



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

Thiele Osvaldt Rosales

**Dinâmica da grk2 no rim: um possível mecanismo para a
insuficiência renal aguda na sepse**

Florianópolis
2021

Thiele Osvaldt Rosales

**Dinâmica da grk2 no rim: um possível mecanismo para a
insuficiência renal aguda na sepse**

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

Orientador: Prof. Dr. Jamil Assreuy

Florianópolis

2021

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

Rosales, Thiele Osvaldt

Dinâmica da grk2 no rim: um possível mecanismo para a
insuficiência renal aguda na sepse / Thiele Osvaldt
Rosales ; orientador, Jamil Assreuy Filho, 2021.
124 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. Insuficiência renal
aguda. 4. GRK2. 5. Receptor alfa 1 adrenérgico. I. Assreuy
Filho, Jamil . II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. III. Título.

Thiele Osvaldt Rosales

Dinâmica da grk2 no rim: um possível mecanismo para a insuficiência renal aguda na sepse

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

Prof. Dr. André Sampaio Pupo
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dra. Priscila Sato
Drexel University

Prof. Dra. Cilene Lino de Oliveira
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.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Dr. Jamil Assreuy
Orientador(a)

Florianópolis, 2021

À minha irmã, Thiécla, por todo incentivo, por me
oferecer suporte e por sempre me guiar

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Darce e Sergio, pelo amor incondicional, por sempre terem me incentivado a correr atrás dos meus sonhos e por permitirem que isso fosse possível.

Aos meus irmãos, Thiécla e Gabriel e ao meu cunhado João Paulo, pelo apoio fundamental e por estarem sempre presentes na minha vida.

Aos meus sobrinhos, Ana Paula e João Pedro, por toda a alegria que me trazem e por todo amor que recebo.

Ao meu orientador, Jamil, por todos esses anos de orientação, pela paciência, pela enorme disponibilidade e disposição. Obrigada pelo cuidado comigo, pela compreensão, pelo carinho, pela amizade e por me ensinar tanto. Agradeço pelo aprendizado científico, mas, especialmente, pelo de vida. Obrigada por dividir comigo o seu amor pela ciência. Sinto muito orgulho em ser sua filha científica.

Ao meu irmão de coração, Filipe, pelas incontáveis horas no laboratório, por toda ajuda nos experimentos e na tese. Mas, muito mais do que isso, obrigada pela amizade, pelo afeto, pelo incentivo, pelo apoio em todos os momentos, pela cumplicidade e por ter me ensinado tanto. Agradeço imensamente por ter você na minha vida. Você é o melhor presente de Floripa.

À Maíra Bicca, minha orientadora em tantos momentos na vida, pela imensa disponibilidade em me ajudar, por todo amor que recebo, por todas as horas de conversa e todo o conhecimento repassado. Você é minha inspiração e você foi fundamental na minha trajetória acadêmica. Você é incomparável.

À Deborah, por toda ajuda no laboratório, por todas as conversas de apoio e por sempre se disponibilizar a me ajudar. Obrigada por compartilhar tantos momentos comigo (os bons e os ruins!). Agradeço muito por sua amizade, companheirismo e por ser inspiração!

À Adri, minha “mãe” no laboratório, por toda ajuda e suporte nos experimentos, pelo exemplo de vida e por me mostrar tanta garra e dedicação. Obrigada por tanto cuidado comigo, tanto carinho e tantos bons momentos.

À Daiane, pela ajuda nos experimentos de Western blot e de cultura celular. Também, por todas as trilhas, fofocas e risadas, principalmente nesse período difícil de pandemia. Obrigada por ser uma ótima guia turística, pela amizade e por tanto companheirismo.

À Verônica, minha eterna co-orientadora, pela disposição em sempre me ajudar, pelo carinho, por todo aprendizado e por essa amizade que construímos e que levarei pra vida.

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

Às amigas Samar e Nicole, presentes que o doutorado sanduíche me deu, por me acolherem, compartilharem tantos bons momentos e por dividirem comigo as dificuldades dessa caminhada.

À Rafaela, Hannah, Maria Luísa, Angelica, pela prazerosa convivência e por toda ajuda prestada.

Ao Prof Dr Jeffrey Benovic, por me receber em seu laboratório durante o doutorado sanduíche, pela paciência e por todos os ensinamentos.

Ao Prof Dr Geisson Nardi pela fundamental colaboração nos experimentos de pressão arterial e fluxo sanguíneo e por todas as discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Juliano Ferreira e a doutoranda Marcela, por fornecerem os reagentes e equipamentos e pela ajuda técnica no experimento de RT-PCR .

Ao Prof. Dr. Fernando Cunha (USP), por disponibilizar os animais *knockout*, fundamentais para esse trabalho.

Ao Prof. Dr. Osmar Damasceno Ribeiro (UNOESC), por realizar a análise histológica nesse estudo.

Aos Profs. Dr. Luis Eduardo Quintas e Dra Claudia Martins Silva (UFRJ), por disponibilizarem as células LLC-PK1.

Aos membros da banca, Prof. Dr. André Sampaio Pupo, Profa. Dr. Cilene Lino de Oliveira e Profa. Dr. Priscila Sato por aceitarem avaliar este trabalho de conclusão de doutorado e todas as contribuições.

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

Aos amigos dos laboratórios da área cardiovascular e a todos os demais colegas que a pós-graduação me presenteou.

Aos funcionários do biotério da Farmacologia, do Lameb e do LCME, pelo suporte técnico.

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

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

“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma humana”.

Carl Jung

RESUMO

Sepse é definida como uma disfunção orgânica com risco de vida, causada por uma resposta imune exacerbada frente à infecção. Os achados clínicos da sepse incluem vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e diminuição da reatividade aos vasoconstritores, levando a hipotensão refratária, sendo o óxido nítrico (NO) um importante modulador neste quadro. Em oposição a circulação sistêmica, a reatividade vascular renal é preservada na sepse, contribuindo para a insuficiência renal aguda (IRA) na sepse. Dados prévios de nosso laboratório mostram que o NO (derivado da NOS-2) ativa a cinase de receptor acoplado à proteína G (GRK2) na aorta e no coração, levando à diminuição da densidade dos receptores adrenérgicos α_1 e β_1 que, por sua vez, está associada à diminuição da reatividade vascular e cardíaca na sepse, respectivamente. Dessa forma, nosso objetivo foi investigar se a IRA, na sepse, ocorre por ativação da via NO-GRK2-receptor α_1 adrenérgico. Camundongos fêmeas selvagens Swiss e C57BL/6 NOS-2-KO foram submetidos à sepse por ligadura e perfuração do ceco (CLP). Camundongos Swiss foram tratados com um inibidor de NOS-2 (1400W; 1 mg/kg), com inibidor da guanilato ciclase solúvel (azul de metileno; s.c.; 10mg/Kg) 6, 12 e 18 h após CLP 30 min antes e 6 e 12 horas após CLP ou com um antagonista do receptor adrenérgico α_1 (prazosina; 1 mg/Kg), 12 horas após CLP. Experimentos *in vivo*, moleculares e bioquímicos foram realizados 24 h após CLP. Camundongos Swiss não sépticos foram tratados com um doador de NO (SNAP, 10 mg / Kg) e as análises foram realizadas após 4 h. Ensaios complementares foram feitos em células epiteliais de rim de porco (LLC-PK1), tratadas com SNAP (100 μ M) e na presença ou não de um inibidor de guanilato ciclase solúvel (ODQ, 1 μ M) ou do inibidor de proteassoma (MG132; 10 μ M) e as análises foram realizadas após 4 h. Nossos resultados mostram que a sepse diminuiu a pressão arterial média, a reatividade vascular à fenilefrina e o fluxo sanguíneo renal basal, o qual foi normalizado pelo tratamento com prazosina. A sepse levou a um aumento na expressão de NOS-2 renal, na produção de NO, nos metabólitos do NO e nos níveis plasmáticos de creatinina e ureia. Os níveis de GRK2 e β -arrestina diminuíram e a densidade do receptor α_1 adrenérgico aumentou no rim durante a sepse. A diminuição de GRK2 renal foi prevenida em camundongos NOS-2-KO ou camundongos tratados com 1400W, mas não pelo

tratamento com azul de metileno. A densidade do receptor da angiotensina II (AT1) não foi alterada no rim séptico. Já a densidade do receptor β 1 adrenérgico aumentou no coração séptico e os níveis de β -arrestina reduziram. O tratamento com um doador de NO reduziu o conteúdo de GRK2 no rim de camundongos não sépticos e em células LLC-PK1. A diminuição do nível de GRK2 em células LLC-PK1 foi prevenida pela inibição da guanilato ciclase solúvel, mas não com o inibidor de proteassoma. Portanto, nossos resultados mostram que o NO leva a uma redução no nível de GRK2 nos rins durante a sepse, levando à preservação da densidade do receptor α 1 adrenérgico o que, juntamente com maior tônus vasoconstritor maior na sepse, leva a vasoconstrição excessiva nos rins e pode contribuir para o desenvolvimento da IRA associada à sepse.

Palavras-chave: sepse; insuficiência renal aguda; GRK2; receptor α 1 adrenérgico; óxido nítrico

ABSTRACT

Sepsis is defined as a life-threatening organ dysfunction caused by an overwhelming immune response to infection. Sepsis clinical findings include vasodilatation and decrease of reactivity to vasoconstrictors leading to severe and untreatable hypotension, being the nitric oxide (NO) an important player in this dysfunction. If in addition to this acute kidney failure (AKI) takes place, the prognostic is worsened. The mechanism of kidney failure in sepsis is under debate. What is known is, in the opposition to the systemic vasculature, renal vascular reactivity to catecholamines is preserved in sepsis. Previous data of our laboratory show that NOS-2-derived NO activates G protein-coupled receptor 2 (GRK2) in aorta and heart, leading to the decrease in α_1 and β_1 adrenergic receptor density which, in turn, is associated with the decrease in vascular and cardiac reactivity in sepsis, respectively. Thus, we aimed to study whether the distinct behavior of the kidney was related to NO-GRK2- α_1 adrenergic receptor. Female wild type Swiss and C57BL/6 NOS-2-KO mice were submitted to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). Swiss mice were treated with a NOS-2 inhibitor (1400W; 1 mg/kg), 30 min before and 6 and 12 hours after CLP, with a soluble guanylate cyclase inhibitor (methylene blue; 10 mg/Kg), 6, 12 and 18 h after CLP or with a α_1 adrenergic receptor antagonist (prazosin; 1 mg/Kg), 12 hours after CLP. *In vivo* experiments, molecular and biochemistry assays were performed 24 h after CLP. Normal Swiss mice were treated with a NO donor (SNAP, 10 mg/Kg) and analyses were carried out 4 hours later. For complementary experiments, swine kidney epithelial cell line (LLC-PK1) were treated with SNAP (100 μ M) in the presence or not of an inhibitor of soluble guanylate cyclase (ODQ, 1 μ M) and proteasome inhibitor (MG132, 10 μ M) and analysis were carried out 4 hours later. Our results show that sepsis decreased the systemic mean arterial pressure, the vascular reactivity to phenylephrine and the basal renal blood flow, which was normalized by treatment with prazosin. Sepsis increased NOS-2 expression in kidney, NO production, NO metabolites and plasma creatinine and urea levels. GRK2 and β -arrestin levels were decreased whereas α_1 adrenergic receptor density increased in septic kidney. The disappearance of renal GRK2 was prevented in NOS-2-KO mice or mice treated with 1400W but not with methylene blue treatment. Angiotensin II receptor

density (AT1) did not change in septic kidney. B1 adrenergic receptor density increased in septic heart while β -arrestin levels were reduced. Treatment with a NO donor reduced GRK2 content in the kidney of non-septic mice and in LLC-PK1 cells. The decrease in GRK2 level in LLC-PK1 cells was prevented by the inhibition of soluble guanylate cyclase but not with the proteasome inhibitor. Therefore, our results show that a NO-dependent reduction in GRK2 level in the kidney leads to the maintenance of a normal α_1 adrenergic receptor density which, together with a higher vasoconstrictor tonus in sepsis lead to vasoconstriction and may help to explain sepsis-induced AKI.

Keywords: sepsis; acute kidney injury; GRK2; α_1 adrenergic receptor; nitric oxide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de sinalização dos receptores α_1 adrenérgicos	38
Figura 2. Estrutura geral das GRKs	40
Figura 3. Mecanismo de dessensibilização de GPCR através da GRK	42
Figura 4. Efeito da fenilefrina na pressão sanguínea de animais sépticos.....	62
Figura 5. Efeito do tratamento com prazosina e da infusão de fenilefrina no fluxo sanguíneo caudal e renal de animais sépticos	66
Figura 6. Dosagem plasmática de creatinina e ureia em camundongos sépticos	67
Figura 7. Cortes histológicos de rim de animais submetidos à sepse.....	68
Figure 8. Densidade de receptores α_1 adrenérgicos no rim e no coração de camundongos sépticos.....	70
Figure 9. Densidade de receptores β_1 adrenérgicos no coração de camundongos sépticos	72
Figure 10. Densidade de receptores AT1 adrenérgicos no coração de camundongos sépticos	74
Figure 11. Níveis de GR2 no rim e no coração de camundongos sépticos	76
Figura 12. Níveis de GRK2 em tecido renal e cardíaco de camundongos sépticos	77
Figura 13. Expressão de NOS-2 e produção de NO em tecido renal e níveis plasmáticos de NOx em camundongos sépticos.....	79
Figura 14. Efeito do tratamento com 1400W e AM e da deleção do gene da NOS-2 nos níveis de GRK2 renal em animais sépticos	81
Figura 15. Efeito do tratamento com SNAP no conteúdo de GRK2 renal	82
Figura 16. Níveis de β -arrestina em tecido renal e cardíaco de camundongos sépticos.....	83
Figure 17. Efeito do SNAP nos níveis de GR2 em células LLC-PK1	84
Figura 18. Efeito do tratamento com SNAP e com ODQ no conteúdo de GRK2 em células LLC-PK1.....	85
Figure 19. Densidade de receptores α_1 adrenérgicos em células LLC-PK1.....	87
Figura 20. Efeito do tratamento com MG132 no conteúdo de GRK2 em células LLC-PK1	89
Figura 21. Mecanismo proposto para IRA associada à sepse.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – AVALIAÇÃO SEQUENCIAL DE FALÊNCIA DE ÓRGÃOS – SOFA	21
Tabela 2 – INICIADORES PARA AMPLICAÇÃO DOS GENES <i>GRK2</i> E <i>GAPDH</i>	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AMPc** – monofosfato cíclico de adenosina
- ATCC** – coleção de micro-organismos norte americana (do inglês, *American Type Culture Collection*)
- BSA** – soro de albumina bovino (do inglês; *Bovine Serum Albumin*)
- CEUA** – Comitê de Ética no Uso de Animais
- CLP** – ligadura e perfuração do ceco
- CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DAG** – diacilglicerol
- DAPI** –4',6-diamidino-2-fenilindol
- E. P. M.** – erro padrão da média
- GCs** – guanilato ciclase solúvel
- GMPc** – guanosina monofosfato cíclico
- GPCR**–receptores acoplados a proteína G (do inglês; *G Protein-Coupled Receptor*)
- GRK**– Cinase de receptor acoplado a proteína G (do inglês, *G Protein-Coupled Receptor Kinase*)
- GTP** – guanosinatrifosfato
- HONO₂** – peroxinitroso
- IRA** – insuficiência renal aguda
- i.p.**– intraperitoneal
- IP₃**– inositoltrifosfato
- LPS** – lipopolissacarideo
- MAPK** – proteína cinase ativada por mitógenos
- MLC** – cadeia leve de miosina
- MLCK** – miosina de cadeia leve cinase (do inglês, *Myosin Light Chain Kinase*)
- N₂O₃** – trióxido de dinitrogênio
- N₂O₄** – tetróxido de dinitrogênio
- NaCl** – cloreto de sódio
- NO** – óxido nítrico (do inglês, *Nitric Oxide*)
- NO₂**– dióxido de nitrogênio
- NOS** – óxido nítrico sintase
- NO_x** – nitrato + nitrito

O₂⁻ – ânion superóxido

ONO₂⁻ – ânion peroxinitrito

PAMPs – (do inglês, *Pathogen-associated Molecular Patterns*)

PBS – tampão fosfato (do inglês, *Phosphate Buffered Solution*)

PDE – fosfodiesterase

PDGFR β – fator de crescimento derivado de plaquetas (do inglês, *Platelet-derived Growth Factor Receptor- β*)

PFA – formaldeído tamponado

PKA – proteína cinase A

PKC – proteína cinase C

PKG – proteína cinasedependente de GMPc

PLC – fosfolipase C

PNF – prazosina não fluorescente

PPVR – pressão de perfusão renal

QAPB – BODIPY[®] FL prazosina

RKIP – cinase Raf (do inglês, *Raf kinase inhibitory protein*)

SRAA – sistema renina-angiotensina-aldosterona

s.c. – subcutânea

SDS – dodecil sulfato de sódio (do inglês; *Sodium Dodecyl Sulfate*)

SNAP – S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina

SNOs – S-nitrosotióis

SOFA – avaliação sequencial de falência de órgãos (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*)

TBS – solução salina tamponada com Tris (do inglês; *Tris-buffered Saline*)

TBS-T – solução salina tamponada com Tris acrescida de Tween 80 0,5 % (do inglês; *Tris-buffered Saline Tween*)

TLR – receptor Toll-like (do inglês, *Toll-like Receptor*)

UFC – unidade formadora de colônia

UI – unidades internacionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	200
1.1 SEPSE	200
1.1.1 Conceitos e aspectos gerais	200
1.1.2 Epidemiologia	22
1.1.3 Fisiopatologia	244
1.1.3.1 Disfunção cardiovascular	255
1.1.3.2 Disfunção renal	266
1.2 ÓXIDO NÍTRICO	288
1.2.1 Biossíntese e bioquímica do Óxido Nítrico	288
1.2.2 Óxido Nítrico e a sepse	31
1.3 REATIVIDADE VASCULAR NA SEPSE	33
1.4 PROTEÍNA G E RECEPTOR α 1 ADRENÉRGICO	36
1.5 CINASE DE RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G (GRK).....	39
1.5.1 Interação entre GRK e GPCR - Mecanismo de dessensibilização	41
1.5.2 Interação da GRK com proteínas não GPCR.....	42
1.5.3 Mecanismos de regulação das GRKs	44
1.5.4 GRK2.....	46
1.6 HIPÓTESE DO TRABALHO.....	48
2 OBJETIVOS	50
2.1 OBJETIVO GERAL	50
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 ANIMAIS.....	51
3.2 MODELO EXPERIMENTAL DE SEPSE POLIMICROBIANA POR CLP	51
3.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E DO FLUXO SANGUÍNEO.....	52
3.4 DETERMINAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO PELA SONDA DAF-FM.....	52
3.5 DETERMINAÇÃO DO NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NITRATO E NITRITO.....	53
3.6 DOSAGEM PLASMÁTICA DE CREATININA E UREIA	54
3.7 ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA	54
3.8 ENSAIO DE LIGAÇÃO DO RECEPTOR α 1 ADRENÉRGICO.....	54

3.9 WESTERN BLOT	56
3.10 EXTRAÇÃO DE RNA E REÇÃO EM CADEIA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT – qPCR)	57
3.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	59
3.12 CULTURA CELULAR	59
3.13 PROTOCOLOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL.....	61
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	62
4. RESULTADOS	63
4.1 AVALIAÇÃO DA PAM EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPSE.....	63
4.2 FLUXO SANGUÍNEO RENAL EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPSE.....	65
4.3 MARCADORES DE DANO RENAL E ANÁLISE HISTOPATÓLOGICA EM ANIMAIS SÉPTICOS.....	67
4.4 DENSIDADE DE RECEPTORES α_1 ADRENÉRGICOS NO RIM E CORAÇÃO DE ANIMAIS SÉPTICOS.....	68
4.5 DENSIDADE DE RECEPTORES β_1 ADRENÉRGICOS NO CORAÇÃO DE ANIMAIS SÉPTICOS	71
4.6 DENSIDADE DO RECEPTOR AT1 NO RIM DE ANIMAIS SÉPTICOS.....	73
4.7 NÍVEIS DE GRK2 NO RIM E NO CORAÇÃO DE ANIMAIS SÉPTICOS.....	75
4.8 EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS NÍVEIS DE GRK2 RENAL EM ANIMAIS SÉPTICOS	78
4.8.1 EXPRESSÃO DE NOS2 E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO RIM E ANÁLISE DE NO _x NO PLASMA DE ANIMAIS SÉPTICOS	78
4.8.2 EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS NÍVEIS DE GRK2 RENAL	80
4.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE β -ARRESTINA NO RIM DE ANIMAIS SÉPTICOS	82
4.10 EFEITO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO NOS NÍVEIS DE GRK2 EM CÉLULAS LLC-PK1	83
4.11 EFEITO DO SNAP NA DENSIDADE DE RECEPTORES α_1 ADRENÉRGICOS EM CÉLULAS LLC-PK1.....	86
4.12 EFEITO DO MG132 NOS NÍVEIS DE GRK2 EM CÉLULAS LLC-PK1.....	88
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÃO	102
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE

1.1.1 Conceitos e aspectos gerais

A palavra sepse deriva do grego *septikós* e significa putrefação. O termo sepse, citado nos poemas de Homero, 770 a.C., foi instituído por Hipócrates (460-377 a.C.) para descrever um estado perigoso, odorífero e de deterioração biológica que poderia ocorrer no corpo. Mais tarde, no século XIX, os trabalhos de Semmelweis, Pasteur, Koch e Lister, forneceram informações que possibilitaram a identificação de microorganismos na corrente sanguínea de pacientes com sepse, relacionando a infecção com a origem da doença. Desde então, a palavra sepse tem sido usada para caracterizar um estado grave de toxicidade sistêmica associada à uma infecção (revisado por NAMAS et al., 2012 e PETTIGREW, 2014).

Ao longo dos anos, diversas definições foram propostas para melhor identificar e caracterizar o quadro de sepse. Em 2016, o Terceiro Consenso Internacional de Sepse e Choque Séptico (Sepse 3) estabeleceu critérios para o diagnóstico da sepse, visando um reconhecimento precoce da doença e um manejo mais adequado de pacientes. Assim, a sepse é atualmente definida como uma disfunção de órgãos com risco de vida causada por uma resposta imune desregulada frente a uma infecção (SINGER et al., 2016).

Na prática clínica atual, a sepse é diagnosticada através da pontuação SOFA (do inglês, *Sequential Organ Failure Assessment*). Os critérios SOFA têm como objetivo especificar o diagnóstico de sepse e quantificar a gravidade da doença com base no grau de disfunção orgânica ao longo do tempo. O quadro séptico é identificado quando há um aumento de dois ou mais pontos no SOFA e uma pontuação alta está associada com um aumento na probabilidade de mortalidade (SINGER et al., 2016). São avaliados os sistemas respiratório, de coagulação, hepático, cardiovascular, nervoso e renal, através de exames clínicos e laboratoriais, conforme demonstrado na **Tabela 1**.

TABELA 1 – AVALIAÇÃO SEQUENCIAL DE FALÊNCIA DE ÓRGÃOS – SOFA

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

Fonte: adaptada de (SINGER *et al.*, 2016).

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

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

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

Entretanto, a pontuação SOFA requer diversos testes laboratoriais e pode não estar disponível em tempo hábil. Pacientes em choque séptico apresentam um aumento da mortalidade de, em média, 7,6% a cada hora de atraso até o início da terapia, tornando o tempo uma variável importantíssima para a melhora do paciente (KUMAR *et al.*, 2006). Além disso, países com poucos recursos não possuem condições necessárias para que a avaliação seja realizada. Desta forma, desenvolveu-se o *quickSOFA* (qSOFA) que não utiliza variáveis laboratoriais e permite uma triagem dos pacientes que correm o risco de desenvolver a sepse, tornando essa ferramenta útil à beira do leito (SINGER *et al.*, 2016).

Os critérios utilizados no qSOFA são: pressão arterial sistólica menor que 100 mmHg, frequência respiratória maior que 22 ciclos por minuto e rebaixamento do nível

de consciência (Escala de coma de Glasgow < 15). Se pelo menos duas variáveis forem encontradas, recomenda-se a utilização do SOFA e há indício de mortalidade ou permanência prolongada em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (SEYMOUR *et al.*, 2016; SHANKAR-HARI *et al.*, 2016; SINGER *et al.*, 2016).

Quando não resolvida, a sepse pode evoluir para um quadro de choque séptico, que é acompanhado por anormalidades circulatórias, celulares e metabólicas que aumentam substancialmente o risco de mortalidade. De acordo com os critérios clínicos, o choque séptico é definido como a presença de hipotensão com necessidade de vasopressores para manter pressão arterial média ≥ 65 mmHg associada a lactato plasmático ≥ 2 mmol/L, após reposição volêmica (SHANKAR-HARI *et al.*, 2016; SINGER *et al.*, 2016).

1.1.2 Epidemiologia

A sepse é uma doença multifatorial, complexa, de difícil tratamento e é uma das principais causas de mortalidade no mundo. A sepse é responsável por uma a cada cinco mortes mundialmente e estima-se que ocorram 48 milhões de casos a cada ano, resultando em cerca de 11 milhões de mortes (RUDD *et al.*, 2020).

No Brasil, pelo menos 30% dos leitos em unidades de terapia intensiva (UTIs) são ocupados por pacientes sépticos e a incidência é de 36,3 casos por 1000 pacientes/dia (MACHADO, 2017). Dados do Instituto Latino Americano da Sepse (ILAS), mostram que a mortalidade nos hospitais privados brasileiros para sepse e choque séptico é de 23,4% e 56,2%, respectivamente, e nos hospitais públicos, de 44,2% e 72,9%, indicando que a diminuição da mortalidade esta atrelada ao manejo e suporte adequados da doença (IDALGO *et al.*, 2021).

Observa-se que as condições socioeconômicas são relevantes no desenvolvimento da sepse, pois cerca de 85% dos casos ocorrem em países subdesenvolvidos. Além disso, a sepse representa um dos maiores gastos hospitalares e tem um alto impacto nos gastos com saúde pública (FLEISCHMANN *et al.* 2016; RUDD *et al.* 2020). Nos Estados Unidos, por exemplo, o tratamento de pacientes sépticos custa mais de USD 24

bilhões por ano para o país, correspondendo a 13% dos custos totais hospitalares (PAOLI et al., 2018).

Outro fator significativo associado a sepse é a etiologia da doença. A sepse pode ser desencadeada por bactérias, fungos, vírus ou protozoários, mas os agentes etiológicos mais frequentes são as bactérias, seguidas dos fungos (NDUKA; PARRILLO, 2009). De acordo com o registro internacional de sepse, entre os 12881 casos registrados, as infecções por bactérias gram-negativas são as mais comuns (41,4%), seguidas das gram-positivas (32,4%), das infecções fúngicas (8,7%) e virais (1,3%) (BEALE et al., 2009). Os achados laboratoriais mostram que o *Staphylococcus aureus* e o *Streptococcus pneumoniae* são as bactérias gram-positivas prevalentes, enquanto que as gram-negativas mais isoladas são *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*. As espécies de *Candida* são as principais causadoras das infecções fúngicas, as quais têm demonstrado crescimento nos casos de sepse (ANGUS; VAN DER POLL, 2013). Mais recentemente por conta da pandemia de SARS-COV-2 as infecções virais aumentaram muito deve haver um aumento de casos por sepse viral.

