



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

ANGÉLICA KARINA BERNARDELLI

VIAS DE TRANSDUÇÃO ENVOLVIDAS NA REATIVIDADE VASCULAR MEDIADA
POR RECEPTORES α_1 -ADRENÉRGICOS NA SEPSE: UMA CONVERSA ENTRE O
ÓXIDO NÍTRICO E O CÁLCIO?

FLORIANÓPOLIS
2021

Angélica Karina Bernardelli

VIAS DE TRANSDUÇÃO ENVOLVIDAS NA REATIVIDADE VASCULAR MEDIADA
POR RECEPTORES α_1 -ADRENÉRGICOS NA SEPSE: UMA CONVERSA ENTRE O
ÓXIDO NÍTRICO E O CÁLCIO?

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

Florianópolis
2021

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

Bernardelli, Angélica Karina

VIAS DE TRANSDUÇÃO ENVOLVIDAS NA REATIVIDADE VASCULAR
MEDIADA POR RECEPTORES ALFA1- ADRENÉRGICOS NA SEPSE: UMA
CONVERSA ENTRE O ÓXIDO NÍTRICO E O CÁLCIO? / Angélica
Karina Bernardelli ; orientador, José Eduardo da Silva
Santos, 2021.

116 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, Florianópolis, 2021.

Inclui referências.

1. Farmacologia. 2. Sepse. 3. Receptores Alfa1
adrenérgicos. 4. Responsividade vascular. I. Santos, José
Eduardo da Silva. II. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III.
Título.

Angélica Karina Bernardelli

Vias de transdução envolvidas na reatividade vascular mediada por receptores α_1 -adrenérgicos na sepe: uma conversa entre o óxido nítrico e o cálcio?

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

Dra. Rita de Cássia Melo Vilhena de Andrade Fonseca da Silva
Universidade do Vale do Itajaí

Prof. Dr. Geisson Marcos Nardi
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Jamil Assreuy Filho
Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Dra. Helena Iturvides Cimarosti
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 Schroder Prediger
Coordenador do Programa

Prof. Dr. José Eduardo da Silva Santos
Orientador

Florianópolis, 2021.

Dedico este trabalho a todos aqueles que se propuseram a acrescentar um tijolo a mais na construção da ciência.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a todo o processo de crescimento e aprendizagem que esses anos de doutorado me proporcionaram, não apenas a nível intelectual, mas como ser humano, traduzidos em oportunidades de evolução.

Agradeço a Deus que de muitas formas, se faz presente em minha vida. Por me sustentar em cada momento. Pela sabedoria nos momentos difíceis. Por conduzir meus passos e me dar forças quando eu achava que não seria mais possível continuar.

Agradeço a minha mãe Ivone e ao meu pai Edgar pelos bons princípios, por tudo que já fizeram e fazem por mim, pelas inúmeras horas de conversa e apoio, por serem sempre a minha base mais forte, por todo o sacrifício e incentivo, por ter me permitido voar, mesmo sabendo o quão difícil seria a minha ausência. Nada que eu diga ou faça é capaz de expressar o tamanho do meu amor e a eterna gratidão que sinto por vocês.

À minha avó, pelo amor dedicado, carinho e o cuidado de sempre. Por ser essa mulher cheia de força e sabedoria. Obrigada por tudo minha avó querida!

Ao meu avô que não está mais aqui, mas permanece sua lembrança e amor.

Ao professor José Eduardo, muito obrigada! Pela oportunidade, pela orientação ao longo desses anos, pelos detalhes, por ter fornecido os meios necessários para o meu crescimento, pelos *feedbacks* sempre honestos, pela disponibilidade cada vez que eu precisei de sua ajuda, além de todo o seu entusiasmo e brilho nos olhos com os receptores e as vias de transdução das quais partilho.

Ao Bruno (amor), pela nossa família, por me fazer enxergar a vida com outros olhos, pelo amor demonstrado a cada dia. Pelo incentivo e paciência nos dias difíceis. Por remar comigo, quando meus braços já estavam cansados. Por tornar as coisas mais leves. Obrigada por tanto! E aos nossos pequenos de quatro patas, pela alegria diária.

À família LabCardio, tanto aos que já concluíram, quanto os que ainda estão: Elaine, Nariana, Ruy, Natália, Merita, Stherfanni, Thaine, Guilherme, Thiago, Priscila, Eduardo, Lívia, Danillo, Leonardo e Maria Luiza, o meu agradecimento pela oportunidade de ter convivido com vocês esses anos, pelo aprendizado, além da amizade e troca científica.

À Thiele pela ajuda nos experimentos de fluorescência e pelas conversas além da ciência, principalmente nesta fase final.

À Adriane Madeira, pela ajuda de sempre.

À Nariana pela amizade e observações importantes que levaram a muitos resultados desta tese. Parte deste trabalho também é seu!

Às boas amigas que a vida me presenteou, Franciele e Bruna, obrigada por saber que tenho vocês, apesar da distância, pelas conversas e compartilhamentos de vida!

À Elaine pela amizade e companheirismo durante toda a jornada a qual permanece para além da farmacologia. Tive muita sorte de ter estado no laboratório na mesma época que você! Obrigada por toda a sua ajuda e amizade!

À Lilian, ao José e ao Felipe pelos bons momentos e acolhimento em sua família.

À vó Nocy, pelo amor demonstrado, pelo exemplo de mulher forte! E por todos os cafezinhos feitos com carinho.

A todos os professores do departamento de Farmacologia que contribuíram para a minha formação. Em especial aos professores da Farmacologia Cardiovascular: Profa. Dra. Áurea Elizabeth Linder, Profa. Dra. Regina De Sordi, Prof. Dr. Daniel Fernandes e Prof. Dr. Jamil Assreuy.

Aos membros da banca avaliadora deste trabalho Dra. Rita de Cássia Melo Vilhena de Andrade Fonseca da Silva, Prof. Dr. Geisson Marcos Nardi, Prof. Dr. Jamil Assreuy, Profa. Dra. Helena Ituvirdes Cimarosti, Profa. Dr. Regina de Sordi e Dra. Karla Bianca Neves. O meu muito obrigada pela disponibilidade de tempo e por toda a contribuição para a melhoria deste documento.

A todos os professores ao longo da minha vida, que de certa forma contribuíram para que eu chegasse até aqui.

Ao esforço de cada pesquisador, por ter fornecido a base para a continuidade da ciência, das quais nos beneficiamos.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e ao departamento de Farmacologia por priorizar o conhecimento.

À querida Floripa, por todos os aprendizados deste ciclo.

Aos colegas e funcionários do departamento.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

Aos animais minha gratidão e profundo respeito.

i- *“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas, que já tem a forma do nosso corpo, e esquecer os nossos caminhos, que nos levam sempre aos mesmos lugares. É o tempo da travessia: e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado, para sempre, à margem de nós mesmos”.*
(Fernando Teixeira de Andrade)

ii- *“You can’t connect the dots looking forward. You can only connect them looking backwards. So, you have to trust that the dots will somehow connect in your future”.*
(JOBS, STEVE 2005).

iii- *“Wherever you go, go with all your heart”*
(Confucius).

RESUMO

Uma vez que ligantes dos receptores α_1 -adrenérgicos (α_1 -ARs) se constituem como um pilar de primeira escolha no tratamento da hipotensão na sepse, buscamos com este trabalho, explorar o comportamento dos α_1 -ARs nessa condição. A hipótese que embasou a pesquisa é de que a estimulação de α_1 -ARs por diferentes ligantes pode resultar em uma modulação diferencial para mediadores intracelulares como o óxido nítrico (NO) e o cálcio (Ca^{2+}), afetando a capacidade dos vasos em aumentar o tônus vascular. Utilizamos o modelo experimental de sepse induzida pela metodologia de ligadura e perfuração do ceco (CLP) em ratos, em dois tempos, pós CLP 6 h e 18 h. Avaliamos a responsividade da aorta frente aos agonistas fenilefrina (PE) e noradrenalina (NE), assim como a ativação direta da maquinaria contrátil pelo CaCl_2 . O receptor α_1 -AR quando ativado pela PE, resulta em uma hiporresponsividade mais acentuada do que quando ativado pela NE em 6 h após a CLP. A análise da densidade basal do receptor α_1 -AR através da técnica de marcação com o ligante fluorescente demonstra não haver reduções na densidade deste receptor na sepse. Além disso, a avaliação do efeito da sepse sobre a maquinaria contrátil em anéis de aorta, caracteriza que em 6 h após a CLP, a contração induzida por CaCl_2 em líquido despolarizante sem Ca^{2+} não é reduzida. No entanto, estágios mais avançados da sepse apresentam perda do tônus contrátil ao CaCl_2 . A exploração das vias de transdução envolvidas denota que o inibidor não seletivo das sintases do óxido nítrico (L-NAME) é capaz de aumentar a responsividade vascular para a PE e NE em anéis de aorta provenientes do grupo controle. No entanto, não foi capaz de aumentar a responsividade vascular frente ao CaCl_2 . Ao contrário do esperado, em 6 h após a CLP, os inibidores seletivos das sintases de óxido nítrico induzida (iNOS), neuronal (nNOS) 1400W e S-metil-L-tiocitrulina, respectivamente, aumentaram as respostas para a PE, mas não para a NE nem para o CaCl_2 . A análise em um momento pós CLP mais tardio (18 h), demonstra que o bloqueio da eNOS, iNOS e nNOS é capaz de aumentar a responsividade vascular para todos os vasoconstritores avaliados. De maneira interessante, ao incubar a aorta de animais controle com o doador exógeno de NO, nitroprussiato de sódio (NPS) e construir CCRs (curvas de resposta dependentes da concentração) para a PE e NE, os resultados mostram diferenças em relação à sensibilidade ao NO de um vasoconstritor para o outro. Por outro lado, não encontramos diferenças entre os dois ligantes em relação à entrada de Ca^{2+} do meio extracelular. De outra forma, uma vez que a maquinaria contrátil já esteja ativada, o bloqueio da entrada de Ca^{2+} com a nicardipina é suficiente para provocar a perda do tônus vascular nas respostas induzidas por PE, tanto nas preparações controle, quanto sépticas, enquanto nas respostas geradas pela NE o mesmo não é observado. Por fim, verificamos particularidades importantes na sinalização mediada por PE e NE, no qual a NE é capaz de iniciar uma segunda onda de contração após atingir o platô, tanto em aorta de animais controle quanto sépticos. Dessa forma, concluímos que no início da sepse, a diferença de resposta vascular entre os dois ligantes do α_1 -AR está relacionada a uma modulação diferencial do NO, e que por outro lado, estágios mais tardios estão relacionados a um prejuízo da maquinaria contrátil, e independente do ligante utilizado, há perda do tônus, que é revertida por inibidores das NOS.

Palavras-chave: Sepse 1. Reatividade vascular 2. Receptores α_1 -adrenérgicos 3.

ABSTRACT

Since α_1 -adrenergic receptor ligands (α_1 -ARs) constitute a pillar of first choice in the treatment of hypotension in sepsis, this study intends to explore the behavior of α_1 -ARs in this condition. The hypothesis that supported the research is that the stimulation of α_1 -ARs by different ligands can result in a differential modulation for intracellular mediators such as nitric oxide and calcium (Ca^{2+}), affecting the capacity of vessels to increase vascular tone. We used the experimental model of sepsis induced by the cecal ligation and puncture (CLP) methodology in rats, in two stages, after CLP 6 h and 18 h. We evaluated the responsiveness of the aorta to phenylephrine (PE) and norepinephrine (NE) agonists, as well as the direct activation of the contractile machinery by CaCl_2 . The α_1 -AR receptor when activated by PE results in greater hyporesponsiveness than when activated by NE 6 h after CLP. The analysis of the basal density of the α_1 -AR receptor using the fluorescent ligand labeling technique demonstrates that there are no reductions in the density of this receptor in sepsis. Furthermore, the evaluation of the effect of sepsis on the contractile machinery in aortic rings characterizes that at 6 h after CLP, the contraction induced by CaCl_2 in Ca^{2+} free depolarizing solution is not reduced. However, more advanced stages of sepsis show loss of contractile tone to CaCl_2 . The exploration of the involved transduction pathways shows that the non-selective inhibitor of nitric oxide synthases (L-NAME) is able to increase vascular responsiveness to PE and NE in aortic rings from the control group. However, it was not able to increase vascular responsiveness to CaCl_2 . Contrary to expectations, at 6 h after CLP, selective inhibitors of induced nitric oxide synthases (iNOS), neuronal (nNOS) 1400W and S-methyl-L-thiocitrulline, respectively, increase responses to PE, but not for NE or for CaCl_2 . Analysis at a later post-CLP time point (18 h) demonstrates that blocking eNOS, iNOS and nNOS can increase vascular responsiveness to all evaluated vasoconstrictors. Interestingly, by incubating the aorta of control animals with the exogenous NO donor, sodium nitroprusside (NPS) and constructing CCRs (concentration response curves) for PE and NE, the results show differences in relation to sensitivity to NO from one vasoconstrictor to another. On the other hand, we found no differences between the two ligands regarding the entry of Ca^{2+} from the extracellular medium. Otherwise, once the contractile machinery is already activated, blocking the entry of Ca^{2+} with nicardipine is sufficient to cause loss of vascular tone in PE-induced responses, both in control and septic preparations, while in generated responses by NE, the same is not observed. Finally, we verified important particularities in the signaling mediated by PE and NE, in which NE is able to initiate a second wave of contraction after reaching the plateau, both in the aorta of control and septic animals. Thus, we conclude that at the early sepsis, the difference in vascular response between the two α_1 -AR ligands is related to a differential modulation of NO. However, late stages are related to an impairment of the contractile machinery, and regardless of the ligand used, there is loss of tone, which is reversed by NOS inhibitors.

Keywords: Sepsis 1. Vascular reactivity 2. α_1 -adrenergic receptors 3.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Protocolo experimental de avaliação do bloqueio das óxido nítrico sintases sobre a contração induzida por PE, NE e CaCl ₂	44
Figura 2 – Protocolo experimental de avaliação da segunda onda de contração	45
Figura 3 – Traçado de um experimento ilustrando as fases fásica e tônica da contração	44
Figura 4 – Ilustração da construção de CCRs ao CaCl ₂ sob o platô da contração induzida pela PE e NE 1 µM	46
Figura 5 – Protocolo experimental de avaliação dos mecanismos envolvidos na manutenção da contração, com a entrada de cálcio e a via Rho-A/Rho-cinase	48
Figura 6 – Representação esquemática do protocolo experimental do bloqueio dos canais de cálcio durante a contração induzida por PE e NE.	49
Figura 7 – Ilustração da linha temporal do protocolo experimental para investigar os mecanismos envolvidos no efeito bifásico da noradrenalina.....	50
Figura 8 – Redução da resposta contrátil ao KCl e à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos sépticos com endotélio funcional	53
Figura 9 – Anéis de aorta de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco apresentam hiporresponsividade maior para a fenilefrina 6 e 18 h após a CLP.....	57
Figura 11 – Efeito de inibidores das NOS em anéis de aorta de ratos controle	60
Figura 12 – Efeito de inibidores das NOS em anéis de aorta de ratos 6 horas após a indução de sepse	61
Figura 13 – Efeito de inibidores das NOS em anéis de aorta de ratos 18 horas após a indução de sepse	62
Figura 14 – Efeitos de bloqueadores de NO na AUC (área sob a curva) dos efeitos vasoconstritores da fenilefrina, noradrenalina e CaCl ₂ em anéis de aorta	64
Figura 15 – Efeito de doador exógeno de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (NPS), nas curvas de resposta dependentes da concentração induzida por noradrenalina e fenilefrina.....	66
Figura 16 – Registros típicos de experimentos em anéis de aorta de ratos controle incubados com NPS	67
Figura 17 – Registro típico de uma curva de resposta dependente da concentração para a noradrenalina	68

Figura 18 – A noradrenalina apresenta uma segunda onda de contração após as curvas de respostas dependentes da concentração	69
Figura 19 – A sepse não impede o efeito bifásico da noradrenalina após as curvas de respostas dependentes da concentração.....	70
Figura 20 – Redução da resposta contrátil a vasoconstritores 18 h após a CLP em aorta de ratos mantidas em solução nutritiva sem cálcio.	72
Figura 21 – Redução da fase tônica da contração para a fenilefrina e noradrenalina em 18 h após a CLP em meio isento de cálcio	72
Figura 22 – Redução da responsividade vascular para o CaCl_2 em anéis de aorta de animais sépticos pré contraídos com fenilefrina e noradrenalina.....	73
Figura 23 – Efeitos do bloqueio da Rho-cinase sobre as curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina e noradrenalina.....	75
Figura 24 – O bloqueio da entrada extracelular de cálcio com a nicardipina reduz as curvas de respostas dependentes da concentração para ambos os vasoconstritores nos grupos controle e sépticos.....	77
Figura 25 – Efeitos do bloqueio das vias Rho-A/Rho-cinase e entrada de cálcio na resposta bifásica induzida pela noradrenalina.....	79
Figura 26 – Efeitos da nicardipina sobre a contração induzida por fenilefrina e noradrenalina.	80
Figura 27 – Traçados típicos, demonstrando a contração vascular induzida por fenilefrina e noradrenalina na presença de nicardipina	81
Figura 28 – Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito bifásico da noradrenalina.....	83
Figura 29 – Avaliação do efeito bifásico da noradrenalina nos grupos controle e sépticos	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Resumo dos principais resultados encontrados na presente tese.....99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise hematológica em ratos dos grupos controle e sépticos.....	52
Tabela 2 – Valores de R_{max} e CE_{50} das curvas de respostas dependentes da concentração à fenilefrina, noradrenalina e $CaCl_2$	55
Tabela 3 – Valores de R_{max} e CE_{50} das curvas de respostas dependentes da concentração à fenilefrina, noradrenalina e $CaCl_2$	63
Tabela 4 – Influência de doador exógeno de NO sobre à CCR para a fenilefrina e noradrenalina.	65
Tabela 5 – Inibição das respostas máximas induzidas por fenilefrina e noradrenalina	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7TM Sete Domínios Transmembranares

1400W N-[3-(Aminometil)-benzil] Acetamidina

4-AP 4-aminopiridina

α_1 - ARs Receptores α_1 -adrenérgicos

β_1 -ARs Receptores β_1 adrenérgicos

β_2 -ARs Receptores β -adrenérgicos

ACs Adenilato Ciclase Solúvel

ACh Acetilcolina

AMPC Monofosfato Cíclico de Adenosina

ANOVA Análise de Variância

ATP Trifosfato de Adenosina

AUC Área Sob a Curva

Ca²⁺ Cálcio

CaCl₂ Cloreto de Cálcio

Cav-L Canais de Cálcio do tipo L

CCR Curva Concentração Resposta

CE₅₀ Concentração Efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

CLP Ligadura e Perfuração do Ceco

CORT Corticosterona

DAG Diacilglicerol

DAPI 4',6-diamidino-2-fenilindol

EDTA Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

eNOS (NOS 3) - Óxido Nítrico Sintase Endotelial

E.P.M Erro Padrão da Média

ET-1 Endotelina - 1

GCs Guanilato Ciclase Solúvel

GEFs Fatores de Troca de Nucleotídeos de Guanina

GLB Glibenclamida

GMPc Monofosfato Cíclico de Guanosina

GPCR Receptores Acoplados à Proteína G

GRADE Classificação de Análise de Recomendações, Desenvolvimento e Avaliação

GRK Cinase de Receptor Acoplado à Proteína G
GTP Trisfosfato de Guanosina
iNOS (NOS 2) Óxido Nítrico Sintase Induzida
IP₃ Trifosfato de Inositol
i.p. Intraperitoneal
KCl Cloreto de Potássio
L-NAME N- ω -nitro-L-arginina metil éster
MLCK Cinase de Cadeia Leve da Miosina
nNOS (NOS 1) – Óxido Nítrico Sintase Neuronal
NE Noradrenalina
NO Óxido Nítrico
NOS Óxido Nítrico Sintase
NPS Nitroprussiato de Sódio
OCT3 Transportador-catiônico-3
OMS Organização Mundial de Saúde
PBS Solução Tampão Fosfato
PE Fenilefrina
PFA Paraformaldeído Tamponado
PIP₂ Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato
PKC Proteína Cinase C
PLC Fosfolipase C
R_{max} Resposta máxima
s.c. Subcutâneo
RS Retículo Sarcoplasmático
RVS Resistência Vascular Sistêmica
SERCA Ca²⁺-ATPase do Retículo Sarcoplasmático
SMTC S- metil- L- tiocitrulina
TEA Tetraetilamônio
UTI Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A TEORIA DOS RECEPTORES.....	18
1.2	RECEPTORES NA ATIVAÇÃO DE VIAS INTRACELULARES	21
1.3	RECEPTORES ADRENÉRGICOS	25
1.4	VELHOS CONHECIDOS DA MEDICINA: A SEPSE E O CHOQUE SÉPTICO.....	29
1.5	CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS E CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	32
2	OBJETIVOS	36
2.1	OBJETIVO GERAL.....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	38
3.1	ANIMAIS.....	38
3.2	COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS	38
3.2.1	Preparo dos reagentes e soluções	39
3.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	40
3.3.1	Modelo de indução de sepse: ligadura e perfuração do ceco (CLP)	40
3.3.2	Dosagens hematológicas	41
3.3.3	Preparação de anéis isolados em banho de órgãos	41
3.3.4	Delineamento experimental	42
3.4	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	42
3.4.1	Efeito da sepse sobre a contração vascular à fenilefrina e noradrenalina através de curvas de respostas dependentes da concentração	42
3.4.2	Efeito da sepse sobre a contração vascular ao CaCl ₂ através de curvas de respostas dependentes da concentração	43
3.4.3	Efeito dos bloqueadores de óxido nítrico sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina, noradrenalina e CaCl ₂ em anéis de aorta	43
3.4.4	Efeito de um doador de óxido nítrico sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta.....	44

3.4.5	Avaliação da segunda onda de contração após as curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta.....	45
3.4.6	Avaliação da mobilização do cálcio intracelular e extracelular nas respostas induzidas por fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta.....	45
3.4.7	Ensaio de fluorescência para a avaliação da densidade basal de receptores α_1 - adrenérgicos nos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h	47
3.4.8	Efeito do bloqueio da via Rho-A/Rho-cinase sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta.....	47
3.4.9	Efeito do bloqueio da entrada de cálcio extracelular com a nicardipina sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta	48
3.4.10	Efeito do bloqueio da via Rho-A/Rho-cinase e nicardipina sobre a segunda onda de contração induzida pela noradrenalina em anéis de aorta.....	49
3.4.11	Efeito do bloqueio da entrada de cálcio durante a contração induzida por fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta.....	49
3.4.12	Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito bifásico da noradrenalina	50
3.5	ANÁLISE DOS RESULTADOS E TESTES ESTATÍSTICOS	51
4	RESULTADOS	52
4.1	INDICADORES HEMATOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO DA DISFUNÇÃO VASCULAR EM RATOS SÉPTICOS	52
4.2	EFEITO DA SEPSE SOBRE AS CURVAS DE RESPOSTAS DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO AOS VASOCONSTRITORES FENILEFRINA, NORADRENALINA E AO CaCl_2	54
4.3	DENSIDADE DE RECEPTORES α_1 - ADRENÉRGICOS NA AORTA DE RATOS SUBMETIDOS À CLP	57
4.4	EFEITO DO BLOQUEIO DAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES SOBRE A RESPONSIVIDADE VASCULAR PARA A FENILEFRINA, NORADRENALINA E CaCl_2	58
4.5	EFEITO DE DOADOR EXÓGENO DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE AS CURVAS DE RESPOSTA DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO INDUZIDA POR NORADRENALINA E FENILEFRINA.....	65
4.6	SEGUNDA ONDA DE CONTRAÇÃO INDUZIDA PELA NORADRENALINA EM ANÉIS DE AORTA.....	68

4.7	EFEITO BIFÁSICO DA NORADRENALINA EM AORTA DE ANIMAIS SUBMETIDOS A CLP	70
4.8	CONTRATILIDADE INDUZIDA POR FENILEFRINA E NORADRENALINA EM MEIO LIVRE DE CÁLCIO.....	71
4.9	AVALIAÇÃO DA ENTRADA DE CÁLCIO DO MEIO EXTRACELULAR INDUZIDA POR FENILEFRINA E NORADRENALINA NOS GRUPOS CONTROLE E SÉPTICOS	71
4.10	EFEITO DO COMPOSTO Y-27632 NAS CURVAS DE RESPOSTAS DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO PARA A FENILEFRINA E NORADRENALINA	73
4.11	AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO POR 30 MINUTOS COM O COMPOSTO Y-27632 NO EFEITO BIFÁSICO INDUZIDO PELA NORADRENALINA	74
4.12	EFEITO DO BLOQUEIO DA ENTRADA DE CÁLCIO SOBRE AS CURVAS DE RESPOSTAS DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO PARA A FENILEFRINA E NORADRENALINA	76
4.13	AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO POR 30 MINUTOS COM A NICARDIPINA SOBRE O EFEITO BIFÁSICO INDUZIDO PELA NORADRENALINA	78
4.14	EFEITO DO BLOQUEIO DA ENTRADA DE CÁLCIO EXTRACELULAR DURANTE A CONTRAÇÃO COM FENILEFRINA E NORADRENALINA	79
4.15	INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO BIFÁSICO DA NORADRENALINA	82
5	DISCUSSÃO	85
6	CONCLUSÃO.....	100
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

1 INTRODUÇÃO

1.1 UM BREVE HISTÓRICO SOBRE A TEORIA DOS RECEPTORES

A ciência é construída ao longo do tempo por contribuição de inúmeros trabalhos. Isso fica evidente no conceito de receptores que temos hoje, o qual se remete a séculos atrás. A história dos receptores começa com os experimentos de John Newton Langley na Inglaterra no ano de 1873, ao estudar as ações que diversas drogas e venenos exerciam sobre os diferentes tecidos. Ainda, persistindo neste contexto de pesquisa e após mais de 30 anos de trabalho, Langley utiliza pela primeira vez em seu artigo publicado em 1905, o termo “substância receptiva”, para descrever as ações que a nicotina e o curare exerciam sobre os músculos, considerando que nas células, dois constituintes devem ser distinguidos, um relacionado com as funções celulares e outro denominado “substância receptiva” (LANGLEY, 1905). Supôs também que a nicotina, o curare, a atropina, a pilocarpina, a estricnina e a maioria dos outros alcaloides, bem como secreções internas, produzem seus efeitos combinando-se com a substância receptiva (LANGLEY, 1909).

Outro pesquisador importante na elucidação desse conceito foi o alemão Paul Ehrlich, que ao desenvolver sua teoria sobre as cadeias laterais para a formação de anticorpos, embasado na sua pesquisa sobre a coloração das células - onde observou que o processo de coloração dependia da reação do corante com algum componente da célula (PRULL, 2003) - influenciou de maneira considerável as ideias de Langley (LANGLEY, 1909). Apesar de, na época a ideia sobre a existência de receptores ainda ser filosófica, teorias sobre a interação droga-receptor e conceitos da farmacologia clássica começaram a surgir a partir de previsões matemáticas. Em 1909, Archibald Vivian seguindo a caracterização de Langley sobre os efeitos do curare e da nicotina no músculo reto abdominal de sapo, infere uma relação entre a concentração de nicotina e a resposta de equilíbrio no músculo, avaliando o curso temporal das respostas. Dessa forma, sugere que a nicotina e o curare estão interagindo quimicamente com algum constituinte do músculo (HILL, 1909). Os experimentos de Hill serviram de base para o que mais tarde ficou conhecida como a equação de equilíbrio de Hill-Langmuir.

A teoria clássica dos receptores evoluiu cronologicamente embasada em estudos quantitativos. Alfred Joseph Clark iniciou a teoria sobre a ocupação dos

receptores ao estudar o efeito da acetilcolina em tiras isoladas de ventrículo e músculo reto abdominal de sapo na presença do antagonista (atropina), utilizando concentrações crescentes de acetilcolina, e traçando curvas conhecidas como logarítmicas de concentração-resposta. Clark fundamentou que a ação da acetilcolina é proporcional ao grau de combinação com algum elemento do músculo, e que a intensidade do efeito farmacológico é diretamente proporcional ao número de receptores ocupados pela substância, correlacionando-se assim de maneira linear, a resposta do tecido com a ocupação dos receptores pela droga (CLARK, 1926b). Nesse sentido, Clark previu um dos modelos mecanicistas mais simples de interação ligante-receptor, em que o receptor possui um único local para a ligação do ligante (WEISS et al., 1996). Nesta mesma época Gaddum (1926), ao estudar os efeitos da adrenalina em preparações isoladas de útero de coelho, assim como Clark, utilizou curvas de respostas dependentes da concentração e mostrou o clássico deslocamento para a direita da curva do agonista na presença do antagonista competitivo (no caso, a ergotamina), concluindo que existia uma área no músculo que a adrenalina deveria agir, e que uma fração desta área seria bloqueada pela ergotamina, de forma que a concentração de adrenalina na presença de ergotamina deveria ser aumentada para produzir o mesmo efeito (GADDUM, 1926). Outro trabalho publicado por Clark nesse mesmo ano fez menção aos experimentos de Gaddum e mostrou que o antagonismo entre a adrenalina e ergotamina segue um curso semelhante ao antagonismo entre a atropina e a acetilcolina. Além disso Clark concluiu que a atropina e a acetilcolina, pareciam estar ligadas a receptores diferentes nas células cardíacas (CLARK, 1926a), embora mais tarde tenha se provado o contrário.

As questões referentes às interações ligante-receptor continuavam sem respostas, principalmente quando se tratava de antagonista (eficácia nula). Diante disso, Heinz, Otto e Schild em 1947, por meio de dados funcionais da resposta de vários antagonistas de histamina e acetilcolina em íleo isolado de cobaia, expôs uma nova medida de antagonismo, designada de pA_2 (constante de equilíbrio para medir a ligação de um antagonista), que pode ser usada para estimar as afinidades de antagonistas (os conhecidos gráficos de Schild). Além disso, sugeriu que quando o mesmo antagonista antagoniza duas drogas distintas, o mecanismo envolvido pode ser diferente (SCHILD, 1947).

A compreensão dos mecanismos que faziam com que uma substância fosse biologicamente ativa tornou-se o centro das investigações. Nessa perspectiva, Everhardus Jacobus Ariens, interpretou as interações entre o fármaco e o receptor como o começo de uma atividade biológica. Ainda, se propôs a pensar nos conceitos de “afinidade” e “atividade intrínseca”, no qual a afinidade determina o grau de ocupação do receptor, enquanto a atividade intrínseca representa a capacidade da droga de contribuir para o efeito, uma vez que ela interage com o receptor. No entanto Ariens ainda chegou à conclusão de que o conceito de receptor era basicamente operacional (ARIENS; SIMONIS, 1967). Posteriormente, uma revisão publicada por Robert Francis Furchgott em 1955, ponderou que a suposição de Clark sobre uma relação linear entre a ocupação do receptor e a resposta observada no tecido, não explicaria o mecanismo de ação de várias drogas no músculo liso vascular, e atribuiu essa falha à falta de conhecimento sobre a natureza dos receptores, com uma lacuna de questões a serem respondidas (FURCHGOTT, 1955).

Na busca pela compreensão de respostas, Robert Stephenson em 1956, levantou várias hipóteses acerca da interação ligante-receptor e assim, introduziu o termo “eficácia”, que juntamente com a afinidade, determina a potência de um agonista. Nestes aspectos, a “eficácia” difere da “atividade intrínseca” que, conforme definido por Ariens, é diretamente proporcional à fração de receptores ocupados pelo agonista, enquanto para Stephenson, alguns agonistas totais podem produzir uma resposta máxima de um tecido quando apenas uma fração pequena dos receptores é ocupada. Ainda Ariens estabeleceu que compostos com uma baixa eficácia (intermediário entre a resposta de um agonista total e antagonista), eram chamados de “agonistas parciais”. No mais, Stephenson incluiu que a abordagem para estudar a ação de drogas não era universalmente popular entre farmacologistas, e alguns de fato desprezavam as discussões em termos de receptores (STEPHENSON, 1956).

Nesta mesma época, publicado em 1948 um conceito a respeito de receptores, por Raymond Perry Ahlquist, sobre o efeito de diferentes aminas na pressão arterial de gatos, cães e coelhos, bem como em preparações de tecidos isolados, descreveu a existência de dois tipos de receptores, embasado na habilidade de respostas dessas aminas em causar excitação ou inibição da célula efetora. O primeiro tipo de receptor foi chamado de “receptor alfa” e o segundo tipo de “receptor beta” (AHLQUIST, 1948). Cabe destacar que os experimentos de Ahlquist foram imprescindíveis para “trazer os receptores à vida” e contribuiu de maneira significativa para o desenvolvimento de

fármacos, principalmente com ação no sistema cardiovascular, muito utilizados na clínica nos dias de hoje, sobre os quais será discorrido em páginas posteriores.

Uma nova teoria foi apresentada em 1961 pelo farmacologista William Drummond Macdonald Paton, embasada na taxa de combinação droga-receptor, e não na proporção de receptores ocupados pela droga. Seus experimentos foram testados em íleo isolado de cobaia, utilizando acetilcolina e histamina como agonistas, hioscina, mepiramina e atropina como antagonistas e compostos alquil-trimetil amônio como agonistas parciais (PATON, 1961). Apesar das diferenças entre as teorias reportadas até então, todas elas apresentavam uma conclusão em comum, a de que a resposta em equilíbrio provavelmente seria decorrente da concentração do complexo agonista-receptor (MACKAY, 1966). Dessa forma, foi através das ideias e experimentos desses pesquisadores e muitos outros não citados, que um vasto campo foi aberto e que se teve a concepção de receptor como estrutura funcional. Mesmo muitos anos após, permanecia a pergunta: o que se encontra entre a ativação do receptor e a resposta biológica?

1.2 RECEPTORES NA ATIVAÇÃO DE VIAS INTRACELULARES

Os estudos sobre a interação ligante-receptor estavam vinculados a uma perspectiva biofísica. Ariens, Furchgott, Clark, Stephenson, Schild, Gaddum e Paton investigaram o conceito de receptores por um prisma teórico e em termos de equações matemáticas (RUBIN, 2007). O conceito de receptores como elementos sensoriais (RODBELL, 1995), ou seja, sobre a capacidade da interação ligante-receptor ativar uma via de transdução intracelular, teve base nos experimentos de Earl Wilbur Sutherland Jr. e Theodore Rall no final da década de 50 e início da década de 60, com a identificação de um composto chamado monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) (GILMAN, 1989; RALL; SUTHERLAND, 1958; SUTHERLAND; RALL, 1958). Pouco tempo depois, foi identificada a enzima responsável pela formação do AMPC, a adenilil ciclase (SUTHERLAND; RALL; MENON, 1962). Um novo e importante sistema enzimático havia sido revelado entre a ocupação do receptor e a resposta biológica o que deu sequência a estudos sobre as vias de transdução. Dessa forma, experimentos realizados em 1965 começaram a desvendar a via de transdução da adrenalina em coração isolado e perfundido de rato, sugerindo que a adrenalina agia

primeiro no sistema da adenilil ciclase da membrana para aumentar a taxa de formação de AMPc, atuando como um segundo mensageiro para iniciar a resposta inotrópica. Um detalhe importante foi a observação de que quando o AMPc que não acessa o meio intracelular, era adicionado ao perfusato as respostas não ocorriam (ROBISON et al., 1965), o que sugeria um efeito no interior da célula. Em 1967, um trabalho publicado por Sutherland, sugeriu que a enzima e o receptor β -adrenérgico podiam ser a mesma coisa. Além disso, especulou que o receptor α -adrenérgico também pode estar relacionado à adenilil ciclase, concluindo que os receptores adrenérgicos α e β poderiam representar diferentes locais para a interação hormônio-enzima na molécula da adenilil ciclase (ROBISON; BUTCHER; SUTHERLAND, 1967).

