



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

NATÁLIA KIMIE MATSUBARA

Participação dos receptores adrenérgicos na modulação cardiovascular pelo sistema nervoso central e periférico durante a sepse

Florianópolis

2022

Natália Kimie Matsubara

Participação dos receptores adrenérgicos na modulação cardiovascular pelo sistema nervoso central e periférico durante a sepse

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Farmacologia.
Orientador: Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos

Florianópolis

2022

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

Matsubara, Natália Kimie

Participação dos receptores adrenérgicos na modulação cardiovascular pelo sistema nervoso central e periférico durante a sepse / Natália Kimie Matsubara ; orientador, José Eduardo da Silva Santos, 2022.

121 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Receptor adrenérgico. 3. Sistema nervoso central. 4. Cardiovascular. 5. Sepse. I. da Silva Santos, José Eduardo. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Natália Kimie Matsubara

Participação dos receptores adrenérgicos na modulação cardiovascular pelo sistema nervoso central e periférico durante a sepse

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. José Vanderlei Menani
Universidade Estadual Paulista

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Leandro José Bertoglio
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutora em Farmacologia.

Prof. Dr. Rui Daniel Schröder Prediger
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
Orientador

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

À minha família pelo suporte e compreensão ao longo de toda a minha carreira acadêmica e dessa jornada de doutorado fora de casa, fora da cidade e fora do estado. Foram quatro anos longe da minha família e com muita saudade, porém eles sempre se fizeram presente em minha vida.

Aos meus colegas de laboratório, Angélica, Rui, Elaine, Thiago, Nariana, Stherfanni, Merita, Thaine e Guilherme, que compartilharam de seus conhecimentos e experiências comigo, e por me ajudarem sempre que eu precisei. Agradeço também por todos os bons momentos que me proporcionaram, e pelos almoços divertidos no R.U.. E por todos os desabafos e incentivos. Vocês foram a minha família em Florianópolis!

Agradeço ao meu orientador Professor Dr. José Eduardo da Silva-Santos pela sua constante orientação, paciência, ensinamentos e disposição, e por ter me aceitado em seu laboratório para essa jornada científica de quatro anos de doutorado.

Agradeço a todos os professores que passaram por mim durante esse doutorado e durante toda a minha vida acadêmica e contribuíram para o meu crescimento profissional e por todos os ensinamentos. Sem vocês eu não estaria aqui.

Aos técnicos do Departamento de Farmacologia, em especial à Adriane Madeira, que contribuíram na realização dos experimentos dessa tese. Aos funcionários do Laboratório Multiusuários do Centro de Ciências Biológicas (LAMEB/CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina pelo apoio técnico e contribuição. A todos os funcionários do Departamento de Farmacologia pela ajuda prestada.

Aos professores Dr. Jamil Assreuy e Dr. Leandro José Bertoglio, e todos os seus alunos, em especial à Fernanda Troyner e Maria Luísa da Silveira Hahmeyer, por me cederem espaço em seus laboratórios e me auxiliarem com as técnicas utilizadas nessa tese.

Aos meus amigos pela paciência e compreensão de vocês. Mesmo com a distância vocês sempre estiveram presente e não desistiram de mim, obrigada!

A todos que passaram pela minha vida, seja de maneira breve ou duradoura, pois com certeza contribuíram para que eu chegasse até aqui. Obrigada pelos conselhos e crescimento pessoal. Agradeço também a todos os ratos que tornaram possível essa pesquisa e que permitem o avanço da ciência, vocês merecem todo o respeito.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo financiamento e por permitirem que este projeto se concretizasse.

Entenda os seus medos, mas jamais deixe que eles sufoquem os seus sonhos.

(CARROLL, Lewis, 1865)

RESUMO

Durante a sepse o sistema cardiovascular encontra-se deprimido, podendo ocorrer hipotensão sistêmica refratária à infusão de fluidos e agentes vasoativos. A atividade tônica do sistema nervoso simpático é crucial para o controle neural da pressão arterial, ocorrendo através da liberação de noradrenalina, processo modulado por receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos. A sepse está associada à exacerbação da atividade do sistema nervoso simpático e alto nível plasmático de catecolaminas endógenas. Este estudo teve como hipótese que durante a sepse ocorre disfunção dos receptores adrenérgicos neurais, e que o tratamento com clonidina é capaz de reverter as disfunções cardiovasculares observadas. Sendo assim, o presente estudo avaliou o envolvimento de receptores adrenérgicos neurais na disfunção do sistema cardiovascular durante sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP), e se o tratamento com clonidina reverte essas disfunções cardiovasculares. Foi avaliada a pressão arterial e a frequência cardíaca dos ratos anestesiados com cetamina/xilazina, divididos nos seguintes grupos: naïve (SHAM), controle (CTR), CLP (após 6 h e 18 h da indução de sepse) e CLP 6 h + CLO (recebeu clonidina 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, s.c.). Ainda, foi avaliado os parâmetros cardiovasculares de ratos anestesiados com cetamina/xilazina ou pentobarbital sob ventilação mecânica para avaliação da administração central de agonistas adrenérgicos. Os animais foram previamente submetidos à cirurgia estereotáxica para acesso à via intracerebroventricular (i.c.v.; 5 $\mu\text{L}/\text{dose}$). Nos animais anestesiados com cetamina/xilazina ou pentobarbital, somente os efeitos i.c.v. de noradrenalina (10 μg) e clonidina (10 μg) foram avaliados. Nos demais grupos, os efeitos dos agonistas adrenérgicos noradrenalina (10 μg), fenilefrina (30 μg), clonidina (10 μg) ou dexmedetomidina (0,6 μg) foram avaliados antes e 15 min após a injeção i.c.v. dos antagonistas prazosina (5 μg), ioimbina (5 μg) ou metoprolol (100 μg). Além disso, esses mesmos grupos receberam via i.v. noradrenalina e fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg). Também foi realizada a avaliação da reatividade vascular *in vitro* com fenilefrina, noradrenalina e angiotensina II. A microinjeção i.c.v. de clonidina reduziu a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos anestesiados com pentobarbital, enquanto ratos anestesiados com cetamina/xilazina apresentaram aumento da pressão arterial e redução da frequência cardíaca, porém em menor intensidade. Ambos os anestésicos mostraram efeito pressórico para administração de noradrenalina i.c.v., porém o grupo anestesiado com pentobarbital apresentou efeitos em menor intensidade. A administração de agonistas adrenérgicos via i.c.v. induziu efeito hipertensor reduzido nos grupos CLP 6 e 18 h em relação ao grupo CTR. Também houve redução da resposta bradicárdica frente a drogas adrenérgicas i.c.v. nos animais CLP 6 e 18 h. Os antagonistas adrenérgicos pela via i.c.v. sugerem uma maior participação de receptores β_1 -adrenérgicos em relação a receptores α_1 durante a sepse no sistema nervoso central. A hiporresponsividade sistêmica após administrações i.v. de drogas vasoativas foi observada somente após 18 h da instalação da sepse. A administração s.c. de clonidina preveniu a hiporreatividade vascular *in vitro* para fenilefrina, como observado previamente nos anéis de aorta do grupo CLP 6 h + CLO. Entretanto, a administração s.c. de clonidina não melhorou as respostas *in vivo* para as drogas vasoativas. Nos parâmetros cardiovasculares *in vivo* não foram observadas diferenças entre os grupos CLP 6 h + CLO e CLP 6 h. Em conclusão, os presentes resultados sugeriram que a escolha da cetamina/xilazina como anestésico apresentou menores interferências nas respostas cardiovasculares centrais. Apesar da administração s.c. de clonidina não alterar os efeitos da sepse nos parâmetros cardiovasculares avaliados neste estudo, foi observada a participação do sistema nervoso central na disfunção cardiovascular durante a sepse, sugerindo uma tentativa compensatória dos receptores β_1 -adrenérgicos para a dessensibilização de receptores α_1 -adrenérgicos. Esses resultados reforçam a relevância de

estudos futuros que explorem áreas cerebrais específicas e os mecanismos envolvidos nesse processo.

Palavras-chave: Receptor adrenérgico. Sistema nervoso central. Cardiovascular. Sepsis. Clonidina.

ABSTRACT

In sepsis, the cardiovascular system is suppressed, leading to systemic hypotension refractory to fluid resuscitation and vasoactive agents. The tonic activity of the sympathetic nervous system is essential for neural control of arterial pressure and occurs through norepinephrine release, which is modulated by presynaptic α_2 -adrenergic receptors. Moreover, sepsis is associated with the overactivation of the sympathetic nervous system and high serum levels of endogenous catecholamines. This study hypothesized that the dysfunction of neural adrenergic receptors occurs during sepsis, and the treatment with clonidine can revert the observed cardiovascular dysfunctions. The present study evaluated the involvement of neural adrenergic receptors in the cardiovascular dysfunction in the cecal ligation puncture (CLP) model and whether clonidine reverses it. We assessed the arterial pressure and heart rate of anesthetized rats, randomly separated into the following groups: naïve (SHAM), control (CTR), CLP 6 h, CLP 18 h (evaluated at 6 and 18 h after the surgery), and CLP 6 h + CLO (treated with 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ clonidine, s.c.). Moreover, we assessed blood pressure and heart rate of normotensive male rats anesthetized with pentobarbital or ketamine/xylazine, both under mechanical ventilation, to assess the effect of anesthetic drugs on cardiovascular responses to centrally administered adrenergic agonists. Rats were previously submitted to stereotaxic surgery for intracerebroventricular access (i.c.v.; 5 $\mu\text{L}/\text{dose}$). The i.c.v. effects of norepinephrine (10 μg) and clonidine (10 μg) were assessed in rats anesthetized with ketamine/xylazine or pentobarbital. In other groups, effects of adrenergic agonists norepinephrine (10 μg), phenylephrine (30 μg), clonidine (10 μg), or dexmedetomidine (0.6 μg) were assessed before and 15 min after i.c.v. injection of prazosin (5 μg), yohimbine (5 μg), or metoprolol (100 μg). These groups also received i.v. norepinephrine and phenylephrine (3, 10, and 30 nmol/Kg). We also assessed vascular reactivity *in vitro* to phenylephrine, norepinephrine, and angiotensin II. The i.c.v. microinjection of clonidine reduced arterial pressure and heart rate in rats anesthetized with pentobarbital. In contrast, rats anesthetized with ketamine/xylazine showed increased arterial pressure and reduced heart rate with less intensity. In both groups, i.c.v. norepinephrine increased the arterial pressure with less intensity in the pentobarbital group. The administration of adrenergic agonists via i.c.v. route reduced the hypertensive effects in CLP 6 and 18 h groups compared with the CTR group. Furthermore, a reduced bradycardic response to i.c.v. adrenergic agonists were found in CLP 6 and 18 h groups. The i.c.v. administration of adrenergic antagonists suggests greater participation of β_1 -adrenergic receptors than α_1 in the central nervous system during sepsis. Systemic hyporesponsiveness after i.v. injections of vasoactive drugs were observed only after 18 h of sepsis onset. The subcutaneous administration of clonidine prevented sepsis-induced *in vitro* vascular hyporeactivity to phenylephrine, as found in aortic rings obtained from the CLP 6 h + CLO group. However, clonidine administration did not improve the *in vivo* responses to vasoactive drugs. Indeed, cardiovascular parameters showed no differences between CLP 6 h + CLO and CLP 6 h groups. In conclusion, the results suggested that the ketamine/xylazine anesthetic showed less interference in cardiovascular responses to central adrenergic administrations. Although subcutaneous administration of clonidine did not alter the effects of sepsis on the cardiovascular parameters evaluated in this study, we observed a significant role of the central nervous system on cardiovascular dysfunction in sepsis, suggesting a compensatory mechanism through β_1 -adrenergic receptors to the desensitization of α_1 -adrenergic receptors. These results reinforce the relevance of studies exploring specific brain areas and the mechanisms involved in this process.

Keywords: Adrenergic receptor. Central nervous system. Cardiovascular. Sepsis. Clonidine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleos envolvidos no barorreflexo.	21
Figura 2. Via de sinalização clássica de receptores acoplados à proteína G (GPCR).....	24
Figura 3. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte I.....	45
Figura 4. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte II.	46
Figura 5. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte III.....	47
Figura 6. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte IV.....	48
Figura 7. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte V.....	49
Figura 8. Curva de mortalidade.	51
Figura 9. Níveis pressóricos reduzidos e aumento da frequência cardíaca na sepse.....	52
Figura 10. Redução da resposta cardiovascular à administração periférica de fenilefrina na sepse.	53
Figura 11. Redução na resposta contrátil a vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos.	54
Figura 12. Aumento dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NOx) na sepse.	55
Figura 13. Efeito hipertensor sem taquifilaxia da administração repetida de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis.....	57
Figura 14. Efeito hipertensor da administração central e periférica de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 6 h.....	58
Figura 15. Efeito hipertensor da administração central e periférica de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 18 h.....	60
Figura 16. Efeito cardíaco da administração central e periférica de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 18 h.....	61
Figura 17. Efeito hipertensor da administração central e periférica de fenilefrina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 6 h.....	62
Figura 18. Efeito cardíaco da administração central e periférica de fenilefrina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 6 h.	63

Figura 19. Efeito cardiovascular à administração central de prazosina e metoprolol sobre os parâmetros basais em ratos anestesiados controle e CLP 6 h.....	64
Figura 20. Efeito cardiovascular da administração central de prazosina sobre a ação da noradrenalina e fenilefrina em ratos saudáveis e submetidos à CLP.	66
Figura 21. Efeito cardiovascular da administração central de metoprolol sobre a ação da noradrenalina em ratos saudáveis e submetidos à CLP.....	67
Figura 22. Efeito cardiovascular da administração central de clonidina dependente do tipo de anestésico em ratos saudáveis sob ventilação mecânica.	69
Figura 23. Efeito cardiovascular da administração central de noradrenalina conforme o tipo de anestésico em ratos saudáveis sob ventilação mecânica.	70
Figura 24. Efeito hipertensor da administração central de clonidina e dexmedetomidina via receptores α_2 -adrenérgicos.....	71
Figura 25. Efeito hipertensor da administração central de clonidina i.c.v. em ratos anestesiados controle e sépticos.	73
Figura 26. Efeito cardíaco da administração central de clonidina i.c.v. em ratos anestesiados controle e sépticos.	74
Figura 27. Efeito cardiovascular da administração central de ioimbina sobre os parâmetros basais em ratos anestesiados controle e CLP 6 h.....	75
Figura 28. Efeito cardiovascular da administração central de ioimbina sobre a ação da clonidina e dexmedetomidina em ratos saudáveis e submetidos à CLP.	76
Figura 29. Efeito cardiovascular da administração central de prazosina e metoprolol sobre a ação da clonidina em ratos saudáveis e submetidos à CLP.....	77
Figura 30. Aumento dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NOx) ratos septicos e tratados com clonidina.	78
Figura 31. Resposta contrátil a vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos e tratados com clonidina.	80
Figura 32. Níveis pressóricos reduzidos e aumento da frequência cardíaca em ratos sépticos e tratados com clonidina.....	81
Figura 33. Redução na resposta cardiovascular da administração periférica de fenilefrina em ratos sépticos e tratados com clonidina.	82
Figura 34. Aumento na resposta cardiovascular da administração periférica de noradrenalina em ratos sépticos e tratados com clonidina.	83

Figura 35. Efeito hipertensor da administração central de noradrenalina em ratos anestesiados controle, sépticos e tratados com clonidina.	81
Figura 36. Efeito hipertensor da administração central de clonidina em ratos anestesiados controle, sépticos e tratados com clonidina.	82
Figura 37. Esquema apresentando os principais resultados encontrados nos parâmetros cardiovasculares.	87
Figura 38. Resumo esquemático dos principais achados do estudo.	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização de subtipos de receptores adrenérgicos relevantes ao sistema cardiovascular.....	25
Tabela 2. Redução na resposta contrátil máxima (Emáx) e na potência (-logCE ₅₀) a vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos.....	55
Tabela 3. Análise hematológica de animais sépticos.	56
Tabela 4. Variação na frequência cardíaca pela administração central e periférica de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 6 h.....	58
Tabela 5. Análise hematológica de animais sépticos e tratados com clonidina.	79
Tabela 6. Resposta contrátil máxima (Emáx) e potência (-logCE ₅₀) aos vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos e tratados com clonidina.	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMPc - adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ATP – Trifosfato de adenosina
bpm - Batimentos por minuto
CCR - Curva concentração-resposta
CLP - Ligadura e perfuração do ceco
CTR - Controle
CVLM - Bulbo caudal ventrolateral
DAG - 1,2 diacilglicerol
DAMP - Padrão molecular associado ao dano tecidual
EPM - Erro padrão da média
GDP – Difosfato de guanosina
GMPc - Monofosfato cíclico de guanosina
GPCR - Receptor acoplado à proteína G
GRK - Proteína cinase de GPCR
GTP – Trifosfato de guanosina
HMGB1 - Proteína box 1 do grupo de alta mobilidade
i.c.v. - Intracerebroventricular
i.m. - Intramuscular
i.p. - Intraperitoneal
i.v. - Intravenoso
IFN - Interferon
IL - Interleucina
iNOS - Óxido nítrico sintase induzida
IP3 - 1,4,5 trisfosfato de inositol
IP3R - Receptor de IP3
LF - Baixa frequência
LPS – Lipopolissacarídeo(s)
MLC - Cadeia leve de miosina
MLCP – Fosfatase de cadeia leve de miosina
mmHg - Milímetros de mercúrio
nAChR - receptor colinérgico do tipo nicotínico

NLR - Receptor do tipo NOD
NO - Óxido nítrico
NOD - Domínio de ligação a nucleotídeos e oligomerização
NOx – Nitrito/nitrato
NTS - Núcleo do trato solitário
PAD - Pressão arterial diastólica
PAM - Pressão arterial média
PAMP - Padrão molecular associado ao patógeno
PAS - Pressão arterial sistólica
PBS – Solução salina tamponada com fosfato
PEEP - Pressão positiva expiratória final
PIP2 - fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
PKA - Proteína cinase dependente de AMPc
PKC - Proteína cinase C
PKG - Proteína cinase G
qSOFA - SOFA rápido (do inglês *quick* SOFA)
r.p.m. - Rotações por minuto
RhoGEF - Fator de troca de nucleotídeo guanina da família Rho
rpm - Respirações por minuto
RVLM – Bulbo rostral ventrolateral
s.c. - Subcutânea
SHAM - Falso operado
SNC - Sistema nervoso central
SOFA - Avaliação sequencial de falência orgânica
TGF - Fator de transformação de crescimento
TLR - Receptor do tipo *Toll*
TNF - Fator de necrose tumoral
UI - Unidades internacionais
VFC - Variabilidade da frequência cardíaca
VT - Volume corrente

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL.....	19
1.1.1	Sistema nervoso central.....	19
1.1.2	Sistema adrenérgico.....	21
1.2	SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO E IMUNE EM CONTEXTO PATOLÓGICO.....	26
1.2.1	Sistema nervoso autônomo e sistema imune	26
1.2.2	Sepse.....	29
1.2.3	Sistema nervoso autônomo e sepse.....	31
1.3	MODULAÇÃO DO SISTEMA CARDIOVASCULAR E SEPSE.....	33
1.4	OBJETIVOS	35
1.4.1	Objetivo Geral.....	35
1.4.2	Objetivos Específicos	35
2	MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1	ANIMAIS	37
2.2	DROGAS.....	37
2.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	38
2.3.1	Cirurgia estereotáxica	38
2.3.2	Indução de sepse pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP)	38
2.3.3	Medida direta da pressão arterial em ratos anestesiados	39
2.3.4	Microinjeção central de drogas	40
2.3.5	Determinação da reatividade vascular em modelo de aorta isolada.....	40
2.3.6	Hemograma	41
2.3.7	Determinação de NOx plasmático.....	42
2.4	GRUPOS E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	42

2.4.1	Grupos experimentais e etapas do estudo	42
2.4.2	Protocolos experimentais - Parte I - caracterização do modelo de sepse	43
2.4.3	Protocolos experimentais - Parte II - responsividade a drogas vasoativas pela via central e periférica.....	45
2.4.4	Protocolos experimentais - Parte III - efeito de diferentes classes de anestésicos sobre a resposta cardiovascular da administração central de clonidina e noradrenalina em ratos controle	46
2.4.5	Protocolos experimentais - Parte IV - responsividade à administração central de clonidina e dexmedetomidina	48
2.4.6	Protocolos experimentais - Parte V - responsividade cardiovascular em ratos sépticos tratados com clonidina.....	48
2.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
3	Resultados.....	51
3.1	PARTE I: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE SEPSE.....	51
3.2	PARTE II: RESPONSABILIDADE ÀS DROGAS VASOATIVAS ADMINISTRADAS PELA VIA CENTRAL E PERIFÉRICA EM RATOS SÉPTICOS.....	56
3.2.1	Responsividade à administração central e periférica de noradrenalina e fenilefrina	56
3.2.2	Responsividade à administração central de prazosina e metoprolol sobre a noradrenalina e fenilefrina	63
3.3	PARTE III: EFEITO DE ANESTÉSICOS SOBRE A RESPOSTA CARDIOVASCULAR PELA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE CLONIDINA E NORADRENALINA EM RATOS CONTROLE	68
3.3.1	Responsividade à administração central de clonidina e noradrenalina	68
3.3.2	Responsividade à administração central de ioimbina sobre a clonidina e dexmedetomidina.....	70
3.4	PARTE IV: RESPONSABILIDADE À ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE CLONIDINA EM RATOS SÉPTICOS	72
3.4.1	Responsividade à administração central de clonidina	72

3.4.2	Responsividade à administração central de ioimbina, prazosina e metoprolol sobre a clonidina e dexmedetomidina.....	74
3.5	PARTE V: RESPONSABILIDADE À ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE CLONIDINA EM RATOS SÉPTICOS TRATADOS COM CLONIDINA.....	78
4	DISCUSSÃO	86
5	CONCLUSÃO.....	104
	REFERÊNCIAS.....	105

1 INTRODUÇÃO

1.1 CONTROLE DA PRESSÃO ARTERIAL

1.1.1 Sistema nervoso central

Os mecanismos regulatórios da pressão arterial podem ser divididos entre locais, hormonais e neurais, que resultam em vasodilatação ou vasoconstrição. Além disso, fatores que alteram o débito cardíaco também podem afetar a pressão arterial e *vice-versa*. O débito cardíaco pode ser definido como o volume de sangue bombeado pelo coração dentro de um minuto (avaliado em L/min), e depende da frequência cardíaca (FC; cronotropismo), força cardíaca (inotropismo), pré carga e pós carga (VINCENT, 2008). Por exemplo, uma redução na pós carga pode reduzir a pressão arterial, mas quando acompanhada de aumento na FC, pode aumentar o débito cardíaco ou mesmo mantê-lo inalterado (VINCENT, 2008). Os reguladores locais da pressão arterial incluem os componentes metabólicos, endoteliais e miogênicos (SARELIUS & POHL, 2010). Já os mecanismos hormonais abrangem o sistema renina-angiotensina-aldosterona e peptídeos, como a vasopressina e o peptídeo natriurético atrial, dentre outros hormônios vasoativos (GHOSH & PANDIT, 2019). O controle neural – também conhecido como central – da pressão arterial é exercido pelo sistema nervoso autônomo, que compreende o sistema nervoso simpático, o qual inerva tanto o coração quanto os vasos sanguíneos, e parassimpático, o qual inerva o coração (PATEL & ALI, 2017). Os neurônios pré-ganglionares do sistema nervoso autônomo se originam no sistema nervoso central (SNC) e possuem a região terminal axonal nos gânglios com liberação do neurotransmissor acetilcolina, que atuam nos receptores colinérgicos do tipo nicotínicos (nAChR), enquanto os neurônios pós-ganglionares partem do gânglio para os órgãos efetores. O neurotransmissor pós-ganglionar liberado pelo sistema nervoso simpático no órgão efector, com exceção nas glândulas sudoríparas, é a noradrenalina, atuante nos receptores adrenérgicos. Já pelo sistema nervoso parassimpático é liberada acetilcolina, atuante nos receptores colinérgicos do tipo muscarínicos (revisado por PATEL & ALI, 2017).

O centro de controle cardiovascular está localizado na região bulbar do tronco cerebral, e possui regiões modulatórias suprabulbares, como o hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, locus coeruleus, entre outras regiões. O fluxo simpático é regulado por neurônios pré-motores simpáticos, localizados principalmente na região bulbar rostral ventrolateral (RVLM), e são responsáveis pela atividade estimulatória cardiovascular, enquanto o fluxo parassimpático é regulado por neurônios cardíacos vagais, localizados principalmente no núcleo ambíguo da região bulbar, e são responsáveis pela atividade inibitória cardíaca (revisado

por DAMPNEY, 2016). O arco aórtico e os seios carotídeos possuem receptores conhecidos como quimiorreceptores e barorreceptores, responsáveis por detectar alterações na quantidade de oxigênio e na pressão arterial, respectivamente, e são cruciais para a modulação central da pressão arterial (DAMPNEY, 2016). Enquanto os quimiorreceptores levam à vasoconstrição simpática como efeito secundário ao aumento do volume minuto respiratório por neurônios respiratórios, os barorreceptores possuem modulação direta, como descrito a seguir.

Um dos principais reflexos cardiovasculares gerados por estimulação periférica de receptores é o barorreflexo, o qual regula a pressão arterial constantemente e de maneira rápida. Os barorreceptores são mecanorreceptores de estiramento responsáveis por detectar queda ou aumento na pressão arterial e manter a homeostase cardiovascular (DAMPNEY, 2016). Em uma situação de aumento da pressão arterial, por exemplo, esses barorreceptores levam a informação através de fibras aferentes para o núcleo do trato solitário (NTS) no bulbo, onde neurônios estimulatórios podem se projetar diretamente do NTS para neurônios cardíacos vagais no núcleo ambíguo, resultando em efeitos cronotrópicos negativos através de receptores muscarínicos, e/ou para interneurônios inibitórios GABAérgicos no bulbo caudal ventrolateral (CVLM), o qual se projeta para neurônios pré-motores simpáticos na RVLM, inibindo-os. Os neurônios simpáticos localizados na RVLM são tonicamente ativos, sendo os principais responsáveis pelo tônus vasomotor através de suas eferências projetadas pela coluna celular intermediolateral, como ilustrado na Figura 1, e pela liberação pós-ganglionar de noradrenalina aos receptores adrenérgicos (principalmente $\alpha 1$) da musculatura lisa vascular (revisado por DAMPNEY, 2016). Os neurônios da RVLM são, em sua maioria, adrenérgicos (cerca de 70%) - pertencentes ao grupo de neurônios conhecidos como C1 - e glutamatérgicos (SCHREIHOFFER & GUYENET, 1997). Ao serem inibidos, os neurônios simpáticos na RVLM diminuem a atividade eferente, fazendo com que o tônus vasomotor diminua e ocorra vasodilatação, além de diminuir a estimulação simpática no coração, favorecendo a ação parassimpática tônica gerada pelos neurônios vagais (DAMPNEY, 2016).

As regiões modulatórias suprabulbares atuam principalmente em resposta a situações de estresse. O hipotálamo tem importante papel regulatório para manutenção da homeostase através do núcleo dorsomedial, núcleo paraventricular e núcleo supraóptico, além da liberação neuroendócrina de vasopressina e ocitocina pelo núcleo paraventricular e supraóptico para a hipófise. Existem diversos grupos de neurônios responsáveis por sintetizar adrenalina e noradrenalina no SNC, os quais são divididos entre o grupo noradrenérgico (A1-A7), caracterizados por Dahlström & Fuxe em 1964, e adrenérgico (C1-C3), caracterizados por

Hökfelt et al. em 1974, subdivididos a partir da região em que se encontram no SNC. Alguns neurônios C1 da RVLM, assim como os neurônios A6 do locus coeruleus e neurônios catecolaminérgicos de outras regiões (A1, A2, C2 e C3), se projetam para o hipotálamo e acredita-se que possuem participação na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (SAWCHENKO & SWANSON, 1982; CUNNINGHAM et al., 1990). O oposto também ocorre, onde neurônios do hipotálamo se projetam diretamente ou indiretamente para o grupo C1, podendo liberar neurotransmissores como vasopressina, fator liberador de corticotrofina e angiotensina II (GÓMEZ et al., 1993; MILNER et al., 1993; KUBO et al., 2002), participando de respostas frente a diferentes estresses como infecções, hemorragia e falência cardíaca (BADOER & MEROLLI, 1998; BULLER et al., 2003; XU et al., 2012). Além disso, o fator liberador de corticotrofina é o principal regulador do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e também regula respostas do sistema nervoso autônomo nessas condições de estresse, podendo alterar a resposta cardiovascular (DEUSSING & CHEN, 2018).

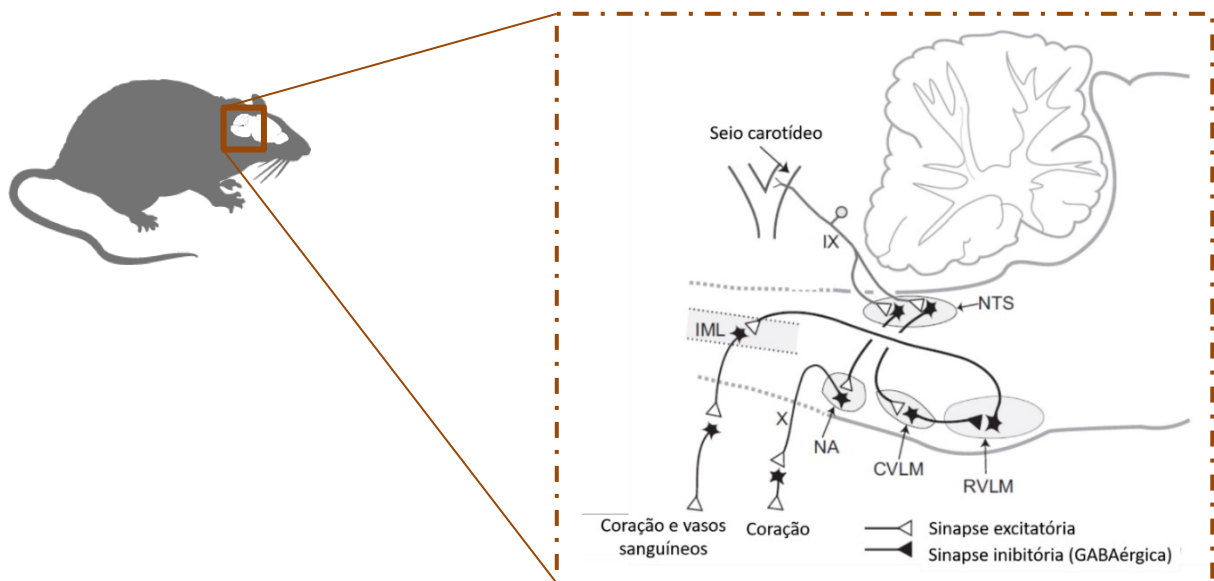


Figura 1. Núcleos envolvidos no barorreflexo. Diagrama esquemático de uma fatia sagital do encéfalo de rato ilustrando as regiões bulbares responsáveis pela modulação do sistema simpático e parassimpático para o coração e vasos sanguíneos durante o barorreflexo (arco aórtico não representado). IX: nervo glossofaríngeo; NTS: núcleo do trato solitário; NA: núcleo ambíguo; CVLM: bulbo caudal ventrolateral; RVLM: bulbo rostral ventrolateral; X: nervo vago; IML: coluna celular intermediolateral. (Adaptada de DAMPNEY, 2016).

1.1.2 Sistema adrenérgico

Os receptores adrenérgicos são divididos em três tipos (α_1 , α_2 e β), e cada família possui 3 subtipos, codificado por diferentes genes (α_1A , α_1B , α_1D , α_2A , α_2B , α_2C , β_1 , β_2 e

β_3) (BYLUND et al., 1994; HIEBLE et al., 1995). Todos fazem parte do grupo de receptores acoplados à proteína G (GPCR). Os GPCRs possuem sete α -hélices transmembranares, com um domínio extracelular amino-terminal e outro intracelular carboxi-terminal (WEIS & KOBILKA, 2019). A proteína G possui três subunidades: α , β e γ , e sua conformação inativada está acoplada com difosfato de guanosina (GDP) na subunidade $G\alpha$. Quando o GPCR é ativado por um agonista, permanece em uma conformação que aumenta sua afinidade com a proteína G no domínio carboxi-terminal e induz a proteína $G\alpha$ a se dissociar do GDP, permitindo que a mesma se ligue ao trifosfato de guanosina (GTP) (WEIS & KOBILKA, 2019). Quando a proteína G está associada a um GTP, se dissocia do receptor e assume a conformação ativada, e a subunidade $G\alpha$ se dissocia da subunidade $G\beta\gamma$, passando a modular a atividade efetora, através de segundos mensageiros (enzimas e canais iônicos). A subunidade $G\alpha$ possui atividade intrínseca GTPase, catalisando sua conversão em GDP, voltando para a conformação inativada ($G\alpha\beta\gamma$) (HAUACHE, 2001). Ainda, a subunidade $G\alpha$ possui quatro grandes famílias: Gs, Gi/o, Gq/11 e G12/13, atuando em diferentes vias de transdução de sinal (PFLEGER et al., 2019).

Cada família de receptor adrenérgico possui preferência por um tipo de proteína $G\alpha$. Os receptores do tipo β -adrenérgicos foram os primeiros receptores do tipo GPCR a serem purificados em 1981 por Shorr et al., e ativam proteínas do tipo Gs (estimulatória), as quais, em resumo, estimulam a adenilil ciclase, que catalisa e aumenta os níveis intracelulares de adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) através de trifosfato de adenosina (ATP). O segundo mensageiro AMPc se liga na proteína cinase dependente de AMPc (PKA) e culmina na liberação de subunidades catalíticas, que através de fosforilação de diversas estruturas intracelulares leva a uma resposta celular agonista-específica como, por exemplo, aumento da força e frequência da contração cardíaca através de ativação de receptores β_1 (PFLEGER et al., 2019). De maneira oposta, tem sido descrito que os receptores α_2 -adrenérgicos ativam proteínas do tipo Gi/o (inibitória), que inibem adenilil ciclase e reduzem os níveis intracelulares de AMPc, e por consequência diminuem a resposta celular levando, por exemplo, à diminuição da liberação de neurotransmissores na fenda sináptica (PFLEGER et al., 2019). Também de forma resumida, é bem conhecido que receptores α_1 -adrenérgicos ativam proteínas do tipo Gq/11, as quais estimulam a fosfolipase C, responsável por hidrolisar fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato (PIP2) da membrana plasmática, gerando os segundos mensageiros 1,4,5 trisfosfato de inositol (IP3) e 1,2 diacilglicerol (DAG). Neste caso, o IP3 atua como ligante do receptor específico (IP3R) na membrana do retículo endoplasmático, liberando o cálcio armazenado para o meio intracelular e, consequentemente, estimulando a contração muscular e exocitose em neurônios

e células endócrinas. Já o DAG é capaz de ativar a proteína cinase C (PKC), que pode fosforilar diversas estruturas para gerar respostas em células efetoras (PFLEGER et al., 2019; REHMAN et al., 2020).

A família das proteínas G12/13 também possui papel importante na manutenção da contração do músculo liso vascular, e pode ser ativada por diversos receptores associados a efeitos vasoconstritores, como a noradrenalina e a angiotensina II. Ao ser ativada, a proteína G12/13 irá se ligar ao fator de troca de nucleotídeo guanina da família Rho (RhoGEF) e converter a RhoA-GDP (inativada) para RhoA-GTP (ativada). A RhoA-GTP possui diversas ações biológicas, dentre elas, ao se ligar com a Rho-cinase no músculo liso, esta catalisa a fosforilação da fosfatase da cadeia leve de miosina (MLCP), inibindo-a. Ao inativar a MLCP, a cadeia leve de miosina (MLC) se mantém em sua forma fosforilada e, por consequência, mantém a contração do músculo liso juntamente com a actina por um tempo mais prolongado, podendo aumentar o tônus vascular (HILGERS & WEBB, 2005). A Figura 2 mostra um resumo da via de sinalização de um GPCR e as famílias da subunidade $G\alpha$.

A ação de cada tipo de receptor adrenérgico depende de sua localização, e cada local pode conter uma maior quantidade de determinado subtipo de receptor. Os receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos estão expressos em diversos tecidos, em destaque músculos (liso, esquelético e cardíaco) e neurônios, e possuem função excitatória e constritora (CALZADA & ARTIÑANO, 2001). Os receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos são expressos principalmente em neurônios pré-sinápticos autonômicos no SNC, e seus agonistas são classicamente utilizados como anti-hipertensivos (PETTINGER, 1975), hipnóticos (HOSSMANN et al., 1980) ou analgésicos (SAWAMURA et al., 2000), a depender do local da ação. Além do efeito central, a ativação do receptor $\alpha 2$ -adrenérgico, mais especificamente o subtipo $\alpha 2B$, possui ação periférica vasoconstritora em aorta (EGLÈME et al., 1984) e veias (ZHAO et al., 2008).

Com relação aos receptores β -adrenérgicos, os subtipos $\beta 1$ são expressos em cardiomiócitos e levam ao aumento da força e frequência da contração cardíaca, como citado anteriormente, além de estimular a liberação de renina pelas células justaglomerulares (WEINBERGER et al., 1975; ROHRER et al., 1996). Os receptores $\beta 2$ possuem ampla distribuição e diversos efeitos, como vasodilatação em vasos da musculatura esquelética, broncodilatação, lipólise e gliconeogênese (revisado por REHMAN et al., 2020). Já os receptores $\beta 3$ possuem função de lipólise, constipação, retenção urinária e vasodilatação coronária (COMAN et al., 2009). Na carótida e aorta torácica de ratos *in vitro*, agonistas seletivos de receptor $\beta 3$ induziram relaxamento (ORIOWO, 1994; TROCHU et al., 1999).

Ambos os receptores $\beta 1$ e $\beta 2$ são expressos amplamente no SNC, enquanto o receptor $\beta 3$ encontra-se pouco expresso, e acredita-se que este participe da modulação da ingestão alimentar e tenha efeitos benéficos relacionados à doença de Alzheimer (KANZLER et al., 2011; TOURNISSAC et al., 2021). Um resumo da localização de cada subtipo de receptor adrenérgico com foco no sistema cardiovascular (central e periférico) encontra-se na Tabela 1.

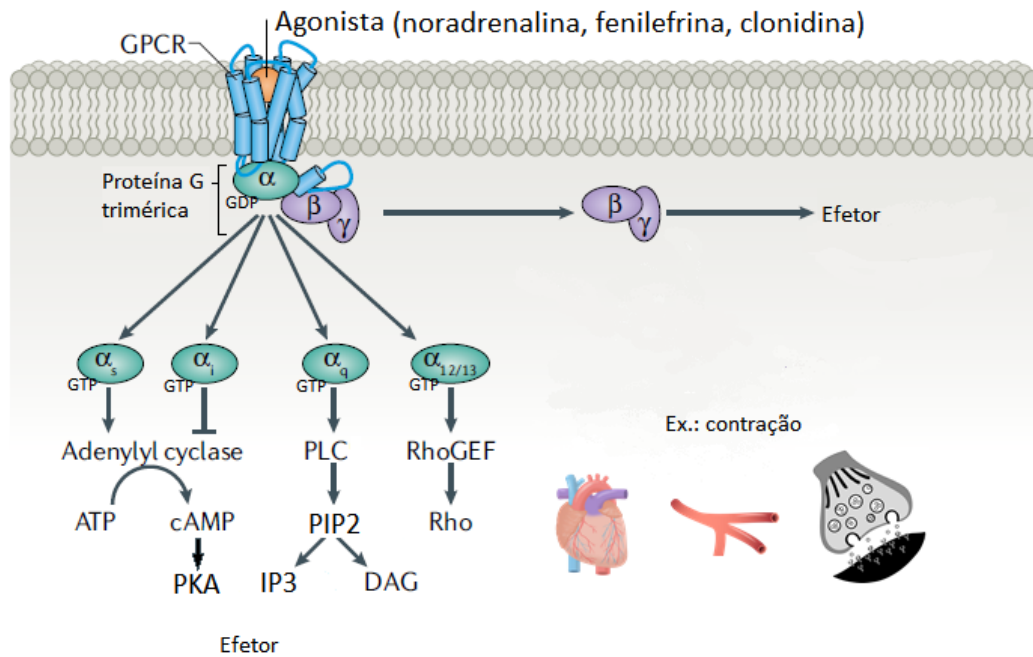


Figura 2. Via de sinalização clássica de receptores acoplados à proteína G (GPCR). Ao se ligar a um agonista, a mudança conformacional do receptor faz com que sua associação à proteína G se dissocie do difostato de guanosina (GDP) e se ligue ao trifostato de guanosina (GTP), além de dissociar a subunidade $G\alpha$ das subunidades $G\beta\gamma$, e ambas modulam a atividade efetora. A subunidade $G\alpha$ possui diferentes famílias (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ e $G_{12/13}$), e cada uma atua em diferentes vias. A inibição ou estímulo da contração é um exemplo de resposta final, afetando a força e frequência cardíaca, vasoconstrição ou liberação de neurotransmissores pelas vesículas sinápticas. ATP: adenosina trifostato; cAMP: adenosina 3',5'-monofostato cíclico; PKA: proteína cinase dependente de cAMP; PLC: fosfolipase C; PIP2: fosfatidilinositol 4,5 bisfostato; IP3: 1,4,5 trisfostato de inositol; DAG: 1,2 diacilglicerol. (Adaptada de PFLEGER et al., 2019).

Tabela 1. Localização de subtipos de receptores adrenérgicos relevantes ao sistema cardiovascular.

Subtipo	Distribuição	Referência
$\alpha 1A$	Coração, artéria renal, aorta, artérias de resistência, linfócitos, córtex, hipotálamo e tronco encefálico.	PRICE et al., 1993; CALZADA & ARTIÑANO, 2001; ROKOSH & SIMPSON, 2002.
$\alpha 1B$	Coração, artéria pulmonar, aorta, rins, córtex, linfócitos e tronco encefálico.	PRICE et al., 1993; DAY et al., 1997; CALZADA & ARTIÑANO, 2001.
$\alpha 1D$	Coração, artéria pulmonar, renal, carótida, íliaca e mesentérica superior, aorta, linfócitos e córtex.	PRICE et al., 1993; DAY et al., 1997; CALZADA & ARTIÑANO, 2001.
$\alpha 2A$	Coração, rins, artéria mesentérica, córtex, tronco encefálico, hipotálamo e locus coeruleus.	CALZADA & ARTIÑANO, 2001.
$\alpha 2B$	Rins, músculo liso vascular, tálamo.	LINK et al., 1996; MACDONALD et al., 1997.
$\alpha 2C$	Coração, rins, córtex, locus coeruleus, núcleo da rafe, substância negra.	MACDONALD et al., 1997; CALZADA & ARTIÑANO, 2001.
$\beta 1$	Coração, rins, córtex, núcleo paraventricular do hipotálamo, e tronco encefálico.	ELALOUF et al., 1993; PASCHALIS et al., 2009.
$\beta 2$	Coração, leito vascular, linfócitos e córtex.	LANDS et al., 1967; ANDRÉ et al., 1996; PUPO & MINNEMAN, 2001.
$\beta 3$	Coração, músculo liso intestinal, endotélio, células adiposas, hipotálamo e córtex.	URSINO et al., 2009.

