aminoguanidina e 1400W, necessitam de maiores investigações.

Os resultados da inibição da NOS-2 nos estimularam a avaliar o efeito da administração de um composto doador de NO sobre a GRK2. Vimos que a administração de SNAP em animais naïve resultou na diminuição parcial da quantidade renal desta cinase. Assim, esse conjunto de dados apontam que o NO possui um papel relevante na modulação dos níveis de GRK2.

As análises de imunoelctroforese mostraram a diminuição do conteúdo de GRK2 no rim séptico, porém essa avaliação não permitiu visualizar a região do órgão em que essa modulação ocorre, visto que é realizada em homogenato de tecido. Então, buscando clarificar a distribuição da GRK2 no tecido renal, utilizamos a técnica de imunofluorescência. Quando destacamos o endotélio renal, através da marcação com a I-CAM, percebemos que há co-localização com a GRK2. Esse achado é importante, pois sugere que as alterações do nível de GRK2 ocorrem no endotélio vascular renal. Ainda, na tentativa de explorar esse resultado, administramos um doador de NO em células com características do epitélio renal, HEK293 e MDCK, e não observamos alterações no conteúdo de GRK2.

Com base na redução de GRK2 renal na sepse investigamos a relação com os receptores α_1 adrenérgicos. Verificamos que a ligação com o antagonista fluorescente prazosina (QAPB) estava aumentada no rim de camundongos sépticos, revelando que a diminuição de GRK2 está associada com o aumento da densidade de receptores α_1 adrenérgicos. Conseqüentemente, esse achado pode explicar, pelo menos em parte, a diferença entre a resposta da vasculatura renal e sistêmica na sepse.

Em contrapartida, no tecido hepático, a análise de receptores α_1 adrenérgicos foi semelhante nos grupos séptico e controle, correlacionando com os dados inalterados do conteúdo de GRK2. Esse resultado contrapõe as evidências encontradas na literatura, onde a vasodilatação esplâncica é marcada pelo prejuízo nas respostas vasoconstritoras, tais como às catecolaminas, vasopressina, angiotensina II e endotelina-1 (BOLOGNESI *et al.*, 2014). Todavia, a investigação da fisiopatologia que envolve a disfunção hepática na sepse foge ao escopo deste trabalho e demanda novos estudos.

Quanto aos mecanismos envolvidos na regulação da GRK2 renal pelo NO, podemos especular que são concentração-dependentes. Sabe-se que os efeitos do NO são direcionados de acordo com a quantidade em que é produzido nas células. Isto é, baixas concentrações de NO favorecem a ligação com a GCs e com canais de potássio. Já a alta produção de NO reflete na rápida reação com resíduos de tiol (-SH) levando a formação de nitrosotióis (R-SNO) ou, ainda, a nitração de proteínas formando resíduos de nitrotirosina. Os efeitos dos S-nitrosotióis, que resultam do rompimento espontâneo da ligação S-N e conseqüente liberação de NO^+ , refletem na nitrosilação de proteínas, exercendo alterações duradouras sobre suas funções. Conforme demonstrado por Whalen e colaboradores (WHALEN *et al.*, 2007), a S-nitrosilação de resíduos de cisteína (Cis340) da GRK2 é capaz de inibir a fosforilação do receptor, o recrutamento da arrestina e prevenir a internalização de receptores β adrenérgicos. Adicionalmente, foi evidenciado que a S-nitrosilação ocorre no resíduo Cis340 da GRK2 através de uma mutação do gene codificante para GRK2 em camundongos *knock-in* (GRK2-C340S) (HUANG *et al.*, 2013). Esse mecanismo de S-nitrosilação da GRK2 poderia explicar o que é observado na disfunção renal da sepse. Ainda, cabe destacar que, em oposição ao que é observado em outros órgãos a expressão de NOS-2 é constitutiva no tecido renal. Assim, considerando que além da alta produção basal, a sepse aumenta a expressão de NOS-2, o resultado é uma concentração exacerbada de NO.