A década de 1960 marca um grande avanço, além de descobertas importantes como a descrição de um sistema enzimático, a teoria dos receptores proposta por Ahlquist segue o rumo terapêutico. Nessa perspectiva, em 1954 James Black inspirado na leitura do capítulo de um livro-texto sobre a farmacologia adrenérgica escrito por Ahlquist, desenvolveu o primeiro medicamento beta bloqueador, nomeado propranolol e introduzido na clínica em 1965. Na época, James Black buscava um medicamento que diminuiria a demanda miocárdica de oxigênio para o tratamento de angina. Black afirmou que o conceito de Ahlquist forneceu a base para o desenvolvimento dos compostos beta bloqueadores (ROCKMAN; LEFKOWITZ, 2011).

Durante a década de 1970, alguns pontos da via de transdução de sinal intracelular começaram a emergir. Rudbel e colaboradores, observaram que os nucleotídeos de guanina mediavam a ativação da adenilil ciclase pelo glucagon (RODBELL et al., 1971). Com base nos resultados obtidos, propuseram a existência de um sistema constituído por um discriminador (receptor), que recebia as informações de fora da célula, um transdutor (dispositivo de acoplamento projetado para permitir a comunicação entre o discriminador e o amplificador), e um amplificador (adenilil ciclase) que intensificaria os sinais do AMPc para iniciar as reações dentro da célula. No entanto, o conceito de transdutor ainda requeria evidências quanto a sua estrutura e função entre o receptor e a enzima (RODBELL, 1995; KRESGE; SIMONI; HILL, 2006). Apesar de algumas das características fundamentais do sistema de receptor acoplado através de proteínas de ligação à guanosina trifosfato (GTP) terem sido delineadas por Robdel, mais detalhes deste processo seriam revelados mais tarde por Alfred Gilman, que purificou a primeira proteína G em células de linfoma. Em

1976, Ross e Gilman purificaram uma proteína denominada como G estimulatória (Gs; para ligação do GTP e estimulação da adenilil ciclase). Esses experimentos serviram de base para a descoberta de várias famílias de proteínas G. Assim, depois de purificar a proteína Gs e identificar as três subunidades que a compõe, o laboratório de Gilman passou a identificar e purificar uma segunda proteína G heterotrímica, chamada de Gi, a qual era capaz de inibir a adenilil ciclase (GILMAN, 1995). Todos esses experimentos serviram de base para a descoberta de várias famílias de proteínas G e colaboraram na resolução de um mistério de longa data sobre a transdução de sinal intracelular, em que os receptores são capazes de detectar a presença de uma diversidade de moléculas fora da célula e iniciar uma variedade de cascatas de sinalização (LATORRACA; VENKATAKRISHNAN; DROR, 2016).

Ao encontro da descoberta da proteína G na transdução de sinal intracelular, a via formada pela quebra de fosfatidilinositol vinha se mostrando importante. Um trabalho publicado em 1975 já relatava evidências que sugeriam que a ligação entre o receptor e a quebra de fosfatidilinositol não poderia ser uma simples questão de controle de uma enzima pelo receptor ativado (MICHELL, 1975). Anos mais tarde, outro trabalho publicado em novembro de 1984 na revista Nature, relata que houve um progresso no entendimento dos receptores que são capazes de ativar um sinal intracelular pela hidrólise do fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, em diacilglicerol e trisfosfato de inositol como parte de um mecanismo de transdução de sinal com a finalidade de controlar uma variedade de processos celulares, no qual o diacilglicerol ativa a proteína quinase C, enquanto que o inositol trisfosfato é liberado no citoplasma para atuar como um segundo mensageiro para a mobilização do cálcio intracelular (BERRIDGE; IRVINE, 1984). No entanto, a natureza da proteína G que estava ativando a fosfolipase C (PLC) continuou desconhecida ao longo da década de 1990 (ABDEL-LATIF, 1989).

A arquitetura estrutural dos receptores acoplados à proteína G (GPCRs) começou a ser elucidada ainda na década de 1980, por dois laboratórios distintos, sendo um deles o de Ovchinnikov, na antiga União Soviética, e o de Hargrave, nos Estados Unidos. Ambos os grupos de pesquisa realizaram estudos com a rodopsina bovina (receptor ativado por fótons de luz), identificaram a sequência completa de aminoácidos que compõe a estrutura do receptor, com destaque para o fato de que o mesmo era composto por sete domínios transmembranares (7TMs), ligados através de uma conformação helicoidal (COSTANZI et al., 2009), também conhecido como

“receptores serpentina” (HARIHARAN; NAIR; SAINI, 2013). Hoje é conhecido que, além de 7TMs hidrofóbicos e de segmentos α -helicoidais separados por uma alça intracelular e extracelular alternadas, esses receptores possuem também locais para regulação da fosforilação em domínios citoplasmáticos e sequências para glicosilação no aminoácido terminal (ROSENBAUM; RASMUSSEN; KOBILKA, 2009).

Pesquisas sobre a estrutura, regulação, distribuição celular e propriedades de sinalização da família dos GPCRs continuaram em rápido progresso na década de 1990 (MILLIGAN, 1998), e as peças do quebra-cabeça das vias de transdução começaram a se encaixar. Um trabalho publicado em 1992 mostrou a participação da subunidade alfa G_q da proteína G na regulação da atividade da PLC, e na mobilização de cálcio intracelular através de ativação pelo ligante (STERNWEIS; SMRCKA; GUTOWSKI, 1992). Um trabalho de revisão, publicado em 1993, descreveu os respectivos caminhos da proteína G e amplificação do sinal (SCHWINN, 1993), e permite compreender de forma bastante precisa o quanto já era conhecido até aquele momento. Em 1994, o Prêmio Nobel de medicina e fisiologia foi concedido a Martin Rodbell e Alfred G. Gillman, pela descoberta das proteínas G heterotriméricas, o que por conseguinte iniciou um novo capítulo na teoria dos receptores e vias de transdução. Esse novo capítulo é continuado nos anos 2000, com a obtenção de consideráveis avanços em termos de receptores, como o trabalho publicado por Palczewski e colaboradores na revista Science, em que mostrou a primeira estrutura cristalina de raios-X de alta resolução dos GPCRs, fornecendo importantes particularidades estruturais (PALCZEWSKI et al., 2000). Ademais, Lefkowitz, no ano 2000, publicou um trabalho ressaltando que a abordagem para o estudo dos receptores que se tem hoje, seria inimaginável para os cientistas que um século antes, introduziram a ideia de receptores (LEFKOWITZ, 2000). Sete anos depois, a elucidação da estrutura cristalina de alta resolução do receptor β_2 adrenérgico humano acoplado à proteína G foi determinada pelo grupo de Brian Kobilka (RASMUSSEN et al., 2007). Em 2012, Robert Lefkowitz e Brian Kobilka foram agraciados com o prêmio Nobel, pela elucidação da estrutura do receptor β adrenérgico, através de técnicas de ligação com radioligantes, solubilização, purificação e reconstituição de quatro receptores adrenérgicos conhecidos na época (para revisão sobre o tema ver LEFKOWITZ, 2013).

Por linhas históricas, ao contrário do que se pensava no passado, foi mostrado que os receptores são mais do que “entidades hipotéticas” ou um “conceito abstrato”

como descrito por Ahlquist em 1948. Assim, desde que Langley utilizou pela primeira vez a palavra substância receptiva em 1905, até os dias de hoje, 116 anos se passaram e um vasto caminho de novos conhecimentos e um agregado de descobertas foram e continuam sendo construídos. A seguir, o texto será limitado para um tipo de receptor em especial - os receptores adrenérgicos - objeto de estudo deste trabalho.

1.3 RECEPTORES ADRENÉRGICOS

Os receptores adrenérgicos são membros da grande família de GPCRs. Eles foram reconhecidos como membros desta família desde o primeiro clone do receptor β_2 -adrenérgico, quando foi revelado que o receptor apresentava sete domínios transmembranares (7TM) como a rodopsina (DIXON et al., 1986). Assim, com a primeira sequência clonada de um GPCR (receptor β_2 -adrenérgico), foi possível observar todas as características agora vistas como canônicas para a família conhecida por 7TM (LEFKOWITZ, 2013). Em 1967, Lands e colaboradores, com base na resposta tecidual de diferentes aminas simpaticomiméticas, identificaram que a população de receptores β pode ser dividida em dois grupos distintos, β_1 (encontrado no coração, tecido adiposo e intestino delgado), e β_2 (encontrado no útero, diafragma, bronquíolos e leito vascular) (LANDS; LUDUENA; BUZZO, 1967). Durante a década de 1970, quatro subtipos de receptores adrenérgicos já eram conhecidos: α_1 e α_2 , β_1 e β_2 (SCHWINN, 1993). Em 1986, Morrow e Creese, por meio de estudos com radioligantes, marcaram os receptores α_1 -adrenérgicos no sistema nervoso central de ratos, mostrando que este constitui um grupo diverso de receptores, denominando-os de α_1A e α_1B (MORROW; CREESE, 1986). Mais tarde, um trabalho publicado em 1991, mostrou a existência de um terceiro subtipo de receptor alfa chamado de α_1D , que foi descoberto através de um clone de cDNA que codifica uma proteína de 560 aminoácidos, correspondente à topologia dos GPCRs de ligação ao nucleotídeo de guanina (PEREZ; PIASCIK; GRAHAM, 1991). Nos últimos anos ficou bem claro que os receptores adrenérgicos constituem uma família heterogênea de receptores, através da identificação de genes que codificam nove subtipos diferentes de receptores, sendo três β (β_1 , β_2 , β_3), três α_1 (α_{1A} , α_{1B} e α_{1D}), e três subtipos de receptores α_2 (α_{2A} , α_{2B} e α_{2C}) (COTECCHIA; STANASILA; DIVIANI, 2012). Para mais

detalhes, ver revisões recentes (AKINAGA; GARCÍA-SÁINZ; PUPPO, 2019; (DOCHERTY, 2019).

Embora o sistema vascular expresse os três subtipos de receptores α_1 , há predominância de subtipos específicos em diferentes artérias (AKINAGA; GARCÍA-SÁINZ; PUPPO, 2019; DALY et al., 2002). Estudos utilizando camundongos knockout para o receptor α_{1A} , mostram que eles são expressos em artérias de resistência, e são necessários para a regulação e manutenção da pressão arterial (ROKOSH; SIMPSON, 2002), além de serem expressos nas artérias renal (HROMETZ et al., 1999) e caudal (LACHNIT et al., 1997; FLACCO et al., 2013), no caso de roedores. Uma publicação do grupo de pesquisa de Daly et al., (2002), utilizando camundongos knockout para o subtipo de receptor α_{1B} , indicou que esses receptores apresentam menor participação na vasoconstrição quando avaliada a resposta funcional à fenilefrina em artérias como aorta, carótida, caudal e ramos de artéria mesentérica de primeira ordem. No entanto, apesar do papel menor na vasoconstrição, tais receptores são acoplados a vários processos metabólicos e celulares (ZUSCIK et al., 2001). Um outro subtipo de receptor importante é o α_{1D} , expresso predominante em artérias como a aorta, ilíacas, mesentéricas superiores e pulmonares (PIASCIK et al., 1995; HUSSAIN; MARSHALL, 1997). Um estudo conduzido por Rudner et al., (1999), mostrou que em artérias humanas o subtipo α_{1D} é encontrado na aorta, e artérias omentais, pulmonares e femoral. Foi demonstrado também que a ativação do receptor α_{1D} leva a uma vasoconstrição persistente e um decaimento lento após a remoção do agonista, evitando mudanças bruscas no calibre dos vasos, ao contrário dos receptores α_{1A} , que são necessários para respostas rápidas e de curta duração, permitindo um ajuste fino do tônus contrátil (FLACCO et al., 2013). Embora seja mostrada a coexpressão dos três subtipos de receptores, na camada do músculo liso vascular, ainda não é claro por que o tecido muscular expressaria os três subtipos de receptores, sendo que todos poderiam potencialmente ativar a contração (HROMETZ et al., 1999). Dessa forma, o significado funcional da heterogeneidade dos receptores α_1 , bem como sua relevância fisiológica, permanece em grande parte desconhecida (TANOUE et al., 2002).

Os receptores α_1 , além de serem expressos na superfície da célula, são encontrados também em compartimentos intracelulares (HROMETZ et al., 1999). Corroborando com essas descobertas, foi mostrado através de técnicas de imunocitoquímica, que o subtipo α_{1D} também é encontrado expresso em

compartimentos intracelulares em células musculares lisas de aorta humana (GARCÍA-CAZARÍN et al., 2008). No mais, um trabalho recente mostrou que os receptores adrenérgicos α_1 também são encontrados na membrana nuclear, permitindo a estimulação de diversas vias de sinalização, sendo que sua ativação pode estar envolvida em mecanismos que causam hipertrofia cardíaca, condição majoritariamente atribuída aos receptores de angiotensina (DAHL et al., 2018).

Como já demonstrado por diversos pesquisadores, conforme discorrido acima, receptores são capazes de ativar cascatas intracelulares que culminam em respostas teciduais. A elucidação desses mecanismos tem sido de interesse da ciência há anos. Um exemplo disso é o trabalho intitulado “Adrenoceptors as models for G protein-coupled receptors: structure, function and regulation”, publicado no ano de 1993, que já ilustrava a via de transdução dos receptores adrenérgicos, fazendo algumas observações interessantes vistas de grande importância e de forma muito clara nos dias atuais, dentre as quais podemos destacar i) “curiosamente os receptores α_1 adrenérgicos ativam um caminho diferente dos receptores α_2 ”; ii) “a ativação dos receptores α_1 adrenérgicos por agonistas, permite o acoplamento do receptor com a recém descrita proteína G (G_q)” (SCHWINN, 1993). De fato, quando esses receptores são estimulados por agonistas, ocorre a ativação da proteína G ($G_{q/11}$) e isso resulta no estímulo de vias intracelulares, sendo uma das principais vias ativadas a da fosfolipase C que hidrolisa as moléculas de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) presentes na membrana plasmática, resultando na produção de dois segundos mensageiros: o diacilglicerol (DAG) e o trifosfato de inositol (IP_3). O IP_3 é uma molécula solúvel que se difunde no meio intracelular interagindo com receptores específicos no retículo endoplasmático, atuando na liberação de cálcio para o meio intracelular. Junto à via de contração, uma via de manutenção da contração é necessária, uma vez que a concentração de cálcio no meio intracelular é transitória e a resposta contrátil é então mantida por um mecanismo de sensibilização ao cálcio, garantido pela inibição da miosina fosfatase, pela enzima Rho-cinase, que por sua vez é ativada pela pequena GTPase Rho-A. A natureza precisa da ativação da Rho-A pelo GPCR não é inteiramente clara, mas envolve um fator de troca de nucleotídeos de guanina (RhoGEF) e migração de Rho-A para a membrana plasmática. Após a ativação, a Rho-A aumenta a atividade da cinase Rho, levando à inibição da miosina fosfatase, assim impedindo o relaxamento, uma vez que a cadeia leve da miosina não pode ser defosforilada. Dessa forma, a via Rho-A/Rho-cinase contribui para o

processo de manutenção da contração do músculo liso vascular (para detalhes ver HILGERS; WEBB, 2005).

Novos conceitos sugerem que os receptores adrenérgicos estão sujeitos a uma ampla variedade de controle e influências, resultando na regulação dinâmica dos sítios receptores e sua sensibilidade às catecolaminas. Ademais, com o maior entendimento acerca das interações ligante-receptor, a ideia de receptores como um sistema estático, de estruturas rígidas, fixas e inflexíveis, operando de forma linear foi desconstruída, mostrando-se que os receptores são estruturalmente plásticos, flexíveis e dinâmicos no espaço e tempo (FLORDELLIS, 2012). Esses novos conceitos têm sido explorados e aplicados aos receptores adrenérgicos, revelando que a sinalização adrenérgica envolve mecanismos intracelulares complexos (LOHSE, HOFMANN, 2015). Embora muito se tenha investigado sobre os GPCRs, acreditava-se que eles poderiam ter diferentes eficácias, mas que cada agonista ativaria um conjunto semelhante de proteínas de sinalização, uma vez que era preconizado que todos os agonistas ativariam um único estado ativo de conformação do receptor, e se pensava que apenas a força do sinal transmitido determinaria a magnitude da eficácia observada (KENAKIN; CHRISTOPOULOS, 2013). Atualmente, é claro que os GPCRs apresentam várias conformações, as quais permitem o acoplamento com um ou mais sistemas efetores (GESTY-PALMER; LUTTRELL, 2011). Dessa forma, diferentes agonistas podem estabilizar diferentes estados ativos de receptores, podendo levar a um viés de sinalização no qual algumas vias de sinalização citosólicas são ativadas preferencialmente (KENAKIN; MORGAN, 1989). Assim, tornou possível o entendimento que, um ligante pode ativar ou inibir apenas um subconjunto dos sinais (GESTY-PALMER; LUTTRELL, 2011). Qualquer um dos três componentes de um complexo ternário, o ligante, receptor e/ou o transdutor podem contribuir para o viés de resposta (SMITH; LEFKOWITZ; RAJAGOPAL, 2018) e os ligantes podem influenciar seletivamente alguns comportamentos do receptor e não outros (KENAKYN, 2002).

Estudos de comportamentos de drogas indicam que algumas moléculas podem induzir alguns desses efeitos enviesados, mas outras não, e que ocasionalmente um fármaco/ligante pode alterar o comportamento do receptor. Um trabalho publicado por Kohout et al., (2004), mostrou que mesmo distintos ligantes endógenos que atuam no mesmo receptor podem apresentar seletividade funcional para ajustar a sinalização. Ampliando esse conceito, um trabalho liderado por Reiner et al., (2010), sugere que o

viés de sinalização também existe para os agonistas endógenos de receptores β_2 adrenérgicos (β_2 -ARs).

Esse novo conceito é aplicável para os receptores adrenérgicos, conforme trabalhos recentes vêm ilustrando. Além disso, já foi mostrado que vários GPCRs, tal como os receptores β_2 -ARs, iniciam a sinalização a partir de mais um local subcelular (IRANNEJAD et al., 2013). Por exemplo, o aumento do tônus adrenérgico resultante do estresse cardiovascular leva ao desenvolvimento de insuficiência cardíaca, em parte, através da estimulação crônica de receptores adrenérgicos β_1 (β_1 -ARs) nos miócitos cardíacos, sugerindo que a ativação dos β_1 -ARs contribui para a ativação de vias hipertróficas que podem ser ativadas pela noradrenalina com implicações para o desenvolvimento de terapias mais eficazes com β -bloqueadores (NASH et al., 2019).

É evidenciado que os receptores adrenérgicos são altamente homólogos, enquanto ao mesmo tempo, exibem afinidade por uma grande diversidade de ligantes e interagem com diferentes proteínas G, de forma que a compreensão dessa diversidade pode ser a chave para o desenvolvimento de medicamentos seletivos (MICHELOTTI; PRICE; SCHWINN, 2000).

É conhecido que a interação ligante-receptor α_1 -adrenérgico é essencial para a homeostase, controlando uma pluralidade de efeitos fisiológicos extremamente importantes. Dessa forma, drogas que tenham como alvo os receptores adrenérgicos são alguns dos agentes terapêuticos mais utilizados na clínica (MICHELOTTI, PRICE, SCHWINN, 2000). Por conseguinte, drogas que mimetizam (agonistas), são amplamente utilizadas para reverter quadros de hipotensão e choque, o que será discutido nas páginas seguintes.

1.4 VELHOS CONHECIDOS DA MEDICINA: A SEPSE E O CHOQUE SÉPTICO

A sepse é uma patologia complexa e grave que acompanha a humanidade há séculos, desafiando médicos e cientistas. Sua definição foi revisitada na terceira conferência de consenso realizada em 2016, sendo redefinida como “uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção”. O choque séptico por sua vez, ficou definido como “um subconjunto de sepse no qual as anormalidades subjacentes do metabolismo circulatório e celular são profundas o suficiente para aumentar a mortalidade”, e nesse caso ocorre hipotensão refratária à reposição volêmica sendo necessário a utilização de vasoconstritor para

manter uma pressão arterial média acima de 65 mmHg (SINGER; DEUTSCHMAN; SEYMOUR, 2016).

Apesar de ser descrita há séculos, a sepse seguida do choque séptico é uma das principais causas de morte em adultos em unidades de terapia intensiva (UTI) (BERG; GERLACH, 2018). Além disso, o combate à sepse se faz mais urgente do que nunca, uma vez que no ano de 2019 o mundo foi acometido pela pandemia causada pelo vírus SARS-CoV-2 e sua doença associada COVID-19, sendo a principal causa de morte a insuficiência respiratória e início de sepse (LÓPEZ-COLLAZO et al., 2020). Um trabalho publicado por Zhou et al., (2020), demonstrou que a sepse foi uma complicação comum entre os pacientes com COVID-19, no qual, mais da metade dos pacientes avaliados progrediram para um quadro séptico. Ainda, de acordo com dados do *site* da Global Sepsis Alliance (2020), a sepse é a via comum para a morte da maioria das doenças infecciosas, incluindo as virais, como a COVID-19.

Além do mais, em 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS), declarou a sepse como uma doença de prioridade global à saúde, necessitando de atenção especial devido à sua alta prevalência e mortalidade em todo o mundo (REINHART et al., 2017). Corroborando com esses dados, um estudo conduzido no Brasil com a participação de cerca de 30% dos leitos de UTI adulto do país, com dados de 190.999 pacientes hospitalizados, entre 2010 e 2016, em 638 UTIs de 349 hospitais públicos e privados que faziam parte do projeto UTIs brasileiras, mostrou um aumento progressivo do número de casos de sepse nas UTIs brasileiras de 19,4% do total de internações em 2010 para 25,2% em 2016, apesar de uma redução nas taxas de mortalidade de 39% em 2010, para 30% em 2016 (LOBO; REZENDE; MENDES, 2019). Cabe destacar que, em relação aos custos para admissões e readmissões hospitalares, comparado com as quatro principais doenças monitoradas pelo Programa de Redução de Readmissão Hospitalar (infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca congestiva, pneumonia e doença pulmonar obstrutiva crônica), a sepse continua sendo a condição mais onerosa (DANNA, 2018).

Publicações recentes destacam um melhor entendimento da fisiopatologia da sepse, a qual envolve múltiplos aspectos de interação entre os microrganismos infectantes e o hospedeiro (SALOMÃO; FERREIRA; SALOMÃO, 2019), com múltiplas cascatas sobrepostas, podendo progredir de uma infecção localizada para uma inflamação sistêmica, e por fim culminar em quadro de choque séptico, no qual o sistema cardiovascular é gravemente comprometido (GOTTS; MATTHAY, 2016).

Uma condição importante na falência cardiovascular observada na sepse é a vasoplegia (resistência vascular sistêmica (RVS) baixa, que se manifesta como hipotensão profunda), um fenômeno complexo centrado na reatividade vascular e que apresenta múltiplos mecanismos, que podem contribuir para o dano vascular (UKOR; WALLEY, 2019). Isto posto, a linha de conhecimento que se tem hoje, acerca da vasoplegia na sepse, compreende a participação de alguns mediadores, como por exemplo o óxido nítrico (NO), que de forma breve será discorrido abaixo.

A produção de NO acontece a partir do aminoácido L-arginina através de um conjunto de enzimas conhecidas como óxido nítrico sintases (NOS) (FÖRSTERMANN; KLEINERT, 1995). Existem três subtipos de NOS: a endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e induzida (iNOS) (para mais detalhes ver revisão de ALDERTON et al., 2001). A estrutura molecular, enzimologia e farmacologia dessas enzimas por meio de novas abordagens experimentais, revelou a importância das NOS em diversos campos, como, na biologia neuronal, renal, pulmonar, gastrointestinal, do músculo esquelético, reprodutiva e cardiovascular (para revisão sobre o assunto ver MUNGREE et al., 2003).

O NO é uma pequena molécula sinalizadora que embora seja quimicamente simples, pode atuar de maneira bastante específica, sendo capaz de controlar uma diversidade de funções, dentre elas o controle do tônus vascular. A sua importância na regulação do tônus vascular é reconhecida desde sua descoberta há três décadas (VANE, 1994), sendo demonstrado que a formação de NO pelo endotélio desempenha um papel na regulação da pressão arterial e na ação hipotensora da acetilcolina (REES; PALMER; MONCADA, 1989). Além disso, um trabalho publicado por Vallance, Collier e moncada (1989), demonstra o papel regulador do NO no fluxo sanguíneo basal de humanos, em que a inibição das NOS com L-NAME em artérias braquiais, foi capaz de provocar uma redução de 50% no fluxo sanguíneo basal, além de atenuar a resposta vasodilatadora para a acetilcolina.

A maioria dos especialistas concordam que o NO é uma molécula de cardioproteção potente e eficaz (STRIJDOM; CHAMANE; LOCHNER, 2009). No entanto, há um equilíbrio delicado entre suas funções fisiológicas (como seu papel na resposta à infecção) até sua produção exagerada levando à disfunção cardiovascular (LAMB DEN, 2019). Conhecer essa medida pode ser uma chave importante para o melhor entendimento da modulação deste mediador na sepse. Esse equilíbrio fica evidente em um estudo, no qual se realizou a administração intravenosa do inibidor

não seletivo das NOS (546C88) em pacientes com sepse, mostrando que a sua inibição colaborou com um aumento da mortalidade (LÓPEZ; LORENTE; STEINGRUB, 2004). É observado que a sua participação na sepse é descrita na literatura desde 1990, onde já era demonstrada a utilidade de inibidores das NOS na reversão do choque endotóxico em cães (KILBOURN et al., 1990). Esses estudos se estendem até os dias atuais, no qual tem se buscado melhor compreensão deste mediador na sepse.

Outro caminho que contribui para a vasoplegia, é a regulação negativa de receptores para vasoconstritores (receptores de angiotensina, receptores adrenérgicos e receptores de vasopressina) como demonstrado em condições de endotoxemia experimental in vivo e in vitro, contribuindo para a hiporresponsividade (BUCHER, 2004). Nesta perspectiva um trabalho publicado por Kato e Pinsky (2015), ressalta que durante o choque séptico a hiporresponsividade adrenérgica ocorre devido à internalização de receptores adrenérgicos e a liberação de fatores inflamatórios. Dessa forma, a combinação da hipotensão sistêmica associada a vasoplegia contribui para a redistribuição do fluxo sanguíneo limitando a perfusão de órgãos vitais.

1.5 CONSIDERAÇÕES CLÍNICAS E CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA

É importante frisar que o tratamento da sepse ao longo dos anos, apesar de décadas de pesquisa, é baseado em cuidados de suporte que se traduzem no uso de antibióticos, fluidos intravenosos e vasopressores. Rivers et al., (2001), iniciou uma nova abordagem no gerenciamento do tratamento da sepse e do choque séptico, com a adoção de medidas específicas direcionadas a objetivos específicos. Após sua publicação, vários estudos adicionais ajudaram a validar uma abordagem protocolada para o manejo clínico da sepse, levando finalmente à sua incorporação às diretrizes da “Campanha Sobrevivendo à Sepse” (WEISBERG; PARK; CHERRY-BUKOWIEC, 2018). Em consonância com as diretrizes para o gerenciamento da sepse e choque séptico em sua versão mais atual, publicada em 2017, o qual tem por objetivo guiar o clínico para a melhor tomada de decisões no manejo da sepse, estas são embasadas na metodologia GRADE (classificação de análise de recomendações, desenvolvimento e avaliação) com a finalidade de avaliar a qualidade de evidência

(pesquisa científica) para determinada intervenção, e assim formular recomendações (fortes ou fracas).

Por exemplo, em relação ao suporte hemodinâmico, recomenda-se a administração de cristaloides como o fluido de escolha para ressuscitação inicial e subsequente reposição do volume intravascular em pacientes com sepse e choque séptico (qualidade de evidência moderada, recomendação forte). Ainda caso a hipotensão não seja revertida, é indicada a utilização de vasoconstritores. A noradrenalina é recomendada como vasopressor de primeira escolha (qualidade de evidência moderada, recomendação forte). Também é recomendada a adição de vasopressina (moderada qualidade de evidência, recomendação fraca) ou adrenalina (qualidade baixa de evidência, fraca recomendação). É sugerido o uso de dopamina como alternativa de vasopressor à noradrenalina (NE) apenas em casos específicos, como pacientes com baixo risco de taquiarritmias e bradicardia (qualidade baixa de evidência, fraca recomendação). Em relação à fenilefrina, os resultados clínicos são incertos e o seu uso deve ser limitado até que se tenha mais pesquisas (RHODES; EVANS; ALHAZZANI, 2017). Cabe destacar que, apesar de inotrópicos e vasopressores serem utilizados há muito tempo, o grau de evidência para a sua utilização ainda é moderada. De forma relevante inclusive no que tange à natureza deste estudo, muitos pacientes apresentam-se hiporresponsivos à terapia vasoconstritora e esse recurso terapêutico muitas vezes se torna falho na tentativa de restaurar a pressão arterial.

Artigos recentes confirmaram a importância da questão temporal no tratamento da sepse, considerado um fator prognóstico para os pacientes. Por exemplo, um estudo avaliando 101 pacientes admitidos no departamento de emergência com diagnóstico de choque séptico no período de janeiro de 2017 a dezembro de 2018, randomizado para a utilização de NE simultaneamente com fluidos intravenosos (grupo inicial) ou após falha na reposição volêmica (grupo tardio), mostrou que o grupo inicial teve uma taxa de sobrevivência de 71,9% em comparação com 45,5% no grupo tardio, concluindo que a NE precoce no tratamento do choque séptico pode causar restauração mais precoce da pressão arterial, melhor depuração de lactato e melhorar a qualidade de vida e sobrevivência hospitalar (ELBOUHY et al., 2019). Outro ensaio clínico realizado nesse mesmo ano de forma randomizada e duplo-cego com a participação de 310 adultos com sepse acompanhada de hipotensão, em que os pacientes foram divididos aleatoriamente em dois grupos: NE inicial (n = 155) e

tratamento padrão (n = 155), concluindo que a administração precoce de NE resultou em uma maior taxa de controle comparado ao tratamento padrão (76,1% vs 48,4%, respectivamente) (PERMPIKUL et al., 2019). Entre os pacientes com choque séptico em hospitais americanos afetados pela escassez de NE em 2011, o vasopressor alternativo mais comumente administrado foi a fenilefrina. Os pacientes internados nesses hospitais durante os períodos de escassez apresentaram maior taxa de mortalidade hospitalar (VAIL et al., 2017). Embora haja evidências crescentes que o uso da NE durante as condições sépticas é benéfico e não prejudicial, os dados clínicos disponíveis ainda são muito limitados. Evidências recentes sugerem a eficácia de administração da NE durante a ressuscitação, no entanto, dados prospectivos para apoiar esta afirmação são escassos (PERMPIKUL et al., 2019).

Portanto, após ser explanado sobre os receptores α -adrenérgicos e tendo a sepse como assunto principal, é possível fazer algumas considerações, sobre a sua problemática nos dias de hoje: i) O cenário atual da sepse demonstra que os mecanismos da disfunção vascular aos vasoconstritores, permanecem incompreendidos (BURGDORFF; BUCHER; SCHUMANN, 2018); ii) Embora já se tenha a elucidação de vias de transdução e um entendimento maior sobre a interação ligante-receptor adrenérgico, há muito a ser explorado tanto na fisiologia como em condições patológicas; iii) O receptor adrenérgico até então alocado em um ambiente celular fisiológico é exposto a uma condição patológica (sepse); iv) Fazendo uma análise crítica sobre o tratamento hemodinâmico da sepse em que é necessário manter a pressão arterial do paciente, ao avaliar os “*guidelines*” são utilizados vasoconstritores, diferindo apenas na ordem de escolha “encaixando” um tratamento que muitas vezes não é eficaz nesta condição, mas que no momento são os únicos recursos terapêuticos disponíveis, visto que não há nenhuma nova molécula inserida na terapêutica que tenha como alvo algumas das principais vias fisiopatológicas (LAMB DEN et al., 2018).

Dessa forma, tendo em vista o atual cenário clínico da sepse no qual é demonstrado que os mecanismos patológicos da disfunção vascular e da hiporresponsividade vascular aos vasoconstritores, permanecem incompreendidos, buscamos neste trabalho entender o comportamento dos α_1 -ARs nesta condição, uma vez que são os principais recursos de tratamento, considerando que a melhor compreensão da transição do comportamento dos α_1 -ARs de um ambiente celular fisiológico para o patológico, bem como o entendimento de como a interação ligante-

receptor modula trajetos de vias intracelulares, pode ser uma luz no fim do túnel para o desenvolvimento de ligantes com melhor eficácia para o tratamento da vasoplegia e hipotensão na sepse.

Dito isso, a hipótese que percorremos neste trabalho foi de que a via de transdução mediada pelos agonistas fenilefrina e noradrenalina apresenta uma modulação diferencial para mediadores intracelulares, tais como o óxido nítrico e o cálcio, afetando a capacidade dos vasos em aumentar o tônus vascular.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Explorar o envolvimento de mediadores intracelulares, tais como o cálcio e o óxido nítrico, na responsividade vascular da aorta aos vasoconstritores fenilefrina e noradrenalina, em condições fisiológicas e de sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os indicadores hematológicos, nos animais submetidos à CLP em dois tempos pós CLP 6 h e 18 h;
- b) Investigar o perfil de responsividade vascular dos vasoconstritores fenilefrina e noradrenalina e da contratilidade direta da maquinaria contrátil com o CaCl_2 nos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h;
- c) Detectar alterações na densidade dos receptores α_1 -adrenérgicos na aorta de animais sépticos nos tempos 6 e 18 h após à CLP, em comparação com o controle (naive);
- d) Avaliar o efeito do bloqueio das óxido nítrico sintases (NOS), na responsividade vascular da fenilefrina, noradrenalina e CaCl_2 nos animais controle e submetidos a CLP 6 h e 18 h;
- e) Avaliar a influência de doador exógeno de NO, nitroprussiato de sódio (NPS) na contratilidade vascular induzida por fenilefrina e noradrenalina em aorta de animais controle;
- f) Avaliar o delta de resposta da segunda onda de contração para a fenilefrina e noradrenalina, após as clássicas curvas de resposta dependentes da concentração em animais controle e submetidos a CLP 6 e 18 h;
- g) Avaliar a mobilização de cálcio intracelular e extracelular induzida por fenilefrina e noradrenalina nos grupos controle e sépticos, 6 e 18 h após a CLP;
- h) Investigar a participação da via de sensibilização ao cálcio na contratilidade vascular induzida por fenilefrina e noradrenalina nos grupos controle e sépticos;
- i) Determinar a participação da entrada de cálcio do meio extracelular sobre a contratilidade vascular induzida por fenilefrina e noradrenalina nos grupos controle e sépticos;

- j) Avaliar a participação da via Rho-A/Rho-cinase e a entrada de cálcio do meio extracelular sobre a segunda onda de contração após as curvas de respostas dependentes da concentração nos grupos controle e sépticos;
- k) Avaliar o efeito do bloqueio da entrada de cálcio e do óxido nítrico durante a contração induzida por fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta dos grupos controle e sépticos;
- l) Investigar os mecanismos envolvidos no efeito bifásico induzido pela noradrenalina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Para a realização deste estudo, utilizamos ratos da espécie *Rattus norvegicus*, linhagem Wistar, de 3 a 4 meses, provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob aprovação da comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (Protocolos nº 6327180718 e 4213170718). Os animais ficaram alojados em gaiolas ventiladas no biotério setorial do departamento de Farmacologia, com ocupação de no máximo 5 animais por caixa e foram mantidos em ambiente climatizado (21 ± 2 °C) com luminosidade controlada automaticamente (ciclo claro/escuro de 12/12 horas). Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram ambientados por um período de sete dias antes da realização dos protocolos experimentais.

3.2 COMPOSTOS E REAGENTES UTILIZADOS

Para a execução dos protocolos experimentais foram utilizadas os compostos e sais incluídos nos itens abaixo.

- i) Anestésicos e analgésicos: isoflurano (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil), cloridrato de xilazina 2% (VetBrands, Jacareí, São Paulo, Brasil); cloridrato de cetamina 10% (Syntec, Cotia, São Paulo, Brasil); cloridrato de lidocaína e cloridrato de tramadol 5% (Cristália, Itapira, São Paulo, Brasil).
- ii) Soluções e sais: cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), sulfato de magnésio (MgSO₄), dihidrogenofosfato de potássio (KH₂PO₄), bicarbonato de sódio (NaHCO₃), D-glucose, EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético), cloreto de cálcio (CaCl₂) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos).
- iii) Compostos utilizadas em banho de órgãos: cloridrato de fenilefrina, L (-) bitartarato de noradrenalina, N- ω -Nitro-L-Arginina Metil Éster (L-NAME), N-([3-(Aminometil) - benzil] acetamidina 1400W, cloridrato de acetilcolina, nicardipina, corticosterona, tetraetilamônio, glibenclamida, 4-aminopiridina (4-AP) TRAM-34, tetraetilamônio (TEA) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), S-metil L tiocitrulina (SMTTC), cloridrato de propranolol (Santa Cruz

Biotechnology), composto Y-27632 (Tocris Bioscience, Bristol, Reino Unido), nitroprussiato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha).