Fonte: A autora (2020).

Os GPCRs podem sofrer regulação negativa quando expostos de maneira prolongada a um agonista, seja para cessar a transdução de sinal ou para evitar exacerbação de estímulos, e este processo leva o nome de taquifílixia. Essa modulação, conhecida como dessensibilização, pode ocorrer através da manutenção do GPCR na superfície celular, porém refratário a novos estímulos, ou internalização dos receptores, com posterior degradação ou reciclagem, o que pode induzir à hiporresponsividade para o respectivo agonista (RAJAGOPAL & SHENOY,

2018). Quando ocorre a internalização e redução da expressão de receptores na superfície da membrana de maneira prolongada, o processo recebe o nome de *downregulation* (TSAO et al., 2001). A dessensibilização pode ocorrer através de mecanismos homólogos ou heterólogos. A dessensibilização homóloga ocorre quando um agonista está presente, induzindo a fosforilação e inativação do receptor (SIBLEY et al., 1985). Já a heteróloga independe da presença do agonista, dependendo somente do aumento dos níveis de AMPc ou DAG, causando fosforilação (SIBLEY et al., 1985). Atualmente, três grupos de moléculas têm sido descritas como as principais reguladoras desse processo: segundos mensageiros regulados por cinases, proteínas cinases de GPCR (GRKs), e arrestinas (LEFKOWITZ et al., 1998). Existem sete subtipos de GRKs (GRK1-7) divididas em 3 subfamílias (GRK1/7, GRK2/3 e GRK4/5/6), e todas fosforilam o receptor no sítio de ligação com o agonista (RAJAGOPAL & SHENOY, 2018). De maneira simplificada, sua ativação ocorre através do segundo mensageiro IP₃, e após fosforilar o receptor, este último passa a ter maior afinidade com moléculas de arrestinas, se estabilizando em sua conformação no estado desacoplado (RAJAGOPAL & SHENOY, 2018). As arrestinas possuem diversas funções celulares, além de sua participação na dessensibilização, através da internalização e reciclagem do receptor. As β -arrestinas se ligam tanto diretamente quanto indiretamente com moléculas de clatrina. No caso da interação indireta, esta ocorre através da ligação das β -arrestinas com o complexo adaptador de proteína AP2 (LAPORTE et al., 1999). O resultado dessa interação é a formação de vesículas revestidas por clatrina contendo o(s) receptore(s). As clatrininas induzem a internalização do receptor fosforilado através de endocitose. Uma vez internalizado, o receptor pode ser reciclado para a superfície da membrana celular ou transferido para a membrana interna de endossomos, onde é destinado à degradação lisossomal (CALEBIRO et al., 2010).

1.2 SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO E IMUNE EM CONTEXTO PATOLÓGICO

1.2.1 Sistema nervoso autônomo e sistema imune

Atualmente sabe-se que, durante um quadro inflamatório, existe a participação conjunta do SNC e sistema imune através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso simpático e parassimpático para modulação do quadro (ELENKOV et al., 2000; STERNBERG, 2006). Em estudos iniciais, em 1997, Besedovsky et al. demonstraram que a inflamação de tecidos periféricos alterava a sinalização neuronal no hipotálamo, demonstrando a participação dessa região no controle imune. A resposta inflamatória possui diversos e complexos eventos, como o aumento da permeabilidade capilar, a ativação de células

endoteliais e de macrófagos, o recrutamento de leucócitos, a agregação plaquetária, a liberação de superóxidos, a estimulação da cascata de coagulação, e muitos outros (ALVAREZ PEREZ GIL et al., 2012). Essa resposta é essencial para a eliminação do patógeno e reparo do tecido lesionado. Entretanto, quando existe um excesso na atividade inflamatória o dano tecidual pode ser maior, já que as substâncias pró-inflamatórias liberadas podem agravar a lesão. Os principais mediadores pró-inflamatórios liberados são as citocinas, nas quais incluem-se interleucina-1 (IL-1), IL-6, IL-12, fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ) e proteína box 1 do grupo de alta mobilidade (HMGB1) (LAMKANFI et al., 2010). De maneira oposta, existem os mediadores anti-inflamatórios, responsáveis por manter a homeostase na resposta inflamatória através da diminuição de produção de mediadores pró-inflamatórios e redução no número de células do sistema imune no tecido. Incluem-se nesse grupo IL-4, IL-10, IFN- α e fator de transformação de crescimento- β (TGF- β) (BURAS et al., 2005). Uma das potenciais vantagens da participação do sistema nervoso autônomo consiste no fato de que a sinalização neuronal é muito mais rápida em comparação com respostas periféricas, o que garante um controle imediato e por vezes mais direcionado da resposta inflamatória, evitando, por exemplo, a exacerbação da mesma.

As primeiras evidências da modulação do sistema imune vieram do estudo de Zabrodskii em 1987, onde foi observado que o uso de um composto anticolinesterásico com ação inibitória no SNC em roedores levava à diminuição da resposta imune. Mais tarde, Borovikova et al., em 2000, identificaram o mecanismo neurológico responsável por inibir a ativação de macrófagos e inibir a síntese de mediadores inflamatórios induzida por endotoxina, o que ocorria através de eferência vagal parassimpática, e foi originalmente denominada “via colinérgica anti-inflamatória”. Desde então, diversos estudos demonstraram a participação vagal/colinérgica na via inflamatória (HANSEN et al., 2001; BERNIK et al., 2002; VAN WESTERLOO et al., 2006). Alguns mediadores, como o TNF, podem chegar ao SNC através de duas vias: pela região dos órgãos circunventriculares, os quais não possuem barreira hematoencefálica, pois estão localizados na borda do sistema ventricular e são perfundidos por capilares fenestrados (SAPER & BREDEK, 1994); ou através do nervo vago aferente (WATKINS et al., 1995). No SNC, esses mediadores levam a informação à região hipotalâmica e ao NTS, que possivelmente atuam através de receptores muscarínicos M1, e conduzem a resposta anti-inflamatória pelo nervo vago eferente (PAVLOV et al., 2006), finalizando o reflexo inflamatório. Os macrófagos e algumas células produtoras de citocinas, como os linfócitos T e B, possuem receptores do tipo nAChR, mais especificamente contendo a

subunidade $\alpha 7nAChR$, que são responsáveis pela sinalização intracelular inibitória de síntese de citocinas pró-inflamatórias (DE JONGE & ULLOA, 2007). A importância da via colinérgica anti-inflamatória fica evidente através dos experimentos de Wang et al. (2003), onde camundongos *knockout* para $\alpha 7nAChR$ ou vagotomizados, expostos a endotoxina, não conseguem suprimir a síntese exacerbada de citocinas, demonstrando uma modulação tônica dessa via.

Enquanto o sistema nervoso parassimpático gera um efeito anti-inflamatório, o sistema nervoso simpático possui efeito ambíguo, dependendo do receptor adrenérgico a ser estimulado. Fibras simpáticas inervam todos os órgãos linfoides (ELENKOV et al., 2000), e receptores $\beta 2$ -adrenérgicos estão presentes em todos os linfócitos, com exceção das células T-*helper* 2, e modulam a liberação de citocinas, inibindo a liberação de IFN- γ e estimulando a liberação de IL-10 (PANINA-BORDIGNON et al., 1997). Além disso, a ativação desses receptores diminui a concentração de células T-*helper* 1, favorecendo o aumento de T-*helper* 2 (ELENKOV et al., 2000). A ativação de receptores $\beta 2$ também beneficia o efeito anti-inflamatório, inativando macrófagos, diminuindo a síntese de citocinas pró-inflamatórias e aumentando a síntese de citocinas anti-inflamatórias (DENG et al., 2004; HUANG et al., 2013).

O acúmulo de citocinas pró-inflamatórias periféricas pode elevar a concentração de noradrenalina no hipotálamo e ativar receptores do tipo α -adrenérgicos (DUNN, 2000), aumentando também a concentração de catecolaminas plasmáticas (ANNANE et al., 1999). A administração de IL-1 ou lipopolissacarídeos (LPS, uma endotoxina de bactérias gram-negativas), no locus coeruleus aumenta a atividade noradrenérgica de neurônios da região, sugerindo que a mesma também participa da via inflamatória (BORSODY & WEISS, 2002; BORSODY & WEISS, 2004). A produção exacerbada de catecolaminas pode causar danos ao coração, já que com o aumento da FC via receptores $\beta 1$, será necessário maior quantidade de ATP e demanda energética mitocondrial, o que pode levar ao esgotamento desses recursos e morte dos cardiomiócitos (ELLISON et al., 2007). Ainda, Grisanti et al. (2011) sugerem que os receptores $\alpha 1$ presentes em monócitos humanos medeiam respostas pró-inflamatórias. Quando existe uma ativação prolongada ou inapropriada do sistema nervoso simpático ou do sistema imune, podem ocorrer efeitos patológicos ou até mesmo letais, como inflamação crônica, choque tóxico, deficiência imune, entre outros.

1.2.2 Sepses

A sepsis é caracterizada como uma disfunção orgânica potencialmente fatal, decorrente de uma resposta inflamatória desregulada do hospedeiro frente a um processo infeccioso, e em casos de não resolução desse quadro, pode evoluir para o choque séptico, o qual é associado com alterações celulares, circulatórias e metabólicas que podem levar à morte (SINGER et al., 2016). A principal característica do choque séptico é a hipotensão refratária à reposição volêmica, onde existe a necessidade de administração de vasoconstritores para a manutenção da pressão arterial média (PAM) acima de 65 mmHg e lactato abaixo de 2 mmol/L (SINGER et al., 2016). Se não revertida, essa hipotensão pode prejudicar a perfusão dos órgãos vitais e contribuir para a falência múltipla dos órgãos, a principal causa de morte na sepsis (ANGUS & VAN DER POOL, 2013). Junto com o choque séptico, a sepsis é a principal causa de mortalidade e morbidade em unidades de terapia intensiva no mundo (BERG & GERLACH, 2018), com cerca de 48,9 milhões de casos por ano e representando 19,7% dos casos globais de morte (RUDD et al., 2020). Além disso, um estudo observacional relatou que a taxa de mortalidade no Brasil é de 55,7% (MACHADO et al., 2017).

Nesse contexto, é necessário que haja um diagnóstico rápido para melhorar a taxa de sobrevivência e desfecho clínico. O SOFA (avaliação sequencial de falência orgânica; do inglês: *sequential sepsis-related organ failure assessment*) é um instrumento de triagem de pacientes com suspeita de sepsis, o qual leva em consideração alguns parâmetros clínicos, como frequência respiratória, PAM, nível de consciência pela escala de coma Glasgow, relação entre pressão arterial de oxigênio e fração inspirada de oxigênio (PaO_2/FiO_2), creatinina depurada, (mL/dia), bilirrubina e plaquetas. Quando a pontuação final obtida com a aplicação do SOFA é igual ou acima de 2 o quadro pode estar associado a uma disfunção orgânica com risco de morte (SINGER et al., 2016). Em sua versão reduzida, o qSOFA (do inglês: *quick SOFA*) avalia pacientes graves com suspeita de sepsis rapidamente, sem a necessidade de exames laboratoriais. Ele leva em consideração três parâmetros: frequência respiratória (≥ 22 /minuto), pressão arterial sistólica (PAS; ≤ 100 mmHg) e escala de coma Glasgow (< 15), sendo que quando o paciente apresenta pelo menos 2 dos critérios citados, o SOFA deve ser aplicado (SINGER et al., 2016).

Com relação à fisiopatologia da sepsis, é conhecido que o primeiro passo para iniciar a cascata imunológica é a apresentação do patógeno (seja ele bactéria, vírus ou fungo), através da ligação do padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) em receptores específicos como os receptores do tipo *Toll* (TLR) e os receptores do tipo NOD (também conhecidos como

receptores similares ao domínio de oligomerização nucleotídica; NLR), dentre outros. Esses receptores estão expressos em múltiplos tipos celulares e estão presentes em grande densidade em células do sistema imune inato (macrófagos e monócitos). Endotoxinas bacterianas, componentes virais e de fungos são exemplos de PAMPs que atuam ligando-se a TLRs e NLRs. Outra maneira de ativar esses receptores é através de padrões moleculares associados ao dano tecidual (DAMP), os quais são produtos endógenos liberados de células necróticas e apoptóticas (como ATP e DNA). A ativação desses receptores resulta em liberação de citocinas pró-inflamatórias, como descritas anteriormente, causando ativação e proliferação de leucócitos, sistema complemento, moléculas de adesão endotelial e maior produção de óxido nítrico (NO), entre outros efeitos. No caso da sepse essa ativação leva a uma resposta inflamatória exacerbada, desregulando a homeostase celular (revisado por GYAWALI et al., 2019). O eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e sua consequente produção de glicocorticoides durante a sepse tem papel regulatório na resposta pró-inflamatória, porém muitas vezes ocorre disfunção desse eixo e dessensibilização dos receptores de glicocorticoides (VANDERWALLE & LIBERT, 2020).

Em quadros de sepse e choque séptico o sistema cardiovascular encontra-se deprimido. Dentre os fatores que contribuem para a falência vascular e hipotensão durante a sepse está a produção excessiva de NO pela isoforma induzida da NO sintase (iNOS) nos vasos (FEIHL et al., 2001). O NO promove relaxamento vascular através da sua difusão do endotélio para a camada da musculatura lisa vascular, onde estimula a guanilato ciclase, que aumenta a concentração de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), ativando a proteína cinase G (PKG), que por sua vez reduz o tônus vascular (TANG et al., 2003). Outro fator que pode resultar em disfunção vascular e hipotensão é a regulação negativa e dessensibilização de receptores cruciais para a vasoconstrição, como os receptores de angiotensina, vasopressina e os receptores adrenérgicos (BUCHER, 2004). A densidade e a atividade mediada por receptores adrenérgicos encontram-se reduzidas em pacientes com choque séptico devido à atividade de GRKs e aumento de fosfodiesterases e fosfolipases, dentre outros eventos, o que leva a uma dessensibilização e posterior degradação dos receptores (THANGAMALAI et al., 2014; SAKAI et al., 2017). A *downregulation* de receptores α 1-adrenérgicos também ocorre durante a sepse induzida em camundongos, o que foi demonstrado tanto *in vivo* como *in vitro*, sendo resultado da liberação de citocinas pró-inflamatórias e associado com a falência circulatória (SCHMIDT et al., 2009). Uma causa importante para a depressão miocárdica encontrada na sepse é a exacerbção da liberação de catecolaminas, já descrita, e a produção de espécies

reativas de oxigênio, causada pelas citocinas pró-inflamatórias (ELLISON et al., 2007). A hipotensão, juntamente com a falência múltipla de órgãos resultante, é a principal causa da alta taxa de mortalidade associada ao choque séptico (BURGDORFF et al., 2018).

1.2.3 Sistema nervoso autônomo e sepse

Apesar da exacerbação da atividade do sistema nervoso simpático e produção de catecolaminas durante a sepse, as opções terapêuticas utilizadas atualmente continuam escassas, se limitando à antibioticoterapia para controle da infecção, a utilização de cristaloides (30 mL/Kg) e de vasoconstritores para uma tentativa de estabilização hemodinâmica (GYAWALI et al., 2019). A noradrenalina é o vasopressor de primeira escolha para o tratamento do choque séptico (RHODES et al., 2017), além da adrenalina, dopamina, fenilefrina e vasopressina (GYAWALI et al., 2019). Entretanto, muitas vezes essa tentativa de aumentar a pressão arterial acaba falhando devido a diversos fatores, alguns deles descritos anteriormente. Pensando na escassez de alternativas atuais, alguns grupos têm estudado o sistema nervoso autônomo visando determinar alvos para intervenções terapêuticas na sepse, como o bloqueio simpático e estimulação vagal/colinérgica.

O bloqueio simpático tem se mostrado eficiente em diversos estudos, apresentando preservação do balanço entre o sistema nervoso simpático e parassimpático e volume sistólico, ressensibilização às catecolaminas, melhora da microcirculação e regulação das citocinas, induzindo ação anti-inflamatória (ACKLAND et al., 2010; GELOEN et al., 2013; MORELLI et al., 2013; XIANG et al., 2014). Atualmente, para a indução de bloqueio simpático na sepse são estudadas duas abordagens, que são o uso de antagonistas β_1 e de agonistas α_2 . À primeira vista, essas abordagens parecem contraintuitivas, já que na sepse existe o quadro hipotensivo e estes fármacos são conhecidos como anti-hipertensivos. Entretanto, tornam-se plausíveis quando avaliada a participação desses receptores no contexto inflamatório (ver item 1.2.1).

Um dos primeiros estudos onde foi realizada a administração de β -bloqueadores em modelo associado à sepse data de 1969, e foi realizado por Berk et al., inicialmente em cães endotoxêmicos e, posteriormente, em humanos com sepse (BERK et al., 1972). O grupo sugeriu que o uso de propranolol, um antagonista β -adrenérgico não seletivo, pode melhorar a hemodinâmica e reduzir a secreção endógena de catecolaminas, além de aumentar a taxa de sobrevivência, levando a um bom prognóstico. Entretanto, essa abordagem ficou esquecida até o ano de 2005, quando Suzuki et al. observaram a melhora da disfunção miocárdica em ratos sépticos tratados com esmolol, um antagonista β_1 seletivo, além da diminuição de TNF- α

plasmática. Desde então diversos estudos demonstraram benefícios do bloqueio de receptores β_1 na sepse, inclusive observaram regulação positiva de receptores α_1 nos vasos (SCHMITZ et al., 2007; ACKLAND et al., 2010; KIMMOUN et al., 2015). De maneira complementar, estudos utilizando agonistas β_2 têm se mostrado benéficos, através da inibição de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas anti-inflamatórias, redução da produção de NO e prevenção da hiporresponsividade à noradrenalina nos vasos (SZABÓ et al., 1997; IZEBOUD et al., 1999; ZABRODSKII, 2019).

Os agonistas α_2 são conhecidos classicamente pelo seu efeito hipotensivo, decorrente da ação pré-sináptica, e consequente redução do fluxo simpático. Além disso, esses agonistas também são utilizados na clínica para efeito sedativo. Um dos primeiros estudos que demonstrou uma possível ação benéfica dos agonistas α_2 -adrenérgicos na sepse foi realizado em 2004, por Taniguchi et al. em ratos endotoxêmicos. Este grupo demonstrou que o uso de dexmedetomidina, um agonista seletivo α_2 , foi capaz de reduzir a taxa de mortalidade e inibir a resposta pró-inflamatória. Porém, somente em 2010 surgiu a primeira descrição clínica de que os agonistas α_2 possuem efeito benéfico em humanos com choque séptico, através do relato de caso de Pichot et al. (2010). Durante a infusão de clonidina, um agonista α_2 , a pressão sistólica do paciente se elevou, a FC diminuiu e houve melhora da responsividade à noradrenalina exógena. Este relato abriu portas para novos estudos, na esperança de um tratamento adjuvante efetivo para a sepse. Nos anos seguintes diversos grupos estudaram os benefícios dos agonistas α_2 na sepse, não somente na modulação inflamatória e cardiovascular, mas também no sistema renal e pulmonar (GEOLEN et al., 2013; KOCA et al., 2013; CALZAVACCA et al., 2019). Um estudo de Xiang et al. (2014) demonstrou que a dexmedetomidina modula a resposta inflamatória através da via colinérgica anti-inflamatória, já que em animais endotoxêmicos vagotomizados não há redução da resposta pró-inflamatória, mesmo com a administração do fármaco. Corroborando este achado, Yu et al. (2019) sugerem que a dexmedetomidina atua via ativação de α_7nAChR em cardiomiócitos. Gulati et al. (1991) observou que em ratos saudáveis, a administração crônica de clonidina induz regulação positiva de receptores α -adrenérgicos e colinérgicos muscarínicos no hipotálamo e na região bulbar. Um estudo de Zoukos et al. (1992) sugere que além de induzir resposta anti-inflamatória, a clonidina induz regulação positiva e sensibilização dos receptores β -adrenérgicos em humanos saudáveis. Estes estudos sugerem que a clonidina possui potencial para prevenir a regulação negativa (aqui chamada por vezes de *downregulation*) e/ou para induzir ressensibilização de receptores adrenérgicos ao reduzir a liberação de catecolaminas na sepse.

Apesar das múltiplas evidências supracitadas, até o presente momento não foram publicados estudos explorando, diretamente, a capacidade de agonistas α_2 reverterem a hiporresponsividade cardiovascular frente a catecolaminas. Geolen et al. (2013) sugerem que os agonistas α_2 podem reverter a hiporresponsividade dos vasos frente à norepinefrina em ratos com endotoxemia. Lankadeva et al. (2015) observaram, em ovinos com endotoxemia, que o tratamento com clonidina por via intravenosa (i.v.) normaliza a atividade simpática renal, além de restaurar a sensibilidade para fenilefrina e angiotensina II. Ainda, o mesmo grupo observou que a dexmedetomidina reduz a necessidade de noradrenalina e mantém a função renal no mesmo modelo de endotoxemia em ovinos (LANKADEVA et al., 2019).

Os estudos de Hofer et al. (2009) corroboram os achados iniciais de Taniguchi et al. (2004), em um modelo de sepse induzida por ligadura e perfuração do ceco (CLP) em camundongos fêmeas, modelo que é considerado padrão ouro e mais similar à sepse humana. Um achado interessante deste grupo é que a administração periférica *in vitro* de clonidina não reduz a resposta pró-inflamatória como ocorre *in vivo*, demonstrando que este efeito possivelmente é mediado pelo SNC. Entretanto, nenhum estudo até o momento explorou a relevância da ação direta da clonidina no SNC para seus efeitos no sistema cardiovascular durante a sepse.

1.3 MODULAÇÃO DO SISTEMA CARDIOVASCULAR E SEPSE

Poucos estudos visaram estudar diretamente o SNC durante a sepse no contexto cardiovascular. Muitos grupos estudam a modulação autonômica cardiovascular de maneira indireta através da variabilidade da frequência cardíaca (VFC), a qual mede as mudanças no intervalo entre dois batimentos cardíacos (ANNANE et al., 1999; PANCOTO et al., 2008; ARBO et al., 2020). O coração varia a sua frequência de funcionamento a cada batimento, como consequência dos ajustes promovidos pelo sistema nervoso autônomo, modulados por mecanismos centrais e periféricos, para a manutenção da homeostase (ACHTEN & JEUKENDRUP, 2003). A VFC tem como vantagem sua medida não-invasiva, o que permite um amplo estudo em humanos, além dos animais. Entretanto, um distúrbio na VFC pode indicar tanto alterações na atividade vasomotora no SNC quanto uma disfunção da transmissão neuronal para o coração, ou ainda da responsividade cardíaca em si. Portanto, VFC alterada não é um indicador preciso da função neural. Quanto à interpretação dos dados, alta na VFC é considerado preditor de um bom prognóstico, enquanto uma baixa VFC é associada a patologias cardiovasculares (revisado por PUMPRLA et al., 2002). Estudos em pacientes e animais

sépticos demonstraram que a VFC se encontra diminuída, assim como o componente LF (do inglês *Low Frequency*; baixa frequência), o qual representa o componente simpático. A redução do LF indica menor ativação simpática nesses pacientes, a qual se encontra inversamente proporcional com a concentração plasmática de catecolaminas e nitrito/nitrato (NO_x) e está relacionada com a maior mortalidade dos mesmos (ANNANE et al., 1999; PANCOTO et al., 2008; ARBO et al., 2020).

Em estágios tardios da sepse, o aumento do estímulo simpático no coração parece ser parcialmente mediado pelo barorreflexo em resposta à hipotensão, como demonstrado em ovinos com endotoxemia (RAMCHANDRA et al., 2009), e diversos estudos em animais sépticos têm mostrado relação direta entre a redução da função barorreflexa e o tempo de sobrevivência (SHEN et al., 2004; SHI et al., 2007; NARDOCCI et al., 2015). Por outro lado, em coelhos anestesiados e com endotoxemia foi observada uma redução do tônus vagal (TANG et al., 2009). Além disso, apesar do bloqueio de α_7 nAChR reduzir a VFC de ratos endotoxêmicos, agonistas desses receptores não se revelaram capazes de modular a FC dos mesmos (MAZLOOM et al., 2013). Assim, Mazloom et al. (2013) sugeriram um papel tônico de receptores α_7 nAChR na modulação da VFC durante a sepse, o que corrobora a participação da via colinérgica anti-inflamatória. Ainda, um estudo realizado em amostras de vítimas do choque séptico revelou que ocorrem apoptose e isquemia neuronal e glial nos centros autonômicos cardiovasculares, além de uma alta expressão de iNOS nos vasos, confirmando a importância de alterações na modulação autonômica durante o quadro de sepse (SHARSHAR et al., 2003).

Alguns grupos estudaram a modulação do sistema cardiovascular diretamente no SNC durante a sepse, mas a maioria dos trabalhos encontrados focaram na produção de NO em regiões do SNC, como o trabalho de Chan et al. (2003), que observou uma regulação negativa do receptor AT1 de angiotensina associada com a produção excessiva de NO na RVLM de ratos com endotoxemia. O grupo de Rocha et al. (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2010; DA COSTA et al., 2017; COELHO et al., 2017) tem trabalhado com a produção exacerbada de NO durante a sepse principalmente no hipotálamo, e as evidências obtidas sugerem que esse excesso de NO modula a produção de neuropeptídeos como a vasopressina. Já o grupo de El-Mas et al. (SALLAM et al., 2018; SALLAM et al., 2019; WEDN et al., 2020) tem trabalhado com a via vagal/colinérgica no contexto cardiovascular e renal em quadros de endotoxemia. Entretanto, ao menos pelo que sabemos, nenhum trabalho publicado até o momento explorou a funcionalidade de receptores adrenérgicos do SNC em contexto cardiovascular na sepse. Em

ratos saudáveis foi observado que a dexmedetomidina administrada via intracerebroventricular (i.c.v.) diminui catecolaminas plasmáticas (SHIRASAKA et al., 2007), assim como ocorre após administração i.v. em humanos saudáveis (EBERT et al., 2000). Ainda em ratos saudáveis, a clonidina reduz a atividade simpática através de um efeito direto no SNC, além de reduzir a disponibilidade de catecolaminas, principalmente através da RVLM (MERMET & QUINTIN, 1991). Com base nos dados da literatura sobre a exacerbação do sistema nervoso simpático e catecolaminas plasmáticas, além da dessensibilização de receptores adrenérgicos na sepse, e nas evidências acerca da participação do SNC na modulação cardiovascular especialmente através do bloqueio simpático, a compreensão da relação entre a sepse e o SNC sobre receptores adrenérgicos pode ampliar o entendimento da fisiopatologia e, conseqüentemente, das estratégias terapêuticas aplicáveis ao tratamento da sepse.

Sendo assim, a hipótese que norteou este estudo foi de que a ativação de receptores adrenérgicos do SNC está prejudicada e contribui para a disfunção cardiovascular observada na sepse, e que o bloqueio simpático pelo agonista α 2-adrenérgico clonidina pode reverter a hiporresponsividade cardiovascular observada durante a sepse em ratos.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação de receptores adrenérgicos do sistema nervoso central na disfunção cardiovascular observada na sepse induzida em ratos, e o bloqueio simpático através do agonista α 2 clonidina para reverter a hiporresponsividade cardiovascular observada durante a sepse em ratos.

1.4.2 Objetivos Específicos

- a) Caracterizar a sepse induzida pelo modelo de CLP em ratos, nos tempos de 6 e 18 horas após a indução, *in vivo* e *in vitro*;
- b) Avaliar a responsividade cardiovascular aos agonistas α 1-adrenérgicos noradrenalina e fenilefrina pela via i.c.v. e i.v. em ratos sépticos anestesiados;
- c) Avaliar a responsividade cardiovascular aos agonistas adrenérgicos clonidina (α 2) e noradrenalina (α 1) pela via i.c.v. em ratos saudáveis anestesiados com pentobarbital ou cetamina/xilazina;
- d) Avaliar a responsividade cardiovascular aos agonistas α 2-adrenérgicos clonidina e dexmedetomidina pela via i.c.v. em ratos sépticos anestesiados;

- e) Avaliar o efeito de antagonistas adrenérgicos (α_1 , α_2 e β) pela via i.c.v. sobre a ação cardiovascular dos agonistas adrenérgicos fenilefrina, noradrenalina, clonidina e dexmedetomidina (via i.c.v.) em ratos sépticos anestesiados;
- f) Avaliar o tratamento periférico com o agonista α_2 -adrenérgico clonidina sobre os parâmetros cardiovasculares de ratos sépticos *in vivo* (via i.c.v. e i.v.) e *in vitro*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos machos Wistar pesando entre 300-350g, com 70 a 90 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Durante a permanência no biotério experimental do Departamento de Farmacologia da UFSC, os animais foram acondicionados em gaiolas ventiladas (dimensão de 48,7 cm de comprimento x 33,1 cm de largura x 21,4 cm de altura) com até 5 ratos por gaiola, mantidos em ambiente climatizado (21 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro a cada 12/12 horas) controladas automaticamente. Água e ração foram fornecidas à vontade aos animais. Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo nº 6327180718), e estão de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.2 DROGAS

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas as seguintes drogas e sais foram comprados da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), seguidos pelo número de catálogo: azul de Evans (#E2129), hidrocloreto de fenilefrina (#P1250000), cloridrato de acetilcolina (#A6625), acetato de angiotensina II (#A9525), bitartarato de norepinefrina (#A0937), hidrocloreto de prazosina (#P7791), cloridrato de clonidina (#C7897), cloridrato de ioimbina (#Y3125) e tartarato de metoprolol (#M5391). Hidrocloreto de dexmedetomidina (#AB120767) foi adquirida da ABCAM (Cambridge, Reino Unido). Heparina sódica (Hemofol®; 5000 UI/ mL) foi adquirida da Cristália (Itapira, SP, Brasil), lidocaína (Anestt®) da Syntec (Santana de Parnaíba, SP, Brasil), cloridrato de tramadol da Teuto (Anápolis, GO, Brasil), isoflurano da BioChimico (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), flunixinina meglumina (Banamine®) da Schering Plough (Rio de Janeiro, RJ, Brasil), e pentobarbital sódico (Nembutal®), cetamina (Anasedan®), xilazina (Dopalen®) foram adquiridas da Ceva (Paulínia, SP, Brasil). Todos os sais usados para preparar a solução salina tamponada com fosfato (PBS, do inglês *phosphate-buffered saline*; esterelizada em autoclave) e solução fisiológica nutritiva foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha) ou da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), e preparados imediatamente antes dos experimentos. A solução estoque de angiotensina II foi dissolvida em HCl 0,1 N e diluída em PBS para uso. Todas as outras drogas foram preparadas em PBS ou solução fisiológica nutritiva imediatamente antes de cada experimento.

2.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

2.3.1 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados via intraperitoneal (i.p.) com cetamina (100 mg/Kg) e xilazina (20 mg/Kg) e fixados em um aparelho estereotáxico (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA). Foi realizada assepsia do escalpo com álcool iodado 0,1% e, em seguida, anestesia subcutânea no local da incisão com lidocaína com vasoconstritor à 2%. O crânio foi exposto cirurgicamente e um parafuso de aço inoxidável foi fixado ao crânio com o auxílio de uma broca odontológica, para posterior suporte à prótese acrílica. Uma cânula-guia de aço inoxidável (22 G; 11 mm de comprimento) foi implantada sobre o ventrículo lateral, com as seguintes coordenadas estereotáxicas selecionadas a partir dos atlas do cérebro de Paxinos e Watson (2013): ântero posterior= -0,8 mm em relação à sutura bregma; lateral= - 1,5 mm em relação à sutura sagital; vertical= - 3,6 mm em relação à estrutura óssea da calota craniana. A cânula foi fixada ao crânio pelo parafuso previamente implantado na calota craniana e por uma prótese de resina acrílica autopolimerizável. Como medida profilática, ao final da cirurgia, os animais receberam uma injeção subcutânea de analgésico não esteroideal, flunixin meglumina (2,5 mg/kg, s.c.). Após a cirurgia os animais foram levados ao biotério do Departamento de Farmacologia para recuperação por 3 dias antes de serem submetidos à cirurgia de CLP.

2.3.2 Indução de sepse pelo modelo de ligadura e perfuração do ceco (CLP)

Para indução da sepse, os animais foram primeiramente sedados e analgésicos por meio de aplicação de cloridrato de xilazina e tramadol nas dosagens de 5 e 10 mg/Kg (i.p.), respectivamente. Após 5 minutos, foram anestesiados com inalação contínua de isoflurano (5% em oxigênio) e colocados sobre uma manta aquecida (37°C). Foi realizada assepsia do abdômen com álcool iodado 0,1% e, em seguida, os animais receberam infiltrações subcutâneas do anestésico local lidocaína (2%, sem vasoconstritor; 200 µL para cada sítio) na linha alba, nos locais da incisão cirúrgica. Para realizar a CLP, os animais foram submetidos a uma laparotomia com incisão de aproximadamente 2 cm e subsequente exposição e ligadura não-obstrutiva do ceco (cerca de 75%, usando como base a válvula ileocecal), o qual foi perfurado 3 vezes com agulha 18 G, seguido de leve compressão para assegurar a saída de conteúdo intestinal. Após a perfuração do ceco o intestino foi recolocado na cavidade abdominal, e a musculatura e pele do animal foram suturadas com fio de nylon (3-0). Em seguida, os animais receberam 30 mL/Kg pela via subcutânea (s.c.) de PBS (composto por, em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5,

NaHPO₄ 8,1; pH de 7,4), para reposição fluídica imediatamente após a cirurgia, e foram mantidos em ambiente aquecido até a recuperação completa da anestesia. Em etapas iniciais do estudo, animais submetidos à CLP foram observados por até 60 horas para avaliação da curva de letalidade, e receberam analgesia pós-operatória (cloridrato de tramadol; 10 mg/Kg, s.c.) 2 e 12 horas após o procedimento cirúrgico. Somente aqueles animais que não morreram em função do procedimento cirúrgico direto ou da anestesia foram considerados para fins de índice de mortalidade.

2.3.3 Medida direta da pressão arterial em ratos anestesiados

Os animais foram anestesiados pela via intramuscular (i.m.) com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/Kg, respectivamente) ou via i.p. com pentobarbital sódico (50 mg/Kg), sendo mantidos em plano anestésico profundo durante toda a experimentação (para isso, quando necessário, receberam doses suplementares correspondentes a 30% da dose inicial). A indução de anestesia profunda foi constatada pela ausência de reflexos oculares e de respostas ao pinçamento da cauda e membros inferiores. No intuito de proteger os animais de condições de hipotermia, a temperatura da sala foi mantida constante (23 °C) e os animais foram mantidos sob uma lâmpada incandescente.

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e, com a pata direita fixada, a veia femoral direita foi dissecada e canulada com agulha (23 G) conectada a uma cânula de polietileno (PE 20) e uma seringa de 1 mL, preenchidas com solução PBS contendo heparina sódica (0,02%), a qual foi administrada imediatamente para prevenir coágulos. Esse acesso venoso também serviu como via de administração sistêmica de drogas vasoativas. Em seguida, foi realizada uma incisão na altura da traqueia para localização e dissecação da artéria carótida comum direita. Após ser totalmente isolada do nervo vago, a carótida teve seu fluxo sanguíneo interrompido com auxílio de uma pinça, e foi submetida à ligadura com fio de sutura na região proximal. Na sequência, um cateter flexível 22 G devidamente heparinizado, foi inserido e amarrado na artéria carótida. Esse cateter foi acoplado a um transdutor de pressão, conectado a um amplificador de sinal e a um sistema de aquisição de dados computadorizado (modelo PowerLab 4/30, ADInstruments, Bella Vista, Austrália), no qual os valores da PAM, PAS e pressão arterial diastólica (PAD) (em mmHg), e da FC (em bpm), foram registrados através do software LabChart versão 7.2 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália).

Para alguns protocolos experimentais foi realizada uma traqueostomia nos animais, através de uma incisão no ligamento anular entre os arcos cartilagosos próximos à cartilagem

cricóide, abaixo das glândulas salivares, seguida pela introdução de um tubo adaptado na luz da traqueia até a proximidade da carina. Este tubo foi conectado a um respirador mecânico (modelo VentElite 55-7040; Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA) para estabilização da ventilação, com os seguintes parâmetros: frequência respiratória = 60 rpm; volume corrente (VT) = 7 mL/Kg; pressão positiva expiratória final (PEEP) = 2 cmH₂O.

Ao término dos protocolos experimentais, os animais foram eutanasiados por overdose de anestésico (cetamina/xilazina) por via i.v..

2.3.4 Microinjeção central de drogas

Após 20 minutos de registro da pressão arterial basal, os animais receberam microinjeção de drogas via i.c.v. através de agulhas com 12 mm de comprimento (30 G) inseridas na cânula-guia, 1 mm abaixo da extremidade final da cânula. Todas as drogas administradas passaram por experimento piloto para determinação da dose a ser utilizada. As injeções foram realizadas manualmente utilizando-se uma microseringa de 10 µL (Hamilton Co., Reno, NV, EUA), conectada à agulha através de um tubo de polietileno (PE 10) preenchida com PBS e com uma bolha de ar para facilitar a visualização do deslocamento da droga injetada. Cada injeção foi realizada com volume final de 5 µL, administradas durante 60 segundos. Após a injeção, a agulha foi mantida na cânula-guia por 60 segundos para evitar refluxo do volume administrado. Ao término dos experimentos, 5 µL do corante azul de Evans a 1% foi microinjetado para confirmar o sítio de injeção. Após a eutanásia, os animais foram decapitados, os cérebros retirados, e o posicionamento da cânula-guia no ventrículo lateral confirmado pela difusão do corante por todo o ventrículo. Apenas os animais com posicionamento correto da cânula no ventrículo foram incluídos para análise dos dados.

2.3.5 Determinação da reatividade vascular em modelo de aorta isolada

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente, i.p.). A aorta torácica descendente foi retirada e acondicionada em placa de Petri contendo solução fisiológica nutritiva (em mM): 131,25 NaCl, 4,82 KCl, 1,59 CaCl₂•2H₂O, 1,18 KH₂PO₄, 1,17 MgSO₄, 14,89 NaHCO₃, 5,55 D-glucose e 0,038 EDTA, na temperatura de ~4 °C, tendo seu tecido conjuntivo e perivascular removido. Em seguida, o vaso foi seccionado em anéis medindo aproximadamente 3 mm de comprimento. Esses anéis foram acondicionados, através de hastes conectadas a transdutores, em cubas de vidro contendo 3 mL de solução fisiológica nutritiva constantemente aerada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5%

CO₂), mantidos a uma temperatura de 37 °C e sob tensão basal de 2 g. Os registros foram obtidos por meio de transdutores isométricos, acoplados ao sistema de aquisição modelo PowerLab 8/30, conectado a um computador rodando o software de integração LabChart versão 7.3.3 (ambos da ADInstruments; Bella Vista, Austrália). Foi adotado um intervalo de uma hora com trocas da solução nutritiva a cada 15 minutos, para estabilização das preparações.

Após o período de estabilização, a preparação foi exposta a uma solução nutritiva contendo 120 mM de KCl (composição em mM: 14,37 NaCl, 119,91 KCl, 1,59 CaCl₂•2H₂O, 1,18 KH₂PO₄, 1,17 MgSO₄, 14,89 NaHCO₃, e 5,55 D-glucose) para avaliar a integridade funcional e resposta contrátil dos anéis de aorta. Após 15 minutos as preparações foram lavadas com solução fisiológica nutritiva três vezes consecutivas. Foi realizado um novo intervalo de 30 minutos para estabilização das preparações, com troca de solução nutritiva a cada 15 minutos. Em seguida foi induzida contração dos anéis por 1 µM de fenilefrina, seguida de administração de 1 µM de acetilcolina após 10 minutos da pré-contração. Foram consideradas preparações com endotélio funcional (E+), aquelas que apresentaram um relaxamento igual ou superior a 80% em resposta à acetilcolina. Os anéis com relaxamento inferior a 5% foram considerados sem endotélio funcional (E-). Após 10 minutos as preparações foram novamente lavadas, três vezes consecutivas, com solução fisiológica nutritiva. Um novo período de estabilização de uma hora foi aguardado, com troca do líquido nutritivo a cada 15 minutos, e os anéis de aorta foram expostos a concentrações crescentes cumulativas (curvas concentração resposta; CCRs) dos seguintes agentes: fenilefrina (1 nM – 100 µM), angiotensina II (1 nM – 3 µM) e noradrenalina (1 nM – 30 µM). Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média (EPM) da força de contração (em g) evocada pelas substâncias vasoativas (em log [M]).

2.3.6 Hemograma

Para avaliação dos parâmetros hematológicos, foram coletados 4 mL de sangue pela veia cava inferior dos ratos previamente anestesiados com cetamina e xilazina (100 e 20 mg/kg, respectivamente, i.p.). O sangue foi acondicionado em tubos contendo 20 UI de heparina sódica por mL de sangue e imediatamente analisado utilizando um contador hematológico automatizado (Horiba ABX®, Micros 60, Montpellier, França). Os seguintes parâmetros foram mensurados: hemoglobina, leucócitos totais, linfócitos, monócitos e granulócitos. Os resultados foram expressos em µL/amostra.

2.3.7 Determinação de NOx plasmático

O volume restante do sangue coletado - conforme especificado anteriormente para o hemograma - foi centrifugado (4.000 r.p.m. por 15 minutos) para separação do plasma, o qual foi congelado a -20 °C até a realização das dosagens. O nitrito foi detectado por colorimetria, através do método de Griess. Para isso, 200 µL de plasma foi desproteínezado com sulfato de zinco (20%, 1:10), incubado por 1 hora a 4 °C, seguido de centrifugação a 10000 r.p.m. por 15 minutos, também em temperatura de 4 °C. Para a conversão do nitrato a nitrito, 100 µL de plasma desproteínezado foram incubados em uma placa de 96 poços mantida à temperatura de 37 °C durante 3 horas com a nitrato redutase expressa em *Escherichia coli* (ATCC 25922). Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3700 r.p.m. por 15 minutos para sedimentação da bactéria. Em seguida, 100 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa de 96 poços e misturado com o mesmo volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de alfa-naftiletildenodiamina em água de Milli-Q) por 10 minutos, para posterior leitura a 540 nm em um leitor de placas (Infinite M200, Tecan Group LTDA, Suíça). Curvas padrão de nitrito e nitrato (0 a 150 µM) foram realizadas simultaneamente para correlação da concentração obtida nas amostras. Os resultados foram expressos em µM de NOx.