Por fim, apontamos a necessidade de novos estudos para o entendimento da fisiopatologia envolvida na LRA induzida pela sepse, bem como a investigação da ação do NO sobre a GRK2.

6 CONCLUSÃO

Este conjunto de resultados, bem como o suporte da literatura, nos permite sugerir que a fisiopatologia da falência renal na sepse abrange um mecanismo com regulação negativa do conteúdo de GRK2 e consequente aumento na densidade de receptores adrenérgicos e que o NO parece estar envolvido nessa modulação. Todavia, as razões pelas quais a GRK2 apresenta modulações diferentes em órgãos que mantem sua reatividade a agentes vasoconstritores e em órgãos hiporreativos ainda não estão elucidadas e demandam a continuidade do estudo. A principal conclusão sobre este trabalho está representada na Figura 26.

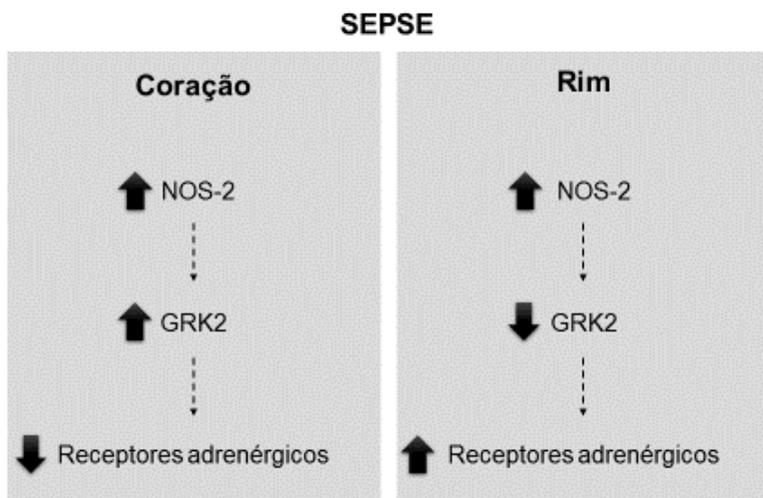


Figura 26. Modulação de GRK2 cardíaca e renal na sepse. A sepse induz a expressão de NOS-2 e aumento da produção de NO em coração e rim de animais com sepse. O NO/NOS-2 aumenta o conteúdo de GRK2 no coração, porém diminui substancialmente no rim. As alterações de GRK2 culminam na diminuição ou aumento da densidade de receptores adrenérgicos, respectivamente, contribuindo para a falência dos órgãos e mortalidade.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADHIKARI, N K J *et al.* Critical care and the global burden of critical illness in adults. **The Lancet** v. 376, n. 9749, p. 1339-1346, 16 out. 2010.

AKTAN, F. iNOS-mediated nitric oxide production and its regulation. **Life Sciences** v. 75, n. 6, p. 639-653, 25 jun. 2004.

ALBERTS, B. Cell Communication. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2006. p. 830 - 906.

ALBAIDI, R *et al.* Sepsis-associated acute kidney injury. **Seminars in Nephrology** v. 35, n. 1, p. 2-11, jan. 2015.

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, 1 jul. 2001.

ANGUS, D C; WAX, R S. Epidemiology of sepsis: an update. **Critical Care Medicine** v. 29, n. 7 Suppl, p. S109-16, jul. 2001.

ANGUS, D C. The search for effective therapy for sepsis: back to the drawing board? **The Journal of the American Medical Association** v. 306, n. 23, p. 2614-2615, 21 dez. 2011.

ANGUS, D C; VAN DER POLL, Tom. Severe sepsis and septic shock. **The New England Journal of Medicine** v. 369, n. 9, p. 840-851, 29 ago. 2013.

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, ago. 1999.

ARAGAY, A M *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions. **FEBS Letters** v. 430, n. 1-2, p. 37-40, 23 jun. 1998.

ARRAES, S M A *et al.* Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood** v. 108, n. 9, p. 2906-2913, 1 nov. 2006.
ARRIETA, O; RODRIGUEZ-REYNA, T S; SOTELO, J.
Pharmacological treatment of septic shock. **Expert opinion on therapeutic patents** v. 10, n. 5, p. 601-622, maio 2000.