- iv) Compostos utilizadas no ensaio de ligação ao receptor α_1 -adrenérgico: paraformaldeído, acetona (Synth, Diadema, Brasil), solução de sacarose (Dglucose), N-etilmaleimida, poli-L-lisina, caneta hidrofóbica, DAPI, Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos), Tissue-Tek (Fisher Healthcare, Gardena, CA, EUA), prazosina fluorescente, BODIPY® FL (QAPB; Molecular Probes, Eugene, OR, Estados Unidos).
- v) Equipamentos utilizados: criostato (Thermo Scientific HM525 NX; Thermo Fisher Scientific, EUA), polígrafo digital e amplificador de sinal (PowerLab, ADInstruments, Austrália), microscópio invertido (NIKON, Tokyo, Japão) acoplado a um sistema de epifluorescência (Sutter Instrument, EUA).
- vi) Software utilizados: LabChart versão 8.0 para Windows (ambos da ADInstruments, Austrália), GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software CA, EUA), NIS-Elements AR (Advanced Research) versão 4.20 (NIKON, Tokyo, Japão), NIS-Elements Analysis (NIKON, Tokyo, Japão).
- vii) Outros materiais: fio de sutura de seda (BC-SUTURE- Bioline Fios Cirúrgicos LTDA, Anápolis, Goiás), agulha de 18 G (1,20 x 40 mm) (BD PrecisionGlide™-Curitiba, Paraná), fio de náilon 3-0 (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, São Luís de Montes Belos, Goiás).

3.2.1 Preparo dos reagentes e soluções

Os sais para o preparo da solução nutritiva de Krebs-Henseleit, solução nutritiva modificada com KCl e solução tampão fosfato (PBS) foram diluídos em água destilada.

Os compostos foram dissolvidos de acordo com as recomendações do fabricante. As alíquotas foram diluídas em solução nutritiva de Krebs-Henseleit. Após o preparo foram armazenadas em freezer a -20 °C.

As drogas fotossensíveis (noradrenalina, nitroprussiato de sódio (NPS), prazosina e propranolol foram envolvidas com papel alumínio.

As soluções de nitroprussiato de sódio e CaCl₂ sempre foram preparadas no momento da utilização e não foram armazenadas.

3.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

3.3.1 Modelo de indução de sepse: ligadura e perfuração do ceco (CLP)

O quadro séptico foi induzido através da metodologia de ligadura e perfuração do ceco (CLP - do Inglês *cecal ligation and puncture*) (BAKER, et al., 1983). Antes do procedimento cirúrgico, os animais receberam a aplicação de xilazina 5 mg/kg intraperitoneal (i.p.) e tramadol 10 mg/kg (i.p.), com o propósito de se obter analgesia e sedação prévia. Após 10 minutos, os animais foram alocados em câmara anestésica contendo isoflurano (5%) e oxigênio (100%), seguida da manutenção anestésica com isoflurano (3%) e oxigênio (100%). Após a verificação da ausência de qualquer estímulo, o local da incisão cirúrgica (linha alba) foi limpo com álcool iodado e, em seguida, realizou-se a administração de lidocaína através de infiltração subcutânea no mesmo local. Na sequência, foi realizada a laparotomia, onde o ceco foi localizado e exposto, a membrana adjacente cortada e em seguida, uma haste de cotonete foi colocada na região mediana para a realização da ligadura com um fio de sutura de seda, sem a obstrução total do intestino. Em seguida, foram feitos quatro furos com uma agulha de 18 G (1,20 x 40 mm), seguidos da compressão e extravasamento de pequena quantidade do conteúdo intestinal e remoção da haste de cotonete. O ceco foi delicadamente realocado no peritônio do animal e a cavidade abdominal suturada com fio de náilon 3-0. Para a reposição de volume, após o procedimento cirúrgico, foram administrados 30 mL/kg subcutâneo (s.c.) de solução tampão fosfato (PBS); concentração em mM: NaCl 137, KCl 2,7, KH₂PO₄ 1,5 e NaH₂PO₄ 10,8; pH 7,4. Para a recuperação cirúrgica, os animais foram colocados em caixas com maravalha sobre uma manta aquecida a aproximadamente 37 °C. Uma nova dose de analgésico foi administrada 12 horas após o procedimento cirúrgico (cloridrato de tramadol, 10 mg/kg, via s.c.).

3.3.2 Dosagens hematológicas

Foi realizada a coleta de sangue através da veia cava dos animais utilizados nos experimentos de reatividade vascular obtidos dos grupos, controle, CLP 6 h e CLP 18 h. Após a coleta, o sangue foi inserido em tubos contendo EDTA 5% (ácido etilenodiaminotetracético disódico). A análise hematológica foi realizada por contador automatizado (modelo Horiba, ABX®, Micros 60; Montpellier, França). Os resultados foram expressos em quantidade de células/ μL , ou em % para o hematócrito.

3.3.3 Preparação de anéis isolados em banho de órgãos

Para a dissecação do tecido a ser utilizado (aorta), os animais foram previamente anestesiados com cetamina e xilazina nas doses de 100 e 20 mg/kg (i.p.) respectivamente. Após a verificação da total ausência de respostas para estímulos como o pinçamento das patas e cauda, foi realizada a toracotomia. Em seguida, a aorta descendente foi exposta e cuidadosamente removida. Após a retirada, a aorta foi acondicionada em placa de Petri contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit modificada (composta por concentração em mM: NaCl, 131,3; KCl, 4,7; KH_2PO_4 , 1,18; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1,17; NaHCO_3 , 14,9; dextrose, 5,5; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 1,6; EDTA, 0,03), e o tecido aórtico foi limpo, sendo retirados os tecidos adjacentes. Após, a aorta foi seccionada em anéis de aproximadamente 5 mm. Um suporte metálico conectado a uma estrutura de acrílico e uma haste metálica foram inseridos delicadamente no lúmen dos anéis, permitindo a montagem vertical das preparações e estiramento perpendicular das mesmas. Para a manutenção das condições funcionais do tecido, os anéis de aorta foram inseridos no sistema de banho de órgãos contendo solução nutritiva de Krebs-Henseleit previamente aquecida à 37 °C, e aerada constantemente com mistura carbogênica (95% O_2 /5% CO_2). A haste metálica foi conectada a um transdutor de força acoplado a um sistema computadorizado composto por polígrafo digital e amplificador de sinal, o qual permitiu o registro da contração isométrica por meio do software (LabChart).

Os anéis foram submetidos a uma tensão basal de 3 g e foram estabilizados pelo período de 1 hora, com troca da solução nutritiva em intervalos de 15 minutos. Cabe elucidar que as trocas ocorreram sempre no período de 15 minutos e antes dos protocolos experimentais o volume da cuba foi ajudado para 3 mL, bem como

procedeu-se o ajuste da tensão para 3 g quando necessário. Aguardado o período de estabilização, a preparação foi exposta à solução nutritiva modificada com KCl 120 mM por 10 minutos (com a finalidade de verificar a viabilidade do tecido). Após esse tempo, o KCl foi retirado e as aortas foram lavadas por três vezes consecutivas com solução nutritiva. Em seguida, as preparações foram submetidas a um novo período de estabilização de 30 minutos e a integridade do endotélio foi verificada farmacologicamente através da contração com 1 μ M de fenilefrina (PE). Após 10 minutos sobre a fase tônica da contração induzida pela PE, foi adicionado à cuba 1 μ M de acetilcolina (Foram consideradas preparações com endotélio funcional às que obtiveram relaxamento superior a 80%). Foram utilizadas somente preparações com a presença de endotélio funcional.

3.3.4 Delineamento experimental

Neste estudo foram utilizados anéis de aorta dos grupos, controle, CLP 6 h e CLP 18 h. Como controle fisiológico foram utilizados animais naive.

Nos experimentos de reatividade vascular, cada preparação foi exposta a um único agente vasoconstritor. As preparações de cada grupo incubadas com inibidores foram comparadas com as preparações incubadas com o veículo do grupo correspondente.

3.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.4.1 Efeito da sepse sobre a contração vascular à fenilefrina e noradrenalina através de curvas de respostas dependentes da concentração

Para verificar a responsividade vascular aos agonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos PE e noradrenalina (NE), foram utilizadas aortas dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. Após a confirmação da presença de endotélio funcional, as preparações foram estabilizadas por 60 minutos e foram construídas curvas de respostas dependentes da concentração (CCRs), através da adição de concentrações crescentes e cumulativas de PE e NE (1 nM- 300 μ M).

3.4.2 Efeito da sepse sobre a contração vascular ao CaCl₂ através de curvas de respostas dependentes da concentração

Para avaliar a responsividade vascular ao CaCl₂, foram utilizados anéis de aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. As preparações com endotélio funcional foram estabilizadas por 10 minutos, e em seguida, foram mantidas em solução nutritiva despolarizante sem cálcio (composição, em mM: NaCl, 71,4; KCl, 59,8; KH₂PO₄, 1,18; MgSO₄.7H₂O, 1,17; NaHCO₃, 14,9; dextrose, 5,5; EDTA, 0,03) durante 60 minutos, sendo que, em 45 minutos o volume da cuba foi ajustado para 3 mL e foram construídas CCRs para o CaCl₂ (10 µM-100 mM).

3.4.3 Efeito dos bloqueadores de óxido nítrico sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina, noradrenalina e CaCl₂ em anéis de aorta

Para avaliar a participação das óxido nítrico sintases na responsividade vascular da PE e NE, após a confirmação da integridade funcional do endotélio, as preparações foram incubadas por um período de 30 minutos com os seguintes inibidores: L-NAME (100 µM, inibidor não seletivo das NOS), 1400W (10 µM, inibidor seletivo da NOS induzida), e SMTC (10 µM, inibidor da NOS neuronal). Em seguida, foram construídas CCRs para a PE e NE. Para avaliar a influência do NO sobre a maquinaria contrátil ativada em resposta ao cálcio, após 10 minutos de estabilização, as preparações foram mantidas em líquido nutritivo despolarizante sem cálcio por 60 minutos, sendo que, em 30 minutos, o volume da cuba foi ajustado para 3 mL e as preparações foram incubadas por um período de 30 minutos com L-NAME, 1400W ou SMTC, nas mesmas concentrações descritas acima. Na presença dos inibidores, foram construídas CCRs para o CaCl₂. A **Figura 1** ilustra o protocolo experimental utilizado nos experimentos descritos neste item.

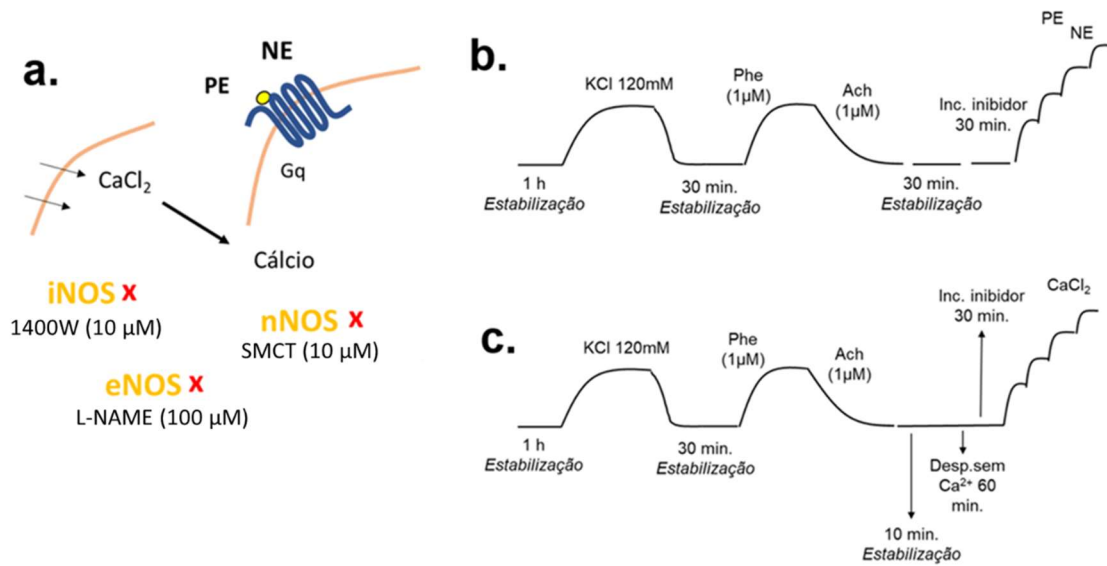


Figura 1 – Protocolo experimental de avaliação do bloqueio das óxido nítrico sintases sobre a contração induzida por PE, NE e CaCl_2 . (a) Bloqueio das NOS com L-NAME 100 μM , 1400W 10 μM e SMCT 10 μM , sobre as respostas por meio dos GPCRs PE e NE que atuam através da ativação da proteína G_q e de segundos mensageiros intracelulares e a ativação direta do mecanismo contrátil através do CaCl_2 . Os painéis (b) e (c) representam o protocolo experimental utilizado: período de estabilização de 1 hora, após as preparações foram expostas a solução de KCl 120 mM por 10 minutos e então foi realizada a lavagem por 3 vezes consecutivas. Um novo período de estabilização de 30 minutos foi aguardado e a seguir as preparações foram expostas a 1 μM de PE e sobre o platô de contração da PE foi verificada a viabilidade do endotélio através do relaxamento com 1 μM de acetilcolina. Um novo período de estabilização de 30 minutos foi aguardado e as preparações foram incubadas com inibidores das NOS e após 30 minutos foram construídas CCRs para a PE e NE (b). No protocolo (c) após a verificação da viabilidade do endotélio as preparações foram estabilizadas por 10 minutos e em seguida foram expostas a líquido despolarizante sem cálcio por 60 minutos sendo que em 30 minutos as preparações foram incubadas com inibidores das NOS. Após foram construídas CCRs para o CaCl_2 .

3.4.4 Efeito de um doador de óxido nítrico sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta

Para avaliar a influência do doador de NO nitroprussiato de sódio (NPS) sobre as contrações induzidas por PE e NE, foram utilizadas somente aortas de animais controle (grupo naive). Após a verificação da funcionalidade do endotélio, as preparações foram estabilizadas por 30 minutos, e posteriormente foram incubadas com NPS na concentração de 0,1 μM por outros 30 minutos. Em seguida, na presença do NPS, foram construídas CCRs para a PE e NE. Foram utilizados como controle, as preparações incubadas somente com o veículo.

3.4.5 Avaliação da segunda onda de contração após as curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta

Para avaliar a segunda onda de contração, empregamos a seguinte metodologia. Após o fim das CCRs dos vasoconstritores PE e NE e as preparações atingirem o pico de resposta máxima e alcançarem o platô, partindo deste ponto mensuramos o delta de contração após 40 minutos, conforme ilustrado na **Figura 2** abaixo.

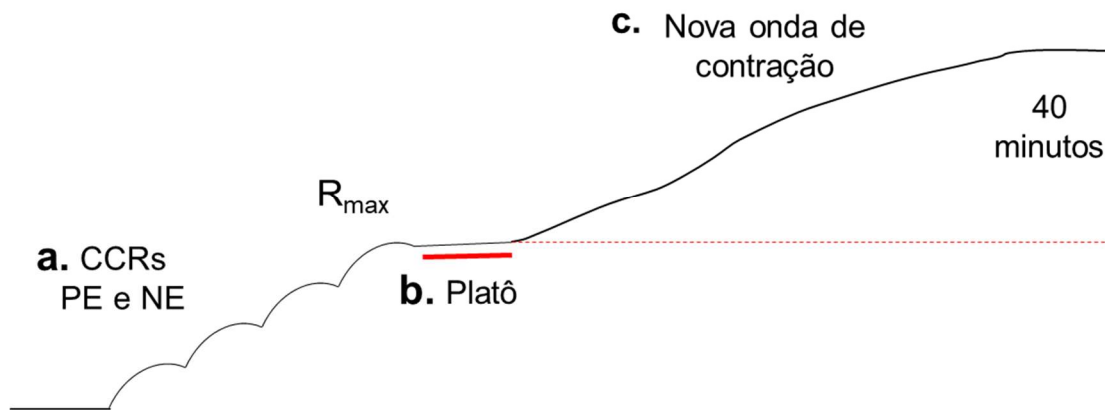


Figura 2 – Protocolo experimental de avaliação da segunda onda de contração. (a) Curvas de respostas dependentes da concentração para a PE e NE (1 nM- 300 μ M). R_{max} = Resposta máxima, obtida das CCRs. (b) Fase de platô após o fim das CCRs. (c) Nova onda de contração a partir do platô. As respostas foram mensuradas após 40 minutos.

3.4.6 Avaliação da mobilização do cálcio intracelular e extracelular nas respostas induzidas por fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta

Para explorar a participação do cálcio intracelular decorrente da ativação por PE e NE, foram utilizados anéis de aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. Após a verificação da integridade do endotélio, as preparações foram estabilizadas por 30 minutos e, em seguida, foram mantidas em líquido nutritivo sem cálcio por 15 minutos. Após esse intervalo a contração foi induzida com 1 μ M de PE ou de NE, utilizando somente uma droga por preparação.

A fase fásica da contração foi mensurada calculando o delta de contração por meio da diferença dos valores basais até o pico de contração máxima (**Figura 3a**). A fase tônica foi mensurada considerando o delta da fase fásica da contração e feita a

análise de ponto a ponto com intervalos de 30 segundos, durante 10 minutos (**Figura 3b**).

Para avaliar a mobilização do cálcio extracelular, foram utilizados anéis de aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h, mantidos por 15 minutos em solução nutritivo sem cálcio e a seguir as preparações foram expostas a 1 μM de PE e NE. Após 10 minutos, sobre o platô de contração induzida por PE ou NE realizou-se CCRs para o CaCl_2 conforme ilustrado na **Figura 4**.

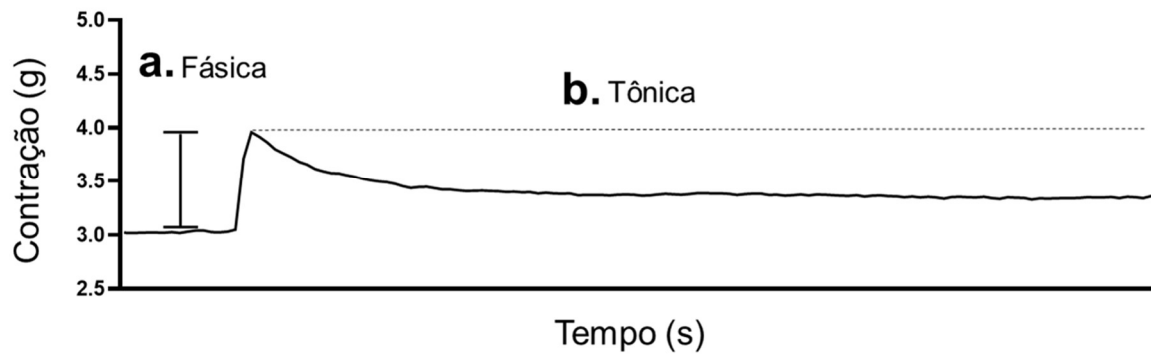


Figura 3 – Traçado de um experimento ilustrando as fases fásica e tônica da contração. (a) indica a fase fásica da contração com 1 μM de PE ou NE. (b) indica a fase tônica (manutenção da contração) após 10 minutos.

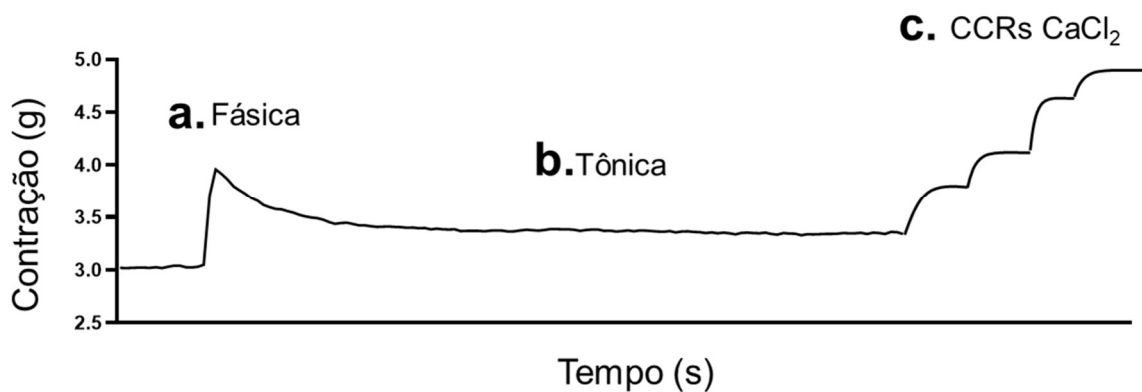


Figura 4 – Ilustração da construção de CCRs ao CaCl_2 sob o platô da contração induzida pela PE e NE 1 μM . (a) indica a fase fásica da contração com 1 μM de PE ou NE. (b) indica a fase tônica (manutenção da contração) após 10 minutos. (c) indica a CCRs ao CaCl_2 sobre o platô de contração induzido pela PE e NE.

3.4.7 Ensaio de fluorescência para a avaliação da densidade basal de receptores α_1 -adrenérgicos nos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h

As aortas dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h foram coletadas e inseridas em solução de paraformaldeído tamponado (PFA 4% em PBS), por 4h, e em seguida foram imersas em solução crioprotetora de sacarose 30% pelo período de 1h. Em seguida, as aortas foram retiradas e inseridas em blocos contendo *Tissue-Tek*, que foram congelados em freezer -80 °C. As lâminas foram previamente preparadas com poli-L-lisina. Os blocos foram cortados em fatias transversais em criostato (Thermo Scientific HM525 NX; Thermo Fisher Scientific, EUA), com espessura de 7 μ m, e foram colocados sobre a lâmina. Após, os cortes foram fixados na lâmina com acetona por 5 minutos, a -20 °C e em seguida foram lavados com PBS. Após a secagem das lâminas, os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos) e incubados com 250 nM de prazosina fluorescente, por 90 minutos e com DAPI durante 5 minutos, ambos em temperatura ambiente. Os cortes foram lavados com PBS e secos. Em seguida, as lamínulas foram inseridas sobre a lâmina utilizando Gel Mount. Para o controle da autofluorescência foram utilizadas lâminas sem a presença de ligante. Para a leitura, utilizou-se microscópio invertido acoplado a um sistema de epifluorescência. As imagens foram capturadas e a intensidade de fluorescência quantificada.

3.4.8 Efeito do bloqueio da via Rho-A/Rho-cinase sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta

Com o objetivo de investigar a participação da via de manutenção da contração composta pelas proteínas Rho-A/Rho-cinase foram utilizados anéis de aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. Após a confirmação da presença de endotélio funcional, as preparações foram incubadas por 30 minutos com 0,3 μ M ou 1 μ M do composto Y-27632 (inibidor de ROCK) e a seguir os anéis foram submetidos a CCRs para a PE e NE. Cada preparação foi exposta somente a um agente vasoconstritor. Foram utilizados como controle, as preparações incubadas com o veículo dos seus respectivos grupos.

3.4.9 Efeito do bloqueio da entrada de cálcio extracelular com a nicardipina sobre a contração vascular induzida pela fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta

Com o propósito de investigar a participação da entrada de cálcio na contração vascular induzida por agonistas, foram utilizados anéis de aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. Após a confirmação da presença de endotélio funcional, os canais de cálcio foram bloqueados com 0,1 μM de nicardipina (inibidor do influxo de cálcio extracelular) por 30 minutos e a seguir foram construídas CCRs para a PE e NE.

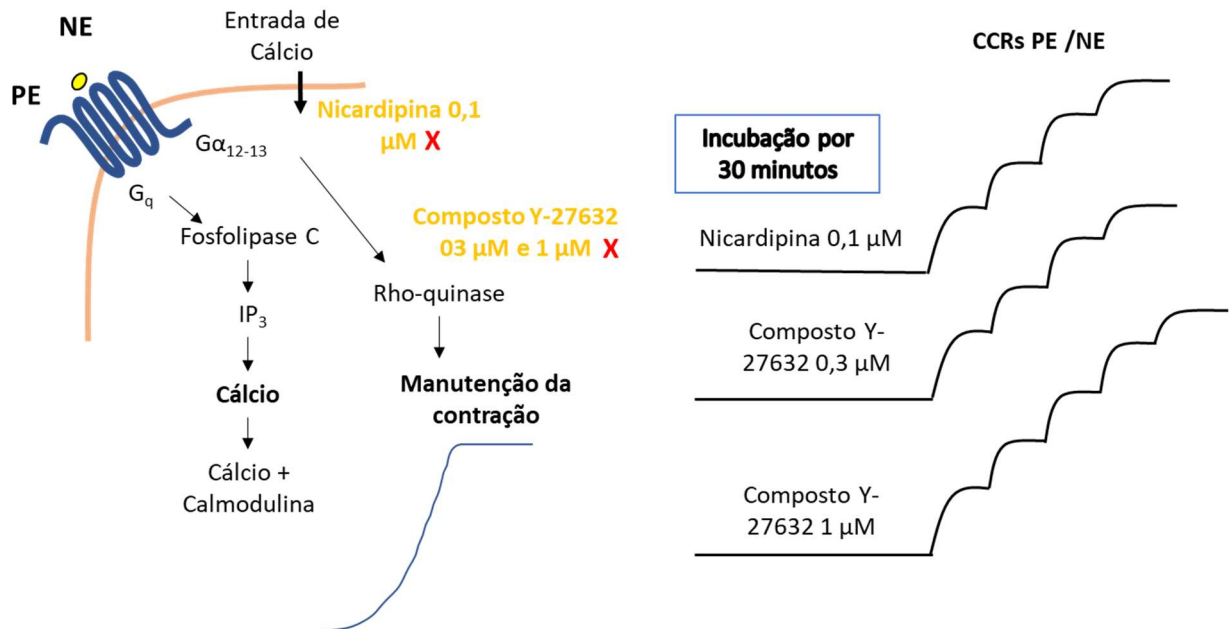


Figura 5 – Protocolo experimental de avaliação dos mecanismos envolvidos na manutenção da contração, com a entrada de cálcio e a via Rho-A/Rho-cinase. Bloqueio da entrada de cálcio com a nicardipina 0,1 μM e composto Y-27632 0,3 μM e 1 μM , sobre as respostas induzidas por PE e NE. Os protocolos experimentais foram de acordo com o item 3.2.3 e após a verificação da integridade funcional do endotélio, as preparações foram incubadas com nicardipina 0,1 μM , composto Y-27632 0,3 μM e Y-27632 1 μM por 30 minutos e em seguida foram construídas CCRs para a PE e NE.

3.4.10 Efeito do bloqueio da via Rho-A/Rho-cinase e nicardipina sobre a segunda onda de contração induzida pela noradrenalina em anéis de aorta

Após a realização dos protocolos experimentais descritos nos itens 3.4.8 e 3.4.9, foi avaliada a influência dos canais de cálcio e da via de sensibilização ao cálcio sobre o segundo efeito de contração induzido pela NE. Dessa forma, após as construções das CCRs o delta do segundo efeito da NE foi mensurado após 40 minutos. Avaliamos este efeito nos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h.

3.4.11 Efeito do bloqueio da entrada de cálcio durante a contração induzida por fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta

Para explorar o efeito de uma única concentração nas respostas mediadas por PE e NE, as preparações foram contraídas com 300 μM de PE e NE e no início da fase tônica adicionou-se nicardipina 0,1 μM . Após 40 minutos, os deltas das respostas foram mensurados.

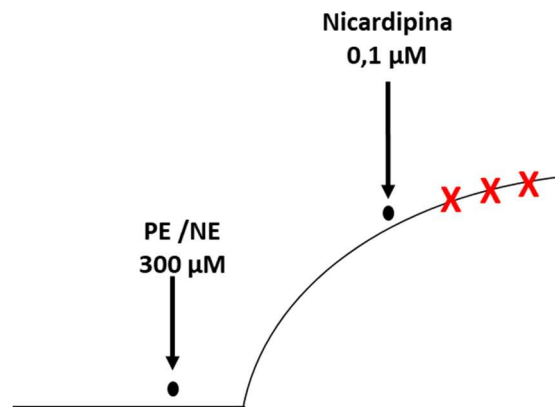


Figura 6 – Representação esquemática do protocolo experimental do bloqueio dos canais de cálcio durante a contração induzida por PE e NE. Foi realizada a contração com uma única concentração de fenilefrina ou noradrenalina 300 μM e assim que iniciou a fase tônica da contração, bloqueou-se a entrada de cálcio com nicardipina 0,1 μM . Após 40 minutos, as respostas foram mensuradas.

3.4.12 Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito bifásico da noradrenalina

Com a finalidade de explorar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito bifásico da NE, após o término das CCRs e ao atingir o platô as preparações foram incubadas com: tetraetilamônio (TEA) 10 mM, bloqueador não seletivo dos canais de K^+ , glibenclamida (GLB) 10 μM , bloqueador dos canais de K^+ sensíveis ao ATP, 4-aminopiridina (4-AP) 1 mM, bloqueador dos canais de K^+ sensíveis a voltagem, TRAM-34 10 μM , bloqueador dos canais de K^+ ativados por cálcio de condutância intermediária, propranolol 1 μM , bloqueador não seletivo dos receptores β -adrenérgicos, tapsigargina 100 μM , inibidor da SERCA, corticosterona (CORT) 100 μM , bloqueador dos transportadores catiônicos 3, nicardipina 0,1 μM , inibidor do influxo de cálcio extracelular, composto Y-27632 1 μM , inibidor de ROCK. Após 40 minutos do bloqueio os deltas de resposta foram obtidos.

Inicialmente os experimentos foram conduzidos apenas em preparações controle, sendo que as que apresentaram diferença estatística $p < 0,05$ foram posteriormente exploradas nos grupos sépticos.

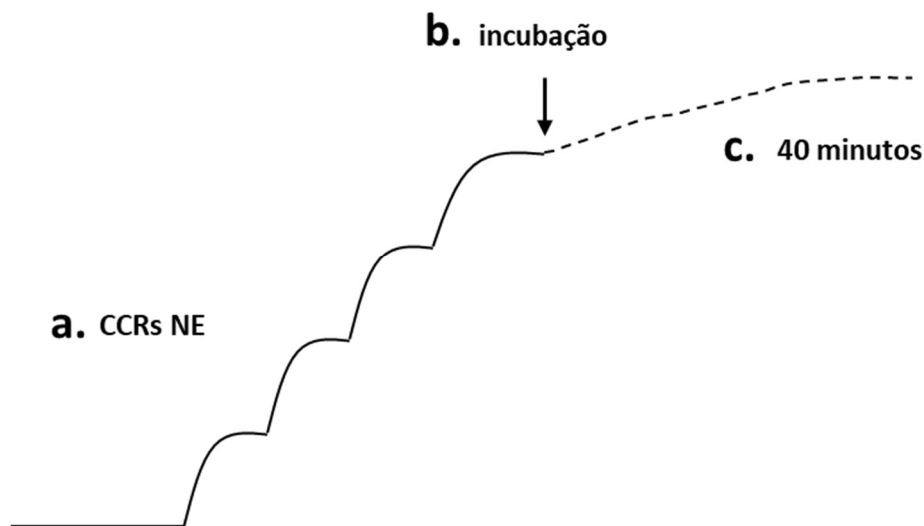


Figura 7 – Ilustração da linha temporal do protocolo experimental para investigar os mecanismos envolvidos no efeito bifásico da noradrenalina. (a) CCRs- Curvas de respostas dependentes da concentração para a noradrenalina. (b) Incubação com os inibidores. (c) Avaliação do efeito bifásico após 40 minutos, a partir do momento da incubação.

3.5 ANÁLISE DOS RESULTADOS E TESTES ESTATÍSTICOS

Os resultados foram analisados e expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M). Os gráficos e as análises estatísticas foram realizados através do programa GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Em alguns gráficos foi aplicada a análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida pelos pós teste de Bonferroni, Tukey ou Dunnet quando aplicáveis. Em alguns gráficos foi utilizado o teste *t* de Student. Foram consideradas como significativamente diferente as análises que obtiveram valor de $p < 0,05$.

Os valores de R_{max} (resposta contrátil máxima) e CE_{50} (Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo) foram calculados através do programa GraphPad Prism versão 9.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EUA), obtidos através de análise de regressão não-linear das curvas de resposta dependente da concentração. O cálculo da AUC foi realizado pelo mesmo programa.

4 RESULTADOS

4.1 INDICADORES HEMATOLÓGICOS E CARACTERIZAÇÃO DA DISFUNÇÃO VASCULAR EM RATOS SÉPTICOS

A **Tabela 1** apresenta dados da análise hematológica realizada nos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. Os resultados mostram um aumento na contagem de granulócitos de acordo com a progressão da sepse, com valores de $1,05 \pm 0,28$ (grupo controle) para $2,76 \pm 0,28$ (grupo CLP 6 h) e $8,10 \pm 1,56$ (grupo CLP 18 h). Além disso, os animais apresentaram linfocitopenia, sendo os valores reduzidos de $6,70 \pm 0,77$ (grupo controle), para $3,20 \pm 0,57$ (grupo CLP 6 h) para $3,81 \pm 0,57$ (grupo CLP 18 h), presumindo um cenário de processo inflamatório. Outrossim, foi verificado aumento no hematócrito 6 h após a CLP. Ademais, foram observados sinais clínicos característicos do modelo, como, por exemplo, secreção de porfirina, piloereção e letargia.

Tabela 1 – Análise hematológica em ratos dos grupos controle e sépticos.

	Controle	CLP 6 h	CLP 18 h
Hemogloblina (g/dL)	$11,68 \pm 0,62$	$13,52 \pm 0,63$	$13,22 \pm 0,40$
Hematócrito (%)	$43,68 \pm 2,15$	$53 \pm 2,83^*$	$49,45 \pm 1,61$
Plaquetas (10^6 /mL)	$997,5 \pm 70,33$	$746,2 \pm 110,9$	$858 \pm 41,95$
Monócitos (10^6 /mL)	$1,55 \pm 0,28$	$2,11 \pm 0,51$	$1,20 \pm 0,16$
Linfócitos (10^6 /mL)	$6,70 \pm 0,77$	$3,20 \pm 0,57^*$	$3,81 \pm 0,57^*$
Granulócitos (10^6 /mL)	$1,05 \pm 0,28$	$2,76 \pm 0,56$	$8,10 \pm 1,56^{*#}$

As análises foram feitas em amostras de sangue coletadas de ratos dos grupos controle, CLP 6 e 18 h após a cirurgia. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=5-6). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância ANOVA de uma via seguido pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. # indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo CLP 6 h.

A **Figura 8a** mostra a média do delta de contração de anéis de aorta por meio da despolarização induzida por KCl 120 mM entre os grupos controle, CLP 6 e 18 h, em que é observada redução da responsividade vascular para o KCl no grupo CLP 18 h quando comparado ao grupo controle ($2,28 \text{ g} \pm 0,07$ para $1,69 \text{ g} \pm 0,08$,

respectivamente). Por outro lado, em 6 h após a CLP, não se observaram diferenças entre os grupos.

Ao mensurar o delta de contração gerado por 1 μ M de fenilefrina, verificou-se redução na responsividade vascular a esse vasoconstritor, de acordo com a progressão do quadro séptico com valores de 1,73 g \pm 0,06 (grupo controle), para 1,40 g \pm 0,07 (grupo CLP 6 h) e 0,98 g \pm 0,06 (grupo CLP 18 h) (**Figura 8b**). Em conjunto, esses resultados já apontam para um prejuízo vascular contrátil nos animais sépticos, tanto pela interação ligante-receptor, como por despolarização (via não receptor).