2.4 GRUPOS E PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

2.4.1 Grupos experimentais e etapas do estudo

Os experimentos foram divididos em 5 partes, as quais estão descritas brevemente nos parágrafos abaixo para fins de direcionamento do leitor. Os protocolos experimentais de cada parte serão detalhados nos itens subsequentes.

Na *parte I* deste estudo foi realizada a caracterização do modelo de sepse utilizado neste trabalho. Para isso, os animais foram divididos em grupo CLP, o qual passou pelo procedimento descrito no item 2.3.2, e grupo controle (CTR), o qual não passou por este procedimento cirúrgico. Ainda, foi utilizado um grupo denominado falso operado (*sham-operated*; SHAM), onde os animais foram submetidos aos mesmos protocolos do grupo CLP descrito no item 2.3.2, com exceção da ligadura e perfuração do ceco. O grupo CLP foi subdividido em grupo CLP 6 h e CLP 18 h, os quais foram avaliados 6 e 18 horas após a cirurgia, respectivamente, pois a literatura já demonstrou que esses tempos apresentam disfunções cardiovasculares.

Durante a *parte II* foi avaliada a responsividade cardiovascular pela via central e periférica, e os animais foram divididos em grupos CLP 6 h e CLP 18 h, os quais passaram pelo procedimento descrito no item 2.3.2, e grupo CTR, o qual não passou por este procedimento cirúrgico. Estes animais foram previamente submetidos ao protocolo de estereotaxia, descrito no item 2.3.1, e posteriormente ao CLP, submetidos ao protocolo de medida direta da pressão arterial, descrito no item 2.3.3.

Na *parte III*, os animais foram divididos conforme o anestésico utilizado para o procedimento de medida direta da pressão arterial para avaliar as administrações pela via central, descrito no item 2.3.3, e assim avaliar se existem implicações nas respostas cardiovasculares devido ao uso de diferentes anestésicos: grupo pentobarbital, com animais anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/Kg, via i.p.), e grupo cetamina/xilazina anestesiados com 100 e 20 mg/Kg dessas drogas (respectivamente, via i.m.). Esses animais foram previamente submetidos ao protocolo de estereotaxia, descrito no item 2.3.1.

Para os experimentos da *parte IV*, foi avaliada a responsividade cardiovascular pela via central, e os animais foram novamente divididos em grupos CLP 6 h, CLP 18 h, os quais passaram pelo procedimento descrito no item 2.3.2, e grupo CTR, o qual não passou por este procedimento cirúrgico. Assim como na parte II, estes animais foram previamente submetidos ao protocolo de estereotaxia, descrito no item 2.3.1, e posteriormente ao CLP, submetidos ao protocolo de medida direta da pressão arterial, descrito no item 2.3.3.

Durante a *parte V*, além dos grupos CLP 6 h e CTR, um novo grupo foi inserido, o CLP 6h + CLO, o qual recebeu tratamento com clonidina (50 µg/Kg, s.c.) 1 hora após a cirurgia de CLP e 1 hora antes da avaliação dos parâmetros cardiovasculares (item 2.3.3), da reatividade em aorta isolada (item 2.3.5), hemograma (2.3.6) e/ou dosagem de NOx (item 2.3.7). Além disso, nesta parte o grupo CLP 6 h recebeu via s.c. o veículo PBS 1 hora após a cirurgia de CLP e 1 hora antes das avaliações.

2.4.2 Protocolos experimentais - Parte I - caracterização do modelo de sepse

A parte I deste trabalho foi realizada para caracterizar o modelo de sepse utilizado, nos tempos de 6 e 18 horas após CLP. Os animais dos grupos sépticos foram operados como descrito no item 2.3.2, enquanto no grupo SHAM os animais foram submetidos aos mesmos protocolos do grupo CLP, com exceção da ligadura e perfuração do ceco. Os animais do grupo CTR não passaram por qualquer procedimento cirúrgico. Inicialmente foi realizada uma curva de mortalidade com os grupos CTR, SHAM e CLP, os quais foram observados a cada 12 horas

por até 60 horas. Somente aqueles animais que não morreram em função do procedimento cirúrgico direto ou da anestesia foram considerados para fins de índice de mortalidade. Em uma outra leva de experimentos, os grupos CTR, SHAM, CLP 6 h e CLP 18 h foram anestesiados com cetamina/xilazina e submetidos ao procedimento cirúrgico descrito no item 2.3.3 para a medida direta da pressão arterial. Após 20 minutos de registro da pressão arterial e FC basal, todos os animais receberam pela via i.v. fenilefrina em doses crescentes (3, 10 e 30 nmol/Kg), com intervalos de 10 minutos entre as doses, ou até o desaparecimento do efeito cardiovascular da dose anterior. Todas as doses foram preparadas em solução de PBS estéril em um volume final de 50 μ L e, após cada administração, 150 μ L de PBS estéril foram injetados (i.v.) para se certificar da inexistência de volume residual do agente vasoativo no cateter intravenoso.

Uma nova leva de grupos CTR, SHAM e CLP 6 h foi utilizada para a avaliação da reatividade vascular *in vitro* no modelo de aorta isolada descrita no item 2.3.5, onde observou-se os efeitos contráteis da fenilefrina e angiotensina II. O hemograma e a dosagem de NOx, descritos nos itens 2.3.6 e 2.3.7, respectivamente, foram realizados nos grupos CTR, CLP 6 h e CLP 18 h, utilizando-se amostras de sangue coletadas de animais avaliados em algum dos experimentos descritos acima. Foi utilizado um *n* experimental de 5 a 7 animais por grupo. Um desenho esquemático do protocolo é apresentado na Figura 3.

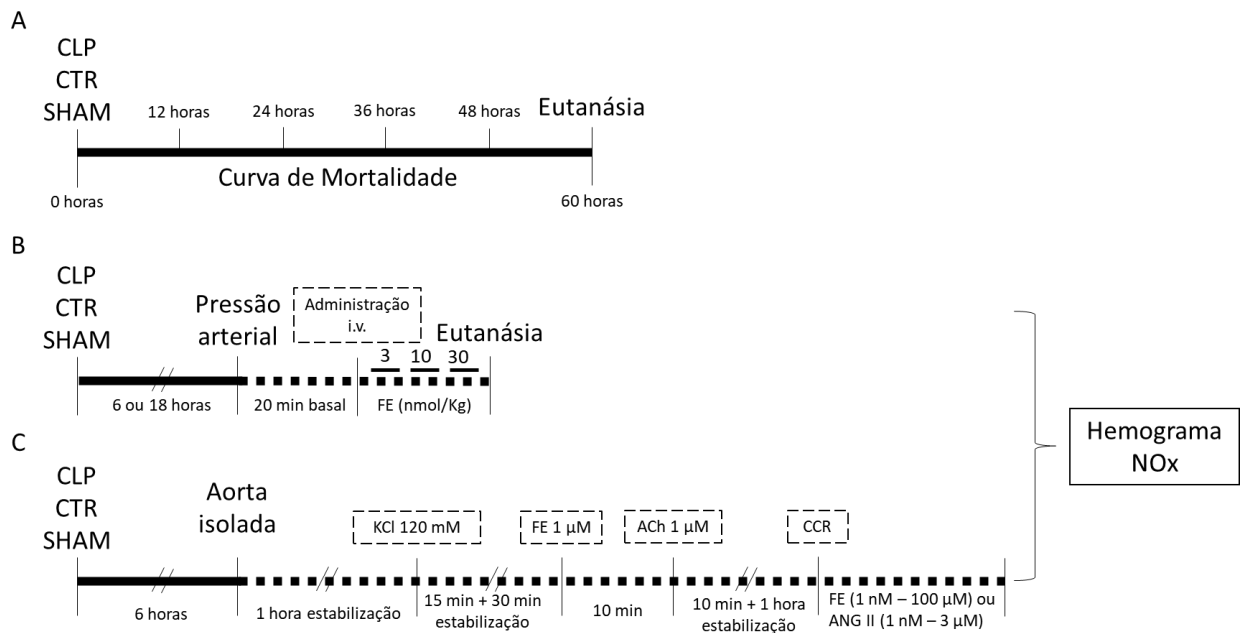


Figura 3. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte I. O protocolo experimental aqui demonstrado foi realizado em ratos anestesiados com cetamina/xilazina, 6 ou 18 horas após a indução da sepse (grupo CLP 6 h e CLP 18 h, respectivamente) ou em animais do grupo controle (CTR) ou falso operado (SHAM). Acima da linha temporal encontram-se descritos os procedimentos e as doses de drogas utilizadas, e abaixo encontram-se o tempo decorrido, as drogas e concentrações utilizadas. **A:** Avaliação da curva de mortalidade dos animais CLP, CTR e SHAM dentro de um período de 60 horas, a cada 12 horas. **B:** Avaliação da responsividade periférica *in vivo* pela fenilefrina em animais CLP 6 e 18 h, CTR e SHAM. A linha tracejada indica o período de registro da pressão arterial. **C:** Avaliação da responsividade vascular *in vitro* pela fenilefrina e angiotensina II em animais CLP 6 h, CTR e SHAM. A linha tracejada indica o período de registro dos anéis de aorta. A coleta de sangue para hemograma e dosagem de nitrito/nitrato (NOx) foi realizada nos animais do protocolo em **B** e/ou **C**. KCl: cloreto de potássio; FE: fenilefrina; ACh: acetilcolina; CCR: curva concentração-resposta; ANG II: angiotensina II.

2.4.3 Protocolos experimentais - Parte II - responsividade a drogas vasoativas pela via central e periférica

A parte II teve como objetivo avaliar a responsividade cardiovascular à noradrenalina e fenilefrina pela via central e periférica em ratos sépticos, 6 e 18 horas após a cirurgia de CLP. Para isso, os animais do grupo CTR e CLP foram inicialmente submetidos à cirurgia estereotáxica descrita no item 2.3.1, e após 3 dias de recuperação os animais do grupo CLP foram submetidos à indução da sepse, descrita no item 2.3.2. Os animais do grupo CTR não passaram pelo processo cirúrgico de CLP. Após 6 ou 18 horas da indução da sepse, todos os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina e submetidos ao procedimento cirúrgico descrito no item 2.3.3 para a medida direta da pressão arterial. Após 20 minutos de registro da

pressão arterial e FC basal, todos os animais receberam, pela via i.v., doses crescentes de noradrenalina e fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg), como apresentado anteriormente. A ordem de administração dos vasoconstritores foi randomizada. Em seguida, os mesmos animais receberam, pela via i.c.v., noradrenalina (10 µg/5 µL) ou fenilefrina (30 µg/5 µL), conforme descrito no item 2.3.4. Para avaliar a participação dos receptores adrenérgicos nas respostas obtidas após a injeção i.c.v. dos agentes vasoativos, diferentes grupos receberam uma administração i.c.v. dos antagonistas adrenérgicos prazosina (5 µg/5 µL) ou metoprolol (100 µg/5 µL). Após 15 minutos, foi realizada uma nova administração i.c.v. de noradrenalina ou fenilefrina, nas concentrações descritas anteriormente. Devido à similaridade de respostas apresentadas pelos grupos CLP 6 h e CLP 18 h após administrações i.c.v., nesse conjunto de experimentos não foi realizada a administração i.c.v. de fenilefrina no grupo CLP 18 h. Foi utilizado um *n* experimental de 6-7 animais por grupo. Um desenho esquemático do protocolo é apresentado na Figura 4.

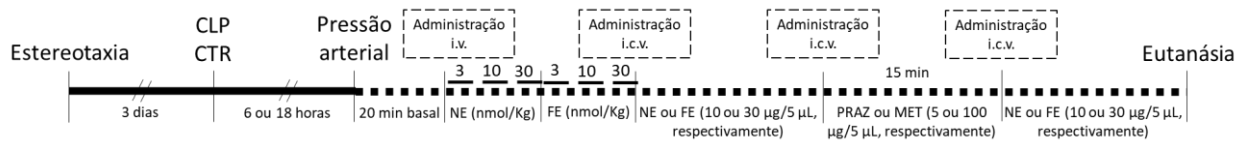


Figura 4. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte II. O protocolo experimental aqui demonstrado foi realizado em ratos anestesiados com cetamina/xilazina, 6 ou 18 horas após a indução da sepse (grupo CLP 6 h e CLP 18 h, respectivamente) ou em animais do grupo controle (CTR). Acima da linha temporal encontram-se descritos os procedimentos e as doses i.v. utilizadas, e abaixo encontram-se o tempo decorrido, as drogas, vias (i.v. e i.c.v) e doses i.c.v. utilizadas. A linha tracejada indica o período de registro da pressão arterial. NE: noradrenalina; FE: fenilefrina; PRAZ: prazosina; MET: metoprolol.

2.4.4 Protocolos experimentais - Parte III - efeito de diferentes classes de anestésicos sobre a resposta cardiovascular da administração central de clonidina e noradrenalina em ratos controle

A parte III deste trabalho teve como objetivo avaliar a responsividade cardiovascular à clonidina e noradrenalina pela via i.c.v. em ratos CTR anestesiados com pentobarbital ou cetamina/xilazina. Inicialmente, todos os animais deste protocolo foram submetidos à cirurgia estereotáxica descrita no item 2.3.1, e após 3 dias de recuperação os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito no item 2.3.3 para a medida direta da pressão arterial. Devido ao fato de que os animais anestesiados com pentobarbital apresentavam depressão respiratória severa, e para evitar viés metodológico, tanto estes animais citados quanto os

animais anestesiados com cetamina/xilazina, exclusivamente neste protocolo, passaram pelo procedimento de traqueostomia para respiração com o auxílio do ventilador mecânico, como descrito no item 2.3.3. Após 20 minutos de registro da pressão arterial e FC basal, os animais receberam via i.c.v. clonidina (10 µg/5 µL), seguida de noradrenalina (10 µg/5 µL), conforme descrito no item 2.3.4 (Figura 5A).

Em outros grupos de animais, anestesiados com cetamina/xilazina, porém sem o auxílio do ventilador mecânico, foram microinjetados via i.c.v. com clonidina (10 µg/5 µL) ou dexmedetomidina (0,6 µg/5 µL) e, após o retorno da pressão arterial para valores basais, receberam uma administração i.c.v. do antagonista $\alpha 2$ -adrenérgico ioimbina (5 µg/5 µL) para bloqueio dos receptores. Após 15 minutos, uma nova administração i.c.v. de clonidina ou dexmedetomidina foi realizada nesses animais (Figura 5B). Foi utilizado um *n* experimental de 5-6 animais por grupo. Um desenho esquemático do protocolo é apresentado na Figura 5.

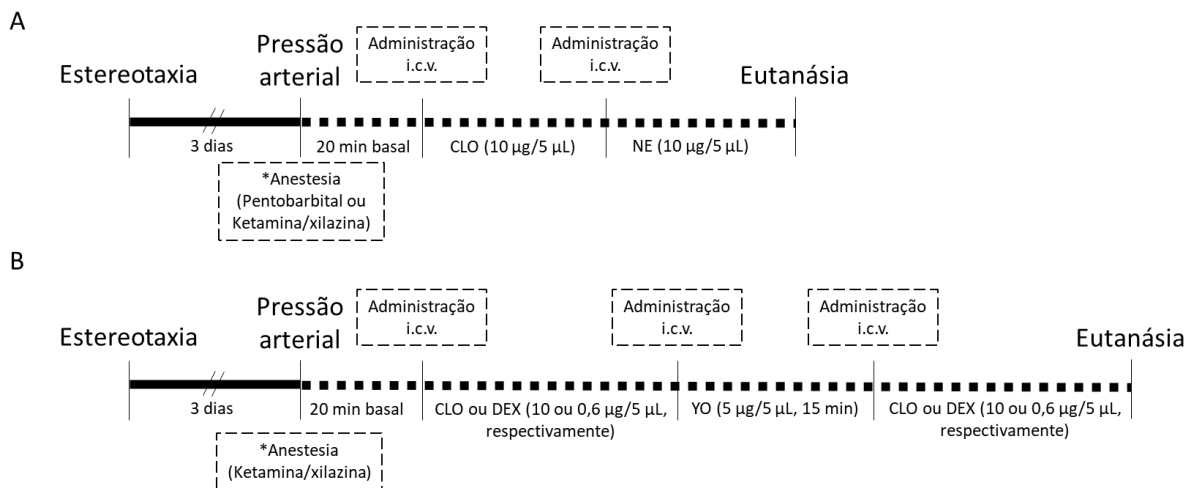


Figura 5. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte III. O protocolo experimental aqui demonstrado foi realizado em ratos anestesiados com pentobarbital ou cetamina/xilazina. Acima da linha temporal encontram-se descritos os procedimentos, e abaixo encontram-se o tempo decorrido, as drogas e doses i.c.v. utilizadas. A linha tracejada indica o período de registro da pressão arterial. **A:** Avaliação da responsividade central à clonidina e noradrenalina em animais anestesiados com pentobarbital ou cetamina/xilazina. **B:** Avaliação da responsividade central à clonidina e dexmedetomidina pré- e pós-ioimbina em animais anestesiados com cetamina/xilazina. CLO: clonidina; NE: noradrenalina; DEX: dexmedetomidina; YO: ioimbina.

2.4.5 Protocolos experimentais - Parte IV - responsividade à administração central de clonidina e dexmedetomidina

A parte IV deste estudo teve como objetivo avaliar a responsividade cardiovascular à clonidina e dexmedetomidina, pela via i.c.v., em ratos sépticos 6 e 18 horas após a cirurgia de CLP. Para isso, o mesmo protocolo da parte I (item 2.4.2) foi adotado. Em resumo, todos os animais foram inicialmente submetidos à cirurgia estereotáxica descrita no item 2.3.1, e após 3 dias de recuperação os animais do grupo CLP foram submetidos à indução da sepse, descrita no item 2.3.2. Após 6 ou 18 horas da indução da sepse, todos os animais foram submetidos ao procedimento cirúrgico descrito no item 2.3.3 para a medida direta da pressão arterial. Após 20 minutos de registro, todos os animais receberam clonidina (10 µg/5 µL) ou dexmedetomidina (0,6 µg/5 µL) por via i.c.v., conforme descrito no item 2.3.4. Para avaliar a participação dos receptores adrenérgicos nas respostas obtidas, foi realizado uma administração i.c.v. dos seguintes antagonistas adrenérgicos, em diferentes grupos experimentais: prazosina (5 µg/5 µL), ioimbina (5 µg/5 µL), ou metoprolol (100 µg/5 µL). Quinze minutos após a injeção dos antagonistas, uma nova dose i.c.v. de clonidina ou dexmedetomidina foi administrada. Foi utilizado um *n* experimental de 7 animais por grupo. Um desenho esquemático do protocolo é apresentado na Figura 6.

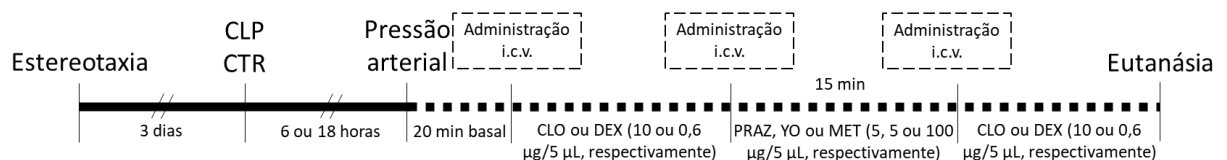


Figura 6. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte IV. O protocolo experimental aqui demonstrado foi realizado em ratos anestesiados com cetamina/xilazina, 6 ou 18 horas após a indução da sepse (grupos CLP 6 h e CLP 18 h, respectivamente), ou em animais do grupo controle (CTR). Acima da linha temporal encontram-se descritos os procedimentos e abaixo encontram-se o tempo decorrido, a droga (i.c.v.) e dose utilizada. A linha tracejada indica o período de registro da pressão arterial. CLO: clonidina; DEX: dexmedetomidina; PRAZ: prazosina; YO: ioimbina; MET: metoprolol.

2.4.6 Protocolos experimentais - Parte V - responsividade cardiovascular em ratos sépticos tratados com clonidina

O objetivo da parte V de experimentos foi avaliar se o tratamento periférico com clonidina seria capaz de reverter a hiporresponsividade cardiovascular a drogas adrenérgicas administradas *in vitro* e *in vivo* (pela via central e periférica), previamente observada em ratos sépticos 6 horas após a cirurgia de CLP. Para isso um novo grupo foi inserido, denominado

CLP + CLO 6 h, o qual teve suas respostas comparadas com os grupos CLP 6 h + PBS (veículo da clonidina) e grupo CTR. Em resumo, todos os animais foram inicialmente submetidos à cirurgia estereotáxica descrita no item 2.3.1, e após 3 dias de recuperação os animais do grupo CLP foram submetidos à indução da sepse, descrita no item 2.3.2. Nesses experimentos, os animais receberam duas injeções s.c. de clonidina (50 µg/Kg; AMBROSE et al., 2000) ou PBS (1 ml/Kg), a primeira 1 hora após a cirurgia de CLP, e a segunda 1 hora antes da avaliação dos parâmetros cardiovasculares (item 2.3.3), da reatividade em aorta isolada (item 2.3.5), hemograma (2.3.6) e/ou dosagem de NOx (item 2.3.7).

Para a avaliação dos parâmetros cardiovasculares, diferentes grupos de animais receberam injeções i.v. de noradrenalina e fenilefrina, nas doses de 3, 10 e 30 nmol/Kg, e pela via i.c.v., de noradrenalina e clonidina (10 µg/5 µL), como descrito no protocolo I (item 2.4.2). A reatividade vascular *in vitro* foi realizada com curvas concentração-resposta de fenilefrina, noradrenalina e angiotensina II, como descrito no item 2.3.5. Para a avaliação do hemograma e NOx, foram coletadas amostras de sangue desses animais (itens 2.3.6 e 2.3.7, respectivamente). Foi utilizado um n experimental de 5 a 7 animais por grupo. Um desenho esquemático do protocolo é apresentado na Figura 7.

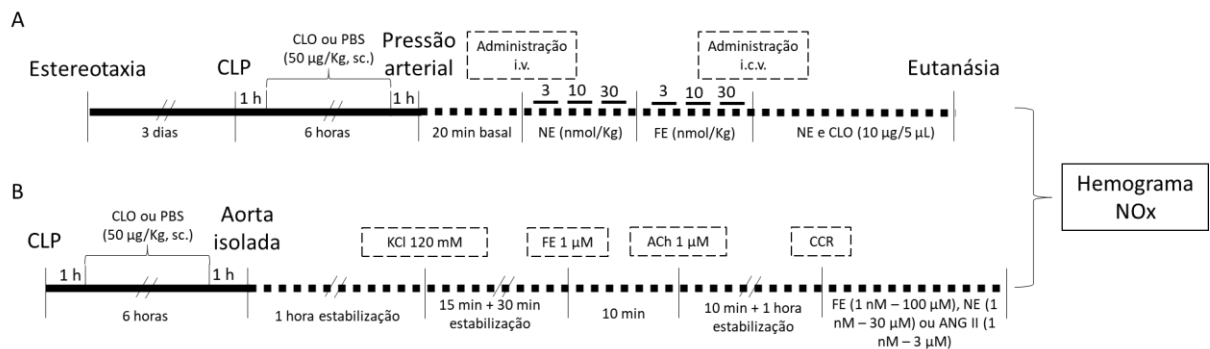


Figura 7. Desenho esquemático ilustrando o protocolo experimental adotado para os experimentos da parte V. O protocolo experimental aqui demonstrado foi realizado em ratos anestesiados com cetamina/xilazina, 6 horas após a indução da sepse (grupo CLP 6h) tratados com clonidina ou PBS. **A:** Avaliação da responsividade cardiovascular *in vivo* para a noradrenalina, fenilefrina e clonidina, administradas no sistema nervoso central (i.c.v.) ou circulação periférica (i.v.). Acima da linha temporal encontram-se descritos os procedimentos, as vias e as doses utilizadas (i.v. e i.c.v.), e abaixo encontram-se o tempo decorrido, as drogas e dose (i.c.v.) utilizadas. **B:** Avaliação da responsividade vascular *in vitro* pela fenilefrina, noradrenalina e angiotensina II em anéis de aorta de animais do grupo CLP 6 h tratados com clonidina ou PBS. A linha tracejada indica o período de registro dos anéis de aorta. A coleta de sangue para hemograma e dosagem de nitrito/nitrato (NOx) foi realizada nos animais de ambos os protocolos. CLO: clonidina; KCl: cloreto de potássio; FE: fenilefrina; ACh: acetilcolina; CCR: curva concentração-resposta; NE: noradrenalina; ANG II: angiotensina II.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm EPM, através de gráficos de barras ou pontos individuais (*dot-plots*), e o número de animais em cada grupo experimental variou de 5 a 7. A análise estatística foi realizada utilizando teste *t* de Student pareado ou não-pareado, ou análise de variância (ANOVA) de uma ou de duas vias, com ou sem medidas repetidas, seguidas pelo pós-teste de Tukey, Šidák ou Dunnet, quando aplicáveis. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. A análise estatística e os gráficos foram preparados através do programa GraphPad Prism, versão 9.2 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

3 RESULTADOS

3.1 PARTE I: CARACTERIZAÇÃO DO MODELO DE SEPSE

Inicialmente foi realizado uma curva de mortalidade para avaliar a intensidade da sepse gerada nos animais utilizando o modelo descrito em 2.3.2. A Figura 8 demonstra a taxa de mortalidade observada nos animais sépticos dentro de 60 horas após a cirurgia, utilizando como controle o grupo SHAM e CTR. Os animais do grupo CLP apresentaram uma mortalidade de 30% dentro de 24 horas após a indução da sepse, e ao final de 60 horas essa taxa subiu para 50%. Nenhum animal do grupo SHAM e CTR veio a óbito. Além disso, os animais sépticos apresentaram sinais físicos característicos do quadro séptico, tais como piloereção, letargia e secreção de porfirina pelos olhos e nariz.

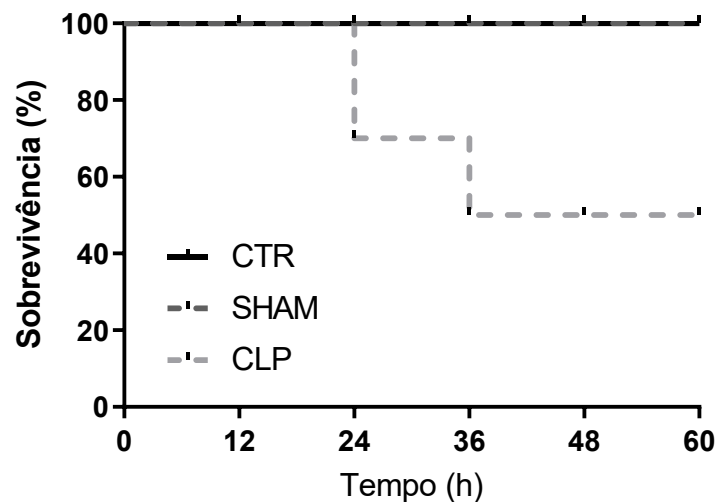


Figura 8. Curva de mortalidade. Os animais submetidos à cirurgia de indução da sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP), grupo falso operado (SHAM) e controle (CTR) foram monitorados a cada 12 h, por um período de 60 h após a cirurgia (n = 6 por grupo). Resultados expressos em % de sobrevivência.

Para a caracterização dos parâmetros cardiovasculares na sepse foi realizado o registro da pressão arterial e FC basal dos grupos CTR, SHAM, CLP 6h e CLP 18h, além da avaliação da reatividade vascular *in vivo* nesses mesmos animais através da administração i.v. do vasoconstritor fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg). Na Figura 9 (A-C) pode-se observar que os animais sépticos, tanto 6 como 18 horas após a CLP apresentaram hipotensão característica do quadro de sepse (PAM de $70,3 \pm 4$ mmHg no grupo CLP 6 h e $73,6 \pm 3$ mmHg no grupo CLP 18h) quando comparados com o grupo CTR (PAM de $96,5 \pm 3$ mmHg, $p < 0,001$) ou com o grupo SHAM (PAM de 99 ± 5 mmHg, $p < 0,001$). Não houve diferença na pressão arterial entre os grupos CTR e SHAM e entre os grupos CLP 6 h e CLP 18 h. Já no parâmetro FC, observou-

se diferença estatisticamente significativa entre os grupos CLP 6 h (300 ± 8 bpm) e SHAM (387 ± 35 bpm, $p < 0,05$), e entre os grupos SHAM e CTR (256 ± 14 bpm, $p < 0,001$), enquanto o grupo CLP 18 h (320 ± 12 bpm) não diferiu dos demais grupos (Figura 9D). Com relação à responsividade frente às drogas vasoativas, observa-se hiporresponsividade somente para a fenilefrina e apenas no grupo CLP 18 h (Figura 10A-C), sem alterações estatisticamente significantes na FC entre os grupos (Figura 10D).

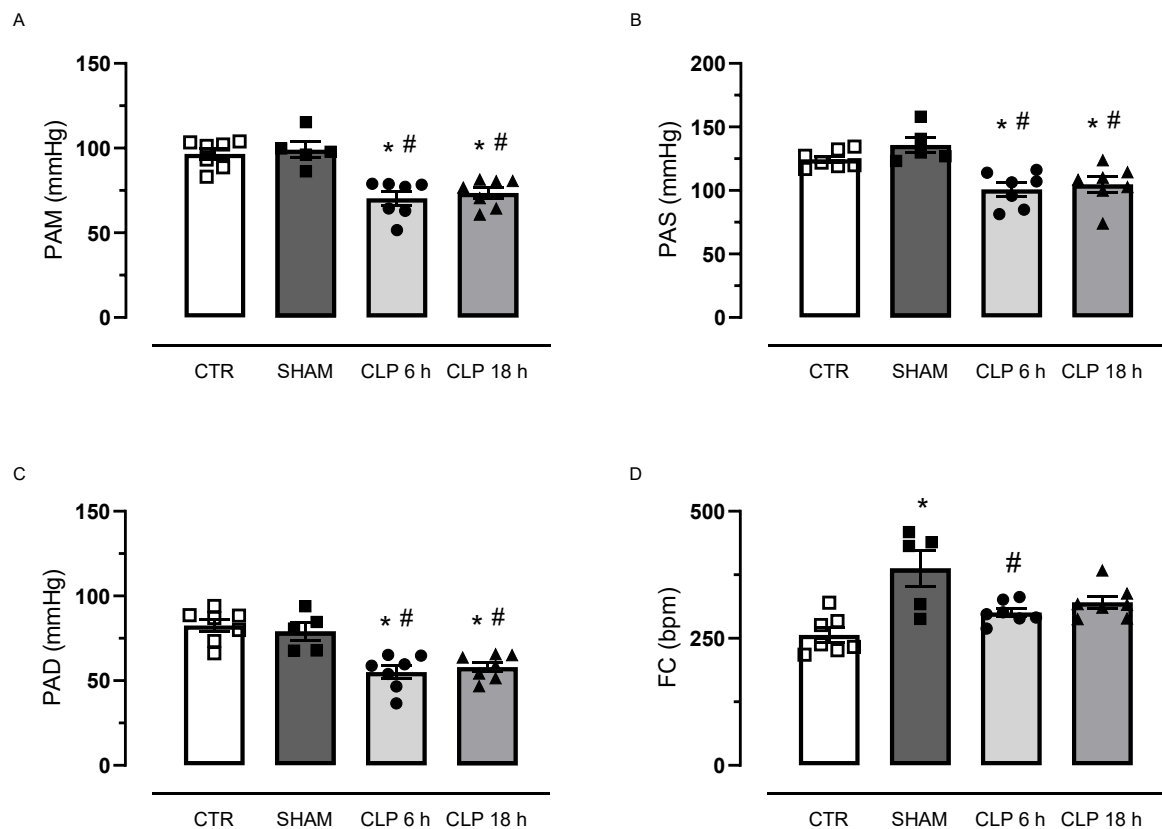


Figura 9. Níveis pressóricos reduzidos e aumento da frequência cardíaca na sepse. A) Pressão arterial média (PAM) basal em mmHg, B) Pressão arterial sistólica (PAS) basal em mmHg, C) Pressão arterial diastólica (PAD) basal em mmHg e D) Frequência cardíaca (FC) basal em batimentos por minuto (bpm). Os painéis mostram valores registrados em animais dos grupos controle (CTR; $n = 7$), falso operado (SHAM; $n = 5$) e sépticos (CLP 6 h; $n = 7$ e CLP 18 h; $n = 7$). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média e pontos individuais. A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$, comparado ao grupo CTR e # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM.

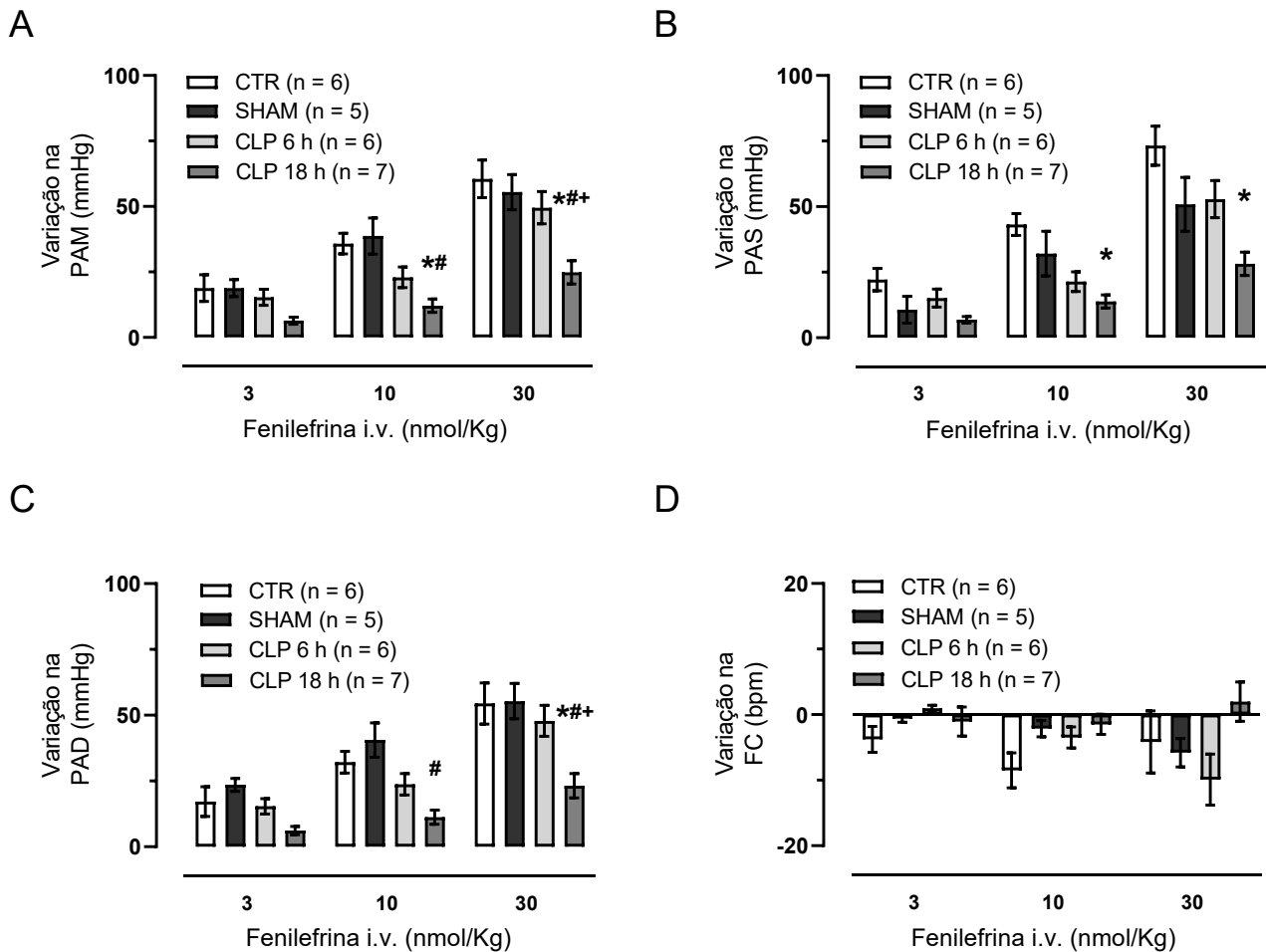


Figura 10. Redução da resposta cardiovascular à administração periférica de fenilefrina na sepse. Variação em **A**) Pressão arterial média (PAM) em mmHg, **B**) Pressão arterial sistólica (PAS) em mmHg, **C**) Pressão arterial diastólica (PAD) em mmHg e **D**) Frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) dos grupos controle (CTR), falso operado (SHAM) e sépticos (CLP 6 h e CLP 18 h) após injeção intravenosa de fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM; e + indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 6 h.

Outro achado que confirma o quadro de sepse instalado nos animais submetidos à CLP no presente estudo é a hiporresponsividade vascular para drogas avaliadas *in vitro*, conforme avaliado através do modelo de aorta isolada. Os anéis de aorta do grupo CLP 6 h apresentaram hipocontratilidade tanto para o vasoconstritor fenilefrina (Figura 11A) quanto para o vasoconstritor angiotensina II (Figura 11B), quando comparados com os grupos CTR ou SHAM. Quando removido o endotélio dos anéis (E-; Figura 11C), observou-se um pequeno aumento da contratilidade à fenilefrina, porém com redução da potência. A Tabela 2 traz os

dados referentes à resposta máxima ($E_{máx}$) e concentração efetiva para atingir 50% da $E_{máx}$ (CE_{50}), para os vasoconstritores fenilefrina e angiotensina II nos anéis de aorta com e sem endotélio dos animais CTR, SHAM e CLP 6 h.

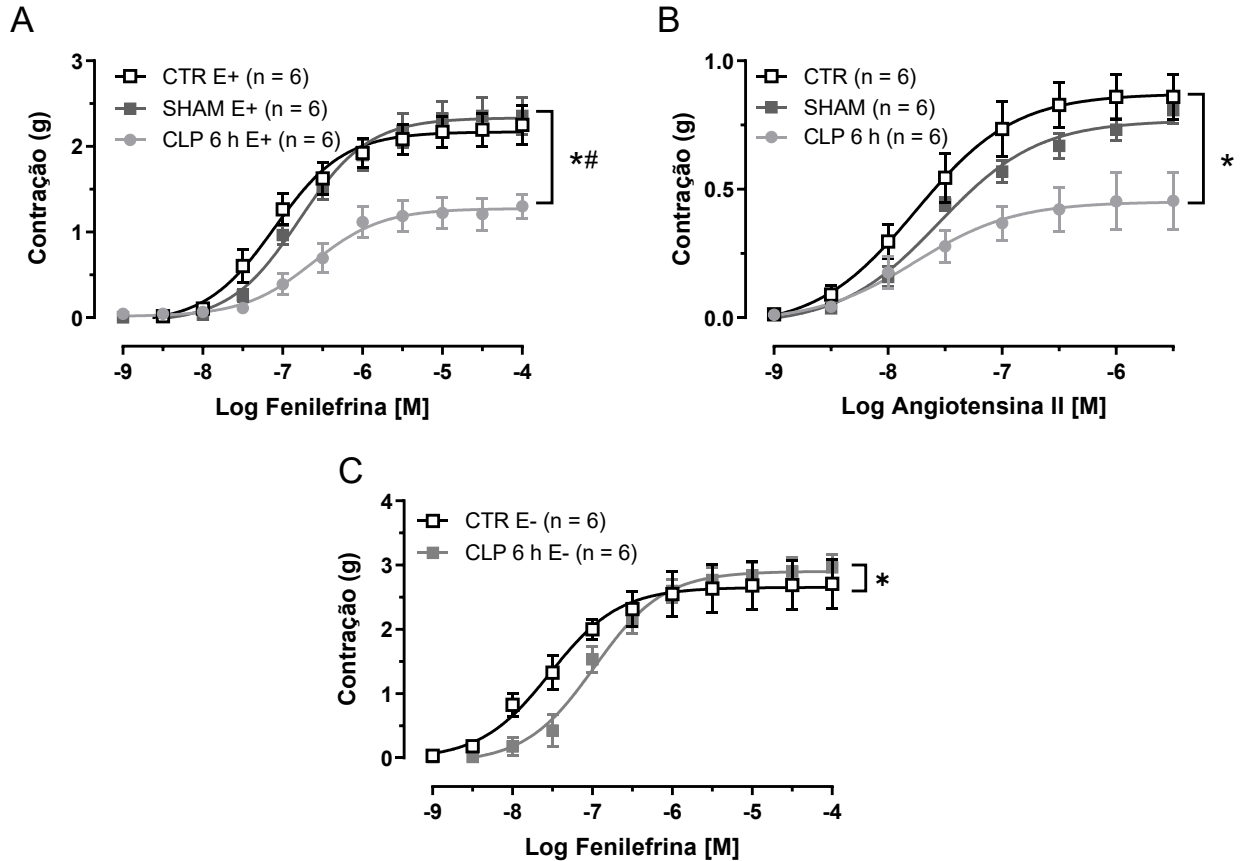


Figura 11. Redução na resposta contrátil a vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos. A aorta torácica dos grupos controle (CTR), falso operado (SHAM) e séptico (CLP 6 h) foram submetidas a concentrações crescentes cumulativas de **A)** fenilefrina (1 nM – 100 μ M), **B)** angiotensina II (1 nM – 3 μ M) e **C)** fenilefrina (1 nM – 100 μ M) em anéis sem endotélio (E-). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM.

Tabela 2. Redução na resposta contrátil máxima (Emáx) e na potência (-logCE₅₀) a vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos.

	Emáx			-log CE ₅₀		
	CTR	SHAM	CLP 6 h	CTR	SHAM	CLP 6 h
Fenilefrina E+	2,17 ± 0,07	2,33 ± 0,07*	1,28 ± 0,06*#	7,09 ± 0,11	6,79 ± 0,09*	6,62 ± 0,16*
Fenilefrina E-	2,65 ± 0,12	-	2,9 ± 0,08*	7,53 ± 0,17	-	6,97 ± 0,09*
Angiotensina II	0,87 ± 0,05	0,77 ± 0,02*	0,45 ± 0,04*#	7,76 ± 0,16	7,55 ± 0,09	7,76 ± 0,3

Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 por grupo). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey (fenilefrina E+ e angiotensina II) e teste *t* de Student não pareado (fenilefrina E-). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo SHAM; - indica não avaliado.