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

AWAD, S S. State-of-the-art therapy for severe sepsis and multisystem organ dysfunction. **American Journal of Surgery** v. 186, n. 5A, p. 23S-30S; discussion 31S, 28 nov. 2003.

BEALE, R *et al.* Promoting Global Research Excellence in Severe Sepsis (PROGRESS): lessons from an international sepsis registry. **Infection** v. 37, n. 3, p. 222-232, jun. 2009.

BEAVO, J A; BRUNTON, L L. Cyclic nucleotide research -- still expanding after half a century. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology** v. 3, n. 9, p. 710-718, set. 2002.

BECKMAN, J S; KOPPENOL, W H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. **The American Journal of Physiology** v. 271, n. 5 Pt 1, p. C1424-37, nov. 1996.

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

BERNARDELLI, A K. **Avaliação comparativa da reatividade a vasoconstritores em artérias deratos submetidos à sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração doceco.** Dissertação – UFPR, 2015. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1884/41859>>.

BOFFA, J J; ARENDSHORST, W J. Maintenance of renal vascular reactivity contributes to acute renal failure during endotoxemic shock. **Journal of the American Society of Nephrology** v. 16, n. 1, p. 117-124, jan. 2005.

BOLOGNESI, M *et al.* Splanchnic vasodilation and hyperdynamic circulatory syndrome in cirrhosis. **World Journal of Gastroenterology** v. 20, n. 10, p. 2555-2563, 14 mar. 2014.

BRADFORD, M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry** v. 72, p. 248-254, 7 maio 1976.

CARMAN, C V *et al.* Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. **The Journal of Biological Chemistry** v. 274, n. 48, p. 34483-34492, 26 nov. 1999.

CHEN, S J; WU, C C; YEN, M H. Alterations of ex vivo vascular reactivity in intraperitoneal sepsis. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** v. 24, n. 5, p. 786-793, nov. 1994.

CHVOJKA, J *et al.* Renal haemodynamic, microcirculatory, metabolic and histopathological responses to peritonitis-induced septic shock in pigs. **Critical Care** v. 12, n. 6, p. 164, 24 dez. 2008.

COBB, J P; DANNER, R L. Nitric oxide and septic shock. **The Journal of the American Medical Association** v. 275, n. 15, p. 1192-1196, 17 abr. 1996.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature** v. 420, n. 6917, p. 885-891, 26 dez. 2002.

CONG, M *et al.* Regulation of membrane targeting of the G protein-coupled receptor kinase 2 by protein kinase A and its anchoring protein AKAP79. **The Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 18, p. 15192-15199, 4 maio 2001.

CONNER, D A *et al.* beta-Arrestin1 knockout mice appear normal but demonstrate altered cardiac responses to beta-adrenergic stimulation. **Circulation Research** v. 81, n. 6, p. 1021-1026, dez. 1997.

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

DELLINGER, R Phillip *et al.* Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Critical Care Medicine** v. 32, n. 3, p. 858-873, mar. 2004.

DESAI, A N *et al.* Involvement of G protein-coupled receptor kinase (GRK) 3 and GRK2 in down-regulation of the alpha2B-adrenoceptor. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 317, n. 3, p. 1027-1035, jun. 2006.

DINIZ, L R L. **Disfunção renal induzida por modelo polimicrobiano de sepsis: Avaliação de componentes do sistema renina-angiotensina.** Dissertação – UFMG, 2011.

DUMA, D *et al.* NOS-1-derived NO is an essential triggering signal for the development of systemic inflammatory responses. **European Journal of Pharmacology** v. 668, n. 1-2, p. 285-292, 1 out. 2011.

DÜNSER, 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, out. 2009.

ECKHART, A D *et al.* Vascular-targeted overexpression of G protein-coupled receptor kinase-2 in transgenic mice attenuates beta-adrenergic receptor signaling and increases resting blood pressure. **Molecular Pharmacology** v. 61, n. 4, p. 749-758, abr. 2002.