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

Além dos fatores socioeconômico e etiológico, as características ligadas ao paciente também estão associadas a suscetibilidade à sepse. A presença de imunossupressão decorrente de neoplasias, infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida ou uso de imunossupressores são fatores clássicos. Além disso, particularidades genéticas do paciente que estão associadas à modulação da resposta imune e às oportunidades de intervenções terapêuticas também são fatores determinantes (ANGUS; WAX, 2001; ANGUS; VAN DER POLL, 2013). Idade, sexo e raça também são relevantes na incidência do quadro séptico, onde a maior ocorrência é em bebês e idosos, homens e na população negra (ANGUS et al., 2001; MAYR et al., 2010).

1.1.3 Fisiopatologia

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

Uma vez que ocorra o reconhecimento de PAMPs, uma cascata de eventos intracelulares é desencadeada, recrutando várias proteínas citoplasmáticas e culminando na ativação de diversos fatores de transcrição, dentre eles o Fator Nuclear κ B (NF- κ B; do inglês *Nuclear Factor Kappa B*), a Proteína Ativadora-1 (AP-1; do inglês *Activation Protein 1*), Proteína de Resposta de Crescimento Precoce (EGR-1; do inglês *Early Growth Response 1*) e os Transdutores de sinais e ativadores de transcrição 1 (STAT 1; do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription 1*) (SHERWOOD, 2004; HOTCHKISS *et al.*, 2016).

A ativação desses fatores de transcrição leva a expressão gênica de moléculas inflamatórias, como fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 beta (IL-1 β) e interleucina-10 (IL-10). Ocorre aumento da expressão da enzima óxido nítrico sintase 2 (NOS-2; do inglês *Nitric Oxide Synthase*), levando a geração de óxido nítrico (NO; do inglês, *Nitric Oxide*) e produção dos metabólitos do ácido araquidônico, como prostaglandinas e leucotrienos (O'BRIEN *et al.*, 2007). As citocinas pró-inflamatórias são liberadas na circulação levando a ativação de células, como neutrófilos, monócitos, macrófagos, plaquetas e células endoteliais. Vários outros sistemas compostos de proteínas plasmáticas, como os sistemas complemento, coagulação e sistema fibrinolítico, também são ativados (ARRIETA; RODRIGUEZ-REYNA; SOTELO, 2000; DELLINGER *et al.*, 2004). Há aumento da permeabilidade vascular e recrutamento dos leucócitos para os tecidos, onde acontece a produção de

mediadores secundários como espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, amplificando ainda mais o processo inflamatório (revisado por CINEL; OPAL, 2009).

Quando o quadro inflamatório não é resolvido, o desequilíbrio entre as respostas inflamatórias e anti-inflamatórias leva a disfunção múltipla de órgãos, culminando na sepse (SOGAYAR *et al.*, 2008). As manifestações clínicas da sepse são variáveis e dependem do foco inicial da doença, do agente etiológico, do estado de saúde do paciente e, ainda, das intervenções terapêuticas iniciais. Entretanto, a falência do sistema cardiovascular é determinante no prognóstico da doença, pois o aporte sanguíneo inadequado contribui para a falência dos demais sistemas. Ainda, sabe-se que o risco de mortalidade da sepse aumenta de acordo com o número de órgãos acometidos (FERREIRA *et al.*, 2001).

1.1.3.1 Disfunção cardiovascular

A disfunção cardiovascular é a manifestação mais grave da sepse e é caracterizada pelo comprometimento da função cardíaca e por alterações hemodinâmicas, tanto na circulação sistêmica como na microcirculação (revisado por LUSH; KVIETYS, 2000; MIRANDA *et al.*, 2016).

A produção de mediadores inflamatórios na sepse resulta na redução do tônus vascular e no aumento da permeabilidade vascular, contribuindo para um quadro de hipovolemia, hipotensão e depressão miocárdica. Além disso, já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa e por outros que há uma diminuição da resposta vascular sistêmica a agentes vasoconstritores, culminando em hipotensão refratária (SILVA-SANTOS & ASSREUY, 1999; FERNANDES *et al.*, 2006).

Do ponto de vista da microcirculação na sepse, observa-se heterogeneidade de fluxo, com áreas com capilares apresentando fluxo muito lento ou mesmo sem fluxo, próximas a áreas com perfusão capilar preservada. Também, há uma redução da densidade de capilares, trombose e edema intersticial, fatores que contribuem para a

redução da oferta tecidual de oxigênio, aumento do metabolismo anaeróbio e hiperlactatemia (revisado por MIRANDA et al., 2016).

1.1.3.2 Disfunção renal

Outra grave e frequente complicação observada na sepse é a insuficiência renal aguda (IRA). A IRA aumenta substancialmente o risco de morte dos pacientes sépticos, com taxas de mortalidade de 80%. Ademais, a IRA é relatada em 30% a 60% dos casos de sepse, dos quais pelo menos metade necessita de diálise (TAKASU *et al.*, 2013; ZARJOU; AGARWAL, 2011). Uma vez que o débito urinário normal é comprometido, desenvolve-se rapidamente uma sobrecarga líquida que leva a um aumento do líquido extravascular nos pulmões com piora considerável nas trocas gasosas (AWAD, 2003).

A IRA é caracterizada por uma falha aguda dos rins em filtrar o sangue adequadamente, regular o balanço de água e de íons e gerar urina. Clinicamente, a IRA associada a sepse é identificada pela diminuição do débito urinário e pelo aumento dos níveis plasmáticos de creatinina (Seymour et al. 2016 ; 2016, LI et al., 2018).

A fisiopatologia da IRA é multifatorial e seus mecanismos ainda não estão totalmente elucidados, mas sabe-se que envolve uma interação complexa entre alterações hemodinâmicas, lesão celular e inflamação (ERGIN *et al.*, 2015).

Os túbulos renais de pacientes com sepse são expostos continuamente a PAMPs, espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio, citocinas e outros fatores produzidos em resposta à infecção, já que os rins filtram grandes volumes de plasma a cada hora. Dentre as principais consequências da exposição renal aos mediadores inflamatórios, estão as lesões de células glomerulares e tubulares e a produção, proliferação e migração de fibroblastos, levando ao acúmulo da matriz extracelular, fibrose e, conseqüentemente, perda de néfrons (DINIZ, 2011). No entanto, apesar da perda de função renal, as evidências histológicas mostram que lesões celulares são escassas, indicando que a IRA está mais relacionada a uma disfunção do que a uma lesão no tecido (MÅRTENSSON; BELLOMO, 2015).

Desde o início da sepse, a disfunção cardiovascular impacta na hipoperfusão glomerular e desregulação da rede peritubular, resultando em um dano isquêmico e disfunção tubular renal, sugerindo que a IRA é iniciada pela disfunção vascular.

Conforme exposto anteriormente, a disfunção vascular na sepse é marcada por uma incapacidade na resposta aos agentes vasoconstritores, porém, no leito renal, a reatividade é conservada ou até mesmo aumentada, contrapondo-se a circulação sistêmica (BOFFA; ARENDSHORST, 2005). Esse fenômeno é um ponto importante no entendimento da IRA na sepse, pois em resposta ao quadro de vasodilatação, diferentes mecanismos fisiológicos são ativados na tentativa de restabelecer a pressão arterial e a perfusão dos tecidos. Então, como resultado da depleção do volume arterial, os barorreceptores são sensibilizados e aumentam a atividade simpática e a produção de angiotensina e de arginina-vasopressina, resultando em uma vasoconstrição renal, diminuição da taxa de filtração glomerular e retenção de água (SCHRIER; WANG, 2004).

É importante enfatizar que no choque séptico há uma ativação inapropriada do sistema simpático, o que leva ao aumento da concentração das catecolaminas circulantes (ANNANE *et al.*, 1999; DÜNSER; HASIBEDER, 2009). Por exemplo, em condições fisiológicas, os níveis de adrenalina correspondem a ordem de picograma por ml de sangue, enquanto que na sepse, esses níveis podem aumentar mil vezes. Com isso, a associação dos altos níveis circulantes de catecolaminas, aliada a diminuição da resposta sistêmica mais à manutenção da responsividade renal à elas, gera uma ação exacerbada do sistema simpático no rim, o que contribui para a IRA e a letalidade na sepse (WORTSMAN; FRANK; CRYER, 1984; JONES; ROMANO, 1989; SCHMIDT *et al.*, 2005).

Adicionalmente, em contraste com os demais órgãos, a NOS-2 é expressa constitutivamente nas células do túbulo renal e contribui para as mudanças hemodinâmicas e para a redução da filtração glomerular subsequentes durante o choque séptico. A excessiva produção de espécies reativas de nitrogênio induz ao estresse nitrosativo, resultando em disfunção do fluxo sanguíneo e da resposta arterial,

comprometimento da circulação sanguínea nos capilares e danos na função celular (ERGIN *et al.*, 2015).

1.2 ÓXIDO NÍTRICO

1.2.1 Biossíntese e bioquímica do Óxido Nítrico

O NO é uma molécula de estrutura simples, que possui um elétron desemparelhado e é reativo com radicais livres e metais de transição (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Com solubilidade máxima em água de cerca de 2 mM, o NO tende a se concentrar em membranas lipídicas e domínios hidrofóbicos de proteínas em sistemas biológicos (FUKUTO; CHO; SWITZER, 2000).

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

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

A regulação da atividade das NOS está relacionada com diferentes mecanismos pós-traducionais, incluindo dimerização da proteína, fosforilação de sítios da proteína e ligação de cofatores, além da biodisponibilidade de oxigênio molecular (O_2) e de L-arginina (AKTAN, 2004; FLEMING; BUSSE, 1999).

A NOS-1 e a NOS-3 têm sua atividade dependente da presença de cofatores (NADPH, FAD, FMN e BH_4) e necessitam da ligação cálcio-calmodulina para sua atividade catalítica, isto é, dependem de cálcio. A produção de NO pelas isoformas

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

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

neurodegenerativas (AKTAN, 2004; FÖRSTERMANN *et al.*, 1994; HECKER; CATTARUZZA; WAGNER, 1999).

O NO pode atuar em diversos alvos, dependendo da sua concentração e do seu local de produção. Seus efeitos podem ser classificados como diretos e indiretos. Os efeitos diretos envolvem a interação do NO com outros ligantes, como complexos metálicos, sendo o grupo heme o maior exemplo. Esta reação requer baixas concentrações de NO e sugere-se que seja responsável pelos efeitos fisiológicos deste composto. Efeitos indiretos decorrem da produção de compostos intermediários, geralmente derivados da interação de altas concentrações de NO com oxigênio e superóxido. Os efeitos indiretos são consequência do estresse nitrosativo e estresse oxidativo causados por estes compostos intermediários e são considerados responsáveis pelos efeitos patológicos do NO (FUKUTO; CHO; SWITZER, 2000; WINK; MITCHELL, 1998; WINK *et al.*, 2000).

O NO apresenta variações no número de elétrons nos orbitais atômicos, determinando a existência de diferentes formas redox como NO \cdot (radical monóxido de nitrogênio), o NO $^+$ (cátion nitrosônio) e o NO $^-$ (ânion nitroxil), com diferentes propriedades químicas e distintos alvos moleculares. Desta forma, o NO pode atuar através da ativação da guanilato ciclase solúvel (GCs), da interação com metalo-proteínas e com moléculas possuidoras de resíduos tióis e da ativação de canais de potássio dependentes de Ca $^{2+}$ (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992).

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

Por ser um radical livre e relativamente reativo, o NO pode reagir com outros radicais, formando espécies tão ou mais biologicamente ativas do que a molécula original. Assim, o NO pode reagir com o O $_2$ formando dióxido de nitrogênio (NO $_2$). Uma vez produzido, o NO $_2$ pode reagir com outra molécula de NO e produzir trióxido de

dinitrogênio (N_2O_3) ou com o próprio NO_2 , gerando tetróxido de dinitrogênio (N_2O_4) que, após dismutação, geram íons nitrito e nitrato. Tanto o N_2O_3 como o N_2O_4 são considerados potenciais doadores de nitrosônio (NO^+) e esta molécula pode ser transferida para uma variedade de nucleófilos presentes em biomoléculas, como hidroxilas, aminas ou tióis, levando à formação de nitrito, N-nitrosaminas e S-nitrosotióis, respectivamente (STAMLER; SINGEL; LOSCALZO, 1992; WINK *et al.*, 2000).

Ainda, NO pode reagir com o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), gerado pelas NADPH oxidases, formando o ânion peroxinitrito ($ONNO_2$). O peroxinitrito é rapidamente protonado, formando o ácido peroxinitroso ($HONNO_2$). Devido a sua instabilidade, o ácido peroxinitroso se decompõe e produz dióxido de nitrogênio e o radical hidroxila, capaz de iniciar a peroxidação de lipídeos, bem como o radical NO_2 , o qual pode promover nitração de resíduos de aminoácidos aromáticos, como tirosina e triptofano. O peroxinitrito, o ácido peroxinitroso e seus produtos de decomposição, participam do crescimento, migração, proliferação celular e rearranjo do citoesqueleto. Entretanto, essas espécies podem ser extremamente danosas às biomoléculas e estão associadas a danos teciduais (BECKMAN; KOPPENOL, 1996; PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007).

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

1.2.2 Óxido Nítrico e a sepse

As primeiras evidências da participação do NO na sepse vieram com a observação de níveis elevados de nitrato e nitrito em pacientes sépticos (EVANS *et al.*, 1993; OCHOA *et al.*, 1991) e que o uso de inibidores da NOS é capaz de atenuar sintomas desses pacientes. Vários trabalhos mostraram que os inibidores de NOS normalizam a queda da pressão arterial (KILBOURN *et al.*, 1990), aumentam a sobrevivência (WU *et al.*,

1995) e atenuam a falência de múltiplos órgãos na sepse experimental em ratos (WU, CHIN-CHEN; RUETTEN; THIEMERMANN, 1996). Isto é, há uma grande quantidade de dados implicando o NO como um mediador chave na disfunção cardiovascular durante a sepse e choque séptico (revisado por ASSREUY, 2006).

Sabe-se que a maioria do NO relevante na sepse é proveniente da NOS-2. Este fato é reforçado pela demonstração de que camundongos *knockout* para o gene da NOS-2 respondem melhor a vasoconstritores e apresentam menor mortalidade em modelos de sepse (KILBOURN; SZABÓ; TRABER, 1997). Entretanto, já foi observado que o NO derivado da NOS-3 induz a translocação nuclear de NF- κ B, demonstrando sua participação na patologia (SZABÓ, 1995). Ainda, o NO produzido pela NOS-1 atua como sinal de disparo no desenvolvimento da resposta inflamatória sistêmica (DUMA *et al.*, 2011). Em células musculares lisas, a atividade da NOS1 também induz a translocação de NF- κ B para o núcleo, levando a expressão da NOS2 e sugerindo sua participação na disfunção vascular da sepse (SCHESCHOWITSCH *et al.*, 2015).

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

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

Adicionalmente, o envolvimento das espécies reativas de nitrogênio, tais como os S-nitrosotióis, já foi observado no modelo de endotoxemia em ratos. A injeção de LPS causa um aumento nas concentrações de S-nitrosoalbumina e S-nitrosohemoglobina em

3 a 25 vezes acima dos animais controle, respectivamente (JOURD'HEUIL; GRAY; GRISHAM, 2000). Também, já foi demonstrado que o aumento da expressão de NOS-2 está associado com o aumento da nitrosilação de proteínas e que os S-nitrosotióis contribuem para a patogênese da sepse nos modelos de CLP e endotoxemia em ratos (FOSTER; MCMAHON; STAMLER, 2003; LIU *et al.*, 2004; MARSHALL; STAMLER, 2002).

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

1.3 REATIVIDADE VASCULAR NA SEPSE

A pressão sanguínea é determinada, principalmente, pelo tônus vascular, isto é, pela contratilidade das células do músculo liso da parede dos vasos, as quais são reguladas pela concentração intracelular de cálcio. A concentração de cálcio, por sua vez, pode ser regulada por alterações no potencial de repouso da membrana, induzindo a abertura de canais de cálcio voltagem-dependente e influxo de cálcio extracelular da célula muscular lisa ou por ativação de receptores específicos da membrana celular, como por exemplo, o receptor α_1 adrenérgico, receptor de angiotensina I (AT1) e receptor de endotelina I (revisado por GILCHRIST, 2007; TUCKER, *et al.*, 2021).

Uma vez ativados pelo estímulo contrátil, receptores α_1 adrenérgico, por exemplo, ativam os segundos mensageiros, inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG) que por sua vez, causam liberação de cálcio dos estoques intracelulares (OGUT; BROZOVICH, 2003). Na célula, o cálcio se liga à calmodulina, formando um complexo capaz de ativar a miosina de cadeia leve cinase (MLCK, do inglês, *Myosin Light Chain Kinase*), que é a enzima responsável pela fosforilação das cadeias leves de miosina (cadeias regulatórias). Assim, quando a cadeia regulatória é fosforilada, as cabeças de miosina

são capazes de se ligar repetitivamente aos filamentos de actina, promovendo a contração (HOROWITZ *et al.*, 1996).

Por outro lado, a ativação de receptores β_2 adrenérgicos, a inibição de fosfodiesterases e outros mecanismos, levam a uma diminuição do cálcio intracelular, reduzindo a fosforilação da cadeia leve de miosina (MLC) pela miosina fosfatase e, conseqüentemente, ao relaxamento da célula muscular lisa. Diversos vasodilatadores agem sobre os níveis de adenosina monofosfato cíclico (AMPc) e de GMPc, os quais ativam respectivamente a proteína cinase A (PKA) e a PKG. A PKA e a PKG fosforilam e inativam a MLCK, favorecendo a perda do tônus muscular (NAJAFI, *et al.*, 2016).

Além dos estímulos químicos, existe ainda um importante estímulo físico, o estresse de cisalhamento, que corresponde à força que o fluxo sanguíneo exerce sobre as células endoteliais e que gera a síntese e liberação de mediadores relaxantes vasculares (MATLUNG; BAKKER; VANBAVEL, 2009). Fisiologicamente, o endotélio relaxa a musculatura lisa vascular por meio de três mediadores principais: o NO (FURCHGOTT; ZAWADZKI, 1980; FURCHGOTT, 1993; MONCADA; HIGGS, 2006), a prostaciclina (MONCADA *et al.*, 1976) e o fator hiperpolarizante derivado do endotélio (FELETOU; VANHOUTTE, 1988). O NO encontra-se entre os mediadores locais liberados no ambiente onde a célula do músculo liso está inserida, sendo considerado um importante regulador fisiológico do relaxamento do músculo liso vascular e não vascular. No caso do músculo liso vascular, o relaxamento induzido por NO ocorre basicamente por dois mecanismos distintos: a) o NO pode abrir canais de potássio no músculo liso vascular, o que reduz o potencial de membrana, hiperpolariza a membrana da célula e fecha os canais de cálcio, assim reduzindo o cálcio intracelular e levando à vasodilatação; b) o NO pode interagir com a GCs, aumentando a produção de GMPc na célula e ativando a PKG (LUCAS *et al.*, 2000; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; BEAVO; BRUNTON, 2002).

Na sepse, o prejuízo na resposta vasoconstritora tem sido associado com a expressão da NOS-2 e acentuada produção de NO, em decorrência da ação do LPS (SZABÓ *et al.*, 1993). Em estudo do decurso temporal, a hiporreatividade às catecolaminas causada pelo LPS revelou duas fases distintas: a fase inicial (até uma hora após o LPS) e a fase tardia (pelo menos 5 horas após o LPS). Em ambas as fases

existe a participação do NO, sendo que na fase inicial o NO é liberado pelo endotélio e na fase tardia o NO é produzido em grande quantidade no músculo liso, resultante da expressão da NOS-2 (PAYA *et al.*, 1995).

Em modelos de endotoxemia, a administração de LPS em ratos anestesiados leva a redução da resposta contrátil à noradrenalina (JULOU-SCHAEFFER *et al.*, 1990), ao U46619 (STOCLET *et al.*, 1999), ao cloreto de potássio (UENO; LEE, 1993) e à fenilefrina (HO; KWAN; BOURREAU, 1996), entre outros agonistas. Ainda, as artérias mesentérica superior, renal, hepática e coronária são alguns exemplos de diferentes segmentos vasculares nos quais a expressão da NOS-2 e as modificações da reatividade estão associadas ao LPS e ao NO (PIEPOT *et al.*, 2002).

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

As evidências clínicas que confirmam a hiporreatividade vascular em pacientes sépticos mostram que apesar da terapia de reposição volêmica e dos níveis elevados de catecolaminas endógenas e exógenas e da máxima ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona, os pacientes ainda permaneciam hipotensos (BENEDICT; ROSE, 1992; UMANS *et al.*, 1993).

Já foi demonstrado pelo nosso grupo de pesquisa e por outros que a diminuição da resposta vascular a agentes vasoconstritores e da resposta cardíaca a agentes inotrópicos na sepse, está relacionada com a dessensibilização de receptores adrenérgicos, estando o NO um importante mediador dessa disfunção (revisado por FERNANDES e ASSREUY, 2008). Além disso, diversos trabalhos relatam o envolvimento da via do NO com a dessensibilização de receptores na sepse (RIOS-SANTOS *et al.*, 2007).

No que diz respeito a reatividade vascular no tecido renal, os mecanismos envolvidos na preservação da resposta vasoconstritoras ainda não foram elucidados, mas especula-se que as alterações de perfusão local incluem o excesso de citocinas inflamatórias, deficiências na vasodilatação mediada por NO, produção de espécies

reativas de oxigênio e dano no glicocálice e barreira endotelial (revisado por PEERAPORNATANA, et al., 2019). Outro aspecto a ser destacado, é que na vasculatura pulmonar ocorre uma hipertensão local, a despeito da queda generalizada da pressão arterial na sepse (ROJAS *et al.*, 2005).

1.4 PROTEÍNA G E RECEPTOR α 1 ADRENÉRGICO

As proteínas G são formadas por três subunidades α , β e γ e sua função é reconhecer os GPCRs ativados e transmitir a mensagem para os sistemas efetores que geram as respostas celulares. Quando não estimulada, a subunidade α possui uma guanosina difosfato (GDP) ligada, e a proteína G está inativa. Quando estimulada por um receptor ativado, isto é, pela ação de um agonista, a subunidade α libera seu GDP, permitindo que a guanosina trifosfato (GTP) se ligue no seu lugar. Essa troca causa a dissociação do trímero em dois componentes ativados – uma subunidade α -GTP e um complexo $\beta\gamma$. Estas são as formas ativas da proteína G, que se difundem na membrana e podem se associar a diversas enzimas e canais iônicos causando ativação do alvo. Dependendo do tipo de proteína G envolvida, a associação das subunidades α ou $\beta\gamma$ com enzimas-alvo ou canais pode causar a ativação ou inibição de determinada via sinalizadora. Os principais alvos das proteínas G, através dos quais os GPCRs controlam diferentes aspectos da função celular, são: adenililciclase, responsável por formar AMPc; fosfolipase C (PLC), responsável pela formação de IP₃ e DAG; canais iônicos, particularmente os canais de cálcio e de potássio; Rho A/Rhocinase, sistema que controla a atividade das muitas vias de sinalização responsáveis pelo crescimento e proliferação celular e da contração da musculatura lisa; e proteína cinase ativada por mitógenos (MAPK), sistema que controla várias funções celulares, incluindo a divisão celular (revisado por OLDHAM e HAMM, 2008).

Os receptores adrenérgicos pertencem a família dos receptores acoplados a proteína G (GPCRs, do inglês, *G Protein Coupled Receptors*). Os GPCRs consistem em uma única cadeia polipeptídica de até 1100 resíduos, cuja estrutura compreende sete α -hélices transmembrana com um domínio N-terminal extracelular de tamanho variável e

um domínio C-terminal intracelular, sendo que a terceira alça citoplasmática longa corresponde a região da molécula que se acopla a proteína G.

Os receptores adrenérgicos respondem pelas ações das catecolaminas, tais como a adrenalina e a noradrenalina, importantes mediadores do sistema nervoso simpático. Eles são classificados em α e β , os quais possuem subtipos, α_{1A} , α_{1B} , α_{1D} , α_{2A} , α_{2B} , α_{2C} e β_1 , β_2 , β_3 . Todos os subtipos de receptores β estimulam a adenilato ciclase, enquanto que os α_2 inibem a atividade da adenilato ciclase, ativam os canais de K^+ operados por receptores e inibem os canais de Ca^{2+} . Já os subtipos de receptores α_1 acoplam-se a diferentes sistemas efetores, sendo a via da PLC um importante efetor (GRAHAM, et al., 1996).

Os receptores α_1 adrenérgicos são encontrados, principalmente, na musculatura lisa vascular. Como resultado da ativação desses receptores, ocorre vasoconstrição e, conseqüentemente, aumento na pressão arterial. Entretanto, também são observados efeitos na contração do músculo liso do útero, contração do esfíncter da bexiga, inotropismo cardíaco, relaxamento da musculatura lisa gastrointestinal, secreção salivar e glicogenólise hepática. Em relação a localização dos subtipos de receptores α_1 observa-se que o RNAm do subtipo α_{1A} é encontrado, principalmente, no coração, cerebelo, córtex cerebral e próstata. Já para o subtipo α_{1B} , o predomínio ocorre no baço e rins, enquanto que o RNAm para o subtipo α_{1D} é encontrado em altas concentrações na aorta (revisado por COTECCHIA, 2010; AKINAGA, GARCÍA-SÁINZ e PUPO, 2019). O principal mecanismo de ativação dos receptores α_1 adrenérgicos está ilustrado na Figura 1.

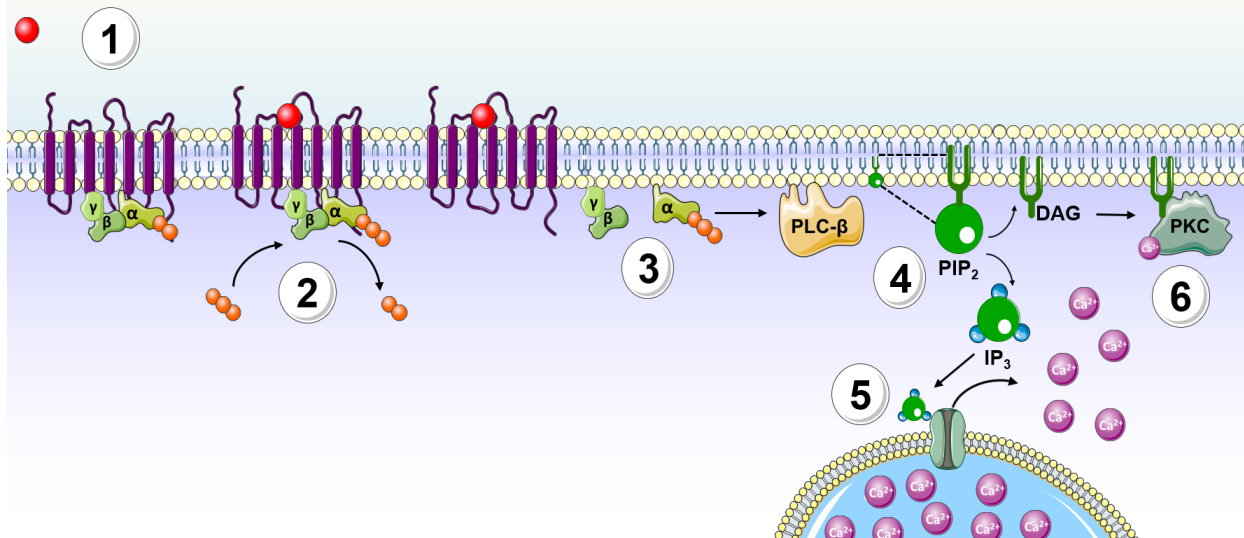


Figura 1. Mecanismo de sinalização dos receptores α_1 adrenérgicos. (1) No estado inativo, a proteína G fica ancorada à membrana plasmática através de resíduos de lipídeos. (2). A ocupação do receptor por um agonista promove a troca do GDP por GTP intracelular, causando o deslocamento do complexo α -GTP. (3) O complexo α -GTP interage com a proteína alvo, PLC, (4) que catalisa a hidrólise de fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PIP₂) em IP₃ e DAG. O IP₃ se difunde no citosol e se liga na membrana do retículo endoplasmático (5), causando a liberação de Ca²⁺ dos reservatórios e aumentando sua concentração no citosol. (6) Já o DAG é responsável por ativar a PKC, que é capaz de fosforilar diversos tipos de proteína. Fonte: a autora

É importante ressaltar que a densidade e a proporção de receptores adrenérgicos são importantes fatores na resposta da célula ou órgão às aminas simpatomiméticas. Além disso, a modulação da função desses receptores é necessária para a homeostase celular e, por isso, a célula possui mecanismos de regulação. Isto é, para atenuar ou cessar a transdução de sinal e proteger a célula da ação excessiva de agonistas, ocorre um processo de dessensibilização dos receptores. A dessensibilização dos GPCRs envolve os processos de fosforilação e internalização dos receptores (PALMER, BENOVIC e STILES, 1995; PAO e BENOVIC, 2002).