Outro parâmetro utilizado como marcador de sepse neste trabalho foi a concentração plasmática de NO_x, considerados metabólitos estáveis de NO e liberados em grandes quantidades durante a sepse. Como demonstrado na Figura 12, houve um aumento significativo na quantidade de NO_x detectada nos grupos CLP 6 h ($98,29 \pm 9,74 \mu\text{M}$) e CLP 18 h ($193,9 \pm 10,23 \mu\text{M}$), quando comparados com o grupo CTR ($53,79 \pm 7,67 \mu\text{M}$) e quando comparados entre si ($p < 0,01$ CTR vs CLP 6 h; $p < 0,001$ CTR vs CLP 18h; $p < 0,001$ CLP 6 h vs CLP 18 h). Devido às diferenças cardiovasculares pouco relevantes para o presente estudo quando os dados obtidos nos grupos CTR e SHAM foram comparados entre si, tanto esse (NO_x plasmático) como os demais parâmetros apresentados neste estudo foram avaliados utilizando-se somente o grupo CTR (composto por animais naïve) para fins de comparação com os grupos CLP.

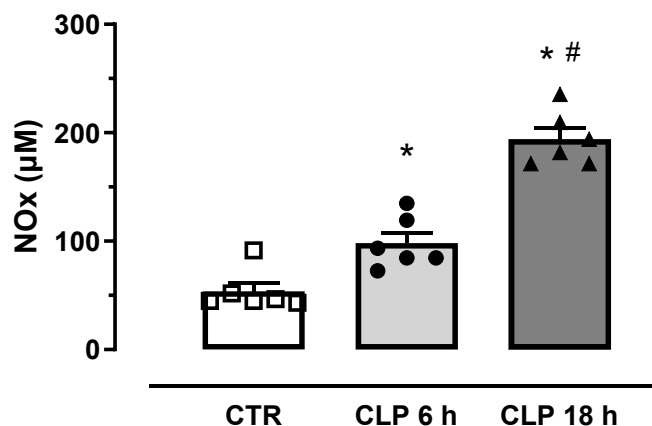


Figura 12. Aumento dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NO_x) na sepse. A concentração de NO_x foi determinada no plasma dos grupos controle (CTR) e sépticos (CLP 6 h e CLP 18 h). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 6 por grupo). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR e # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 6 h.

A Tabela 3 apresenta dados obtidos no hemograma de animais CTR e sépticos, onde destaca-se a leucocitopenia, com linfocitopenia e monocitopenia, nos grupos CLP 6 h e CLP 18 h, características comumente observadas durante a sepse. Além disso, os animais sépticos de ambos os grupos apresentaram aumento nos níveis de hemoglobina e o grupo CLP 18 h apresentou granulocitose.

Tabela 3. Análise hematológica de animais sépticos.

Hemograma ($10^3/\mu\text{L}$)	CTR	CLP 6 h	CLP 18 h
Leucócitos	8,38 \pm 0,75	3,81 \pm 0,18*	5,057 \pm 0,37*
Hemoglobina	12,22 \pm 0,19	14,72 \pm 0,45*	15,12 \pm 0,33*
Linfócitos	5,23 \pm 0,31	1,53 \pm 0,09*	1,45 \pm 0,85*
Monócitos	1,23 \pm 0,22	0,36 \pm 0,02*	0,716 \pm 0,98*
Granulócitos	1,88 \pm 0,31	1,96 \pm 0,18	2,9 \pm 0,37*

As análises foram realizadas em amostras de sangue dos grupos controle (CTR) e sépticos (CLP 6 h e CLP 18 h). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 6 por grupo). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR.

3.2 PARTE II: RESPONSABILIDADE ÀS DROGAS VASOATIVAS ADMINISTRADAS PELA VIA CENTRAL E PERIFÉRICA EM RATOS SÉPTICOS

3.2.1 Responsividade à administração central e periférica de noradrenalina e fenilefrina

Para avaliar a responsividade cardiovascular frente a agonistas α_1 -adrenérgicos (noradrenalina e fenilefrina), tanto quando administrados no SNC quanto no sistema periférico de ratos sépticos, dados de pressão arterial e FC foram analisados em animais anestesiados. Foi realizada inicialmente a administração i.v. de noradrenalina e fenilefrina (3, 10 e 30 nmol/Kg), seguida da administração i.c.v. de noradrenalina (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) ou fenilefrina (30 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) nos grupos CTR, CLP 6 h e 18 h. Não houve taquifilaxia para nenhuma das drogas utilizadas, observado através de estudos piloto para determinação de doses e efeito de administrações repetidas, como exemplificado na Figura 13 para duas administrações de noradrenalina. A Figura 14 apresenta os resultados comparativos da responsividade após administração central e periférica de noradrenalina sobre a PAM nos grupos CTR e CLP 6 h. A administração central (i.c.v.) de noradrenalina gerou uma resposta pressora com padrão de duração mais prolongada do que a resposta gerada pela administração i.v., onde o retorno para os valores basais aconteceu de maneira rápida (Figuras A e D). Ainda, a administração de noradrenalina no SNC (i.c.v.)

gerou uma resposta pressora em ambos os grupos, porém o efeito registrado no grupo CLP 6 h foi menor, tanto no valor de resposta máxima (Δ PAM: $20,2 \pm 4,2$ mmHg) quanto na área sob a curva (ASC: $260,3 \pm 131$ UA), quando comparados à resposta máxima (Δ PAM: $51,9 \pm 3,5$ mmHg, $p < 0,0001$) e área sob a curva (ASC: $656,8 \pm 110$ UA, $p < 0,05$) do grupo controle, como observado nas Figuras 14A-C. Já a administração periférica (i.v.) de noradrenalina resultou em resposta pressora similar entre os grupos CLP 6 h (Δ PAM: $54 \pm 8,1$ mmHg) e CTR (Δ PAM: $59,2 \pm 5,9$ mmHg, $p = 0,613$), sem diferença significativa entre as ASC dos grupos CLP 6 h ($83,9 \pm 16,6$ UA) e CTR ($121,5 \pm 17,2$ UA, $p = 0,146$), como observado nas Figuras 14D-F. Respostas similares foram observadas nos parâmetros de PAS e PAD (dados não apresentados). Já para a FC, a administração central (i.c.v.) de noradrenalina induziu uma leve queda variável em ambos os grupos, enquanto a administração i.v. de noradrenalina induziu um aumento da FC, a qual retornou para valores basais após cerca de 5 minutos, também em ambos os grupos, porém nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (Tabela 4).

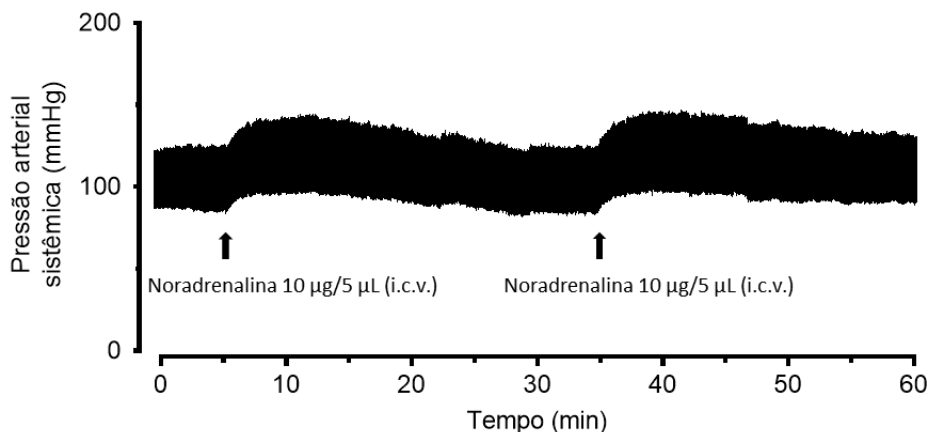


Figura 13. Efeito hipertensor, sem taquifilaxia, da administração repetida de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis. Registro de medida da pressão arterial mostrando a administração i.c.v. repetida de noradrenalina ($10 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) em rato saudável anestesiado com cetamina/xilazina.

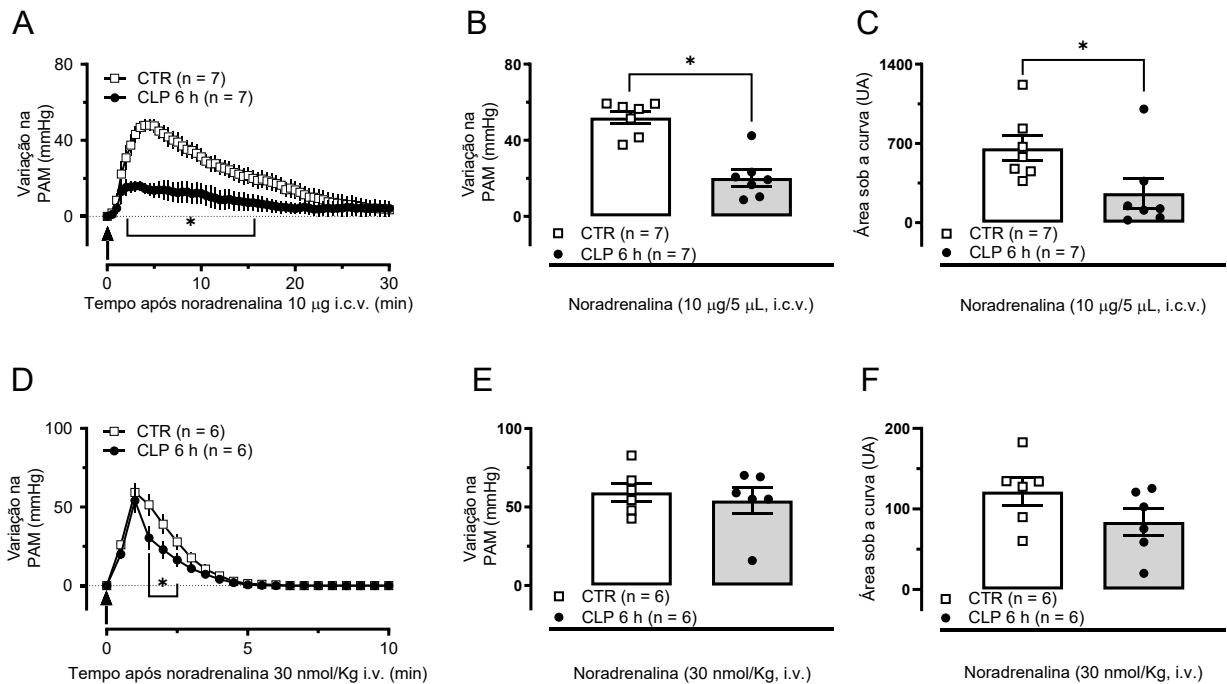


Figura 14. Efeito hipertensor da administração central e periférica de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 6 h. Análise temporal (A), variação (B), e área sob a curva do efeito (C) da noradrenalina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média. D) Análise temporal do efeito de noradrenalina administrada i.v. sobre a pressão arterial média. E) Variação na pressão arterial média após administração i.v. de noradrenalina. F) Área sob a curva do efeito de aumento da pressão arterial média causada pela administração i.v. de noradrenalina. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A e D), ou teste *t* de Student não pareado (B, C, E e F). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Tabela 4. Variação na frequência cardíaca pela administração central e periférica de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 6 h.

Via de administração da noradrenalina	CTR	CLP 6 h
i.c.v. (10 µg/5 µL)	-3,76 \pm 22,4	-8,72 \pm 9,51
i.v. (30 nmol/Kg)	23,11 \pm 13,29	14,57 \pm 12,29

Os dados mostram resposta máxima na frequência cardíaca (em bpm) de ratos anestesiados saudáveis e sépticos e são expressos como a média \pm erro padrão da média (n = 6-7 por grupo). Análise estatística realizada pelo teste *t* de Student não pareado.

O mesmo procedimento de administração de noradrenalina pela via central e periférica foi realizado nos animais do grupo CLP 18 h, a fim de comparar com seu respectivo grupo CTR. Assim como o grupo CLP 6 h, o grupo CLP 18 h apresentou hiporresponsividade à noradrenalina após administração central (i.c.v.), tanto no valor de resposta máxima (Δ PAM:

20,4 ± 2,7 mmHg) quanto na ASC (175,4 ± 29 UA), quando comparados às respostas obtidas no grupo CTR (Δ PAM: 46,9 ± 5,1 mmHg, $p < 0,001$; ASC: 511 ± 74,4 UA, $p < 0,05$), como pode ser observado nas Figuras 15A-C. Ainda, a administração i.v. de noradrenalina pela via periférica resultou em resposta pressora máxima similar entre os grupos CLP 18 h (Δ PAM: 54 ± 8,1 mmHg) e CTR (Δ PAM: 59,2 ± 5,9 mmHg, $p = 0,613$), porém com redução na área sob a curva do grupo CLP 18 h em relação ao grupo CTR (ASC de 137 ± 8,6 e 302,3 ± 42,9 UA, respectivamente, $p < 0,05$), com redução marcante no tempo de duração da resposta pressora, como mostrado nas Figuras 15D-F. Novamente, respostas similares foram observadas nos parâmetros de PAS, PAD (dados não apresentados). Já para a FC, a administração central (i.c.v.) de noradrenalina induziu uma queda em ambos os grupos, porém o grupo CLP 18 h apresentou uma queda menor quando comparado ao grupo CTR, sendo essa diferença estatisticamente significativa somente na análise temporal (Figura 16 A). A administração i.v. de noradrenalina induziu uma resposta bifásica, inicialmente com uma queda rápida e posteriormente com aumento da FC, a qual retornou para valores basais após cerca de 7 minutos, também em ambos os grupos, porém nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada (Figura 16).

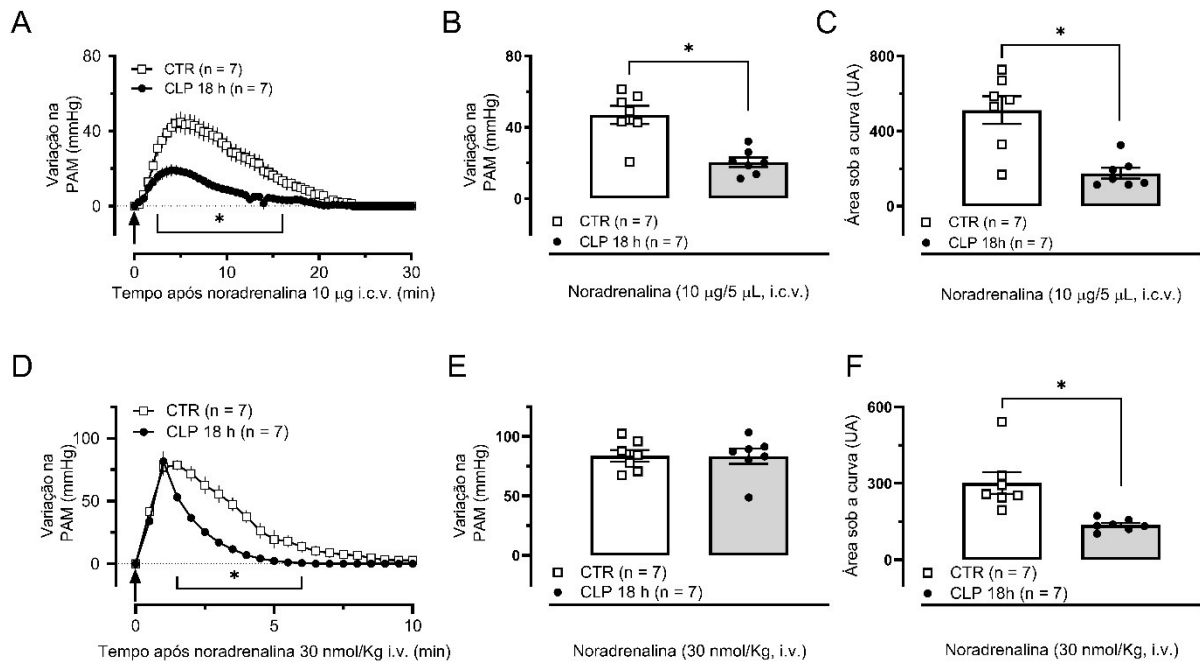


Figura 15. Efeito hipertensor da administração central e periférica de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 18 h. Análise temporal (A), variação (B), e área sob a curva do efeito (C) da noradrenalina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média. D) Análise temporal do efeito de noradrenalina administrada i.v. sobre a pressão arterial média. E) Variação na pressão arterial média após administração i.v. de noradrenalina. F) Área sob a curva do efeito de aumento da pressão arterial média causada pela administração i.v. de noradrenalina. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A e D), ou teste *t* de Student não pareado (B, C, E e F). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

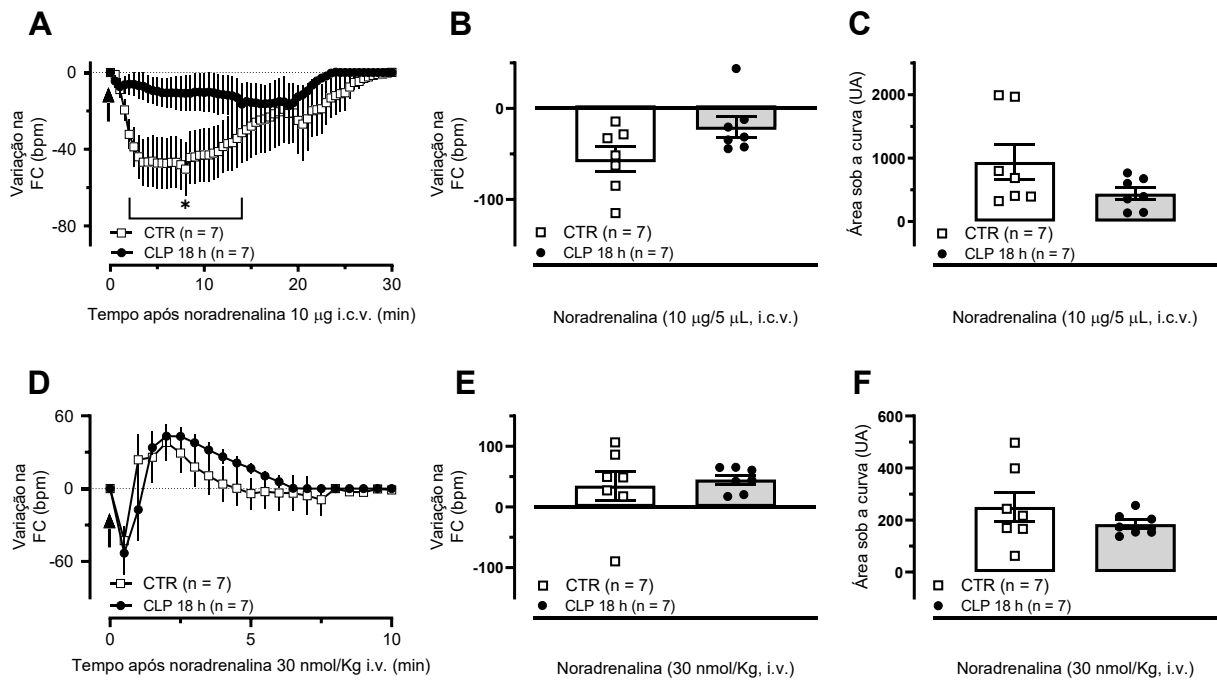


Figura 16. Efeito cardíaco da administração central e periférica de noradrenalina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 18 h. Análise temporal (A), variação (B), e área sob a curva do efeito (C) da noradrenalina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a frequência cardíaca. D) Análise temporal do efeito de noradrenalina administrada i.v. sobre a frequência cardíaca. E) Variação na frequência cardíaca após administração i.v. de noradrenalina. F) Área sob a curva do efeito de aumento da frequência cardíaca causada pela administração i.v. de noradrenalina. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A e D), ou teste *t* de Student não pareado (B, C, E e F). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Nos grupos CLP 6 h e CTR também foram avaliados quanto à responsividade para fenilefrina administradas pelas vias i.c.v. e i.v.. Similar à resposta observada para noradrenalina, os animais do grupo CLP 6 h apresentaram respostas reduzidas à fenilefrina administrada pela via i.c.v. (Δ PAM: $16,4 \pm 3,6$ mmHg; ASC: $151,3 \pm 37$ UA), comparada às respostas verificadas no grupo CTR (Δ PAM: $35,7 \pm 4,8$ mmHg, $p < 0,05$; ASC: $392,6 \pm 87,7$ UA, $p < 0,05$), como pode ser observado nas Figuras 17A-C. Seguindo o mesmo padrão encontrado para a noradrenalina, na Figura 17D-F nota-se que quando a fenilefrina foi administrada via i.v. não há diferença entre os grupos no que se refere à resposta máxima registrada (Δ PAM foi de $60,5 \pm 7,2$ mmHg e $49,5 \pm 6,2$ mmHg, nos grupos CLP 6 h e CRT, respectivamente; $p = 0,271$; Figura 16E). Apesar dos efeitos pressóricos da fenilefrina também terem durado menos tempo no grupo CLP 6 h (Figura 17D), a comparação estatística da ASC não apontou diferença significativa (valor de $p = 0,058$) entre os grupos ($89,9 \pm 21,3$ UA e $171,1 \pm 31,4$ UA).

Novamente, respostas similares foram observadas nos parâmetros de PAS e PAD (dados não apresentados). Já para a FC, a administração central (i.c.v.) de fenilefrina induziu uma queda em ambos os grupos, porém o grupo CLP 6 h apresentou uma queda menor quando comparado ao grupo CTR, com redução na resposta máxima (ΔFC : $-20,8 \pm 3,5$ bpm) e na área sob a curva (ASC: $236,7 \pm 47,7$ UA) comparados ao grupo CTR (ΔFC : $-47,8 \pm 8,4$ bpm, $p < 0,05$; ASC: $823,6 \pm 217,4$ UA, $p < 0,05$), indicando hiporresponsividade cardíaca, como observado na Figura 18A-C. Diferente da administração i.v. de noradrenalina, onde uma resposta bifásica foi observada (Figura 16D), a administração i.v. de fenilefrina induziu somente uma resposta bradicárdica, a qual retornou para valores basais em menos de 2 minutos em ambos os grupos, sem nenhuma diferença estatisticamente significativa (Figura 18D-F).

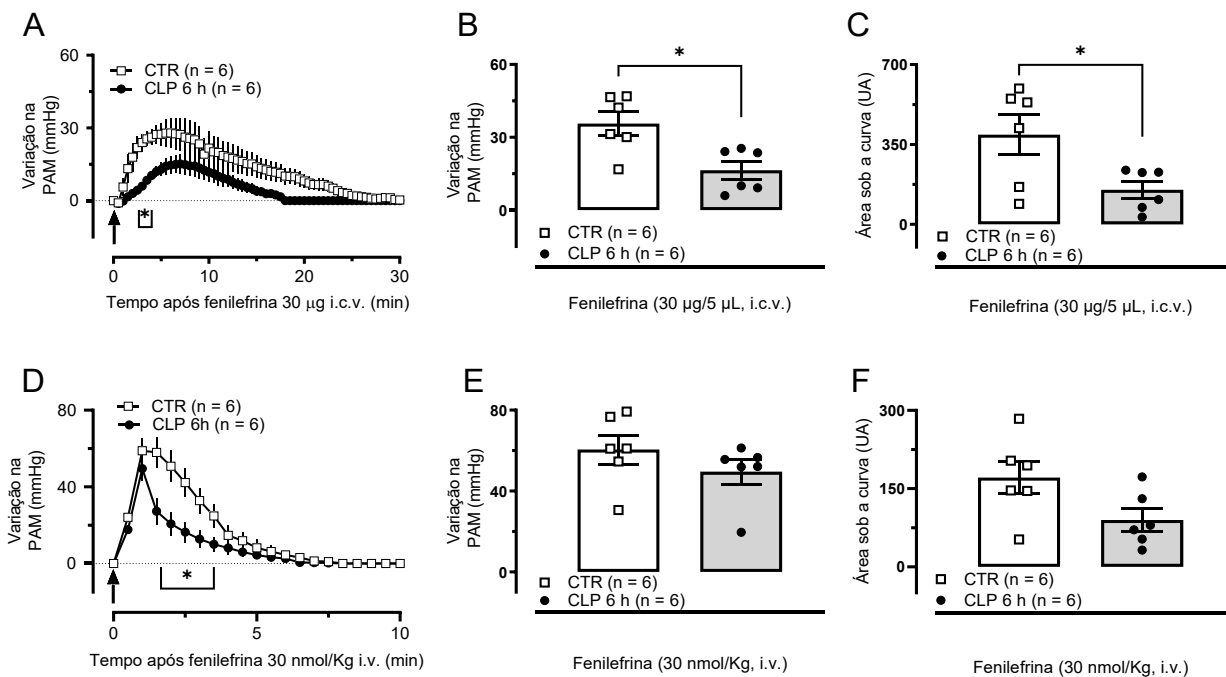


Figura 17. Efeito hipertensor da administração central e periférica de fenilefrina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 6 h. Análise temporal (A), variação (B), e área sob a curva do efeito (C) da noradrenalina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média. D) Análise temporal do efeito de fenilefrina administrada i.v. sobre a pressão arterial média. E) Variação na pressão arterial média após administração i.v. de fenilefrina. F) Área sob a curva do efeito de aumento da pressão arterial média causada pela administração i.v. de fenilefrina. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A e D), ou teste *t* de Student não pareado (B, C, E e F). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

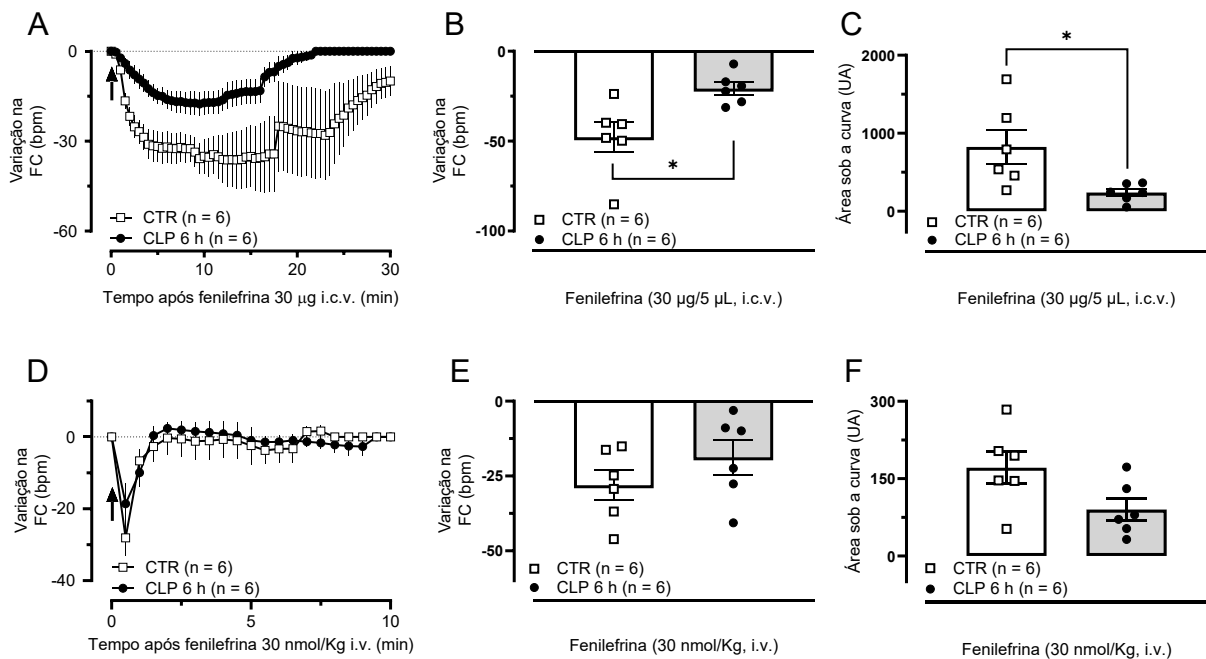


Figura 18. Efeito cardíaco da administração central e periférica de fenilefrina em ratos anestesiados saudáveis e submetidos à CLP 6 h. Análise temporal (A), variação (B), e área sob a curva do efeito (C) da fenilefrina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a frequência cardíaca. D) Análise temporal do efeito de fenilefrina administrada i.v. sobre a frequência cardíaca. E) Variação na frequência cardíaca após administração i.v. de fenilefrina. F) Área sob a curva do efeito de aumento da frequência cardíaca causada pela administração i.v. de fenilefrina. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A e D), ou teste *t* de Student não pareado (B, C, E e F). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

3.2.2 Responsividade à administração central de prazosina e metoprolol sobre a noradrenalina e fenilefrina

Para verificar quais receptores adrenérgicos estão envolvidos nas respostas frente à noradrenalina e fenilefrina administrada diretamente no SNC nos grupos CTR e CLP 6 h, foram realizados experimentos com uma administração i.c.v. dos antagonistas prazosina (α_1 -adrenérgico) e metoprolol (β_1 -adrenérgico) antes dos agonistas adrenérgicos. A Figura 19 apresenta os efeitos da administração central da prazosina e do metoprolol sobre a PAM e FC. A microinjeção de prazosina induziu uma leve redução na PAM basal tanto na resposta máxima dos animais do grupo CTR (Δ PAM: $-8,57 \pm 2,8$ mmHg, $n = 7$) quanto CLP 6 h (Δ PAM: $-9 \pm 0,9$ mmHg, $n = 6$), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 18A). Com relação à FC, a prazosina gerou um pequeno aumento no grupo CTR (Δ FC: $10,35 \pm 5,2$ bpm) e uma redução quase imperceptível no grupo CLP 6 h (Δ FC: $-3 \pm 3,2$ bpm), sem diferença

estatística entre os grupos (Figura 19B). Já a microinjeção de metoprolol aumentou a PAM do grupo CLP 6 h (Δ PAM: $7,8 \pm 2,8$ mmHg, $n = 6$), e reduziu a PAM no grupo CTR (Δ PAM: $-8,6 \pm 2,2$ mmHg, $n = 7$; $p < 0,001$ entre os grupos), como mostrado na Figura 19C. Além disso, os dados plotados na Figura 19D mostra que embora ambos os grupos tenham apresentado redução na FC após a microinjeção de metoprolol, a intensidade desse efeito foi maior no grupo CLP 6 h do que no grupo CTR (Δ FC: $-55,7 \pm 8,2$ bpm e $-20,9 \pm 11,6$ bpm, respectivamente; $p < 0,05$).

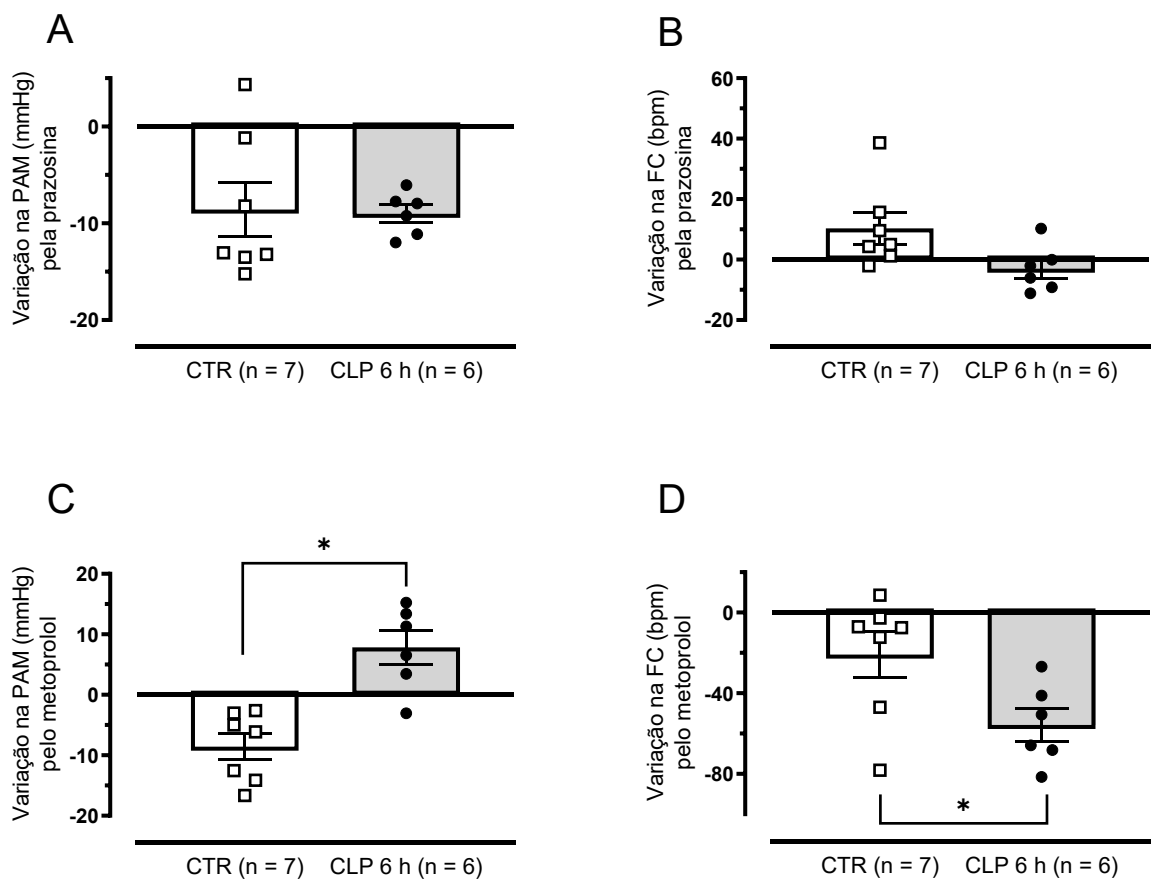


Figura 19. Efeito cardiovascular à administração central de prazosina e metoprolol sobre os parâmetros basais em ratos anestesiados controle e CLP 6 h. Efeito da administração da prazosina ($5 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média (A) e frequência cardíaca (B). Efeito da administração do metoprolol ($100 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) administrado no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média (C) e frequência cardíaca (E). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. Teste *t* de Student não pareado. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

A Figura 20 apresenta os resultados comparativos da responsividade à noradrenalina e fenilefrina (administradas via i.c.v.), antes e depois da prazosina, com análise dos efeitos dos agonistas sobre a PAM e FC, tanto no grupo CTR como CLP 6 h. Nos animais saudáveis (grupo

CTR), a microinjeção de prazosina reduziu o aumento da PAM induzido pela noradrenalina de $51,9 \pm 3,3$ para $24,6 \pm 8$ mmHg ($n = 7, p < 0,05$; Figura 20A), diferença essa também observada na área sob a curva ($p < 0,01$; Figura 20B). Entretanto, o tratamento com prazosina não alterou significativamente a já reduzida resposta pressórica para a noradrenalina no grupo CLP 6 h, (Δ PAM de $20,2 \pm 4,2$ e $12,7 \pm 1,4$ mmHg, antes e após a prazosina, respectivamente; $n = 6, p = 0,597$; Figura 20A). A prazosina não alterou a resposta máxima e a área sob a curva gerada pela noradrenalina na FC em nenhum dos grupos (Figuras 20C e D). Já o efeito pressórico da fenilefrina foi reduzido pela prazosina em ambos os grupos, como apresentado na Figura 20E (Δ PAM: grupo CTR, de $35,7 \pm 4,8$ para $6,2 \pm 5$ mmHg, $n = 6, p < 0,0001$; grupo CLP 6 h, de $16,4 \pm 3,6$ para $2,5 \pm 2$ mmHg, $n = 6, p < 0,01$). Porém, ao analisar a área sob a curva, somente a área do grupo CTR foi estatisticamente reduzida (CTR: $p < 0,0001$, CLP 6 h: $p = 0,154$; Figura 20F). A bradicardia na resposta máxima de FC frente à microinjeção central de fenilefrina foi reduzida pela prazosina, também em ambos os grupos (CTR: de $-47,8 \pm 8,4$ para $5,7 \pm 5,2$ bpm, $n = 6, p < 0,0001$; CLP 6 h: de $-20,8 \pm 3,5$ para $2,5 \pm 2,1$ bpm, $n = 6, p < 0,05$, Figura 20G). Assim como observado para a área sob a curva da PAM, a área sob a curva da FC somente apresentou redução no grupo CTR ($p < 0,05$, Figura 20H).

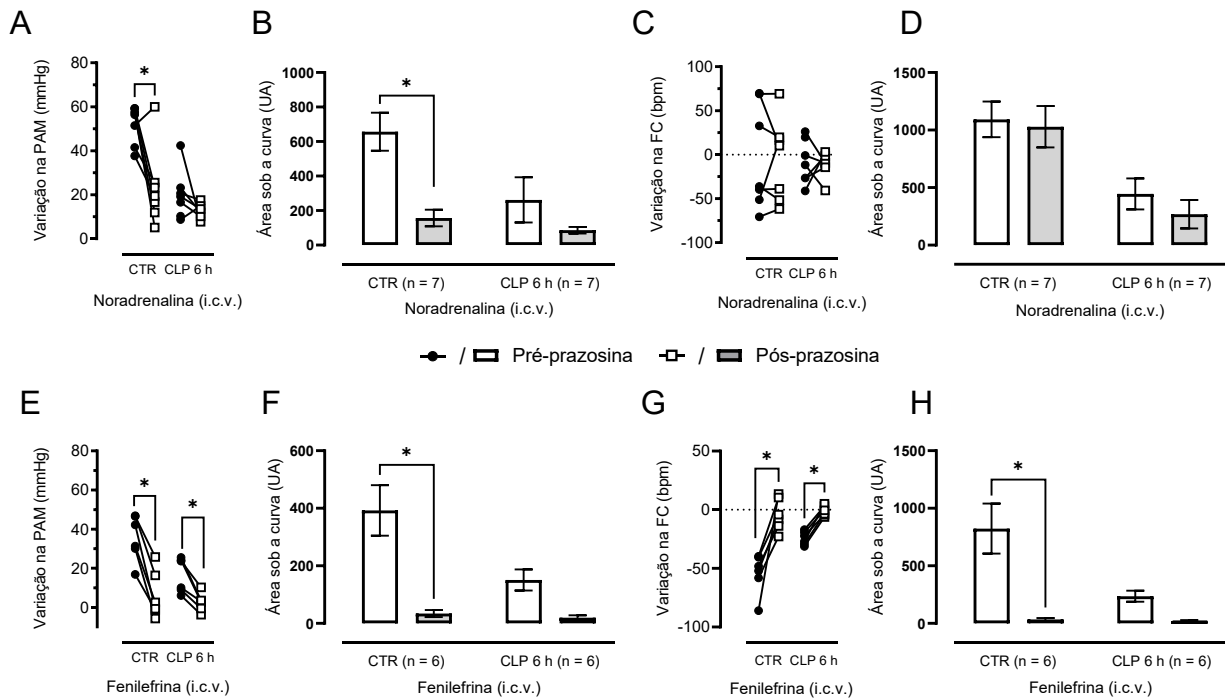


Figura 20. Efeito cardiovascular da administração central de prazosina sobre a ação da noradrenalina e fenilefrina em ratos saudáveis e submetidos à CLP. Variação e área sob a curva do efeito da noradrenalina (10 µg/5 µL) administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média (A e B, respectivamente) e frequência cardíaca (C e D, respectivamente) antes e depois da administração i.c.v. de prazosina (5 µg/5 µL). Variação e área sob a curva do efeito da fenilefrina (30 µg/5 µL) administrada via i.c.v. sobre a pressão arterial média (E e F, respectivamente) e frequência cardíaca (G e H, respectivamente) antes e depois da administração i.c.v. de prazosina. Resultados expressos como média ± erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado à resposta pré-prazosina.

A Figura 21 apresenta os resultados comparativos da responsividade central à noradrenalina, antes e depois da administração de metoprolol, sobre a PAM e FC em ambos os grupos. Nos animais CTR, a microinjeção de metoprolol reduziu a resposta pressora induzida pela noradrenalina na PAM de $37,5 \pm 5,6$ mmHg para $18,54 \pm 4,7$ mmHg ($n = 7$, $p < 0,01$, Figura 21A), diferença também observada na área sob a curva ($p < 0,01$, Figura 21B). Assim como nos animais CTR, houve redução da resposta pressora induzida por noradrenalina frente à microinjeção prévia de metoprolol no grupo CLP 6 h, onde a resposta máxima em PAM passou de $24,3 \pm 2,6$ mmHg para 10 ± 3 mmHg ($n = 6$, $p < 0,05$, Figura 21A), redução também observada na área sob a curva ($p < 0,05$, Figura 21B). O metoprolol não induziu diferenças estatisticamente significantes na resposta gerada pela noradrenalina na FC máxima de ambos

os grupos (Figura 21C), mas reduziu a área sob a curva no grupo CLP 6 h ($p < 0,05$ Figura 21D).