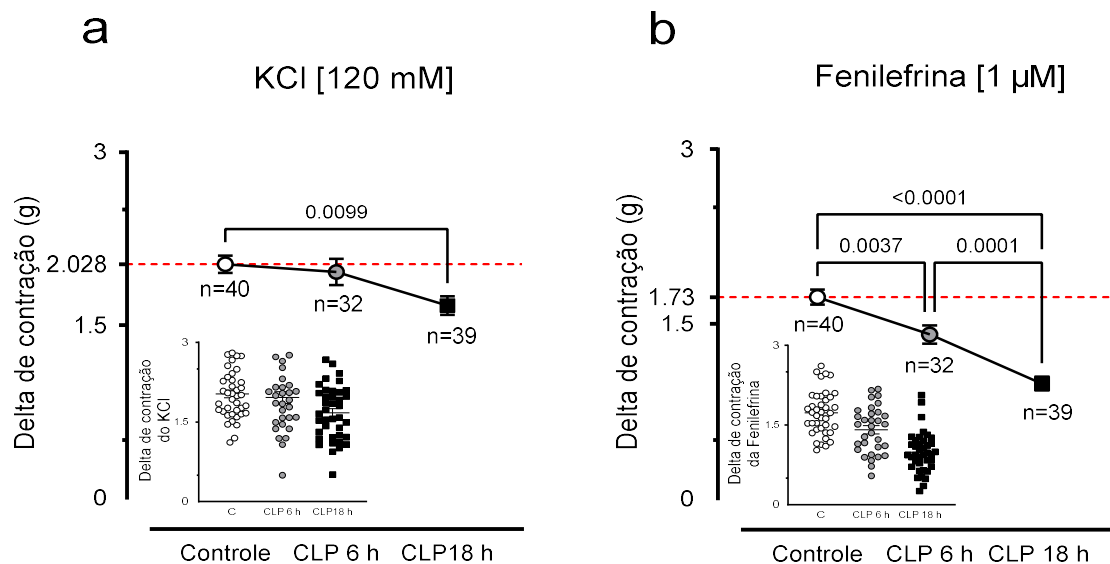


Figura 8 – Redução da resposta contrátil ao KCl e à fenilefrina em anéis de aorta torácica de ratos sépticos com endotélio funcional. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média de todos os grupos experimentais. A linha tracejada em vermelho representa a média do grupo controle. O gráfico dentro representa as respostas individuais (*dot plot*) e a média de contração. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Foram considerados diferentes valores de $p < 0,05$ conforme indicado nos gráficos.

4.2 EFEITO DA SEPSE SOBRE AS CURVAS DE RESPOSTAS DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO AOS VASOCONSTRITORES FENILEFRINA, NORADRENALINA E AO CaCl_2

Considerando que um dos principais alvos terapêuticos no tratamento da sepse é o receptor α_1 -adrenérgico, nosso objetivo neste conjunto de experimentos foi avaliar a responsividade vascular da aorta via sistema ligante-receptor com os agonistas PE e NE, bem como avaliar a capacidade da maquinaria contrátil com o CaCl_2 . A **Figura 9** demonstra que, quando o receptor α_1 -adrenérgico é ativado pela PE, há hiporresponsividade mais acentuada em comparação com o agonista NE. A resposta máxima (R_{max}) gerada pela PE apresenta redução de 37,7% no grupo CLP 6 h e de 58,33% no grupo CLP 18 h, comparadas ao grupo controle (**Figura 9a**). Além disso, a PE apresenta redução significativa da potência, como revelam os valores de CE_{50} nos grupos sépticos, sendo necessárias concentrações maiores da droga para produzir 50% da resposta máxima observada nos controles (valores visualizados na **Tabela 2**). Por outro lado, a NE gerou contrações máximas na ordem de 2,47 g no grupo controle, 2,12 g no grupo CLP 6 h e 1,69 g no grupo CLP 18 h, o que proporcionalmente equivale a uma redução da eficácia de 14,17% no grupo CLP 6 h e de 31,57% no grupo CLP 18 h, comparadas ao grupo controle (**Figura 9b**). Conforme visualizado na **Tabela 2**, a NE apresenta uma potência maior em comparação à PE, tanto nos grupos controle quanto sépticos.

Com o objetivo de avaliar a capacidade da maquinaria contrátil, os anéis de aorta foram expostos ao líquido despolarizante sem cálcio por 60 minutos e, em seguida, foi construída CCRs a esse agente vasoconstritor. Em 6 h após a CLP, a maquinaria contrátil é mantida, uma vez que não encontramos prejuízo na reatividade vascular quando comparado ao grupo controle. No entanto, encontramos redução da reatividade vascular induzida por CaCl_2 em períodos mais tardios da sepse, apresentando redução da eficácia de 46,89% no grupo CLP 18 h em comparação ao controle (**Figura 9c**). A análise da área sob a curva expressa os mesmos perfis de resultados (**Figura 9d, e, f**). Em relação à CE_{50} para o CaCl_2 é observada um aumento em 18 h após a CLP (**Tabela 2**).

Neste estudo, a avaliação da reatividade vascular foi realizada em mais de um bloco de experimentos, ou seja, em momentos distintos, nesse caso, em anos

diferentes. Dessa forma, os resultados dos diferentes blocos/conjuntos desses experimentos foram plotados nas **Figuras 9g, h, i** para fins de comparação. Apesar das variações experimentais, é possível afirmar que o perfil das respostas encontradas é sempre o mesmo.

Em seguida consideramos avaliar se a presença da hiporresponsividade seria proveniente de níveis reduzidos de receptores α_1 -adrenérgicos.

Tabela 2 – Valores de R_{max} e CE_{50} das curvas de respostas dependentes da concentração à fenilefrina, noradrenalina e $CaCl_2$.

	Fenilefrina	Noradrenalina	$CaCl_2$
Controle			
R_{max} (g)	2,28 (2,16 - 2,41)	2,47 (2,36 - 2,60)	2,70 (2,48 - 3,01)
CE_{50} (μM)	0,073 (0,05 - 0,105)	0,023 (0,014 - 0,034)	115,7 (72,91 - 175,3)
CLP 6 h			
R_{max} (g)	1,43 (1,33 - 1,55) *	2,12 (2,00 - 2,26) *	2,63 (2,41 - 2,94)
CE_{50} (μM)	0,190 (0,122 - 0,298)	0,061 (0,039 - 0,094)	98,95 (62,11 - 152,1)
CLP 18 h			
R_{max} (g)	0,95 (0,86 - 1,07) * #	1,69 (1,60 - 1,79) * #	1,50 (1,34 - 1,77) *#
CE_{50} (μM)	0,2166 (0,116 - 0,407)	0,044 (0,028 - 0,067)	312,5 (199,7 - 516,6)

A avaliação da R_{max} = Resposta contrátil máxima e CE_{50} = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo foram obtidas através das curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina, noradrenalina e $CaCl_2$ em anéis de aorta dos grupos controle e sépticos (intervalo de confiança de 95%). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. # indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo CLP 6 h.

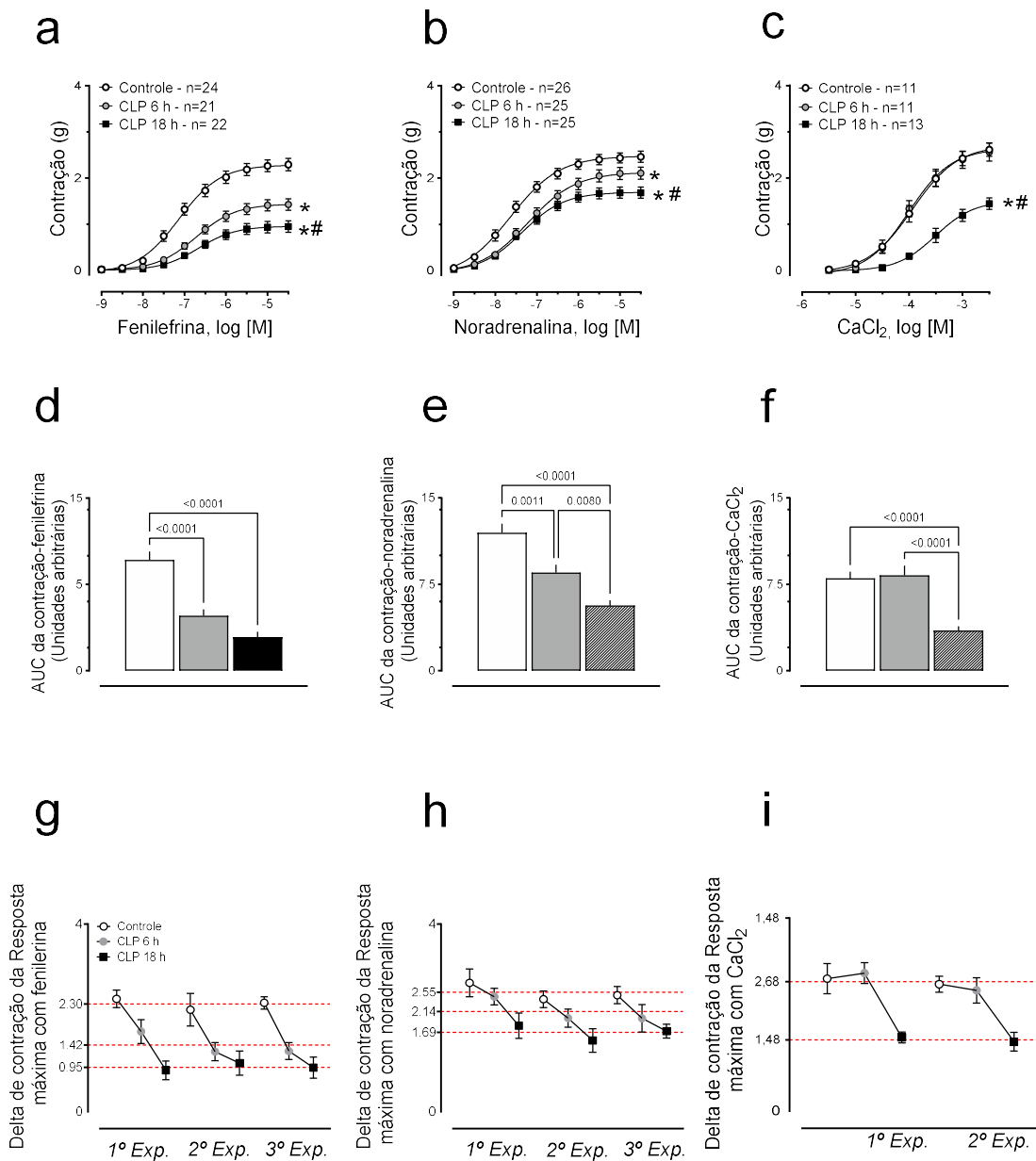


Figura 9 – Anéis de aorta de animais submetidos à cirurgia de ligadura e perfuração do ceco apresentam hiporresponsividade maior para a fenilefrina 6 e 18 h após a CLP. As curvas de respostas dependentes da concentração à fenilefrina (a), noradrenalina (b), e para o CaCl₂ (c) foram construídas em anéis de aortas com endotélio, obtidos do grupo controle e grupos CLP 6 h e 18 h. Nos experimentos que originaram o gráfico (c), os anéis foram mantidos por 60 minutos em líquido despolarizante sem cálcio antes da curva para o CaCl₂. Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=11-26) por grupo. As áreas sob as curvas são apresentadas nos painéis (d) (e) (f). As figuras (g) (h) representam a média das respostas máximas em 3 sets de experimentos e a (i) em dois. A linha tracejada representa a média de cada grupo experimental (controle, CLP 6 h e CLP 18 h). A diferença entre os grupos foi verificada pela ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni painéis (a) (b) (c). * p < 0,05 comparado com o grupo controle. # p < 0,05 comparado com o grupo CLP 6 h. A diferença entre os grupos foi verificada pela ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey painéis (d) (e) (f). Foram considerados diferentes valores de p < 0,05 conforme indicado no gráfico.

4.3 DENSIDADE DE RECEPTORES α_1 - ADRENÉRGICOS NA AORTA DE RATOS SUBMETIDOS À CLP

Com a finalidade de avaliar se nossos resultados seriam decorrentes de níveis reduzidos de receptores α_1 -adrenérgicos nas artérias durante a sepse, realizamos o ensaio de marcação com o BODIPY-PAZOSIN fluorescente e avaliamos a densidade basal do receptor α_1 -adrenérgico nos grupos controle e sépticos. Como demonstrado na **Figura 10**, não houve diferenças nos níveis de receptores α_1 -adrenérgicos entre os grupos. Por isso, a partir dos resultados obtidos passamos a investigar alterações na via de transdução. Dessa forma, sabendo que o NO está envolvido nas alterações vasculares da sepse, a pergunta que permeou nosso próximo bloco de experimentos foi qual seria o envolvimento do NO na via de transdução de ambos os vasoconstritores (PE/NE), bem como o seu envolvimento na contração induzida por CaCl_2 .

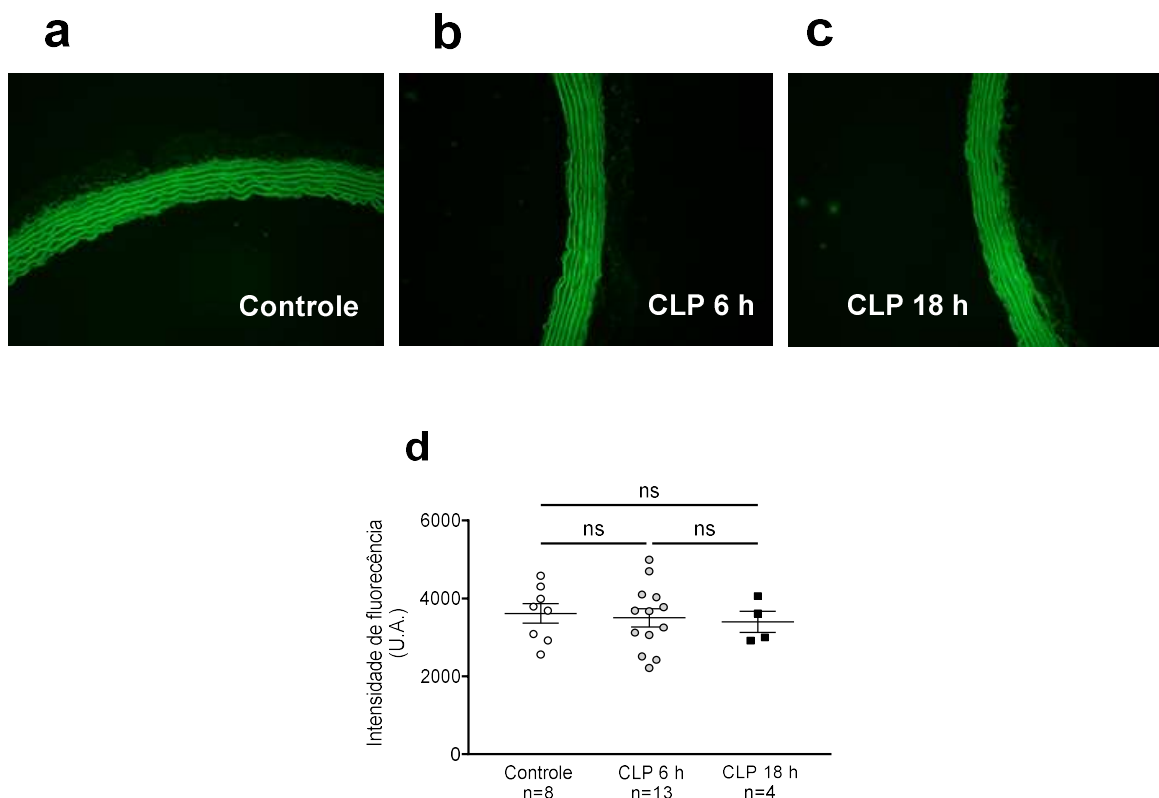


Figura 10 – Imunofluorescência para o receptor α_1 - adrenérgico na artéria aorta de animais saudáveis e submetidos à CLP. Imagens representativas de imunofluorescência com o ligante (BODIPY FL-prazosina) em cortes de anéis de aorta de animais controle (a) comparado aos sépticos CLP 6 h (b) e CLP 18 h (c). Escala de 20x. Resultados apresentados como pontos individuais e expressos como a média da intensidade de fluorescência (n= 4-13 por grupo). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey.

4.4 EFEITO DO BLOQUEIO DAS ÓXIDO NÍTRICO SINTASES SOBRE A RESPONSABILIDADE VASCULAR PARA A FENILEFRINA, NORADRENALINA E CaCl₂

Com a finalidade de avaliar a participação do NO na contratilidade vascular induzida pelos vasoconstritores PE, NE e CaCl₂, incubamos os anéis de aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h, por 30 minutos, com os inibidores, L-NAME (100 µM), 1400W (10 µM) e SMTC (10 µM). Em preparações controle o bloqueio com L-NAME foi capaz de aumentar de maneira mais intensa a contratilidade vascular por meio dos ligantes de GPCRs PE e NE, enquanto as respostas geradas pelo CaCl₂ na presença do L-NAME não foram significativamente diferentes quando comparadas ao veículo. Assim, verificamos que o bloqueio com L-NAME provocou um aumento da R_{max} da PE em 45,45% e para a NE 35,8% (ambas as respostas comparadas com as preparações incubadas com veículo), enquanto o mesmo provocou um aumento de apenas 26,88% na contratilidade vascular para o CaCl₂ (**Figuras 11a, d, g**). Como esperado, nas preparações controle o bloqueio das óxido nítrico sintases induzida (iNOS) e neuronal (nNOS) não alteraram a resposta para ambos os vasoconstritores (**Figuras 11b, e, h; Tabela 3**). Da mesma forma a análise da área sob a curva expressou o mesmo perfil de resultado (**Figura 14a**).

Por outro lado, em 6 h após a CLP, o bloqueio com L-NAME além de aumentar as R_{max} induzida pela PE e NE foi capaz de aumentar a resposta ao CaCl₂ o que não era observado nas preparações controle. Os valores de R_{max} foram aumentadas em 130,53% para a PE, enquanto as respostas geradas pela NE e CaCl₂ foram aumentadas em 56,12% e 46,12%, respectivamente (**Figuras 12a, d, g**). Curiosamente quando avaliamos a participação da iNOS através da incubação com o 1400W houve um aumento da R_{max} para a PE de 70,99%, enquanto o bloqueio da iNOS não foi capaz de aumentar a R_{max} para a NE e nem para o CaCl₂ (**Figuras 12b, e, h**, respectivamente). Além disso, o bloqueio da isoforma nNOS com SMTC foi capaz de aumentar a R_{max} da PE em 68,70% apesar de não influenciar na CCR da NE e CaCl₂ (**Figuras 12c, f, i**).

Em 18 h após à CLP, todos os vasoconstritores estudados apresentaram respostas reduzidas, sendo esta, revertida com inibidores de NO, porém em taxas diferentes. Por exemplo, em anéis incubados com L-NAME, a eficácia da PE foi aumentada em 191,66% em comparação com as preparações incubadas com o veículo, enquanto as respostas geradas pela NE e CaCl₂ foram aumentadas em

67,81% e 94,23% respectivamente (**Figuras 13a, d, g**). O bloqueio da iNOS foi capaz de aumentar em 122,91% a R_{max} para a PE, enquanto as respostas obtidas para a NE e o $CaCl_2$ foram aumentadas em 54,02% e 55,12%, respectivamente (**Figuras 13b, e, h**). O bloqueio da nNOS elevou em 100% a resposta da PE, 44,25% a NE e 44,81% ao $CaCl_2$, todas as preparações foram comparadas com as preparações incubadas somente com veículo (**Figuras 13c, f, i**). Os resultados foram refletidos na análise da área sobre a curva (**Figura 14**). Neste tempo estudado, também é visto aumento da CE_{50} da PE, NE e $CaCl_2$, sendo que os inibidores de NO foram capazes de diminuir a concentração efetiva para gerar 50% da resposta máxima (**Tabela 3**).

A partir deste ponto do estudo, nossos experimentos foram conduzidos apenas com PE e NE. Dessa forma, a pergunta que deu sequência aos resultados foi se a PE estaria levando a uma maior produção de NO, ou se a diferença na hiporesponsividade para a PE e a NE seria em virtude da via de transdução ativada por um ou outro ligante. Uma das maneiras de responder essa pergunta foi incubar anéis de aorta controle com um doador exógeno de NO e, em seguida, construir CCRs para ambos os vasoconstritores.

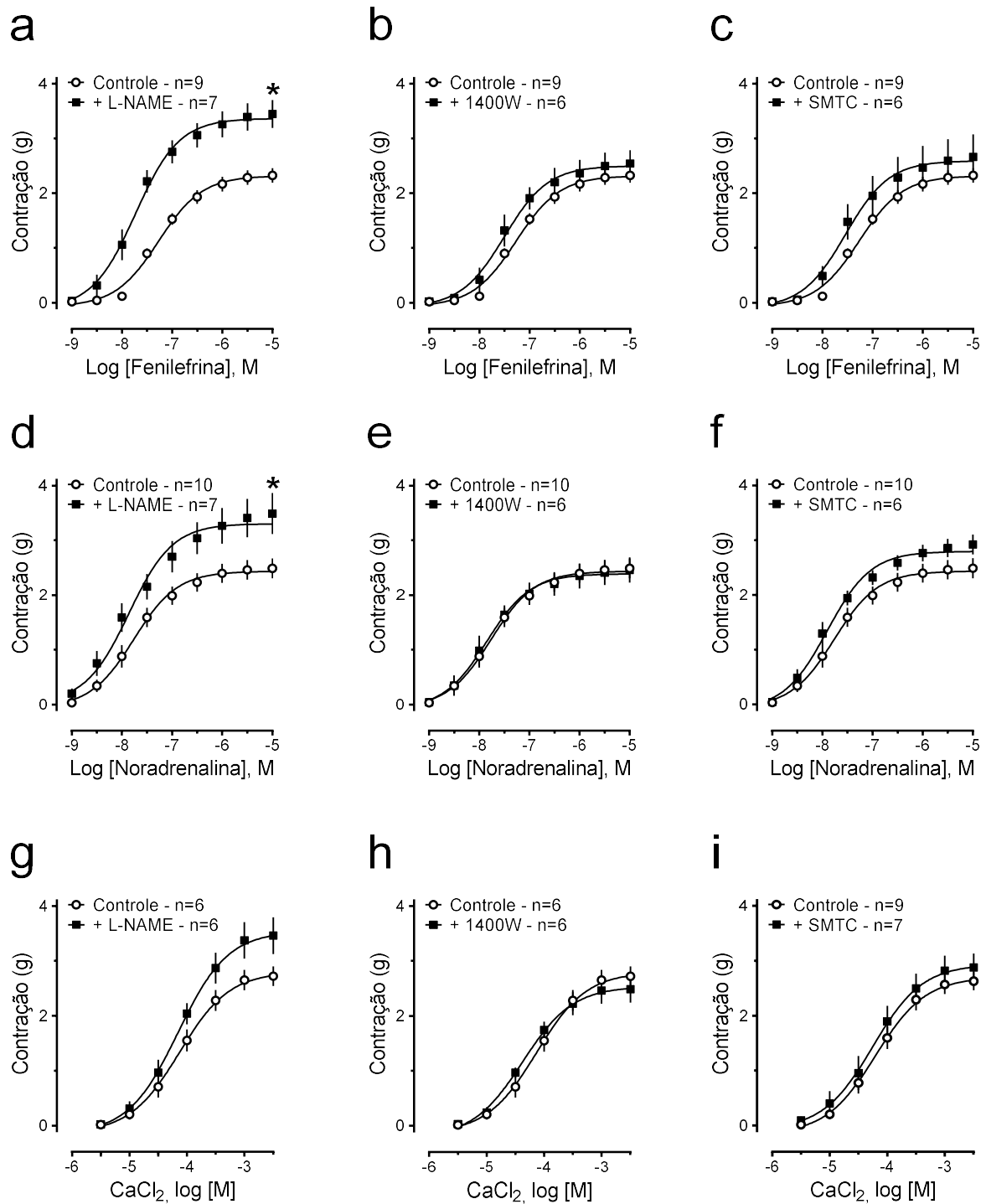


Figura 11 – Efeito de inibidores das NOS em anéis de aorta de ratos controle. Os anéis de aorta do grupo controle foram incubados por 30 minutos com L-NAME (100 μ M; a, d, g) 1400W (10 μ M; b, e, h) e SMTc (10 μ M; c, f, i). Em seguida foram construídas curva de respostas dependentes da concentração aos vasoconstritores fenilefrina, noradrenalina e CaCl_2 . Antes da curva com CaCl_2 os anéis foram mantidos por 60 minutos em líquido despolarizante sem cálcio (g, h, i). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6-10) por grupo, e avaliados através de ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ comparando as preparações incubadas com veículo com as preparações incubadas com os respectivos inibidores.

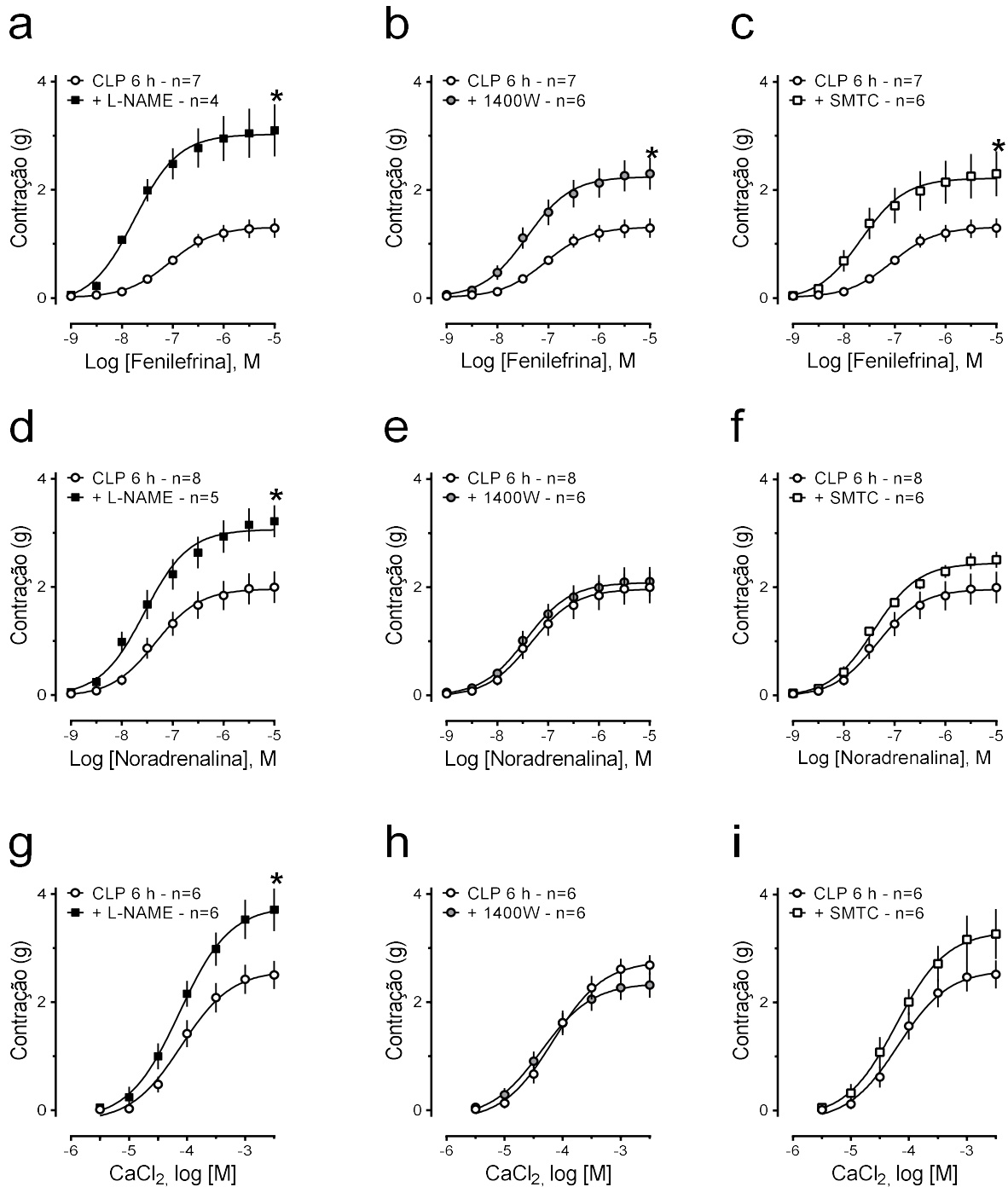


Figura 12 – Efeito de inibidores das NOS em anéis de aorta de ratos 6 horas após a indução de sepsis. Os anéis de aorta do grupo CLP 6 h foram incubados por 30 minutos com L-NAME (100 μ M; a, d, g) 1400W (10 μ M; b, e, h) e SMTC (10 μ M; c, f, i). Em seguida foram construídas curva de respostas dependentes da concentração aos vasoconstritores fenilefrina, noradrenalina e CaCl_2 . Antes da curva com CaCl_2 os anéis foram mantidos por 60 minutos em líquido despolarizante sem cálcio (g, h, i). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6-10) por grupo, e avaliados através de ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ comparado com as preparações incubadas com o veículo.

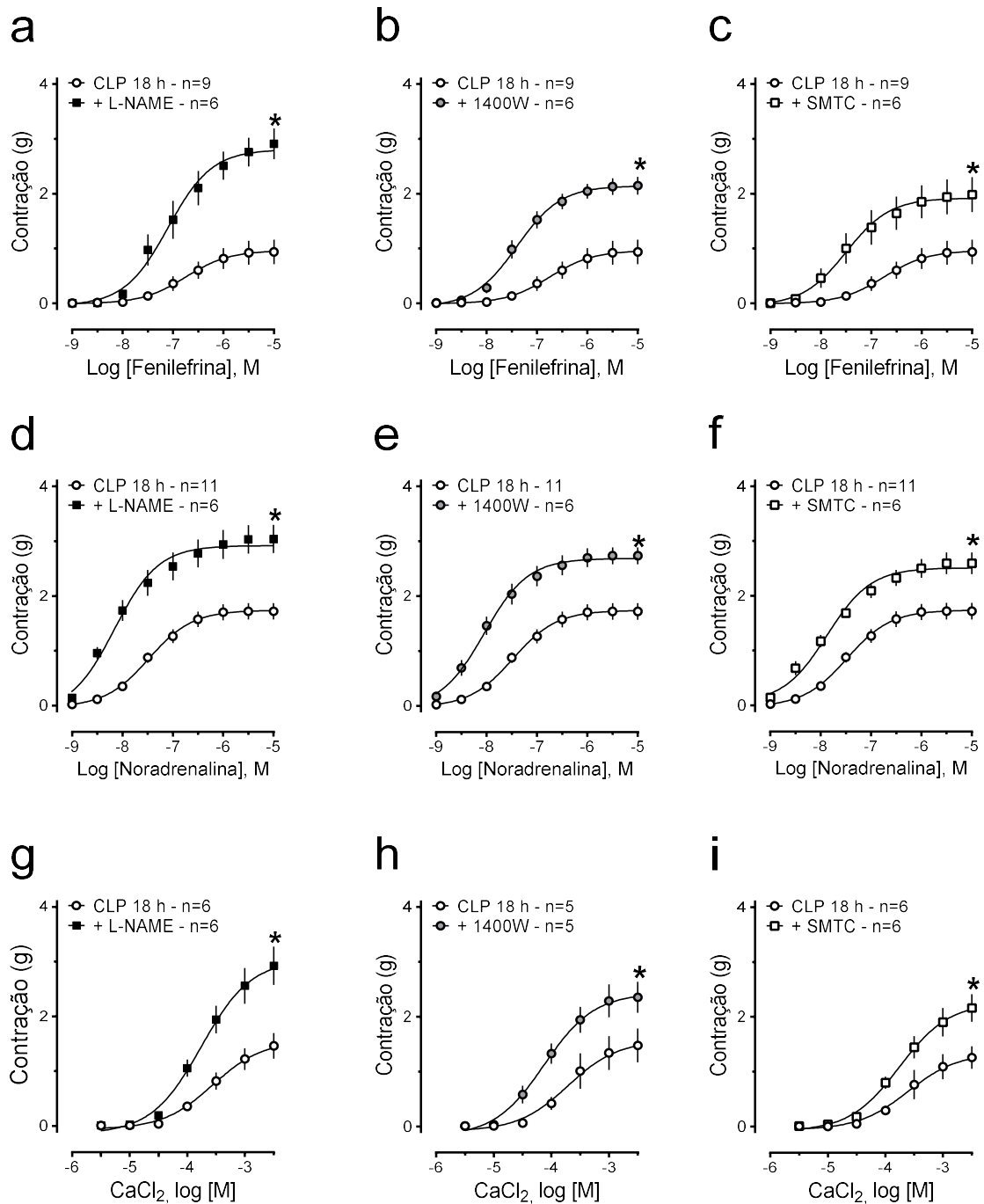


Figura 13 – Efeito de inibidores das NOS em anéis de aorta de ratos 18 horas após a indução de sepse. Os anéis de aorta do grupo CLP 18 h foram incubados por 30 minutos com L-NAME (100 μ M; a, d, g) 1400W (10 μ M; b, e, h) e SMTC (10 μ M; c, f, i). Em seguida foram construídas curva de respostas dependentes da concentração aos vasoconstritores fenilefrina, noradrenalina e CaCl₂. Antes da curva com CaCl₂ os anéis foram mantidos por 60 minutos em líquido despolarizante sem cálcio (g, h, i). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=6-10) por grupo, e avaliados através de ANOVA de duas vias seguida pelo pós teste de Bonferroni. * indica p < 0,05 comparado com as preparações incubadas com o veículo.

Tabela 3 – Valores de R_{max} e CE_{50} das curvas de respostas dependentes da concentração à fenilefrina, noradrenalina e $CaCl_2$.

	Fenilefrina	Noradrenalina	$CaCl_2$
Controle - (veículo)			
R_{max} (g)	2,31 ± 0,056	2,43 ± 0,076	2,79 ± 0,100
CE_{50} (μM)	0,053 (0,03-0,07)	0,017 (0,010-0,027)	74,08 ± (45,68-120,1)
Controle - L-NAME			
R_{max} (g)	3,36 ± 0,104 *	3,30 ± 0,130 *	3,54 ± 0,152
CE_{50} (μM)	0,018 (0,01-0,029)	0,013 (0,0074-0,025)	69,83 (38,64-126,2)
Controle - 1400W			
R_{max} (g)	2,49 ± 0,107	2,38 ± 0,092	2,53 ± 0,100
CE_{50} (μM)	0,031 (0,017-0,056)	0,014 (0,007-0,025)	42,23 (23,31-76,49)
Controle - SMTc			
R_{max} (g)	2,59 ± 0,154	2,79 ± 0,070	2,93 ± 0,144
CE_{50} (μM)	0,028 (0,012-0,063)	0,012 (0,008-0,018)	55,64 (26,85-115,3)
CLP 6 h - (veículo)			
R_{max} (g)	1,31 ± 0,064	1,96 ± 0,111	2,58 ± 0,131
CE_{50} (μM)	0,087 (0,048-0,156)	0,045 (0,022-0,094)	79,35 (41,24-152,6)
CLP 6 h - L-NAME			
R_{max} (g)	3,02 ± 0,139 *	3,06 ± 0,122 *	3,77 ± 0,177 *
CE_{50} (μM)	0,017 (0,008-0,034)	0,027 (0,015-0,048)	73,81 (39,03-139,6)
CLP 6 h - 1400W			
R_{max} (g)	2,24 ± 0,110 *	2,08 ± 0,096	2,35 ± 0,105
CE_{50} (μM)	0,037 (0,019-0,073)	0,036 (0,019-0,068)	43,19 (21,84-85,42)
CLP 6 h - SMTc			
R_{max} (g)	2,21 ± 0,147 *	2,44 ± 0,054	3,31 ± 0,194
CE_{50} (μM)	0,021 (0,008-0,056)	0,039 (0,029-0,052)	60,87 (26,39-140,4)
CLP 18 h - (veículo)			
R_{max} (g)	0,96 ± 0,09	1,74 ± 0,058	1,55 ± 0,116
CE_{50} (μM)	0,176 (0,063-0,489)	0,033 (0,021-0,052)	127,9 (63,65-593,4)
CLP 18 h - L-NAME			
R_{max} (g)	2,80 ± 0,137 *	2,92 ± 0,095 *	3,03 ± 0,166 *
CE_{50} (μM)	0,079 (0,044-0,142)	0,006 (0,004-0,0121)	174,6 (94,57-322,2)
CLP 18 h - 1400W			
R_{max} (g)	2,14 ± 0,06 *	2,68 ± 0,069 *	2,42 ± 0,126 *
CE_{50} (μM)	0,039 (0,026-0,059)	0,008 (0,005-0,013)	75,00 (37,69-149,2)
CLP 18 h - SMTc			
R_{max} (g)	1,92 ± 0,127 *	2,51 ± 0,067 *	2,26 ± 0,121 *
CE_{50} (μM)	0,031 (0,013-0,077)	0,013 (0,008-0,020)	147,9 (95,52-320,1)

A avaliação da R_{max} = Resposta contrátil máxima e CE_{50} = Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. Valores obtidos através das curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina, noradrenalina e $CaCl_2$ em anéis de aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h. As preparações foram incubadas com L-NAME (100 μM), 1400W (10 μM), SMTc (10 μM) e comparadas com as preparações veículo. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ comparado ao controle.