A sequência dos GPCRs inclui certos resíduos que podem ser fosforilados por cinases, como a PKA, PKC e cinases de GPCRs (GRKs) específicas ligadas a membrana. A fosforilação efetuada pela PKA e PKC geralmente resulta no bloqueio do acoplamento entre o receptor ativado e a proteína G com conseqüente redução do efeito

do agonista. Estas cinases não são seletivas, de modo que outros receptores, além daqueles para o agonista dessensibilizante, também são afetados. Esse efeito no qual um agonista pode dessensibilizar outros receptores é conhecido como dessensibilização heteróloga e, em geral, é pouco intenso e de curta duração. A fosforilação pelas GRKs é específica em maior ou menor grau para determinados receptores e afeta principalmente receptores no estado ativado, isto é, na presença do agonista. Neste caso, o processo é conhecido como dessensibilização homóloga e resulta na internalização do receptor (BENOVIC et al., 1987b; MAYOR et al., 1987; STRASSER et al., 1986).

1.5 CINASE DE RECEPTOR ACOPLADO A PROTEÍNA G (GRK)

As GRKs são proteínas multi-domínios que compõem uma família de sete isoformas (1 - 7). Com base na homologia das sequências, as GRKs são divididas em três subfamílias: as GRKs visuais, 1 e 7 (anteriormente ditas cinases de rodopsina), as GRKs 2 e 3 (anteriormente ditas cinases de receptores β adrenérgicos) e as GRKs 4, 5 e 6 (revisado por PENELA; RIBAS; MAYOR, 2003).

Todas as isoformas possuem uma organização estrutural semelhante (~60-80 kDa), com um domínio amino-terminal (~185 aminoácidos), um domínio catalítico (~270 aminoácidos) e um domínio carboxiterminal (~105 a 230 aminoácidos). A região amino-terminal é importante no reconhecimento do receptor e possui uma α -hélice (fundamental para a estabilidade proteica) e um domínio homólogo (RH) regulador da sinalização de proteína G, que se liga na subunidade $G\alpha$. O domínio catalítico é bilobular, caracterizado por um subdomínio amino-terminal enovelado com um subdomínio carboxiterminal e com um sítio de ligação de ATP numa fenda entre os dois. Por fim, a extremidade carboxiterminal é variável entre as isoformas e é determinante na localização subcelular e/ou translocação das GRKs para a membrana. A interação com a membrana pode ocorrer através de isoprenilação (nas GRK1 e GRK7), por palmitoilação (nas GRK4 e GRK6) ou diretamente pelo domínio de homologia de pleckstrina (PH) (nas GRK2 e GRK3) ou por sítios de aminoácidos carregados positivamente (na GRK5) (revisado por KOMOLOV; BENOVIĆ, 2018).

As isoformas também diferem em relação à sua localização no organismo. As GRKs 2, 3, 5 e 6 são encontradas ubiquamente em todos os tecidos, enquanto que a GRK1 é encontrada em bastonetes, na retina e glândula pineal, a GRK7 em cones e a GRK4 nos testículos, rim e cerebelo (revisado por PENELA; RIBAS; MAYOR, 2003).

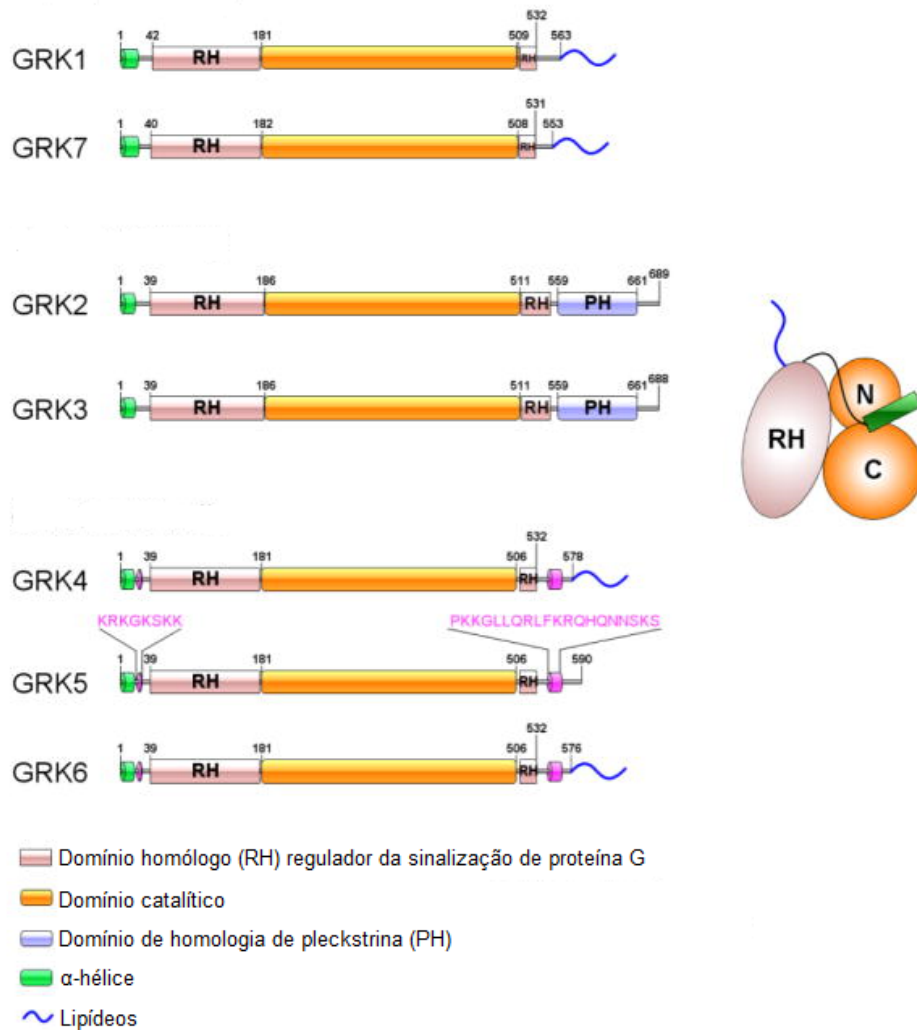


Figura 2. Estrutura geral das GRKs. As GRKs são divididas em três subfamílias: GRKs visuais (GRK1 e GRK7), GRKs β adrenérgicos (GRK2 e GRK3) e subfamília GRK4 (GRK4, GRK5 e GRK6). Cada isoforma é composta por uma região amino-terminal que contém uma α-helix e um domínio homólogo (RH) regulador da sinalização de proteína G, uma região catalítica e uma região carboxi-terminal variável entre as isoformas. Adaptado de KOMOLOV; BENOVIC, 2018.

1.5.1 Interação entre GRK e GPCR - Mecanismo de dessensibilização

A interação das GRKs com os GPCRs é fundamental para a regulação do estímulo no receptor e interfere na associação da proteína G com seus efetores de sinalização celular. Assim, as GRKs fosforilam especificamente a conformação ativa dos GPCRs e os resíduos fosforilados são diferentes daqueles que são alvos de outras cinases.

O mecanismo de dessensibilização do receptor é iniciado quando a região amino-terminal das GRKs interage com a subunidade α da proteína G. Nas GRK2 e GRK3 também ocorre a interação do domínio PH da região carboxiterminal com a subunidade $\beta\gamma$ livre, ancorando a cinase na membrana e facilitando a associação do seu sítio catalítico. Em seguida, ocorre a fosforilação nos resíduos de serina e treonina localizados nos *loops* intracelulares ou na cauda carboxiterminal do receptor. O receptor fosforilado expõe um sítio com alta afinidade para arrestinas, proteínas intracelulares que bloqueiam estericamente a interação das proteínas G e direcionam o receptor para a internalização, produzindo uma dessensibilização mais profunda e de maior duração que outras cinases (KOMOLOV; BENOVIC, 2018; MOORE; MILANO; BENOVIC, 2007; REITER; LEFKOWITZ, 2006).

A arrestina recruta proteínas chamadas clatrininas que, juntamente com seu complexo adaptador AP2, medeiam a internalização do receptor em pequenas vesículas endocíticas. Além de promover a internalização e a regulação negativa (*down regulation*) do receptor, a arrestina também participa da ativação de diferentes vias de sinalização, como da MAPK, c-Src, JNK-3, PDE4, componentes da via do NF- κ B e outras. Uma vez internalizado, o receptor pode ser defosforilado e reinserido na membrana plasmática (ressensibilização) ou encaminhado para os lisossomos, onde é degradado (inativação)

(EICHEL; JULLIÉ; VON ZASTROW, 2016; PENELA et al., 2010). Esse mecanismo está ilustrado na Figura 3.

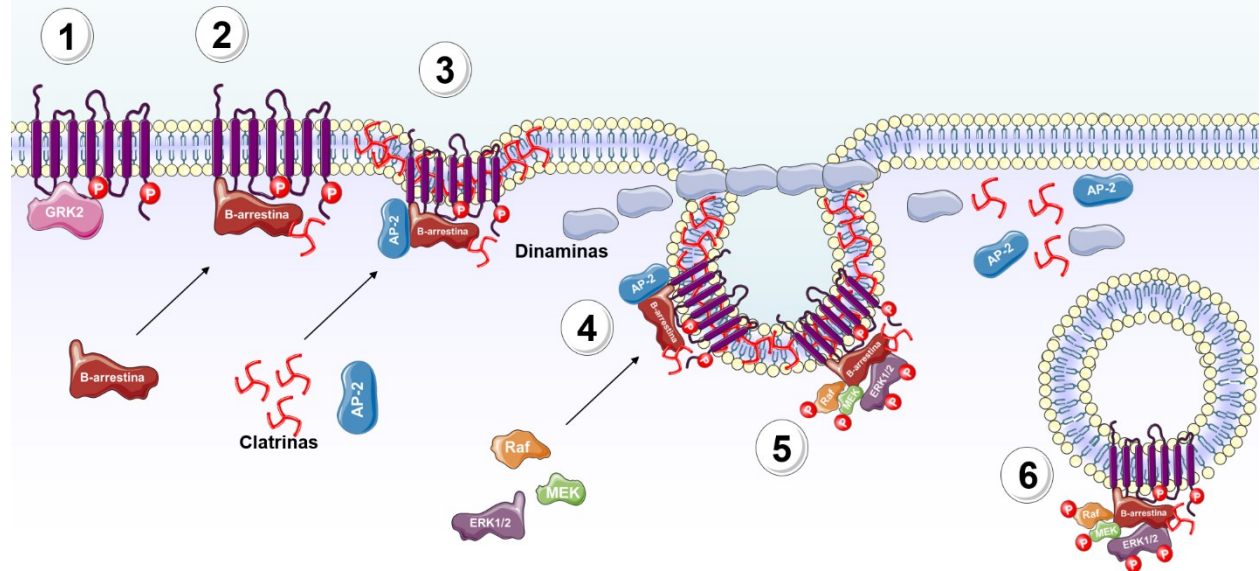


Figura 3. Mecanismo de dessensibilização de GPCR através da GRK. Uma vez ativados (1), os receptores GPCR sofrem fosforilação pela GRK (2) sinalizando para a ligação da arrestina. A ligação da arrestina (3) ao receptor fosforilado impede sua interação com a proteína G e promove sua internalização por vesículas recobertas por clatrina e seu complexo adaptador (AP-2)(4). Dinaminas realizam a fissão da membrana celular formando endossomos. (5). Por fim, os receptores podem ser degradados pelos lisossomos ou reinsertados na membrana plasmática (6). Fonte: a autora

1.5.2 Interação da GRK com proteínas não GPCR

Além da clássica atuação na dessensibilização de receptores, sabe-se que as GRKs podem interagir com diversas outras proteínas. Embora nem todos os mecanismos estejam completamente elucidados, as GRKs podem participar da ativação de outras vias e que também podem ter sua ação controlada dependendo da associação (PENELA; RIBAS; MAYOR, 2003).

Dados da literatura mostram que as GRKs são inibidas quando interagem com proteínas sensíveis ao cálcio, como a calmodulina (SALLESE et al., 2000). Por exemplo, a interação da GRK2 ou GRK3 com a calmodulina ocorre devido a resíduos presentes nas regiões amino e carboxiterminal das cinases e resulta na diminuição da sua atividade catalítica. Na GRK5, a ligação da calmodulina impede a associação da cinase na membrana, promovendo uma autofosforilação regulatória diferente daquela produzida por lipídeos e impedindo sua ação no GPCR (IACOVELLI et al., 1999; PENN; PRONIN; BENOVIC, 2000; SALLESE et al., 2000).

Já foi demonstrado que as GRKs também tem sua ação diminuída quando há associação com caveolinas na membrana microssomal. Ainda não se sabe qual o significado funcional dessa associação, porém há diminuição da fosforilação dos receptores alvos das GRKs presentes nos microdomínios de membrana. Adicionalmente, sabe-se que a atividade catalítica das GRKs é completamente inibida pela interação com α -actinina e embora o sítio de interação ainda tenha sido descrito, acredita-se que ocorre entre resíduos preservados em todas as isoformas (PENELA; RIBAS; MAYOR, 2003).

Outra interação importante a ser destacada é entre as GRKs e o 4,5 bisfosfato de fosfatidil-inositol (PIP₂). A ligação com o PIP₂ na membrana aproxima a GRK do seu GPCR alvo e aumenta a fosforilação do receptor. Ainda, nas GRK2 e GRK3 pode ocorrer uma ligação simultânea entre o domínio PH das cinases com PIP₂ e com a subunidade G $\beta\gamma$ favorecendo ainda mais a ação no receptor (DEBBURMAN et al., 1996).

A atividade das GRKs também é aumentada quando há interação direta com clatrin, aumentando a internalização de GPCRs. Experimentos *in vitro* mostram que os resíduos 498-502 no domínio carboxiterminal da GRK2 ligam-se no domínio amino-terminal das clatrin de cadeia pesada, semelhante a ligação das β -arrestinas nas clatrin. Essa ligação promove uma internalização do complexo GRK2/receptor β_1 adrenérgico e é independente de β -arrestinas (SHIINA et al., 2001).

1.5.3 Mecanismos de regulação das GRKs

No contexto de regulação das GRKs, sabe-se que o principal fator regulador é a interação com GPCRs. O controle da expressão e diferentes modificações pós-traducionais, tais como a fosforilação, nitrosilação e ubiquitinação, participam na modulação da atividade, translocação e níveis de GRKs.

Na literatura, os trabalhos que envolvem os mecanismos moleculares de controle da expressão de GRKs ainda são escassos. O que se sabe é que os níveis de RNAm de GRKs são mantidos por genes de manutenção, mas as particularidades de cada isoforma, tecido e em patologias ainda não são totalmente elucidadas (RAMOS-RUIZ et al., 2000).

Já foi evidenciado que a expressão de GRK2 está correlacionada com os níveis circulantes de catecolaminas e a ativação de receptores β adrenérgicos, pois a infusão crônica com agonistas ou antagonistas leva ao aumento ou diminuição da quantidade de RNAm e proteína de GRK2 no coração, respectivamente (IACCARINO et al., 1998). Em células de músculo liso de aorta, a atividade transcricional do gene promotor de GRK2 aumenta em situações fisiológicas de vasoconstrição ou hipertrofia. Entretanto, quando há inflamação o oposto é observado, isto é, ocorre diminuição na expressão de GRK2, indicando que a transcrição da cinase em células vasculares é controlada por diferentes vias de sinalização e que este balanço pode ser alterado em condições patológicas. Ademais, o aumento da transcrição de GRK2 em células do músculo liso de aorta por agentes que promovem vasoconstrição e hipertrofia, tais como ésteres de forbol (RAMOS-RUIZ et al., 2000).

Além dos efeitos de fosforilação e dessensibilização nos GPCRs, a proteína cinase A (PKA) e a proteína cinase C (PKC) podem fosforilar as GRKs. Experimentos *in vitro* demonstraram que a GRK2 pode ser fosforilada pela PKA e pela PKC, resultando no aumento da fosforilação e conseqüente internalização do receptor. Além disso, os dados mostram que a fosforilação pela PKC promove um aumento da translocação das GRK2 para a membrana, enquanto que a PKA aumenta a interação da GRK2 com a subunidade $G\beta\gamma$, favorecendo a ação no receptor ativo. Entretanto, na GRK5 a fosforilação pela PKC ocorre em um sítio inibitório e também atua intensificando o

bloqueio causado pela calmodulina (autofosforilação inibitória). Assim, a modulação dependente de PKA e PKC pode variar de acordo com a isoforma de GRK e sua distribuição celular (CONG et al., 2001; KRASEL et al., 2001; PRONIN et al., 1997; PRONIN; CARMAN; BENOVIC, 1998).

Evidências revelam que a ativação de GPCRs leva a modulação das GRKs através da ativação de tirosinas cinases, como c-Src e da cascata MAPK (Raf-1, MEK1 e ERK). A fosforilação da GRK2 pela c-Src em resíduos de tirosina no domínio amino-terminal favorece a interação da cinase com a subunidade G α q e potencializa a ação no receptor adrenérgico β 2 em curto prazo. Contudo, a longo prazo a tirosina fosforilada promove a degradação proteolítica da GRK2. Já a proteína ERK1 é capaz de fosforilar a Ser670 da GRK2, prejudicando a ligação GRK2-G $\beta\gamma$ e inibindo a translocação e atividade catalítica da cinase. Da mesma forma, a interação da GRK2 com proteínas inibitórias da cinase Raf (RKIP; do inglês, *Raf kinase inhibitory protein*) resulta na diminuição da habilidade de fosforilação do receptor (ELORZA et al., 2003; PENELA et al., 2001; PENELA; RIBAS; MAYOR, 2003).

Ademais, o óxido nítrico (NO) e/ou S-nitrosotióis (RSNOs) causam a inibição da atividade da GRK2. Neste caso, o resíduo Cis340 da GRK2 é S-nitrosilado, inibindo a fosforilação do receptor, o recrutamento da β -arrestina e a internalização do receptor (WHALEN et al., 2007).

As GRKs são proteínas de vida curta (meia vida de \sim 1h), que sofrem ubiquitinação e são degradadas por proteassoma. Entretanto, acredita-se que o processo de degradação seja dependente da atividade de outras cinases, pois uma mutante GRK2 inativa (GRK2-K220R) apresenta retardo na sua degradação. Nesse sentido, experimentos com superexpressão de β -arrestinas revelam aumento no *turnover* de GRK2-K220R, indicando que as β -arrestinas participam no processo de degradação das GRKs. Além disso, os estudos sugerem que a β -arrestina atua como uma proteína de ancoragem, facilitando a ativação de diversas vias de sinalização, como a da c-Src e MAPK e também pode recrutar ligases, como Mdm2 e ubiquitina ligase E3. Dessa forma, a ancoragem da arrestina permite que os resíduos de tirosina da GRK2 sejam fosforilados através da c-Src ou MAPK, sinalizando para ubiquitinação pelas

ligases e degradação por proteassoma (revisado por PENELA et al., 2001; ELORZA et al., 2003; PENELA et al., 2019).

A degradação das GRKs também é mediada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). Em modelos experimentais de inflamação, onde linfócitos T foram expostos ao estresse oxidativo, foi observada uma diminuição no conteúdo de GRK2. Interessantemente, a degradação de GRK2 induzida pela produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi prevenida através inibição da atividade de calpaínas, mas não de proteassoma, sugerindo que as calpaínas também desempenham um papel importante na degradação da GRK2. Experimentos *in vitro* mostram que a proteólise da GRK2 via m-calpaína é dependente de cálcio e está associada com uma redução de aproximadamente 70% na internalização do receptor β₂ adrenérgico (LOMBARDI et al., 2002; SALCEDO; MAYOR; PENELA, 2006).

Outra interação proteína-proteína a ser destacada neste contexto, é a das GRKs com a chaperona Hsp90. LUO e BENOVIĆ (LUO; BENOVIĆ, 2003), revelaram que a ligação da Hsp90 com GRK2, GRK3, GRK5 e GRK6 é importante para a maturação e estabilidade das cinases em células epiteliais. Os dados sugerem que a inibição da Hsp90 leva ao aumento da degradação das GRKs por proteassoma, reduzindo os níveis da cinase de uma maneira dose e tempo dependente.

1.5.4 GRK2

Desde que foi descoberta na década de 80, a GRK2 tem sido amplamente estudada. A GRK2 é distribuída ubiquamente no organismo e o papel que ela desempenha na modulação de GPCRs sugere que mudanças em sua atividade e/ou compartimentalização interferem diretamente na homeostase celular. Ademais, a GRK2 é uma das principais isoformas no sistema cardiovascular e entre os seus alvos estão os receptores adrenérgicos e os receptores AT₁ (revisado por SATO et al., 2015).

No tecido cardíaco, as GRK2, GRK3 e GRK5 são as principais isoformas, porém sabe-se que há diferença na localização das isoformas. Análises imunohistoquímicas de corações de ratos mostram alta expressão de GRK2 em células cardíacas não miocitárias, enquanto que a GRK3 é predominante em cardiomiócitos. Já a GRK5 é

igualmente distribuída entre os tipos de células cardíacas. Assim, a distribuição das isoformas reflete no envolvimento de diferentes patologias cardíacas (PENELA et al., 2006). Camundongos heterozigotos para GRK2 (GRK2^{+/-}) apresentam alterações da função cardíaca, com aumento da resposta contrátil miocárdica às catecolaminas por intermédio de receptores β adrenérgicos (ROCKMAN et al., 1998). Além disso, existem evidências demonstrando que camundongos transgênicos com alta expressão de GRK2 apresentam hiporresponsividade aos receptores beta adrenérgicos vasculares, contribuindo para o quadro de hipertensão (ECKHART et al., 2002). A atividade e expressão da GRK2 é significativamente aumentada em indivíduos hipertensos em comparação com normotensos (GROS et al., 1997).

A GRK2 também já foi reportada na modulação de receptores AT1 e a alta expressão de GRK2 ocorre em pacientes com hipertensão (TUTUNEA-FATAN et al., 2015). Além disso, o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio mediado por AT1 e renina foi observado em animais *knockdown* para GRK2, resultando em dano glomerular (TUTUNEA-FATAN et al., 2018).

Em modelos animais de resistência à insulina, a GRK2 foi identificada como importante regulador negativo da captação de glicose via fosforilação do substrato do receptor de insulina 1 (IRS1). Assim, animais *knockout* para GRK2 apresentam melhora no transporte de glicose e tolerância à insulina na obesidade (GARCIA-GUERRA et al., 2010; MAYOR et al., 2011). Além da melhora na sensibilidade à insulina, a inibição da GRK2 reduz a disfunção endotelial em camundongos diabéticos. Sabe-se que a GRK2 interage diretamente com a AKT e prejudica a produção de NO em células endoteliais. Assim, a inibição da GRK2 aumenta a fosforilação da AKT e melhora a função do endotélio (TAGUCHI et al., 2012, TAGUCHI et al., 2014; TAGUCHI et al., 2017).

Na sepse, já foi demonstrado que há um aumento nos níveis de GRK2 e GRK5 em neutrófilos, o que se correlaciona com a dessensibilização de receptores quimiotáticos CXCR1 e CXCR2 e consequente falência na migração de neutrófilos para o foco infeccioso (ARRAES et al., 2006). Em um trabalho recente publicado por HU e colaboradores (2019), foi demonstrado que a ativação dos receptores do tipo *Toll 4* (TLR4) pelo LPS na sepse, leva a fosforilação da Ser670 da GRK2 via cinases ativadas por mitógenos p38. Como resultado, a translocação da GRK2 para a membrana é inibida

e a internalização do receptor quimiotático CCR2 é suprimida, permitindo a migração das células supressoras de origem mielóide.

Em camundongos sépticos, a resposta à noradrenalina na aorta foi restaurada quando a GRK2 foi inibida (KANDASAMY et al., 2016). Em concordância, dados nosso laboratório revelam que a hiporreatividade às catecolaminas está associada com um aumento no conteúdo e na atividade de GRK2, culminando na diminuição na densidade de receptores β_1 adrenérgicos no coração de camundongos sépticos (DAL-SECCO et al., 2017).

No trabalho realizado por PAULA-NETO (2011), foi sugerido que há um aumento dos níveis de GRK2 em neutrófilos por um mecanismo dependente de guanilato ciclase solúvel (sGC)/cGMP/PKG, sendo o NO proveniente da NOS2. Os resultados mostram a ativação dos receptores do tipo *Toll 2/4* leva ao aumento na quantidade de GRK2 e, conseqüentemente, há um aumento na internalização dos receptores quimiotáticos em neutrófilos humanos. De maneira semelhante, dados do nosso grupo demonstram que a inibição da via sGC/cGMP/PKG é capaz de prevenir o aumento de GRK2 no tecido cardíaco de animais sépticos e restaura a resposta adrenérgica (DAL-SECCO et al., 2017).

1.6 HIPÓTESE DO TRABALHO

Na sepse, a disfunção cardiovascular é caracterizada por hipotensão, diminuição da resistência vascular e hiporreatividade a agentes vasoconstritores, sendo o NO o principal mediador desta disfunção. Contudo, o leito renal tem sua capacidade contrátil preservada ou até mesmo aumentada, o que resulta em uma resposta excessiva à catecolaminas e isto está associado com a IRA associada a sepse.

Os dados prévios do laboratório revelam que a hiporreatividade vascular e cardíaca estão relacionadas com um aumento nos níveis de GRK2, culminando na diminuição na densidade de receptores α_1 e β_1 adrenérgicos na aorta e no coração, respectivamente, de camundongos sépticos. Ademais, foi demonstrado que a inibição da via do NO (proveniente da NOS2) é capaz de reverter esse quadro e restaurar a resposta adrenérgica.