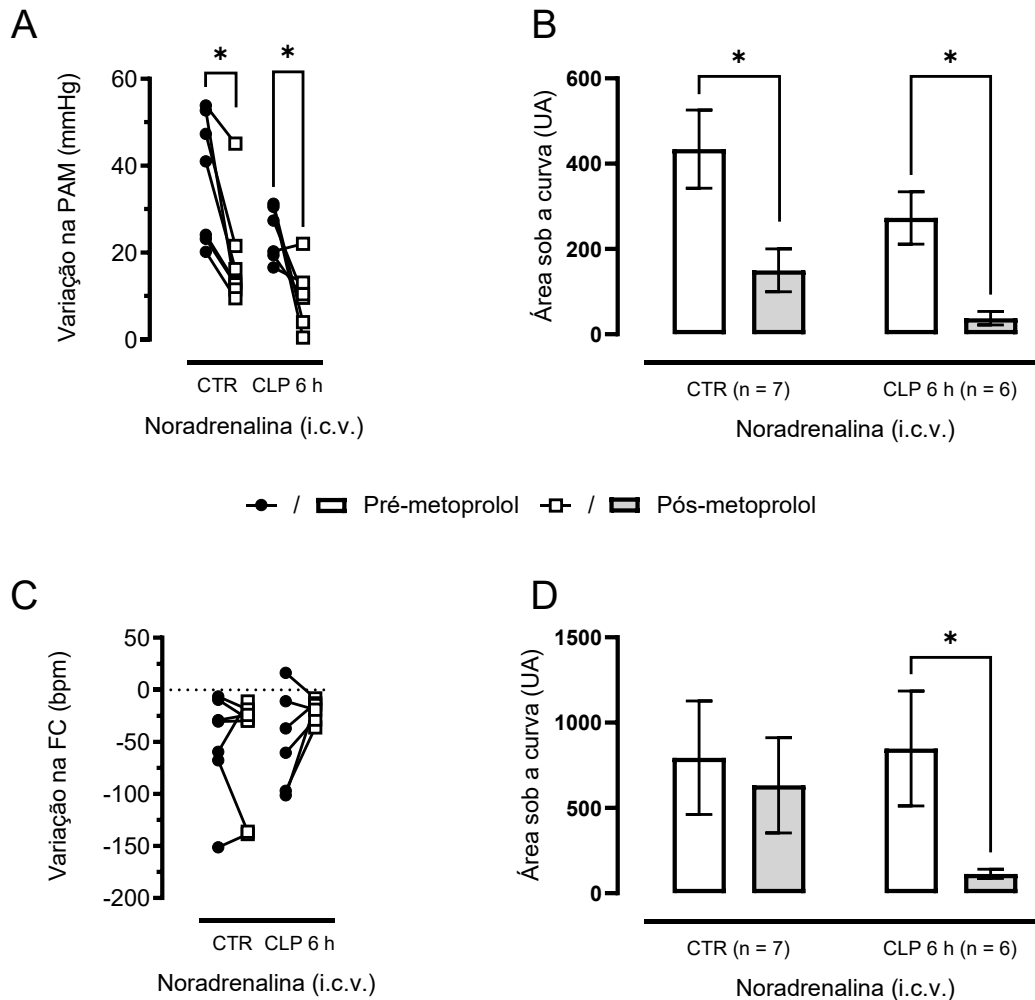


Figura 21. Efeito cardiovascular da administração central de metoprolol sobre a ação da noradrenalina em ratos saudáveis e submetidos à CLP. Variação e área sob a curva do efeito da noradrenalina (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média (A e B, respectivamente) e frequência cardíaca (C e D, respectivamente) antes e depois da administração i.c.v. de metoprolol (100 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado à resposta pré-metoprolol.

3.3 PARTE III: EFEITO DE ANESTÉSICOS SOBRE A RESPOSTA CARDIOVASCULAR PELA ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE CLONIDINA E NORADRENALINA EM RATOS CONTROLE

3.3.1 Responsividade à administração central de clonidina e noradrenalina

Com o objetivo de verificar a influência dos diferentes tipos de anestésicos utilizados em estudos experimentais, animais saudáveis normotensos foram anestesiados com pentobarbital sódico ou cetamina/xilazina, e receberam via i.c.v. clonidina (10 µg/5 µL) e noradrenalina (10 µg/5 µL). Os animais do grupo pentobarbital apresentaram queda na pressão arterial após a administração de clonidina (Δ PAM: $-40,7 \pm 6$ mmHg), enquanto o grupo cetamina/xilazina apresentou, de maneira oposta, aumento na pressão arterial (Δ PAM: $29,4 \pm 5$ mmHg; $p < 0,0001$). Ambos os grupos apresentaram queda na FC, porém o grupo pentobarbital apresentou uma queda mais intensa (Δ FC: $-133,7 \pm 15$ bpm), comparado ao grupo cetamina/xilazina (Δ FC: $-33,6 \pm 5$ bpm; $p < 0,0001$), sugerindo uma modulação da resposta cardiovascular pelos anestésicos (Figura 22).

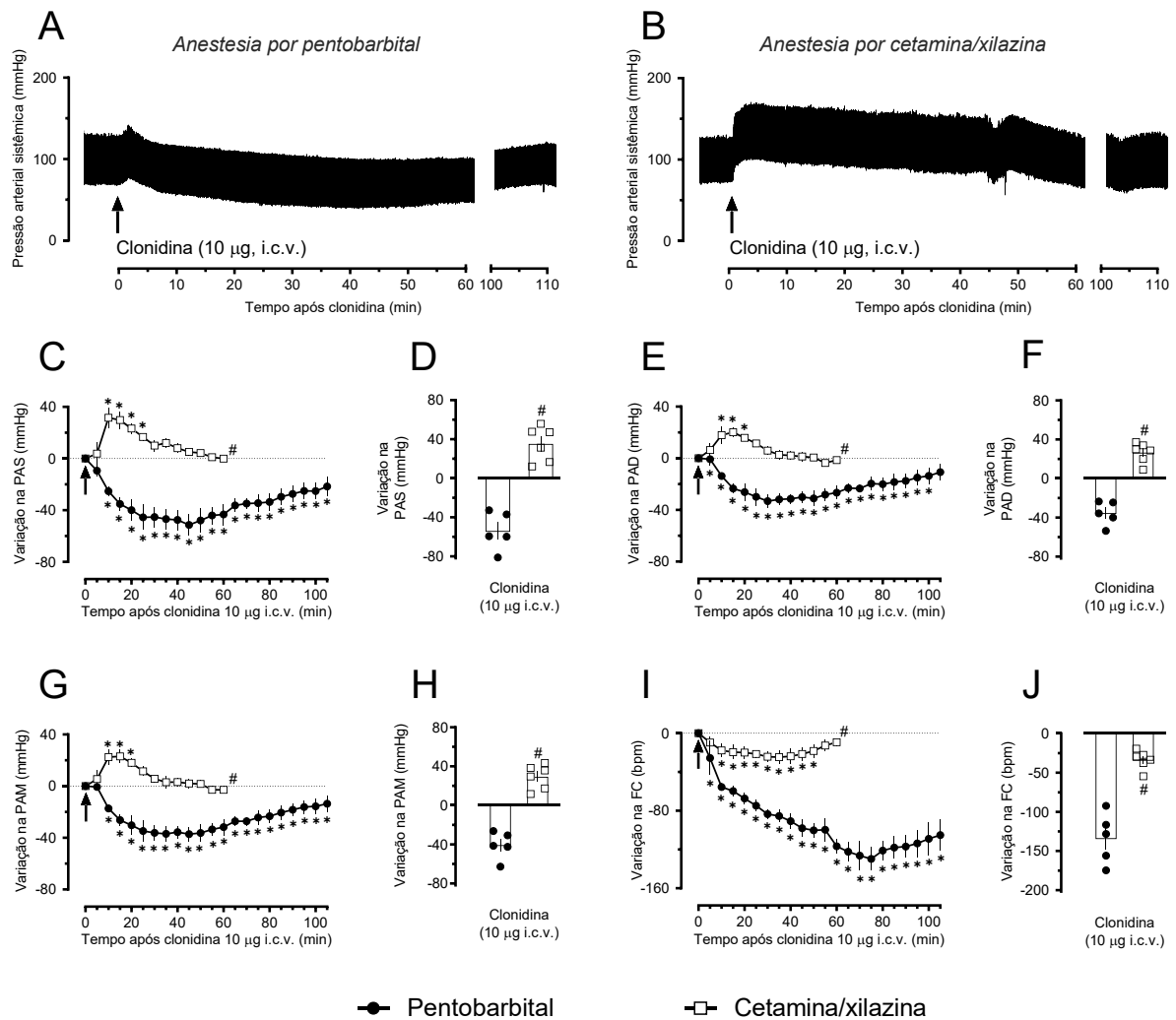


Figura 22. Efeito cardiovascular da administração central de clonidina dependente do tipo de anestésico em ratos saudáveis sob ventilação mecânica. Registro de medida da pressão arterial mostrando a administração i.c.v. de clonidina (10 µg/5 µL) em **A**) ratos anestesiados com pentobarbital sódico e **B**) animais anestesiados com cetamina/xilazina. Análise temporal e variação após administração i.c.v. de clonidina em ratos anestesiados com pentobarbital sódico (círculo preto) e cetamina/xilazina (quadrado branco), respectivamente: **C** e **D**) da alteração na pressão arterial sistólica; **E** e **F**) da alteração na pressão arterial diastólica; **G** e **H**) alteração na pressão arterial média e **I** e **J**) alteração na frequência cardíaca. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5-6 por grupo). ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Dunnett (C, E, G e I), ou teste *t* de Student não pareado (D, F, H e J). * indica $p < 0,05$ comparado ao valor basal do próprio grupo e # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo pentobarbital.

Já quando administrado noradrenalina i.c.v., ambos os grupos apresentaram aumento na pressão arterial, porém o grupo cetamina/xilazina apresentou um maior aumento (Δ PAM: $42,8 \pm 7,8$ mmHg) em relação ao grupo pentobarbital (Δ PAM: $18,9 \pm 5,5$ mmHg; $p < 0,05$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas alterações de FC entre os

grupos (Δ FC do grupo pentobarbital: $7,4 \pm 9$ bpm; cetamina/xilazina: $-1,6 \pm 15$ bpm; $p = 0,63$), como mostrado na Figura 23.

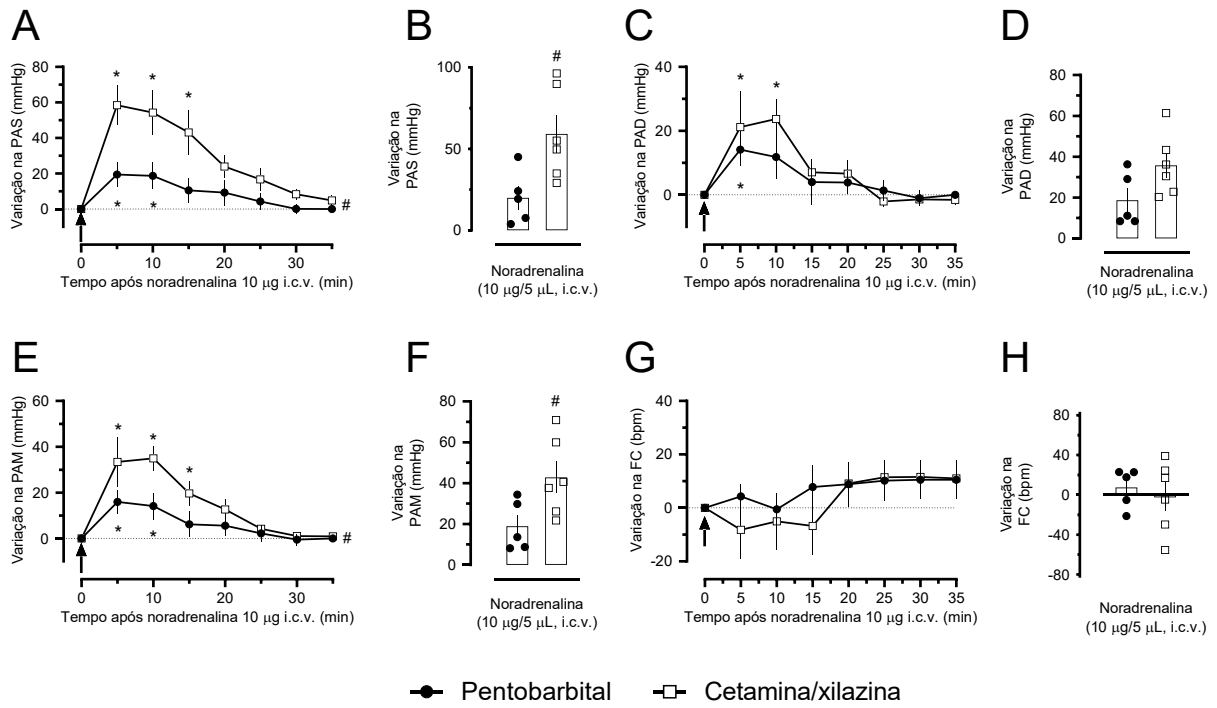


Figura 23. Efeito cardiovascular da administração central de noradrenalina conforme o tipo de anestésico em ratos saudáveis sob ventilação mecânica. Análise temporal e variação após administração i.c.v. de noradrenalina em ratos anestesiados com pentobarbital sódico (círculo preto) e cetamina/xilazina (quadrado branco), respectivamente: **A e B)** da alteração na pressão arterial sistólica; **C e D)** da alteração na pressão arterial diastólica; **E e F)** alteração na pressão arterial média e **G e H)** alteração na frequência cardíaca. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média ($n = 5-6$ por grupo). ANOVA de uma via com medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Dunnet (A, C, E e G), ou teste t de Student não pareado (B, D, F e H). * indica $p < 0,05$ comparado ao valor basal do próprio grupo e # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo pentobarbital.

3.3.2 Responsividade à administração central de ioimbina sobre a clonidina e dexmedetomidina

Para verificar se o efeito pressor da clonidina i.c.v. observado quando os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina seria dependente da ligação em receptores α_2 -adrenérgicos, os animais receberam clonidina ou dexmedetomidina ($0,6 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$), antes e após o antagonista α_2 -adrenérgico ioimbina ($5 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$). Assim como a clonidina, a administração i.c.v. de dexmedetomidina em animais anestesiados com cetamina/xilazina resultou em efeito hipertensor (Δ PAM: $21 \pm 3,7$ mmHg) e queda na FC (Δ FC: -50 ± 15 bpm). Após a

administração i.c.v. do antagonista ioimbina, tanto a clonidina quanto a dexmedetomidina apresentaram redução no efeito pressórico em relação ao aumento inicial da pressão arterial (Δ PAM clonidina pós-ioimbina: $9,9 \pm 2,3$ mmHg, $p < 0,05$; Δ PAM dexmedetomidina pós-ioimbina: $6,7 \pm 1,1$ mmHg, $p < 0,05$), porém sem alterações estatisticamente significantes na queda da FC (Δ FC clonidina pós-ioimbina: $6,5 \pm 6$ bpm, $p = 0,8$; Δ FC dexmedetomidina pós-ioimbina: $-23,7 \pm 8$ bpm, $p = 0,36$), como apresentado na Figura 24.

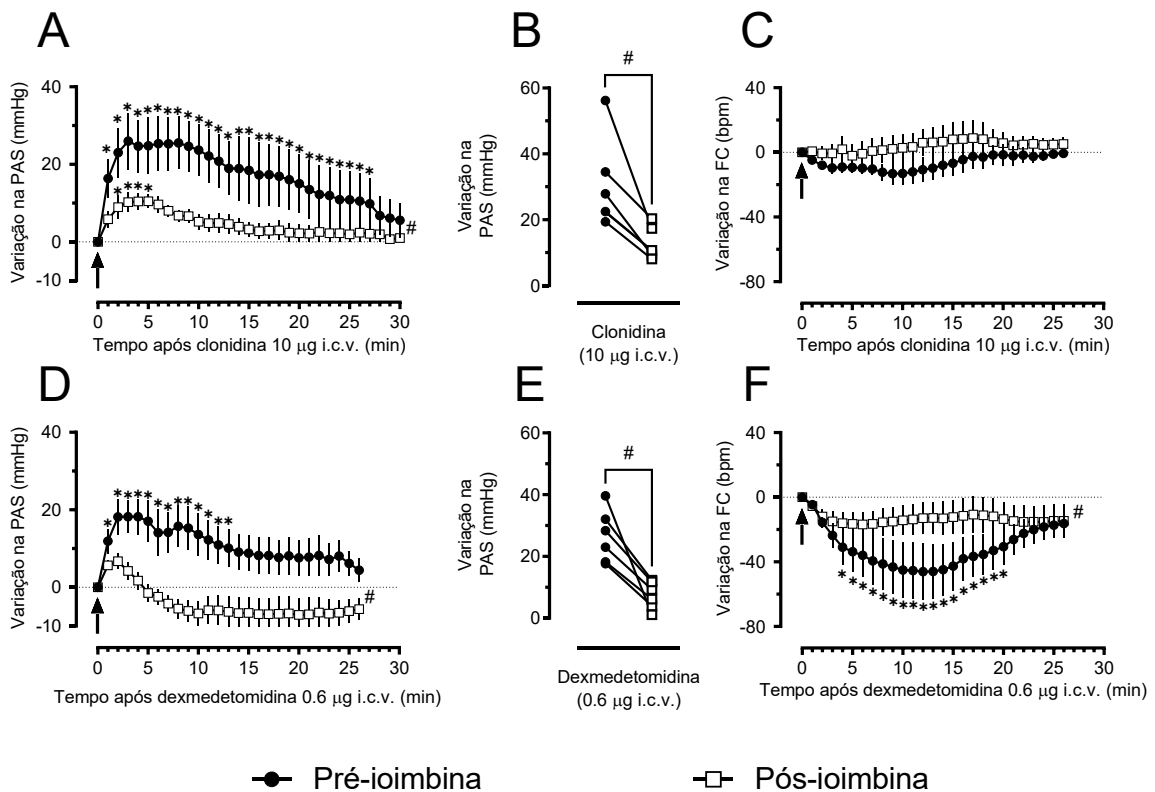


Figura 24. Efeito hipertensor da administração central de clonidina e dexmedetomidina via receptores α_2 -adrenérgicos. Análise temporal e variação da microinjeção i.c.v. de clonidina ($10 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) antes (círculos pretos) e depois (quadrados brancos) da administração i.c.v. de ioimbina ($5 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) na pressão arterial sistólica (A e B, respectivamente) e frequência cardíaca (C). Análise temporal e variação da microinjeção i.c.v. de dexmedetomidina ($0,6 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) antes (círculos pretos) e depois (quadrados brancos) da administração i.c.v. de ioimbina na pressão arterial sistólica (D e E, respectivamente) e frequência cardíaca (F). Resultados expressos como dot plot e média \pm erro padrão da média ($n = 6$ por grupo). ANOVA de duas vias com medidas repetidas e pós-teste de Šidák (A, C, D e F), ou teste t de Student pareado (B e E). * indica $p < 0,05$ comparado com valores basais intragrupo e # indica $p < 0,05$ comparado com antes da administração de ioimbina.

3.4 PARTE IV: RESPONSABILIDADE À ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE CLONIDINA EM RATOS SÉPTICOS

3.4.1 Responsividade à administração central de clonidina

Para verificar se existe hiporresponsividade cardiovascular de origem central frente ao agonista α_2 -adrenérgico clonidina durante a sepse em diferentes tempos, os dados de pressão arterial e FC foram analisados em animais anestesiados com cetamina/xilazina. Foi realizada a administração i.c.v. de clonidina (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) nos grupos CTR, CLP 6 e 18 h. Na Figura 25 encontram-se os resultados comparativos da responsividade central de clonidina sobre a pressão arterial média dos grupos. A administração de clonidina via i.c.v. gerou uma resposta pressora em ambos os grupos, porém o grupo CLP 6 h apresentou hiporresponsividade cardiovascular, tanto no valor de resposta máxima (ΔPAM : $10,4 \pm 2,5$ mmHg) quanto na área sob a curva (ASC: $79,5 \pm 17,3$ UA), quando comparados à resposta máxima do grupo CTR (ΔPAM : $24,2 \pm 2$ mmHg, $p < 0,01$) e área sob a curva do mesmo (ASC: $387,2 \pm 58$ UA, $p < 0,001$), como observado nas Figuras 25A-C. Do mesmo modo, os animais do grupo CLP 18 h apresentaram hiporresponsividade cardiovascular à clonidina via i.c.v., tanto no valor de resposta máxima (ΔPAM : $5,1 \pm 1,6$ mmHg) quanto na área sob a curva (ASC: $54,6 \pm 33$ UA), quando comparados à resposta máxima do grupo CTR (ΔPAM : $21,4 \pm 4$ mmHg, $p < 0,01$) e área sob a curva do mesmo (ASC: $184,7 \pm 39,2$ UA, $p < 0,05$), como observado nas Figuras 25D-F. Respostas similares foram observadas nos parâmetros de PAS e PAD (dados não apresentados).

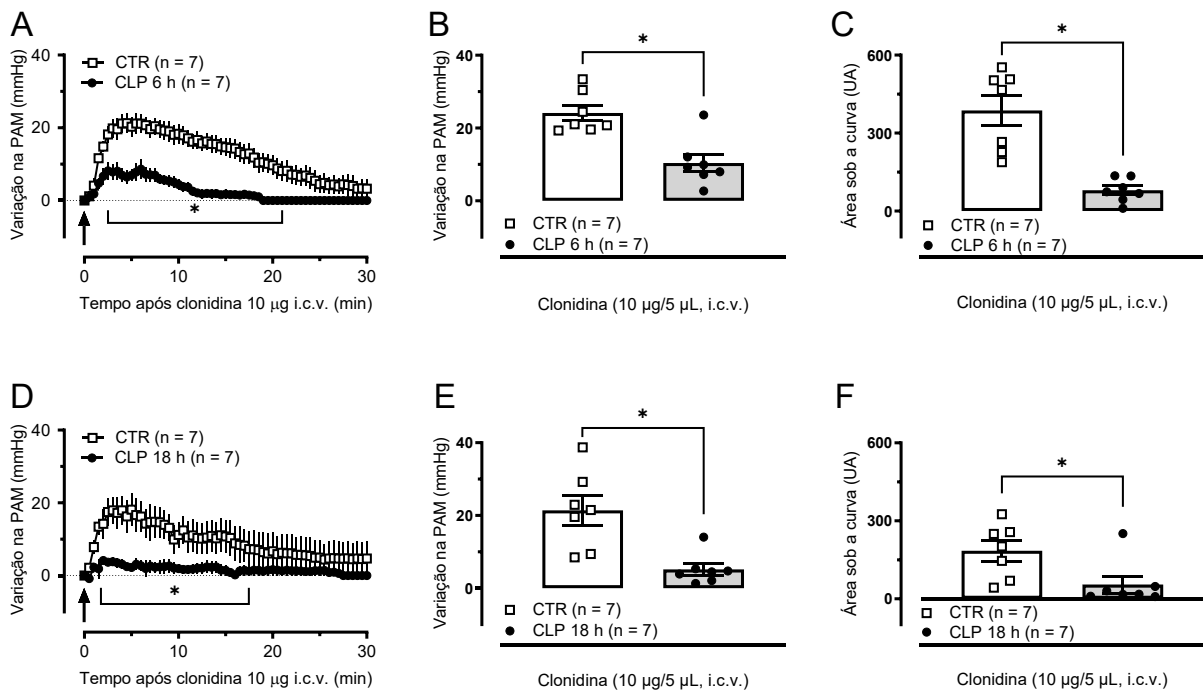


Figura 25. Efeito hipertensor da administração central de clonidina i.c.v. em ratos anestesiados controle e sépticos. Análise temporal (A), variação (B), e área sob a curva do efeito (C) da clonidina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média de ratos controle e submetidos à CLP 6 h. Análise temporal (D), variação (E), e área sob a curva do efeito (F) da clonidina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média de ratos controle e submetidos à CLP 18 h. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A e D), ou teste *t* de Student não pareado (B, C, E e F). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

Já no parâmetro da FC, a administração de clonidina via i.c.v. causou uma diminuição na FC em ambos os grupos, sem alteração na resposta máxima dos grupos CLP 6 e CLP 18 h em relação ao grupo CTR (Figura 26A, B, D e E). Porém, tanto o grupo CLP 6 h quanto o grupo CLP 18 h apresentaram diminuição no tempo de duração da resposta cardíaca à clonidina, como pode ser observado pela área sob a curva apresentadas nas Figuras 26C e F (CLP 6 h: $89,7 \pm 32,6$ UA; ASC CLP 18 h: $109,1 \pm 37,7$ UA), quando comparados à área sob a curva dos respectivos grupos CTR (CTR 6 h: $464,7 \pm 101,5$ UA, $p < 0,05$; CTR 18 h: $416 \pm 56,3$ UA, $p < 0,001$).

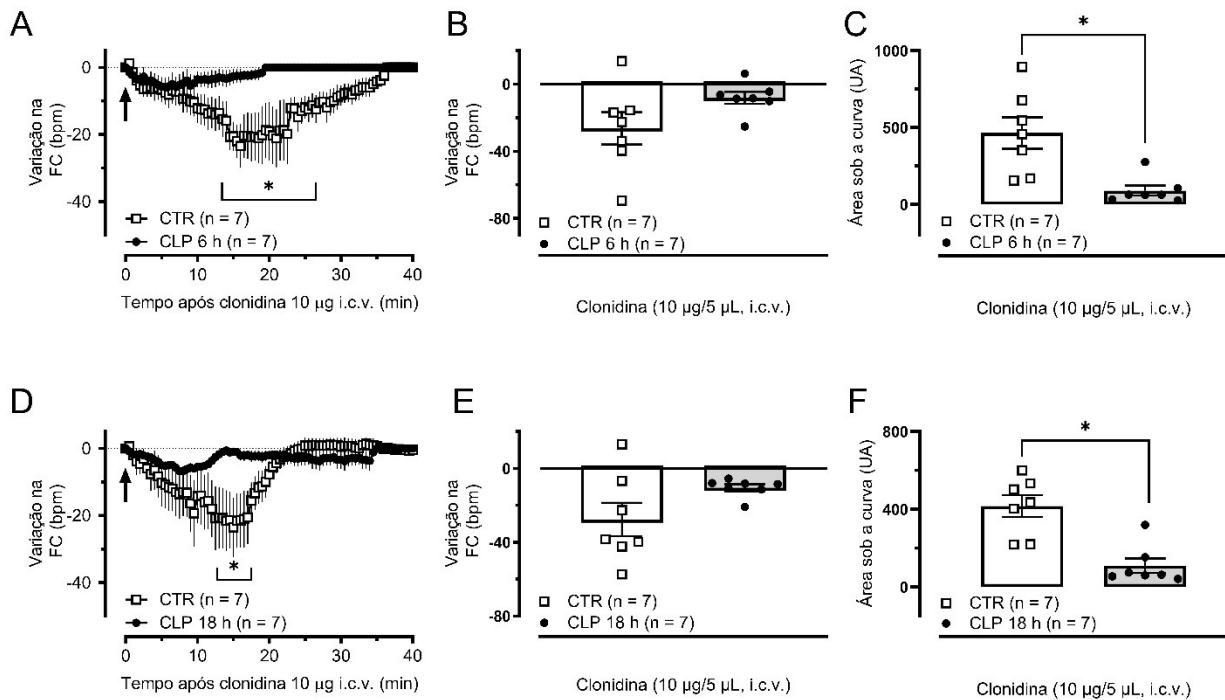


Figura 26. Efeito cardíaco da administração central de clonidina i.c.v. em ratos anestesiados controle e sépticos. Análise temporal (A), variação (B), e área sob a curva do efeito (C) da clonidina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a frequência cardíaca de ratos controle e submetidos à CLP 6 h. Análise temporal (D), variação (E), e área sob a curva do efeito (F) da clonidina administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a frequência cardíaca de ratos controle e submetidos à CLP 18 h. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A e D), ou teste *t* de Student não pareado (B, C, E e F). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

3.4.2 Responsividade à administração central de ioimbina, prazosina e metoprolol sobre a clonidina e dexmedetomidina

Para verificar quais receptores adrenérgicos estão envolvidos nas respostas frente à clonidina e dexmedetomidina administradas no SNC nos grupos CTR e CLP 6 h, foi realizada uma administração i.c.v. dos antagonistas ioimbina (α_2 -adrenérgico), prazosina (α_1 -adrenérgico) e metoprolol (β_1 -adrenérgico). Após 15 minutos, uma nova administração i.c.v. de clonidina ou dexmedetomidina foi realizada. A Figura 27 apresenta os resultados da administração do antagonista ioimbina sobre a PAM e FC em ambos os grupos. A microinjeção de ioimbina induziu uma pequena redução na PAM basal tanto na resposta máxima dos animais CTR (Δ PAM: $-6,95 \pm 3,4$ mmHg, $n = 7$) quanto CLP 6 h (Δ PAM: $-1,3 \pm 2,7$ mmHg, $n = 7$), porém sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Figura 27A). Na FC foi observado um aumento no grupo CTR (Δ FC: $23,4 \pm 12,2$ bpm) e CLP 6 h (Δ FC: $12,8 \pm 4,2$

bpm), sem diferença estatística entre os grupos (Figura 27B). Cabe ressaltar que dois animais do grupo CTR e um do grupo CLP 6 h apresentaram diminuição da FC.

A Figura 28 apresenta os resultados comparativos da responsividade central à clonidina e dexmedetomidina, antes e depois da administração de ioimbina, sobre a PAM e FC em ambos os grupos. Nos animais CTR, a microinjeção de ioimbina reduziu a resposta pressora induzida pela clonidina na Δ PAM de $23,4 \pm 3,4$ para $10 \pm 2,3$ mmHg ($n = 6$, $p < 0,0001$, Figura 28A), assim como nos animais CLP 6 h, no qual a resposta pressora induzida pela clonidina na Δ PAM passou de $12,5 \pm 1,6$ para $5,4 \pm 0,5$ mmHg ($n = 6$, $p < 0,01$; Figura 28A), porém com diferença estatística na área sob a curva somente para o grupo CTR (CTR: $p < 0,05$; CLP 6 h: $p = 0,734$; Figura 28B). A administração de ioimbina aumentou resposta gerada pela clonidina na FC máxima no grupo CTR de $-17 \pm 6,5$ para $18 \pm 12,8$ bpm ($n = 6$, $p < 0,05$, Figura 28C), entretanto, não alterou a resposta da clonidina na FC do grupo CLP 6 h e na área sob a curva em nenhum dos grupos (Figura 28C e D). De maneira similar, a resposta induzida pela dexmedetomidina foi reduzida pela ioimbina no grupo CTR na resposta máxima da Δ PAM (CTR: de $20,8 \pm 3,2$ para $6,7 \pm 1,1$ mmHg, $n = 6$, $p < 0,01$; Figura 28E), porém sem diferença estatística na resposta máxima da Δ PAM para o grupo CLP 6 h ($p = 0,0775$; Figura 28E) e na área sob a curva de ambos os grupos (Figura 28F). Já na FC, a ioimbina não influenciou a resposta gerada pela dexmedetomidina na FC máxima de ambos os grupos (Figura 28G), mas reduziu a área sob a curva somente do grupo CTR ($p < 0,05$; Figura 28H).

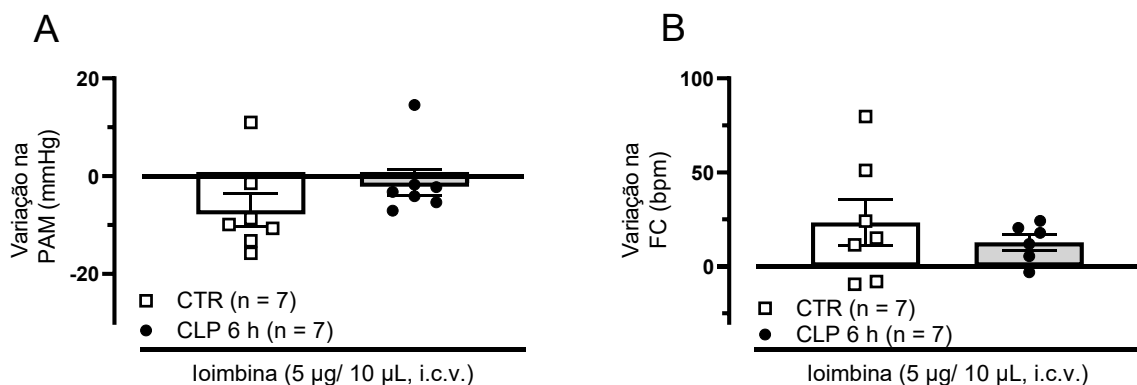


Figura 27. Efeito cardiovascular da administração central de ioimbina sobre os parâmetros basais em ratos anestesiados controle e CLP 6 h. Efeito da administração i.c.v. de ioimbina sobre a pressão arterial (A) e frequência cardíaca (B). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. Teste *t* de Student não pareado.

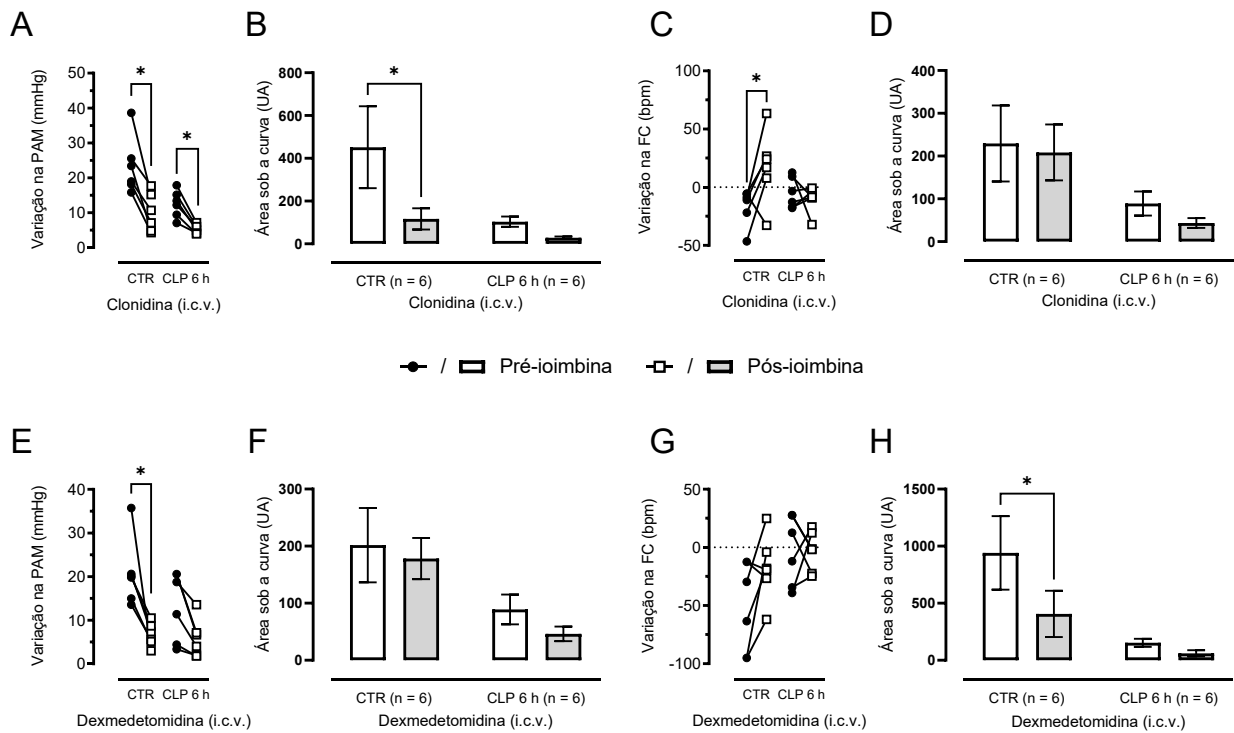


Figura 28. Efeito cardiovascular da administração central de ioimbina sobre a ação da clonidina e dexmedetomidina em ratos saudáveis e submetidos à CLP. Variação e área sob a curva do efeito da clonidina (10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média (A e B, respectivamente) e frequência cardíaca (C e D, respectivamente) antes e depois da administração i.c.v. de ioimbina (5 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$). Variação e área sob a curva do efeito da dexmedetomidina (0,6 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) administrada via i.c.v. sobre a pressão arterial média (E e F, respectivamente) e frequência cardíaca (G e H, respectivamente) antes e depois da administração i.c.v. de ioimbina. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado à resposta pré-prazosina.

A Figura 29 apresenta os resultados comparativos da responsividade central à clonidina antes e depois da administração de prazosina e metoprolol, sobre a PAM e FC em ambos os grupos. Nos animais do grupo CTR, a microinjeção de prazosina reduziu a resposta pressora induzida pela clonidina na ΔPAM de $24,2 \pm 2,1$ para $14,4 \pm 3,7$ mmHg ($n = 7$, $p < 0,05$; Figura 29A) e na área sob a curva (AUC de $387,2 \pm 58$ UA para $157,1 \pm 58,5$ UA, $n = 7$, $p < 0,05$; Figura 29B). Nos animais do grupo CLP 6 h, não houve diferença estatística tanto para resposta máxima em PAM e na área sob a curva (Figura 29B), e a resposta pressora induzida pela clonidina na ΔPAM passou de $10,4 \pm 2,5$ mmHg para $11,2 \pm 2,7$ mmHg ($n = 6$, $p = 0,975$; Figura 29A). A prazosina reduziu a resposta cronotrópica negativa no grupo CTR

(ΔFC de $-26,3 \pm 9,7$ para $-2,1 \pm 10,7$ bpm, $n = 7$, $p < 0,05$; Figura 29C e D), sem alterar esse parâmetro no grupo CLP 6 h ($n = 6$, $p = 0,922$; Figura 29C e D). Similarmente, o metoprolol não reduziu a resposta pressora para clonidina no grupo CTR, porém sem diferença estatística na área sob a curva (Figura 29F). Já no grupo CLP 6 h, o metoprolol não foi capaz de alterar de maneira estatisticamente significativa as respostas para clonidina tanto na PAM quanto na FC (Figura 29E-H). Por exemplo, no grupo CTR o metoprolol reduziu a resposta máxima para clonidina na ΔPAM de $29 \pm 3,7$ para $14,5 \pm 1,9$ mmHg ($n = 6$, $p < 0,05$; Figura 29E) e no grupo CLP 6 h de $9,4 \pm 1,9$ para $4,6 \pm 1,3$ mmHg ($n = 6$, $p = 0,869$; Figura 29E).

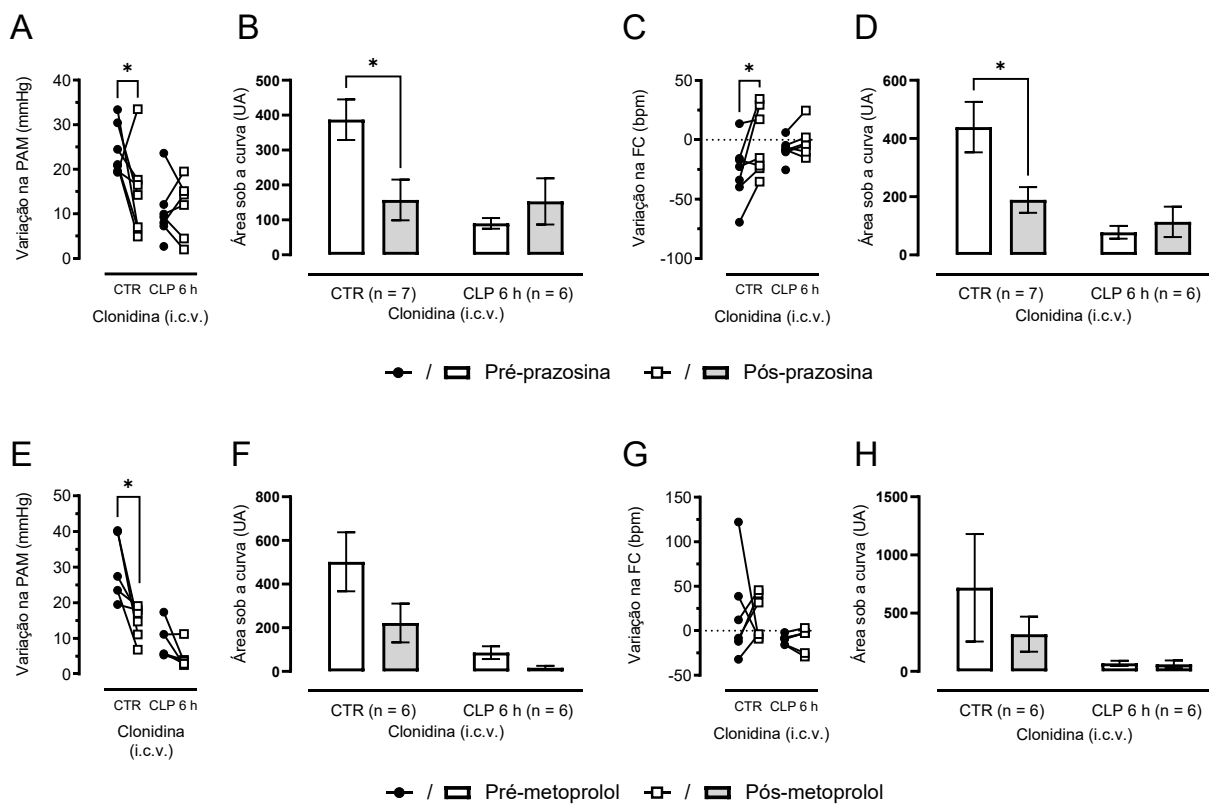


Figura 29. Efeito cardiovascular da administração central de prazosina e metoprolol sobre a ação da clonidina em ratos saudáveis e submetidos à CLP. Variação e área sob a curva do efeito da clonidina ($10 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$) administrada no sistema nervoso central (i.c.v.) sobre a pressão arterial média (A e B, respectivamente) e frequência cardíaca (C e D, respectivamente) antes e depois da administração i.c.v. de prazosina ($5 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$). Variação e área sob a curva do efeito da clonidina administrada via i.c.v. sobre a pressão arterial média (E e F, respectivamente) e frequência cardíaca (G e H, respectivamente) antes e depois da administração i.c.v. de metoprolol ($100 \mu\text{g}/5 \mu\text{L}$). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado à resposta pré-prazosina.

3.5 PARTE V: RESPONSABILIDADE À ADMINISTRAÇÃO CENTRAL DE CLONIDINA EM RATOS SÉPTICOS TRATADOS COM CLONIDINA

Para avaliar se o tratamento periférico com clonidina reverte os parâmetros hematológicos e cardiovasculares observados na sepse após 6 horas de indução, os animais tratados (grupo CLP 6 h + CLO) tiveram o sangue coletado para hemograma e dosagem de NOx e comparados com os dados dos animais dos grupos CLP 6 h e CTR. Os animais tratados com clonidina apresentaram um aumento da produção de NOx, tanto comparado ao grupo CTR quanto ao grupo CLP 6 h, ($193,8 \pm 48,5 \mu\text{M}$; $p < 0,01$, para ambas as comparações (Figura 30). O tratamento não foi capaz de reverter a leucocitopenia e a linfocitopenia observada nos animais sépticos. Houve somente diferença estatisticamente significativa nos níveis de hemoglobina, onde o grupo tratado apresentou redução em relação ao grupo CLP 6 h, se aproximando dos valores encontrado no grupo CTR (Tabela 5).

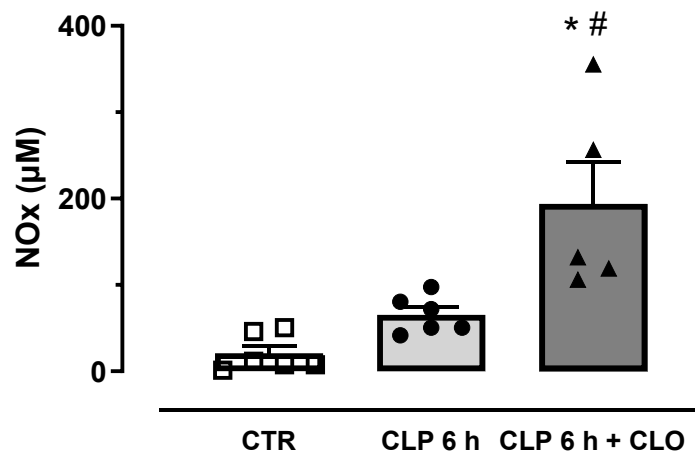


Figura 30. Aumento dos níveis plasmáticos de nitrato e nitrito (NOx) ratos sépticos e tratados com clonidina. A concentração de NOx foi determinada no plasma dos grupos controle (CTR), sépticos (CLP 6 h) e sépticos tratados com clonidina 50 µg/Kg (CLP 6 h + CLO). Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5-6 por grupo). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR e # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 6 h.