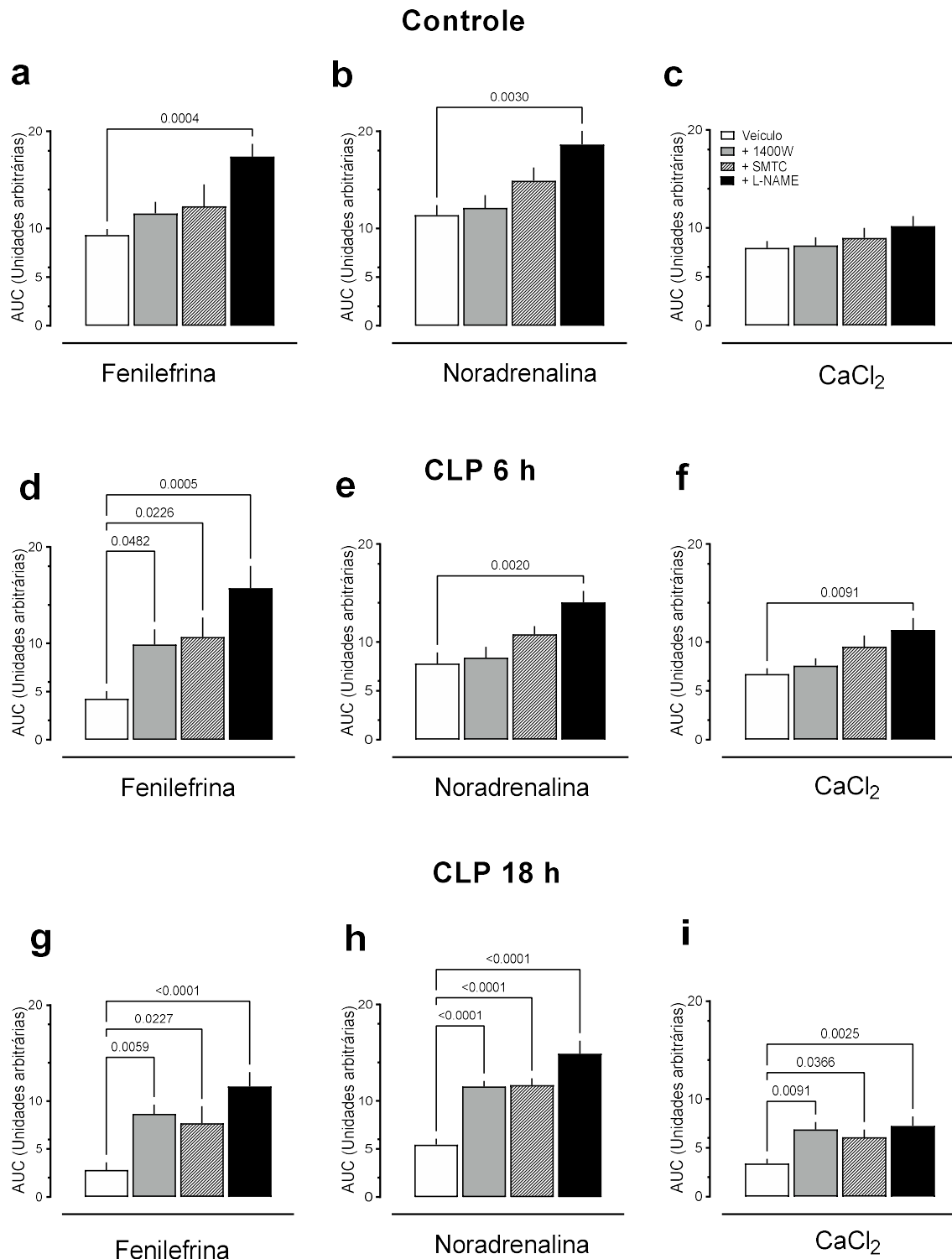


Figura 14 – Efeitos de bloqueadores de NO na AUC (área sob a curva) dos efeitos vasoconstritores da fenilefrina, noradrenalina e CaCl₂ em anéis de aorta. Os resultados foram obtidos dos grupos controle (a) CLP 6 h (b) e CLP 18 h (c) através das curvas de respostas dependentes da concentração na presença e ausência de inibidores de NO (n=4-11). Resultados expressos como a média ± erro padrão da média. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Dunnet. Foram considerados diferentes valores de $p < 0,05$ conforme indicado no gráfico.

4.5 EFEITO DE DOADOR EXÓGENO DE ÓXIDO NÍTRICO SOBRE AS CURVAS DE RESPOSTA DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO INDUZIDA POR NORADRENALINA E FENILEFRINA

Quando incubamos a aorta de animais controle com o doador de NO, nitroprussiato de sódio (NPS), na concentração de 0,1 μM por 30 minutos, e construímos CCRs para a NE e PE, a R_{max} da PE caiu de $2,16 \pm 0,09$ g para $0,77 \pm 0,04$ g (redução de 64,4%), enquanto a da NE caiu de $2,60 \pm 0,09$ g para $1,71 \pm 0,08$ g (redução de 34,3%), conforme demonstrado nas **Figuras 15a, b**. Ao mensurar a CE_{50} foi constatado que a adição de NPS provocou um aumento na CE_{50} de ambos os vasoconstritores.

Ainda, nesta fase do estudo conforme demonstrado no traçado típico (**Figura 16**) observamos que após a construção das CCRs, a NE foi capaz de dar início a uma segunda onda de contração, mesmo nas preparações incubadas com NPS (dados não mostrados). Por isso, nossa próxima sequência de experimentos foi desenhada para investigar, de forma padronizada, se essa segunda onda de contração aconteceria para os dois agonistas do receptor α_1 -adrenérgico PE e NE.

Tabela 4 – Influência de doador exógeno de NO sobre à CCR para a fenilefrina e noradrenalina.

	Fenilefrina	Noradrenalina
<i>Controle (veículo; n= 6-7)</i>		
R_{max} (g)	$2,16 \pm 0,09$	$2,60 \pm 0,09$
CE_{50} (μM)	0,091 (0,05-0,16)	0,035 (0,01-0,06)
<i>NPS (0,1 μM; n= 6-7)</i>		
R_{max} (g)	$0,77 \pm 0,04^*$	$1,71 \pm 0,08^*$
CE_{50} (μM)	0,220 (0,10-0,48)	0,13 (0,06-0,25)

R_{max} = Resposta contrátil máxima; CE_{50} =Concentração efetiva capaz de gerar 50% do efeito máximo. Os resultados foram obtidos através das curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina e noradrenalina em anéis de aorta dos grupos controle (veículo) e incubados com NPS. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni * $p < 0,05$ em comparação com as preparações incubadas com veículo.

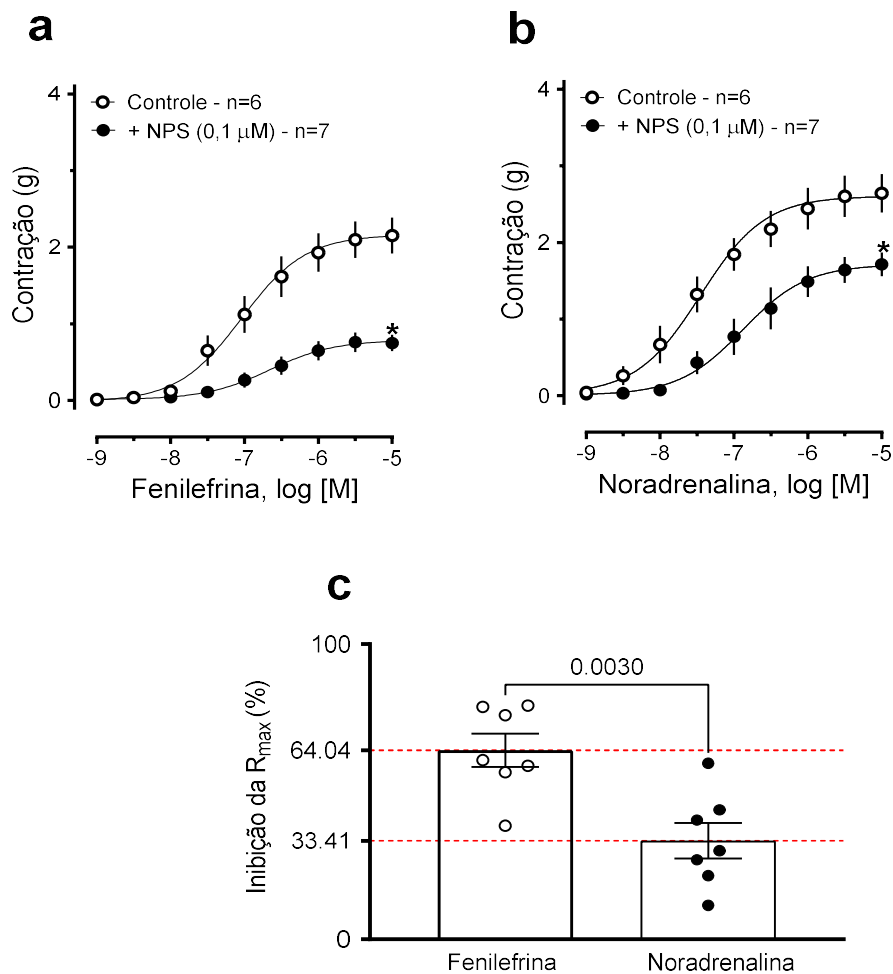


Figura 15 – Efeito de doador exógeno de óxido nítrico, nitroprussiato de sódio (NPS), nas curvas de resposta dependentes da concentração induzida por noradrenalina e fenilefrina. O efeito de doador exógeno de óxido nítrico foi avaliado em aorta de ratos naive previamente incubados com (veículo) ou NPS (0,1 μ M) por 30 minutos. Após, foram construídas curvas de resposta dependentes da concentração para a fenilefrina (a) e noradrenalina (b). O painel (c) apresenta a % de redução das respostas máximas induzidas pela fenilefrina e noradrenalina na presença de NPS. A linha tracejada em vermelho representa a média da % de redução para a fenilefrina e noradrenalina. Os valores mostram a média \pm erro padrão da média (n=6-7) obtidos dos grupos experimentais. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni, painéis (a-b). * $p < 0,05$ em comparação com as preparações incubadas com veículo. Para o gráfico (c) a diferença foi avaliada por meio de teste t de Student. Foram considerados diferentes valores de $p < 0,05$ conforme indicado no gráfico.

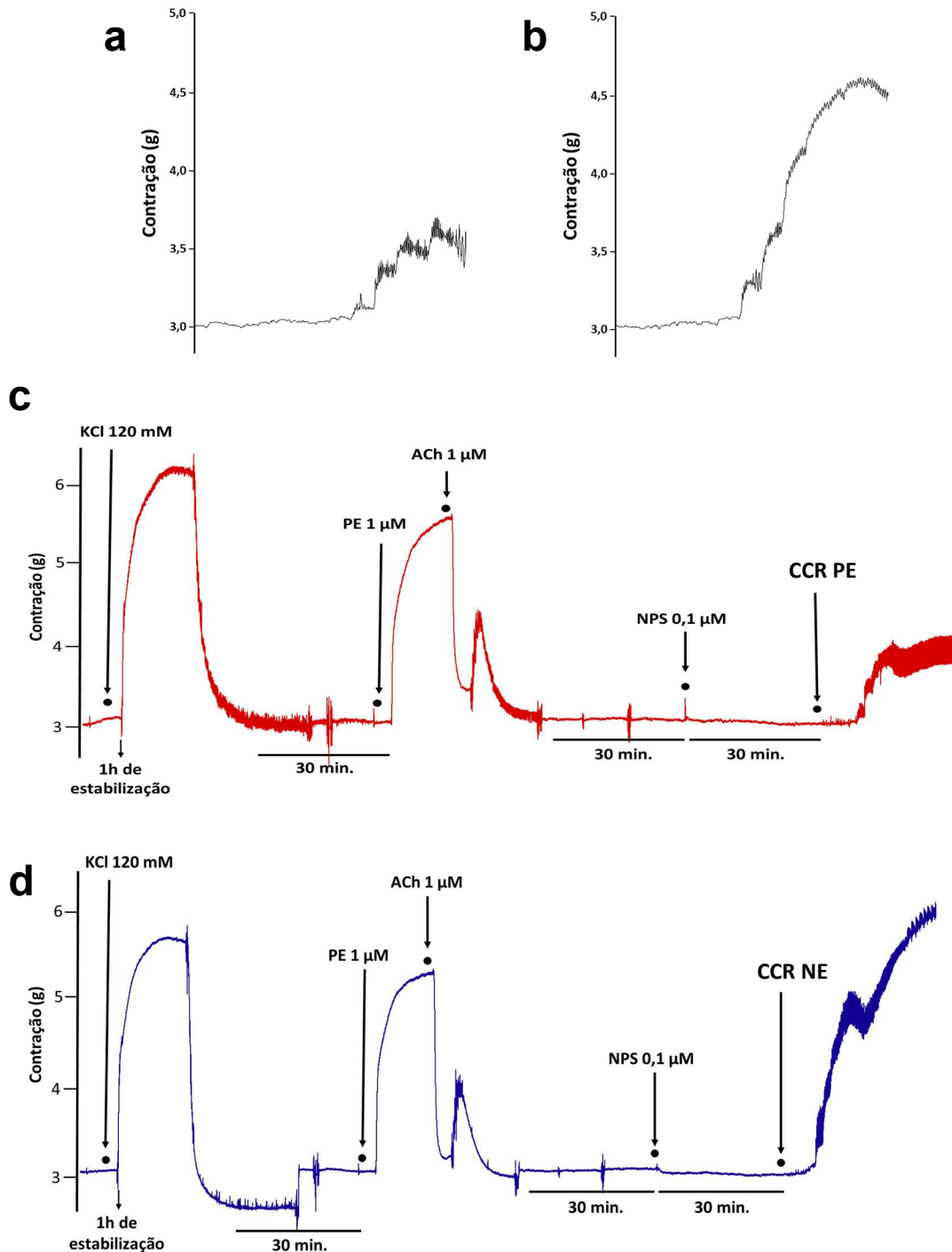


Figura 16 – Registros típicos de experimentos em anéis de aorta de ratos controle incubados com NPS. CCRs para a PE (a) e (b) NE em anéis de aorta incubados com NPS 0,1 μM por 30 minutos. (c) e (d) Após 1 hora de estabilização foi avaliada a viabilidade do tecido através da contração com KCl 120 mM, após mais um período de estabilização de 30 minutos foi verificada a presença de endotélio funcional através do relaxamento com Acetilcolina (ACh) sobre o platô de contração da PE. (Relaxamento igual ou superior a 80%) indicando a integridade do endotélio. Em seguida os anéis foram estabilizados por 30 minutos e incubados com NPS (0,1 μM) por 30 minutos. Após foram realizadas adições de concentrações crescentes de PE (a) e NE (b) ilustrando a segunda onda de contração para a NE na presença do NPS.

4.6 SEGUNDA ONDA DE CONTRAÇÃO INDUZIDA PELA NORADRENALINA EM ANÉIS DE AORTA

Neste bloco de resultados, demonstramos que, após a clássica curva de resposta dependente da concentração, a NE, ao atingir a R_{max} (2,55 g, nesse conjunto de experimentos) seguida pela fase de platô e um leve relaxamento inicia uma segunda onda de contração (média de $1,15 \pm 0,2$). Entretanto, o mesmo não é visto para o outro agonista do receptor α_1 -adrenérgico a PE ou acontece em proporções muito menores (**Figura 18**) embora os dois ligantes em teoria compartilhem a mesma via de transdução. Em seguida, consideramos avaliar esse efeito nos animais sépticos, visto que essa resposta contrátil parece contrastar com o quadro de hiporresponsividade aos vasoconstritores.

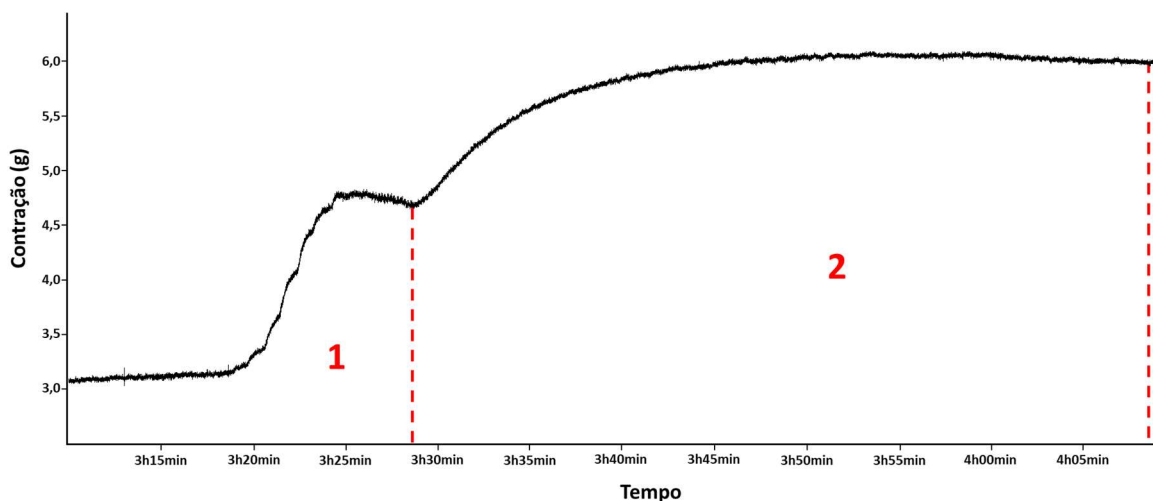


Figura 17 – Registro típico de uma curva de resposta dependente da concentração para a noradrenalina. Ao lado esquerdo, a resposta contrátil para as concentrações crescentes e cumulativas de noradrenalina (1nM a 300 μ M) – Fase 1 – seguida pelo platô, e por uma segunda onda de contração – Fase 2 – registrada ao longo de 40 minutos.

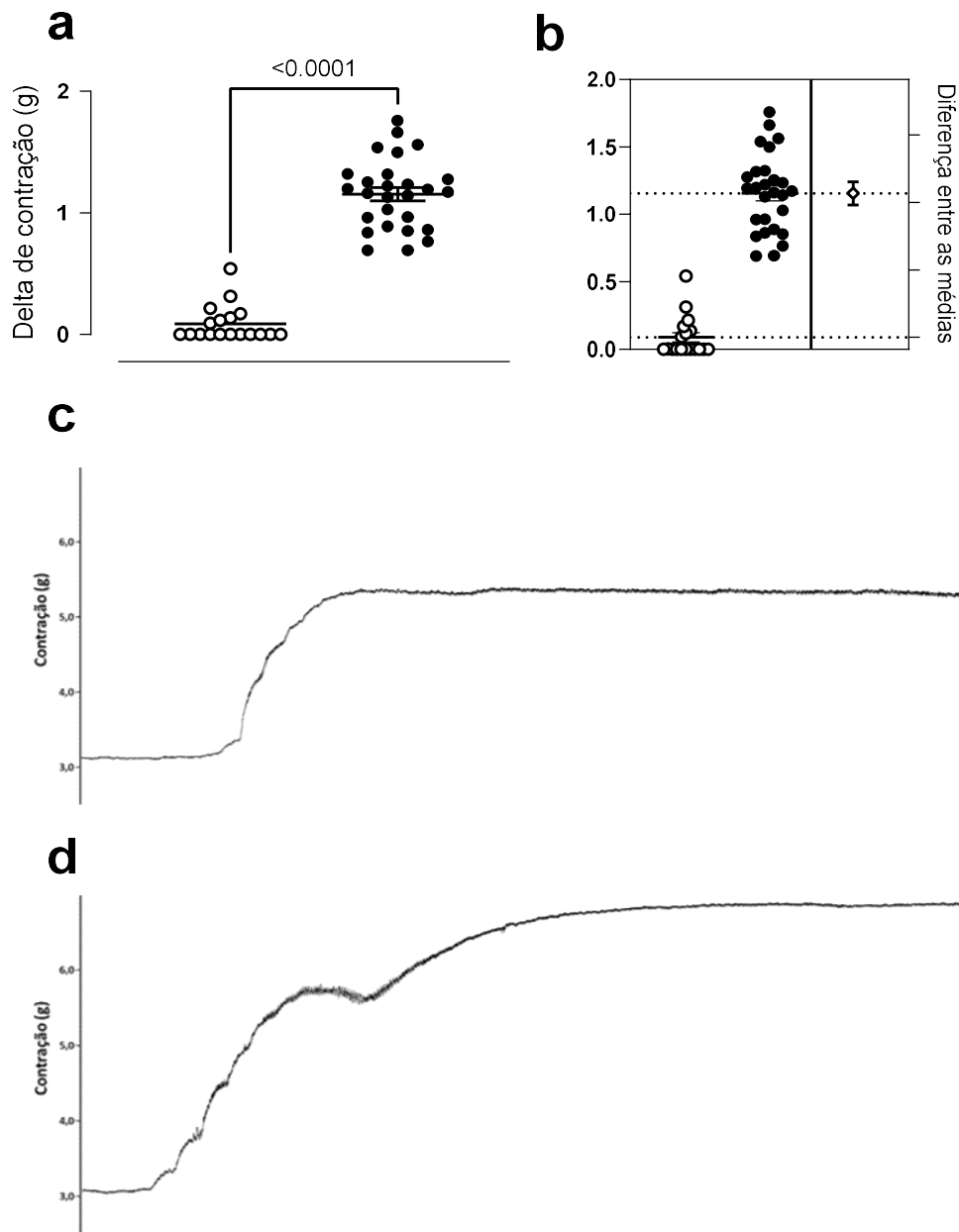


Figura 18 – A noradrenalina apresenta uma segunda onda de contração após as curvas de respostas dependentes da concentração. (a) Valores referentes ao delta de contração após 40 minutos do platô da resposta para a noradrenalina e fenilefrina. (b) Diferença entre as médias. Os painéis abaixo representam os traçados típicos das curvas de resposta dependentes da concentração para a fenilefrina (c) e noradrenalina (d) em aortas de animais controle. Resultados expressos como a média \pm E.P.M. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* de Student. Foram considerados diferentes valores de $p < 0,05$ conforme indicado no gráfico.

4.7 EFEITO BIFÁSICO DA NORADRENALINA EM AORTA DE ANIMAIS SUBMETIDOS A CLP

Nesses experimentos, comparamos a magnitude do segundo efeito de contração de ambos os agonistas PE e NE, após as CCRs nos grupos controle e sépticos. Como demonstrado na **Figura 19b** os animais submetidos à CLP também apresentam um efeito bifásico para a NE (agonista endógeno). No curso de tempo de 6 h após a CLP o delta de contração não é reduzido se comparado ao observado em artérias do grupo controle (médias $1,15 \pm 0,28$ para $1,37 \pm 0,34$, para controle e CLP 6 h respectivamente). Curiosamente embora a resposta registrada em anéis do grupo CLP 18 h não tenham diferido do controle, o delta de contração mostrou-se reduzido quando comparado ao grupo CLP 6 h ($0,91 \pm 0,42$). Como demonstrado na **Figura 19a** a PE também não apresentou esse efeito bifásico no grupo séptico, enquanto no grupo controle, como observado em outros conjuntos de experimentos, essa resposta é inexistente ou acontece em proporções muito menores.

Uma vez que ambos os vasoconstritores dependam de variações em concentrações intracelulares de cálcio para induzir e manter seus efeitos contráteis, os experimentos subsequentes foram desenhados para investigar o envolvimento do cálcio nas diferenças de respostas observadas.

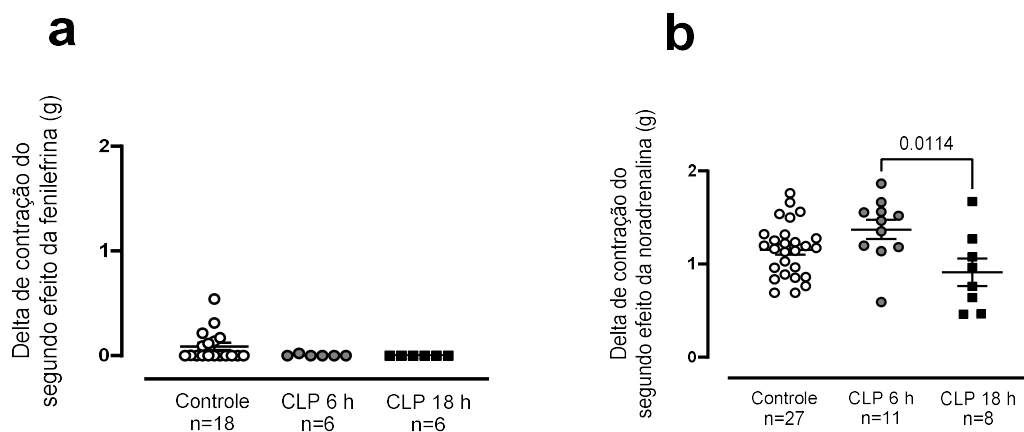


Figura 19 – A sepse não impede o efeito bifásico da noradrenalina após as curvas de respostas dependentes da concentração. Valores referentes ao delta de contração após 40 minutos do platô das curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina (a) e noradrenalina (b) nos grupos controle e sépticos. Resultados expressos como a média \pm E.P.M. (n = 6-27 por grupo). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. Foram considerados diferentes valores de $p < 0,05$ conforme indicado no gráfico.

4.8 CONTRATILIDADE INDUZIDA POR FENILEFRINA E NORADRENALINA EM MEIO LIVRE DE CÁLCIO

Nosso intuito neste bloco de experimentos foi explorar se há alterações em mecanismos envolvendo a liberação de cálcio na sepse. Para isso, submetemos o vaso à condição experimental em que se tem depleção do cálcio proveniente do meio extracelular. Dessa forma, para a manutenção do tônus é necessário que o vaso utilize o cálcio proveniente do meio intracelular (retículo endoplasmático). A retirada de cálcio em 6 h após a CLP não foi capaz de alterar a resposta fásica para ambos os vasoconstritores estudados, em comparação com a aorta de animais controle. Entretanto, em 18 h após a CLP, a retirada do cálcio provocou redução significativa da contratilidade vascular induzida por PE e NE, com uma redução para a PE de $0,77 \pm 0,08$ em preparações controle para $0,21 \pm 0,06$ (grupo CLP 18 h) e para a NE os valores foram na ordem de $0,95 \pm 0,06$ em preparações controle para $0,37 \pm 0,04$ (grupo CLP 18 h) (**Figuras 20a, b**).

Da mesma forma, a fase de sustentação da contração em meio isento de cálcio foi reduzida. A queda da fase tônica apresentada pela PE apresentou um declínio nos grupos sépticos 6 e 18 h após a CLP, valores expressos na ordem de $34,79 \pm 3,23$, $49,47 \pm 3,83$ e $58,29 \pm 4,33$ (grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h respectivamente). Por outro lado, as respostas geradas pela NE não foram reduzidas em 6 h após a CLP, no entanto em 18 h obtivemos redução na fase tônica, como demonstram os valores para os grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h, de $43,72 \pm 3,31$, $49,38 \pm 3,14$ e $62,50 \pm 3,88$ respectivamente (**Figura 21a, b**).

4.9 AVALIAÇÃO DA ENTRADA DE CÁLCIO DO MEIO EXTRACELULAR INDUZIDA POR FENILEFRINA E NORADRENALINA NOS GRUPOS CONTROLE E SÉPTICOS

Com a finalidade de explorar alterações envolvendo o manuseio de cálcio proveniente do meio extracelular, os anéis aórticos foram mantidos em meio sem cálcio por 15 minutos e em seguida foram expostos a $1 \mu\text{M}$ de PE ou NE. Após 10 minutos do platô da contração, adicionamos concentrações crescentes de CaCl_2 . Nossos resultados indicam que, em anéis previamente expostos à PE, ocorreu uma redução na CCR ao CaCl_2 na ordem de $0,82 \pm 0,27$ para $0,37 \pm 0,13$ e $0,15 \pm 0,05$ nos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h respectivamente. Da mesma forma, na contração

induzida por NE as CCR ao CaCl_2 apresentaram valores de $1,03 \pm 0,35$ para $0,63 \pm 0,21$ para $0,32 \pm 0,12$ nos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h respectivamente. O que nos indica que tanto a PE quanto a NE provoca uma redução bastante intensa da contratilidade vascular ao CaCl_2 (**Figura 22b**).

A seguir consideramos explorar se a via de manutenção da contração mediada pelas proteínas RhoA/Rho-cinase estão sendo moduladas de maneira diferente pela PE e NE.

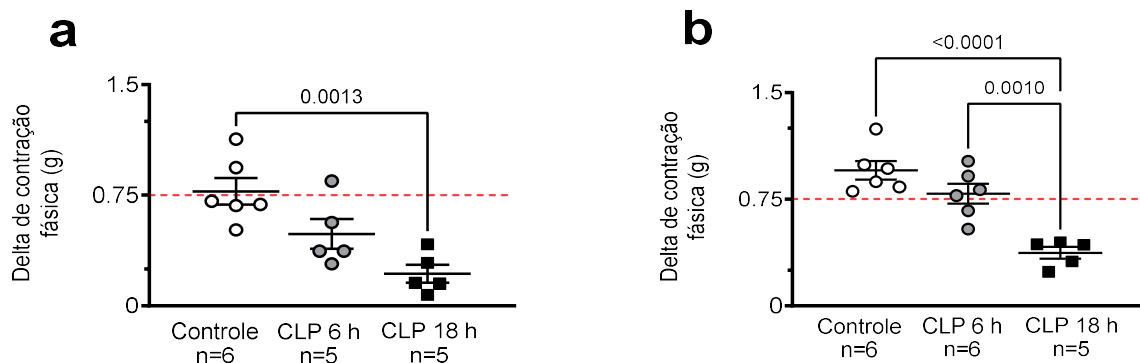


Figura 20 – Redução da resposta contrátil a vasoconstritores 18 h após a CLP em aorta de ratos mantidas em solução nutritiva sem cálcio. A aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h foram mantidas por 15 minutos em solução nutritiva sem cálcio e após foi avaliada a contração induzida por fenilefrina (a) e noradrenalina (b) na concentração de $1 \mu\text{M}$, em seguida avaliamos as fases fásica da contração para a fenilefrina (a) e noradrenalina (b). A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. Foram considerados diferentes valores de $p < 0,05$ conforme indicado no gráfico.

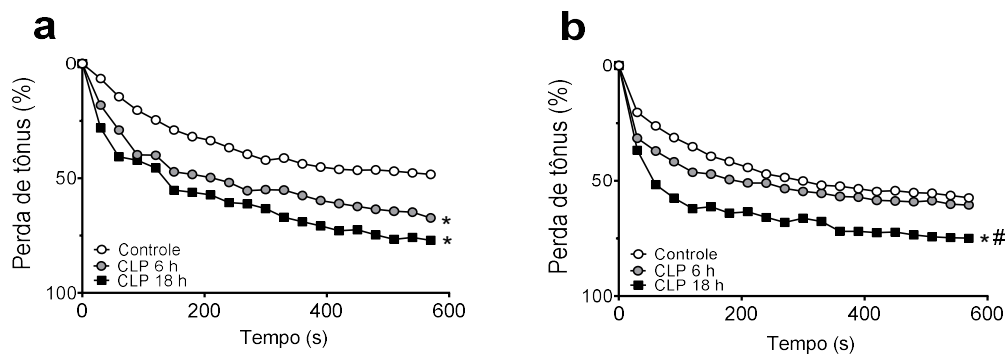


Figura 21 – Redução da fase tônica da contração para a fenilefrina e noradrenalina em 18 h após a CLP em meio isento de cálcio. A aorta dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h foram mantidas por 15 minutos em solução nutritiva sem cálcio e após foi avaliada a contração induzida por fenilefrina (a) e noradrenalina (b) na concentração de $1 \mu\text{M}$, e mensuramos a fase tônica da contração ponto a ponto a cada 30 segundos (a) fenilefrina e (b) noradrenalina. A diferença entre os grupos foi verificada pela ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey. * indica $p < 0,05$ em comparação ao controle. # indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo CLP 6 h.

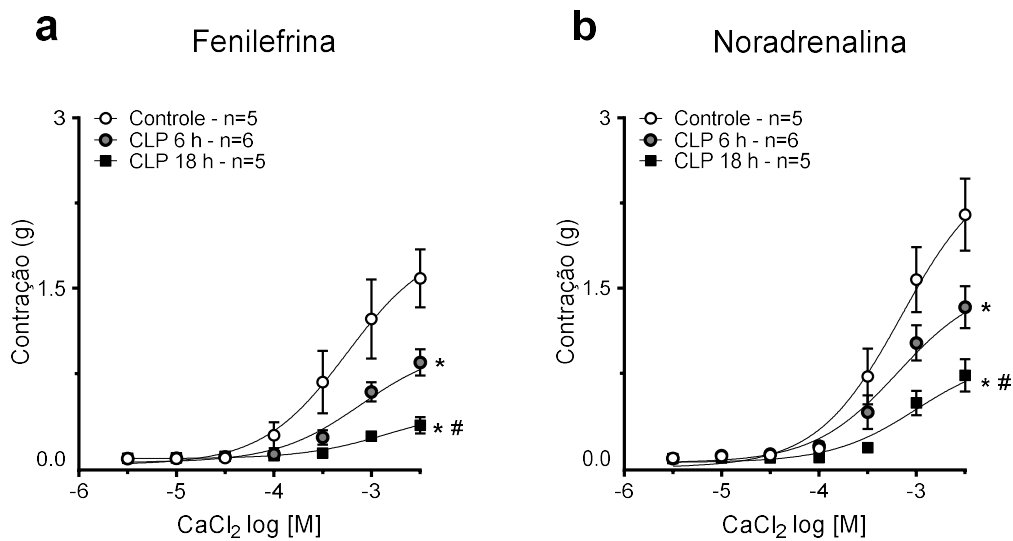


Figura 22 – Redução da responsividade vascular para o CaCl_2 em anéis de aorta de animais sépticos pré contraídos com fenilefrina e noradrenalina. Foram utilizados anéis de aorta de ratos dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h mantidos por 15 minutos em líquido sem cálcio e contraídas com $1 \mu\text{M}$ de fenilefrina (a) e noradrenalina (b) seguida da construção de curvas de respostas dependentes da concentração para o CaCl_2 . Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média ($n=5-6$) por grupo. A diferença entre os grupos foi verificada pela ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação ao controle. # indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo CLP 6 h.