Com base no exposto, a hipótese deste trabalho é que há uma regulação negativa da GRK2 no rim, o que acarreta na preservação da densidade de receptores α_1 adrenérgicos, contribuindo para vasoconstrição renal e prejuízo da função do órgão, por um mecanismo dependente de NO.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação da via NO-GRK2-receptor α_1 adrenérgico no rim de animais com sepse.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a pressão sanguínea e a resposta vascular à agentes constritores em camundongos com sepse;
- b) Avaliar o fluxo sanguíneo renal de camundongos com sepse;
- c) Investigar a função renal de camundongos com sepse, através dos marcadores plasmáticos creatinina e ureia e do fluxo sanguíneo renal;
- d) Determinar a densidade do receptor α_1 adrenérgico renal em camundongos com sepse;
- e) Determinar os níveis de GRK2 renal em camundongos com sepse;
- f) Avaliar a expressão da NOS2 e a produção de NO no rim de camundongos com sepse;
- g) Investigar a modulação da GRK2 pelo NO no rim de camundongos com sepse.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 35 e 40 g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Camundongos C57BL/6 NOS-2 *knockout* fêmeas, pesando entre 30 e 35 g, foram gentilmente doados pelo Dr. Fernando de Queiroz Cunha (Departamento de Farmacologia, Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os animais foram mantidos em mini isoladores (Alesco, Monte Mor, São Paulo, Brasil), cinco animais por caixa, com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo de luz claro/escuro (12/12h) e com livre acesso à ração e água. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC) sob o protocolo 8443190617 e seguiram as Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

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

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

3.3 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA E DO FLUXO SANGUÍNEO

Os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina (90 e 15 mg/kg, respectivamente; i.p.) e posicionados em decúbito dorsal em uma manta de aquecimento (37°C). A veia femoral esquerda foi dissecada e nela foi inserido uma cânula de polietileno (PE 10) heparinizada para a administração de fármacos. Em seguida, a artéria carótida esquerda foi exposta, isolada e nela foi inserido um catéter (24G) heparinizado acoplado a um transdutor de pressão (Mikro-Tip, Millar Instruments Inc., Houston TX, EUA).

Após 10 min para estabilização, os animais receberam três doses consecutivas de fenilefrina (2, 6 e 20 nmol/Kg), diluída em 20 uL de PBS, para avaliar a reatividade vascular. A pressão arterial média (PAM) foi registrada através do sistema de aquisição Powerlab 8/30 e do software de integração Chart versão 7 (ambos da AD Instruments Pty Ltd., Castle Hill, Austrália) e os valores obtidos foram expressos em relação a linha basal registrada (em mmHg).

O fluxo sanguíneo foi determinado no rim e na veia caudal através do sistema Laser Doppler moorVMS-LDF (Moor Instruments, Axminster, Reino Unido), utilizando as sondas VP1T e VP4s, respectivamente. O rim esquerdo foi exposto por uma incisão (1,5 cm) na região retroperitoneal superior, o líquido peritoneal e o sangue foram secos com um *swab* e a sonda VP1T foi cuidadosamente posicionada no meio do rim. A sonda VP4s foi colocada sobre a veia caudal, 2 cm acima da extremidade da cauda. Na veia femoral, foi inserido um cateter PE 10 heparinizado para infusão de fármacos, acoplado a uma bomba de infusão (Insight, São Paulo, SP, Brasil). Os animais receberam uma infusão de fenilefrina (40 nmol/kg/min; 50 µL/min) por 5 minutos e o fluxo sanguíneo foi registrado simultaneamente no rim e na veia caudal por 15 minutos. Os resultados foram obtidos em intervalos de 30 s e expressos como unidades arbitrárias (U.A.).

3.4 DETERMINAÇÃO DOS PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO PELA SONDA DAF-FM

A concentração de NO foi determinada de maneira direta através da sonda fluorescente DAF-FM DA (diacetato de 4- amino-5-metilamino-2',7'-difluorofluoresceína;

Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). As amostras de rim foram obtidas após 24 h a cirurgia de CLP e os órgãos foram rapidamente incluídos em blocos de Tissue-Tek O.C.T (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, EUA) e congelados a -80°C. Em seguida, foram obtidos cortes transversais de 7 µm com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850 UV; Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha). As seções foram colocadas em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e mantidas em solução de Hanks, por 30 min, em temperatura ambiente para estabilização. Os cortes foram incubados com DAF-FM DA (10 µM; em Hanks) por 1 h, lavados com solução de Hanks e lamínulas foram colocadas sobre as lâminas, utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Como controle negativo, foram usados cortes préincubados com o inibidor não seletivo para NOS, L-NIO (100 µM; por 1h; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Para a leitura, foi utilizado o microscópio de fluorescência (Leica DMI3000B®) e as imagens foram capturadas através do software LAS AF Lite® (ambos da empresa Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Alemanha). Foram realizados pelo menos três cortes de cada tecido e adquiridas imagens de três regiões diferentes em cada seção. A intensidade de fluorescência foi quantificada usando o software ImageJ® (versão 1.36b; NIH; Bethesda, MD, EUA) e os valores foram expressos como unidades arbitrárias (U.A.).

3.5 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE NITRATO E NITRITO (NO_x)

A concentração de NO foi determinada, indiretamente, através da mensuração de nitrito e nitrato (NO_x) no plasma, conforme a metodologia descrita por Granger e colaboradores (1990). As amostras de plasma foram diluídas em água destilada (1:1) e desproteinizadas pela adição de sulfato de zinco 20% (1 h; em banho de gelo). As amostras foram centrifugadas a 4°C, por 20 min, a 1000 g e o sobrenadante foi coletado. Em seguida, o nitrato foi reduzido a nitrito, através da enzima nitrato redutase, expressa em *Escherichia coli* quando cultivada em meio anaeróbico. Para isso, as amostras foram incubadas com alíquotas da bactéria, a 37°C, durante 3 h. Então, as amostras foram centrifugadas (150 g; 20 min) e o sobrenadante foi misturado com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida em 10% de ácido fosfórico/0,1% de α-naftil-etilenodiamina em água

destilada), na proporção de 1:1. Finalmente, a mistura foi transferida para uma placa de 96 poços e foi realizada a leitura da absorbância em leitor de placas modelo Infinite M200 (Tecan Group Ltd, Männedorf, Suíça), na faixa de 540 nm. Simultaneamente, foram feitas curvas padrão de nitrato e nitrito (0 a 150 μ M). Nestas condições experimentais, a conversão de nitrato para nitrito foi maior que 90% e, portanto, não foi realizada nenhuma correção dos resultados. Os valores plasmáticos foram calculados por meio de regressão linear e expressos como μ M de NOx.

3.6 DOSAGEM PLASMÁTICA DE CREATININA E UREIA

As dosagens plasmáticas de creatinina e ureia foram realizadas de acordo com as instruções do fabricante, através de kits comercialmente disponíveis (Labtest, Lagoa Santa, MG, Brasil). As leituras foram feitas em placas de 96 poços e as absorbâncias foram registradas através de um leitor de placas modelo Infinite M200 (TecanGroupLtd, Männedorf, Suíça), em 510 nm para creatinina e 600 nm para ureia. Os valores foram calculados com base em um fator de calibração e expressos em mg/dL.

3.7 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), via i.p., e perfundidos com solução salina 0,9% (10 min) e com solução de formaldeído tamponado (PFA 4% em PBS, 5 min), via transcardíaca. Em seguida, o rim foi coletado, fixado em PFA 4% e encaminhado para a inclusão em parafina, preparo de lâminas e coloração com hematoxilina e eosina. Alterações histopatológicas foram gentilmente avaliadas pelo Dr. Osmar Damasceno Ribeiro (Departamento de Patologia, Universidade do Oeste de Santa Catarina – Joaçaba, SC, Brasil).

3.8 ENSAIO DE LIGAÇÃO DE RECEPTOR α_1 ADRENÉRGICO

Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (15 mg/Kg), via i.p., e perfundidos com solução salina 0,9% (10 min) e com solução de formaldeído

tamponado (PFA 4% em PBS, 5 min), via transcardíaca. Amostras de rim e coração foram coletadas e fixadas em PFA 4% em PBS (24 h; a temperatura ambiente) e depois imersos em solução crioprotetora de sacarose 30% (em PBS; por 24 h a 4°C). Em seguida, os órgãos foram incluídos em blocos de Tissue-Tek O.C.T. (Sakura Finetek Inc., Torrance, CA, EUA) e congelados a -80°C. Secções transversais, com espessura de 5 µm, foram obtidas com o auxílio de um criostato (Leica CM 1850 UV; Leica Biosystems, Wetzlar, Alemanha), colocadas em lâminas tratadas com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e fixadas com acetona a -20°C, por 5 min. As secções foram imersas em uma solução de metanol com peróxido de hidrogênio 3% por 20 min, a temperatura ambiente e lavadas com PBS. Os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e incubados com um antagonista α_1 adrenérgico fluorescente, BODIPY® FL prazosina (QAPB; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), 250 nM, por 1 h, e com DAPI (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), por 5 min, a temperatura ambiente. Como um controle de seletividade do QAPB, nas secções dos animais controles, foi utilizado o antagonista α_1 adrenérgico não fluorescente, hidrocloreto de prazosina (PNF; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Para isso, após estabelecido o equilíbrio da ligação do QAPB (1 h, a temperatura ambiente), as secções controle foram incubadas com PNF (250 µM, 1 h, a temperatura ambiente). Finalmente, todas as secções foram lavadas com PBS e lamínulas foram colocadas sobre as lâminas, utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Para a leitura, foi utilizado o microscópio confocal de fluorescência (Leica DMI6000B®) e as imagens foram capturadas através do software LAS AF Lite® (ambos da empresa Leica Microsystems, Wetzlar, HE, Alemanha). Lâminas controle foram utilizadas para configurar os parâmetros de aquisição de imagens no software. Foram realizados pelo menos três cortes de cada tecido e adquiridas imagens de três regiões diferentes em cada seção. A intensidade de fluorescência foi quantificada usando o software ImageJ® (versão 1.36b; NIH; Bethesda, MD, EUA) e os valores foram expressos como unidades arbitrárias (U.A.).

3.9 WESTERN BLOT

Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg), i.p. e perfundidos com solução salina 0,9% (10 min). Amostras de rim e coração foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

Para o preparo das amostras, os tecidos congelados em nitrogênio líquido foram pulverizados, homogenizados em tampão de lise [coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), ortovanadato 100 mM, fluoreto de fenil-metanosulfonil (PMSF) 100 mM em T-Per (*Tissue protein Extraction Reagent*; ThermoScientific, Rockford, IL, EUA)], por 1 h, a 4°C, e sonicados (60 Watts, 5 seg). Os homogenatos foram centrifugados a 10.000 g, por 20 min, a 4°C e o sobrenadante foi obtido. Em seguida, foi separada uma alíquota do sobrenadante para dosagem de proteínas e o restante foi misturado com tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas por 8 min e armazenadas a -20°C até o momento da eletroforese. A concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando uma curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) para interpolação dos resultados.

Para separação de proteínas, as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE). Foi utilizado um gel de entrada de 5% e um gel de separação de 10%. As amostras (60 µg/poço) e o padrão de peso molecular (Precision Plus Protein™ Standards, Kaleidoscope™, Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA) foram aplicados nos géis e a eletroforese foi realizada em cuba específica, contendo tampão de corrida, com voltagem fixa de 90 V, por aproximadamente 2:30 h. Após a eletroforese, as proteínas presentes no gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45 µm). A transferência de proteínas foi realizada em um aparato de eletrotransferência contendo tampão de transferência, no sentido do polo negativo para o polo positivo, com uma voltagem fixa de 100 V, durante 1 h, a 4°C. Em seguida, as membranas foram coradas com vermelho de Ponceau 0,2% (v/v) em ácido tricloroacético 3% (v/v) para visualização das proteínas e para controle de carregamento. Para retirada do excesso do corante, as membranas foram lavadas três vezes (5 min), sob agitação, com TBS-T (Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM, contendo 0,05%

(v/v) de Tween 20, pH 7,5). Então, as possíveis ligações inespecíficas foram bloqueadas com leite desnatado 5% em TBS-T, durante 1 h, a temperatura ambiente e sob agitação. As membranas foram incubadas por 18 h, a 4 °C, com os anticorpos primários específicos: monoclonal camundongo anti-GRK2 (1:500), monoclonal camundongo anti- β -actina (1:45000; ambos da Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA), monoclonal coelho anti β -arrestina (1:1000; Cell Signaling Tech, Danvers, MA, EUA) e monoclonal camundongo anti-NOS2 (1:1000; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Depois, foram realizadas três lavagens (5 min), sob agitação, com TBS-T e os anticorpos secundários conjugados à peroxidase, específicos para cada anticorpo primário, foram incubados (cabra anti-coelho ou cavalo anti-camundongo; ambos usados na concentração de 1:5000; Cell Signalling Tech, Danvers, MA, EUA).

Novamente, foram realizadas lavagens e os imunocomplexos foram revelados usando um sistema de detecção de substrato quimioluminescente, Super Signal West Pico (Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA). As membranas foram expostas ao sistema de fotodocumentação ChemiDoc MP e as análises foram realizadas utilizando o software Image Lab™ (ambos da empresa Bio-Rad Laboratories Inc, Hercules, CA, EUA). Os resultados foram determinados através da quantificação da densidade óptica das bandas, normalizados utilizando os valores obtidos para as bandas de β -actina e expressos graficamente como unidades arbitrárias (U.A.).

3.10 EXTRAÇÃO DE RNA E REÇÃO EM CADEIA POLIMERASE QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (RT – qPCR)

Os animais foram anestesiados com cetamina (90 mg/Kg) e xilazina (5 mg/Kg), i.p. e perfundidos com solução salina 0,9% (10 min). Amostras de rim e coração foram coletadas, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C.

O RNA foi extraído utilizando o kit ReliaPrep® (Promega, Madison, WI, EUA) para o tecido renal e com reagente TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) para o tecido cardíaco, seguindo as recomendações do fabricante. A fim de eliminar qualquer DNA contaminante durante o processo de extração de RNA, as amostras de RNA (700 ng para rim e 1000 ng para coração) foram submetidas a tratamento com DNase I

proveniente do próprio kit de extração utilizado. As amostras obtidas tiveram sua concentração e pureza avaliadas em um espectrofotômetro, NanoDrop® ND-1000 (ThermoScientific, Rockford, IL, EUA), através das relações de absorbância 260/280 nm e 260/230 nm.

Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de transcrição reversa. O procedimento foi realizado com o kit High-Capacity cDNA (Applied Biosystems Waltham, MA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A reação ocorreu a 25 °C por 10 minutos, 37 °C por 120 minutos e 85 °C por 5 minutos em termociclador. O DNA complementar (cDNA) obtido foi armazenado a -20 °C.

Depois, o cDNA foi diluído dez vezes em água ultrapura livre de nucleases para utilização como molde na qPCR. Foi utilizado o reagente GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, EUA), na presença de 0,3 µM dos iniciadores específicos para GRK2 e Gapdh, conforme demonstrados na Tabela 2.

TABELA 2. INICIADORES PARA AMPLIFICAÇÃO DOS GENES *GRK2* E *GAPDH*

Iniciadores	Sequência
<i>GRK2</i>	<i>forward</i> 5' TGCCAGAGCCCAGCATC 3' <i>reverse</i> 5' GGAAAAGCAGGTACCCTAAC 3'
<i>Gapdh</i>	<i>forward</i> 5' CATCACTGCCACCCAGAAGACTG 3' <i>reverse</i> 5' ATCGGAGTGAGCTTCCCGTTTCAG 3'

As amostras foram colocadas em placa de 96 poços A-B-C (Axygen, Union City, CA, EUA) coberta com selante óptico MicroAmp® Optical Adhesive Film e analisadas em equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (ambos da Applied Biosystems Waltham, MA, EUA). As reações tiveram início com uma etapa de desnaturação a 95 °C por 10 min, seguida por 40 ciclos, contendo uma etapa de desnaturação (95°C por 15 segundos) e uma etapa de ligação dos iniciadores e extensão (60 °C por um minuto). Ao final, foi incluída uma etapa para obtenção da curva de dissociação (95 °C por 15 segundos, 60 °C por 15 segundos e, novamente, 95 °C por 15 segundos). Em cada placa foi adicionado um controle negativo para cada par de iniciadores, composto por todos os reagentes necessários à amplificação, exceto o DNA molde.

3.11 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A técnica de imunofluorescência foi utilizada para marcação de GRK2 e dos receptores AT1 e β 1 adrenérgico. Amostras de rim e coração foram obtidas 24 h após a cirurgia de CLP e os cortes foram obtidos conforme descrito no item 3.8. Após fixação com acetona (5 min; a -20°C), as secções foram imersas em uma solução de metanol com peróxido de hidrogênio 3% (20 min; a temperatura ambiente) e lavadas com PBS. Os cortes foram contornados com caneta hidrofóbica e as possíveis ligações inespecíficas foram bloqueadas com BSA 5%, por 1 h, a temperatura ambiente. Em seguida, as secções foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-GRK2, monoclonal de coelho anti-AT1 (ambos na concentração de 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) e policlonal de coelho anti- β 1 (1:50; Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, EUA), por 18 h, a 4°C . Então, as secções foram lavadas com uma solução de PBS-Tween 0,1% por três vezes de 5 min e incubadas com o anticorpo secundário macaco anti-camundongo Alexa Fluor 594 ou cabra anti-coelho Alexa Fluor 488 (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), por 1 h, a temperatura ambiente. Novamente, foi realizada a lavagem e o núcleo das células foi corado com DAPI, por 5 min, a temperatura ambiente. Como controles negativos, foram utilizadas lâminas contendo apenas o anticorpo secundário. Finalmente, as secções foram lavadas e lamínulas foram colocadas sobre as lâminas utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). A análise de imagens seguiu conforme descrito no item 3.8.

3.12 CULTURA CELULAR

Foram utilizadas células da linhagem LLC-PK1 (células epiteliais de rim de porco; ATCC CL-101), mantidas em garrafas próprias para cultura. As células foram cultivadas em meio M-199 (suplementado com 3% de soro fetal bovino, 100 U/ml de penicilina e 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina), pH 7,2, em atmosfera úmida, contendo 5% de CO_2 e a 37°C . Os repiques foram feitos a cada 3 ou 4 dias, de acordo com a confluência das células.

Para a realização dos repiques todo meio de cultura foi removido e as garrafas foram lavadas com PBS estéril pré-aquecido a 37°C. Após a remoção do PBS, cada placa recebeu uma solução de tripsina 0,25% /EDTA 0,03%, pré-aquecida a 37°C. Após a digestão enzimática, as células foram transferidas para um tubo cônico contendo meio completo e centrifugadas (250 g, 10 min). O sobrenadante foi descartado e o *pellet* suspenso em 1 ml de meio completo, o qual foi utilizado para contagem do número de células, preparação dos protocolos experimentais e manutenção da cultura.

Para o protocolo experimental, as células foram incubadas em meio com um doador de NO, S-Nitroso-N-acetil-DL-penicilamina (SNAP; 0,01, 0,1 ou 1 mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por 4 h e células não estimuladas foram usadas como controle. Em um segundo protocolo, as células em meio foram tratadas com o inibidor da guanilato ciclase solúvel, 1H-[1,2,4]Oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one (ODQ; 1 µM, Calbiochem, San Diego, CA, EUA) ou com o inibidor de proteassoma e de calpaína, MG 132 (10 µM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por 30 min e então incubadas com SNAP, durante 4 h.

Seguindo a investigação, o sobrenadante foi descartado e as células foram preparadas para análise por *Western blot*. Para isso, as células foram homogenizadas em tampão de lise (conforme descrito no item 3.8), durante 15 min, a 4°C e transferidas para *ependorfs* com o auxílio de um raspador. Os *ependorfs* foram mantidos no gelo, durante 40 min e, em seguida, centrifugados (10.000 g; 15 min; 4°C). Após, foi separada uma alíquota do sobrenadante para dosagem de proteínas, pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), e o restante foi misturado com tampão de amostra (glicerol 20%, mercaptoetanol 14,4 mM, azul de bromofenol 0,1%, Tris/HCl 0,2 M e SDS 10%). As amostras foram fervidas por 8 minutos e armazenadas a -20 °C até o momento da eletroforese. A eletroforese e a imunodeteção foram realizadas conforme descrito no item 3.9 para GRK2.

Para o ensaio de ligação do receptor α_1 adrenérgico e imunofluorescência para GRK2, as células foram cultivadas em lamínulas e submetidas ao ensaio após 24 h. As células foram incubadas com SNAP e, após 4 h, foram lavadas com PBS e fixadas com PFA 4%. Para o ensaio de ligação do receptor α_1 adrenérgico: foi utilizada a BODIPY® FL prazosina (10 nM, por 1h, em temperatura ambiente). As células foram lavadas com

PBS e as lamínulas foram colocadas sobre lamínas com o auxílio do meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Para a técnica de imunofluorescência: foi realizado o bloqueio das ligações inespecíficas com BSA 5%, por 1 h, a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-GRK2 (1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, EUA) por 18 h, a 4°C. Então, as secções foram lavadas com uma solução de PBS-Tween 0,1% por três vezes de 5 min e incubadas com o anticorpo secundário macaco anti-camundongo Alexa Fluor 594 (1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA), por 1 h, a temperatura ambiente. Novamente, foi realizada a lavagem e o núcleo das células foi corado com DAPI, por 5 min, a temperatura ambiente. Finalmente, as células foram lavadas e as lamínulas foram colocadas sobre as lâminas utilizando meio de montagem aquoso Gel Mount™ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). A análise de imagens seguiu conforme descrito no item 3.8.

3.13 PROTOCOLOS DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Os animais foram distribuídos de maneira randômica e em números iguais entre os grupos sépticos e não sépticos. Foram utilizados animais *naïve* como controle, a fim de minimizar a manipulação de animais. Todas as análises foram realizadas 24 h após a indução da sepse e os animais foram eutanasiados com overdose de anestésicos.

Camundongos Swiss foram tratados com o antagonista do receptor $\alpha 1$ adrenérgico, prazosina (1 mg/Kg, s.c.), 12 h após a cirurgia de CLP ou com o inibidor seletivo e irreversível da NOS-2, 1400W (1 mg/Kg, s.c.; ambos da Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), 30 min antes e 6 e 12 h após a cirurgia de CLP ou ainda, com o azul de metileno, inibidor da guanilato ciclase solúvel (10 mg/Kg), 6, 12 e 18 h após a cirurgia de CLP. Animais controle receberam apenas o veículo (PBS).

Em outro grupo experimental, animais não sépticos foram tratados com SNAP (10 mg/Kg; s.c., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e amostras de tecido renal foram obtidas após 4 h.

Camundongos C57BL/6 NOS-2 *knockout* foram induzidos à sepse por CLP e após 24 h foi realizada a análise de GRK2 pela técnica de Western blot.

3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) e os testes estatísticos foram empregados de acordo com a pertinência de cada experimento, conforme descrito na legenda de cada figura. Foram executados os testes estatísticos *t* Student, análise de variância (ANOVA) de uma via ou ANOVA de duas vias, seguidos pelo teste *post-hoc* de Bonferroni e valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Todos os testes estatísticos foram realizados com o software GraphPad Prism® versão 8.4.2 (San Diego, CA, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPSE

Já está bem demonstrado que a sepse induz uma disfunção cardiovascular, marcada por uma redução da reatividade e da resistência vascular e hipotensão. Desta forma, o passo inicial e crucial no desenvolvimento desse trabalho foi reproduzir esse quadro nos camundongos submetidos à cirurgia de CLP e garantir a reprodutibilidade do modelo. Conforme demonstrado no registro típico de pressão sanguínea (**Figura 4A**), nos animais submetidos a sepse, a pressão arterial sistólica estava cerca de 20% menor em comparação com o grupo controle (*naïve*). Além disso, foi observado que a reatividade vascular a fenilefrina, um agente vasoconstritor, estava significativamente menor nos animais sépticos, 24 h após a cirurgia de CLP. Nós quantificamos a diferença entre os picos de pressão arterial média basal e após a administração de fenilefrina e identificamos que a resposta foi reduzida em aproximadamente 80% durante a sepse (**Figura 4B**).

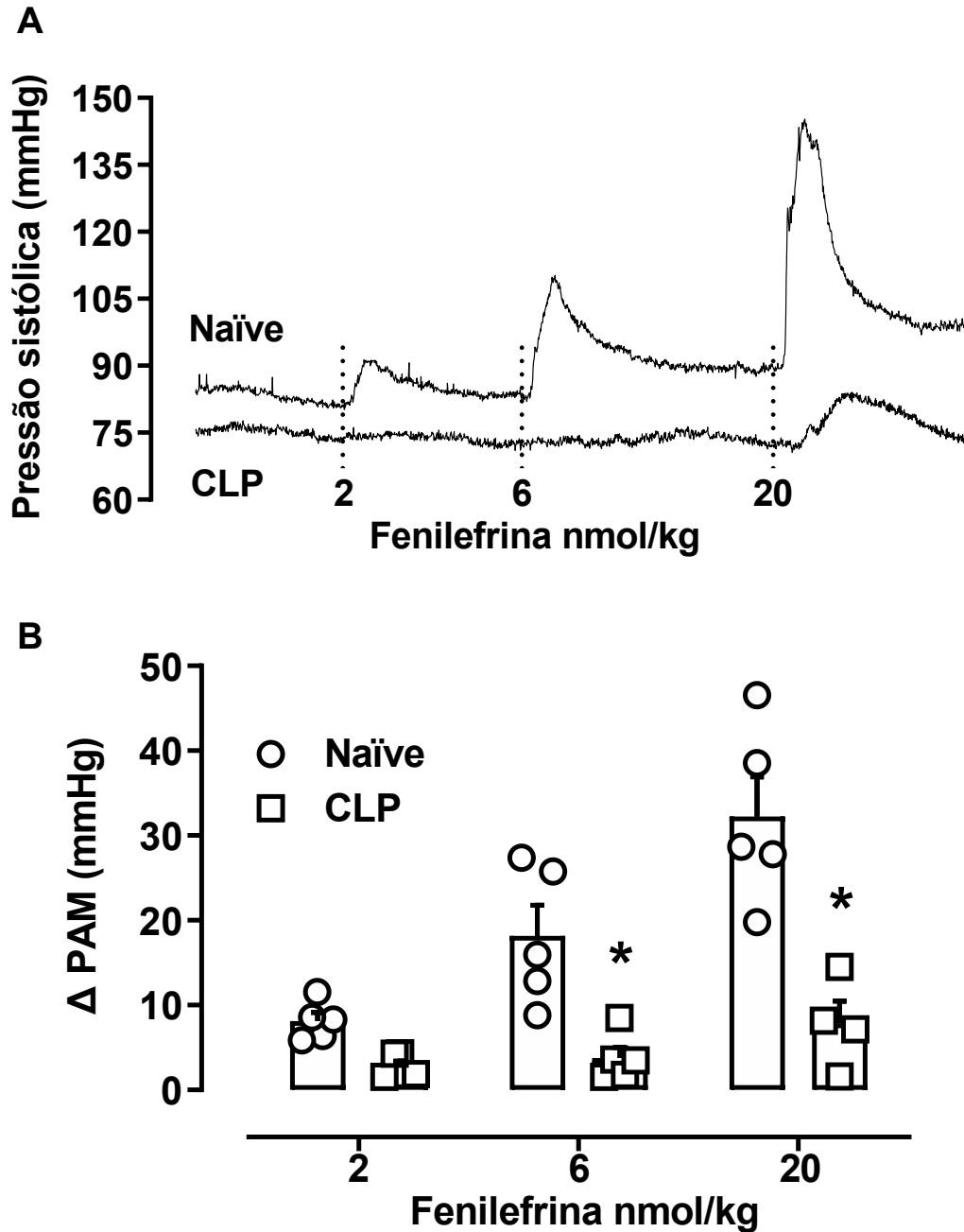


Figura 4: Efeito da fenilefrina na pressão sanguínea de animais sépticos. Os camundongos foram submetidos à cirurgia de CLP e os registros de pressão arterial foram obtidos após 24 h. **Painel A:** Registro típico de pressão arterial. **Painel B:** Quantificação da resposta vascular a fenilefrina. Barras representam a média + E.P.M e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (*naive*).