Tabela 5. Análise hematológica de animais sépticos e tratados com clonidina.

Hemograma ($10^3/\mu\text{L}$)	CTR	CLP 6 h	CLP 6 h + CLO
Leucócitos	8,38 ± 0,75	3,81 ± 0,18*	2,69 ± 0,76*
Hemoglobina	12,22 ± 0,19	14,72 ± 0,45*	13,26 ± 0,14 [#]
Linfócitos	5,23 ± 0,31	1,53 ± 0,09*	0,95 ± 0,18*
Monócitos	1,23 ± 0,22	0,36 ± 0,02*	0,25 ± 0,12*
Granulócitos	1,88 ± 0,31	1,96 ± 0,18	1,49 ± 0,49

As análises foram realizadas em amostras de sangue dos grupos controle (CTR), e sépticos (CLP 6 h) e sépticos tratados com clonidina 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (CLP 6 h + CLO). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média (n = 5-6 por grupo). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR e [#] indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 6 h.

Quando avaliada a reatividade vascular *in vitro* em aorta isolada, o tratamento com clonidina foi capaz de reverter a hipocontratilidade à fenilefrina observada no grupo CLP 6 h (Figura 31A). O aumento da contratilidade à fenilefrina observado nos anéis sem endotélio dos animais sépticos foi retomado a valores similares ao do grupo CTR nos animais tratados com clonidina, porém a potência se manteve reduzida. O tratamento dos animais sépticos com clonidina não foi capaz de reverter a hipocontratilidade vascular para noradrenalina e angiotensina II (Figuras 31C e D). A Tabela 6 traz os dados referentes ao Emáx e CE_{50} para os vasoconstritores fenilefrina, noradrenalina e angiotensina II nos animais CTR, CLP 6 h e CLP 6 h + CLO. Para fenilefrina em anéis sem endotélio, os anéis do grupo CLP 6 h + CLO apresentaram redução no Emáx quando comparado ao grupo CLP 6 h. Foram observadas alterações tanto no Emáx quanto no CE_{50} para noradrenalina em anéis dos animais do grupo CLP 6 h + CLO quando comparados com o grupo CTR e CLP. Já para angiotensina II, foi observada uma redução no Emáx dos anéis do grupo CLP 6 h + CLO comparado com o grupo CLP 6 h (Tabela 6).

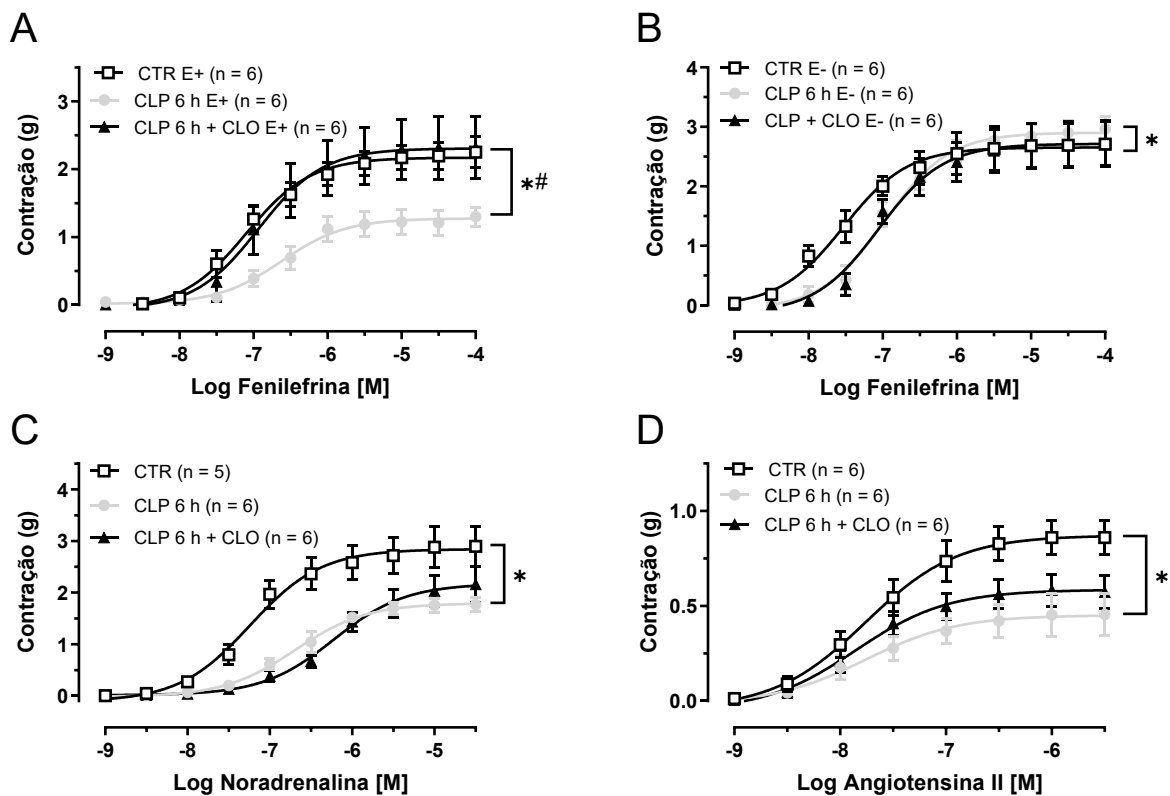


Figura 31. Resposta contrátil a vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos e tratados com clonidina.

A aorta torácica dos grupos controle (CTR), séptico (CLP 6 h) e sépticos tratados com clonidina 50 µg/Kg (CLP 6 h + CLO) foram submetidas a concentrações crescentes cumulativas de **A)** fenilefrina (1 nM – 100 µM) em anéis com endotélio (E+), **B)** fenilefrina (1 nM – 100 µM) em anéis sem endotélio (E-), **C)** noradrenalina (1 nM – 30 µM) e **D)** angiotensina II (1 nM – 3 µM). Resultados expressos como a média ± erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR e # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 6 h + CLO.

Tabela 6. Resposta contrátil máxima ($E_{máx}$) e potência ($-\log CE_{50}$) aos vasoconstritores em aorta isolada de ratos sépticos e tratados com clonidina.

	$E_{máx}$			$-\log CE_{50}$		
	CTR	CLP 6 h	CLP 6 h + CLO	CTR	CLP 6 h	CLP 6 h + CLO
Fenilefrina E+	2,17 ± 0,07	1,28 ± 0,06*	2,3 ± 0,16#	7,09 ± 0,11	6,62 ± 0,16*	6,93 ± 0,22#
Fenilefrina E-	2,65 ± 0,12	2,9 ± 0,08*	2,71 ± 0,13*#	7,53 ± 0,17	6,97 ± 0,09*	7,05 ± 0,15*
Noradrenalina	2,84 ± 0,13	1,79 ± 0,06*	2,17 ± 0,13*#	7,24 ± 0,15	6,69 ± 0,09*	6,22 ± 0,14*#
Angiotensina II	0,87 ± 0,05	0,45 ± 0,04*	0,58 ± 0,04#	7,76 ± 0,16	7,76 ± 0,3	7,85 ± 0,2

Resultados expressos como média ± erro padrão da média (n = 5-6 por grupo). ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 6 h.

Os parâmetros cardiovasculares basais observados através do registro de pressão arterial, na Figura 32, sugerem que o tratamento com clonidina não foi capaz de reverter a hipotensão e a taquicardia dos animais sépticos (PAM de $71 \pm 4,9$ mmHg e FC de $318,2 \pm 10$ bpm). Com relação à responsividade frente a drogas vasoativas, houve diferença estatisticamente significativa na PAS, onde o grupo tratado com clonidina apresentou hiporresponsividade cardiovascular à fenilefrina na concentração de 30 nmol/Kg (Δ PAS: $36,7 \pm 7,1$ mmHg), em relação ao grupo CTR (Δ PAS: $73,3 \pm 7,4$ mmHg, $p < 0.001$), como observado na Figura 33B. Para os demais parâmetros de pressão e FC não foram observadas diferenças estatisticamente significativas. De maneira oposta, o tratamento com clonidina induziu aumento na contratilidade frente à noradrenalina tanto na Δ PAM (30 nmol/Kg: $83,9 \pm 9,2$ mmHg) quanto na Δ FC (3 nmol/Kg: $25,9 \pm 9$ bpm), quando comparado ao grupo CTR (Δ PAM 30 nmol/Kg: $59,2 \pm 5,9$ mmHg, $p > 0,05$; Δ FC 3 nmol/Kg: $-0,9 \pm 4,6$ bpm, $p > 0,05$), como observado na Figura 34.

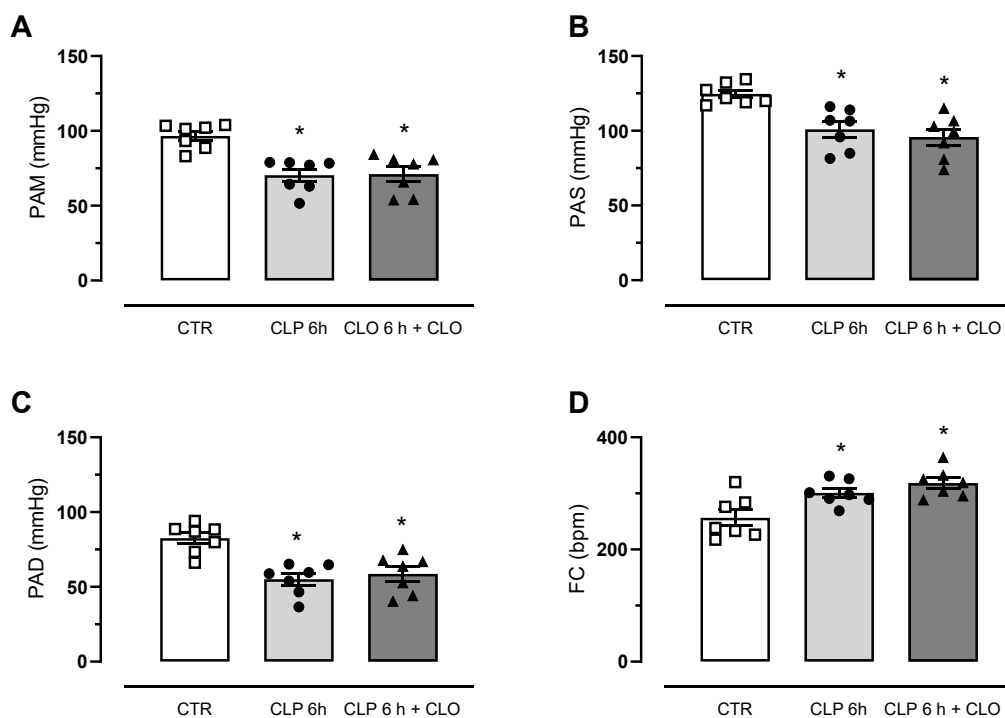


Figura 32. Níveis pressóricos reduzidos e aumento da frequência cardíaca em ratos sépticos e tratados com clonidina. A) Pressão arterial média (PAM) basal em mmHg, B) Pressão arterial sistólica (PAS) basal em mmHg, C) Pressão arterial diastólica (PAD) basal em mmHg e D) Frequência cardíaca (FC) basal em batimentos por minuto (bpm) dos grupos controle (CTR), sépticos (CLP 6 h) e sépticos tratados com clonidina 50 μ g/Kg (CLP 6 h + CLO). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n = 7$ por grupo). A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR.

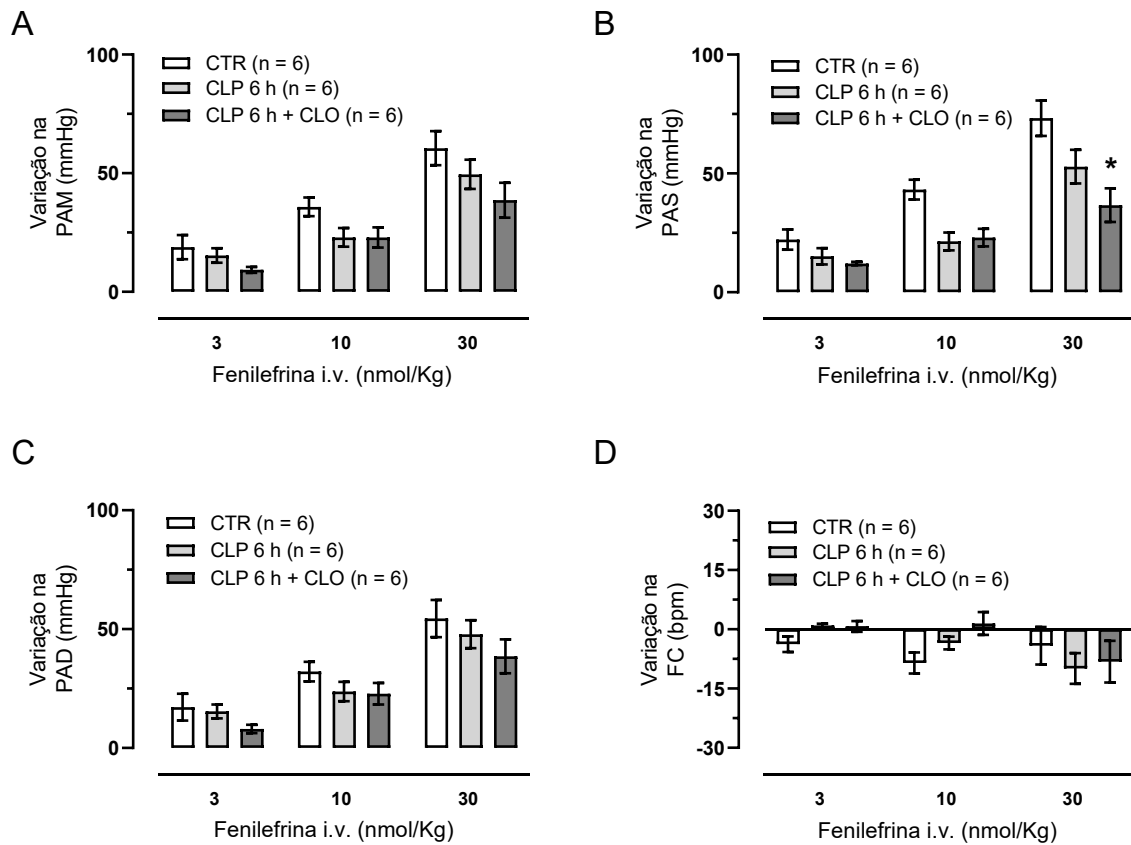


Figura 33. Redução na resposta cardiovascular à administração periférica de fenilefrina em ratos sépticos e tratados com clonidina. Alteração em **A**) Pressão arterial média (PAM) em mmHg, **B**) Pressão arterial sistólica (PAS) em mmHg, **C**) Pressão arterial diastólica (PAD) em mmHg e **D**) Frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) dos grupos controle (CTR), sépticos (CLP 6) e sépticos tratados com clonidina 50 µg/Kg (CLP 6 h + CLO). Fenilefrina foi administrada por via intravenosa (3, 10 e 30 nmol/Kg). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR.

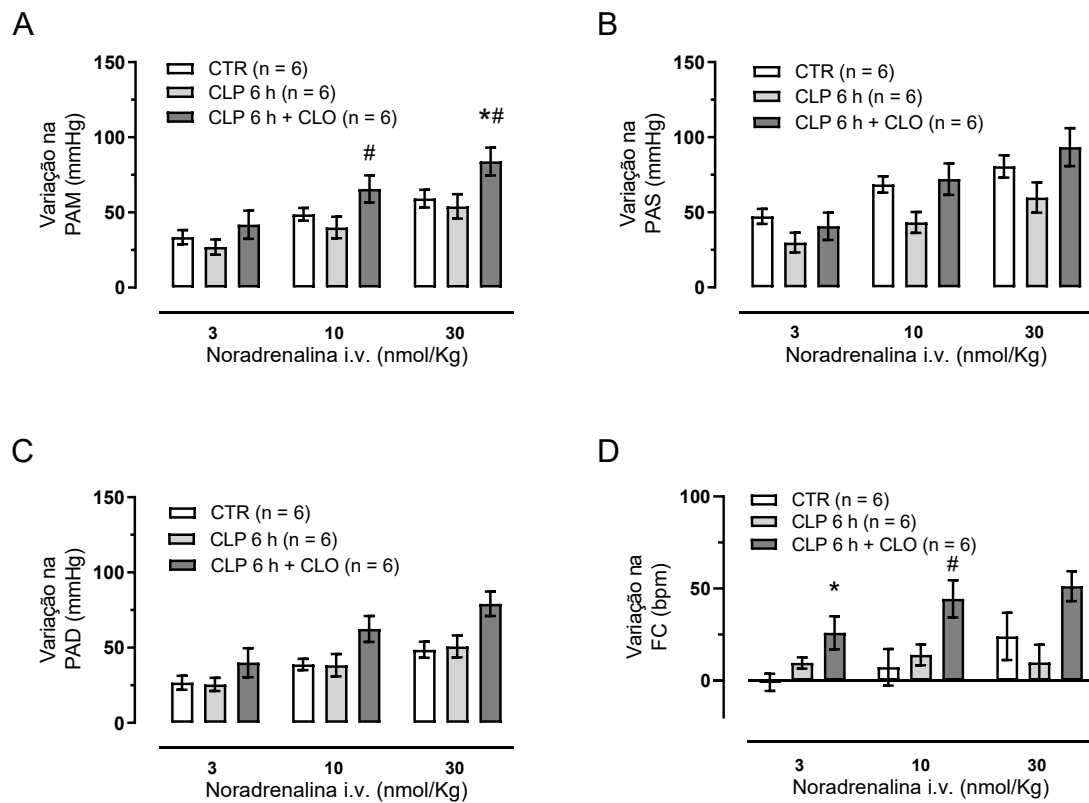


Figura 34. Aumento na resposta cardiovascular à administração periférica de noradrenalina em ratos sépticos e tratados com clonidina. Alteração em **A)** Pressão arterial média (PAM) em mmHg, **B)** Pressão arterial sistólica (PAS) em mmHg, **C)** Pressão arterial diastólica (PAD) em mmHg e **D)** Frequência cardíaca (FC) em batimentos por minuto (bpm) dos grupos controle (CTR), sépticos (CLP 6 h) e sépticos tratados com clonidina 50 µg/Kg (CLP 6 h + CLO). Noradrenalina foi administrada por via intravenosa (3, 10 e 30 nmol/Kg). Resultados expressos como média ± erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi avaliada por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey. *indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CTR; # indica $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP 6 h.

Também foi avaliado se o tratamento com clonidina reverte a hiporresponsividade cardiovascular de origem central, tanto para administração i.c.v. de noradrenalina quanto para clonidina. A Figura 35 apresenta os resultados obtidos para a administração i.c.v. de noradrenalina nos parâmetros cardiovasculares de animais CTR, CLP 6 h e CLP 6 h + CLO. O tratamento com clonidina não foi capaz de reverter a hiporresponsividade cardiovascular para noradrenalina observada nos animais sépticos em nenhum dos parâmetros avaliados. De maneira similar, também não foram observadas alterações na hiporresponsividade para clonidina i.c.v.. Somente no parâmetro da FC foi observado resposta bradicárdica similar ao grupo CTR e diferente do grupo CLP 6 h, quando avaliado a área sob a curva, como observado na Figura 36.

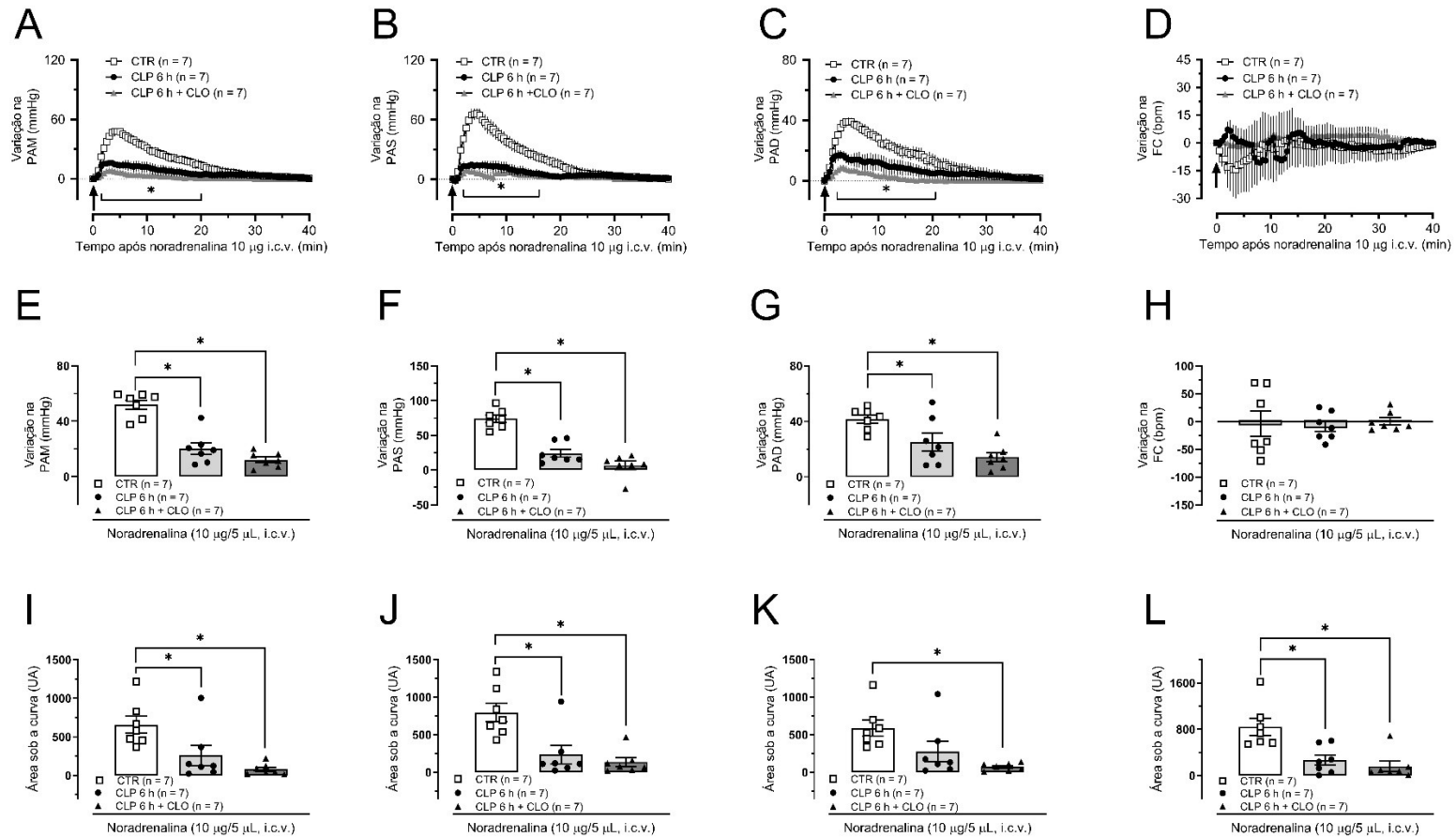


Figura 35. Efeito hipertensor da administração central de noradrenalina em ratos anestesiados dos grupos controle, sépticos e tratados com clonidina. Análise temporal, variação e área sob a curva (respectivamente) do efeito de aumento causado pela administração i.c.v. de noradrenalina sobre a pressão arterial média (PAM) (A, E, I), sistólica (PAS) (B, F, J) e diastólica (PAD) (C, G, K), em mmHg, e frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm) (D, H, L), dos grupos controle (CTR), sépticos (CLP 6 h) e sépticos tratados com clonidina 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (CLP 6 h + CLO). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A-D), ou ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tuckey (E-L). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

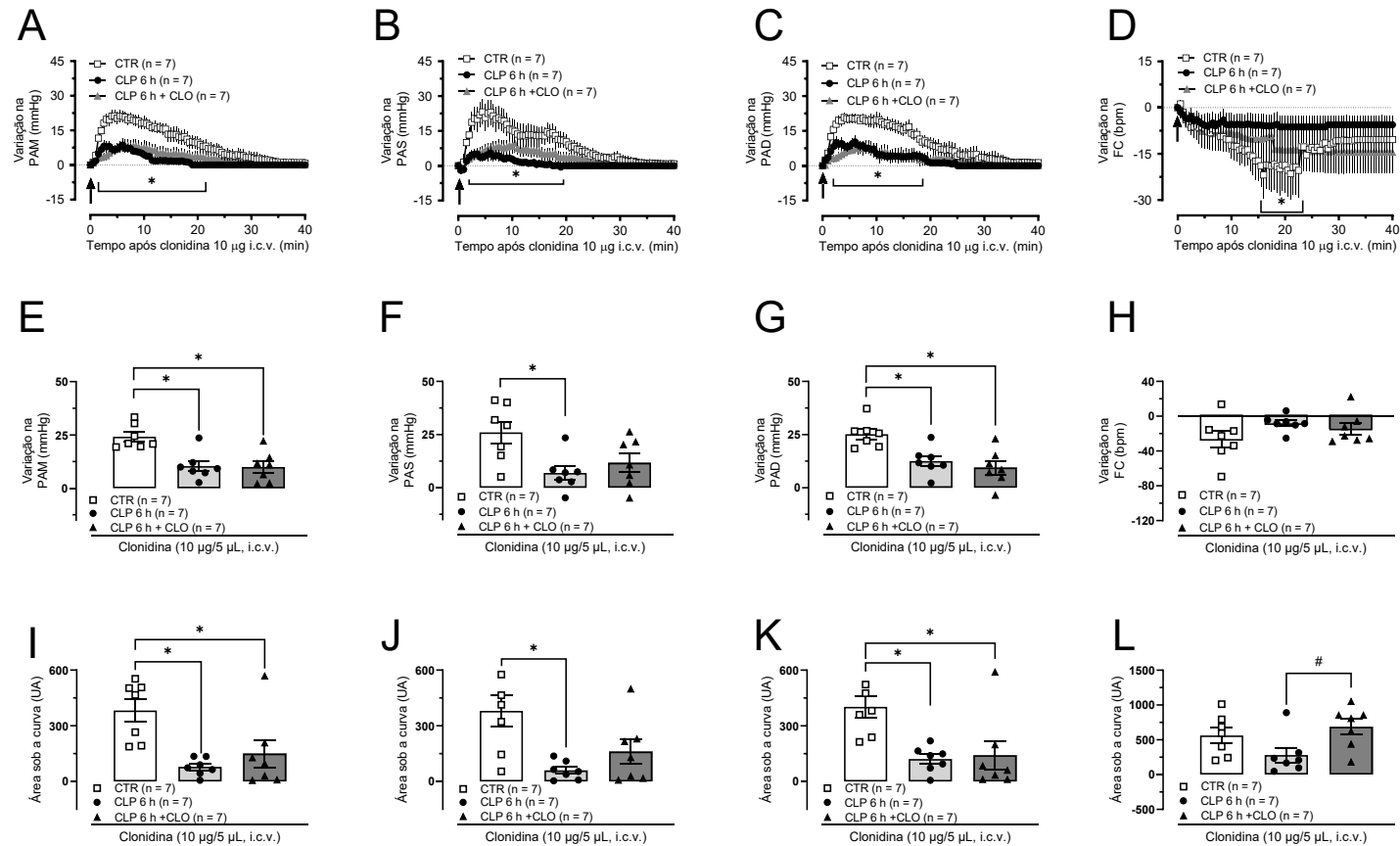


Figura 36. Efeito hipertensor da administração central de clonidina em ratos anestesiados dos grupos controle, sépticos e tratados com clonidina. Análise temporal, variação e área sob a curva (respectivamente) do efeito de aumento causado pela administração i.c.v. de clonidina sobre a pressão arterial média (PAM) (A, E, I), sistólica (PAS) (B, F, J) e diastólica (PAD) (C, G, K), em mmHg, e frequência cardíaca (FC), em batimentos por minuto (bpm) (D, H, L), dos grupos controle (CTR), sépticos (CLP 6 h) e sépticos tratados com clonidina 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (CLP 6 h + CLO). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Šidák (A-D), ou ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tuckey (E-L). * indica $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

4 DISCUSSÃO

No presente estudo descrevemos a existência de hiporresponsividade para drogas adrenérgicas administradas no SNC em ratos submetidos ao modelo de CLP, tanto 6 como 18 horas após a indução da sepse. Nesse modelo, a administração i.c.v. de agonistas $\alpha 1$ -adrenérgicos (noradrenalina e fenilefrina) e $\alpha 2$ -adrenérgicos (clonidina e dexmedetomidina) apresentaram efeito hipertensor reduzido em relação aos animais do grupo CTR, sugerindo a participação de ambos os receptores nessa disfunção. Também observamos redução da resposta bradicárdica frente a drogas adrenérgicas via i.c.v. nos animais dos grupos CLP 6 horas e CLP 18 horas. Ainda, ao avaliar se o tratamento pela via s.c. com clonidina seria capaz de alterar a vasoplegia na sepse, observamos que a reatividade para a fenilefrina *in vitro*, mas não *in vivo*, foi melhorada pelo tratamento com clonidina. O grupo CLP 6 h + CLO também não apresentou diferenças nos parâmetros hematológicos avaliados, comparado ao grupo CLP 6 h, sugerindo que o tratamento com clonidina (na dose administrada) não reverteu as disfunções causadas pela sepse. A Figura 37 traz um resumo dos principais resultados obtidos nesse estudo.

A maior parte dos experimentos de caracterização do modelo foram realizadas tanto em animais SHAM quanto CTR, para que pudéssemos definir o melhor controle experimental. Os experimentos seguiram com o uso do grupo CTR, pois não houve diferenças significativas nos parâmetros avaliados entre CTR e SHAM. Assim, nosso grupo CTR se assemelhou ao que ocorre em humanos, onde parâmetros observados na população saudável – sem nenhum tipo de condição associada a um processo inflamatório – são utilizados para comparação com dados de indivíduos com sepse. Tendo em vista que grande parte de nosso estudo não abordou a eficácia de um tratamento contra a sepse, também optamos por não tratar os animais com antibioticoterapia. Assim, as respostas e resultados obtidos incorporaram todos os danos causados pela sepse. A inclusão de antibióticos como uma variável nesse modelo pode dificultar ainda mais o entendimento dos mecanismos moleculares e celulares envolvidos na resposta séptica, visto que o presente estudo avalia principalmente a influência da exacerbação da resposta inflamatória e das catecolaminas nos parâmetros cardiovasculares e SNC (HALBACH et al., 2017). Além disso, Halbach et al. (2017) demonstraram em seu estudo que a antibioticoterapia por si não melhora a sobrevida em um modelo de CLP agudo em camundongos.

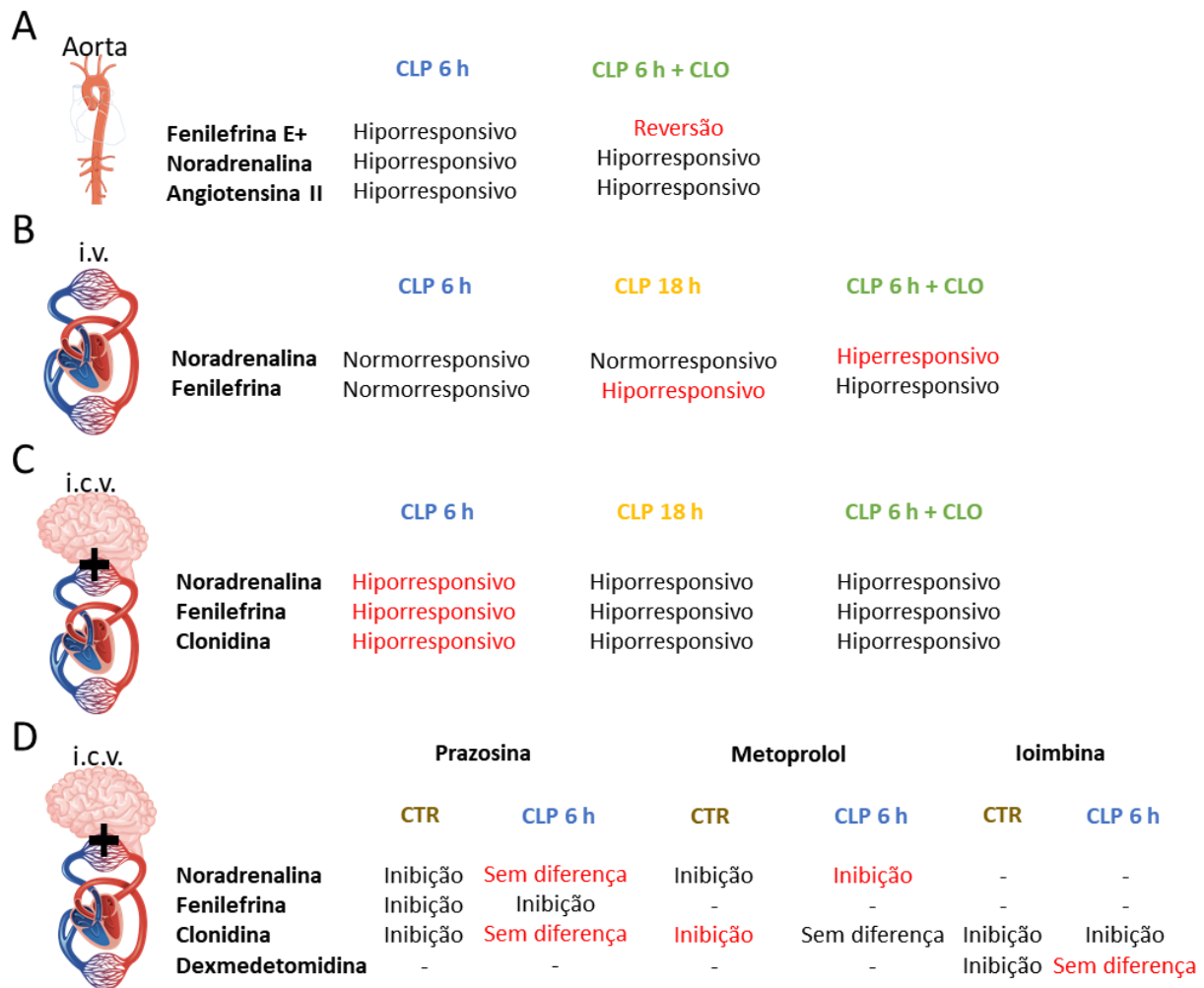


Figura 37. Esquema apresentando os principais resultados encontrados nos parâmetros cardiovasculares.

A) Responsividade para fenilefrina, noradrenalina e angiotensina II em anéis de aorta dos grupos CLP 6 h e CLP 6 h + CLO, em relação ao grupo CTR. **B)** Resposta cardiovascular frente à administração i.v. de noradrenalina e fenilefrina dos grupos CLP 6 h, CLP 18 h e CLP 6h + CLO, em relação ao grupo CTR. **C)** Resposta cardiovascular da administração i.c.v. de noradrenalina, fenilefrina e clonidina dos grupos CLP 6 h, CLP 18 h e CLP 6h + CLO, em relação ao grupo CTR. **D)** Resposta cardiovascular da administração i.c.v. dos antagonistas adrenérgicos sobre a resposta dos agonistas i.c.v. na pressão arterial dos grupos CTR e CLP 6 h, em relação à resposta antes do antagonista. Em vermelho encontram-se os principais achados do estudo.

Os tempos de 6 e 18 horas após a sepse foram escolhidos com base na curva de mortalidade obtida, na qual 30% dos animais submetidos ao protocolo de CLP morreram 24 horas após a cirurgia. Para evitar perda amostral e uso excessivo de animais, os tempos de 6 horas (sepse “inicial”) e 18 horas (sepse “avançada”) foram adotados, pois evidências da literatura e do nosso laboratório demonstram que ambos os tempos já são suficientes para gerar

disfunções hematológicas e cardiovasculares significativas (SANT'HELENA et al., 2015; SOUZA et al., 2015; BERNARDELLI et al., 2016; AWATA et al., 2019). De fato, os parâmetros observados no grupo CLP 6 horas e 18 horas do nosso estudo indicam um estado séptico. Comparados aos dados obtidos no grupo CTR, apesar da ausência de alterações significativas na FC, em ambos os tempos após a CLP os ratos apresentaram redução da pressão arterial. Ainda, nossos resultados corroboram a literatura, onde a hiporresponsividade *in vitro* em anéis de aorta na sepse foi observada para noradrenalina (por exemplo, WURSTER et al., 1994; BERMEJO et al., 2003), fenilefrina (por exemplo, BENEDET et al., 2018; AWATA et al., 2019) e angiotensina II (por exemplo, SOUZA et al., 2015). Além disso, os animais do grupo CLP 18 h apresentaram hiporresponsividade para a fenilefrina administrada pela via i.v., um quadro que sugere o estado de choque séptico, onde a hipotensão é refratária à reposição volêmica e existe a necessidade de uso de vasoconstritores (SINGER et al., 2016). Apesar do grupo CLP 6 h não ter apresentado hiporresponsividade sistêmica à administração i.v. de fenilefrina, esse grupo apresentou hiporresponsividade *in vitro* de maneira endotélio-dependente, sugerindo que mecanismos sistêmicos compensam essa disfunção vascular/endotelial observada no grupo CLP 6 h, e que a partir de 18 horas de sepse esse mecanismo compensatório já não consegue manter a responsividade sistêmica.

Vale ressaltar que a sepse é uma condição que acomete diversos sistemas. Além do sistema cardiovascular, ocorrem alterações importantes, por exemplo, nos sistemas respiratório e renal. A evolução do quadro de sepse leva a uma exacerbação de resposta pró-inflamatória (GYAWALI et al., 2019), aumento do NO (FEIHL et al., 2001), aumento do tônus simpático com liberação de catecolaminas (ELLISON et al., 2007), *downregulation* dos receptores α 1-adrenérgicos (SCHMIDT et al., 2009), e diversas outras alterações que podem ser elencadas como mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela hipotensão e vasoplegia. No presente estudo, os animais sépticos apresentaram aumento da concentração plasmática de NO_x, considerados metabólitos estáveis de NO, liberado em grandes quantidades durante a sepse (MITAKA et al., 2003). Ainda, como esperado, os animais do grupo CLP 18 h apresentaram uma concentração de NO_x maior do que o grupo CLP 6 h, sugerindo o estado mais avançado ou a progressão da sepse ao longo das horas nesse modelo. Outro parâmetro utilizado nesse estudo para a caracterização do modelo de sepse foi o perfil hematológico. Destacamos aqui que ambos os grupos submetidos ao modelo de CLP (6 horas e 18 horas) apresentaram

leucocitopenia, linfocitopenia e monocitopenia, características indicativas de sepse (GUCYETMEZ & ATALAN, 2016).

Apesar da disfunção cardiovascular sistêmica ser um parâmetro bem conhecido da sepse, pouco se sabe sobre o papel do SNC nesse processo. Para explorar esse campo, realizamos uma série de experimentos, nos quais agentes adrenérgicos foram administrados diretamente no sistema ventricular (via i.c.v.) para banhar todas as regiões encefálicas. Esse é um recurso valioso, visto que tanto na clínica quanto em experimentos com modelos animais, quando uma droga é administrada pela via periférica e atravessa a barreira hematoencefálica, esta irá atingir todas as áreas cerebrais, sem especificidade para somente uma região. Ressaltamos que não houve taquifilaxia para a administração de nenhuma das drogas via i.c.v. em nenhum dos grupos avaliados. Ou seja, em experimentos controle, a repetição da mesma dose de noradrenalina ou fenilefrina via i.c.v. foi capaz de gerar o mesmo padrão de efeitos cardiovasculares nos animais. Ao administrar noradrenalina ou fenilefrina via i.c.v. nos animais do grupo CTR, observamos um aumento de pressão arterial, como previamente observado na literatura para ratos acordados (CORRÊA & PERES-POLON, 1995; RICCI & TAIRA, 1996; PELOSI et al., 2006). Esse aumento da pressão arterial foi transitório, porém duradouro, se comparado ao efeito gerado pela administração intravenosa dos agentes adrenérgicos. Após a administração i.c.v. dos mesmos, a pressão arterial retornou a valores basais em cerca de 30 minutos, diferente do que foi observado após administração pela via i.v., na qual a pressão arterial retornou a valores basais em cerca de 5 minutos. Essa diferença no perfil temporal da resposta cardiovascular evocada sugere que o efeito pressórico da administração i.c.v. não se deve (ao menos não majoritariamente) a efeitos periféricos, e sim a uma estimulação central.

Em ratos sépticos dos grupos CLP 6 e 18 horas, observamos que a resposta pressora evocada pela administração i.c.v. dos agentes adrenérgicos encontra-se diminuída, se comparada ao grupo controle. Isso sugere que há um desbalanço adrenérgico também no SNC, o que poderia causar a disfunção cardiovascular observada na sepse. Ainda, embora não observada vasoplegia sistêmica no grupo CLP 6 h, observou-se redução na responsividade tanto para a noradrenalina como para a fenilefrina, sugerindo que, somado com a disfunção endotelial observada *in vitro* nesse mesmo período, a disfunção cardiovascular possa decorrer de alterações na capacidade do SNC modular a função de vasos ou do coração. Como apresentado em nossos resultados, tanto em animais controle (não-sépticos) como sépticos, o efeito pressórico induzido pela administração i.c.v. de noradrenalina e fenilefrina é acompanhado por

uma redução significativa e sustentada da FC. Esse efeito parece paradoxal, tendo em vista que o coração também possui inervação simpática que medeia aumento do cronotropismo, mas comprova que as ações da noradrenalina administrada diretamente no SNC não decorrem de efeitos periféricos. Não observamos diferença significativa para a bradicardia induzida por noradrenalina i.c.v. nos animais do grupo CLP 6 h, porém no grupo CLP 18 h ocorre redução dessa bradicardia, demonstrando que com o passar das horas, a capacidade do SNC em modular a função cardíaca também é alterada no quadro de sepse. Por outro lado, a fenilefrina gerou uma resposta bradicárdica tanto pela administração periférica quanto central, porém somente pela administração via i.c.v. foi possível observar redução dessa resposta no grupo CLP 6 h, sugerindo novamente uma disfunção na modulação cardiovascular de origem central. Como de uma forma geral os parâmetros pressóricos se mantiveram semelhantes entre os grupos CLP 6 h e 18 h, a abordagem experimental escolhida para a condução deste estudo envolveu apenas o grupo CLP 6 h.