EICHEL, K; JULLIÉ, D; VON ZASTROW, M. β -Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. **Nature Cell Biology** v. 18, n. 3, p. 303-310, mar. 2016.

EL-MAS, M M; FAN, M; ABDEL-RAHMAN, A A. Endotoxemia-mediated induction of cardiac inducible nitric-oxide synthase expression accounts for the hypotensive effect of ethanol in female rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 324, n. 1, p. 368-375, jan. 2008.

ELORZA, A; SARNAGO, S; MAYOR, F. Agonist-dependent modulation of G protein-coupled receptor kinase 2 by mitogen-activated protein kinases. **Molecular Pharmacology** v. 57, n. 4, p. 778-783, abr. 2000.

ERGIN, B *et al.* The renal microcirculation in sepsis. **Nephrology, Dialysis, Transplantation** v. 30, n. 2, p. 169-177, fev. 2015.

EVANS, T *et al.* Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome. **Circulatory shock** v. 41, n. 2, p. 77-81, out. 1993.

FAGOTTI, G C; ZAPPAROLI, A. MODELO EXPERIMENTAL EM ROEDORES - LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL. **Revista Eletrônica de Farmácia** v. 9, n. 3, 30 set. 2012.

FELETOU, M; VANHOUTTE, P M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. **British Journal of Pharmacology** v. 93, n. 3, p. 515-524, mar. 1988.

FENTON, K E; PARKER, M M. Cardiac Function and Dysfunction in Sepsis. **Clinics in Chest Medicine** v. 37, n. 2, p. 289-298, jun. 2016.

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

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

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

FERREIRA, F L *et al.* Serial evaluation of the SOFA score to predict outcome in critically ill patients. **The Journal of the American Medical Association** v. 286, n. 14, p. 1754-1758, 10 out. 2001.

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, abr. 2004.

- FLEMING, I; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovascular Research** v. 43, n. 3, p. 532-541, 15 ago. 1999.
- FÖRSTERMANN, U *et al.* Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. **Hypertension** v. 23, n. 6 Pt 2, p. 1121-1131, jun. 1994.
- FÖRSTERMANN, U; BOISSEL, J P; KLEINERT, H. Expressional control of the “constitutive” isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **The FASEB Journal** v. 12, n. 10, p. 773-790, jul. 1998.
- FOSTER, M W; MCMAHON, T J; STAMLER, J S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends in Molecular Medicine** v. 9, n. 4, p. 160-168, abr. 2003.
- FUKUTO, J M.; CHO, J Y.; SWITZER, C H. The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. **Nitric Oxide**. [S.l.]: Elsevier, 2000. p. 23-40.
- FURCHGOTT, R F. Introduction to EDRF research. **Journal of Cardiovascular Pharmacology** v. 22 Suppl 7, p. S1-2, 1993.
- FURCHGOTT, R F; ZAWADZKI, J V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature** v. 288, n. 5789, p. 373-376, 27 nov. 1980.
- GAIESKI, D F *et al.* Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Critical Care Medicine** v. 41, n. 5, p. 1167-1174, maio 2013.
- GARVEY, E P *et al.* 1400W is a slow, tight binding, and highly selective inhibitor of inducible nitric-oxide synthase in vitro and in vivo. **The Journal of Biological Chemistry** v. 272, n. 8, p. 4959-4963, 21 fev. 1997.
- GRANGER, D L *et al.* Metabolic fate of L-arginine in relation to microbiostatic capability of murine macrophages. **The Journal of Clinical Investigation** v. 85, n. 1, p. 264-273, jan. 1990.

GUREVICH, E V *et al.* G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs. **Pharmacology & Therapeutics** v. 133, n. 1, p. 40-69, jan. 2012.

GUREVICH, V V *et al.* Arrestin interactions with G protein-coupled receptors. Direct binding studies of wild type and mutant arrestins with rhodopsin, beta 2-adrenergic, and m2 muscarinic cholinergic receptors. **The Journal of Biological Chemistry** v. 270, n. 2, p. 720-731, 13 jan. 1995.