4.2 FLUXO SANGUÍNEO RENAL EM ANIMAIS SUBMETIDOS À SEPSE

Uma vez validado o modelo de sepse e identificada a disfunção no sistema circulatório, nosso interesse foi investigar a microcirculação no tecido renal, visto que a resposta vascular no local é diferente dos demais leitos durante a sepse. É importante ressaltar que as análises de pressão arterial e de fluxo sanguíneo foram feitas nos mesmos animais.

De fato, 24 h após a cirurgia de CLP, o fluxo sanguíneo basal no rim dos animais sépticos estava reduzido quando comparado com os animais controle. O tratamento com prazosina (um antagonista do receptor α_1 adrenérgico; 1 mg/Kg; s.c.; 12 h após a cirurgia de CLP), reestabeleceu o fluxo sanguíneo renal para valores normais (em relação aos animais *naïve*). Já em outro leito vascular, como na cauda, não foram observadas alterações de fluxo sanguíneo (**Figura 5A**).

Buscando explorar o efeito gerado pela prazosina no fluxo sanguíneo renal durante a sepse, nós utilizamos uma segunda abordagem farmacológica. Desta forma, os animais submetidos à sepse foram infundidos com fenilefrina (40 nmol/Kg/min; 50 μ L/min), um agonista do receptor α_1 adrenérgico, durante 5 min. Como resultado, o tratamento com fenilefrina não foi capaz de alterar o fluxo sanguíneo renal. Em contrapartida, na veia caudal dos animais controle foi observado o efeito vasoconstritor da fenilefrina, ao passo que nos animais sépticos, a reatividade foi prejudicada (**Figura 5B**).

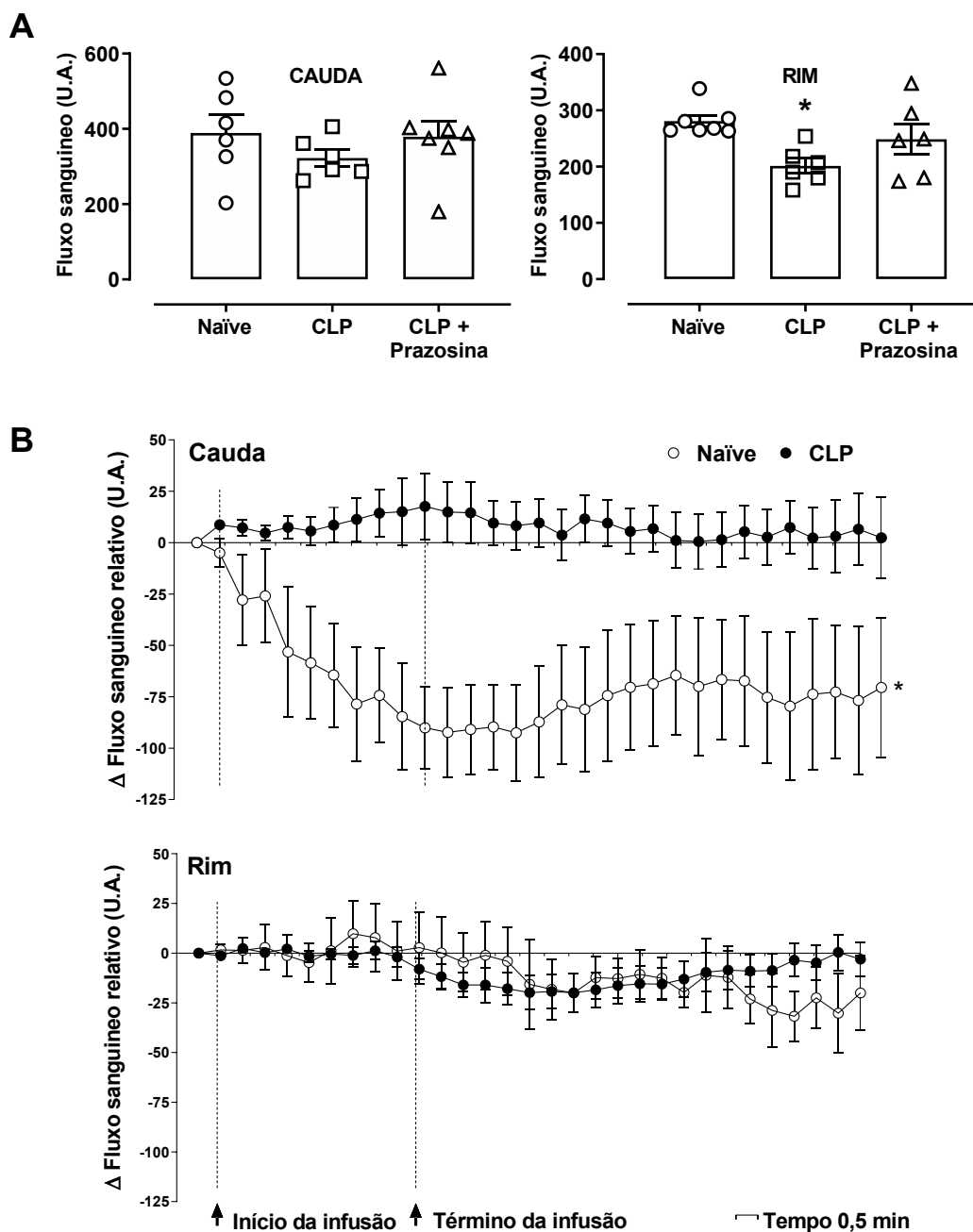


Figura 5: Efeito do tratamento com prazosina e da infusão de fenilefrina no fluxo sanguíneo caudal e renal de animais sépticos. Os camundongos foram submetidos à sepse e o fluxo sanguíneo foi analisado após 24 h. **Painel A:** Fluxo sanguíneo na cauda e no rim após a administração de prazosina (1 mg/Kg; s.c.; 12 h após a cirurgia de CLP). Barras representam a média + E.P.M e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (*naïve*). **Painel B:** Fluxo sanguíneo na cauda e no rim durante a infusão de fenilefrina (40 nmol/kg/min). A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de duas vias; $n = 8$; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (*naïve*).

4.3 MARCADORES DE DANO RENAL E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA EM ANIMAIS SÉPTICOS

Após a constatação de uma diminuição no fluxo sanguíneo no rim dos camundongos submetidos à sepse, nós nos perguntamos como estaria a função renal e quais as consequências da diminuição do aporte sanguíneo local e dos possíveis danos teciduais causados pela inflamação. Assim, decidimos determinar os valores plasmáticos de creatinina e de ureia e realizar uma avaliação histopatológica do rim.

Como visto na **Figura 6**, os níveis plasmáticos de creatinina (**Figura 6A**) e de ureia (**Figura 6B**) estavam elevados nos animais sépticos, 24 h após a cirurgia de CLP.

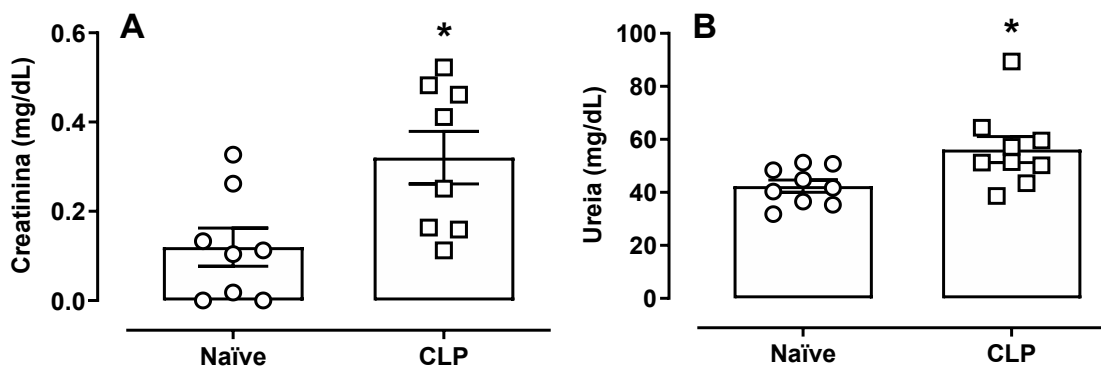


Figura 6. Dosagem plasmática de creatinina e ureia em camundongos sépticos. O plasma foi obtido 24 h após a cirurgia de CLP e foram dosados os níveis de creatinina (**Painel A**) e ureia (**Painel B**). As barras representam a média + E.P.M e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (*naive*).

Os achados histopatológicos revelam que há degeneração hidrópica, com formação de vacúolos no citoplasma em túbulos, principalmente nos proximais, decorrentes de alterações no balanço eletrolítico por distúrbios da circulação. Não foram relatadas lesões mais acentuadas ou necrose (**Figura 7**).

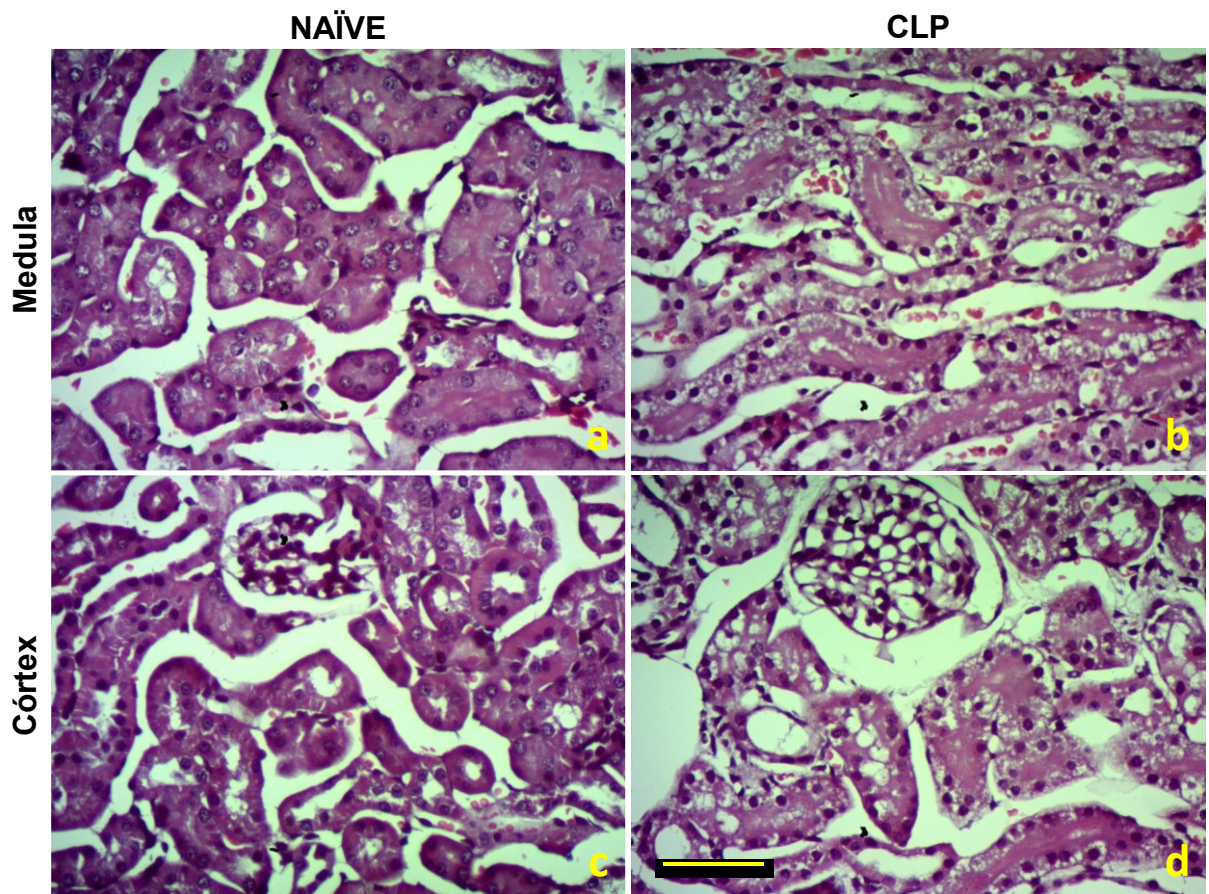


Figura 7. Cortes histológicos de rim de animais submetidos à sepse. Imagens representativas da medula (a e b) e do córtex (c e d) renal de camundongos *naïve* (Painéis esquerdos, a e c) e sépticos (Painéis direitos, b e d), corados com hematoxilina e eosina, exibindo intensa vacuolização citoplasmática no epitélio tubular no grupo CLP; aumento de 40x; escala = 50 μ m.

4.4 DENSIDADE DE RECEPTORES α_1 ADRENÉRGICOS NO RIM E CORAÇÃO DE ANIMAIS SÉPTICOS

Com base nas alterações de fluxo sanguíneo renal basal e no efeito dos moduladores do sistema α_1 adrenérgico (prazosina e fenilefrina) nos camundongos submetidos à sepse, nosso próximo objetivo foi avaliar a modulação dos receptores desse sistema no órgão.

Com isso, desenhamos um experimento para estipular a densidade do receptor α_1 adrenérgico no tecido renal e cardíaco durante a sepse, através de um ensaio de ligação

com BODIPY[®] FL prazosina (QAPB), um ligante fluorescente do receptor. Como podemos visualizar nas **Figuras 8A e 8C**, a densidade do receptor α_1 adrenérgico aumentou em cerca de três vezes no rim séptico quando comparado ao grupo controle. Outro ponto observado é que a marcação é maior nos túbulos e vasos, embora esteja presente nos glomérulos. Em contrapartida, a densidade do receptor α_1 adrenérgico não foi alterada no coração dos camundongos sépticos (**Figura 8B e 8D**).

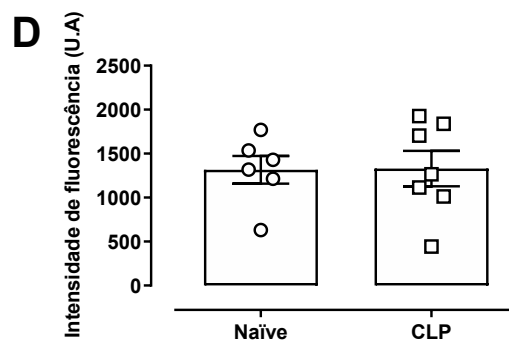
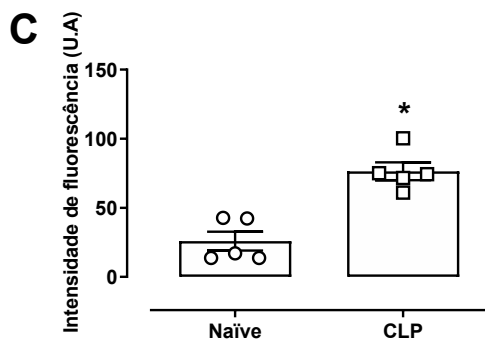
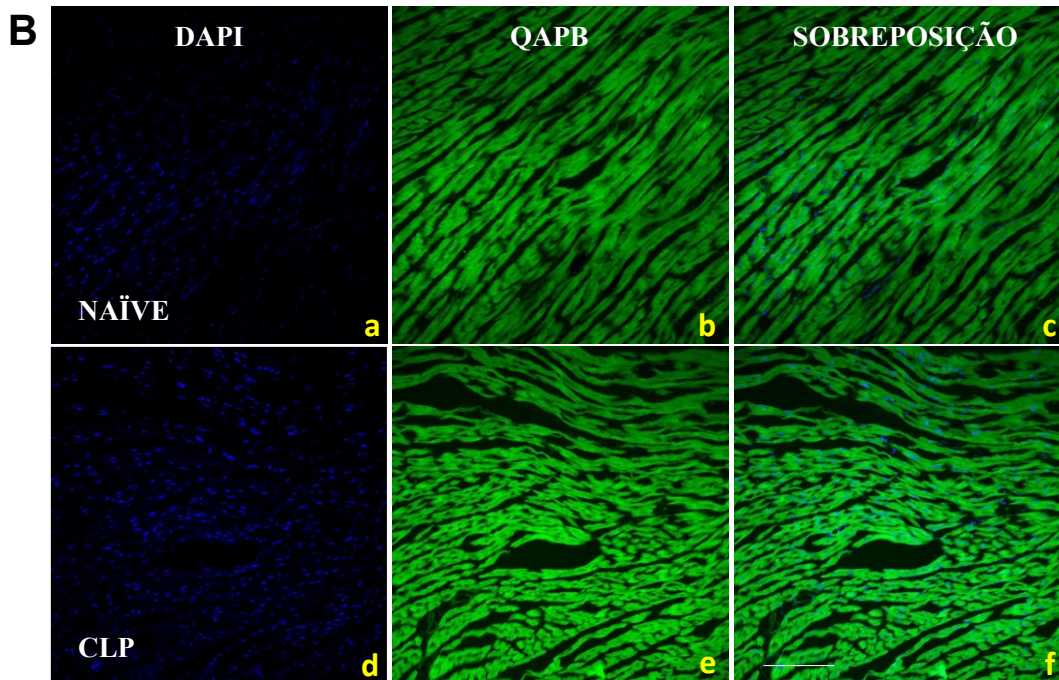
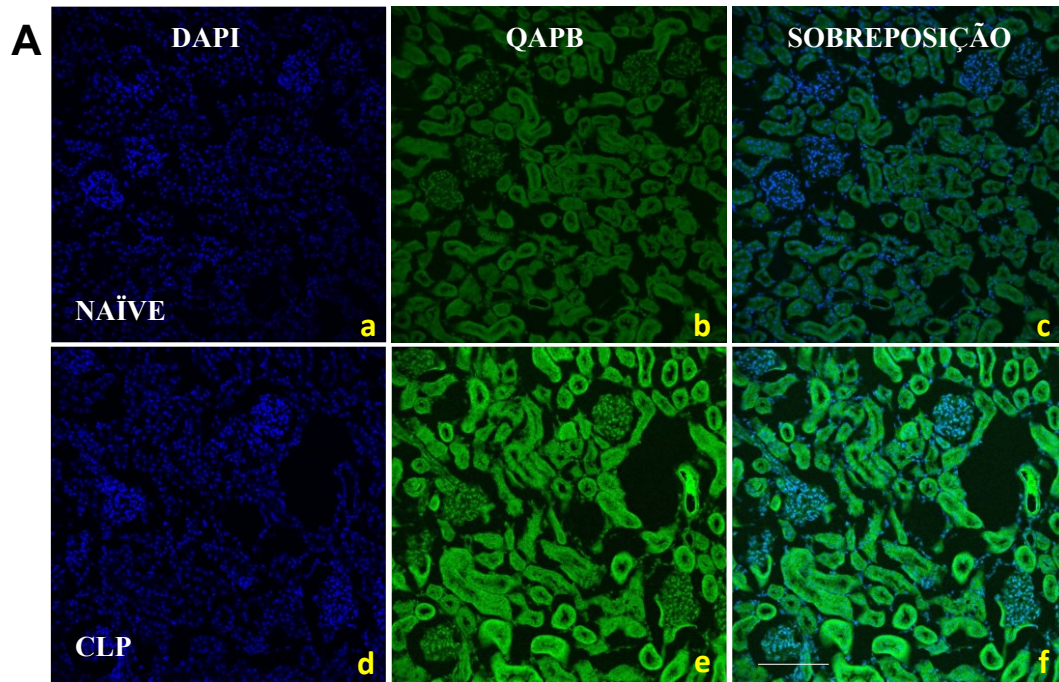


Figure 8. Densidade de receptores α_1 adrenérgicos no rim e no coração de camundongos sépticos.

Imagens representativas da marcação com BODIPY™ FL Prazosina (QAPB, verde) e DAPI (azul) no rim (**Painéis A e C**) e no coração (**Painéis B e D**) de camundongos, 24 h após a indução da sepse. Foram obtidas pelo menos 3 imagens de cada animal para quantificação. As Figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal; escala = 50 μ m. As barras representam a média + E.P.M e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (*naïve*).

4.5 DENSIDADE DE RECEPTORES β_1 ADRENÉRGICOS NO CORAÇÃO DE ANIMAIS SÉPTICOS

Embora não tenha sido observada diferença na densidade de receptores α_1 adrenérgicos no tecido cardíaco, já está bem estabelecido que há uma hiporresponsividade cardíaca a ação das catecolaminas na sepse e que o receptor β_1 é o principal subtipo dos receptores adrenérgicos encontrado no coração. Sendo assim, nós optamos por avaliar a densidade do receptor β_1 adrenérgico no coração dos animais sépticos. Como esperado, há uma diminuição substancial da intensidade de fluorescência da marcação para o receptor β_1 adrenérgico cardíaco, 24 h após a indução da sepse, indicando uma menor densidade do receptor e confirmando os dados prévios do laboratório e da literatura (**Figura 9**).

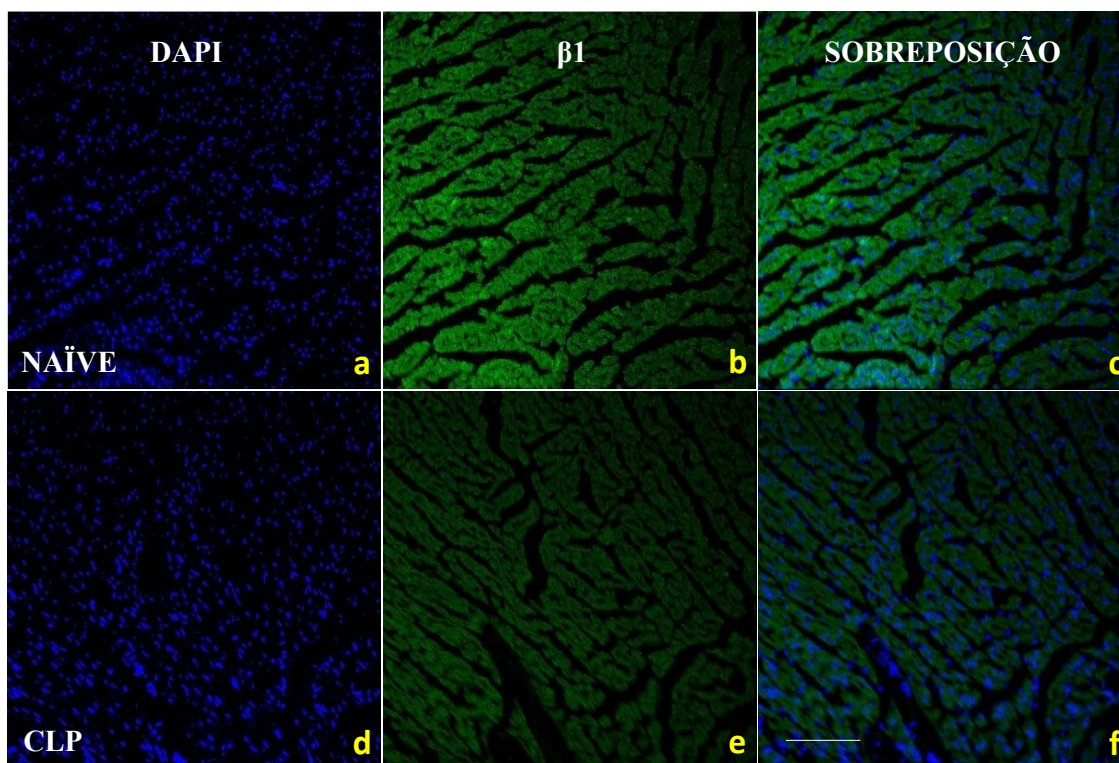
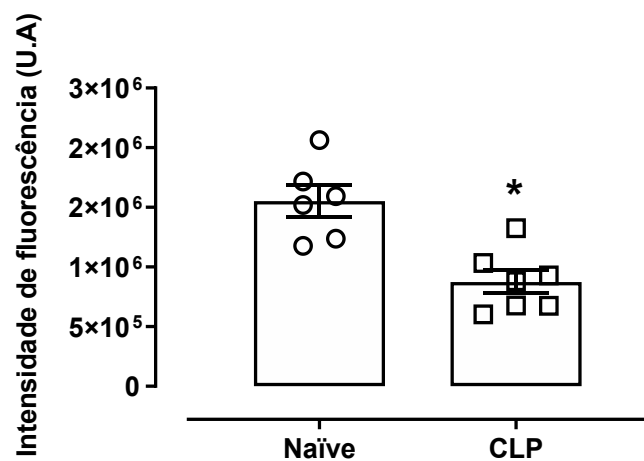
A**B**

Figure 9. Densidade de receptores $\beta 1$ adrenérgicos no coração de camundongos sépticos. Imagens representativas (**Painel A**) e representação gráfica (**Painel B**) da marcação do receptor $\beta 1$ adrenérgico (verde; **b** e **e**) e DAPI (azul; **a** e **d**) no coração de camundongos, 24 h após a indução da sepse. Foram obtidas pelo menos 3 imagens de cada animal para quantificação. As Figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal; escala = 50 μ m. As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (*naïve*).

4.6 DENSIDADE DO RECEPTOR AT1 NO RIM DE ANIMAIS SÉPTICOS

Além do receptor α_1 adrenérgico, o receptor AT1 tem um papel relevante na contração da vasculatura. Durante a sepse, sabe-se que resposta da angiotensina II também está alterada e, portanto, nós avaliamos as possíveis alterações na densidade do receptor de angiotensina II (AT1) no tecido renal de camundongos sépticos, 24 h após a cirurgia de CLP. Como exposto na **Figura 10**, podemos ver que não houve diferença na intensidade de fluorescência da marcação para o receptor AT1 no rim séptico em comparação com o grupo controle.