4.10 EFEITO DO COMPOSTO Y-27632 NAS CURVAS DE RESPOSTAS DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO PARA A FENILEFRINA E NORADRENALINA

Para avaliar a participação da via de sensibilização ao cálcio, utilizamos o composto Y-27632 (inibidor seletivo da ROCK) nos grupos controle e sépticos. Nota-se que os anéis aórticos incubados com o composto Y-27632 nas concentrações de $0,3 \mu\text{M}$ e $1 \mu\text{M}$ apresentaram reduções da contratilidade vascular para a PE, na ordem de $122 \pm 0,32$ para $0,87 \pm 0,21$ e $0,62 \pm 0,17$ (grupo veículo, composto Y-27632 $0,3$ e $1 \mu\text{M}$ respectivamente). Por outro lado, as respostas geradas pela NE na presença do composto Y-27632 apresentaram reduções menores, em magnitude de $1,43 \pm 0,29$ para $1,20 \pm 0,26$ para $0,89 \pm 0,22$ (grupo veículo, composto Y-27632 $0,3$ e $1 \mu\text{M}$ respectivamente) (**Figuras 23a, b**). Isso se reflete na porcentagem de redução das R_{max} , conforme pode ser observado na **Tabela 5**. Ao explorar a participação desta via na sepse, em 6 h após a CLP, os resultados demonstram que o bloqueio com o composto Y-27632 foi capaz de reduzir os valores de R_{max} para os dois vasoconstritores, conforme observado na **tabela 5** e **Figuras 23c, d**. Com a evolução

do quadro séptico é notável que a inibição desta via torna os anéis aórticos muito menos responsivos a PE, provocando reduções de $0,45 \pm 0,12$ para $0,29 \pm 0,07$ para $0,13 \pm 0,02$ (grupo CLP 18 h -veículo composto Y-27632 0,3 e 1 μM respectivamente). Da mesma forma as respostas induzidas pela NE foram capazes de provocar reduções na ordem de $0,85 \pm 0,20$ para $0,66 \pm 0,15$ para $0,19 \pm 0,04$ (grupos CLP 18 h -veículo composto Y-27632 0,3 e 1 μM respectivamente). O que nos indica que na sepse a NE parece depender muito mais dessa via (**Figuras 23e, f**).

4.11 AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO POR 30 MINUTOS COM O COMPOSTO Y-27632 NO EFEITO BIFÁSICO INDUZIDO PELA NORADRENALINA

Exploramos o impacto do bloqueio com o composto Y-27632 no efeito bifásico induzido pela NE. Dessa forma, após as CCRs mensuramos o delta da contração do segundo efeito da NE após 40 minutos. Os resultados apresentados na **Figura 25a** demonstram que o bloqueio por 30 minutos com o composto Y-27632 nas concentrações de 0,3 μM e 1 μM não impediu o efeito bifásico nas preparações controle (veículo). Da mesma forma, o bloqueio por 30 minutos com o Y-27632 no grupo CLP 6 h também não foi capaz de atenuar o efeito bifásico (**Figura 25b**). Por outro lado, quando mensuramos o efeito bifásico da NE no grupo CLP 18 h a **Figura 25c** demonstra que o bloqueio com o composto Y-27632 na concentração de 1 μM foi capaz de provocar redução no delta do efeito bifásico da NE em comparação com as preparações incubadas com o veículo-CLP18 h.

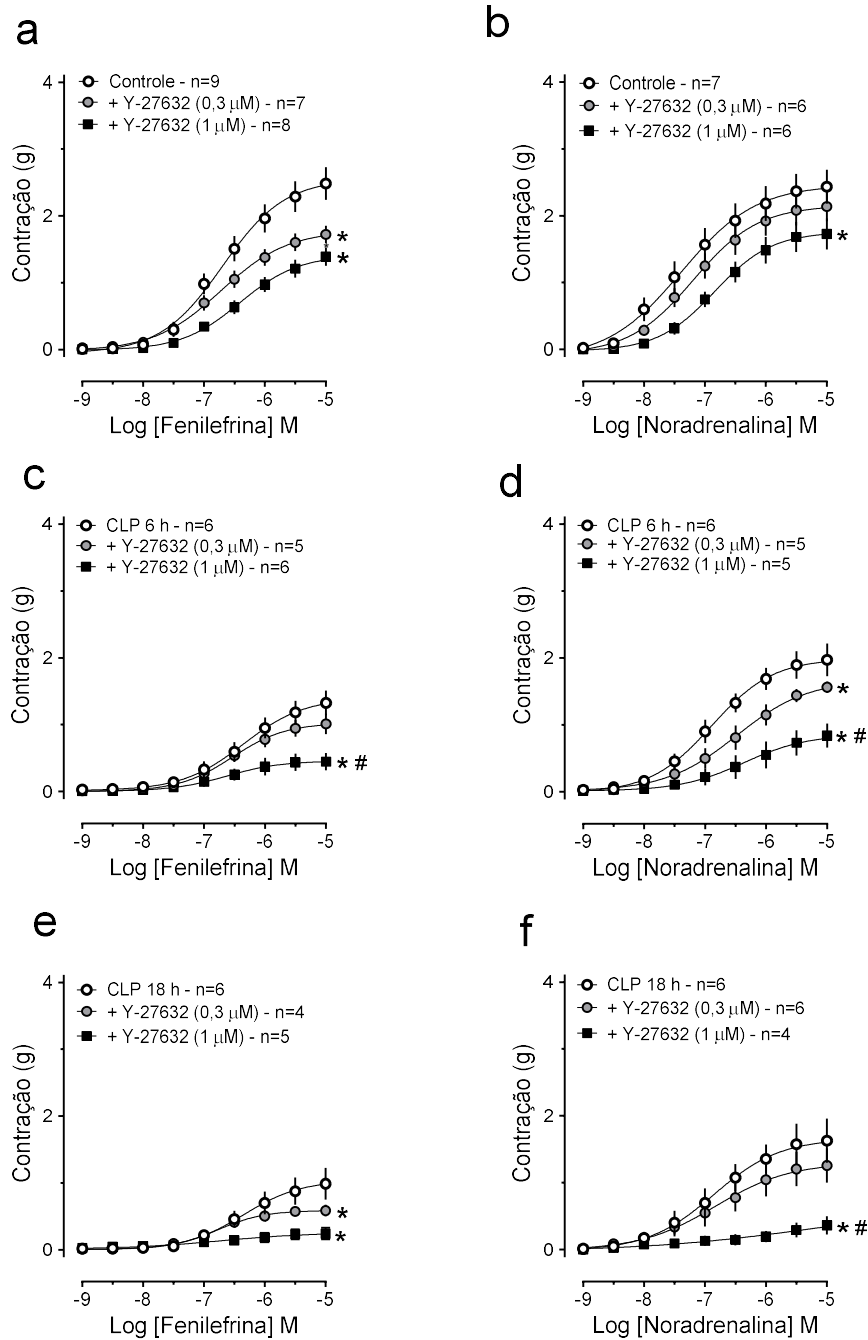


Figura 23 – Efeitos do bloqueio da Rho-cinase sobre as curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina e noradrenalina. Foram obtidos anéis dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h na presença e ausência do composto Y-27632 nas concentrações de 0,3 e 1 μM. Resultados expressos como a média ± erro padrão da média (n=4-9). A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle. # indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo CLP 6 h.

4.12 EFEITO DO BLOQUEIO DA ENTRADA DE CÁLCIO SOBRE AS CURVAS DE RESPOSTAS DEPENDENTES DA CONCENTRAÇÃO PARA A FENILEFRINA E NORADRENALINA

A entrada de cálcio proveniente do meio extracelular é uma peça importante para a manutenção da contração do músculo liso vascular. Ao avaliar a sua participação na contratilidade vascular induzida por PE e NE, nossos resultados demonstram que ao contrário do que observamos para o composto Y-27632 a incubação com a nicardipina no grupo controle, apresentou valores de $1,14 \pm 0,27$ g para $0,62 \pm 0,16$ g (grupo veículo e incubado com a nicardipina $0,1 \mu\text{M}$) para a fenilefrina, da mesma forma, as respostas geradas pela NE foram de $1,27 \pm 0,30$ g para $0,74 \pm 0,18$ g (grupo veículo e incubado com a nicardipina $0,1 \mu\text{M}$) (**Figuras 24a, b**), demonstrando que o bloqueio com a nicardipina afetou a R_{max} de maneira semelhante para ambos os vasoconstritores, conforme demonstrado na **Tabela 5**. Da mesma forma, no grupo CLP 6 h houve redução da R_{max} para os dois vasoconstritores avaliados (**Figura 24c, d**). As reduções das R_{max} podem ser observadas na **Tabela 5**, que demonstra que o padrão de redução foi semelhante para o grupo CLP 18 h entre a PE e a NE com reduções de $0,45 \pm 0,12$ g para $0,20 \pm 0,16$ g para a PE e $0,80 \pm 0,8$ g e $0,42 \pm 0,08$ g para a NE (**Figuras 24c, d**). Assim, observamos que o bloqueio com a nicardipina afetou de maneira similar a resposta dos dois vasoconstritores.

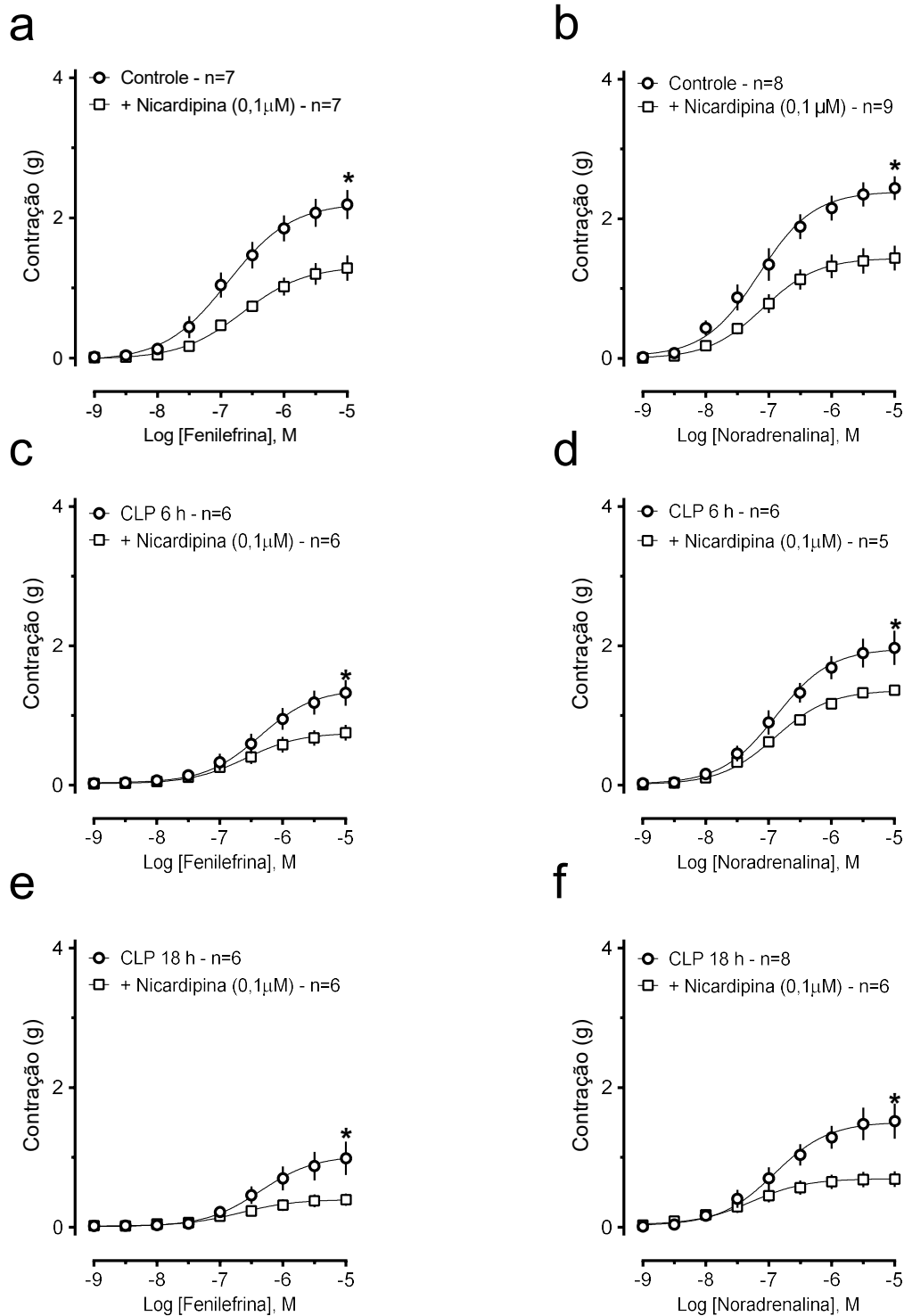


Figura 24 – O bloqueio da entrada extracelular de cálcio com a nicardipina reduz as curvas de respostas dependentes da concentração para ambos os vasoconstritores nos grupos controle e sépticos. Foram utilizados anéis de aorta de ratos dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h, incubados por 30 minutos com a nicardipina e em seguida foram construídas curvas de respostas dependentes da concentração para a fenilefrina (a) e noradrenalina (b). Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média (n=5-9) por grupo. A diferença entre os grupos foi verificada pela análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo pós-teste de Bonferroni. * indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo controle.

Tabela 5 – Inibição das respostas máximas induzidas por fenilefrina e noradrenalina.

	Fenilefrina	Noradrenalina
Controle		
0,3 μ M Composto Y-27632	30,31 \pm 0,13	21,59 \pm 12,48
1 μ M Composto Y-27632	45,27 \pm 0,17	29,37 \pm 20,47
0,1 μ M nicardipina	41,25 \pm 8,49	41,73 \pm 5,66
CLP 6 h		
0,3 μ M Composto Y-27632	30,21 \pm 20,26	17,15 \pm 9,24
1 μ M Composto Y-27632	67,79 \pm 22,54	58,13 \pm 20,26
0,1 μ M nicardipina	44,93 \pm 8,45	30,14 \pm 3,03
CLP 18 h		
0,3 μ M Composto Y-27632	43,57 \pm 16,49	35,33 \pm 23,96
1 μ M Composto Y-27632	76,05 \pm 19,01	69,80 \pm 24,76
0,1 μ M nicardipina	61,17 \pm 8,21	51,79 \pm 7,94

Os resultados apresentam a % de inibição da resposta máxima das curvas de respostas dependentes da concentração em preparações incubadas com o composto Y-27632 (0,3 μ M), composto Y-27632 (1 μ M) e nicardipina (0,1 μ M) dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h em comparação com as preparações incubadas com veículo.

4.13 AVALIAÇÃO DO BLOQUEIO POR 30 MINUTOS COM A NICARDIPINA SOBRE O EFEITO BIFÁSICO INDUZIDO PELA NORADRENALINA

Averiguamos a participação da nicardipina sobre o efeito bifásico da NE. Dessa forma, após 30 minutos do bloqueio com a nicardipina foram construídas CCRs e ao atingir o platô, mensuramos o delta de contração após 40 minutos. Os resultados demonstram na **Figura 25d, e, f** que o efeito bifásico da NE perdurou mesmo após o bloqueio dos canais de cálcio com a nicardipina tanto no grupo controle quanto séptico. Um dos nossos questionamentos foi se a nicardipina poderia estar perdendo o efeito em virtude do tempo, por essa razão em um experimento piloto incubamos a nicardipina por 5 minutos no grupo controle e em seguida construímos CCRs e mensuramos o delta do efeito bifásico após 40 minutos, no entanto mesmo bloqueando por 5 minutos o efeito não foi atenuado (dados não mostrados).

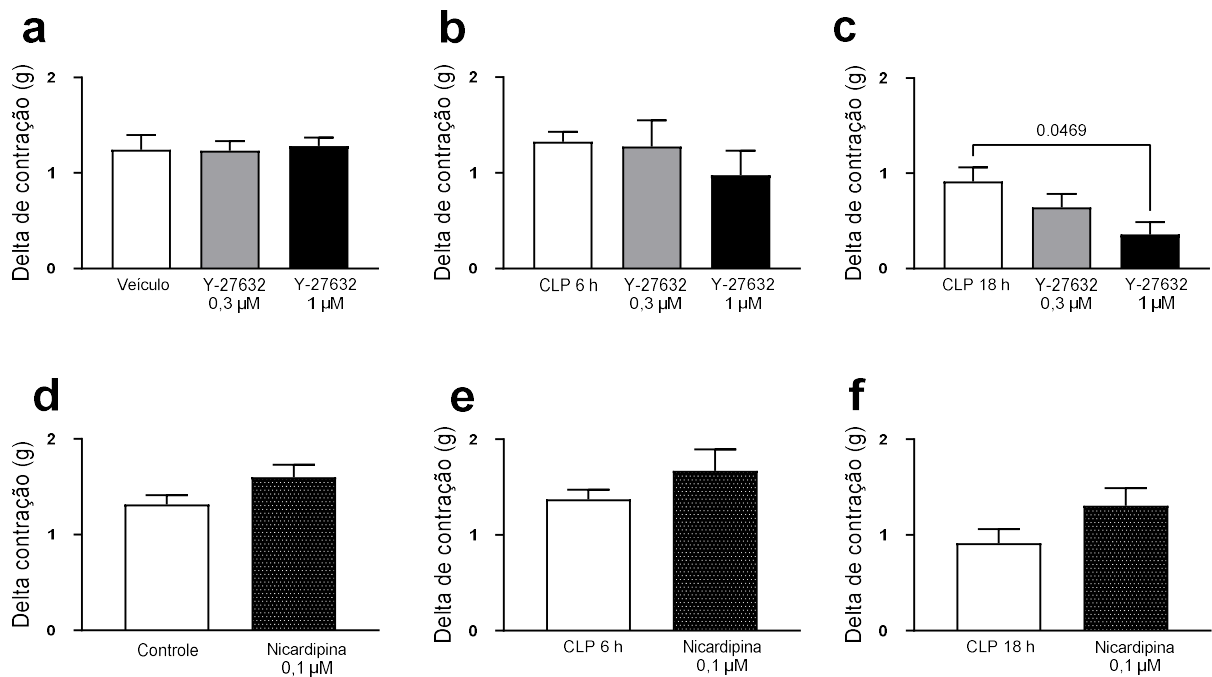


Figura 25 – Efeitos do bloqueio das vias Rho-A/Rho-cinase e entrada de cálcio na resposta bifásica induzida pela noradrenalina. Após o bloqueio por 30 minutos da via de sensibilização ao cálcio com o composto Y-27632 (0,3 μ M) e o composto Y-27632 (1 μ M) e da entrada de cálcio extracelular com a nicardipina (0,1 μ M) foram construídas curvas de respostas dependentes da concentração para a NE e após 40 minutos o delta da resposta foi mensurado. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. Nos painéis (a), (b) e (c) a diferença estatística foi verificada através do teste de análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Dunnet. Foram considerados diferentes valores de $p < 0,05$ conforme indicado no gráfico. Nos painéis (d) (e) e (f) foi realizado o teste t de Student.

4.14 EFEITO DO BLOQUEIO DA ENTRADA DE CÁLCIO EXTRACELULAR DURANTE A CONTRAÇÃO COM FENILEFRINA E NORADRENALINA

Uma vez que os mecanismos contrateis já estejam ativados e a contratilidade esteja em funcionamento, qual o efeito do bloqueio dos canais de cálcio? Essa foi a pergunta que abriu espaço para a nossa próxima sequência de experimentos e resultados. Dessa forma, os anéis aórticos foram previamente contraídos com 300 μ M de PE/NE e assim que a contração foi iniciada bloqueamos a entrada de cálcio extracelular com a nicardipina. Nossos resultados demonstram que nas preparações controle a PE foi capaz de sustentar a contração, no entanto quando adicionamos a nicardipina as respostas foram reduzidas, tanto nos grupos controle quanto sépticos. Um experimento piloto demonstrou que quando adicionamos o L-NAME concomitante com a nicardipina as respostas geradas pela PE foram restauradas nos grupos controle e sépticos (controle $n = 4$; CLP 6 h $n = 5$ e CLP 18 h $n = 2$). A estimulação

induzida por NE além de ter mantido o tônus nas preparações controle, quando adicionamos a nicardipina não foi suficiente para provocar o relaxamento das preparações mesmo em anéis de aorta proveniente de animais sépticos (que já apresenta redução no tônus vascular).

Neste bloco de experimentos fica a pergunta, o que acontece a nível de receptor quando este é estimulado através de pequenas concentrações ou quando é estimulado por uma única concentração?

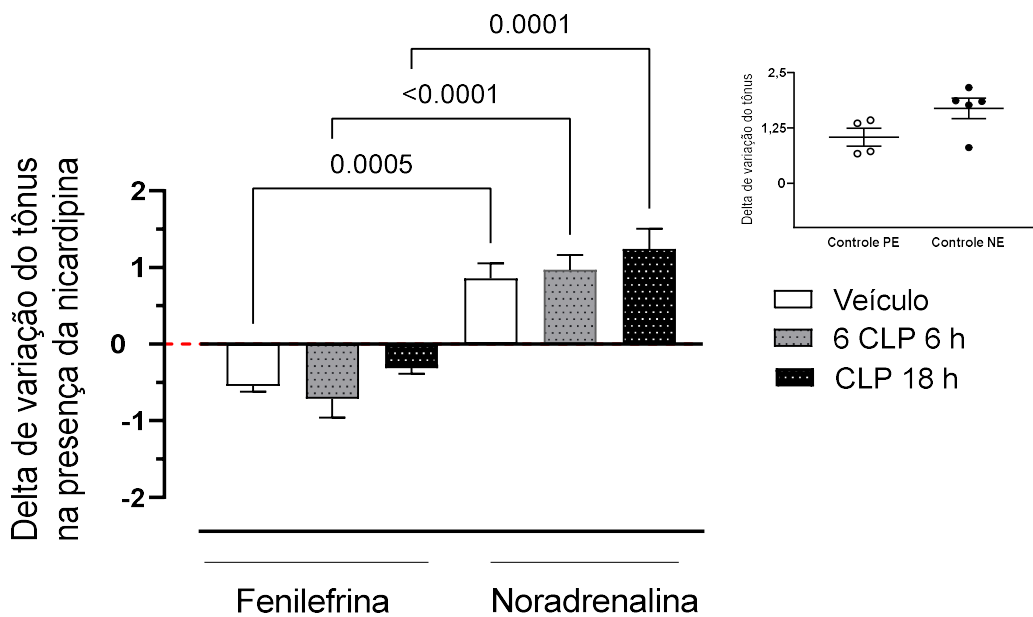


Figura 26 – Efeitos da nicardipina sobre a contração induzida por fenilefrina e noradrenalina. Os anéis de aorta foram contraídos com 300 μM de PE/NE e em seguida foi adicionado a cuba 0,1 μM de nicardipina. As respostas foram mensuradas após 40 minutos. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média $n=5-7$ por grupo. O gráfico ao lado representa o *dot plot* dos pontos individuais da contração induzida por PE e NE sem a presença de nicardipina. A diferença entre os grupos foi avaliada pela análise de variância ANOVA de uma via, seguida pelo pós-teste de Tukey. Foram considerados diferentes valores de $p < 0,05$ conforme indicado no gráfico.

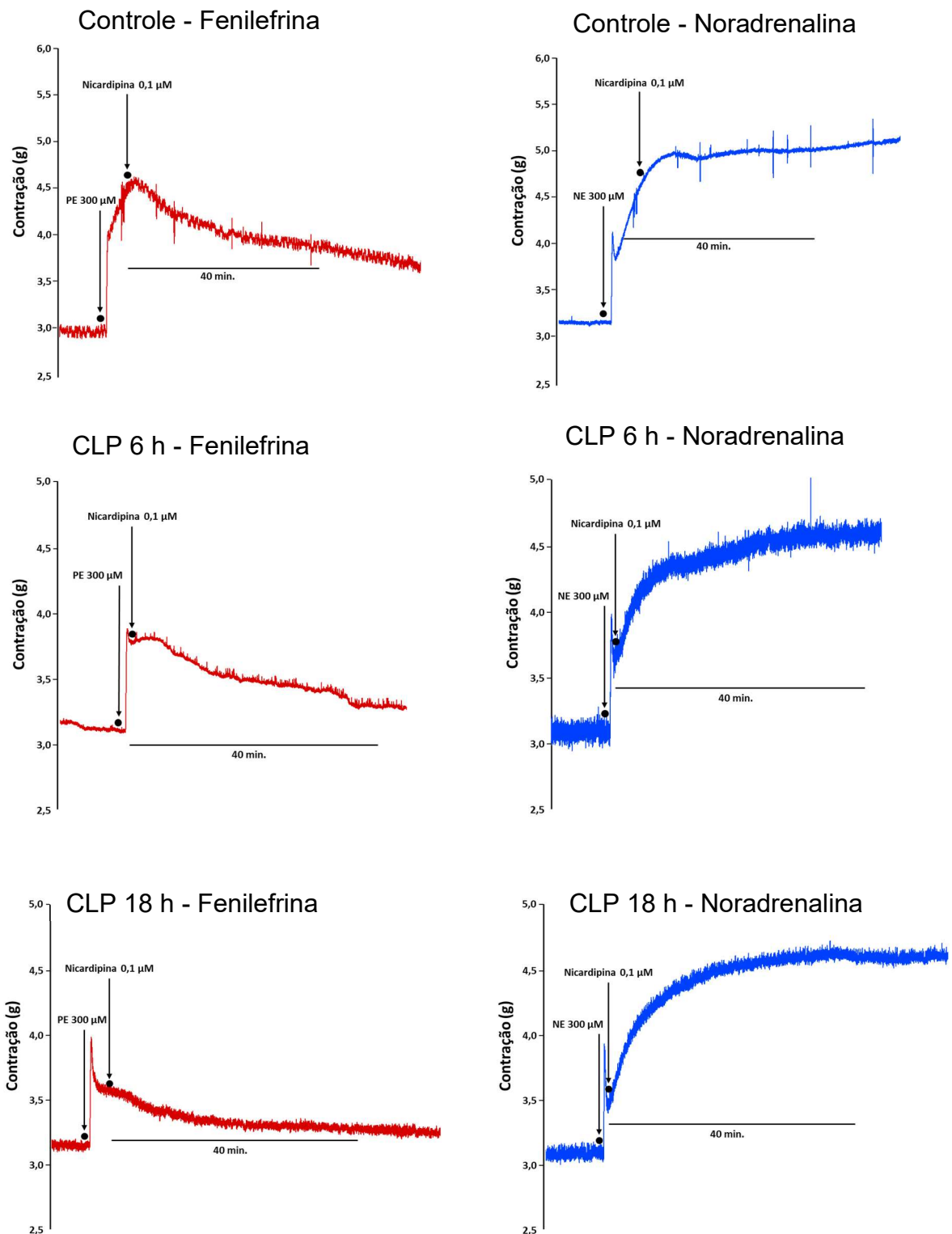


Figura 27 – Traçados típicos, demonstrando a contração vascular induzida por fenilefrina e noradrenalina na presença de nicardipina. Imagens de registros típicos das aortas provenientes dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h oriundas do mesmo animal de cada grupo. Após a realização dos protocolos experimentais descritos no item 3.2.3. As preparações foram estimuladas com PE/ ou NE na concentração de 300 μM, assim como indicado na seta e logo que iniciou a fase tônica adicionamos nicardipina (0,1 μM). Após 40 minutos as respostas foram mensuradas.

4.15 INVESTIGAÇÃO DOS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO BIFÁSICO DA NORADRENALINA

Uma questão chave é por qual mecanismo a NE está conduzindo o efeito bifásico. Nossos resultados demonstram que o TEA (bloqueador não seletivo dos canais de K^+ ativados por Ca^{2+}) não foi capaz de atenuar o efeito bifásico, assim como o bloqueio com a glibenclamida (bloqueador dos canais de K^+ dependentes de ATP), TRAM-34 (bloqueador de canais de potássio ativados por Ca^{2+} de condutância intermediária) e a 4-aminopiridina (bloqueador de canais de potássio dependente de voltagem), demonstrando que este parece não ter envolvimento dos canais de K^+ pelo menos na aorta de animais controle (**Figuras 28a, b, c, d**)

Também exploramos a possibilidade deste efeito ser mediado pelo cálcio proveniente do retículo endoplasmático. O bloqueio com a tapsigargina (inibidor da Ca^{2+} ATPase), logo após as CCRs, não foi capaz de atenuar o efeito bifásico induzido pela NE. (**Figura 28e**). Da mesma forma, o bloqueio por 30 minutos com a tapsigargina antes das CCRs para a NE não foi capaz de atenuar o efeito (dados não mostrados). Em conjunto estes resultados demonstram que este mecanismo possivelmente não é atribuído ao cálcio proveniente do retículo endoplasmático

A investigação do envolvimento do receptor β -adrenérgico no efeito bifásico demonstrou que o bloqueio com o propranolol (bloqueador β -adrenérgico não seletivo) logo após as CCRs não impediu o efeito bifásico, nas preparações controle, o que nos indica que o efeito possivelmente não está sendo mediado por esses receptores (**Figura 28f**). Uma outra possibilidade seria que em grandes concentrações a NE poderia ativar receptores α_2 -adrenérgicos, no entanto quando bloqueamos estes com a ioimbina o efeito bifásico foi mantido (dados não mostrados).

Também avaliamos a possibilidade desse efeito estar sendo mediado pela entrada do ligante (NE) na célula, através dos transportadores catiônicos-3. Utilizamos a corticosterona como bloqueador e demonstramos uma redução do efeito bifásico tanto no grupo controle, quanto séptico 6 h após à CLP, o que nos indica, que esse pode ser um dos caminhos pelos quais o efeito ocorre.

De maneira contrária ao observado com o bloqueio da nicardipina 30 minutos antes das CCRs, ao avaliarmos o efeito do bloqueio da entrada de cálcio logo após o término das CCRs, nossos resultados demonstram que o bloqueio com a nicardipina foi capaz de impedir o efeito bifásico nos grupos controle e sépticos 6 h após a CLP.

Ao avaliarmos a participação da via de sensibilização ao cálcio Rho-A/Rho-cinase, um ponto importante a ser considerado é que de maneira oposta ao observado com o bloqueio antes das CCRs, o bloqueio dessa via após as CCRs demonstra redução no efeito bifásico em todos os grupos experimentais e de maneira mais evidente na aorta de animais sépticos.

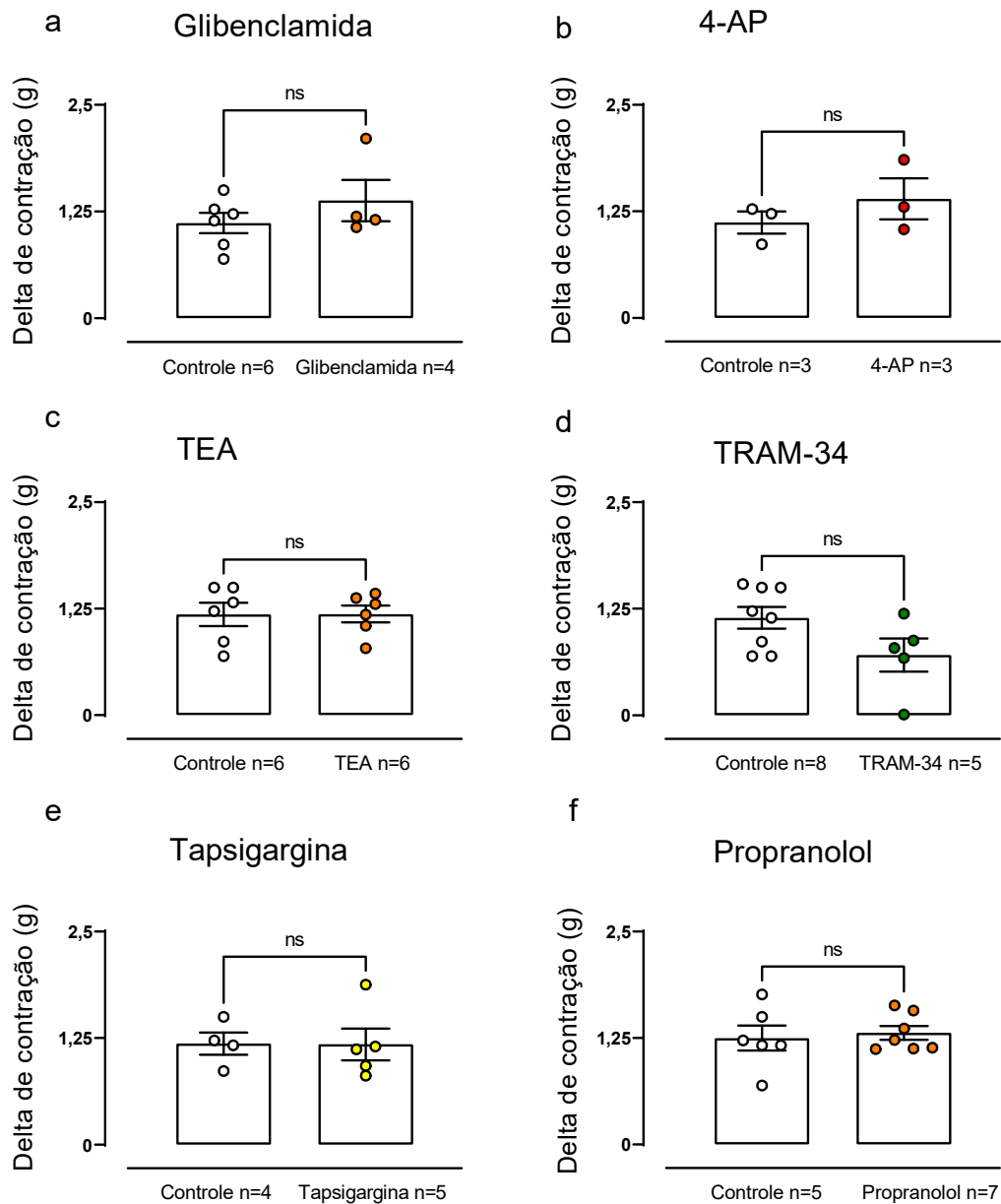


Figura 28 – Avaliação dos mecanismos envolvidos no efeito bifásico da noradrenalina. Após as curvas de respostas dependentes da concentração para a noradrenalina e ao atingir o platô as preparações foram incubadas com glibenclamida 10 μ M (a), 4-AP 1 mM (b), TEA 10 mM (c), TRAM-34 10 μ M (d), tapsigargina 100 μ M (e) e propranolol 1 μ M (f) e após 40 minutos foi mensurado o delta de contração. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A análise estatística foi verificada pelo teste *t* de Student.

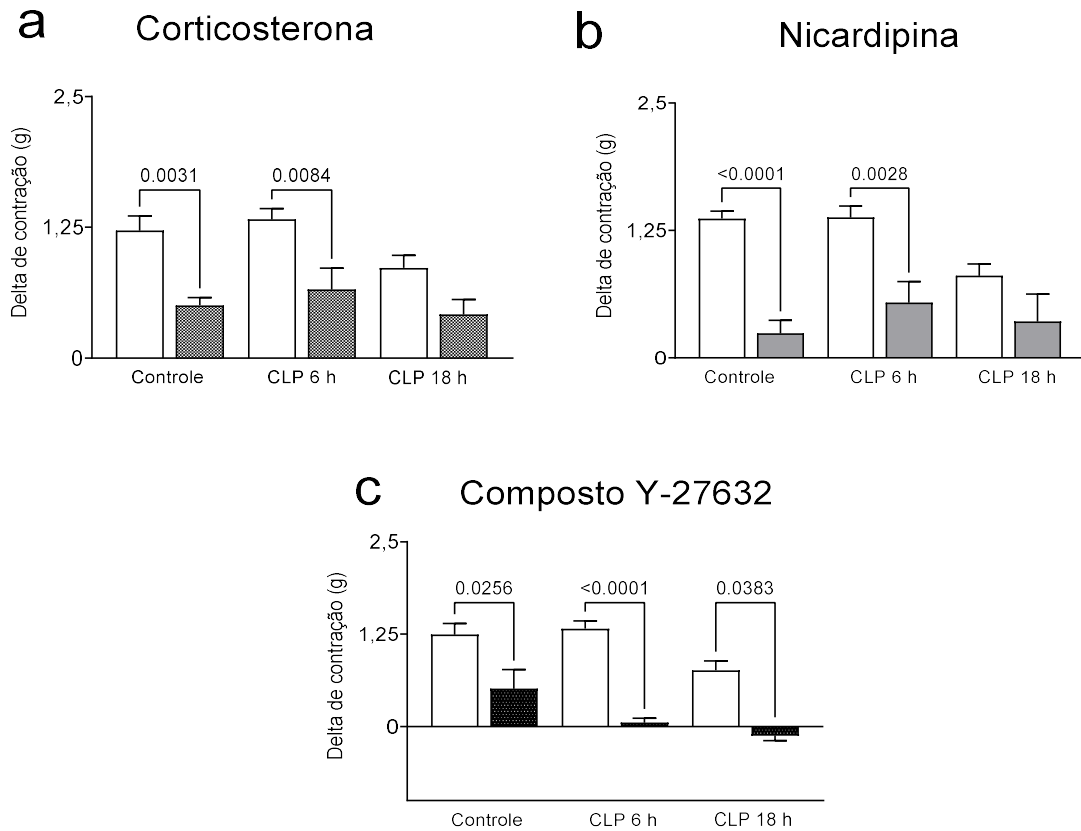


Figura 29 – Avaliação do efeito bifásico da noradrenalina nos grupos controle e sépticos. Após as curvas de respostas dependentes da concentração para a noradrenalina e ao atingir o platô as preparações dos grupos controle, CLP 6 h e CLP 18 h foram incubadas com corticosterona 100 μ M (a), nicardipina 0,1 μ M (b), e composto y-27632 1 μ M (c) e após 40 minutos foi mensurado o delta de contração. Resultados expressos como a média \pm erro padrão da média. A diferença foi verificada pela análise de variância ANOVA de uma via seguida pelo pós teste de Tukey. Foram considerados diferentes os valores de $p < 0,05$ conforme indicado no gráfico.