HAGA, K; TSUGA, H; HAGA, T. Ca²⁺-dependent inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 by calmodulin. **Biochemistry** v. 36, n. 6, p. 1315-1321, 11 fev. 1997.

HALL, J E.; GUYTON, A C. The body fluids and kidneys. **Guyton and hall physiology review**. [S.l.]: Elsevier, 2011. p. 71-100.

HECKER, M; CATTARUZZA, M; WAGNER, A H. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular smooth muscle cells. **General pharmacology** v. 32, n. 1, p. 9-16, jan. 1999.

HINSHAW, L B. Sepsis/septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. **Critical Care Medicine** v. 24, n. 6, p. 1072-1078, jun. 1996.

HO, K H; KWAN, C Y; BOURREAU, J P. Hyporesponsiveness to Ca²⁺ of aortic smooth muscle in endotoxin-treated rats: no-dependent and -independent in vitro mechanisms. **Research communications in molecular pathology and pharmacology** v. 92, n. 3, p. 275-284, jun. 1996.

HOROWITZ, A *et al.* Mechanisms of smooth muscle contraction. **Physiological Reviews** v. 76, n. 4, p. 967-1003, out. 1996.

HOTCHKISS, R S; KARL, I E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **The New England Journal of Medicine** v. 348, n. 2, p. 138-150, 9 jan. 2003.

HUANG, Z M *et al.* Convergence of G protein-coupled receptor and S-nitrosylation signaling determines the outcome to cardiac ischemic injury. **Science Signaling** v. 6, n. 299, p. 95, 29 out. 2013.

HUSSAIN, M B; HOBBS, A J; MACALLISTER, R J. Autoregulation of nitric oxide-soluble guanylate cyclase-cyclic GMP signalling in mouse thoracic aorta. **British Journal of Pharmacology** v. 128, n. 5, p. 1082-1088, nov. 1999.

INAGAKI, S *et al.* G Protein-Coupled Receptor Kinase 2 (GRK2) and 5 (GRK5) Exhibit Selective Phosphorylation of the Neurotensin Receptor in Vitro. **Biochemistry** v. 54, n. 28, p. 4320-4329, 21 jul. 2015.

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, maio 1989.

JONES, S B; ROMANO, F D. Myocardial beta adrenergic receptor coupling to adenylate cyclase during developing septic shock. **Circulatory shock** v. 30, n. 1, p. 51-61, jan. 1990.

JOURD'HEUIL, D; GRAY, L; GRISHAM, M B. S-nitrosothiol formation in blood of lipopolysaccharide-treated rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v. 273, n. 1, p. 22-26, 24 jun. 2000.

JULOU-SCHAEFFER, G *et al.* Loss of vascular responsiveness induced by endotoxin involves L-arginine pathway. **The American Journal of Physiology** v. 259, n. 4 Pt 2, p. H1038-43, out. 1990.

KAUSS I A M *et al.* The epidemiology of sepsis in a Brazilian teaching hospital. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 14(3):264-70. May-Jun 2010.

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, 15 nov. 1990.

KILBOURN, R G; SZABÓ, C; TRABER, D L. Beneficial versus detrimental effects of nitric oxide synthase inhibitors in circulatory shock: lessons learned from experimental and clinical studies. **Shock** v. 7, n. 4, p. 235-246, abr. 1997.

KRASEL, C *et al.* Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. **The Journal of Biological Chemistry** v. 276, n. 3, p. 1911-1915, 19 jan. 2001.

KUMAR, G *et al.* Nationwide trends of severe sepsis in the 21st century (2000-2007). **Chest** v. 140, n. 5, p. 1223-1231, nov. 2011.

LINDBLOM, P *et al.* Isoforms of alanine aminotransferases in human tissues and serum--differential tissue expression using novel antibodies. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 466, n. 1, p. 66-77, 1 out. 2007.

LIU, L *et al.* Essential roles of S-nitrosothiols in vascular homeostasis and endotoxic shock. **Cell** v. 116, n. 4, p. 617-628, 20 fev. 2004.