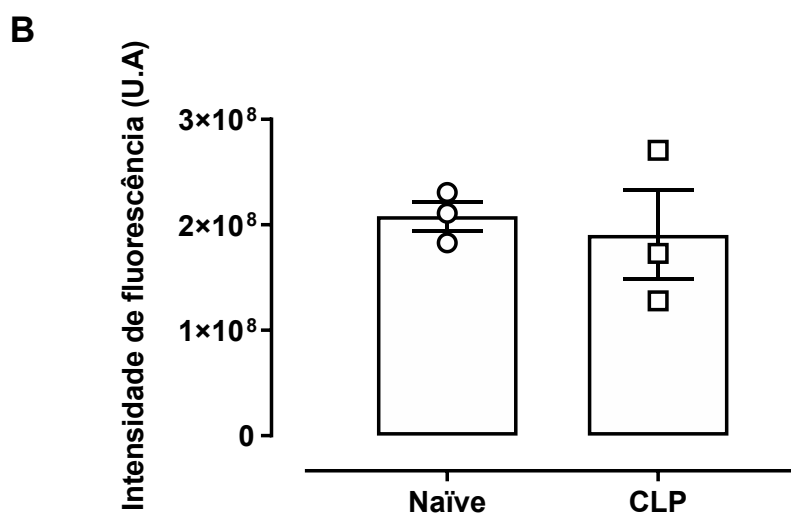
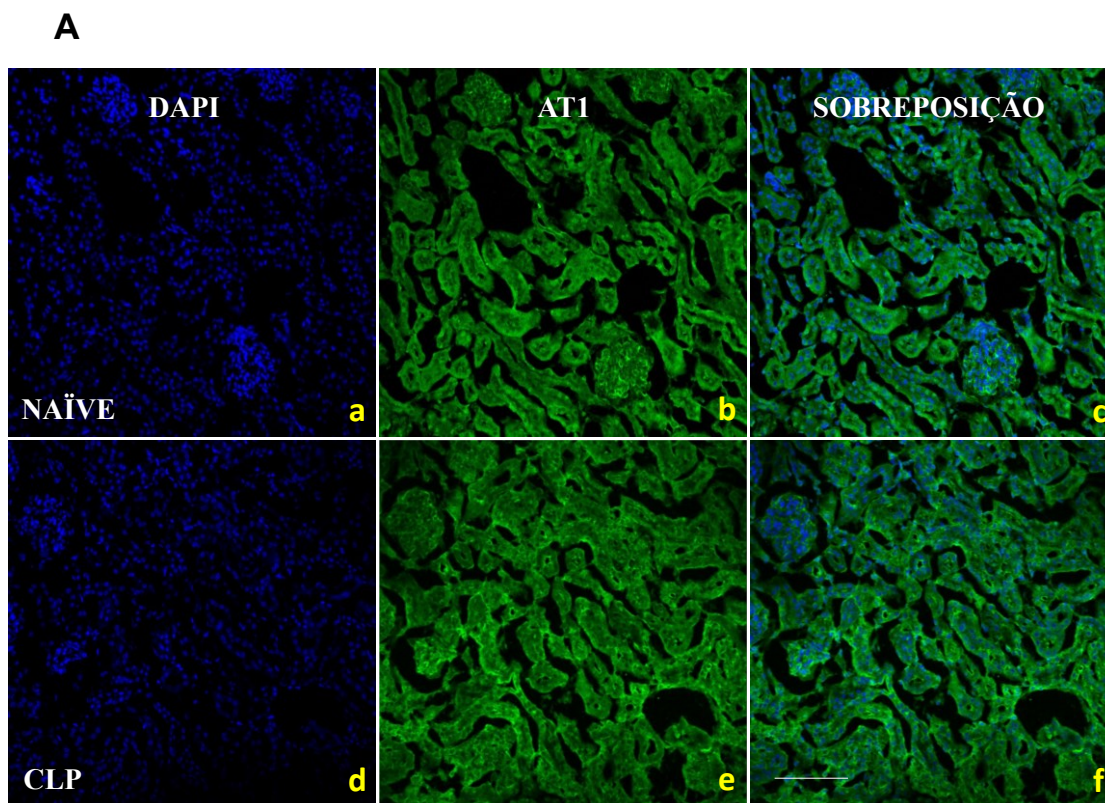


Figure 10. Densidade de receptores AT1 adrenérgicos no coração de camundongos sépticos. Imagens representativas (**Painel A**) e representação gráfica (**Painel B**) da marcação do receptor AT1 adrenérgico (verde; **b** e **e**) e DAPI (azul; **a** e **d**) no rim de camundongos, 24 h após a indução da sepse. Foram obtidas pelo menos 3 imagens de cada animal para quantificação. As Figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal; escala = 50 μ m. As barras representam a média + E.P.M e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (*naïve*).

4.7 NÍVEIS DE GRK2 NO RIM E NO CORAÇÃO DE ANIMAIS SÉPTICOS

O aumento da densidade do receptor α_1 adrenérgico renal foi intrigante e nos conduziu a estudar os níveis de GRK2, proteína que participa da regulação desses receptores. Desta maneira, através da imunomarcção para GRK2 (**Figura 11A e 11C**), nós constatamos que há uma acentuada diminuição do conteúdo celular de GRK2 no rim dos camundongos sépticos. De maneira semelhante a marcação com BODIPY® FL prazosina, a distribuição da GRK2 ocorre em todo o tecido renal, entretanto parece ser menos intensa nos glomérulos. Através da técnica de *Western blot*, é possível perceber que a sepse induz uma redução de quase todo conteúdo de GRK2 no rim, 24 h após a cirurgia de CLP (**Figura 12A e 12C**). Além disso, os níveis de RNAm de GRK2, determinados pela técnica de RT-qPCR, estavam significativamente reduzidos no rim séptico (**Figura 12E**). No que diz respeito a GRK2 cardíaca, a distribuição da GRK2 parece ser homogênea em todo o tecido (**Figura 11B e 11D**) e há um aumento no conteúdo de GRK2 no coração durante a sepse (**Figura 12B e 12D**). Já os níveis de RNAm de GRK2 não foram alterados no coração séptico em comparação com o grupo controle (**Figura 12F**).

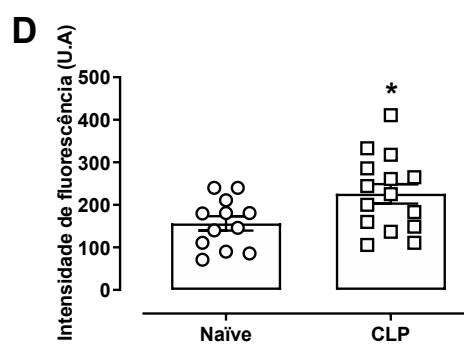
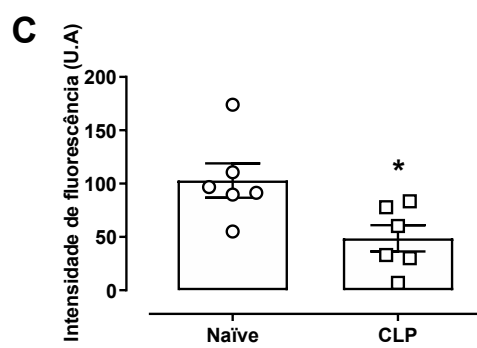
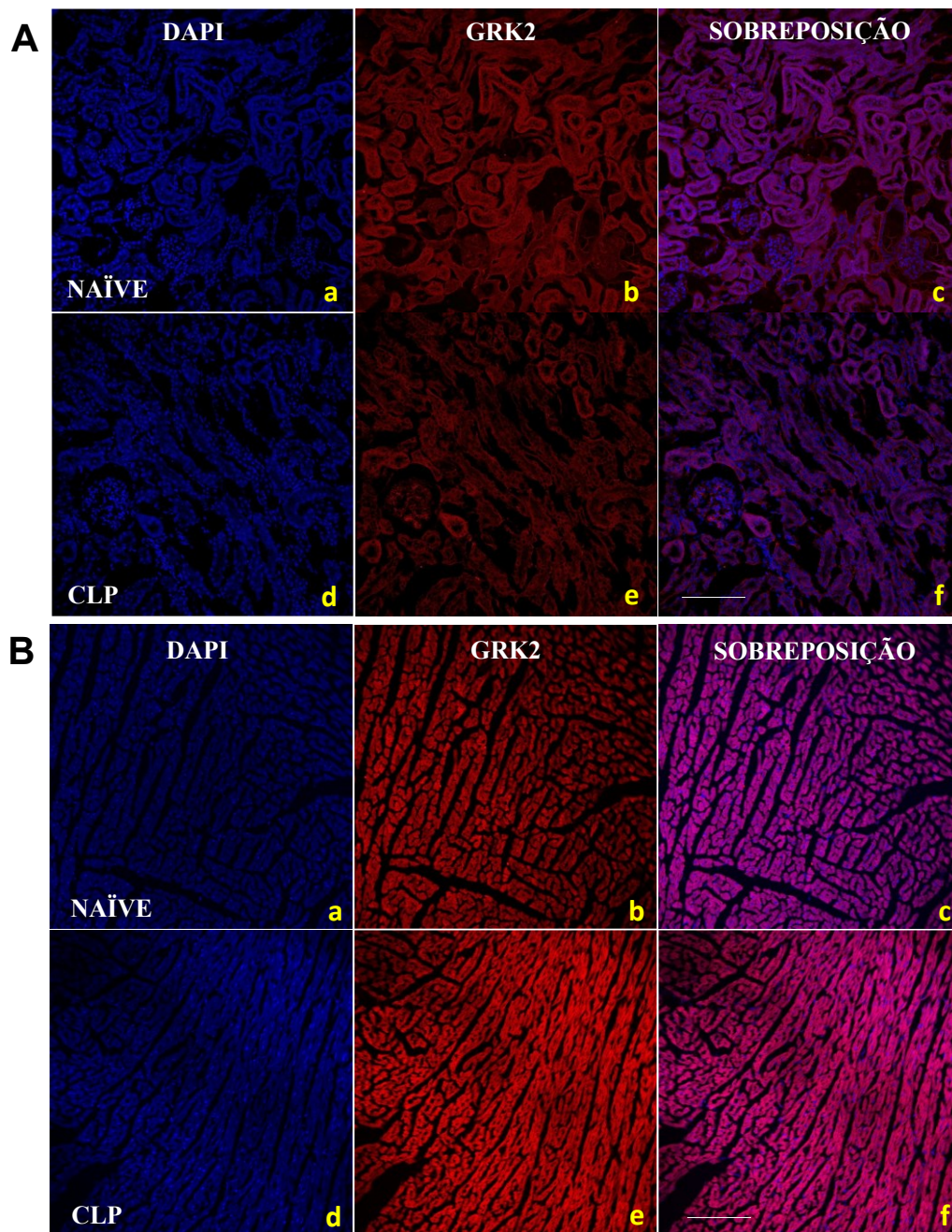


Figure 11. Níveis de GR2 no rim e no coração de camundongos sépticos. Imagens representativas da marcação com GRK2 (vermelho) e DAPI (azul) no rim (**Painel A e C**) e no coração (**Painel B e D**) de camundongos, 24 h após a indução da sepse. Foram obtidas pelo menos 3 imagens de cada animal para quantificação. As figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal; escala = 50 μ m. As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (*naïve*).

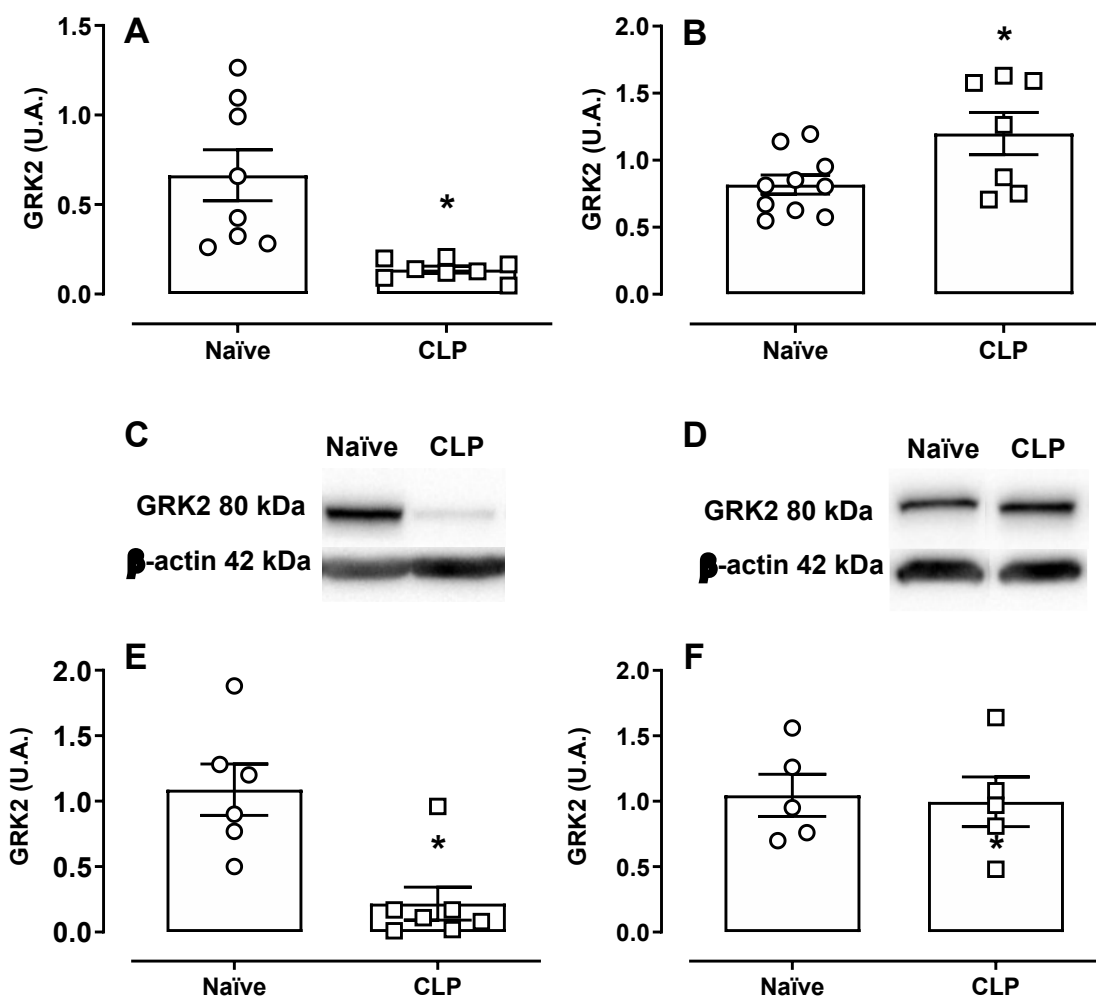


Figura 12. Níveis de GRK2 em tecido renal e cardíaco de camundongos sépticos. Representação gráfica e imagens representativas das bandas obtidas por *Western blot* para GRK2 no rim (**Painéis A e C**) e no coração (**Painéis B e D**) de camundongos, 24 h após a indução da sepse. RT-qPCR para GRK2 no rim (**Painel E**) e no coração (**Painel F**). As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (*naïve*).

4.8 EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS NÍVEIS DE GRK2 RENAL EM ANIMAIS SÉPTICOS

Sabendo do papel do NO na disfunção cardiovascular na sepse, na regulação da GRK2 e com base nos trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa, nós objetivamos investigar se o NO também estaria envolvido na modulação da GRK2 no rim séptico.

4.8.1 EXPRESSÃO DE NOS2 E PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO NO RIM E ANÁLISE DE NO_x NO PLASMA DE ANIMAIS SÉPTICOS

O primeiro passo foi investigar a expressão da NOS-2, principal enzima produtora de NO na inflamação e a produção de NO no rim dos camundongos submetidos à sepse, bem como os metabólitos estáveis do NO (NO_x; nitrato e nitrito) no plasma. Nós verificamos que há um aumento na expressão da NOS-2 no rim durante a sepse, como pode ser observado nas **Figuras 13A e 13B**. A produção de NO foi confirmada de maneira direta, através da sonda DAF-FM DA, onde é possível visualizar um aumento na intensidade de fluorescência nos rins dos animais sépticos da ordem de 30% (**Figuras 13C e 13D**). Além disso, indiretamente, nós confirmamos a produção de NO (pela NOS-2 no rim e presumidamente em outros órgãos) pela medida dos seus metabólitos. Os valores plasmáticos de NO_x aumentaram aproximadamente cinco vezes em comparação com o grupo controle (**Figura 13E**).

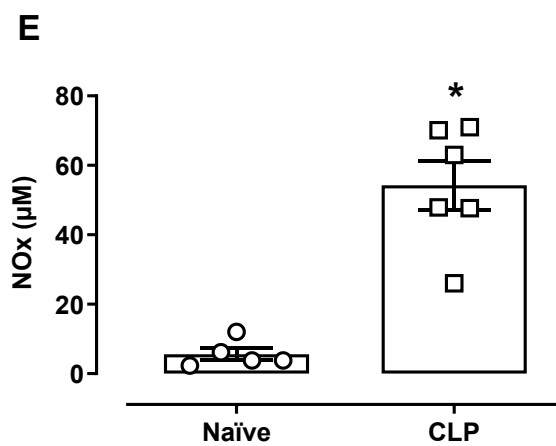
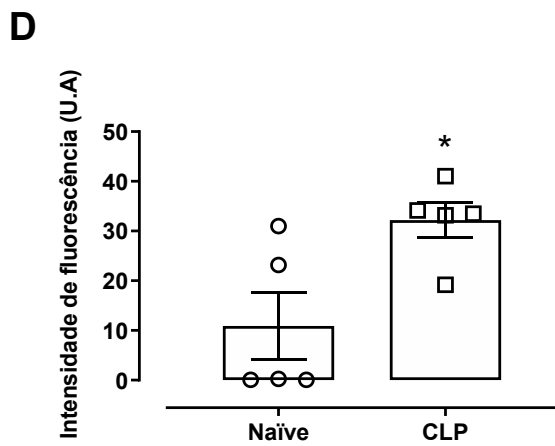
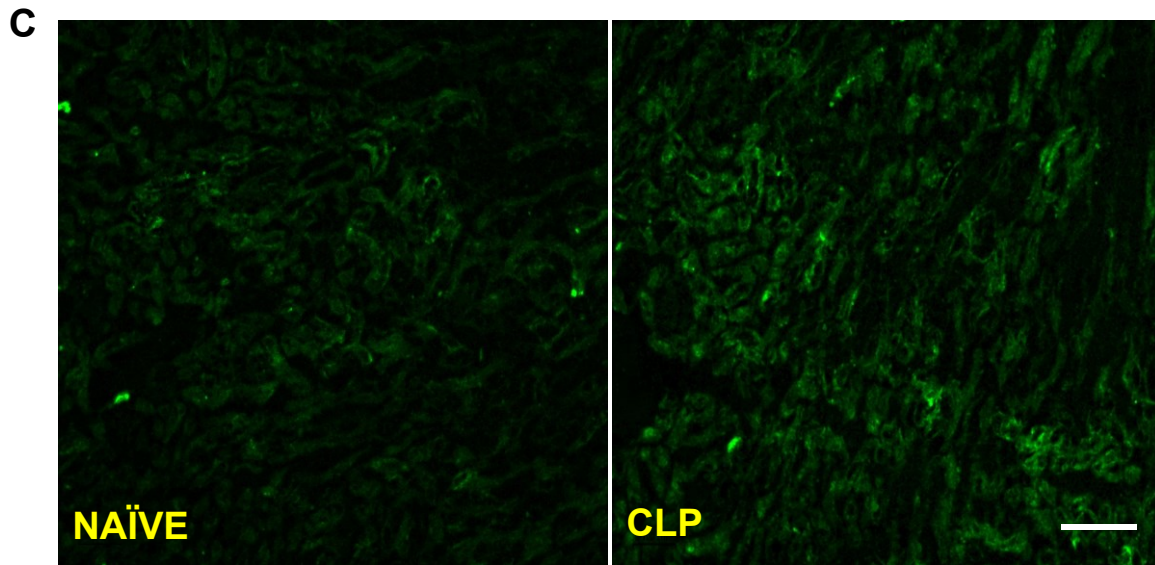
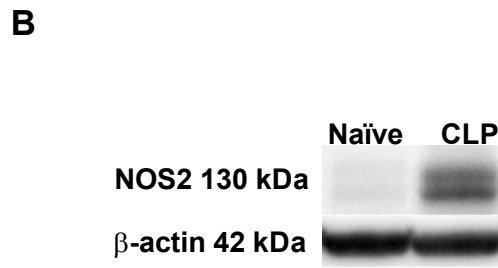
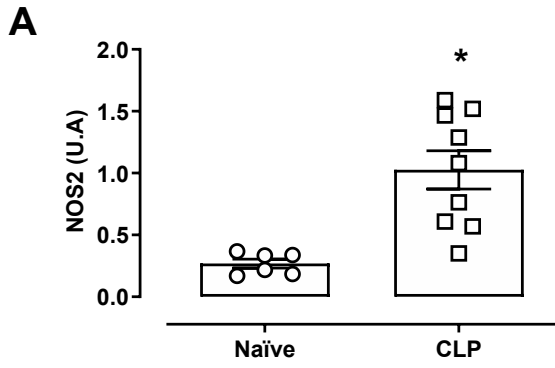


Figura 13. Expressão de NOS-2 e produção de NO em tecido renal e níveis plasmáticos de NOx em camundongos sépticos. Representação gráfica e imagens representativas das bandas obtidas por *Western blot* para NOS2 no rim (**Painéis A e B**) de camundongos, 24 h após a indução da sepse. **Painéis C e D:** Imagens representativas e representação gráfica da intensidade de fluorescência da sonda DAF-FM DA (verde) em rim de animais *naïve* e CLP. **Painel E:** quantificação dos níveis de nitrato e nitrito (NOx) no plasma. As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle (*naïve*).

4.8.2 EFEITO DO ÓXIDO NÍTRICO NOS NÍVEIS DE GRK2 RENAL

Para explorar o possível papel do NO na dinâmica da GRK2 renal, nós utilizamos diferentes estratégias experimentais.

No primeiro protocolo, os animais foram tratados com 1400W (4 μ mol/kg, s.c), um inibidor seletivo para NOS-2, 30 min antes, 6 e 12 h após a indução da sepse. Na **Figuras 14A e 14B**, podemos visualizar que o tratamento com 1400W preveniu a perda de GRK2 no rim séptico. Além da abordagem farmacológica, nós utilizamos animais *knockout* para o gene da NOS-2 e realizamos a indução da sepse. Novamente, 24 h após a cirurgia de CLP, a diminuição da GRK2 renal foi prevenida nos animais com a deleção do gene da NOS-2 em comparação com os animais *wild type* (WT) sépticos (**Figura 14C e 14D**). Nesse ponto, é pertinente ressaltar que foi realizada a confirmação da deleção global do gene da NOS-2 nos animais através da técnica de *Western blot* para NOS-2.

Além de avaliarmos o efeito da diminuição da produção de NO sobre os níveis de GRK2, nós optamos por investigar o efeito do bloqueio da guanilato ciclase solúvel (principal alvo de ação do NO) sobre a GRK2. Para isso, os animais foram tratados com azul de metileno (10 mg/Kg), um inibidor da guanilato ciclase solúvel, 6, 12 e 18 h após a indução da sepse. Interessantemente, a inibição da via NO/GCs/GMPc não foi capaz de restaurar os níveis de GRK2 renal nos animais sépticos comparados ao grupo controle, na análise feita 24 h após a cirurgia de CLP (**Figura 14 E e F**).

Adicionalmente, animais não sépticos foram tratados com SNAP (45 nmol/kg, s.c.), um doador de NO, e após 4 h o conteúdo de GRK2 foi avaliado. Conforme demonstrado na **Figura 15**, o tratamento com SNAP induziu uma diminuição nos níveis de GRK2 renal.

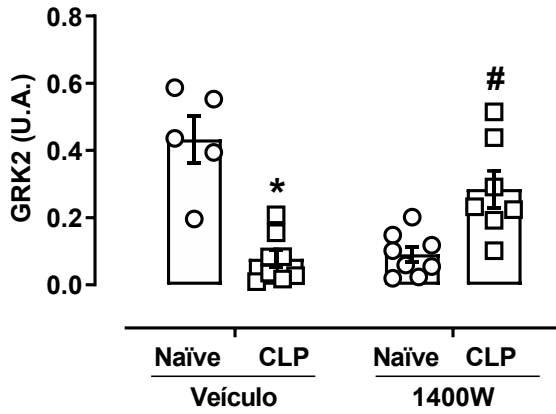
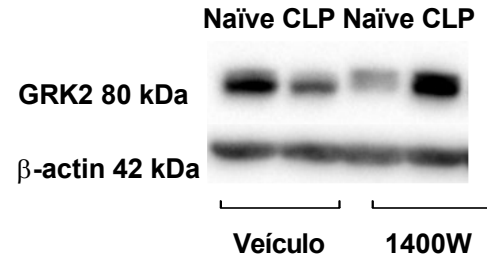
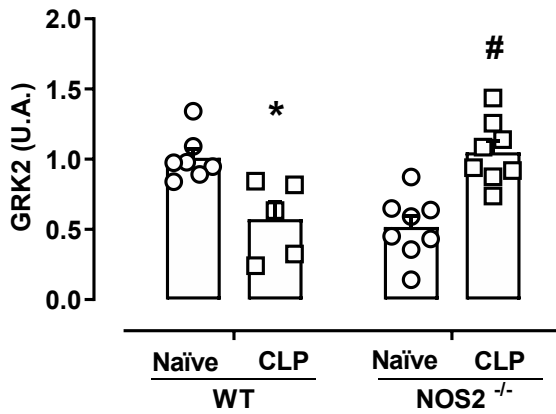
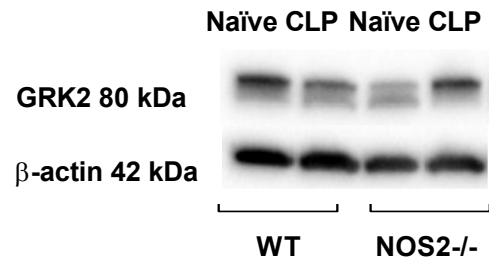
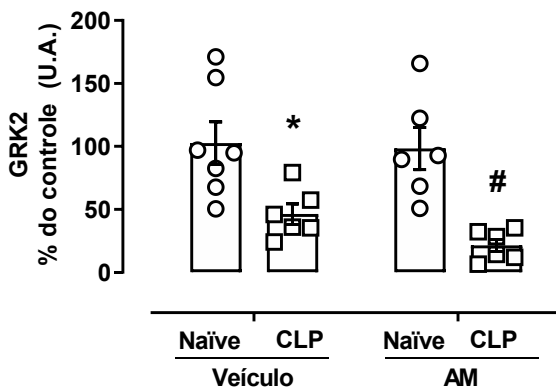
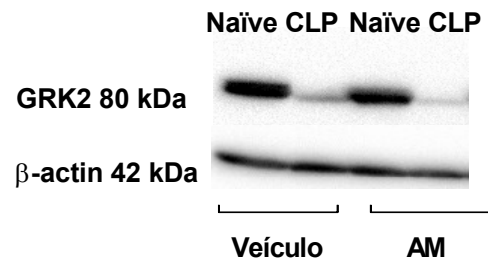
A**B****C****D****E****F**

Figura 14. Efeito do tratamento com 1400W e do azul de metileno (AM) e da deleção do gene da NOS2 nos níveis de GRK2 renal de animais sépticos. Representação gráfica (**Painéis A, C e E**) e imagens representativas das bandas obtidas por *Western blot* para GRK2 no rim de camundongos, 24 h após a indução da sepse (**Painéis B, D e F**). As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de duas vias, seguido pelo post hoc de Bonferroni ; *p < 0,05 comparado com o grupo controle (*naïve*).

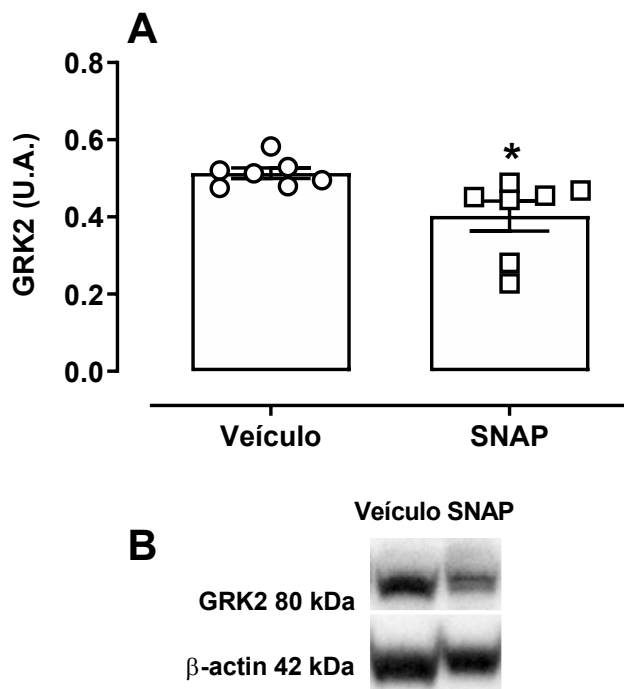


Figura 15. Efeito do tratamento com SNAP no conteúdo de GRK2 renal. Representação gráfica (**Painel A**) e imagem representativa das bandas obtidas por *Western blot* para GRK2 (**Painel B**) dos níveis de GRK2, 4 h após a administração de SNAP. As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; *p < 0,05 comparado com o grupo controle (*naïve*); #p < 0,05 comparado com o grupo CLP veículo ou WT.