Para verificar quais receptores adrenérgicos foram responsáveis pelos efeitos gerados na pressão arterial dos animais após as administrações i.c.v. de noradrenalina e fenilefrina, foram utilizados os antagonistas prazosina e metoprolol. A prazosina é um antagonista de receptores α_1 -adrenérgicos, enquanto o metoprolol antagoniza receptores β_1 -adrenérgicos, ambos com capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica (PUPO & MINNEMAN, 2001; SIGAROUDI et al., 2018). A prazosina i.c.v., por si só, induziu queda na pressão arterial dos grupos CTR e CLP 6 h, com um pequeno aumento na FC do grupo CTR e queda na FC do grupo CLP 6 h. Nenhum desses efeitos alcançou diferença estatística, e os valores retornaram aos basais dentro de 15 minutos. Um achado interessante foi que a administração i.c.v. de metoprolol induziu queda da pressão arterial basal no grupo CTR e aumento no grupo CLP 6 h, efeitos opostos que retornaram a valores basais dentro de 15 minutos. Além disso, o metoprolol induziu uma bradicardia mais intensa no grupo CLP 6 h em relação ao grupo CTR (Figura 18). Estudos anteriores mostraram que a administração de pindolol, nebivolol e metoprolol (todos antagonistas β -adrenérgicos) via i.c.v. em ratos saudáveis leva a uma queda na pressão arterial e na FC, sem alterar o barorreflexo (COHEN et al., 1979; MIDOL-MONNET et al., 1991). Também foi demonstrado que o metoprolol induz hiperpolarização dos neurônios da RVLM *in vitro* (avaliado através do método de *pach-clamp*) (OSHIMA et al., 2014). Ainda, a administração central de metoprolol inibiu a resposta hipertensora induzida por estímulo elétrico local no hipotálamo de gatos anestesiados

(PHILIPPU & KITTEL, 1977). Complementando esse achado, em ratos espontaneamente hipertensos foi observado que o tratamento sistêmico crônico com metoprolol aumenta a atividade de neurônios GABAérgicos no hipotálamo (REMISZEWSKA et al., 1993). Em conjunto, esses dados da literatura podem explicar a queda da pressão arterial associada aos antagonistas β -adrenérgicos em animais saudáveis, além de evidenciarem que esse efeito pode ser obtido através do bloqueio de receptores em diferentes regiões do SNC. Na literatura foi observado que pacientes sépticos apresentam 40% de redução na densidade de receptores β_1 -adrenérgicos em células mononucleares sanguíneas (BERNARDIN et al., 1998), redução também observada em tecido cardíaco de ratos e camundongos (TANG et al., 1998; THANGAMALAI et al., 2014). Visto que os receptores β_1 , juntamente com os receptores α_1 , participam do tônus simpático na RVLM (OSHIMA et al., 2014), sugerimos que a diferença induzida pelo metoprolol tanto na pressão arterial como na FC dos animais sépticos é um forte indício de alteração de sistemas dependentes de vias noradrenérgicas no SNC durante a sepse.

A prazosina foi capaz de reduzir os efeitos pressóricos da noradrenalina e cardiovasculares centrais da fenilefrina nos animais CTR, como esperado. Entretanto, os animais de ambos os grupos (CTR e CLP 6 h) apresentaram respostas variadas na FC (aumento e/ou queda) para noradrenalina, e a prazosina não foi capaz de alterar essa resposta. Talvez essa dispersão na FC ocorra devido ao fato de que a noradrenalina atue tanto em receptores α_1 quanto em β_1 -adrenérgicos (dentre outros subtipos de receptores adrenérgicos), e também por isso a prazosina não tenha sido capaz de inibir essas respostas. Embora tenhamos observado redução da resposta pressora induzida por fenilefrina i.c.v. nos animais sépticos tratados com prazosina, não foi possível observar diferença estatística na resposta pressora induzida por noradrenalina i.c.v. nesses animais, quando comparamos antes e após prazosina, apesar de visualmente observarmos redução para essa resposta após prazosina. Ao olhar mais detalhadamente para a resposta gerada pela noradrenalina, podemos notar que, no grupo CTR, somente um de sete animais não teve o aumento da pressão reduzido pela prazosina, e que no grupo CLP 6 h somente um de sete animais apresentou uma resposta pressora similar ao grupo CTR. Notavelmente, esse animal com resposta pressora maior para noradrenalina no grupo CLP 6 h apresentou redução frente à prazosina. Sendo assim, sugerimos que devido à resposta pressora para noradrenalina no grupo CLP 6 h já estar reduzida, a prazosina não foi capaz de reduzir significativamente esse pequeno aumento da pressão. Ainda, a fenilefrina, um agonista seletivo para receptores α_1 -adrenérgicos, quando administrada pela via i.c.v., gerou uma resposta

bradicárdica em ambos os grupos, e diferente do efeito observado sobre a noradrenalina, a prazosina foi capaz de reduzir essa resposta bradicárdica nos grupos CTR e CLP 6 h. Vale ressaltar que a prazosina não foi capaz de bloquear toda a resposta induzida pela noradrenalina e fenilefrina nos grupos CTR e CLP 6 h, sugerindo que essas drogas possam estar atuando a partir de outro(s) receptor(es). É importante destacar ainda que a ineficácia da prazosina em bloquear totalmente as respostas para a noradrenalina não parece ser devido a uma dose subefetiva de prazosina. Um estudo prévio onde foi realizada a curva dose-resposta para inibição de noradrenalina por prazosina, ambas administradas pela via i.c.v., já havia demonstrado uma taxa de inibição máxima de 80% da resposta pressora de noradrenalina, com doses menores do que a utilizada no presente estudo (CORRÊA & PERES-POLON, 1995).

Sabe-se que a noradrenalina é capaz de se ligar em todos os receptores adrenérgicos (α e β) (revisado por PUPO & MINNEMAN, 2001). Tendo em vista essa possibilidade, o metoprolol foi administrado via i.c.v. antes de uma microinjeção de noradrenalina, em ambos os grupos CTR e CLP 6 h. O metoprolol foi capaz de reduzir significativamente a resposta pressora para noradrenalina no grupo CTR e CLP 6 h, diferente do que foi observado com prazosina. Entretanto, o metoprolol não causou alterações significativas na FC do grupo CTR, e no grupo CLP 6 h foi observada uma redução na área sob a curva, sugerindo que neste grupo a resposta bradicárdica para noradrenalina após metoprolol teve sua duração reduzida. Além dos efeitos basais do metoprolol e do papel dos receptores β_1 centrais discutidos anteriormente, o conjunto de resultados obtidos com prazosina e metoprolol sugere que receptores α_1 -adrenérgicos e β_1 -adrenérgicos no SNC participam da resposta pressora induzida por noradrenalina em situação fisiológica. Ainda, Corrêa et al. (1985) demonstrou em ratos acordados que a resposta pressora induzida por noradrenalina i.c.v. não é inibida por bloqueio ganglionar, mas sim por administração i.v. prévia de um antagonista de vasopressina, sugerindo que parte dessa resposta seja mediada pela liberação de vasopressina. A pequena redução na bradicardia observada no grupo CLP 6 h sugere ainda uma maior participação de receptores β_1 nos centros de modulação vagal cardíaca, como o núcleo ambíguo (BATEMAN et al., 2012), durante a sepse. Sabe-se que existe uma *downregulation* de receptores α_1 -adrenérgicos em camundongos sépticos (SCHMIDT et al., 2009) e de β_1 -adrenérgicos durante a sepse em humanos, ratos e camundongos (BERNARDIN et al., 1998; TANG et al., 1998; THANGAMALA et al., 2014). Entretanto, a menor inibição gerada pela prazosina, porém com inibição pelo metoprolol sobre a resposta pressora induzida por noradrenalina i.c.v. no grupo

CLP 6 h, pode ser devido a uma redução no número ou na dessensibilização de $\alpha 1$ -adrenérgicos no SNC. Nesse contexto, é plausível especular que os receptores $\beta 1$ -adrenérgicos do SNC estejam atuando como mecanismo compensatório, mantendo a resposta pressora nesses animais sépticos frente à prazosina. Essa hipótese, assim como outros mecanismos de regulação da pressão arterial que podem compensar a perda de modulação direta por noradrenalina (por exemplo, liberação de vasopressina), precisam ser investigadas durante a sepse.

Dados da literatura acerca do efeito da microinjeção i.c.v. de noradrenalina são contraditórios. Alguns trabalhos observaram resposta hipotensora (DE JONG et al., 1975; CORRÊA et al., 1982) e outros, hipertensora (CORRÊA et al., 1982; CORRÊA et al., 1985; PELOSI et al., 2006). Entretanto, todos os estudos em animais acordados observaram resposta pressora para noradrenalina i.c.v. Não foram encontrados dados da literatura utilizando animais anestesiados com cetamina/xilazina, inviabilizando uma comparação direta com os presentes resultados. Buccafusco & Brezenoff (1977) avaliaram o efeito de diferentes doses de noradrenalina administradas via i.c.v. em animais acordados e anestesiados somente com cetamina, e em ambos os grupos observaram respostas bimodais, sendo hipotensora com doses abaixo de 2 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$ e hipertensoras acima de 12 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$. A dose de noradrenalina i.c.v. utilizada no presente estudo foi de 10 $\mu\text{g}/5 \mu\text{L}$, e a magnitude da resposta observada foi similar à resposta obtida por Buccafusco & Brezenoff (1977) com a dose de 12 $\mu\text{g}/10 \mu\text{L}$. A partir desse estudo, podemos sugerir que os nossos resultados se assemelham com os resultados observados em animais acordados, indicando que a anestesia com cetamina/xilazina não induz grandes interferências nas respostas cardiovasculares moduladas pelo SNC, quando comparado ao que é observado em estudos com animais acordados.

A clonidina é um agonista de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos, classicamente considerada como um fármaco simpatorlítico. Sua ação se dá principalmente por receptores pré-sinápticos do SNC, reduzindo a liberação de noradrenalina e, por consequência, a pressão arterial e FC (AICHER & DRAKE, 1999). Ao avaliar a resposta cardiovascular para a clonidina administrada via i.c.v., observamos um aumento da pressão arterial nos animais saudáveis, indo contra o seu efeito clássico de hipotensão atribuído à ativação de receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos pré-sinápticos (DABIRÉ & RICHER, 1991; DOBRUCKI et al., 2001; IMAI et al., 1989; WANG et al., 2007). Entretanto, ao analisar esses trabalhos, observamos que todos utilizaram animais saudáveis anestesiados com pentobarbital sódico ou uretana, e que em animais acordados a administração de clonidina via i.c.v. aumentou a pressão arterial (COLOMBARI

et al., 1992; KAWASAKI & TAKASAKI, 1986; NAKAMURA et al., 1993). Em nosso estudo os animais foram anestesiados com cetamina/xilazina, e não existem dados na literatura mostrando o efeito central da clonidina com o uso desse protocolo anestésico. Portanto, para testar a hipótese de que os animais anestesiados com cetamina/xilazina possuem resposta cardiovascular para noradrenalina e clonidina similar à resposta observada em animais acordados, foi realizado um estudo paralelo com animais anestesiados com pentobarbital. Assim, a administração da noradrenalina e clonidina i.c.v. e a análise de seus efeitos pôde ser realizada sob as mesmas condições experimentais.

A administração i.c.v. de noradrenalina, a qual foi utilizada desde os primeiros experimentos realizados nesse trabalho, gerou resposta pressora em ambos os grupos de ratos saudáveis com os dois protocolos anestésicos, sem alterações significativas na FC. Porém, o grupo anestesiado com cetamina/xilazina apresentou maior magnitude de aumento da PAS e, por consequência, na PAM. O pentobarbital é um barbitúrico que se liga aos receptores do tipo GABA_A e potencializa a atividade do neurotransmissor GABA, induzindo depressão generalizada do SNC (MUROI et al., 2009). Portanto, a resposta de menor magnitude observada para a noradrenalina i.c.v. nos animais anestesiados com pentobarbital pode ocorrer devido à uma inibição de áreas que participam do controle cardiovascular no SNC.

Como descrito na literatura, os animais anestesiados com pentobarbital em nossos experimentos também apresentaram hipotensão associada com bradicardia intensa em resposta à administração i.c.v. de clonidina. Ambos os efeitos foram reprodutíveis após duas administrações sequenciais de clonidina, mostrando que não ocorre taquifilaxia para essas respostas. Muitos anestésicos afetam parâmetros cardiovasculares de animais de experimentação, sendo necessária cautela ao considerar o uso de anestésicos em pesquisa cardiovascular, especialmente pela modulação do SNC (SAHA et al., 2007; SUMITRA et al., 2004). Além do pentobarbital aumentar a afinidade do neurotransmissor GABAérgico ao receptor GABA_A (MUROI et al. 2009), ele diminui a via parassimpática cardioinibitória (IRNATEN et al., 2002) e pode afetar as respostas centrais da clonidina. Já a cetamina/xilazina é uma combinação de escolha anestésica comum em experimentação animal por possuir efeitos mínimos nos sistemas cardiovascular e respiratório, e provavelmente não possuir interação com a via GABAérgica inibitória (IDVALL et al., 1979).

A resposta hipertensora observada nos animais anestesiados com cetamina/xilazina é similar à resposta observada por Kawasaki et al. (1986) em ratos normotensos acordados. Uma

hipótese para a resposta hipertensora em nossos animais é baseada na regulação do sistema nervoso simpático por centros modulatórios cardiovasculares. Esse centro está localizado na região bulbar e suprabulbar do cérebro, como o hipotálamo. Ensaio de afinidade com radioligantes demonstraram sítios de ligação para clonidina na RVLM de ratos, o que sugere que a resposta pressora frente à clonidina pode estar relacionada com a RVLM (ERNSBERGER et al., 1990). De fato, o bloqueio de receptores α -adrenérgicos e imidazolínicos nessa região inibe o efeito hipotensor da clonidina administrada por via sistêmica (revisado por SUN, 1996). A clonidina administrada diretamente na RVLM de ratos anestesiados (MCAULEY et al., 1989; MERMET & QUINTIN, 1991; WANG et al., 2007) e acordados (YAMAZATO et al., 2001) estimula efeitos hipotensores e simpatoinibitórios. Entretanto, os efeitos da clonidina na RVLM de ratos anestesiados com cetamina/xilazina ainda é desconhecido.

Trolin (1975) descreveu que a administração via i.v. de clonidina em ratos acordados aumenta a pressão arterial. Entretanto, ratos descerebrados e anestesiados com pentobarbital apresentaram queda na pressão arterial com administração i.v. de clonidina, levando o autor a sugerir que estruturas supramedulares medeiam as respostas hipertensoras, e que o pentobarbital atenua o mecanismo excitatório supramedular (TROLIN, 1975). A microinjeção de clonidina no hipotálamo induz respostas hipertensoras em ratos acordados (COLOMBARI et al., 1992; EBIHARA et al., 1993; HANAFUSA et al., 2012), o que tem gerado diversas interpretações e hipóteses acerca do funcionamento e modulação dessa região pela clonidina. Por exemplo, Colombari et al. (1992) propuseram que o terceiro ventrículo anteroventral e o hipotálamo lateral estão envolvidos em vias excitatórias responsáveis pelas respostas pressoras da clonidina central. Por outro lado, Ebihara et al. (1993) e Hanafusa et al. (2012) descreveram que o núcleo paraventricular do hipotálamo está envolvido na resposta hipertensora da clonidina central. Ainda, Hanafusa et al. (2012) sugeriram que a clonidina atua em receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos no núcleo paraventricular do hipotálamo, reduzindo a liberação do neurotransmissor GABA. Consequentemente, a atividade excitatória do núcleo paraventricular do hipotálamo é aumentada, induzindo a resposta hipertensora observada em ratos acordados. Já o pentobarbital, por se ligar em receptores GABA_A, aumenta a afinidade do neurotransmissor GABAérgico a esse receptor e estimula a via inibitória (MUROI et al., 2009). O estudo de Boudier et al. (1974) corrobora esta via GABAérgica proposta, e descreve a resposta hipotensiva para clonidina injetada na região hipotalâmica preóptica anterior em ratos anestesiados com pentobarbital.

O efeito bradicárdico mais pronunciado observado nos ratos anestesiados com pentobarbital também sugere que a via simpática excitatória para a resposta cardíaca está suprimida, e que a resposta vagal parassimpática de regiões como o núcleo do trato solitário e núcleo ambíguo são predominantes. Corroborando essa hipótese, a neurotransmissão GABAérgica para os neurônios vagais cardíacos é igualmente reduzida pela clonidina (PHILBIN et al., 2010) e pela dexmedetomidina (SHARP et al., 2014), sugerindo que receptores α_2 -adrenérgicos pré-sinápticos de neurônios GABAérgicos do núcleo do trato solitário e do núcleo ambíguo são responsáveis por essa atividade. Assim, baseado nos dados da literatura citados, parece razoável sugerir que o efeito excitatório da clonidina no hipotálamo supera o efeito inibitório gerado na RVLM, quando administrada via i.c.v. tanto em ratos acordados quanto em ratos anestesiados com cetamina/xilazina. Nesse contexto, o pentobarbital estaria inibindo os efeitos hipertensivos ao suprimir sítios excitatórios como os presentes no hipotálamo, mecanismo este não compartilhado pela cetamina/xilazina. Entretanto, não encontramos informações sobre os efeitos cardiovasculares da clonidina na RVLM ou no hipotálamo de ratos anestesiados com cetamina/xilazina, e futuros estudos devem confirmar essa hipótese.

A clonidina, apesar de seletiva para receptores α_2 -adrenérgicos, também se liga a receptores α_1 -adrenérgicos com uma taxa de ligação α_2/α_1 de 220:1 (VIRTANEN et al., 1988). Além disso, a clonidina também pode se ligar a receptores do tipo I_1 -imidazolínicos, com uma taxa de ligação α_2/I_1 de 16:1 (ERNSBERGER et al., 1987). Os receptores imidazolínicos estão presentes na RVLM e também induzem respostas inibitórias sobre o sistema simpático (ERNSBERGER et al., 1987; PILETZ et al., 2000). Por isso, também investigamos se os efeitos cardiovasculares da clonidina nos ratos anestesiados com cetamina/xilazina estariam de fato sendo induzidos por receptores α_2 -adrenérgicos. A dexmedetomidina é mais seletiva do que a clonidina para receptores α_2 (taxa de ligação α_2/α_1 de 1620:1) e possui pouca interação com receptores imidazolínicos (VIRTANEN et al., 1988; KHAN et al., 1999). Assim como a clonidina, a dexmedetomidina também induziu resposta pressora com bradicardia nos animais anestesiados com cetamina/xilazina. Quando a ioimbina foi administrada via i.c.v. antes da segunda administração de clonidina ou dexmedetomidina, tanto o efeito bradicárdico quanto o efeito pressor foram atenuados, sugerindo a participação dos receptores do tipo α_2 -adrenérgicos nessa via excitatória. A supressão da bradicardia pela ioimbina corrobora dados da literatura para clonidina (PHILBIN et al., 2010) e dexmedetomidina (SHARP et al., 2014). Entretanto,

não podemos descartar a participação de receptores α 1-adrenérgicos ou I₁-imidazolínicos, ou mesmo de outros receptores, nas respostas cardiovasculares geradas por esses agentes, já que a ioimbina não foi capaz de abolir o efeito hipertensor da clonidina e dexmedetomidina (Figura 23), mesmo quando doses maiores de ioimbina foram administradas (resultados não mostrados).

Vale ressaltar que a xilazina é um agonista do receptor α 2-adrenérgico e possui efeitos analgésicos, sedativos e relaxantes musculares (GRANT & UPTON, 2001). Sua associação com cetamina parece não interagir com a via GABAérgica como o pentobarbital, mas a interação da xilazina com a via simpática é uma limitação do presente estudo. Entretanto, apesar dos efeitos adrenérgicos da clonidina, as respostas que encontramos são similares aos efeitos da clonidina em ratos acordados, sugerindo pouca interferência da anestesia com cetamina e xilazina nas respostas cardiovasculares para a clonidina. Essa ausência de interferência sobre o efeito cardiovascular gerado pela clonidina – quando comparado ao efeito descrito em animais acordados – pode ser visto como uma vantagem da adoção do protocolo anestésico com xilazina e cetamina para o estudo dos efeitos cardiovasculares da clonidina em animais sépticos.

Assim como nos animais saudáveis, a clonidina, ao ser administrada via i.c.v. nos animais sépticos após 6 horas e 18 horas da cirurgia de CLP, induziu resposta pressora e bradicárdica. Entretanto, semelhante ao observado para a administração i.c.v. de fenilefrina e noradrenalina, os animais sépticos apresentaram resposta pressora e bradicárdica reduzida para clonidina administrada no SNC. Esse resultado sugere que a resposta cardiovascular mediada pela ativação de receptores α 2-adrenérgicos no SNC de ratos também está prejudicada na sepse. Ainda, os animais do grupo CLP 18 h apresentaram uma hiporresponsividade para a clonidina mais intensa do que o grupo CLP 6 h, revelando que esses receptores ou as vias de transdução a ele acopladas também são comprometidos de forma progressiva.

Para verificar quais receptores adrenérgicos foram responsáveis pelas respostas pressoras geradas pela administração i.c.v. de clonidina e dexmedetomidina, foram utilizados os antagonistas prazosina, metoprolol e ioimbina em animais sépticos do grupo CLP 6 h. A administração i.c.v. de ioimbina levou a uma queda na pressão arterial e aumento na FC dos animais CTR e CLP 6 h, sem diferenças estatísticas e retornando a valores basais dentro de 15 minutos. Assim como observado anteriormente para ratos saudáveis, a ioimbina i.c.v. também inibiu a resposta pressora induzida por clonidina i.c.v. nos animais sépticos, sem alterações significativas na FC. Apesar da resposta cardiovascular induzida por dexmedetomidina i.c.v.

nos animais sépticos com a ioimbina estar visivelmente reduzida (Figura 27E), não foi observada redução estatisticamente significativa ($p = 0,0775$), talvez pela variabilidade de resposta entre os animais. Já a prazosina i.c.v. foi capaz de reduzir a resposta pressora e bradicárdica para clonidina i.c.v. em 5 dos 6 animais do grupo CTR, mas não inibiu significativamente as respostas cardiovasculares à clonidina no grupo CLP 6 h, sugerindo que nesses animais as respostas pressóricas à clonidina injetada via i.c.v. podem não ser dependentes do receptor $\alpha 1$ -adrenérgico. Como citado anteriormente, a ação da clonidina via receptores $\alpha 1$ – como a que aparentemente vimos nos animais do grupo CTR – já era esperada, pois a clonidina pode se ligar tanto em receptores do tipo $\alpha 1$ quanto em $\alpha 2$ (VIRTANEN et al., 1988). A redução desse efeito via $\alpha 1$ da clonidina em animais sépticos reforça os indícios de que esses receptores se encontram alterados no SNC de animais sépticos, o que altera a capacidade do mesmo em modular a pressão arterial. Essa resposta alterada na sepse pode estar ocorrendo por uma dessensibilização mais intensa de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos em comparação com os outros receptores adrenérgicos ($\alpha 2$ e $\beta 1$).

Foi observada diferença, confirmada pela análise estatística, no efeito do metoprolol sobre a resposta cardiovascular da clonidina somente no grupo CTR, e apesar de não observarmos essa diferença no grupo CLP 6 h, a resposta pressora da clonidina foi visivelmente reduzida também nesse grupo. Quando avaliados os valores de resposta máxima na PAM individualmente, todos os animais do grupo CTR e três dos seis animais do grupo CLP 6 h apresentaram redução na resposta para clonidina após metoprolol. Logo, é provável que a variabilidade na magnitude das respostas no grupo CLP 6 h tenha contribuído para que as diferenças entre os grupos alcançassem significância estatística. De qualquer forma, nossos resultados claramente indicam que, na ausência do quadro séptico, o efeito hipertensor da clonidina também é dependente da ativação de receptores beta-adrenérgicos. Uma hipótese para esses resultados seria de que a clonidina, além de atuar em receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos, atua em sinergismo com os receptores $\beta 1$ -adrenérgicos, resultando em efeitos somatórios (SKOLNICK & DALY, 1975; HAN & KIM, 1986). Outra hipótese seria de que os mecanismos hipotensores do metoprolol no hipotálamo, através do aumento da atividade GABAérgica (PHILIPPU & KITTEL, 1977; REMISZEWSKA et al., 1993), possam contrapor o mecanismo de redução da atividade GABAérgica pela clonidina no PVN, proposto por Hanafusa et al. (2012). Essa última hipótese nos parece mais plausível, porém estudos avaliando regiões específicas do cérebro são necessários para confirmá-la. Vale ressaltar algumas limitações importantes acerca do uso

dessas drogas e, portanto, da interpretação associada aos nossos resultados: i) apesar da prazosina e da ioimbina serem antagonistas seletivos para receptores $\alpha 1$ - e $\alpha 2$ - adrenérgicos, respectivamente, esses agonistas podem se ligar em ambos os receptores com menor afinidade relativa (CORRÊA ET AL., 1985) e; ii) a clonidina também se liga em receptores imidazolínicos e, portanto, não podemos descartar a participação desses receptores para a resposta à clonidina injetada via i.c.v., especialmente durante a sepse. Como não foram encontrados estudos acerca desse receptor na modulação cardiovascular nesse processo, abordagens futuras são necessárias para investigar o papel dos receptores imidazolínicos na sepse.

Estudos anteriores sugeriram o bloqueio simpático com agonistas $\alpha 2$ -adrenérgicos para tentar reverter a hiporresponsividade observada na sepse, através da redução da resposta pró-inflamatória e da regulação positiva de receptores $\alpha 1$ e β -adrenérgicos (HOFER et al., 2009; GEOLEN et al., 2013; LANKANDEVA et al., 2015). Tendo em vista que fármacos como a clonidina podem diminuir catecolaminas plasmáticas em humanos e animais saudáveis (EBERT et al., 2000; SHIRASAKA et al., 2007), realizamos uma etapa de experimentos para observar os efeitos do tratamento via s.c. com clonidina nos animais CLP 6 h. Essa via foi escolhida visto que induzimos a sepse nos ratos através da cirurgia de CLP, a qual causa uma lesão no intestino do animal. A lesão intestinal leva a uma resposta pró-inflamatória inicialmente local, a qual pode prejudicar a absorção das substâncias injetadas por via i.p. (GARDINER et al., 1995).

O efeito do tratamento com clonidina sobre o hemograma de animais sépticos (grupo CLP 6 h + CLO) mostrou que somente os valores de hemoglobina voltaram ao patamar observado no grupo CTR, e que, portanto, os outros parâmetros igualmente alterados nos animais CLP 6 h não foram influenciados pela clonidina. Visto que o nível aumentado de hemoglobina participa do processo pró-inflamatório por ativação de neutrófilos em ratos (GRAÇA-SOUZA et al., 2002), e que em pacientes sépticos é um preditor de mortalidade (ADAMZIK et al., 2012; JANZ et al., 2013), a reversão desse aumento de hemoglobina observado no presente estudo pode indicar uma melhora no prognóstico dos animais sépticos. Um achado interessante com o tratamento dos ratos sépticos com a clonidina foi que esses animais apresentaram um nível de NOx acima dos animais CTR e CLP 6 h sem tratamento, sugerindo que a clonidina aumentou a produção de NO durante a sepse. Essa hipótese é reforçada pelos dados previamente descritos por Su et al. (2008), que demonstraram *in vitro*,

em células de macrófagos estimulados com LPS, que a clonidina aumenta a expressão de iNOS. Além disso, foi observado tanto em humanos quanto em ratos saudáveis que o vasorrelaxamento causado pela administração periférica de clonidina é mediado por NO (MOLIN & BENDHACK, 2004; HERMANN et al., 2005). Assim, esse aumento exacerbado de NOx observado no presente estudo pode ter ocorrido como efeito direto da administração s.c. de clonidina nos ratos sépticos. Entretanto, é difícil afirmar que essa variação possa ter impacto positivo ou negativo na evolução do quadro de sepse.

O primeiro estudo que se tem conhecimento demonstrando o potencial benéfico da clonidina foi de Pichot et al. (2010), onde a necessidade de administração de noradrenalina exógena para aumentar a pressão arterial de um paciente séptico caiu entre 50-75% com a infusão de clonidina. Ainda em humanos com sepse, a infusão de dexmedetomidina como sedativo também reduziu a necessidade de noradrenalina exógena para manutenção da pressão arterial (MORELLI et al., 2019). De maneira curiosa, em nosso estudo as respostas *in vivo* para noradrenalina na PAM dos animais sépticos tratados com clonidina, apresentaram aumento significativo (Figura 33A), além de aumento na FC (Figura 33D). Em ratos com endotoxemia, tanto a infusão de clonidina como de dexmedetomidina aumentou a responsividade à noradrenalina (GEOLEN et al., 2013), e essa melhora da responsividade também foi observada em ovinos endotoxêmicos que receberam infusão de dexmedetomidina (LANKANDEVA et al., 2019). Em conjunto, esses dados corroboram nossos resultados, pois apesar de não observarmos hiporresponsividade à noradrenalina sistêmica nos animais sépticos, o tratamento com clonidina aumentou a responsividade para noradrenalina i.v. nesses animais.

Artérias de animais do grupo CLP 6 h tratados com clonidina apresentaram melhora da reatividade vascular *in vitro* para a fenilefrina, um efeito que se revelou dependente do endotélio. Observamos também que o grupo CLP 6 h tratado com clonidina apresentou maior E_{max} que o grupo CLP 6 h para as CCR de noradrenalina e angiotensina II, porém ainda menor que o grupo CTR. Entretanto, os anéis desses animais tratados apresentaram redução na potência da noradrenalina, observada através do CE_{50} . Apesar da melhora da responsividade à fenilefrina *in vitro*, os efeitos pressóricos para a maior dose da fenilefrina *in vivo* continuaram reduzidos no grupo CLP 6 h tratado com clonidina, sugerindo que a clonidina foi capaz de reduzir a disfunção local/endotelial, porém não foi suficiente para reverter a disfunção sistêmica. Indo além, o tratamento com clonidina nos animais sépticos reduziu a responsividade *in vivo* para fenilefrina. Esse dado não corrobora estudos anteriores, que descrevem a melhora

da responsividade para fenilefrina e angiotensina II em ovinos endotoxêmicos infundidos com clonidina (LANKANDEVA et al., 2015). Dados da literatura também descrevem que a infusão de clonidina ou de dexmedetomidina em diferentes modelos animais diminui a FC sem modificar a pressão arterial (JULIEN et al., 2017; CALZAVACCA et al., 2019; AIDONI et al., 2020). Encontramos que o tratamento com clonidina não reverteu a hipotensão e tampouco a taquicardia dos animais sépticos. É possível que diferenças metodológicas, incluindo a espécie animal utilizada, o modelo de sepse e o protocolo de tratamento, abrangendo a via de administração e a dose de clonidina, possam contribuir para as divergências entre nossos achados e os artigos citados. Futuros estudos utilizando a infusão contínua de clonidina em nosso modelo poderiam esclarecer seus efeitos durante a sepse.

Ao avaliarmos a influência do tratamento sistêmico com clonidina sobre a capacidade do SNC em modular o sistema cardiovascular nos animais sépticos, não observamos melhora na responsividade cardiovascular frente à administração i.c.v. de noradrenalina. Ao administrar clonidina via i.c.v. nos animais sépticos tratados com clonidina, foi observado maior aumento na PAS comparado com o grupo CLP 6 h, porém não foi suficiente para reverter a hiporresponsividade à clonidina. Ainda, os animais sépticos tratados com clonidina apresentaram aumento na área sob a curva de resposta bradicárdica frente à clonidina i.c.v., comparado com o grupo CLP 6 h (Figura 35L), sugerindo que a bradicardia se mantém por mais tempo nos animais tratados. Em conjunto, esses resultados envolvendo efeitos no SNC sugerem que o tratamento com clonidina não é capaz de restaurar as respostas cardiovasculares frente à noradrenalina e clonidina administradas via i.c.v., apesar de observarmos uma pequena melhora nas respostas cardiovasculares para administração de clonidina central. Uma vez que o tratamento foi capaz de melhorar a responsividade vascular *in vitro*, porém não a disfunção cardiovascular sistêmica (níveis de pressão arterial e FC basais e responsividade a drogas vasoativas, inclusive a nível de SNC), é razoável afirmar que o tratamento com clonidina pela via s.c. não foi suficiente para atuar em mecanismos associados ao SNC na sepse. Sharshar et al. (2003) demonstraram que a sepse altera reflexos neurais do centro de modulação cardiovascular por apoptose neuronal e glial, o que pode prejudicar a comunicação do SNC com a periferia. Sendo assim, mesmo que o tratamento com clonidina tenha melhorado a responsividade vascular *in vitro*, a disfunção a nível de SNC durante a sepse não foi revertida, refletindo no sistema nervoso periférico, o qual não apresentou melhora da hipotensão, taquicardia e responsividade cardiovascular para drogas vasoativas nos ratos CLP 6 h tratados.

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro estudo avaliando os efeitos da sepse na modulação cardiovascular via SNC. Estudos avaliando o tratamento de animais e humanos com agonistas α_2 -adrenérgicos observaram melhoras nos parâmetros cardiovasculares periféricos durante a sepse, mas sempre através de infusão desses agonistas. No presente estudo não observamos tais melhoras, e esse fato também pode ser devido ao modelo de indução de sepse, já que na literatura os modelos escolhidos foram endotoxemia ou administração de *Escherichia coli* (GEOLEN et al., 2013; LANKANDEVA et al., 2015; JULIEN et al., 2017; CALZAVACCA et al., 2019; LANKANDEVA et al., 2019; AIDONI et al., 2020). Estudos futuros devem investigar outros modelos de sepse e outras vias de administração de clonidina para avaliar melhor os efeitos da modulação central no sistema cardiovascular, além de realizar as administrações i.c.v. e em outras regiões específicas, como em regiões hipotalâmicas e na RVLM, em animais acordados. Além disso, estudos quantificando a densidade de receptores adrenérgicos (α_1 , α_2 e β_1) presentes no cérebro dos ratos sépticos poderiam confirmar a nossa hipótese de *downregulation* presente nessa região. Por fim, o presente estudo apresentou resultados relevantes acerca da participação do SNC na disfunção cardiovascular gerada pela sepse, em especial a participação dos receptores adrenérgicos, permitindo que futuros estudos levem em consideração esse sistema ao estudar mecanismos fisiopatológicos e abordagens farmacológicas na sepse.

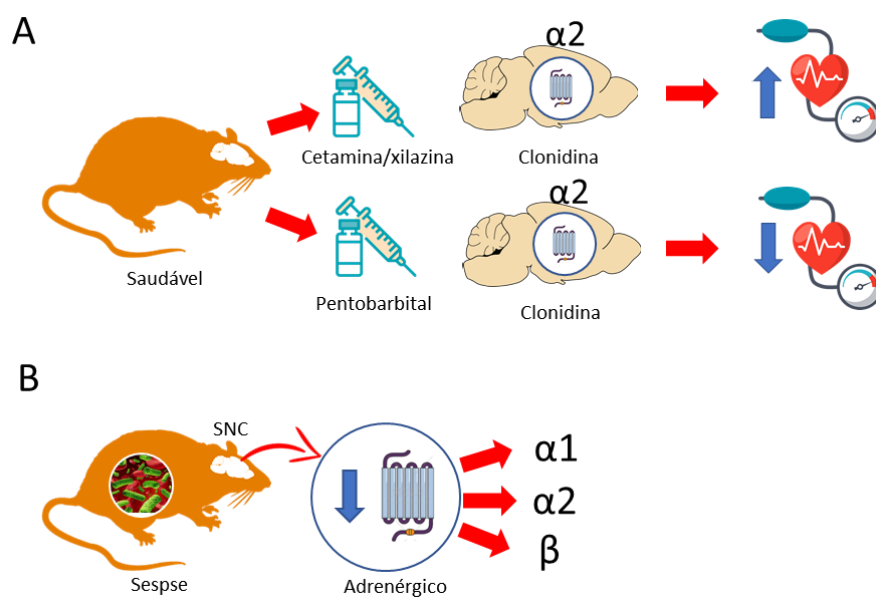


Figura 38. Resumo esquemático dos principais achados do estudo. A) Em ratos normotensos, a administração central do agonista $\alpha 2$ -adrenérgico clonidina induziu aumento na pressão arterial, quando utilizado o anestésico cetamina/xilazina, e queda na pressão arterial, quando utilizado o anestésico pentobarbital. **B)** Em ratos sépticos, a capacidade do sistema nervoso central (SNC) responder a estímulos que levem ao aumento da função cardiovascular através de receptores adrenérgicos está reduzida.

5 CONCLUSÃO

Este é o primeiro estudo a fornecer evidências de que a capacidade do SNC responder a estímulos que levem ao aumento da função cardiovascular durante a sepse está reduzida em ratos machos. Mais especificamente, encontramos que efeitos mediados através de receptores adrenérgicos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$), se mostraram reduzidos após a estimulação com noradrenalina, fenilefrina, clonidina e dexmedetomidina. Ainda, foi possível observar que as alterações na reatividade do SNC já são evidentes 6 horas após o início do insulto séptico, antes mesmo do desenvolvimento da hiporresponsividade sistêmica a agentes vasoativos, e é exacerbada 18 horas após. Administrando antagonistas adrenérgicos ($\alpha 1$, $\alpha 2$ e $\beta 1$) pela via i.c.v., demonstramos que receptores $\beta 1$ -adrenérgicos parecem compensar a dessensibilização de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos no SNC durante a sepse. O tratamento sistêmico dos animais sépticos com clonidina pela via s.c. reverteu a hiporresponsividade observada para fenilefrina em anéis de aorta e aumentou a resposta hipertensora com noradrenalina por via i.v., mas não foi capaz de melhorar parâmetros cardiovasculares *in vivo* afetados pela sepse. Além disso, a escolha da cetamina/xilazina como anestésico apresentou menores interferências nas respostas cardiovasculares centrais. Em conclusão, nossos resultados sugerem uma disfunção cardiovascular de origem central e adrenérgica durante a sepse, abrindo margem para futuros estudos acerca da importância do funcionamento de áreas específicas do cérebro e dos mecanismos envolvidos nessa disfunção.

REFERÊNCIAS

ACHTEN J, JEUKENDRUP AE. Heart Rate Monitoring - Applications and Limitations. **Sports Medicine**. 2003; 33: 517-538.

ACKLAND GL, YAO ST, RUDIGER A, et al. Cardioprotection, attenuated systemic inflammation, and survival benefit of beta1-adrenoceptor blockade in severe sepsis in rats. **Critical Care Medicine**. 2010; 38(2): 388-394.

ADAMZIK M, HAMBURGER T, PETRAT F. et al. Free hemoglobin concentration in severe sepsis: methods of measurement and prediction of outcome. **Critical Care** 2012; 16: R125.

AICHER SA & DRAKE CT. Clonidine evokes vasodepressor responses via α 2-adrenergic receptors in gigantocellular reticular formation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 1999; 289(2): 688–694.

AIDONI Z, POURZITAKI C, STAMOULA E, et al. Circulatory effects of dexmedetomidine in early sepsis: a randomised controlled experimental study. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 2020; 393: 89–97.

ALVAREZ PEREZ GIL AL, NAVARRO LB, VERA MP, PETRICEVICH VL. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Bougainvillea xbuttiana*. **Journal of Ethnopharmacology**. 2012; 144(3): 712-719.

AMBROSE C, SALE S, HOWELLS R, BEVAN C, JENKINS I, WEIR P, MURPHY P, WOLF A. Intravenous clonidine infusion in critically ill children: dose-dependent sedative effects and cardiovascular stability. **British Journal of Anaesthesia**. 2000; 84(6): 794-796.

ANDRÉ C, ERRAJI L, GASTON J, GRIMBER G, BRIAND P, GUILLET JG. Transgenic mice carrying the human beta 2-adrenergic receptor gene with its own promoter overexpress beta 2-adrenergic receptors in liver. **European Journal of Biochemistry**. 1996; 241(2): 417-424.

ANGUS DC & VAN DER POLL T. Severe sepsis and septic shock. **New England Journal of Medicine**. 2013; 369(9): 840-851.

ANNANE D, TRABOLD F, SHARSHAR T, et al. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine**. 1999; 160(2): 458-465.

ARBO JE, LESSING JK, FORD WJH, et al. Heart rate variability measures for prediction of severity of illness and poor outcome in ED patients with sepsis. **American Journal of Emergency Medicine**. 2020; 38(12): 2607-2613.

AWATA WMC, GONZAGA NA, BORGES VF, SILVA CBP, TANUS-SANTOS JE, CUNHA FQ, TIRAPELLI CR. Perivascular adipose tissue contributes to lethal sepsis-induced vasoplegia in rats. **European Journal of Pharmacology**. 2019; 863: 172706.

BADOER E, MEROLLI J. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus that project to the rostral ventrolateral medulla are activated by haemorrhage. **Brain Research**. 1998; 791(1-2): 317-320.

BATEMAN RJ, BOYCHUK CR, PHILBIN KE, MENDELOWITZ D. β adrenergic receptor modulation of neurotransmission to cardiac vagal neurons in the nucleus ambiguus. **Neuroscience**. 2012; 210: 58-66.

BENEDET PO, MENEGATTI ACO, GONÇALVES MC, TERENCE H, ASSREUY J. The therapeutic value of protein (de)nitrosylation in experimental septic shock. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**. 2018; 1864(1): 307-316.

BERG D, GERLACH H. Recent Advances in Understanding and Managing Sepsis. **F1000Research**. 2018; 7: 1-8.

BERK JL, HAGEN JF, BEYER WH, GERBER MJ, DOCHAT GR. The treatment of endotoxin shock by beta adrenergic blockade. **Annals of Surgery**. 1969; 169(1): 74-81.

BERK JL, HAGEN JF, MALY G, KOO R. The Treatment of Shock With Beta Adrenergic Blockade. **Archives of Surgery**. 1972; 104 (1): 46–51.

BERMEJO A, ZARZUELO A, DUARTE J. In Vivo Vascular Effects of Genistein on a Rat Model of Septic Shock Induced by Lipopolysaccharide. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 2003; 42(3): 329-338.

BERNARDELLI AK, DA SILVA RC VAF, CORRÊA T, SILVA-SANTOS JE. Vasoplegia in sepsis depends on the vascular system, vasopressor, and time-point: a comparative evaluation in vessels from rats subjected to the cecal ligation puncture model. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**. 2016; 94(11): 1227-1236.

BERNARDIN G, STROSBERG A, BERNARD A, et al. β -adrenergic receptor-dependent and -independent stimulation of adenylate cyclase is impaired during severe sepsis in humans. **Intensive Care Medicine**. 1998; 24: 1315–1322.