5 DISCUSSÃO

Uma das maneiras para se avaliar a eficácia de um agonista, é por meio de curvas do tipo cumulativa de concentração-resposta (CCR). Ao se construir tais curvas à medida que é aumentada a concentração do ligante em um espaço de tempo, tem-se também o aumento do efeito referido, até que seja alcançado o efeito máximo, seguido pela fase de platô. Por um prisma histórico, a interação ligante-receptor e o desdobramento em vias de sinalização tem sido tratada de forma monótona, ou seja, o sinal é transmitido à célula pelo complexo agonista-receptor em intensidades variadas, de acordo com a eficácia do ligante bem como das propriedades do sistema, isto é, do número de elementos produtores de estímulos (receptores) (KENAKIN, 2021). Neste trabalho, avaliamos de maneira temporal a via de transdução do receptor α_1 -adrenérgico na aorta com dois agonistas, PE e NE, em estado fisiológico e de doença (sepse), em dois tempos pós CLP, 6 h e 18 h. Com isso, mostramos que a intensidade de resposta é modulada pela concentração do ligante e a interação ligante-receptor no espaço inserido (condições fisiológicas ou de sepse) em virtude do tempo, resultando na tradução de vias intracelulares, que são alteradas na sepse de maneira diferenciada. Além disso, constatamos que estes agonistas apresentam uma cinética de resposta diferente, na qual após a clássica CCR e ao atingir o platô, a NE inicia uma segunda onda de contração, o que não é visto ou acontece em menor proporção para a PE. Exploramos também, a maquinaria contrátil na sepse, através da contração induzida com o CaCl_2 . Nossos resultados demonstram que em 18 h após a CLP há prejuízos na responsividade vascular ao CaCl_2 e este é revertido por inibidores das NOS.

O modelo de escolha para o nosso estudo foi o de ligadura e perfuração do ceco (CLP), o qual melhor se assemelha com a evolução de um quadro clínico de sepse em humanos (BAKER et al., 1983; SJAASTAD et al., 2020). Cabe destacar que a padronização do modelo experimental de sepse (CLP) utilizada no desenvolvimento deste estudo foi realizada em trabalho anterior (Bernardelli et al., 2016). Dessa forma, com a finalidade de otimizar a utilização de animais, nós não realizamos uma nova curva de sobrevivência. A análise hematológica apontou redução na contagem de leucócitos e aumento na contagem de granulócitos, o que nos indicou que o modelo foi capaz de produzir um estado inflamatório. Além do mais, os animais apresentaram

sinais característicos do modelo, tais como, letargia, piloereção e secreção de porfirina. Com base em trabalho anterior e dados da literatura, optamos por utilizar animais *naive* como controle, em alusão ao estado fisiológico.

Ligantes distintos podem compartilhar vias de transdução em comum, ao ativar o mesmo receptor. A ativação do receptor α_1 -adrenérgico acoplado à proteínas $G_{q/11}$ por exemplo, resulta na ativação da fosfolipase C (PLC) e hidrólise de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato, gerando diacilglicerol e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3), ocorrendo a liberação de íons de cálcio e a ativação de mecanismos subsequentes, que irão resultar na contração vascular. Durante um insulto séptico, o receptor α_1 -adrenérgico responsável pela transdução de sinal e consequente contração do músculo liso vascular, até então alocado em um ambiente celular fisiológico, é exposto a uma condição patológica (sepse). Por conseguinte, nesse novo contexto celular, uma característica bem documentada e associada a esses receptores é o seu envolvimento na hiporresponsividade vascular (PRICE et al., 1999; UMANS et al., 1993; WURSTER et al., 1994; CHEN; WU; YEN, 1994). No presente estudo, avaliamos a capacidade de contração da aorta através da ativação do receptor α_1 -adrenérgico por meio de CCR para a PE e NE, demonstrando que o grau de hiporresponsividade é mais acentuado quando o receptor é ativado pela PE do que quando ativado por NE (**Figura 9a, b**). Além disso, demonstramos que o prejuízo vascular observado, depende do tempo de progressão da sepse, o que está de acordo com trabalhos anteriores (WURSTER et al., 1994; CHEN; WU; YEN, 1994; BERNARDELLI et al., 2016).

O comprometimento da capacidade de resposta adrenérgica, seja devido à redução de receptores ou em decorrência da função reduzida destes (subsequente à interação física ligante-receptor), ou ainda devido à falha na via de transdução, resulta na perda do tônus vascular. Segundo Roth e Spitzer (1987), outras possibilidades podem incluir diminuição da síntese de receptores, aumento da degradação ou modificação covalente destes. No presente trabalho, não encontramos redução na densidade basal do receptor α_1 -adrenérgico marcado com o repórter fluorescente BODIPY FL-prazosina nos grupos submetidos à CLP, quando comparado ao grupo controle (**Figura 10**), embora trabalhos anteriores demonstrem redução no número de receptores em aorta (CARCILLO et al., 1988). Além disso, trabalhos explorando alterações metabólicas no fígado de animais sépticos, demonstraram redução no número total de receptores α_1 -adrenérgico neste órgão, sem alterar a afinidade de

ligação (MCMILLAN; CHERNOW; ROTH, 1986; ROTH; SPITZER, 1987). Ainda, um trabalho publicado por Hwang et al., (1993), demonstrou alterações no tráfego de receptores α_1 -adrenérgicos no fígado de ratos sépticos, no qual, no início da sepse ocorre a externalização destes receptores, enquanto em fases mais tardias são internalizados. Dessa forma, sabendo que a BODIPY FL-prazosina é permeável na célula (MACKENZIE et al., 2000), uma alternativa plausível é de que o ligante fluorescente, além de marcar os receptores de membrana, estaria marcando os receptores intracelulares e, com a metodologia adotada em nosso estudo, não é possível explorar a localização subcelular destes receptores. Porém, cabe elencar que independentemente disso, as condições experimentais foram as mesmas para a PE e a NE. Dessa forma, alterações no número de receptores não seria uma justificativa para os resultados descritos até então.

Nas células musculares lisas além da ativação de segundos mensageiros, a contração pode ser induzida por meio da ativação direta do acoplamento mecânico em resposta à despolarização. Esse mecanismo aumenta a abertura de canais de cálcio dependentes de voltagem, ocasionando o influxo de cálcio na célula. O cálcio, além de modular a função contrátil, regula sua própria concentração no citoplasma (CARL; LEE; SANDERS, 1996). Assim, elevações nas concentrações de cálcio para o interior da célula irão promover a sua ligação à proteína calmodulina e, uma vez que este complexo é formado, as interações irão culminar na ativação da cinase de cadeia leve da miosina (MLCK), que por sua vez, vai fosforilar a miosina fosfatase, resultando no mecanismo de contração vascular (WEBB, 2003). Nossos resultados demonstram um efeito da sepse na mecânica contrátil do músculo liso vascular induzida por CaCl_2 18 h após a CLP, nos permitindo concluir que em períodos mais tardios da sepse, independente do ligante utilizado, há prejuízos na contratilidade vascular (**Figura 9**). Estudos anteriores trabalharam nesta mesma linha de pesquisa e atribuíram que em fases mais tardias da sepse, a própria maquinaria contrátil é prejudicada (PRICE et al., 1999). Nesse sentido, é possível sugerir algumas possibilidades: as células do músculo liso vascular de fato não estão sendo capazes de contrair em virtude de um efeito direto da sepse, ou pode haver prejuízos em mecanismos envolvendo o influxo de cálcio para o interior da célula.

Em adição ao papel do cálcio nos mecanismos contráteis, o aumento intracelular deste íon nas células endoteliais vasculares resulta na liberação de NO através de interações com a calmodulina, caveolina, a NOS endotelial (eNOS) e a

tetrahidrobiopterina (FRANSEN et al., 2012). Além disso, é importante mencionar que o caminho fisiológico para a produção de NO em resposta à tensão de cisalhamento, por exemplo, é a fosforilação da eNOS (DIMMELER et al., 1999). Ainda, o NO pode ser produzido por três diferentes isoformas, produto de diferentes genes e com diferentes localizações, regulações e propriedades catalíticas (ALDERTON, COOPER, KNOWLES, 2001), sendo elas: NOS endotelial (eNOS) (LAMAS et al., 1992; MARSDEN; SCHAPPERT; CHEN, 1992) encontrada em células endoteliais vasculares; NOS neuronal (nNOS) (BREDT; HWANG; SNYDER, 1990), expressa predominantemente no tecido neuronal, no entanto também é encontrada em células do músculo liso vascular (BROPHY et al., 2000; BOULANGER et al., 1998); e a NOS induzida (iNOS) (SHERMAN et al., 1993; CHARLES et al., 1993), podendo ser induzida em uma variedade de células e tecidos, controlada por mediadores inflamatórios e citocinas, e que é capaz de produzir grandes quantidades de NO (CIRINO; FIORUCCI; SESSA, 2003). Uma vez produzido, o NO se difunde em três dimensões ao longo das células, passando facilmente por membranas de células vizinhas, onde pode provocar uma série de efeitos (MILLER; MEGSON, 2007). Essa capacidade confere ao NO um importante papel como mediador da comunicação entre o endotélio e o músculo liso vascular.

Como descrito na literatura, demonstramos que NO interfere na contratilidade vascular mediada por PE e NE, uma vez que ao bloquearmos as NOS com L-NAME (um inibidor não seletivo), este foi capaz de aumentar a responsividade vascular para estes vasoconstritores em anéis de aorta de animais não sépticos, sugerindo um efeito mediado pela eNOS, uma vez que o bloqueio das isoformas nNOS e iNOS não tiveram efeito sobre a CCR desses vasoconstritores (**Figura 11**). Por outro lado, o bloqueio com L-NAME não aumentou a responsividade vascular ao CaCl_2 , o que nos sugere que em preparações controle a contração através do CaCl_2 pode não estar sendo suficiente para ativar a eNOS. Assim como observado para os agonistas dos receptores α_1 -adrenérgicos, o bloqueio das isoformas nNOS e iNOS não teve efeito sobre a contração mediada pelo CaCl_2 (**Figura 11**).

De forma intrigante, em 6 h após a CLP, o bloqueio das óxido nítrico sintases induzida e neuronal, aumentou a responsividade vascular para a PE, mas não para a NE e o CaCl_2 , apesar de ter ocorrido um aumento na responsividade vascular para todos os vasoconstritores quando utilizamos L-NAME, inclusive para o CaCl_2 o que nos indica que possivelmente está ocorrendo um aumento do NO em 6 h após a CLP

(**Figura 12**). Existem poucos relatos na literatura desta modulação diferencial frente a inibidores das óxido nítrico sintases. Um estudo publicado em 2003 mostrou que em ramos de artéria mamária de mulheres submetidas à mastectomia, o bloqueio do NO com L-NAME não apresentou efeito modulador nas contrações induzidas por NE, mas provocou um aumento nas contrações induzidas por PE em preparações com e sem endotélio funcional, apesar de ambas compartilharem da mesma via de transdução. Além disso, o mesmo estudo demonstrou que a adição de propranolol não afetou a CCR da NE nas preparações estudadas e que ambos os vasoconstritores de fato exercem seus efeitos via receptores α_1 -adrenérgicos (PEŠIC et al., 2003).

Por outro lado, em um tempo maior de evolução do quadro séptico (18 h após a CLP), demonstramos que o bloqueio das NOS aumentou a resposta máxima para todos os vasoconstritores estudados, tanto os dependentes da ativação dos receptores α , como o obtido através do CaCl_2 , mostrando a susceptibilidade da função contrátil ao aumento de NO proveniente das três isoformas estudadas (**Figura 13**). Conforme apontado por Fernandes et al., (2009), a sepse é uma condição que muda com o passar do tempo. Dessa forma, é mesmo de se esperar que o cenário celular esteja diferente de acordo com a evolução da sepse. Nesta perspectiva, eles demonstraram um aumento nos níveis de expressão da GCs e um consequente aumento da sua atividade na fase tardia da sepse, podendo contribuir para os efeitos vasculares observados. Embora não tenhamos avaliado a expressão das NOS, bem como de estruturas alvos do NO, nossos dados funcionais permitem considerar que as 3 isoformas estão ativas nesta fase avaliada e que o NO está envolvido no processo de hiporresponsividade. De maneira contrária, Wang et al., (2004) demonstrou que o L-NAME falhou em aumentar a responsividade vascular para a NE, concluindo que a contratilidade das células musculares lisas é reduzida na sepse sem envolvimento da iNOS. Além disso, Heesen, Hotchkiss e Karl (1994), mostraram que após a CLP, a adição de L-NAME falhou em restaurar a contração provocada por PE em anéis aórticos. No entanto, nós demonstramos que o bloqueio das NOS foi capaz de aumentar a responsividade vascular para todos os vasoconstritores avaliados.

Uma alternativa para explicar as diferenças descritas entre os dois vasoconstritores seria, por exemplo, a de que a PE poderia induzir uma maior produção de NO na célula. No entanto, quando incubamos a aorta de animais *naïve* com doador exógeno de NO, nitroprussiato de sódio (NPS) por 30 minutos, e construímos CCRs para a NE e PE, nossos resultados revelaram diferenças de um

vasoconstritor para o outro quanto à sensibilidade ao NO. O NPS é um agente relaxante independente de receptor de membrana e tem seu efeito atribuído à ação direta sobre o músculo liso vascular (KREYE et al., 1975). O NO liberado pelo endotélio, ou gerado pelo próprio metabolismo de doadores de NO, induz a hiperpolarização da membrana, estimulando a atividade da GCs, e assim aumentando a síntese de GMPc (ARNOLD, 1977), o qual desencadeia uma cascata de eventos que resulta na redução do cálcio citosólico e, como consequência, promove o relaxamento do músculo liso vascular. Bonaventura et al., (2008), demonstrou que o relaxamento e a diminuição de cálcio induzido pelo NPS nas células do músculo liso vascular são potencializados pela produção endotelial de NO, devido à ativação da NO sintase endotelial pelo NPS. Além disso, é importante mencionar a ativação da GCs pelo NO através do grupamento heme presente na enzima (CRAVEN; DERUBERTIS, 1978; STONE; MARLETTA, 1994). A hipótese de que a PE poderia estar induzindo uma maior produção de óxido nítrico não pode ser refutada, mas também é possível pensar em aspectos mecanicistas tanto da interação física com o receptor, como aspectos referentes à própria via de transdução, uma vez que na presença do NPS a sensibilidade da PE foi diferente da NE.

Tendo em vista que os mecanismos/as etapas envolvidas através da interação ligante-receptor é de natureza mais complexa e constitui um efeito em cascata, quaisquer alterações em qualquer componente dessa cascata de transdução podem reduzir a resposta à estimulação adrenérgica (PRICE et al., 1999). Levando em consideração que o cálcio é um dos principais gatilhos principais para o início do processo contrátil, bem como para a sua manutenção, nós avaliamos o envolvimento do cálcio em resposta à PE e NE nas fases fásica e tônica da contração nos grupos controle e sépticos. A resposta ao cálcio é atribuída a dois mecanismos distintos. O primeiro envolve uma resposta transitória, conhecida como fase fásica da contração, e o segundo depende de um componente lento e sustentado, também conhecido como a fase tônica (nesse estágio ocorre o influxo de cálcio do espaço extracelular e a ativação de uma via de sensibilização ao cálcio) (MITA; WALSH, 1997; NOBE; PAUL, 2001). Nossos resultados apontam uma redução no delta de contração da fase fásica para ambos os vasoconstritores em 18 h após a CLP (**Figura 20**), indicando que a liberação de cálcio dos estoques intracelulares dos locais de armazenamento pode estar reduzida na sepse, ou ainda pode-se atribuir a um efeito da sepse na própria liberação de cálcio. Assim como observado na fase fásica, houve

uma redução na manutenção do estado contrátil para a PE, quando avaliamos a fase de sustentação, em 6 h após a CLP. No entanto, neste mesmo tempo as respostas não foram reduzidas para a NE. Por outro lado, em 18 h após a CLP, houve um declínio das respostas para ambos os vasoconstritores (**Figura 21**). Nesse sentido, é possível pensar na via de sensibilização ao cálcio, que devido à redução deste íon, pode não estar sendo totalmente ativada. Além disso, há redução da contratilidade vascular ao CaCl_2 em 6 e 18 h após a CLP, quando os vasos são estimulados com PE e NE. Porém, não é possível inferir se essa redução é devido a falhas na entrada de cálcio ou na via de transdução (**Figura 22**). No entanto, os resultados sugerem que em meio isento de cálcio, os dois vasoconstritores são afetados de maneira semelhante, perdendo parte da diferença antes observada.

Uma força maior de contração não decorre somente em função do aumento nas concentrações intracelulares de cálcio. Posto que a sensibilidade do aparelho contrátil ao cálcio é uma engrenagem de contração tão importante quanto as mudanças nas concentrações intracelulares deste íon (BRADLEY; MORGAN, 1987). A vista disso, é conhecido que em paralelo ao aumento intracelular de cálcio, alguns agonistas, como por exemplo a NE, serotonina, histamina e endotelina-1 (ET-1), podem ativar a via de sensibilização ao cálcio (SAKURADA et al., 2001), composta pelas proteínas Rho-A/Rho-cinase. Os genes Rho fazem parte da grande família de proteínas Ras, descobertos em 1985 em moluscos (MADAULE; AXEL, 1985). A GTPase Rho-A é uma proteína G monomérica, e como a maioria das proteínas Rho típicas, são pequenas, apresentando de 190 a 250 resíduos de aminoácidos (WENNERBERG; DER, 2004). Elas se localizam predominantemente no citosol, com uma pequena fração na membrana plasmática (ADAMSON; PATERSON; HALL, 1992), e uma vez ativadas, se direcionam para a membrana plasmática. Em seu estado conformacional ativo ela é ligada a um GTP e assim como todas as GTPases, elas atuam como interruptores entre esses dois estados. Esse processo é regulado por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) por proteínas ativadoras de GTPase (GAPs) (AELST; D'SOUZA-SCHOREY, 1997). Um dos sistemas efetores da Rho-A é a Rho-cinase (ROCK), tendo sido identificadas duas isoformas desta proteína serina/treonina cinase, ROCK-I e ROCK-II (NAKAGAWA et al., 1996). Assim, uma vez que Rho-A é ativada, ela pode interagir com a ROCK, resultando na sua ativação. A ROCK ativada vai fosforilar a cadeia leve de miosina (AMANO et al., 1996), inibindo a ação da miosina fosfatase (KIMURA et al., 1996). Como resultado a defosforilação da

cadeia leve de miosina é inibida fazendo com que o processo contrátil perdure por mais tempo. Por isso, a via Rho-A/ROCK é conhecida como a via de sensibilização ao cálcio (HIRATA; KIKUCHI; SASAKI, 1992).

Evidências tem sugerido a interação entre duas vias antagônicas, NO RhoA/Rho-cinase, no qual o NO pode regular o tônus vascular em parte através da supressão da atividade da Rho-cinase (ROCK) (CARTER; BEGAYE; KANAGY, 2002). Essa interação NO Rho-A/Rho-cinase fica ainda mais evidente, uma vez que é demonstrado que o relaxamento induzido por NO e GMPc envolve a ativação da fosfatase de cadeia leve da miosina no músculo liso arterial (ETTER et al., 2001). Chitale e Webb (2002) confirmam o papel da Rho-cinase na manutenção da contração induzida por agonista e demonstram que o relaxamento induzido por NO endógeno, ocorre principalmente através da inibição da atividade da Rho-A/Rho-cinase. Poucos trabalhos na literatura exploraram a participação desta via na sepse. Da Silva-Santos et al., (2009), demonstraram que embora os componentes da via Rho-A/Rho-cinase sejam *up*-regulados em artérias mesentéricas de ratos endotoxêmicos, a capacidade de inibir a atividade da miosina fosfatase é marcadamente reduzida. Para revisão recente sobre o tema ver Hahmeyer e Silva-Santos (2021).

Utilizando o composto Y-27632, nós demonstramos a participação da via Rho-A/Rho-cinase na contração da aorta induzida por PE e NE, no qual o bloqueio desta via com o composto Y-27632 reduziu a contratilidade vascular de maneira mais intensa para a PE do que para a NE em preparações controle (**Figura 23**). Por outro lado, nos animais submetidos à CLP o bloqueio desta via provocou uma redução mais acentuada na contratilidade vascular tanto para a PE como para a NE. Neste caso, é possível pensar em uma participação importante do NO inibindo a atividade da Rho-cinase, e quando nós bloqueamos essa via que por sua vez já estava reduzida, houve um prejuízo ainda maior na contratilidade vascular, observada para ambos os vasoconstritores. Ainda, é possível sugerir que a NE depende mais dessa via e a inibição nos animais sépticos é capaz de provocar uma redução mais intensa na contratilidade vascular em comparação com a PE. No entanto, essa possibilidade precisa ser explorada por experimentos adicionais.

A organização espacial e o perfil temporal dos sinais de cálcio dependentes dos canais de cálcio do tipo-L (Cav-L) são essenciais para a função celular adequada (NAVEDO; AMBERG, 2013). Os canais de cálcio ativados por voltagem são proteínas

transmembranares de superfície celular responsáveis por sinais de cálcio multifuncionais (ATLAS, 2014). Esta classe de canais compreende um grupo de proteínas muito semelhantes, mas distintas, em relação à cinética, voltagem e sensibilidade aos bloqueadores. É visto que os Ca_v-L desempenham uma função importante na regulação da pressão arterial e manutenção do tônus vascular (MOOSMANG et al., 2003). Desse modo, o influxo de cálcio sustentado através dos Ca_v-L mantém um nível tônico de vasoconstrição, e ainda fornece uma base sobre a qual substâncias vasoativas endógenas podem atuar para modular o diâmetro arterial (SONKUSARE; PALADE; MARSH, 2006). Além disso, esses canais podem ser modulados por vários sistemas de sinalização e parecem ser ativados por vasoconstritores que estimulem a via de sinalização $G_{q11}/G_{12/13}$, como por exemplo, a NE (NELSON et al., 1988). Dessa forma, nós investigamos a participação dos Ca_v-L na contratilidade mediada por PE e NE nos animais controle e sépticos. Utilizamos como bloqueador a nicardipina, uma vez que estudos experimentais demonstraram que ela é mais seletiva para o músculo liso vascular (PEPINE, 1989). Assim, o bloqueio com a nicardipina reduziu a contratilidade vascular de maneira semelhante para ambos os vasoconstritores nos animais controle e sépticos (**Figura 24**), o que nos indica que a diferença observada não é proveniente da entrada de cálcio do meio extracelular.

Os sinais de cálcio na célula são altamente organizados em relação ao tempo e espaço, e quando as células são ativadas, particularmente por meio de receptores que utilizam a via de sinalização do fosfatidilinositol, o nível de cálcio frequentemente oscila com uma frequência que varia de acordo com a concentração do agonista (BERRIDGE; DUPONT, 1994). Nesse sentido, até aqui investigamos as vias de sinalização trabalhando em uma janela específica de tempo e concentração. A partir dessa fase do estudo, exploramos o impacto de uma concentração única do agonista, avaliando os efeitos das variáveis como o tempo e espaço celular (fisiológico/sepsis), em relação ao influxo de cálcio na célula, uma vez que a maquinaria contrátil já está em funcionamento, comparando a atividade dos agonistas PE e NE. Nossos resultados demonstraram que quando o receptor é ativado com a NE, a sensibilidade à nicardipina é muito menor, não havendo queda na responsividade vascular, mesmo nos animais sépticos. Por outro lado, quando o receptor é ativado pela PE, há uma queda substancial da contratilidade vascular, ao longo do tempo, tanto nos grupos controle quanto sépticos (**Figura 27**), como se a ligação proveniente da interação com

a PE fosse de natureza muito mais fraca, seja da interação com o receptor ou da própria via de transdução. Ainda, experimentos piloto demonstraram que essa redução pode ser revertida ao adicionar L-NAME concomitante com a nicardipina, o que nos leva a sugerir que o efeito vasorrelaxante da nicardipina provavelmente tenha uma participação importante do NO, mais uma vez evidenciando a sensibilidade da PE a esse sistema. Esse último ponto, porém, carece de dados complementares.

Estudos explorando a interação entre o NO e a contração das células musculares lisas, indicaram um efeito direto do NO sobre a SERCA (Ca^{2+} ATPase do retículo sarcoplasmático), acelerando a recaptção de cálcio para o interior do RS (retículo sarcoplasmático) e inibindo indiretamente o seu influxo, o que por sua vez culmina no relaxamento das células musculares lisas (COHEN et al., 1999; COHEN; ADACHI, 2006). Ademais, o NO diminui a concentração intracelular de cálcio e bloqueia as correntes através de canais de cálcio dependentes de voltagem, fornecendo a base para um mecanismo alternativo ou adicional de relaxamento do vaso, pelo qual um nível reduzido de cálcio intracelular inibe a cinase de cadeia leve da miosina e, portanto, a contração (BLATTER; WIER, 1994). Um grupo de pesquisa liderado por Van Hove et al., (2009), utilizando aortas de camundongos, verificou que o NO induziu o relaxamento vascular através de dois caminhos, no qual um mecanismo envolveu a recaptção de cálcio para o interior do RS e o outro a formação de GMPc estimulada por GCs, causando relaxamento sem alterar o cálcio intracelular, presumivelmente pela dessensibilização do aparelho contrátil. Esse mecanismo foi atribuído ao influxo de cálcio via canais do tipo-L, uma vez que bloqueadores desse canal aumentaram a eficácia vasodilatadora do NO. Nesse sentido, Fransen et al., (2012) sugerem uma interação entre o NO basal e os canais de cálcio do tipo L no músculo liso vascular.

Na maioria dos estudos, a capacidade de um ligante em induzir uma resposta é medida em um único ponto do tempo, com base em uma janela de sinal máxima obtida por um ligante de referência (HERENBRINK et al., 2016). Segundo Grundmann e Kostenis (2017) a transdução de sinal é mais complexa do que se supõe e pode ser categorizada em pelo menos três dimensões: (i) qualidade (quais substâncias participam), (ii) espaço (onde o evento ocorre) e (iii) tempo (quando o evento acontece). Dependendo da cinética de ligação ou da capacidade do ligante em ativar determinadas vias, a ação do agonista pode ter um padrão espaço-temporal bastante diferente. Ainda, deve-se levar em consideração que o viés observado para um ligante

pode depender da(s) escala(s) de tempo sobre o qual o efeito é medido em diferentes vias, ao comparar as respostas transitórias com aquelas medidas em escalas de tempo mais longas (HERENBRINK et al., 2016). Dessa forma, a avaliação do curso de tempo da sinalização do receptor tem revelado mecanismos fundamentais da função do GPCR (LOHSE; HOFMANN, 2015), no qual para muitos GPCRs, parece haver uma série de ondas de sinalização distintas (LOHSE; CALEBIRO, 2013).

Além da sinalização mediada pela interação ligante-receptor apresentarem pontos de controle para dar início à via de transdução, o seu encerramento também é minuciosamente controlado por uma família de proteínas cinases conhecidas como GRKs (cinase de receptor acoplado à proteína G) e arrestinas (*revisão ver* BENOVIC, 2021). Desse modo, um dos principais mecanismos envolvidos na regulação dos GPCRs envolve o seu tráfego, que direciona os receptores para locais endocíticos na membrana plasmática, seguida pela internalização destes (MOORE; MILANO; BENOVIC, 2007).

Neste estudo nós demonstramos que após a CCR clássica atingir o platô, a NE inicia uma segunda onda de contração de forma lenta e sustentada, o que não ocorre para o agonista PE. Trabalhos anteriores exploraram esse efeito bifásico da NE na aorta de coelhos (NELSON JR; TOOKE, 1974) e na artéria da orelha de coelhos (BEVAN; WATERSON, 1971). Sato et al., (1995) também evidenciaram um efeito bifásico da NE *in vivo*, após infusão intravenosa em *bolus* e análise da pressão arterial em humanos, o que sugere que esse efeito também acontece *in vivo*. Esses achados foram atribuídos como a soma da contração lenta sobreposta à resposta imediata. De maneira interessante, ainda foi sugerida a existência de localizações diferentes do receptor (NELSON JR; TOOKE, 1974).

Avaliamos o impacto deste efeito na sepse, uma vez que contrasta com o quadro geral de hiporresponsividade, e observamos que mesmo na sepse esse efeito é mantido. Ao nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho da literatura que demonstra um efeito bifásico da NE na aorta de animais sépticos. Nossos resultados evidenciam que não houve redução no delta de contração do efeito bifásico quando foram comparados os grupos controle e sépticos. No entanto, quando comparamos o grupo CLP 6 h com o grupo 18 h, ocorreu uma redução no delta do efeito bifásico no grupo 18 h, porém, nesse ponto são necessários mais experimentos para solidificar esse resultado, uma vez que não houve diferença em relação ao grupo controle. Um dos nossos principais questionamentos é se essa segunda onda de contração de fato

se configura como um novo início de sinalização ou se já vem acontecendo simultaneamente à CCR.

Ao investigarmos os mecanismos envolvidos os resultados demonstram que o bloqueio por 30 minutos com o composto Y-27632 antes das CCRs não foi capaz de atenuar o efeito bifásico tanto no grupo controle como em 6 h após a CLP. No entanto em 18 h após a CLP o efeito foi reduzido. De maneira contrária ao observado com o composto Y-27632, o bloqueio da entrada de cálcio com a nicardipina, apesar de reduzir a CCR para a NE não impediu o efeito bifásico, tanto nos grupos controle quanto sépticos (**Figura 25**).

Uma vez que os canais de potássio (K^+) são expressos no músculo liso vascular e se constituem como um regulador importante do potencial de membrana, investimos a participação desses canais no efeito bifásico induzido pela NE, através de outra abordagem experimental, na qual adicionamos os bloqueadores logo após o fim das CCR. Nossos resultados demonstraram que o bloqueio dos canais de K^+ não foi capaz de atenuar o efeito bifásico, induzido pela NE (**Figura 28**) o que nos indica que eles não estão envolvidos nesse efeito. Outra possibilidade explorada foi a do efeito ser mediado pelo cálcio proveniente do retículo endoplasmático. No entanto, a tapsigargina (bloqueador da cálcio-ATPase) também não foi capaz de impedir o efeito bifásico. Outro viés que poderia levar ao efeito bifásico seria os receptores β -adrenérgicos, uma vez que a NE apresenta capacidade de ligação a esses receptores, porém, nossos resultados demonstraram que o bloqueio do receptor β -adrenérgico não reduziu esse efeito. Nesse sentido Sato et al., (1995) também verificaram que esse efeito não tem envolvimento dos receptores β -adrenérgicos e atribuiu que a resposta tardia era decorrente ao influxo de cálcio proveniente do meio extracelular, apontando que ambas as respostas são mediadas pelo mesmo receptor.

Obtivemos alguns resultados intrigantes, em que ao realizar o bloqueio da entrada de cálcio 30 minutos antes das CCRs as respostas não foram reduzidas, tanto nos grupos controle quanto sépticos. Por outro lado, quando realizamos o bloqueio logo após as CCRs as respostas foram reduzidas. Isso poderia ser justificado, uma vez que o bloqueio da entrada de cálcio é reversível. Da mesma forma, quando bloqueamos a via de sensibilização ao cálcio logo após as CCRs, os resultados demonstraram que este foi capaz de reduzir o efeito bifásico no grupo controle e no grupo CLP 6 h, enquanto no grupo CLP 18 h a resposta foi totalmente abolida. Esse resultado foi oposto ao obtido quando realizamos o bloqueio 30 minutos antes das

CCRs, que foi reduzida apenas no grupo CLP 18 h. Neste conjunto de experimentos, fica o questionamento: qual a diferença de realizar o bloqueio de vias antes da estimulação com o agonista e após, considerando que todo o mecanismo contrátil já tenha sido ativado?

Os relatos referentes ao efeito bifásico da NE foram descritos na literatura nas décadas de 70 e 90. No entanto, desde então, novas descobertas foram agregadas à farmacologia dos GPCRs, incluindo a capacidade de alguns receptores serem ativados a partir de locais subcelulares - como demonstrado por exemplo para o receptor β_2 -adrenérgico (β_2 -AR) - em que eles estimulam uma resposta ao AMPc mediada por ativação de Gs, tanto na membrana plasmática como nos endossomos, após a internalização induzida por ligantes (IRANNEJAD et al., 2013).

Pode-se também observar esse efeito em células de miócitos cardíacos endógenos, onde o receptor β_1 -adrenérgico residente no aparelho de Golgi em estado estacionário pode ser ativado através de ligantes exógenos (adrenalina), no qual são capazes de acessar o *pool* de receptores nesta localização por meio dos transportadores de OCT3 (transportador-catiônico-3) e assim, iniciar a sinalização (IRRANEJAD, 2017). Há evidências crescentes nesse sentido, onde um trabalho liderado por Nash et al., (2019) mostra que a ativação de uma via importante para a patogênese da hipertrofia cardíaca em miócitos de ratos é induzida por meio de receptores β_1 -adrenérgicos presentes no aparelho de Golgi, e não por receptores de membrana, sendo que estes podem ser ativados pela NE após o seu transporte para o interior da célula via OCT3.

Cabe destacar que esses resultados foram demonstrados apenas em cultura de células, não havendo trabalhos na literatura que demonstrem esse efeito *in vivo* ou em experimentos de órgãos isolados. Dessa forma, fomos investigar se o efeito bifásico da NE poderia ser decorrente da sua capacidade de entrar na célula e assim ativar uma segunda onda de sinalização. Utilizando como ferramenta farmacológica a corticosterona demonstramos que esta foi capaz de reduzir o efeito bifásico tanto de animais controle, como sépticos em 6 h após a CLP (**Figura 29**), o que nos sugere, que este pode ser um dos mecanismos envolvidos no efeito observado, no entanto, seria necessário um conjunto maior de experimentos e evidências para de fato confirmar essa possibilidade.

Por fim, nosso trabalho, abre novas perspectivas, como por exemplo: i) tendo em vista os diferentes subtipos de receptores α -adrenérgicos, seria interessante

explorar o envolvimento destes nas diferenças observadas em outros leitos vasculares; ii) investigar mais a fundo o efeito dos receptores β -adrenérgicos nas vias estudadas, uma vez que a NE é capaz de atuar nestes receptores; iii) explorar os resultados obtidos através de outras abordagens experimentais; iv) investigar mais a fundo de que maneira o NO pode modular a maquinaria contrátil; v) Investigar a modulação dos canais de cálcio através da interação ligante-receptor para outros vasoconstritores, bem como seu impacto em outras doenças cardiovasculares; vi) explorar mais a fundo o que está por trás do efeito bifásico da NE; vii) apurar com mais detalhes a diferença na sensibilidade encontrada ao NO; viii) explorar a cinética temporal de diferentes agonistas e como isso impacta nas diferentes vias de transdução.

Com o conjunto de resultados, obtidos em nosso estudo observamos que um leque de novas sugestões foi aberto, inclusive em outras patologias. Ainda, nossos achados podem justificar a busca por novos ligantes que apresentem um melhor perfil terapêutico para o manejo da vasoplegia e hipotensão na sepse, e até mesmo ligantes capazes de ativar preferencialmente a segunda onda de contração da noradrenalina. Um resumo dos resultados principais encontrados nesta tese pode ser observado na **Quadro 1**.