4.9 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE β -ARRESTINA NO RIM DE ANIMAIS SÉPTICOS

Além da GRK, outra importante proteína envolvida na dessensibilização dos GPCR, como os receptores adrenérgicos e AT1, é a β -arrestina. A β -arrestina também pode ser modulada pelo NO e alterar as vias canônicas de sinalização e internalização do receptor e também auxilia na regulação de GRK. Desta forma, nós investigamos se o conteúdo de β -arrestina estaria alterado no rim e no coração dos animais sépticos, 24 h após a indução da sepse. Interessantemente,

nós encontramos uma redução acentuada nos níveis de β -arrestina em ambos os órgãos (rim e coração) nos camundongos sépticos em comparação ao grupo controle (**Figura 16**).

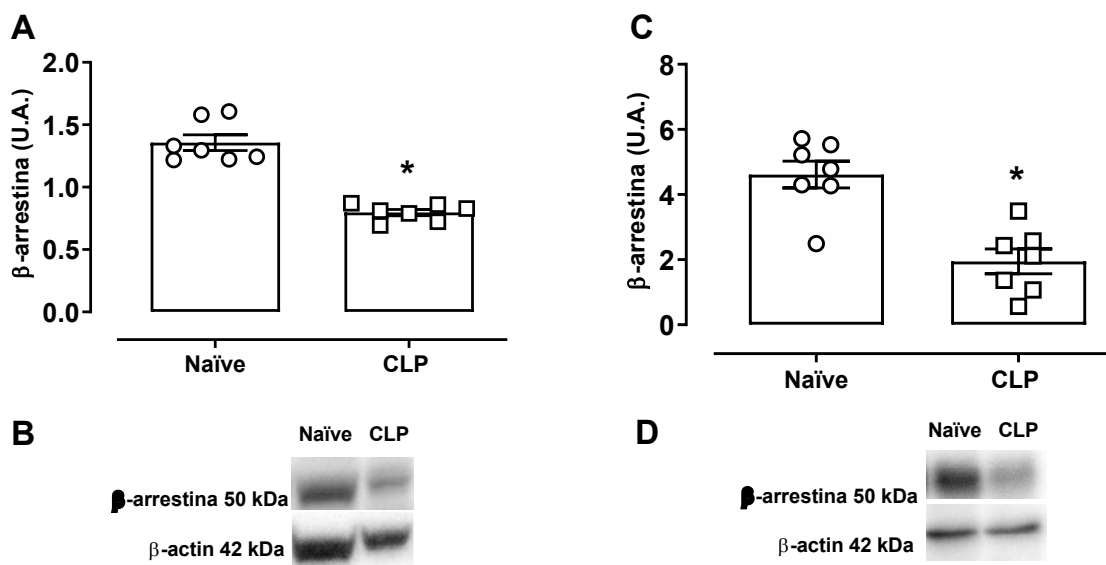


Figura 16. Níveis de β -arrestina em tecido renal e cardíaco de camundongos sépticos. Representação gráfica (**Painéis A e C**) e imagens representativas das bandas obtidas por *Western blot* para β -arrestina (**Painéis B e D**) no rim (**Painéis A e B**) e coração (**Painéis C e D**) de camundongos, 24 h após a indução da sepse. As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a um animal. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle (*naive*).

4.10 EFEITO DA VIA DO ÓXIDO NÍTRICO NOS NÍVEIS DE GRK2 EM CÉLULAS LLC-PK1

Na tentativa de melhor explorar o mecanismo no qual o NO regula negativamente a GRK2, nós utilizamos células de epitélio renal de porco, LLC-PK1, expostas a um doador de NO (SNAP). As células foram tratadas com SNAP (0,01, 0,1 ou 1 mM) e o conteúdo de GRK2 foi determinado por imunofluorescência e por *Western blot*, após 4 h. Como resultado, o tratamento com o SNAP reduziu o conteúdo de GRK2 em todas as concentrações testadas (**Figuras 17A e 17B e Figuras 18A e 18B**), reproduzindo o dado obtido no rim de camundongos tratados com o doador de NO.

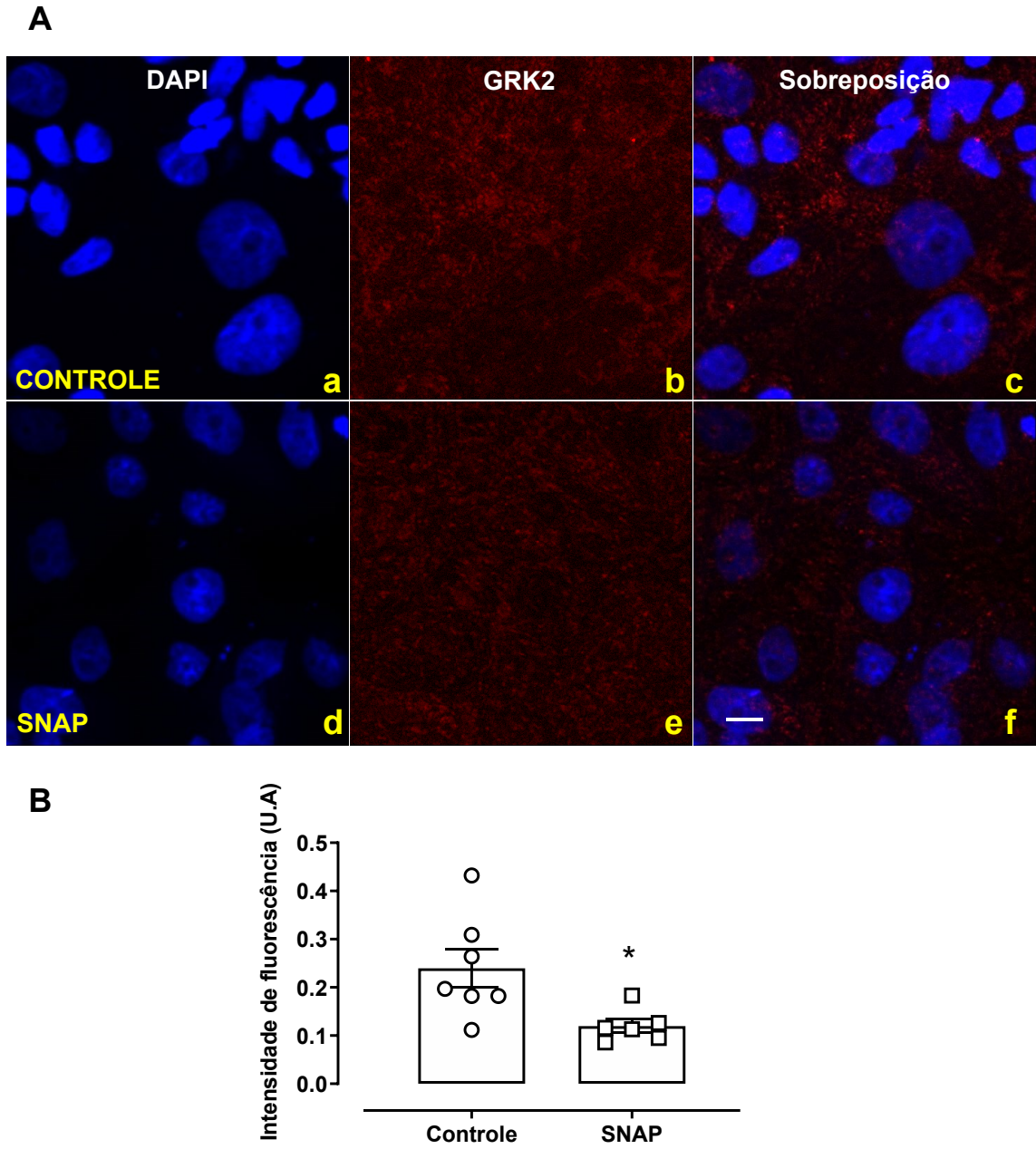


Figure 17. Efeito do SNAP nos níveis de GR2 em células LLC-PK1. Imagens representativas (**Painel A**) e representação da gráfica (**Painel B**) da marcação com GRK2 (vermelho; **b e e**) e DAPI (azul; **a e d**) de células tratadas com SNAP (**d, e e f**; 0,1 mM, por 4 h) e de células não estimuladas (**a, b e c**). As Figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal; escala = 10 μ m. As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a média de cada repetição. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle.

Nosso próximo objetivo foi investigar o mecanismo no qual o NO participa da regulação negativa da GRK2. Dessa forma, o experimento realizado constitui na inibição da guanilato ciclase solúvel, com o ODQ (1 μ M). As células foram tratadas com ODQ, por 30 min e depois tratadas com SNAP (0,1 mM, por 4 h). Conforme demonstrado na **Figura 18**, o tratamento com ODQ foi capaz de prevenir a perda de GRK2 em células LLC-PK1.

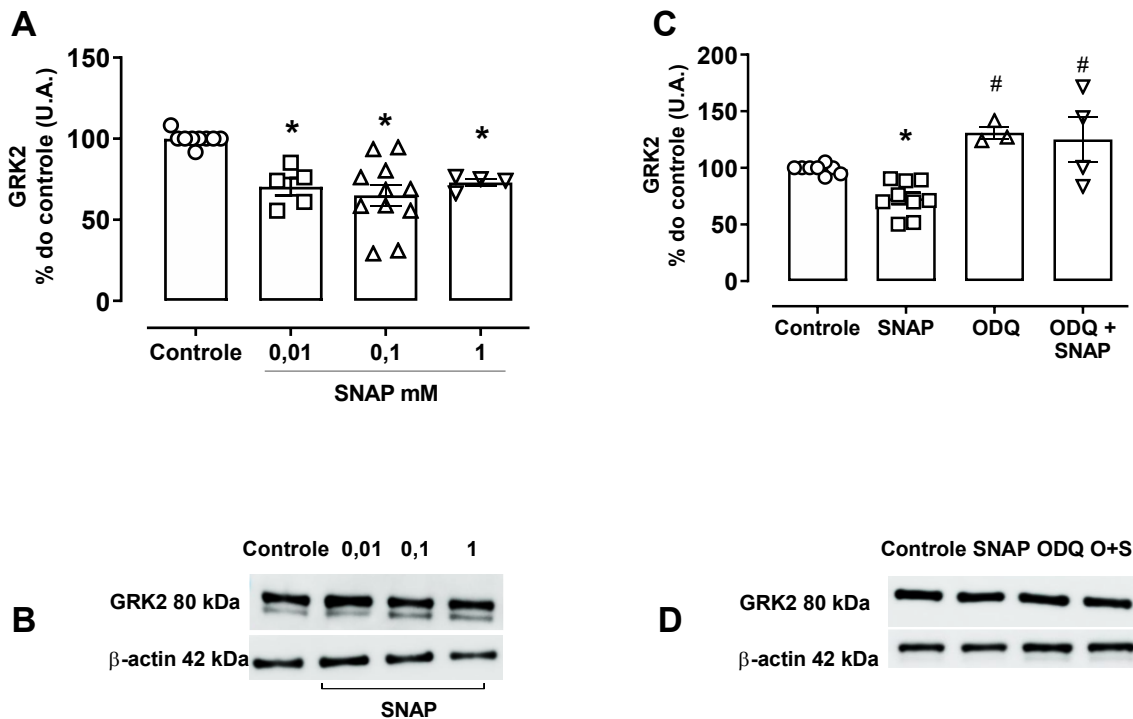
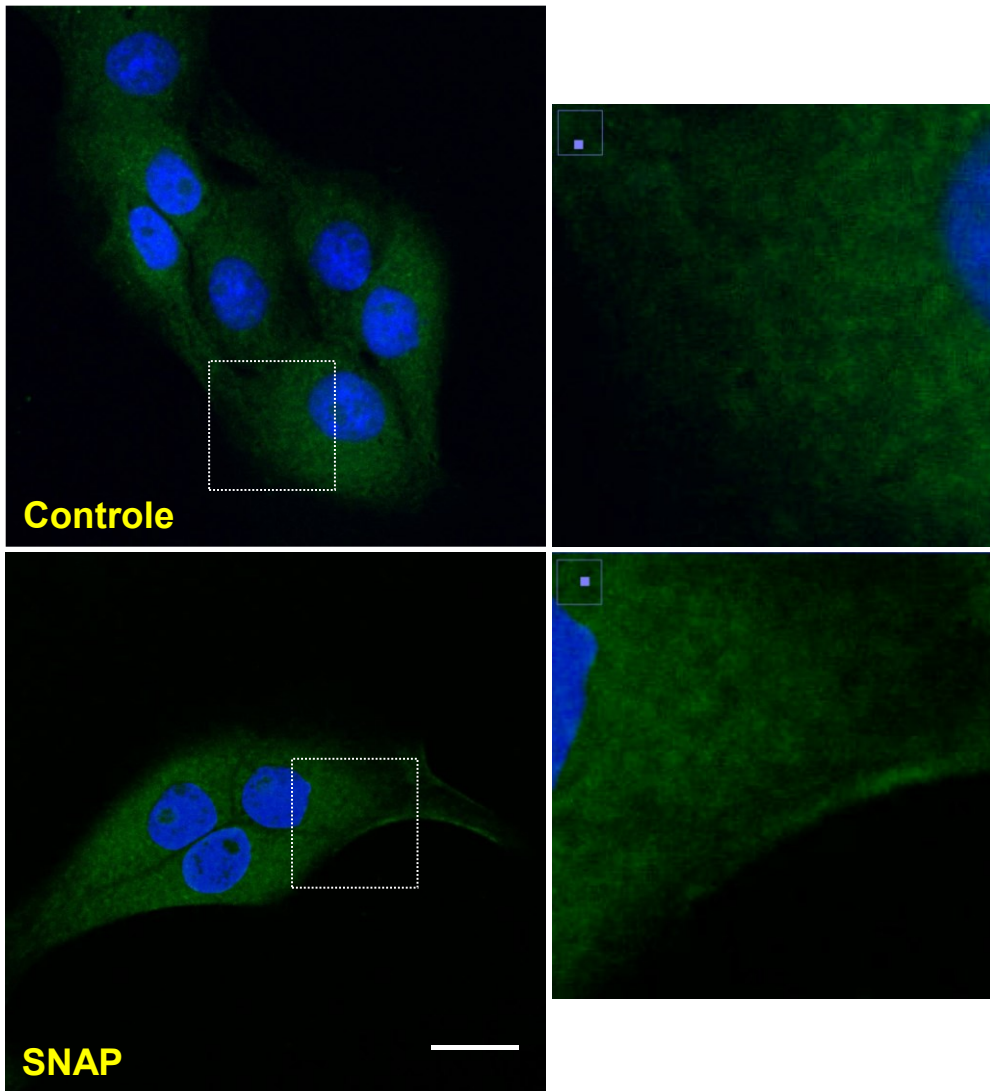


Figura 18. Efeito do tratamento com SNAP e com ODQ no conteúdo de GRK2 em células LLC-PK1. Representação gráfica (**Painel A e C**) e imagens representativas das bandas obtidas por *Western blot* para GRK2 (**Painel B e D**) dos níveis de GRK2 em células LLC-PK1 incubadas com SNAP (0,01, 0,1 e 1 mM, por 4 h) e pré-incubadas com ODQ (1 μ M, por 30 min). As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a média de cada repetição. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle; # $p < 0,05$ comparado com o grupo SNAP.

4.11 EFEITO DO SNAP NA DENSIDADE DE RECEPTORES α_1 ADRENÉRGICOS EM CÉLULAS LLC-PK1

Tendo em vista a diminuição da GRK2 após o tratamento com SNAP, nós investigamos a densidade de receptores α_1 adrenérgicos nas células LLC-PK1. Para tanto, as células foram incubadas com SNAP (0,1 mM; por 4 h), foram fixadas e marcadas com o BODIPY[®] FL prazosina (QAPB; 10 μ M). Podemos observar na **Figura 19**, que não houve diferença na intensidade total de fluorescência entre as células com SNAP e as células controle. Todavia, quando aproximamos a imagem (300x), percebemos que há uma diferença no perfil da marcação pelo QAPB, sugerindo diferença na compartimentalização do receptor α_1 adrenérgico.

A



B

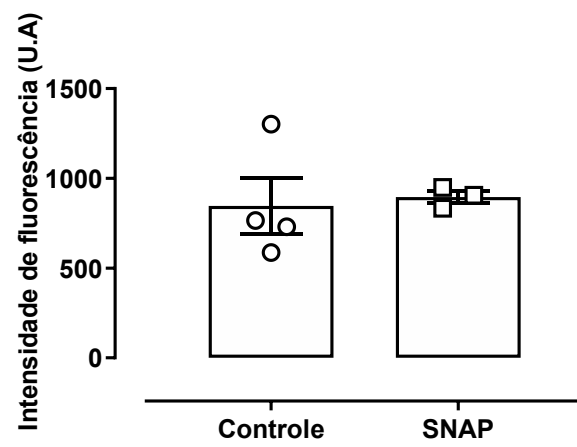


Figure 19. Densidade de receptores α 1 adrenérgicos em células LLC-PK1. Imagens representativas (**Painel A**) e apresentação gráfica (**Painel B**) da marcação com BODIPY™ FL Prazosina (QAPB, verde) e DAPI (azul) em células LLC-PK1 tratadas com SNAP (0,1 mM, por 4 h). Foram obtidas pelo menos 3 imagens de cada animal para quantificação. As Figuras representam a projeção máxima de todas as imagens capturadas no eixo “z” utilizando microscópio confocal; escala = 10 μ m. As barras representam a média + E.P.M. e cada símbolo corresponde a uma repetição. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student; **p* < 0,05 comparado com o grupo controle.

4.12 EFEITO DO MG132 NOS NÍVEIS DE GRK2 EM CÉLULAS LLC-PK1

Na tentativa de clarificar o mecanismo no qual o NO regula a GRK2 e considerando que há diminuição do conteúdo celular de GRK2, nós investigamos um possível aumento na degradação da enzima. Para isso, o experimento foi desenhado utilizando um inibidor de proteassoma e calpaína, MG132 (10 μ M, por 30 min) em células tratadas com SNAP (0,1 mM, por 4 h). Como resultado, notamos que o tratamento com MG132 não foi capaz de prevenir a perda de GRK2 decorrente do tratamento com SNAP em células LLC-PK1 (**Figura 20**).

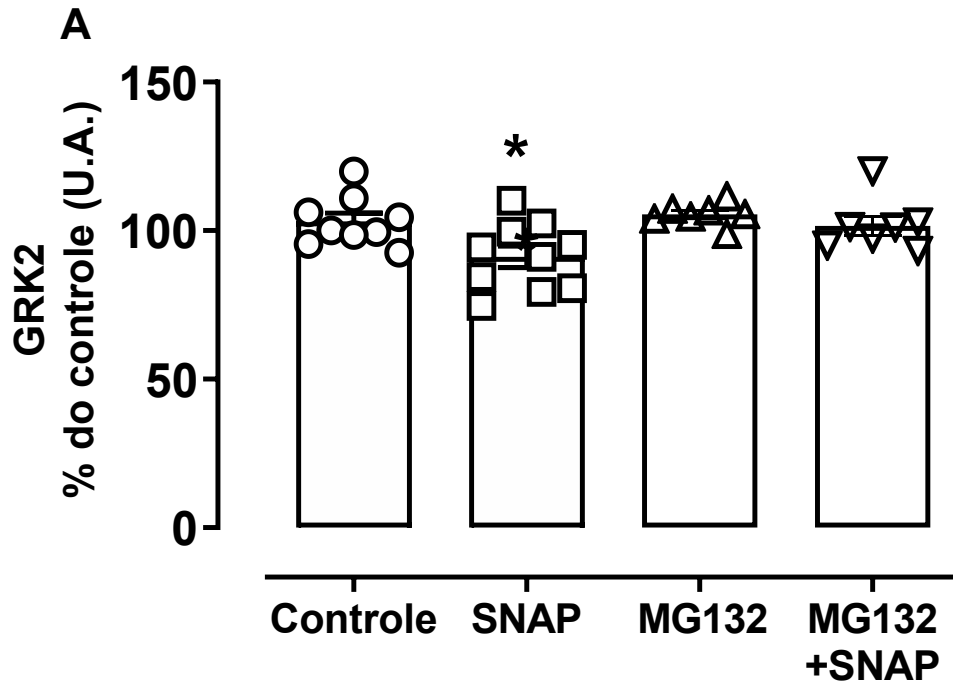


Figura 20. Efeito do tratamento com MG132 no conteúdo de GRK2 em células LLC-PK1. Representação gráfica (**Painel A**) e imagem representativa das bandas obtidas por *Western blot* para GRK2 (**Painel B**) dos níveis de GRK2 em células LLC-PK1 tratadas com MG132 (10 μ M, 30 min) e depois com SNAP (0,1 mM, por 4 h). As barras representam a média + E.P.M e cada símbolo corresponde a uma repetição. A análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via, seguido pelo teste *post-hoc* de Bonferroni; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle

5 DISCUSSÃO

A sepse ainda é um desafio na clínica médica, com altas taxas de incidência e de mortalidade. Apesar dos avanços na compreensão da fisiopatologia da sepse e o estabelecimento de diretrizes para o seu manejo, nenhuma abordagem farmacológica tem sido eficaz na diminuição da gravidade e progressão desta condição.

Sabe-se que a disfunção orgânica desencadeada na sepse é sistêmica entretanto, a falência do sistema cardiovascular é determinante na evolução do quadro clínico e é uma das mais relevantes. Quando o sistema cardiovascular falha, há prejuízo no fornecimento adequado de sangue para os tecidos, levando a hipóxia tecidual e contribuindo para a falência dos órgãos e letalidade na sepse (CAUWELS, 2007).

A disfunção cardiovascular impacta diretamente na funcionalidade do sistema renal na sepse e é apontada como responsável pela instalação da insuficiência renal aguda (IRA). Acredita-se que a hipoperfusão e a desregulação da microcirculação renal geram um dano isquêmico e disfunção tubular, resultando na falência do órgão. Entretanto, a IRA também pode ser desencadeada por um processo inflamatório local e lesão oxidativa, gerando apoptose das células tubulares renais, mecanismo proposto em cenários no qual o fluxo sanguíneo renal se mantém constante. Apesar dos diversos estudos sobre a IRA associada à sepse, os mecanismos fisiopatológicos desta entidade clínica ainda não estão completamente elucidados (revisado por SKUBE, et al., 2018). Nesse contexto, o presente estudo objetivou clarificar os mecanismos associados a IRA na sepse e contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Para o desenvolvimento deste trabalho nós utilizamos o modelo experimental de sepse por CLP em camundongos. O modelo de sepse por CLP, considerado padrão ouro para o estudo da sepse experimental, mimetiza vários aspectos clínicos da sepse em humanos (RITTIRSCH et al., 2009) e representa a evolução de uma infecção abdominal polimicrobiana, uma das mais comuns no desenvolvimento do quadro séptico, perdendo apenas para a origem pulmonar. Embora seja amplamente utilizado, o modelo de sepse por CLP apresenta uma grande variabilidade, sendo importante a sua padronização para que não haja heterogeneidade na intensidade da infecção gerada nos animais de estudo. Com base nas taxas de mortalidade da sepse, nós padronizamos a cirurgia de CLP para

uma mortalidade ao redor de 50% dos animais em 24 h após o procedimento cirúrgico. Para evitar sacrifícios e dano desnecessário e dada a longa experiência do laboratório com este modelo, optamos por não realizar curvas de sobrevida.

Os camundongos submetidos à cirurgia de CLP apresentaram sinais clínicos comuns ao modelo, como piloereção, olhos incrustados, cifose vertebral, dispneia e letargia (SOTOCINAL et al., 2011). Além disso, a avaliação da pressão arterial mostrou que os animais estavam hipotensos, 24 h após a cirurgia. Também, a resposta vascular estava significativamente prejudicada, visto que a administração do agente vasopressor, fenilefrina, não induziu mudanças na pressão sanguínea. Assim, esses achados indicam o desenvolvimento do quadro característico do choque séptico nos animais e justificam a não-realização da curva de mortalidade.

Na sepse, a queda da pressão sanguínea e a hipoperfusão tecidual levam a ativação de vias regulatórias para tentar restabelecer as condições fisiológicas. Nesse âmbito, baroreceptores e outros mecanismos reflexos são estimulados, levando a ativação dos sistemas adrenérgico, renina-angiotensina e de outros componentes. São liberados altos níveis de noradrenalina (GROVES et al., 1973; BENEDICT et al., 1992) e renina (TAMION, et al., 2004) durante a sepse, indicando a ativação de ambos os sistemas. Todavia, estes e outros sistemas vasoconstritores falham em reverter a hipotensão, pois há uma perda na capacidade de resposta da vasculatura sistêmica. Por conseguinte, os leitos vasculares permanecem dilatados e a hipotensão é refratária apesar da produção endógena e da administração de fármacos vasopressores na área clínica.

Em contrapartida, a resposta vascular no rim é oposta a maioria dos leitos vasculares. Isto é, enquanto há uma vasodilatação sistêmica, como no leito esplâncnico, o leito renal está contraído durante a sepse. O trabalho de BERNARDELLI et al., (2015), demonstrou que, em ratos submetidos ao CLP, a responsividade da artéria renal à fenilefrina e outros vasoconstritores, como noradrenalina e angiotensina II, é inalterada, embora ocorra hiporresponsividade na artéria mesentérica superior e na artéria carótida. No presente trabalho, nós evidenciamos esse quadro paradoxal através da fluxometria por laser Doppler. O fluxo sanguíneo basal estava reduzido no leito renal dos animais sépticos, mas não na veia da cauda, usada como comparativo. Neste mesmo contexto,

BOFFA E ARENDSHORST (2005) relataram que há uma diminuição do fluxo sanguíneo renal e da filtração glomerular, um aumento da resistência vascular renal e hipotensão em camundongos endotoxêmicos, corroborando com nossos achados.

Esse quadro distinto entre os leitos renal e não renais da sepse fica ainda mais evidente com a infusão de fenilefrina nos camundongos. A administração do vasoconstritor causou uma diminuição do fluxo sanguíneo na veia caudal dos animais do grupo controle, porém nos animais sépticos ocorreu a perda da resposta contrátil e não vimos alterações de fluxo sanguíneo pelo laser Doppler. A perda da reatividade vascular à vasopressores já foi demonstrada em diferentes leitos e em modelos de sepse e endotoxemia, corroborando com nosso resultado (FERNANDES, et al., 2006; KANDASAMY, et al., 2011; HOREWICZ, et al. 2015). Já no rim, não observamos alterações no fluxo sanguíneo na presença de fenilefrina em ambos os grupos controle e séptico.