LOMBARDI, M S *et al.* Oxidative stress decreases G protein-coupled receptor kinase 2 in lymphocytes via a calpain-dependent mechanism. **Molecular Pharmacology** v. 62, n. 2, p. 379-388, ago. 2002.

LÓPEZ, A *et al.* Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Critical Care Medicine** v. 32, n. 1, p. 21-30, jan. 2004.

LORENZ, K; LOHSE, M J; QUITTERER, U. Protein kinase C switches the Raf kinase inhibitor from Raf-1 to GRK-2. **Nature** v. 426, n. 6966, p. 574-579, 4 dez. 2003.

LORTON, D *et al.* Altered sympathetic-to-immune cell signaling via β_2 -adrenergic receptors in adjuvant arthritis. **Clinical & Developmental Immunology** v. 2013, p. 1-17, 1 out. 2013.

LUCAS, K A *et al.* Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. **Pharmacological Reviews** v. 52, n. 3, p. 375-414, set. 2000.

LUSH, C W; KVIETYS, P R. Microvascular dysfunction in sepsis. **Microcirculation** v. 7, n. 2, p. 83-101, abr. 2000.

LYMPEROPOULOS, A; RENGO, G; KOCH, W J. GRK2 inhibition in heart failure: something old, something new. **Current Pharmaceutical Design** v. 18, n. 2, p. 186-191, 2012.

MARSHALL, H E; STAMLER, J S. Nitrosative stress-induced apoptosis through inhibition of NF-kappa B. **The Journal of Biological Chemistry** v. 277, n. 37, p. 34223-34228, 13 set. 2002.

MARTELL, M *et al.* Physiopathology of splanchnic vasodilation in portal hypertension. **World journal of hepatology** v. 2, n. 6, p. 208-220, 27 jun. 2010.

MÅRTENSSON, J; BELLOMO, R. Sepsis-Induced acute kidney injury. **Critical Care Clinics** v. 31, n. 4, p. 649-660, out. 2015.

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

MAYR, F B *et al.* Infection rate and acute organ dysfunction risk as explanations for racial differences in severe sepsis. **The Journal of the American Medical Association** v. 303, n. 24, p. 2495-2503 , 23 jun. 2010.

MCCONNELL, K W; COOPERSMITH, C M. Pathophysiology of septic shock: From bench to bedside. **Presse Medicale** v. 45, n. 4 Pt 2, p. e93-8, 13 abr. 2016.

MERX, M W; WEBER, C. Sepsis and the heart. **Circulation** v. 116, n. 7, p. 793-802, 14 ago. 2007.

MÉTAYÉ, T *et al.* Pathophysiological roles of G-protein-coupled receptor kinases. **Cellular Signalling** v. 17, n. 8, p. 917-928, ago. 2005.

MIRANDA, M *et al.* Microcirculatory dysfunction in sepsis: pathophysiology, clinical monitoring, and potential therapies. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology** v. 311, n. 1, p. H24-35, 1 jul. 2016.

- MONCADA, S *et al.* An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature** v. 263, n. 5579, p. 663-665, 21 out. 1976.
- MONCADA, S; HIGGS, E A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology** v. 147 Suppl 1, p. S193-201, jan. 2006.
- MONCADA, S; PALMER, R M; HIGGS, E A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacological Reviews** v. 43, n. 2, p. 109-142, jun. 1991.
- NDUKA, O O; PARRILLO, J E. The pathophysiology of septic shock. **Critical Care Clinics** v. 25, n. 4, p. 677-702, vii , out. 2009.
- O'BRIEN, J M *et al.* Sepsis. **The American Journal of Medicine** v. 120, n. 12, p. 1012-1022 , dez. 2007.
- OCHOA, J B *et al.* Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Annals of Surgery** v. 214, n. 5, p. 621-626, nov. 1991.
- OGUT, O; BROZOVICH, F V. Regulation of force in vascular smooth muscle. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology** v. 35, n. 4, p. 347-355, abr. 2003.
- OPPERT, M *et al.* Acute renal failure in patients with severe sepsis and septic shock--a significant independent risk factor for mortality: results from the German Prevalence Study. **Nephrology, Dialysis, Transplantation** v. 23, n. 3, p. 904-909, mar. 2008.
- PACHER, P; BECKMAN, J S; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews** v. 87, n. 1, p. 315-424, jan. 2007.
- PAYA, D *et al.* Temporal relationships between levels of circulating NO derivatives, vascular NO production and hyporeactivity to noradrenaline induced by endotoxin in rats. **Cardiovascular Research** v. 30, n. 6, p. 952-959, dez. 1995.