BERNIK TR, FRIEDMAN SG, OCHANI M, DIRAIMO R, ULLOA L, YANG H, SUDAN S, CZURA CJ, IVANOVA SM, TRACEY KJ. Pharmacological Stimulation of the Cholinergic Antiinflammatory Pathway. **Journal of Experimental Medicine**. 2002; 195 (6): 781–788.

BESEDOVSKY H, SORKIN E, FELIX D, HAAS H. Hypothalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**. 1977; 7(5): 323-325.

BOROVIKOVA L, IVANOVA S, ZHANG M. et al. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**. 2000; 405: 458–462.

BORSODY MK & WEISS JM. The effects of endogenous interleukin-1 bioactivity on locus coeruleus neurons in response to bacterial and viral substances. **Brain Research**. 2004; 1007 (1–2): 39-56.

BORSODY MK & WEISS JM. Peripheral endotoxin causes long-lasting changes in locus coeruleus activity via IL-1 in the brain. **Acta Neuropsychiatrica**. 2002; 14(6): 303-321.

BOUDIER H, STRUYKER AJ, SMEETS GWM, BROUWER GM, VAN ROSSUM JM. Hypothalamic Alpha Adrenergic Receptors in Cardiovascular Regulation. **Neuropharmacology**. 1974; 13(9): 837–46.

BUCCAFUSCO JJ, BREZENOFF HE. Mechanisms involved in the cardiovascular response to intracerebroventricular injection of noradrenaline and phentolamine. **Neuropharmacology**. 1977; 16(11): 775-780.

BUCHER M. Expression of vasoconstrictive receptors during experimental endotoxaemia. **Anesthesiologie e Intensivmedizin**. 2004; 45.

BULLER KM. Neuroimmune Stress Responses: Reciprocal Connections Between the Hypothalamus and the Brainstem. **Stress**. 2003; 6(1): 11-17.

BURAS J, HOLZMANN B, SITKOVSKY M. Animal Models of sepsis: setting the stage. **Nature Reviews Drug Discovery**. 2005; 4: 854–865.

BURGDORFF AM, BUCHER M, SCHUMANN J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. **Journal of International Medical Research**. 2018; 46(4): 1303-1310.

BYLUND DB, EIKENBERG DC, HIEBLE JP, LANGER SZ, J LEFKOWITZ RJ, MINNEMAN KP, MOLINOFF PB, RUFFOLO RR, TRENDELENBURG U. International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors. **Pharmacological reviews**. 1994; 46(2): 121-36.

CALEBIRO D, NIKOLAEV VO, PERSANI L, LOHSE MJ. Signaling by internalized G-protein-coupled receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**. 2010; 31(5): 221-228.

CALZADA BC & ARTIÑANO AA. Alpha-adrenoceptor subtypes. **Pharmacological Research**. 2001; 44(3): 195-208.

CALZAVACCA P, BOOTH LC, LANKADEVA YR, BAILEY SR, BURRELL LM, BAILEY M, BELLOMO R, MAY CN. Effects of Clonidine on the Cardiovascular, Renal, and Inflammatory Responses to Experimental Bacteremia. **Shock**. 2019; 51(3): 348-355.

CHAN JY, WANG LL, OU CC, CHAN SH. Downregulation of angiotensin subtype 1 receptor in rostral ventrolateral medulla during endotoxemia. **Hypertension**. 2003; 42(1): 103-109.

COELHO CH, MARTINS TF, OLIVEIRA-PELEGRIN GR, et al. Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity does not alter vasopressin secretion in septic rats. **Pituitary**. 2017; 20: 333–339.

COHEN Y, LINDENBAUM A, MIDOL-MONNET M, PORQUET D, WEPIERRE J. beta-Adrenoceptor blocking drugs and isoprenaline: central effects on cardiovascular parameters. **British Journal of Pharmacology**. 1979; 65(3): 389-394.

COLOMBARI E, CAMARGO LA, SAAD WA, RENZI A, DE LUCA JÚNIOR LA, MENANI JV. Cardiovascular effects of central clonidine in conscious rats after hypothalamic lesions. **Journal of Autonomic Nervous System**. 1992; 40(1): 49-56.

CORRÊA FMA, MACRO IAS, PERES-POLON VL, ANTUNES-RODRIGUES J. Mechanism of the CNS-mediated pressor response to intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanaesthetized rats. **Neuropharmacology**. 1985; 24(9): 831-837.

CORRÊA FMA, MAGRO IAS, PERES-POLON VL. CNS mediation of cardiovascular responses to the intracerebroventricular administration of catecholamines. **Trends in Pharmacological Sciences**. 1982; 3: 330-332.

CORRÊA FMA, PERES-POLON VL. Central $\alpha 1$ -adrenoceptors mediate the pressor response to intracerebroventricular injection of noradrenaline in unanesthetized rats. **Neuropharmacology**. 1995; 34(7): 793-798.

CUNNINGHAM ET, BOHN MC, SAWCHENKO PE. Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**. 1990; 292: 651-667.

DA COSTA, LHA, JÚNIOR NNDS, CATALÃO CHR, et al. Vasopressin Impairment During Sepsis Is Associated with Hypothalamic Intrinsic Apoptotic Pathway and Microglial Activation. **Molecular Neurobiology**. 2017; 54: 5526–5533.

DABIRÉ H, RICHER C. Implication of the central nervous system in the systemic and regional hemodynamics of two centrally acting hypotensive drugs, flesinoxan and clonidine, in the rat. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 1991; 18(4): 605-613.

DAHLSTRÖM A & FUXE K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system II. Experimentally induced changes in the intraneuronal amine levels of bulbospinal neuron systems. **Acta Physiologica Scandinavica**. 1964; 64: 247, 1-36.

DAMPNEY RAL. Central neural control of the cardiovascular system: current perspectives. **Advances in Physiology Education**. 2016; 40(3): 283-296.

DAY H, CAMPEAU S, WATSON SJ, AKIL H. Distribution of $\alpha 1a$ -, $\alpha 1b$ - and $\alpha 1d$ -adrenergic receptor mRNA in the rat brain and spinal cord. **Journal of Chemical Neuroanatomy**. 1997; 13(2): 115-139.

DE JONG W, ZANDBERG P, BOHUS B. Central Inhibitory Noradrenergic Cardiovascular Control. **Progress in Brain Research, Elsevier**. 1975; 42: 285-298.

DE JONGE WJ, ULLOA L. The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor as a pharmacological target for inflammation. **British Journal of Pharmacology**. 2007; 151: 915–29.

DENG J, MUTHU K, GAMELLI R, SHANKAR R, JONES SB. Adrenergic modulation of splenic macrophage cytokine release in polymicrobial sepsis. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. 2004, 287: C730-C736.

DEUSSING JM, CHEN A. The Corticotropin-Releasing Factor Family: Physiology of the Stress Response. **Physiological Reviews**. 2018; 98(4): 2225-2286.

DOBRUCKI LW, CABRERA CL, BOHR DF, MALINSKI T. Central hypotensive action of clonidine requires nitric oxide. **Circulation**. 2001; 104(16): 1884–1886.

- DUNN AJ. Effects of the IL-1 receptor antagonist on the IL-1 and endotoxin-induced activation of the HPA axis and cerebral biogenic amines in mice. **Neuroimmunomodulation**. 2000 7: 36-45.
- EBERT TJ, HALL JE, BARNEY JA, UHRICH TD, COLINCO MD. The Effects of Increasing Plasma Concentrations of Dexmedetomidine in Humans. **Anesthesiology**. 2000; 93: 382–394.
- EBIHARA H, et al. Pressor Response to Microinjection of Clonidine into the Hypothalamic Paraventricular Nucleus in Conscious Rats. **Brain Research**. 1993; 624(1–2): 44–52.
- EGLÈME C, GODFRAIND T, MILLER RC. Enhanced responsiveness of rat isolated aorta to clonidine after removal of the endothelial cells. **British Journal of Pharmacology**. 1984; 81(1): 16–18.
- ELALOUF JM, BUHLER JM, TESSIOT C, BELLANGER AC, DUBLINEAU I, ROUFFIGNAC C. Predominant Expression of α_1 -Adrenergic Receptor in the Thick Ascending Limb of Rat Kidney. Absolute mRNA Quantitation by Reverse Transcription and Polymerase Chain Reaction. **Journal of Clinical Investigation**. 1993; 91(1): 264-272.
- ELENKOV IJ, WILDER RL, CHROUSOS GP AND VIZI ES. The Sympathetic Nerve—An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune System Pharmacological. **Reviews**. 2000; 52(4): 595-638.
- ELLISON GM, TORELLA D, KARAKIKES I, et al. Acute beta-adrenergic overload produces myocyte damage through calcium leakage from the ryanodine receptor 2 but spares cardiac stem cells. **Journal of Biological Chemistry**. 2007; 282(15): 11397-11409.
- ERNSBERGER P, GIULIANO R, WILLETTE N, REIS DJ. Role of Imidazole Receptors in the Vasodepressor Response to Clonidine Analogs in the Rostral Ventrolateral Medulla. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 1990; 253(1): 408–18.
- ERNSBERGER P, MEELEY MP, JOHN MANN JJ, REIS DJ. Clonidine Binds to Imidazole Binding Sites as Well as A₂-Adrenoceptors in the Ventrolateral Medulla. **European Journal of Pharmacology**. 1987; 134(1): 1–13.
- FEIHL F, WAEBER B, LIAUDET L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacological Therapy**. 2001; 91: 179-213.
- GARDINER KR, GARDINER RE, BARBUL A. Reduced intestinal absorption of arginine during sepsis. **Critical Care Medicine**. 1995; 23(7): 1227-1232.
- GEOLEN A, CHAPELIER K, CIVIDJIAN A, DANTONY E, RABILLOUD M, MAY CN, QUINTIN L. Clonidine and Dexmedetomidine Increase the Pressor Response to Norepinephrine in Experimental Sepsis. **Critical Care Medicine**. 2013; 41(12): e431-e438.
- GHOSH SK & PANDIT JJ. Neurological and humoral control of blood pressure. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**. 2019; 20(5): 301-305.

GÓMEZ RE, CANNATA MA, MILNER TA, ANWAR M, REIS DJ, RUGGIERO DA. Vasopressinergic mechanisms in the nucleus reticularis lateralis in blood pressure control. **Brain Research**. 1993; 604(1–2): 90-105.

GRAÇA-SOUZA AV, ARRUDA MAB, FREITAS MS, BARJA-FIDALGO C, OLIVEIRA PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. **Blood**. 2002; 99(11): 4160–4165.

GRANT C, UPTON RN. Cardiovascular and Haemodynamic Effects of Intramuscular Doses of Xylazine in Conscious Sheep. **Australian Veterinary Journal**. 2001; 79(1): 58–60.

GRISANTI LA, WOSTER AP, DAHLMAN J, SAUTER ER, COMBS CK, PORTER JE. α 1-Adrenergic Receptors Positively Regulate Toll-Like Receptor Cytokine Production from Human Monocytes and Macrophages. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 2011; 338(2): 648-657.

GUCYETMEZ B, ATALAN HK. C-Reactive Protein and Hemogram Parameters for the Non-Sepsis Systemic Inflammatory Response Syndrome and Sepsis: What Do They Mean?. **PLOS ONE**. 2016; 11(2): e0148699.

GULATI A, HUSSAIN G, SRIMAL RC. Effect of repeated administration of clonidine on adrenergic, cholinergic (muscarinic), dopaminergic, and serotonergic receptors in brain regions of rats. **Drug Development Research**. 1991; 22: 141-152.

GYAWALI B, RAMAKRISHNA K, DHAMOON AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. **SAGE Open Medicine**. 2019; 7: 1–13.

HALBACH JL, WANG AW, HAWISHER D, et al. Why Antibiotic Treatment Is Not Enough for Sepsis Resolution: an Evaluation in an Experimental Animal Model. **Infection and Immunity**. 2017; 85(12).

HAN GI, KIM MY. Effect of Alpha-2 adrenergic agonist on Beta adrenoceptor-mediated control of blood glucose in the fasted mouse. **Archives of Pharmacological Research**. 1986; 9: 219–222.

HANAFUSA N, OKAMOTO K, TAKATORI S, KAWASAKI H. Involvement of hypothalamic periventricular GABAergic nerves in the central pressor response to clonidine in freely-moving conscious rats. **Journal of Pharmacological Sciences**. 2012; 118(3): 382-390.

HANSEN MK, O'CONNOR KA, GOEHLER LE, WATKINS LR, MAIER SF. The contribution of the vagus nerve in interleukin-1 β -induced fever is dependent on dose. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 2001; 280(4): R929-R934.

HAUACHE OM. Receptores acoplados à proteína G: implicações para a fisiologia e doenças endócrinas. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**. 2001; 45: 3: 228-239.

HERMANN D, SCHLERETH D, VOGT T, BIRKLEIN F. Clonidine induces nitric oxide- and prostaglandin-mediated vasodilation in healthy human skin. **Journal of Applied Physiology**. 2005; 99(6): 2266-2270.

HIEBLE JP, BYLUND DB, CLARKE DE, EIKENBURG DC, LANGER SZ, LEFKOWITZ RJ, MINNEMAN KP AND RUFFOLO RR. International Union of Pharmacology. X. Recommendation for nomenclature of alpha 1-adrenoceptors: consensus update. **Pharmacological Reviews**. 1995; 47(2): 267-270.

HILGERS RHP & WEBB RC. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. **Experimental Biology and Medicine**. 2005; 230(11): 829-835.

HOFER S, STEPPAN J, WAGNER T, et al. Central sympatholytics prolong survival in experimental sepsis. **Critical Care**. 2009 13: R11.

HÖKFELT T, FUXE K, GOLDSTEIN M, JOHANSSON O. Immunohistochemical evidence for the existence of adrenaline neurons in the rat brain. **Brain Research**. 1974; 66: 235-251.

HOSSMANN V, MALING TJB, HAMILTON CA, REID JL, DOLLERY CT. Sedative and cardiovascular effects of clonidine and nitrazepam. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**. 1980; 28(2): 167-176.

HUANG HW, TANG JL, HAN XH, PENG YP, QIU YH. Lymphocytederived catecholamines induce a shift of Th1/Th2 balance toward Th2 polarization. **Neuroimmunomodulation**. 2013; 20(1): 1-8.

IDVALL J, AHLGREN I, ARONSEN KF, STENBERG P. Ketamine infusions: Pharmacokinetics and clinical effects. **British Journal of Anaesthesia**. 1979; 51(12): 1167-1173.

IMAI Y, ABE K, SASAKI S, NIHEI M. Modulation Depressant Pentobarbital of Cardiovascular Action of Clonidine in Rats by Anesthesia. **The Tohoku Journal of Experimental Medicine**. 1989; 157(3): 221-227.

IRNATEN M, WALWYN WM, WANG J, VENKATESAN P, EVANS C, CHANG KSK, et al. Pentobarbital enhances GABAergic neurotransmission to cardiac parasympathetic neurons, which is prevented by expression of GABA A ϵ subunit. **Anesthesiology**. 2002; 97(3): 717-724.

IZEBOUD C, MONSHOUWER M, VAN MIERT A, et al. The β -adrenoceptor agonist clenbuterol is a potent inhibitor of the LPS-induced production of TNF- α and IL-6 in vitro and in vivo. **Inflammation Research**. 1999; 48: 497-502.

JANZ DR, BASTARACHE JA, PETERSON JF, SILLS G, WICKERSHAM N, MAY AK, ROBERTS LJ 2ND, WARE LB. Association between cell-free hemoglobin, acetaminophen, and mortality in patients with sepsis: an observational study. **Critical Care Medicine**. 2013; 41(3): 784-90.

JULIEN C, ORÉA V, QUINTIN L, PIRIOU V, BARRÈS C. Renal sympathetic nerve activity and vascular reactivity to phenylephrine after lipopolysaccharide administration in conscious rats. **Physiology Reports**. 2017; 5(4): e13139.

KANZLER SA, JANUARIO AC, PASCHOALINI MA. Involvement of β 3-adrenergic receptors in the control of food intake in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2011; 44(11): 1141-1147.

KAWASAKI H, YAMAMOTO R, TAKASAKI K. Possible Mechanisms Underlying the Hypertensive Response to Clonidine in Freely Moving, Normotensive Rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**. 1986; 42(3): 405-417.

KHAN ZP, FERGUSON CN, JONES RM. Alpha-2 and Imidazoline Receptor Agonists. Their Pharmacology and Therapeutic Role. **Anaesthesia**. 1999; 54(2): 146–65.

KIMMOUN A, LOUIS H, AL KATTANI N, DELEMAZURE J, DESSALES N, WEI C, MARIE PY, ISSA K, LEVY B. β 1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock*. **Critical Care Medicine**. 2015; 43(9): e332-e340.

KOCA U, OLGUNER ÇG, ERGÜR BU, et al. The effects of dexmedetomidine on secondary acute lung and kidney injuries in the rat model of intra-abdominal sepsis. **Scientific World Journal**. 2013; 2013: 292687.

KUBO T, NUMAKURA H, ENDO S, HAGIWARA Y, FUKUMORI R. Angiotensin receptor blockade in the anterior hypothalamic area inhibits stress-induced pressor responses in rats. **Brain Research Bulletin**. 2001; 56(6): 569-574.

LAMKANFI M, SARKAR A, WALLE LV, VITARI AC, AMER AO, WEWERS MD, TRACEY KJ, KANNEGANTI TD, DIXIT VM. Inflammasome-Dependent Release of the Alarmin HMGB1 in Endotoxemia. **The Journal of Immunology**. 2010; 185 (7): 4385-4392.

LANDS AM, LUDUENA FP, BUZZO HJ. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. **Life Sciences**. 1967; 6(21): 2241-2249.

LANKADEVA YR, MA S, IGUCHI N, EVANS RG, HOOD SG, FARMER DGS, BAILEY SR, BELLOMO R, MAY CN. Dexmedetomidine reduces norepinephrine requirements and preserves renal oxygenation and function in ovine septic acute kidney injury. **Kidney International**. 2019; 96(5): 1150-1161.

LANKADEVA YR, BOOTH LC, KOSAKA J, EVANS RG, QUINTIN L, BELLOMO R, MAY CN. Clonidine Restores Pressor Responsiveness to Phenylephrine and Angiotensin II in Ovine Sepsis*. **Critical Care Medicine**. 2015; 43(7): e221-e229.

LAPORTE SA, OAKLEY RH, ZHANG J, HOLT JA, FERGUSON SSG, CARON MG, BARAK LS. The β 2-adrenergic receptor/ β arrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1999; 96(7): 3712-3717.

LEFKOWITZ RJ. G Protein-coupled Receptors. **Journal of Biological Chemistry**. 1998; 273(30): 18677-18680.

LINK RE, DESAI K, HEIN L, STEVENS ME, CHRUSCINSKI A, BERNSTEIN D, BARSH GS, KOBILKA BK. Cardiovascular Regulation in Mice Lacking $\alpha 2$ -Adrenergic Receptor Subtypes b and c. **Science**. 1996; 273(5276): 803-805.

MACDONALD E, KOBILKA BK, SCHEININ M. Gene targeting — homing in on $\alpha 2$ -adrenoceptor-subtype function. **Trends in Pharmacological Sciences**. 1997; 18(4): 211-219.

MACHADO FR, CAVALCANTI AB, BOZZA FA, FERREIRA EM, ANGOTTI CARRARA FS, SOUSA JL, CAIXETA N, SALOMAO R, ANGUS DC, PONTES AZEVEDO LC. SPREAD Investigators; Latin American Sepsis Institute Network. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infectious Diseases**. 2017; 17(11):1180-1189.

MAZLOOM R, EFTEKHARI G, RAHIMI M, KHORI V, HAJIZADEH S, et al. The Role of $\alpha 7$ Nicotinic Acetylcholine Receptor in Modulation of Heart Rate Dynamics in Endotoxemic Rats. **PLOS ONE**. 2013; 8(12): e82251.

MCAULEY MA, MACRAE I, REID JL. The Cardiovascular Actions of Clonidine and Neuropeptide-Y in the Ventrolateral Medulla of the Rat. **British Journal of Pharmacology**. 1989; 97(4): 1067–74.

MERMET C, QUINTIN L. Effect of clonidine on catechol metabolism in the rostral ventrolateral medulla: an in vivo electrochemical study. **European Journal of Pharmacology**. 1991; 204(1): 105-107.

MIDOL-MONNET M, DAVY M, HEIMBURGER M, BESLOT F, COHEN Y. Cardiovascular Effects of Intracerebroventricular Injections of (\pm)-Nebivolol and its Enantiomers—a Comparison with those of Metoprolol in the Rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**. 1991; 43(7): 504–509.

MILNER TA, REIS DJ, PICKEL VM, AICHER SA, GIULIANO R. Ultrastructural localization and afferent sources of corticotropin-releasing factor in the rat rostral ventrolateral medulla: Implications for central cardiovascular regulation. **Journal of Comparative Neurology**. 1993; 333: 151-167.

MITAKA C, HIRATA Y, YOKOYAMA, K, WAKIMOTO H, HIROKAWA M, NOSAKA T, IMAI T. Relationships of Circulating Nitrite/Nitrate Levels to Severity and Multiple Organ Dysfunction Syndrome in Systemic Inflammatory Response Syndrome. **Shock**. 2003; 19(4): 305-309.

MOLIN JC, BENDHACK LM. Clonidine induces rat aorta relaxation by nitric oxide-dependent and -independent mechanisms. **Vascular Pharmacology**. 2004; 42(1): 1-6.

MORELLI A, DONATI A, ERTMER C, et al. Microvascular effects of heart rate control with esmolol in patients with septic shock: a pilot study. **Critical Care Medicine**. 2013; 41(9): 2162-2168.

MORELLI A, SANFILIPPO F, ARNEMANN P, HESSLER M, et al. The Effect of Propofol and Dexmedetomidine Sedation on Norepinephrine Requirements in Septic Shock Patients: A Crossover Trial. **Critical Care Medicine**. 2019; 47(2): e89-e95.

MUROI Y, THEUSCH CM, CZAJKOWSKI C, JACKSON MB. Distinct structural changes in the GABAA receptor elicited by pentobarbital and GABA. **Biophysical Journal**. 2009; 96(2): 499–509.

NAKAMURA S, KAWASAKI H, TAKASAKI K. Intracerebroventricular Treatment with Vasopressin Vi-Receptor Antagonist Inhibits Centrally-Mediated Pressor Response to Clonidine in Conscious Rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**. 1993; 63(4): 447–453.

NARDOCCI G, MARTIN A, ABARZÚA S, RODRÍGUEZ J, SIMON F, REYES EP, ACUÑA-CASTILLO C, NAVARRO C, CORTES PP, FERNÁNDEZ R. Sepsis progression to multiple organ dysfunction in carotid chemo/baro-denervated rats treated with lipopolysaccharide. **Journal of Neuroimmunology**. 2015; 278: 44-52.

OLIVEIRA-PELEGRIN GR, AGUILA FA, BASSO PJ, ROCHA MJA. Role of central NO-cGMP pathway in vasopressin and oxytocin gene expression during sepsis. **Peptides**. 2010; 31(10): 1847-1852.

ORIOWO MA. Atypical β -adrenoceptors in the rat isolated common carotid artery. **British Journal of Pharmacology**. 1994; 113: 699-702.

OSHIMA N, ONIMARU H, YAMAMOTO K. et al. Expression and functions of β_1 - and β_2 -adrenergic receptors on the bulbospinal neurons in the rostral ventrolateral medulla. **Hypertension Research**. 2014; 37: 976–983.

PANCOTO JA, CORRÊA PB, OLIVEIRA-PELEGRIN GR, ROCHA MJ. Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Autonomic Neurosciences**. 2008; 138(1-2): 57-63.

PANINA-BORDIGNON P, MAZZEO D, LUCIA PD, D'AMBROSIO D, LANG R, FABBRI L, SELF C, SINIGAGLIA F. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. **Journal of Clinical Investigations**. 1997; 100(6): 1513-1519.

PASCHALIS A, CHURCHILL L, MARINA N, KASYMOV V, GOURINE A, ACKLAND G. β_1 -Adrenoceptor distribution in the rat brain: An immunohistochemical study. **Neuroscience Letters**. 2009; 458(2): 84-88.

PATEL PA & ALI N. Mechanisms involved in regulation of Systemic Blood Pressure. **Archives of Clinical Hypertension**. 2017; 3(1): 016-020.

PAVLOV VA, OCHANI M, GALLOWITSCH-PUERTA M, OCHANI K, HUSTON JM, CZURA CJ, AL-ABED Y, TRACEY KJ. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2006; 103(13): 5219-5223.

PAXINOS G, WATSON C. The rat brain in stereotaxic coordinates. 7th ed. **Elsevier Academic Press**. 2013.

PELOSI GG, PERES-POLON VL, CORRÊA FMA. Pressor effects of the injection of noradrenaline into different cerebroventricular spaces in unanesthetized rats. **Neuroscience Letters**. 2006; 397(3): 165-169.

PETTINGER WA. Clonidine, a New Antihypertensive Drug. **New England Journal of Medicine**. 1975; 293(23): 1179–1180.

PFLEGER J, GRESHAM K, KOCH WJ. G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets in the heart. **Nature Reviews in Cardiology**. 2019; 16: 612–622.

PHILBIN KE, BATEMAN RJ, MENDELOWITZ D. Clonidine, an A₂-Receptor Agonist, Diminishes GABAergic Neurotransmission to Cardiac Vagal Neurons in the Nucleus Ambiguus. **Brain Research**. 2010; 1347: 65–70.

PHILIPPU A, KITTEL E. Presence of Beta-adrenoreceptors in the hypothalamus; their importance for the pressor response to hypothalamic stimulation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**. 1977; 297: 219–225.

PICHOT C, MATHERN P, KHETTAB F, GHIGNONE M, GELOEN A, et al. Increased pressor response to noradrenaline during septic shock following clonidine? **Anaesthesia and Intensive Care; Edgecliff**. 2010; 38(4): 784-5.

PILETZ J, ORDWAY G, ZHU H, et al. Autoradiographic Comparison of [³H]-Clonidine Binding to Non-Adrenergic Sites and α_2 -Adrenergic Receptors in Human Brain. **Neuropsychopharmacol**. 2000; 23: 697–708.

PRICE DT, LEFKOWITZ RJ, CARON MG, BERKOWITZ D, SCHWINN DA. Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. **Molecular Pharmacology**. 1994; 45(2): 171-175.

PUMPRLA J, HOWORKA K, GROVES D, CHESTER M, NOLAN J. Functional assessment of heart rate variability: physiological basis and practical applications. **International Journal of Cardiology**. 2002; 84(1): 1-14.

PUPO A & MINNEMAN K. Adrenergic Pharmacology: Focus on the Central Nervous System. **CNS Spectrums**. 2001; 6(8): 656-662.

RAJAGOPAL S, SHENOY SK. GPCR desensitization: Acute and prolonged phases. **Cellular Signalling**. 2018; 41: 9-16.

RAMCHANDRA R, WAN L, HOOD SG, FRITHIOF R, BELLOMO R, MAY CN. Septic shock induces distinct changes in sympathetic nerve activity to the heart and kidney in conscious sheep. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 2009; 297(5): R1247-R1253.

REHMAN A, BALOCH NUA, MORROW J, et al. Targeting of G-protein coupled receptors in sepsis. **Pharmacology and Therapeutics**. 2020.

REMISZEWSKA M, JASTRZĘBSKI Z, CZYŻEWSKA-SZAFRAN H, WUTKIEWICZ M. Enhancement of GABAergic system activity by metoprolol in spontaneously hypertensive rats. **European Journal of Pharmacology**. 1993; 250(3): 355-360.

RHODES A, EVANS LE, ALHAZZANI W, LEVY MM, ANTONELLI M, FERRER R, KUMAR A, SEVRANSKY JE, SPRUNG CL, NUNNALLY ME. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of sepsis and septic shock: 2016. **Intensive Care Medicine**. 2017; 43: 304-377.

RICCI D, TAIRA CA. Brain α 1-adrenoceptor in the cardiovascular responses to BHT-920 and phenylephrine. **General Pharmacology: The Vascular System**. 1996; 27(2): 299-304.

ROHRER DK, DESAI KH, JASPER JR, STEVENS ME, REGULA DP, BARSH GS, BERNSTEIN D, KOBILKA BK. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 1996; 93(14): 7375-7380.

ROKOSH DG, SIMPSON PC. Knockout of the α 1A/C-adrenergic receptor subtype: The α 1A/C is expressed in resistance arteries and is required to maintain arterial blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2002; 99(14): 9474-9479.

RUDD KE, JOHNSON SC, AGESA KM, SHACKELFORD KA, TSOI D, KIEVLAN DR, et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990–2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**. 2020; 395(10219): 200-211.

SAHA DC, SAHA AC, MALIK G, ASTIZ ME, RACKOW EC. Comparison of cardiovascular effects of tiletamine-zolazepam, pentobarbital, and ketamine-xylazine in male rats. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science**. 2007; 46(2): 74–80.

SAKAI M, SUZUKI T, TOMITA K, YAMASHITA S, PALIKHE S, HATTORI K, YOSHIMURA N, MATSUDA N, HATTORI Y. Diminished responsiveness to dobutamine as an inotrope in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis: attribution to phosphodiesterase 4 upregulation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. 2017; 312: H1224-H1237.

SALLAM MY, EL-GOWILLY SM, EL-GOWELLI HM, EL-LAKANY MA, EL-MAS MM. Additive counteraction by α 7 and α 4 β 2-nAChRs of the hypotension and cardiac sympathovagal imbalance evoked by endotoxemia in male rats. **European Journal of Pharmacology**. 2018; 834: 36-44.

SALLAM MY, EL-GOWILLY SM, FOU DA MA, ABD-ALHASEEB MM, EL-MAS MM. Brainstem cholinergic pathways diminish cardiovascular and neuroinflammatory actions of endotoxemia in rats: Role of NF κ B/ α 7/ α 4 β 2AChRs signaling. **Neuropharmacology**. 2019; 157: 107683.

SANT'HELENA BRM, GUARIDO KL, SOUZA P, CRESTANI S, SILVA-SANTOS JE. Reduction in renal blood flow following administration of norepinephrine and phenylephrine in septic rats treated with Kir6.1 ATP-sensitive and KCa1.1 calcium-activated K⁺ channel blockers. **European Journal of Pharmacology**. 2015; 765: 42-50.

SAPER CB & BREDER CD. The Neurologic Basis of Fever. **New England Journal of Medicine**. 1994; 330:1880-1886.

SARELIUS I & POHL U. Control of muscle blood flow during exercise: local factors and integrative mechanisms. **Acta Physiologica**. 2010; 199: 349-365.

SAWAMURA S, KINGERY WS, DAVIES MF, AGASHE GS, CLARK JD, KOBILKA BK, HASHIMOTO T, MAZE M. Antinociceptive Action of Nitrous Oxide Is Mediated by Stimulation of Noradrenergic Neurons in the Brainstem and Activation of $\alpha 2B$ Adrenoceptors. **Journal of Neuroscience**. 2000; 20(24): 9242-9251.

SAWAMURA S, KINGERY WS, DAVIES MF, AGASHE GS, CLARK JD, KOBILKA BK, HASHIMOTO T, MAZE M. Antinociceptive action of nitrous oxide is mediated by stimulation of noradrenergic neurons in the brainstem and activation of $\alpha 2B$ adrenoceptors. **Journal of Neuroscience**. 2000; 20(24): 9242-9251.

SAWCHENKO PE, SWANSON LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Research Reviews**. 1982; 4(3): 275-325.

SCHMIDT C, KURT B, HÖCHERL K, BUCHER M. Inhibition of NF- κ B activity prevents downregulation of $\alpha 1$ -adrenergic receptors and circulatory failure during CLP-induced sepsis. **Shock**. 2009; 32(3): 239-246.

SCHMITZ D, WILSENACK K, LENDEMANN S, SCHEDLOWSKI M, OBERBECK R. β -Adrenergic blockade during systemic inflammation: Impact on cellular immune functions and survival in a murine model of sepsis. **Resuscitation**. 2007; 72(2): 286-294.

SCHREIHOFER AM & GUYENET, P.G. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. **Journal of Comparative Neurology**. 1997; 387: 524-536.

SHARP DB, WANG X, MENDELOWITZ D. Dexmedetomidine Decreases Inhibitory but Not Excitatory Neurotransmission to Cardiac Vagal Neurons in the Nucleus Ambiguus. **Brain Research**. 2014 1574: 1-5.

SHARSHAR T, GRAY F, GRANDMAISON GL, HOPKINSON NS, ROSS E, DORANDEU A, ORLIKOWSKI D, RAPHAEL JC, GAJDOS P, ANNANE D. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **The Lancet**. 2003; 362(9398): 1799-1805.

SHEN FM, GUAN YF, XIE HH, SU DF. Arterial baroreflex function determines the survival time in lipopolysaccharide-induced shock in rats. **Shock**. 2004; 21(6): 556-560.

SHI KY, SHEN FM, LIU AJ, CHU ZX, CAO YL, SU, DF. The Survival Time Post-Cecal Ligation and Puncture in Sinoaortic Denervated Rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**. 2007; 50(2): 162-167.

SHIRASAKA T, QIU DL, KANNAN H, TAKASAKI M. The effects of centrally administered dexmedetomidine on cardiovascular and sympathetic function in conscious rats. **Anesthesia & Analgesia**. 2007; 105(6).

SHORR RG, LEFKOWITZ RJ, CARON MG. Purification of the beta-adrenergic receptor. Identification of the hormone binding subunit. **Journal of Biological Chemistry**. 1981; 256(11): 5820-5826.

SIBLEY D, LEFKOWITZ R. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the β -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. **Nature**. 1985; 317: 124–129.

SIGAROUDI A, KINZIG M, WAHL O, STELZER C, SCHROETER M, FUHR U, HOLZGRABE U, SÖRGEL F. Quantification of Bisoprolol and Metoprolol in Simultaneous Human Serum and Cerebrospinal Fluid Samples. **Pharmacology**. 2018; 101: 29-34.

SINGER M, DEUTSCHMAN CS, SEYMOUR CW, et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Journal of the American Medical Association**. 2016; 315: 801–810.

SKOLNICK P, DALY JW. Stimulation of Adenosine 3',5'-Monophosphate Formation by Alpha and Beta Adrenergic Agonists in Rat Cerebral Cortical Slices: Effects of Clonidine. **Molecular Pharmacology**. 1975; 11(5): 545-551.

SOUZA P, SCHULZ R, SILVA-SANTOS JE. Matrix metalloproteinase inhibitors prevent sepsis-induced refractoriness to vasoconstrictors in the cecal ligation and puncture model in rats. **European Journal of Pharmacology**. 2015; 765: 164-170.

STERNBERG E. Neural regulation of innate immunity: a coordinated nonspecific host response to pathogens. **Nature Reviews in Immunology**. 2006; 6: 318–328.

SU NY, TSAI PS, HUANG CJ. Clonidine-induced enhancement of iNOS expression involves NF-kappaB. **Journal of Surgical Research**. 2008; 149(1): 131-137.

SUMITRA M, MANIKANDAN P, RAO KVK, NAYEEM M, MANOHAR BM, PUVANAKRISHNAN R. Cardiorespiratory effects of diazepam-ketamine, xylazine-ketamine and thiopentone anesthesia in male Wistar rats - A comparative analysis. **Life Sciences**. 2004; 75(15): 1887–1896.

SUN MK. Pharmacology of Reticulospinal Vasomotor Neurons in Cardiovascular Regulation. **Pharmacological Reviews**. 1996; 48(4): 465–94.

SUZUKI T, MORISAKI H, SERITA R, YAMAMOTO M, KOTAKE Y, ISHIZAKA A, TAKEDA J. Infusion of the β -adrenergic blocker esmolol attenuates myocardial dysfunction in septic rats*. **Critical Care Medicine**. 2005; 33(10): 2294-2301.

SZABÓ C, HASKÓ G, ZINGARELLI B, NÉMETH ZH, SALZMAN AL, KVETAN V, MCCARTHY PS, VIZI ES. Isoproterenol regulates tumour necrosis factor, interleukin-10, interleukin-6 and nitric oxide production and protects against the development of vascular hyporeactivity in endotoxaemia. **Immunology**. 1997; 90: 95-100.

TANG C, YANG J, WU L, DONG LW, LIU MS. Phosphorylation of β -adrenergic receptor leads to its redistribution in rat heart during sepsis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**. 1998; 274(4): R1078-R1086.

TANG CHH, CHAN GSH, MIDDLETON PM, CAVE G, et al. Transfer function analysis of baroreflex function in a rabbit model of endotoxic shock. **Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society**. 2009; 1848-1851.

TANG M, WANG G, LU P, KARAS RH, ARONOVITZ M, HEXIMER SP, MENDELSON ME. Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. **Nature Medicine**. 2003; 9: 1506.

TANIGUCHI T, KIDANI Y, KANAKURA H, TAKEMOTO Y, YAMAMOTO K. Effects of dexmedetomidine on mortality rate and inflammatory responses to endotoxin-induced shock in rats. **Critical Care Medicine**. 2004; 32(6): 1322-1326.

THANGAMALAI R, KANDASAMY K, SUKUMARN SV, REDDY N, SINGH V, CHOUDHURY S, et al. Atorvastatin Prevents Sepsis-Induced Downregulation of Myocardial β 1-Adrenoceptors and Decreased Camp Response in Mice. **Shock**. 2014; 41(5): 406-412.

TOURNISSAC M, VU TM, VRABIC N, et al. Repurposing beta-3 adrenergic receptor agonists for Alzheimer's disease: beneficial effects in a mouse model. **Alzheimer Research Therapy**. 2021; 13: 103.

TROCHU JN, LEBLAIS V, RAUTUREAU Y, BÉVÉRELLI F, LE MAREC H, BERDEAUX A, GAUTHIER C. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. **British Journal of Pharmacology**. 1999; 128(1): 69-76.

TROLIN G. Effects of pentobarbitone and decerebration on the clonidine-induced circulatory changes. **European Journal of Pharmacology**. 1975; 34(1): 1-7.

TSAO P, CAO T, VON ZASTROW M. Role of endocytosis in mediating downregulation of G-protein-coupled receptors. **Trends in Pharmacological Sciences**. 2001; 22(2): 91-96.

URSINO MG, VASINA V, RASCHI E, CREMA F, PONTI F. The β 3-adrenoceptor as a therapeutic target: Current perspectives. **Pharmacological Research**. 2009; 59(4): 221-234.

VANDEWALLE J, LIBERT C. Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be. **Frontiers in Immunology**. 2020; 11.

VAN WESTERLOO DJ, GIEBELEN IA, FLORQUIN S, BRUNO MJ, LAROSA GJ, ULLOA L, TRACEY KJ, VAN DER POLL T. The Vagus Nerve and Nicotinic Receptors Modulate Experimental Pancreatitis Severity in Mice. **Gastroenterology**. 2006; 130(6): 1822-1830.

VINCENT JL. Understanding cardiac output. **Critical Care**. 2008; 12: 174.

VIRTANEN R, SAVOLA JM, SAANO V, NYMAN L. Characterization of the selectivity, specificity and potency of medetomidine as an alpha 2-adrenoceptor agonist. **European Journal of Pharmacology**. 1988; 150: 9-14.

WANG LG, ZENG J, YUAN WJ, SU DF, WANG WZ. Comparative study of NMDA and AMPA/kainate receptors involved in cardiovascular inhibition produced by imidazoline-like drugs in anaesthetized rats. **Experimental Physiology**. 2007; 92(5): 849–858.

WANG H, YU M, OCHANI M, et al. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. **Nature**. 2003; 421: 384–388.

WATKINS LR, MAIER SF, GOEHLER LE. Cytokine-to-brain communication: A review & analysis of alternative mechanisms. **Life Sciences**. 1995; 57(11): 1011-1026.

WEDN AM, EL-GOWILLY SM, EL-MAS MM. The $\alpha 7$ -nAChR/heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway mediates the nicotine counteraction of renal inflammation and vasoconstrictor hyporeactivity in endotoxic male rats. **Inflammatory Research**. 2020; 69: 217–231.

WEINBERGER MH, AOI W, HENRY DP. Direct effect of beta-adrenergic stimulation on renin release by the rat kidney slice in vitro. **Circulation Research**. 1975; 37: 318–324.

WEIS WI & KOBILKA BK. The Molecular Basis of G Protein–Coupled Receptor Activation. **Annual Review of Biochemistry**. 2018; 87: 1: 897-919.

WURSTER SH, WANG P, DEAN RE, CHAUDRY IH. Vascular Smooth Muscle Contractile Function Is Impaired during Early and Late Stages of Sepsis. **Journal of Surgical Research**. 1994; 56(6): 556-561.

XIANG H, HU B, LI Z, LI J. Dexmedetomidine controls systemic cytokine levels through the cholinergic anti-inflammatory pathway. **Inflammation**. 2014; 37(5): 1763-1770.

XU B, ZHENG H, AND PATEL KP. Enhanced activation of RVLM-projecting PVN neurons in rats with chronic heart failure. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**. 2012; 302(8): H1700-H1711.

YAMAZATO M, et al. Hypotensive and Sedative Effects of Clonidine Injected into the Rostral Ventrolateral Medulla of Conscious Rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. 2001; 281(6 50-6): 1868–76.

YU T, LIU D, GAO M, YANG P, ZHANG M, SONG F, ZHANG X, LIU Y. Dexmedetomidine prevents septic myocardial dysfunction in rats via activation of $\alpha 7$ nAChR and PI3K/Akt-mediated autophagy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 2019; 120.

ZABRODSKII PF. Effect of armin on nonspecific resistance factors of the body and on the primary humoral immune response. **Farmakologija I Toksikologija**. 1987; 50(1): 57-60.

ZABRODSKII PF. The Combined Effect of $\alpha 7$ n-Acetylcholine and $\beta 2$ -Adrenergic Receptors Agonists on the Implementation of the Cholinergic Anti-Inflammatory Pathway in Early Phase of Sepsis. **Acta Scientific Pharmaceutical Sciences**. 2019; 3(11): 17-21.

ZHAO D, REN LM, LU HG, ZHANG X. Potentiation by yohimbine of α -adrenoceptor-mediated vasoconstriction in response to clonidine in the rabbit ear vein. **European Journal of Pharmacology**, 2008; 589(1–3): 201–205.

ZOUKOS Y, THOMAIDES T, PAVITT DV, LEONARD JP, CUZNER ML, MATHIAS CJ. Upregulation of beta-adrenoceptors on circulating mononuclear cells after reduction of central sympathetic outflow by clonidine in normal subjects. **Clinical Autonomic Research**. 1992; 2: 165–170.