Quadro 1 – Resumo dos principais resultados encontrados na presente tese.

		Fenilefrina (PE)			Noradrenalina (NE)			Cloreto de Cálcio		
		Saudáveis	Sépticos		Saudáveis	Sépticos		Saudáveis	Sépticos	
		Controle	6h	18h	Controle	6h	18h	Controle	6h	18h
Caracterização da responsividade vascular		↑	↓↓↓	↓↓↓	↑	↓	↓↓↓	↑	—	↓↓↓
Inibição das óxido nítrico sintases	eNOS	↑	↑	↑	↑	↑	↑	—	↑	↑
	iNOS	—	↑	↑	—	—	↑	—	—	↑
	nNOS	—	↑	↑	—	—	↑	—	—	↑
2ª onda de contração após a CCR	Efeito Bifásico	↑	—	—	↑↑↑	↑↑↑	↑↑↑	n.a.	n.a.	n.a.
Incubação em líquido sem cálcio	Fase fásica da contração	—	—	↓	—	—	↓	n.a.	n.a.	n.a.
	Fase tônica da contração	—	↓	↓	—	—	↓	n.a.	n.a.	n.a.
	Cloreto de Cálcio	↑	↓	↓↓↓	↑	↓	↓↓↓	n.a.	n.a.	n.a.
Entrada de cálcio durante a contração	Nicardipina	↓	↓	↓	↑	↑	↑	n.a.	n.a.	n.a.

1: expressa a caracterização da responsividade vascular frente à fenilefrina, noradrenalina e CaCl_2 ; 2: mostra a participação das diferentes isoformas das óxido nítrico sintases na contratilidade vascular induzida por fenilefrina, noradrenalina e cloreto de cálcio; 3: caracteriza a segunda onda de contração para a fenilefrina e noradrenalina após as CCRs; 4: mostra o envolvimento da mobilização de cálcio intracelular e extracelular para os agonistas fenilefrina e noradrenalina em líquido sem cálcio; 5: demonstra a participação da entrada de cálcio, uma vez que a maquinaria contrátil já esteja em funcionamento. A seta em verde representa o aumento da reatividade vascular; a seta em vermelho representa a redução de resposta. n.a. é expresso quando não se aplica. O traço em azul é utilizado quando a resposta é inalterada. O número de setas indica a magnitude do efeito.

6 CONCLUSÃO

Em resumo, concluímos que a contratilidade vascular mediada por dois diferentes agonistas do receptor α_1 -adrenérgico difere nos estágios iniciais da sepse, apesar de compartilharem a mesma via de sinalização canônica, e que essa diferença é dependente da modulação de óxido nítrico. Além disso, nossos resultados apontam uma dinâmica de efeito diferente entre os dois agonistas, em que após as CCRs a NE é capaz de dar início a uma segunda onda de sinalização, mesmo em anéis de aorta provenientes de animais sépticos. Por outro lado, em estágios mais avançados da sepse há um prejuízo na maquinaria contrátil dependente de Ca^{2+} , tornando as artérias menos responsivas, condição essa que é passível de reversão pela inibição das óxido nítrico sintases.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-LATIF, A. A. Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides, generation of second messengers and contraction in the mammalian iris smooth muscle: Historical perspectives and current status. **Life Sciences**, v. 45, n. 9, p. 757-786, 1989.

ADAMSON, P.; PATERSON, H. F.; HALL, A. Intracellular Localization of the P21^{rho} Proteins. **The Journal of Cell Biology**, v. 119, n. 3, p. 617-627, 1992.

AELST, L. V.; D' SOUZA-SCHOREY, C. Rho GTPases and signaling networks. **Genes & Development**, v. 11, n. 18, p. 2295-2322, 1997.

AHLQUIST, R. P. A study of the adrenotropic receptors. **American Journal of Physiology**, v. 153, n. 3, p. 586-600, 1948.

AKINAGA, J.; GARCÍA-SÁINZ, J. A.; PUPPO, A. Updates in the function and regulation of α_1 -adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 14, p. 2343-2357, 2019.

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593-615, 2001.

AMANO, M.; ITO, M. KIMURA, K. et al. Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-associated Kinase (Rho-kinase). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 34, p. 20246-20249, 1996.

ARIENS, E. J.; SIMONIS, A. M. Cholinergic and anticholinergic drugs, do they act on common receptors? **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 144, n. 2, p. 842-868, 1967.

ARNOLD, W. P.; MITTAL, C. K.; KATSUKI, S. et al. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 8, p. 3203-3207, 1977.

ATLAS, D. Voltage-gated calcium channels function as Ca²⁺-activated signaling receptors. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 32, p. 45-52, 2014.

BAKER, C. C.; CHAUDRY, I. H.; GAINES, H. O. et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, n. 2, p. 331-335, 1983.

BENOVIC, J. L. Historical Perspective of the G Protein-Coupled Receptor Kinase Family. **Cells**, v. 10, n. 3, p. 1-10, 2021.

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

BERNARDELLI, A. K.; DA SILVA, R. C. V. A. F.; CÔRREA, T. et al. 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**, v. 94, n. 11, p. 1227-1236, 2016.

BERRIDGE, M. J.; DUPONT, G. Spatial and temporal signalling by calcium. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 6, n. 2, p. 267-274, 1994.

BERRIDGE, M. J.; IRVINE, R. F. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. **Nature**, v. 312, n. 5992, p. 315-321, 1984.

BEVAN, J. A.; WATERSON, J. G. Biphasic Constrictor Response of the Rabbit Ear Artery. **Circulation Research**, v. 28, n. 6, p. 655-661, 1971.

BLATTER, L. A.; WIER, W. G. Nitric oxide decreases $[Ca^{2+}]_i$ in vascular smooth muscle by inhibition of the calcium current. **Cell Calcium**, v. 15, n. 2, p. 122-131, 1994.

BONAVENTURA, D.; LUNARDI, C. N.; RODRIGUES, G. J. et al. A novel mechanism of vascular relaxation induced by sodium nitroprusside in the isolated rat aorta. **Nitric Oxide**, v. 18, n. 4, p. 287-295, 2008.

BOULANGER, C. M.; HEYMES, C.; BENESSIANO, J. et al. Neuronal nitric oxide synthase is expressed in rat vascular smooth muscle cells: activation by angiotensin II in hypertension. **Circulation Research**, v. 83, n. 12, p. 1271-1278, 1998.

BRADLEY, A. B.; MORGAN, K. G. Alterations in cytoplasmic calcium sensitivity during porcine coronary artery contractions as detected by aequorin. **The Journal of Physiology**, v. 385, p. 437-448, 1987.

BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, p. 768-770, 1990.

BROPHY, C. M.; KNOEPP, L.; XIN, J. et al. Functional expression of NOS in vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory**, v. 278, n. 3, p. H991-H997, 2000.

BUCHER, M. Expression of vasoconstrictive receptors during experimental endotoxaemia. **Anesthesiologie e Intensivmedizin**, v. 45, n. 5, p. 247-261, 2004.

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

CARCILLO, J. A.; LITTEN, R. Z.; SUBA, E. A. et al. Alterations in rat aortic α_1 -adrenoceptors and α_1 -adrenergic stimulated phosphoinositide hydrolysis in intraperitoneal sepsis. **Circulatory Shock**, v. 26, n. 3, p. 331-339, 1988.

CARL, A.; LEE, H. K.; SANDERS, K. M. Regulation of ion channels in smooth muscle calcium. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 271, n. 1, p. C9-34, 1996.

CARTER, R. W.; BEGAYE, M.; KANAGY, N. L. Acute and chronic NOS inhibition enhances α_2 -adrenoreceptor-stimulated RhoA and Rho kinase in rat aorta. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory**, v. 283, n. 4, p. H1361-H1369, 2002.

CHARLES, I. G.; PALMER, R. M.; HICKERY, M. S. et al. Cloning, characterization, and expression of a cDNA encoding an inducible nitric oxide synthase from the human chondrocyte. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 23, p. 11419-11423, 1993.

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

CHITALEY, K.; WEBB, R. C. Nitric Oxide Induces Dilation of Rat Aorta via Inhibition of Rho-Kinase Signaling. **Hypertension**, v. 39, n. 2, p. 438-442, 2002.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 91-95, 2003.

CLARK, A. J. The antagonism of acetyl choline by atropine. **The Journal of Physiology**, v. 61, n. 4, p. 547-556, 1926.

CLARK, A. J. The reaction between acetyl choline and muscle cells. **The Journal of Physiology**, v. 61, n. 4, p. 530-546, 1926.

COHEN, R. A.; ADACHI, T. Nitric-oxide-induced vasodilatation: regulation by physiologic s-glutathiolation and pathologic oxidation of the sarcoplasmic endoplasmic reticulum calcium ATPase. **Trends in Cardiovascular Medicine**, v. 16, n. 4, p. 109-114, 2006.

COHEN, R. A.; WEISBROD, R. M.; GERICKE, M. et al. Mechanism of nitric oxide-induced vasodilatation: refilling of intracellular stores by sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase and inhibition of store-operated Ca^{2+} influx. **Circulation Research**, v. 84, n. 2, p. 210-219, 1999.

COSTANZI, S.; SIEGEL, J.; TIKHONOVA, I. G. et al. Rhodopsin and the others: a historical perspective on structural studies of G protein-coupled receptors. **Current Pharmaceutical Design**, v. 15, n. 35, p. 3994-4002, 2009.

COTECCHIA, S.; STANASILA, L.; DIVIANI, D. Protein-protein interactions at the adrenergic receptors. **Current Drug Targets**, v. 13, n. 1, p. 15-27, 2012.

CRAVEN, P. A.; DERUBERTIS, F. R. Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and heme proteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex

in enzyme activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 253, n. 23, p. 8433-8443, 1978.

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

DAHL, E. F.; WU, S. C.; HEALY, C. L. et al. Subcellular compartmentalization of proximal $G\alpha_q$ -receptor signaling produces unique hypertrophic phenotypes in adult cardiac myocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 23, p. 8734-8749, 2018.

DALY, C. J.; DEIGHAN, C.; MCGEE, A. et al. Knockout approach indicates a minor vasoconstrictor role for vascular α_{1B} -adrenoceptors in mouse. **Physiological Genomics**, v. 9, n. 2, p. 85-91, 2002.

DANNA, D. M. Hospital Costs Associated with Sepsis Compared with Other Medical Conditions. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 30, n. 3, p. 389-398, 2018.

DIMMELER, S.; FLEMING, I.; FISSLTHALER, B. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, n. 6736, p. 601-605, 1999.

DIXON, R. A. F.; KOBILKA, B. K.; STRADER, D. J. et al. Cloning of the gene and cDNA for mammalian β -adrenergic receptor and homology with rhodopsin. **Nature**, v. 321, p. 75-79, 1986.

DOCHERTY, J. R. The pharmacology of α_1 -adrenoceptor subtypes. **European Journal of Pharmacology**, v. 855, p. 305-320, 2019.

ELBOUHY, M. A.; SOLIMAN, M.; GABER, A. et al. Early Use of Norepinephrine Improves Survival in Septic Shock: Earlier than Early. **Archives of Medical Research**, v. 50, n. 6, p. 325-332, 2019.

ETTER, E. F.; ETO, M.; WARDLE, R. L. et al. Activation of Myosin Light Chain Phosphatase in Intact Arterial Smooth Muscle During Nitric Oxide-induced Relaxation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34681-34685, 2001.

FERNANDES, D.; SORDI, R.; PACHECO, L. K. et al. Late, but Not Early, Inhibition of Soluble Guanylate Cyclase Decreases Mortality in a Rat Sepsis Model. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 328, n. 3, p. 991-999, 2009.

FLACCO, N.; PARÉS, J.; SERNA, E. et al. α_{1D} -Adrenoceptors are responsible for the high sensitivity and the slow time-course of noradrenaline-mediated contraction in conductance arteries. **Pharmacology Research & Perspectives**, v. 1, n. 1, p. 1-14, 2013.

FLORDELLIS, C. S. The Plasticity of the 7TMR Signaling Machinery and the Search for Pharmacological Selectivity. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 2, p. 145-160, 2012.

FÖRSTERMANN, U.; KLEINERT, H. Nitric oxide synthase: expression and expressional control of the three isoforms. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 352, n. 4, p. 351-364, 1995.

FRANSEN, P.; VAN HOVE, C. E.; LANGEN, J. V. et al. Contraction by Ca²⁺ Influx via the L-Type Ca²⁺ Channel Voltage Window in Mouse Aortic Segments is Modulated by Nitric Oxide. **Current basic and pathological approaches to the function of muscle cells and tissues-From molecules to Humans**, p. 69-92, 2012.

FURCHGOTT, R. F. The pharmacology of vascular smooth muscle. **Pharmacological Reviews**, v. 7, n. 2, p. 183-265, 1955.

GADDUM, J. H. The action of adrenalin and ergotamine on the uterus of the rabbit. **The Journal of Physiology**, v. 61, n. 1, p. 141-150, 1926.

GARCÍA-CAZARÍN, M. L.; SMITH, J. L.; OLSZEWSKI, K. A. et al. The α_{1D} -adrenergic receptor is expressed intracellularly and coupled to increases in intracellular calcium and reactive oxygen species in human aortic smooth muscle cells. **Journal of Molecular Signaling**, v. 3, p. 3-6, 2008.

GESTY-PALMER, D.; LUTTRELL, L. M. 'Biasing' the parathyroid hormone receptor: A novel anabolic approach to increasing bone mass? **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 59-67, 2011.

GILMAN, A. G. G Proteins and Regulation of Adenylyl Cyclase. **JAMA**, v. 262, n. 13, p. 1819-1825, 1989.

GILMAN, A. Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. **Bioscience Reports**, v. 15, n. 2, p. 65-97, 1995.

GLOBAL SEPSIS ALLIANCE. **World sepsis day toolkit section: sepsis fact sheet**. Disponível em: < <https://www.worldsepsisday.org/toolkits> >. Acesso em: 7 de setembro de 2021.

GOTTS, J. E.; MATTHAY, M. A. Sepsis: Pathophysiology and Clinical Management. **Clinical Review**, v. 353, p. 1-20, 2016.

GRUNDMANN, M.; KOSTENIS, E. Temporal Bias: Time-Encoded Dynamic GPCR Signaling. **Cell Press**, v. 38, n. 12, p. 1110-1124, 2017.

HAHMEYER, M. L. d. S.; SILVA-SANTOS, J.E. Rho-Proteins and Downstream Pathways as Potential Targets in Sepsis and Septic Shock: What Have We Learned from Basic Research. **Cells**, v. 10, n. 1844, p. 1-25, 2021.

HARIHARAN, V. N.; NAIR, R. R.; SAINI, D. K. A Serpentine Way to Signaling - Nobel Prize in Chemistry, 2012. **Resonance - Journal of Science Education**, v. 18, n. 6, p. 530-542, 2013.

HEESEN, B. J.; HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. Sepsis decreases phenylephrine- and KCl-induced aortic ring contraction and decreases the frequency of oscillations in active wall tension. **Shock**, v. 2, n. 2, p. 106-112, 1994.

HERENBRINK, C. K.; SYKES, D. A.; DONTAMSETTI, P. et al. The role of kinetic context in apparent biased agonism at GPCRs. **Nature Communications**, v. 7, n.10842, p. 1-14, 2016.

HILGERS, R. H. P.; WEBB, C. Molecular Aspects of Arterial Smooth Muscle Contraction: Focus on Rho. **Experimental Biology and Medicine**, v. 230, n. 11, p. 829-835, 2005.

HILL, A. V. The mode of action of nicotine and curari, determined by the form of the contraction curve and the method of temperature coefficients. **The Journal of Physiology**, v. 39, n. 5, p. 361-373, 1909.

HIRATA, K-I.; KIKUCHI, A.; SASAKI, T. et al. Involvement of rho p21 in the GTP-enhanced calcium ion sensitivity of smooth muscle contraction. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 13, p. 8719-8722, 1992.

HROMETZ, S. L.; EDELMANN, S. E.; McCUNE, D. F. et al. Expression of Multiple α_1 -Adrenoceptors on Vascular Smooth Muscle: Correlation with the Regulation of Contraction. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, n. 1, p. 452-463, 1999.

HUSSAIN, M. B.; MARSHALL, I. Characterization of α_1 -adrenoceptor subtypes mediating contractions to phenylephrine in rat thoracic aorta, mesenteric artery, and pulmonary artery. **British Journal of Pharmacology**, v. 122, n. 5, p. 849-858, 1997.

HWANG, T. L.; LAU, Y-T.; CHEN, M-F. et al. Biphasic intracellular redistribution of alpha 1-adrenergic receptors in rat liver during sepsis. **American Journal of Physiology**, v. 265, n. 2, p. R385-R391, 1993.

IRANNEJAD, R.; TOMSHINE, J. C.; TOMSHINE, J. R. et al. Conformational biosensors reveal GPCR signalling from endosomes. **Nature**, v. 495, p. 534-538, 2013.

IRANNEJAD, R.; PESSINO, V.; MIKA, D. et al. Functional Selectivity of GPCR-directed Drug Action Through Location Bias. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 7, p. 799-806, 2017.

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

KENAKIN, T.; CHRISTOPOULOS, A. Signalling bias in new drug discovery: detection, quantification and therapeutic impact. **Nature Reviews - Drug Discovery**, v.12, n. 3, p. 205-216, 2013.

KENAKIN, T. P.; MORGAN, P. H. Theoretical effects of single and multiple transducer receptor coupling proteins on estimates of the relative potency of agonists. **Molecular Pharmacology**, v. 35, n. 2, p. 214-222, 1989.

KENAKIN, T. Biased Signaling as Allosteric Probe Dependence. **Cellular Signalling**, v. 79, p. 1-10, 2021.

KENAKIN, T. Drug Efficacy at G Protein- Coupled Receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 42, p. 349-379, 2002.

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

KIMURA, K.; ITO, M.; AMANO, M. et al. Regulation of Myosin Phosphatase by Rho and Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase). **Science**, v. 273, n. 5272, p. 245-248, 1996.

KOHOUT, T. A.; NICHOLAS, S. L.; PERRY, S. J. et al. Differential Desensitization, Receptor Phosphorylation, Beta-Arrestin Recruitment, and ERK1/2 Activation by the Two Endogenous Ligands for the CC Chemokine Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 22, p. 23214- 23222, 2004.

KRESGE, N.; SIMONI, R. D.; HILL, R. L. The Effects of Insulin on Fat Cells and the Role of Guanyl Nucleotides in Signal Transduction: The Work of Martin Rodbell. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 30, p. E24-E26, 2006.

KREYE, V. A.; BARON, G. D.; LÜTH, J. B. et al. Mode of Action of Sodium Nitroprusside on Vascular Smooth Muscle. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 288, n. 4, p. 381-402, 1975.

LACHNIT, W. G.; TRAN, A. M.; CLARKE, D. E. et al. Pharmacological characterization of an α_{1A} -adrenoceptor mediating contractile responses to noradrenaline in isolated caudal artery of rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 120, n. 5, p. 819-826, 1997.

LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K. et al. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, n. 14, p. 6348-6352, 1992.

LAMB DEN, S. Bench to bedside review: therapeutic modulation of nitric oxide in sepsis-an update. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 7, n. 1, p. 1-14, 2019.

LAMB DEN, S.; CREAGH-BROWN, B. C.; HUNT, J. et al. Definitions and pathophysiology of vasoplegic shock. **Critical Care**, v. 22, n. 174, p. 1-8, 2018.

LANDS, A. M.; LUDUENA, F. P.; BUZZO, H. J. Differentiation of receptors responsive to isoproterenol. **Life Sciences**, v. 6, n. 21, p. 2241-2249, 1967.

LANGLEY, J. N. On the contraction of muscle, chiefly in Relation to the presence of 'receptive' Substances. Part iv. The effect of Curari and of some other substances on the nicotine response of the sartorius and gastrocnemius muscles of the frog. **The Journal of Physiology**, v. 39, n. 4, p. 235-295, 1909.

LANGLEY, J. N. On the reaction of cells and of nerve-endings to certain poisons, chiefly as regards the reaction of striated muscle to nicotine and to curari. **The Journal of Physiology**, v. 33, p. 374-413, 1905.

LATORRACA, N. R.; VENKATAKRISHNAN, A. J.; DROR, R. O. GPCR Dynamics: Structures in Motion. **Chemical Review**, v. 117, n. 1, p. 139-155, 2016.

LEFKOWITZ, R. J. A brief history of G-protein coupled receptors (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie**, v. 52, n. 25, p. 6367-6378, 2013.

LEFKOWITZ, R. J. The superfamily of heptahelical receptors. **Nature Cell Biology**, v. 2, p. E133-E136, 2000.

LOBO; S. M.; REZENDE, E.; MENDES, C. L. et al. Mortalidade por sepse no Brasil em um cenário real: projeto UTIs Brasileiras. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, n. 1, p. 1-4, 2019.

LOHSE, M. J.; CALEBIRO, D. Receptor signals come in waves. **Nature**, v. 495, n. 7442, p. 457-458, 2013.

LOHSE, M. J.; HOFMANN, K. P. Spatial and Temporal Aspects of Signaling by G-Protein-Coupled Receptors. **Molecular Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 572-578, 2015.

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

LÓPEZ-COLLAZO, E.; AVENDAÑO-ORTIZ, J.; MARTÍN-QUIRÓS, A. et al. Immune Response and COVID-19: A mirror image of Sepsis. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 14, p. 2479-2489, 2020.

MACKAY, D. The mathematics of drug-receptor interactions. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 18, p. 201-222, 1966.

MACKENZIE, J. F.; DALY, C. J.; PEDIANI, J. D. et al. Quantitative Imaging in Live Human Cells Reveals Intracellular α_1 -Adrenoceptor Ligand-Binding Sites. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 2, p. 434-443, 2000.

MADAULE, P.; AXEL, R. A Novel ras-Related Gene Family. **Cell**, v. 41, n. 1, p. 31-40, 1985.

MARSDEN, P. A.; SCHAPPERT, K. T.; CHEN, H. S. et al. Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase. **FEBS Letters**, v. 307, n. 3, p. 287-293, 1992.

MCMILLAN, M.; CHERNOW, B.; ROTH, B. L. Hepatic α_1 -adrenergic receptor alteration in a rat model of chronic sepsis. **Circulatory Shock**, v. 19, n. 2, p. 185-193, 1986.

MICHELL, R. H. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Reviews on Biomembranes**, v. 415, n. 1, p. 81-147, 1975.

MICHELOTTI, G. A.; PRICE, D. T.; SCHWINN, D. A. α_1 -Adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 88, n. 3, p. 281-309, 2000.

MILLER, M. R.; MEGSON, I. L. Recent developments in nitric oxide donor drugs. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 3, p. 305-321, 2007.

MILLIGAN, G. New aspects of G protein-coupled receptor signaling and regulation. **Trends in Endocrinology e Metabolism**, v. 9, n. 1, p. 13-19, 1998.

MITA, M.; WALSH, M. P. α_1 -Adrenoceptor-mediated phosphorylation of myosin in rat tail arterial smooth muscle. **Biochemical Journal**, v. 327, n. 3, p. 669-674, 1997.

MOORE, C. A. C.; MILANO, S. K.; BENOVIC, J. L. Regulation of Receptor Trafficking by GRKs and Arrestins. **Annual Review of Physiology**, v. 69, p. 451-482, 2007.

MOOSMANG, S.; SCHULLA, V.; WELLING, A. et al. Dominant role of smooth muscle L-type calcium channel $Ca_v1.2$ for blood pressure regulation. **The EMBO Journal**, v. 22, n. 22, p. 6027-6034, 2003.

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

MUNGREE, I. N.; BREDDT, D.S.; STEWART, D.J. et al. From molecules to mammals: what's NOS got to do with it? **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 172, n. 2, p. 123-135, 2003.

NAKAGAWA, O.; FUJISAWA, K.; ISHIZAKI, T. et al. ROCK-I and ROCK-II, two isoforms of Rho-associated coiled-coil forming protein serine/threonine kinase in mice. **FEBS Letters**, v. 392, n. 2, p. 189-193, 1996.

NASH, C. A.; WEI, W.; IRANNEJAD, R. et al. Golgi Localized β_1 -adrenergic Receptors Stimulate Golgi PI4P Hydrolysis by PLC ϵ to Regulate Cardiac Hypertrophy. **ELife**, v. 8, n. 48167, p. 1-22, 2019.

NAVEDO, M. F.; AMBERG, G. C. Local regulation of L-type Ca^{2+} channel sparklets in arterial smooth muscle. **Microcirculation**, v. 20, n. 4, p. 290-298, 2013.

NELSON, JR. T. E.; TOOKE, R. M. Biphasic Adrenergic Responses of Rabbit Aorta. **Microvascular Research**, v. 8, n. 2, p. 172-180, 1974.

NELSON, M. T.; STANDEN, N. B.; BRAYDEN, J. E. et al. Noradrenaline contracts arteries by activating voltage-dependent calcium channels. **Nature**, v. 336, p. 382-385, 1988.

NOBE, K.; PAUL, R. J. Distinct Pathways of Ca²⁺ Sensitization in Porcine Coronary Artery. **Circulation Research**, v. 88, n. 12, p. 1283-1290, 2001.

PALCZEWSKI, K.; KUMASAKA, T.; HORI, T. et al. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. **Science**, v. 289, n. 5480, p. 739-745, 2000.

PATON, W. D. M. A theory of drug action based on the rate of drug-receptor combination. **The Royal Society**, v. 154, n. 954, p. 21-69, 1961.

PEPINE, C. Nifedipine, A New Calcium Channel Blocker: Role for Vascular Selectivity. **Clinical Cardiology**, v. 12, n. 5, p. 240-246, 1989.

PEREZ, D.M.; PIASCIK, M.T.; GRAHAM, R.M. Solution-phase library screening for the identification of rare clones: isolation of an alpha 1D-adrenergic receptor cDNA. **Molecular Pharmacology**, v. 40, n. 6, p. 876-883, 1991.

PERMPIKUL, C.; TONGYOO, S.; VIARASILPA, T. et al. Early Use of Norepinephrine in Septic Shock Resuscitation (CENSER). A Randomized Trial. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 199, n. 9, p. 1097-1105, 2019.

PEŠIĆ, S.; GRBOVIC, L.; JOVANOVIĆ, A. et al. Effect of the vascular endothelium on contractions induced by noradrenaline and phenylephrine in perforating branch of the human internal mammary artery. **Polish Journal of Pharmacology**, v. 55, n. 4, p. 581-593, 2003.

PIASCIK, M. T.; GUARINO, R. D.; SMITH, M. S. et al. The specific contribution of the novel alpha-1D adrenoceptor to the contraction of vascular smooth muscle. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 275, n. 3, p. 1583-1589, 1995.

PRICE, S. A.; SPAIN, D. A.; WILSON, M. A. et al. Subacute Sepsis Impairs Vascular Smooth Muscle Contractile Machinery and Alters Vasoconstrictor and Dilator Mechanisms. **Journal of Surgical Research**, v. 83, n. 1, p. 75-80, 1999.

PRULL, C. R. Part of a Scientific Master Plan? Paul Ehrlich and the Origins of his Receptor Concept. **Medical History**, v.47, n. 3, p. 332-356, 2003.

RALL, T. W.; SUTHERLAND, E. W. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 232, n. 2, p. 1065-1076, 1958.

RASMUSSEN, S. G. F.; CHOI, H-J.; ROSENBAUM, D. M. et al. Crystal structure of the human β_2 -adrenergic G-protein-coupled receptor. **Nature**, v. 450, p. 383-387, 2007.

REINER, S.; AMBROSIO, M.; HOFFMANN, C. et al. Differential Signaling of the Endogenous Agonists at the β 2-Adrenergic Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 46, p. 36188-36198, 2010.

REINHART, K.; DANIELS, R.; KISSOON, N. et al. Recognizing Sepsis as a Global Health Priority - A WHO Resolution. **The New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 5, p. 414-417, 2017.

REES, D.D.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 9, p. 3375-3378, 1989.

RHODES, A.; EVANS, L. E.; ALHAZZANI, W. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Medicine**, v. 43, n. 3, p. 304-377, 2017.

RIVERS, E.; NGUYEN, B.; HAVSTAD, S. et al. Early Goal-Directed Therapy in the Treatment of Severe Sepsis and Septic Shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 19, p. 1368-1377, 2001.

ROBISON, G. A.; BUTCHER, R. W.; OYE, I. et al. The Effect of Epinephrine on Adenosine 3',5'-Phosphate Levels in the Isolated Perfused Rat Heart. **Molecular Pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 168-177, 1965.

ROBISON, G. A.; BUTCHER, R. W.; SUTHERLAND, E. W. Adenyl cyclase as an adrenergic receptor. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 139, n. 3, p. 703-723, 1967.

ROCKMAN, H. A.; LEFKOWITZ, R. J. Introduction to the Series on Novel Aspects of Cardiovascular G-Protein-Coupled Receptor Signaling. **Circulation Research**, v. 109, n. 2, p. 202-204, 2011.

RODBELL, M. In vitro assays of adenyl cyclase. **Acta Endocrinology Supplement (Copenhagen)**, v. 153, p. 337-347, 1971.

RODBELL, M. Signal Transduction: Evolution of an Idea. **Environmental Health Perspectives**, v.103, n. 4, p. 338-345, 1995.

ROKOSH, D. G.; SIMPSON, P. C. 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**, v. 99, n. 14, p. 9474-9479, 2002.

ROSENBAUM, D. M.; RASMUSSEN, S. G. F.; KOBILKA, B. K. The structure and function of G-protein-coupled receptors. **Nature**, v. 459, p. 356-363, 2009.

ROTH, B. L.; SPITZER, J. A. Altered hepatic vasopressin and α 1-adrenergic receptors after chronic endotoxin infusion. **American Journal of Physiology**, v. 252, n. 1, p. E699-702, 1987.

RUBIN, R. P. A Brief History of Great Discoveries in Pharmacology: In Celebration of the Centennial Anniversary of the Founding of the American Society of Pharmacology and Experimental Therapeutics. **Pharmacological Reviews**, v. 59, n. 4, p. 289-359, 2007.

RUDNER, X. L.; BERKOWITZ, D. E.; BOOTH, J. V. et al. Subtype Specific Regulation of Human Vascular α_1 -Adrenergic Receptors by Vessel Bed and Age. **Circulation**, v. 100, n. 23, p. 2336-2343, 1999.

SAKURADA, S.; OKAMOTO, H.; TAKUWA, N. et al. Rho activation in excitatory agonist-stimulated vascular smooth muscle. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 281, n. 2, p. C571-C578, 2001.

SALOMÃO, R.; FERREIRA, B. L.; SALOMÃO, M, C. et al. Sepsis: evolving concepts and challenges. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 4, p. 1-14, 2019.

SATO, K.; SAWADA, M.; KOJIMA, M. et al. Biphasic pressor responses to norepinephrine in humans. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 58, n. 5, p. 583-587, 1995.

SCHILD, H. O. pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 2, n. 3, p. 189-206, 1947.

SCHWINN, D. A. Adrenoceptors as models for g protein-coupled receptors: structure, function and regulation. **British Journal of Anaesthesia**, v. 71, n. 1, p.77-85,1993.

SHERMAN, P. A.; LAUBACH, V. E.; REEP, B. R. et al. Purification and cDNA Sequence of an Inducible Nitric Oxide Synthase from a Human Tumor Cell Line. **Biochemistry**, v. 32, n. 43, p. 11600-11605, 1993.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W. et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801-810, 2016.

SJAASTAD, F. V.; JENSEN, I. J.; BERTON, R. R. et al. Inducing Experimental Polymicrobial Sepsis by Cecal Ligation and Puncture. **Current Protocols in Immunology**, v. 131, n. 1, p. 1-16, 2020.

SMITH, J. S.; LEFKOWITZ, R. J.; RAJAGOPAL, S. Biased Signalling: From Simple Switches to Allosteric Microprocessors. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 17, p. 243-260, 2018.

SONKUSARE, S.; PALADE, P. T.; MARSH, J. D. et al. Vascular calcium channels and high blood pressure: Pathophysiology and therapeutic implications. **Vascular Pharmacology**, v. 44, n. 3, p. 131-142, 2006.

STEPHENSON, R. P. A modification of receptor theory. **British Journal of Pharmacology**, v.11. n. 4, p. 379-393, 1956.

STERNWEIS, P. C.; SMRCKA, A. V.; GUTOWSKI, S. Hormone signalling via G-protein: regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis by G_q. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 336, n. 1276, p. 35-41, 1992.

STRIJDOM, H., CHAMANE, N. AND LOCHNER, A. Nitric oxide in the cardiovascular system: A simple molecule with complex actions. **Cardiovascular Journal of Africa**, v. 20, n. 5, p. 303-310, 2009.

STONE, J. R.; MARLETTA, M. A. Soluble Guanylate Cyclase from Bovine Lung: Activation with Nitric Oxide and Carbon Monoxide and Spectral Characterization of the Ferrous and Ferric States. **Biochemistry**, v. 33, n. 18, p. 5636-5640, 1994.

SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W. Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 232, n. 2, p. 1077-1091, 1958.

SUTHERLAND, E. W.; RALL, T. W.; MENON, T. Adenyl Cyclase I. Distribution, preparation, and properties. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 237, n. 4, p. 1220-1227, 1962.

TANOUE, A.; NASA, Y.; KOSHIMIZU, T. et al. The α_{1D} -adrenergic receptor directly regulates arterial blood pressure via vasoconstriction. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 109, n. 6, p. 765-775, 2002.

UKOR, I-F.; WALLEY, K. R. Vasopressin in Vasodilatory Shock. **Critical Care Clinics**, v. 35, n. 2, p. 247-261, 2019.

UMANS, J. G.; WYLAM, M. E.; SAMSEL, R. W. Effects of Endotoxin In Vivo on Endothelial and Smooth-Muscle Function in Rabbit and Rat Aorta. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 148, n. 6, p. 1638-1645, 1993.

VAIL, E.; GERSHENGORN, H. B.; HUA, M. et al. Association Between US Norepinephrine Shortage and Mortality Among Patients with Septic Shock. **JAMA**, v. 317, n. 14, p. 1433-1442, 2017.

VALLANCE, P.; COLLIER, J.; MONCADA, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. **The Lancet**, v. 2, n. 8670, p. 997-1000, 1989.

VAN HOVE, CE.; VAN DER DONCKT, C.; HERMAN, A. G. et al. Vasodilator efficacy of nitric oxide depends on mechanisms of intracellular calcium mobilization in mouse aortic smooth muscle cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 3, p. 920-930, 2009.

VANE, J. R. The Croonian Lecture, 1993. The Endothelium: Maestro of the Blood Circulation. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 343, n. 1304, p. 225-46, 1994.

WANG, C.; MANSARD, A.; GIUMMELLY, P. et al. Decreased aortic smooth muscle contraction in a rat model of multibacterial sepsis. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 18, n. 6, p. 679-683, 2004.

WEBB, R. C. Smooth muscle contraction and relaxation. **Advances in Physiology Education**, v. 27, n. 4, p. 201-206, 2003.

WEISBERG, A.; PARK, P.; CHERRY-BUKOWIEC, J. R. Early Goal-Directed Therapy: The History and Ongoing Impact on Management of Severe Sepsis and Septic Shock. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 142-146, 2018.

WEISS, J. M.; MORGAN, P. H.; LUTZ, M. W. The cubic ternary complex receptor occupancy model. III. resurrecting efficacy. **Journal of Theoretical Biology**, v. 181, n. 4, p. 381-397, 1996.

WENNERBERG, K.; DER, C. J. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1301-1312, 2004.

WURSTER, S. H.; WANG, P.; DEAN, R. E. et al. Vascular smooth muscle contractile function is impaired during early and late stages of sepsis. **Journal of Surgical Research**, v. 56, n. 6, p. 556-561, 1994.

ZHOU, F.; YU, T.; DU, R. et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. **The Lancet**, v. 395, n. 10229, p. 1054-1062, 2020.

ZUSCIK, M. J.; CHALOTHORN, D.; HELLARD, D. et al. Hypotension, Autonomic Failure, and Cardiac Hypertrophy in Transgenic Mice Overexpressing the α_{1B} -Adrenergic Receptor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 17, p. 13738-13743, 2001.