PELTE, C H; CHAWLA, L S. Novel therapeutic targets for prevention and therapy of sepsis associated acute kidney injury. **Current Drug Targets** v. 10, n. 12, p. 1205-1211, dez. 2009.

PENELA, P *et al.* Degradation of the G protein-coupled receptor kinase 2 by the proteasome pathway. **The Journal of Biological Chemistry** v. 273, n. 52, p. 35238-35244, 25 dez. 1998.

PENELA, P *et al.* G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) modulation and cell cycle progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 107, n. 3, p. 1118-1123 , 19 jan. 2010.

PENELA, P; RIBAS, C; MAYOR, F. Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases. **Cellular Signalling** v. 15, n. 11, p. 973-981, nov. 2003.

PETTIGREW, C A. A defining time for sepsis. **Trends in Molecular Medicine** v. 20, n. 4, p. 191, abr. 2014.

PIEPOT, H A *et al.* The role of inducible nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-mediated hyporeactivity to vasoconstrictors differs among isolated rat arteries. **Clinical Science** v. 102, n. 3, p. 297-305, mar. 2002.

PITCHER, J A *et al.* Role of beta gamma subunits of G proteins in targeting the beta-adrenergic receptor kinase to membrane-bound receptors. **Science (New York)** v. 257, n. 5074, p. 1264-1267, 28 ago. 1992.

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 , ago. 1994.

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

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

REITHMANN, C *et al.* Desensitization of rat cardiomyocyte adenylyl cyclase stimulation by plasma of noradrenaline-treated patients with septic shock. **Circulatory shock** v. 41, n. 1, p. 48-59, set. 1993.

RIOS-SANTOS, F *et al.* Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 175, n. 5, p. 490-497, 1 mar. 2007.

ROCKMAN, H A *et al.* Control of myocardial contractile function by the level of beta-adrenergic receptor kinase 1 in gene-targeted mice. **The Journal of Biological Chemistry** v. 273, n. 29, p. 18180-18184, 17 jul. 1998.

ROJAS, M *et al.* Endotoxin-induced lung injury in mice: structural, functional, and biochemical responses. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology** v. 288, n. 2, p. L333-41, fev. 2005.

ROMERO-CALVO, I *et al.* Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. **Analytical Biochemistry** v. 401, n. 2, p. 318-320, 15 jun. 2010.

RYAN, J J *et al.* Right ventricular adaptation and failure in pulmonary arterial hypertension. **The Canadian Journal of Cardiology** v. 31, n. 4, p. 391-406, abr. 2015.

SALES J, J A L. *et al.* Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepse em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. **Revista Brasileira de terapia intensiva** v. 18, n. 1, p. 9-17, mar. 2006.

SALVADOR, B *et al.* Modulation of endothelial function by Toll like receptors. **Pharmacological Research** v. 108, p. 46-56, 9 abr. 2016.

SCHECHOWITSCH, K *et al.* Rapid NOS-1-derived nitric oxide and peroxynitrite formation act as signaling agents for inducible NOS-2 expression in vascular smooth muscle cells. **Pharmacological Research** v. 100, p. 73-84, out. 2015.

SCHMIDT, C *et al.* Inhibition of NF-kappaB activity prevents downregulation of alpha1-adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis. **Shock** v. 32, n. 3, p. 239-246, set. 2009.

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, set. 2005.

SCHRIER, R W; WANG, W. Acute renal failure and sepsis. **The New England Journal of Medicine** v. 351, n. 2, p. 159-169, 8 jul. 2004.

SCHWARTZ, D; BLANTZ, R C. Nitric oxide, sepsis, and the kidney. **Seminars in Nephrology** v. 19, n. 3, p. 272-276, maio 1999.

SEYMOUR, C W *et al.* Assessment of Clinical Criteria for Sepsis: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **The Journal of the American Medical Association** v. 315, n. 8, p. 762-774 , 23 fev. 2016.

SHANKAR-HARI, M *et al.* Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **The Journal of the American Medical Association** v. 315, n. 8, p. 775-787 , 23 fev. 2016.

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

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

STAMLER, J S; SINGEL, D J; LOSCALZO, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. **Science (New York)** v. 258, n. 5090, p. 1898-1902 , 18 dez. 1992.

STOCLET, J C *et al.* Induction of nitric oxide synthase and dual effects of nitric oxide and cyclooxygenase products in regulation of arterial contraction in human septic shock. **Circulation** v. 100, n. 2, p. 107-112, 13 jul. 1999.

- SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. **New horizons (Baltimore, Md.)** v. 3, n. 1, p. 2-32, fev. 1995.
- SZABÓ, C *et al.* Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. **British Journal of Pharmacology** v. 108, n. 3, p. 786-792, mar. 1993.
- TAKASU, O *et al.* Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 187, n. 5, p. 509-517, 1 mar. 2013.
- UENO, M; LEE, T J. Endotoxin decreases the contractile responses of the porcine basilar artery to vasoactive substances. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism** v. 13, n. 4, p. 712-719, jul. 1993.
- 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 , dez. 1993.
- VINCENT, J L *et al.* Effects of nitric oxide in septic shock. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** v. 161, n. 6, p. 1781-1785, jun. 2000.
- WENZEL, R P; EDMOND, M B. Septic shock--evaluating another failed treatment. **The New England Journal of Medicine** v. 366, n. 22, p. 2122-2124, 31 maio 2012.
- WHALEN, E J *et al.* Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. **Cell** v. 129, n. 3, p. 511-522, 4 maio 2007.
- WILLIAMS, A L.B.; HOOFNAGLE, J H. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis relationship to cirrhosis. **Gastroenterology** v. 95, n. 3, p. 734-739, set. 1988.
- WILLIAMS, S C P. After Xigris, researchers look to new targets to combat sepsis. **Nature Medicine** v. 18, n. 7, p. 1001, 6 jul. 2012.
- WINK, D A; MITCHELL, J B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of

nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine** v. 25, n. 4-5, p. 434-456, set. 1998.

WINK, D. A. *et al.* The Chemical Biology of Nitric Oxide. Balancing Nitric Oxide with Oxidative and Nitrosative Stress. In: MAYER, Bernd (Org.). **Nitric Oxide**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000. p. 7-29.

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, nov. 1984.

WU, C C *et al.* Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxic shock. **British Journal of Pharmacology** v. 114, n. 8, p. 1666-1672, abr. 1995.

WU, C-C; RUETTEN, H; THIEMERMANN, C. Comparison of the effects of aminoguanidine and N ω -nitro-l-arginine methyl ester on the multiple organ dysfunction caused by endotoxaemia in the rat. **European Journal of Pharmacology** v. 300, n. 1-2, p. 99-104, abr. 1996.

WU, J-H *et al.* The platelet-derived growth factor receptor-beta phosphorylates and activates G protein-coupled receptor kinase-2. A mechanism for feedback inhibition. **The Journal of Biological Chemistry** v. 280, n. 35, p. 31027-31035, 2 set. 2005.

YANG, R-Z *et al.* Alanine aminotransferase isoenzymes: molecular cloning and quantitative analysis of tissue expression in rats and serum elevation in liver toxicity. **Hepatology** v. 49, n. 2, p. 598-607, fev. 2009.

ZARJOU, A; AGARWAL, A. Sepsis and acute kidney injury. **Journal of the American Society of Nephrology** v. 22, n. 6, p. 999-1006, jun. 2011.