O rim, fisiologicamente, possui mecanismos de auto-regulação em resposta a alterações de pressão de perfusão. Estes mecanismos atuam no sentido de preservar a taxa de filtração glomerular (TFG) e o fluxo sanguíneo renal em valores constantes. Por diferentes mecanismos, ocorrem ajustes na resistência das arteríolas aferente (pré-glomerular) e eferente (pós-glomerular), mantendo a pressão hidrostática dos capilares glomerulares e a TFG (revisado por BURKE, 2014). Neste cenário, a redução ou perda da capacidade de autorregulação do rim está associada com patologias. Já foi demonstrado que, em modelos de insuficiência renal por isquemia e reperfusão, ocorre uma diminuição no diâmetro basal da arteríola aferente, prejudicando o controle da TFG e reduzindo o fluxo sanguíneo glomerular (FENG, 2021). O resultado que nós obtivemos na avaliação do fluxo sanguíneo renal após a infusão de fenilefrina em animais *naïve*, sugere que os mecanismos autoregulatórios do rim estão sendo ativados em resposta as alterações de pressão sanguínea e o fluxo sanguíneo renal se mantêm nos valores basais. Já nos animais sépticos, a ausência de alterações no fluxo sanguíneo renal induzidas pela fenilefrina, sugere que o leito renal já estava contraído, pois o fluxo sanguíneo renal basal já estava reduzido em comparação com o grupo controle, evidenciando a falha no mecanismo auto-regulatório.

Um resultado muito interessante apresentado nesse trabalho, é que quando nós tratamos os animais sépticos com a prazosina, antagonista do receptor α_1 adrenérgico, houve uma melhora no fluxo sanguíneo renal. Esse achado indica que a vasoconstrição renal na sepse é decorrente de uma ação exacerbada da via α_1 adrenérgica. No rim, tanto as arteríolas aferentes quanto as eferentes respondem à ação das catecolaminas. Quando há diminuição de pressão de perfusão renal, por exemplo, a noradrenalina e a adrenalina interagem com os receptores α_1 adrenérgicos, que estão localizados principalmente nas arteríolas aferentes. Por sua vez, a contração das arteríolas aferentes promove a diminuição do fluxo sanguíneo renal e da TFG (WILSON, 1986; KOEPPEN E STANTON, 2013). Nesse ponto, é válido ressaltar que a noradrenalina é o agente de escolha para o tratamento do choque séptico, porém, na tentativa de reverter a vasodilatação, a noradrenalina pode induzir um maior prejuízo na função renal, causando vasoconstrição renal e isquemia (LANKADEVA, 2016; HALLENGREN, 2017). Na cauda dos animais sépticos, o fluxo sanguíneo não foi alterado na presença da prazosina, indicando a hiporreatividade do sistema, como já descrito na literatura.

Considerando o prejuízo no fluxo sanguíneo renal nos animais sépticos, nós investigamos o comprometimento da função renal. A presença de IRA associada ao quadro de sepse foi confirmada pela elevação plasmática dos níveis de creatinina e ureia, importantes marcadores da função renal. É interessante ressaltar que uma duplicação dos valores plasmáticos de creatinina indica perda de 50% da função renal (KHWAJA, 2012) e nossos resultados mostraram um aumento de cerca de três vezes nesses valores em relação aos animais controle.

Conforme mencionado anteriormente, a IRA na sepse também pode se desenvolver a partir da resposta inflamatória local e lesão tecidual, além da disfunção vascular. Já foi relatado que a IRA pode estar presente mesmo na ausência de hipoperfusão renal e sinais de disfunção hemodinâmica (revisado por PEERAPORN RATANA, et al., 2019). No presente estudo, a análise histopatológica mostrou que ocorre degeneração hidrópica nos túbulos renais dos camundongos sépticos. A degeneração hidrópica nos túbulos renais, caracterizada por um acúmulo de água no citoplasma, é gerada por um desequilíbrio hidroeletrólítico celular e é mais sensível à isquemia do que em outras estruturas. Uma das principais causas da degeneração hidrópica é a hipóxia, pois a falta

de oxigênio altera a respiração celular, levando à uma queda da síntese e/ou disponibilidade do ATP. Por sua vez, a queda nos níveis de ATP afeta diversos processos celulares, como o funcionamento da bomba de Na^+/K^+ -ATPase, retendo Na^+ e água na célula. Condições que agridam a integridade da membrana celular, como danos por radicais livres também podem levar a degeneração hidrópica. Não encontramos outras significativas alterações celulares de necrose no tecido renal. Em concordância com nossos resultados, análises histopatológicas *post mortem* no rim de pacientes sépticos, revelaram lesões tubulares e morte celular em apenas 5% das amostras, sendo identificada a presença de vacúolos hidrópicos e pequenos focos de expansão da matriz mesangial (HOTCHKISS, et al., 1999). Uma revisão sistemática que reuniu dados de pacientes sépticos e de animais submetidos à sepse experimental, mostrou que as alterações histopatológicas são mínimas ou não existentes no rim, apesar do desenvolvimento da IRA (LANGENBERG, et al., 2008). Como uma descrição minuciosa da morfologia renal não estava entre nossos objetivos, não aprofundamos estas análises. Em resumo, os achados histológicos e a elevação dos valores plasmáticos de creatinina e ureia mostram claramente a disfunção renal nos animais sépticos.

Retomando a discussão acerca da hiporreatividade aos agentes vasopressores e inotrópicos na sepse, ainda não se tem clareza sobre os mecanismos causadores deste quadro. Sabe-se que o prejuízo na resposta de ligantes pode estar relacionado com a dessensibilização ou heterodimerização de receptores, alterações na cascata de transdução, exaustão dos componentes da transdução e outros. Na sepse, uma das explicações para a perda da reatividade vascular e cardíaca se dá pela dessensibilização dos receptores adrenérgicos (KANDASAMY, et al., 2016, DAL-SECCO, et al., 2017).

Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa mostraram que há uma diminuição na densidade dos receptores α_1 e β_1 adrenérgicos na aorta e no coração, respectivamente, de animais submetidos à sepse, consistente com a hiporreatividade às catecolaminas (resultados não-publicados e DAL-SECCO et al., 2017). No presente trabalho, nós também avaliamos a densidade do receptor β_1 adrenérgico no coração dos camundongos sépticos. Corroborando com o trabalho de DAL-SECCO (2017), nós confirmamos que ocorre uma diminuição na densidade do receptor β_1 adrenérgico

cardíaco, indicando o prejuízo da resposta adrenérgica e da contratilidade no coração séptico.

Com base nas informações e na literatura descritas anteriormente, nós nos perguntamos se a diferença na resposta adrenérgica do leito renal em comparação com leitos extra-renais na sepse poderia estar relacionada com a modulação do receptor $\alpha 1$ adrenérgico, subtipo responsável pela contração vascular. Assim, nossa hipótese foi de que no leito renal não ocorre a regulação negativa do receptor $\alpha 1$ adrenérgico, como é observado em outros leitos.

De fato, o resultado inédito apresentado nesse trabalho mostrou, através do ensaio de ligação com o BODIPY[®] FL prazosina, que há um aumento na densidade do receptor $\alpha 1$ adrenérgico no rim mas não no coração de animais durante a sepse. Esse achado nos sugere uma possível explicação para a diferença de reatividade no leito renal e reforça nossa hipótese de que a vasoconstrição renal na sepse ocorre por um mecanismo dependente do receptor $\alpha 1$ adrenérgico. Além disso, considerando que o fluxo sanguíneo renal nos animais sépticos foi melhorado pelo bloqueio do receptor $\alpha 1$ adrenérgico (através da prazosina), fica evidente o papel exacerbado desta via na disfunção renal.

Um aspecto importante sobre a análise do receptor $\alpha 1$ adrenérgico no rim é que o ensaio realizado não nos permitiu diferenciar a localização do receptor no tecido. Isto é, através do ensaio de ligação com o BODIPY[®] FL prazosina, nós observamos uma marcação fluorescente em todo o tecido (vasos e túbulos). Embora este achado não tenha sido explorado em maior detalhe, sabe-se que os receptores adrenérgicos também são abundantes nos túbulos renais e participam de processos como a reabsorção de Na^+ , por exemplo. Além disso, já foi relatado na literatura que há uma diferença no subtipo do receptor $\alpha 1$ adrenérgico presente nos vasos e nos túbulos, sendo os subtipos $\alpha 1A$ e $\alpha 1B$ predominantes nos túbulos e $\alpha 1D$ predominante nos vasos, além de diferenças na transdução do sinal e internalização do receptor entre os subtipos (CHALOTHORN, et al., 2002 e revisado por AKINAGA, GARCÍA-SÁINZ E PUPO, 2019). Apesar de não termos evidências sobre como e se os receptores $\alpha 1$ adrenérgicos tubulares interfeririam diretamente no tônus vascular renal, os efeitos indiretos devido à sua ativação, como produção/liberação de renina, manuseio de sódio, secreção de

prostanóides, ativação/inibição de canais de potássio e outros, são mecanismos possíveis que ligam os receptores α_1 tubulares a regulação do tônus renal (DIBONA, 1985; LEEUW E BIRKENHÄGER, 1988; CLARKE E GARG, 1991; GARG, 1992).

Dando continuidade a nossa investigação, buscamos entender o paradoxal aumento da densidade do receptor α_1 adrenérgico no rim durante a sepse. Dados prévios do laboratório mostraram que a diminuição da densidade do receptor adrenérgico no tecido cardíaco na sepse é associada ao aumento da GRK2. Foi demonstrado que a inibição da GRK2 restaura a resposta cardíaca à isoprenalina, agonista β adrenérgico, melhorando a performance cardíaca na sepse (DAL-SECCO, et al., 2017).

A GRK2 é uma das isoformas mais relevantes no sistema cardiovascular e está envolvida na regulação dos receptores adrenérgicos. Fisiologicamente, os receptores ativos são fosforilados pela GRK, interagem com as β -arrestina e são internalizados. No entanto, em condições patológicas, como na sepse, o aumento da atividade da GRK gera uma diminuição da densidade de receptores e, conseqüentemente, prejuízo na sinalização. Da forma inversa, uma eventual inibição da GRK poderia levar a uma ação exacerbada do ligante pelo excesso de receptores. Dentro dessa conjuntura, nossa segunda hipótese foi que a densidade do receptor α_1 adrenérgico aumenta no rim séptico devido a uma alteração na atividade/quantidade de GRK2.

Os resultados obtidos neste trecho do estudo revelaram que o nível proteico e de RNAm da GRK2, de fato, diminuíram acentuadamente no rim durante a sepse. Níveis reduzidos de GRK2 também foram identificados no pulmão de camundongos sépticos, órgão cuja reatividade vascular também é mantida durante a sepse, resultando em hipertensão local (ROSALES, 2017). Esses achados são interessantes, pois mostram que leitões que não apresentam hiporreatividade à agentes constritores na sepse, possuem uma modulação negativa de GRK2.

Já no coração dos animais sépticos, nossos dados confirmam o achado de DAL-SECCO et al. (2017), mostrando um aumento dos níveis proteicos de GRK2. Não houve diferença na quantidade de RNAm de GRK2 no coração séptico em comparação com o controle, porém sabe-se que o RNAm é consumido no processo de produção da proteína. Assim, sugere-se que alta produção de GRK2 cardíaca poderia estar consumindo o excesso da expressão do RNAm ou ainda, que os elevados níveis de

GRK2 poderiam estar associados com a inibição dos mecanismos de degradação da proteína no coração séptico.

Outro elemento importante abordado na hipótese desta tese é o NO. O NO, mediador relevante na disfunção cardiovascular na sepse, está envolvido em diferentes vias de sinalização (revisado por ASSREUY, 2006). Além disso, já está bem estabelecido que o NO tem um papel chave na vasodilatação excessiva e na hiporreatividade vascular à agentes vasoconstritores na sepse (revisado por FERNANDES E ASSREUY, 2008). Resultados prévios do nosso grupo de pesquisa demonstram que o aumento da pressão arterial de ratos induzido por doses crescentes de fenilefrina é muito reduzido após a infusão de um doador de NO (SILVA-SANTOS & ASSREUY, 1999). O estudo de DAL-SECCO et al (2017) também relacionou o NO a hiporreatividade cardíaca na sepse. Foi demonstrado que a inibição da NOS-2 melhorou a resposta cardíaca à isoprenalina na sepse, através da preservação da densidade do receptor β 1 adrenérgico. Além disso, o trabalho evidencia que o NO ativa a GRK2 cardíaca na sepse por um mecanismo dependente de GMPc, levando à um aumento da internalização do receptor β 1 adrenérgico. Neste ponto nós nos perguntamos se, mesmo que aparentemente de forma paradoxal, o NO estaria de alguma forma envolvido no quase desaparecimento da GRK2 no rim de animais sépticos.

O primeiro passo foi validar se realmente haveria um aumento nos níveis de NO no tecido renal séptico. Nossos resultados mostram que há um aumento na expressão de NOS-2 e na produção de NO no rim, coincidindo com um nível elevado de NOx no plasma, indicando a participação do NO nas alterações renais da sepse.

Para investigar o papel do NO sobre a GRK2 renal na sepse, nós utilizamos tanto a abordagem farmacológica, com o bloqueio da NOS-2 usando o inibidor seletivo da NOS-2 1400W, como a abordagem genética, usando camundongos *knockout* para a isoforma NOS-2. Ambas as abordagens evidenciaram inequivocamente que a redução na produção de NO ou ausência de uma das suas enzimas de síntese refletiu-se na manutenção dos níveis de GRK2 no rim séptico. A demonstração final da participação do NO na regulação negativa da GRK2 renal veio com o resultado de que o tratamento de animais *naïve* com um doador de NO, SNAP, reduziu os níveis da GRK2 no rim. Interessantemente, a inibição da guanilato ciclase solúvel, principal alvo de ação de NO,

não foi capaz de prevenir a perda da GRK2 renal durante a sepse, indicando que a via NO/GCs/GMPc pode não ser prioritária na inibição da GRK2 no rim. Esse conjunto de resultados foi intrigante, pois mostra um papel oposto do NO na regulação da GRK2 renal e cardíaca na sepse.

O efeito do NO sobre a GRK2 já foi explorado por diversos autores. Na sepse, por exemplo, a expressão da NOS-2 e o aumento na produção de NO em neutrófilos está envolvido com a ativação da GRK2 e consequente aumento da internalização de receptores de quimiocinas, contribuindo para a falência da migração dessas células para o foco infeccioso. Neste caso, a ativação da GRK2 nos neutrófilos pelo NO ocorre por um mecanismo dependente de guanilato ciclase solúvel (GCs)/cGMP/PKG. Corroborando com esse achado, o trabalho de DAL-SECCO et al. (2017), mostrou que a inibição desta via efetora do NO, com inibidores da sGC ou da PKG, impede o aumento da GRK2 e restaura a resposta adrenérgica no tecido cardíaco durante a sepse.

Em contrapartida, Whalen et al. (2007), revelaram que a GRK2 tem sua atividade inibida através da interação com o NO. O NO pode reagir com resíduos de tiol (-SH) presente em cisteínas, levando a formação de nitrosotióis (R-SNO) e alterando funções de proteínas. A S-nitrosilação de resíduos de cisteína (Cis340) da GRK2 é capaz de inibir a fosforilação do receptor, o recrutamento da arrestina e prevenir a internalização de receptores β adrenérgicos. A GRK2 possui cinco cisteínas passíveis de nitrosilação, entretanto, já foi evidenciado que a S-nitrosilação ocorre apenas no resíduo Cis340 através de uma mutação do gene codificante para GRK2 em camundongos *knock-in* (GRK2-C340S) (HUANG et al., 2013).

O mecanismo de S-nitrosilação da GRK2 poderia explicar o que foi observado no rim séptico e constituiu nossa primeira hipótese. Contudo, analisando os dados em conjunto, percebemos que o resultado do RT-PCR indicou que há uma diminuição do conteúdo de RNAm da GRK2 renal. Assim, parece que há um envolvimento do NO na diminuição da expressão de GRK2 e modificações pós-traducionais, como a S-nitrosilação, não são capazes de explicar as alterações do conteúdo de GRK2, considerando a ausência da expressão da proteína no rim séptico. Embora ainda não se saiba a via de inibição da expressão da GRK2 pelo NO, sabe-se que o NO pode interferir diretamente com fatores de transcrição, interferir na estabilidade e na transcrição do

RNA_m e modular cascatas de sinalização (DEMPLE, 1999; ZAMORA, et al., 2002; DHAKSHINAMOORTHY e PORTER, 2004).

Na tentativa de melhor compreender o efeito do NO sobre a GRK2 renal, utilizamos células LLC-PK1 (células de epitélio renal de porco). O tratamento das células com SNAP levou a diminuição do conteúdo de GRK2, de maneira semelhante ao que foi observado no rim dos camundongos tratados com SNAP. O bloqueio da GCs, através do tratamento com ODQ, preveniu a perda de GRK2 pelo SNAP nas células LLC-PK1. Essa descoberta sugere que a via GCs/cGMP/PKG também pode resultar na inibição da GRK2.

Os resultados abordados nesse trabalho sugerem que o NO pode estar participando da regulação negativa da GRK2 através da inibição da expressão da proteína. Entretanto, o NO também pode alterar mecanismos que regulam a degradação de proteínas, como o sistema ubiquitina-proteassoma (LEE, TRIPATHI E MORGAN, 2017). Por exemplo, em células β pancreáticas, já foi demonstrado que o NO ativa a via do proteassoma, resultando na diminuição de substrato do receptor de insulina 2 (IRS-2) associada à diabetes (TANIOKA, 2011).

A via do proteassoma é a principal via de regulação do ciclo de vida da GRK2. Acredita-se que os resíduos de tirosina da GRK2 sejam fosforilados pela c-Src ou MAPK, sinalizando para a ubiquitinação pelas ligases e degradação por proteassoma (revisado por PENELA et al., 2001; PENELA et al., 2019). Assim sendo, pensamos que talvez a via do proteassoma também poderia participar do aumento da degradação de GRK2 e, conseqüentemente contribuir para a diminuição do conteúdo celular de GRK2 induzido pelo NO. Para tanto, pré-tratamos as células LLC-PK1 expostas ao SNAP com o MG132, um inibidor de proteassoma e de calpaína. Os resultados, contudo, mostraram que pelo menos *in vitro* a redução nos níveis de GRK2 pelo NO não parece ser devida à atividade do proteassoma. Pode ser que *in vivo* esta via seja importante.

Quanto a densidade do receptor α 1 adrenérgico nas células LLC-PK1 expostas ao SNAP, nós não visualizamos diferenças na intensidade de fluorescência no ensaio de ligação com BODIPY[®] FL-prazosina, em comparação com as células controle. No entanto, a BODIPY[®] FL prazosina é permeável à membrana celular e, na análise qualitativa das imagens, é possível perceber que há uma alteração na compartimentalização do receptor, sendo a marcação fluorescente mais intensa na

região da membrana celular. Esse dado sugere que há uma menor internalização do receptor nas células expostas ao doador de NO.

Além da sinalização adrenérgica, o sistema renina-angiotensina também participa do processo de vasoconstrição. Ademais, a angiotensina II também está relacionada com o equilíbrio hidroeletrólítico no rim e contribui para a regulação periférica da resposta simpática (revisado por MEHTA e GRIENGLING, 2007). Na sepse, já foi relatado que também há uma diminuição na resposta à angiotensina II na circulação sistêmica, ao passo que o no rim a reatividade é preservada (YU, et al., 2008). O foco do presente estudo foi avaliar a resposta adrenérgica nos vasos renais, entretanto, como dado complementar, nós avaliamos também a densidade do receptor de angiotensina II (AT1). Nós não evidenciamos diferenças na densidade do receptor AT1 no rim dos animais sépticos comparados ao grupo controle. Contudo, esses dados são preliminares e nós não examinamos a resposta frente à angiotensina II e não avaliamos possíveis alterações na compartimentalização do receptor, bem como alterações na transdução de sinal.

Por fim, o último resultado mostrado neste estudo refere-se a modulação da β -arrestina no rim e no coração dos animais sépticos. A β -arrestina, além da GRK, é relevante na internalização e sinalização de GPCR. Classicamente, a β -arrestina interage com o receptor após ele ter sido fosforilado pela GRK. Em seguida, a β -arrestina recruta outras proteínas, como as clatras e AP-2, promovendo a internalização do receptor (revisado por PIERCE e LEFKOWITZ, 2001). As arrestinas também participam da ativação de diferentes vias de sinalização de proteínas cinases, de fatores de transcrição e outras (revisado por GUREVICH e GUREVICH, 2019). Todavia, a S-nitrosilação da β -arrestina pode ativar vias não canônicas da sinalização do receptor, independente do ligante (HAYASHI, et al., 2018). A β -arrestina também já foi descrita no processo de degradação da GRK2, onde a super expressão da β -arrestina leva a proteólise e aumento no *turnover* de GRK2 (PENELA et al., 2001).

No presente estudo, nós buscamos clarificar a relevância da β -arrestina na disfunção renal e cardíaca durante a sepse, relacionando com as possíveis ações sobre a GRK2 ou na resposta tendenciosa do ligante. Como resultado, constatamos que ocorre uma diminuição do conteúdo de β -arrestina no rim e no coração séptico. Nosso dado

ressalta o prejuízo na via de internalização de receptores e reforça nossa hipótese de que a preservação e/ou aumento da densidade de receptores alfa1 adrenérgicos no tecido renal pode estar relacionado com a vasoconstrição e IRA presente na sepse. Além disso, a diminuição da β -arrestina no coração durante a sepse sugere que o aumento na internalização de receptores β adrenérgicos pode estar ocorrendo de uma maneira independente de β -arrestina, evidenciando, mais uma vez, as diferenças na internalização dos receptores adrenérgicos nos rins e coração.

Nossos resultados indicam também possíveis caminhos para uma melhor elucidação do papel da GRK2 e do NO na IRA da sepse. Por exemplo, qual ou quais os mecanismos que o NO utiliza para regular negativamente a GRK2 no rim e, ao mesmo tempo, ativar a enzima no coração durante a sepse. Também, qual a participação de outras isoformas da GRK, como a GRK3 e GRK5, na internalização de receptores adrenérgicos. Outra pergunta importante é qual o efeito da redução nos níveis de GRK2 em outros receptores relevantes no tecido renal, como o receptores AT1 da angiotensina e β adrenérgico. Por fim, ainda é necessário clarificar a localização do receptor α 1 adrenérgico/GRK2 no tecido renal, diferenciando vasos e túbulos e as consequências para a disfunção do órgão na sepse.

6 CONCLUSÃO

Em conclusão, os resultados aqui apresentados sugerem um novo mecanismo para explicar a IRA associada à sepse. A GRK2 no rim diminui significativamente por um mecanismo dependente de NO, resultando na redução da fosforilação e consequente internalização do receptor $\alpha 1$ adrenérgico no rim. A preservação da densidade e/ou funcionalidade desse receptor pode levar à vasoconstrição no rim devido ao aumento da atividade neuro-humoral endógena da sepse, bem como pelo uso de vasoconstritores exógenos na clínica, contribuindo para o desenvolvimento de IRA associada à sepse, conforme exposto na Figura 21. Assim, GRK2 e o receptor $\alpha 1$ adrenérgico podem ser alvos relevantes a serem estudados para reduzir a IRA associada à sepse.

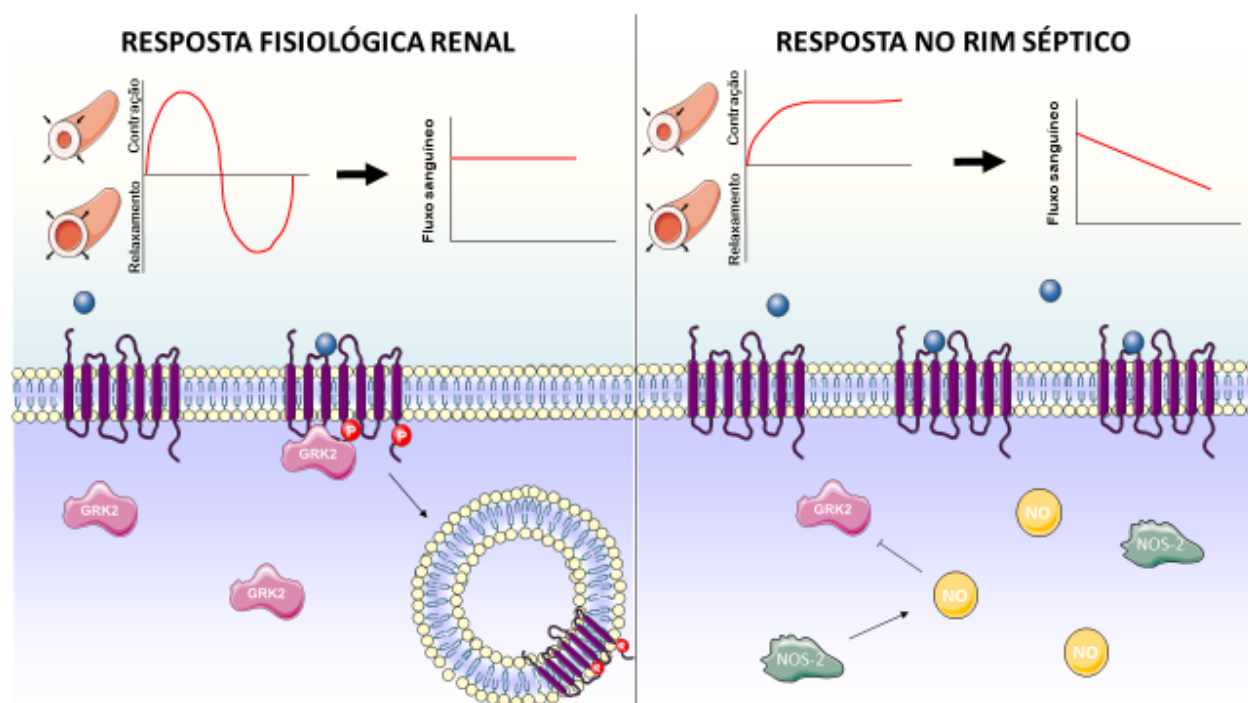


Figura 21. Mecanismo proposto para IRA associada à sepse. Fisiologicamente, o rim possui a capacidade de autoregulação e mantém o fluxo sanguíneo constante (pela contração e relaxamento vascular). O controle da resposta vascular é dependente da manutenção de receptores $\alpha 1$ adrenérgicos. Uma vez ativados, os receptores $\alpha 1$ adrenérgicos são internalizados pela GRK2, mantendo a homeostasia celular. Entretanto, na sepse, ocorre vasoconstrição no rim e perda da capacidade auto-regulatória, devido

a ação exacerbada de catecolaminas, levando à insuficiência renal aguda. Esse mecanismo ocorre devido ao aumento da densidade do receptor α_1 adrenérgico, que não é internalizado devido ao desaparecimento da GRK2 e é dependente do NO.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKINAGA, J.; GARCÍA-SÁINZ, J. A.; S PUPO, A. Updates in the function and regulation of $\alpha 1$ -adrenoceptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 176, n. 14, p. 2343–2357, Jul. 2019.

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

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

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

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

ARRAES, S. M. A. et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, v. 108, n. 9, p. 2906–2913, 1 Nov. 2006.

ARRIETA, O.; RODRIGUEZ-REYNA, T. S.; SOTELO, J. Pharmacological treatment of septic shock. **Expert opinion on therapeutic patents**, v. 10, n. 5, p. 601–622, May 2000.

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

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

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

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

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

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

BENOVIC, J. L. et al. Purification and characterization of the beta-adrenergic receptor kinase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 19, p. 9026–9032, 5 Jul. 1987.

BERNARDELLI, A. K. **Avaliação comparativa da reatividade a vasoconstritores em artérias deratos submetidos à sepse induzida pelo modelo de ligadura e perfuração doceco**. Undergraduate thesis—[s.l.] UFPR, 2015.

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

BURKE, M. et al. Molecular mechanisms of renal blood flow autoregulation. **Current vascular pharmacology**, v. 12, n. 6, p. 845–858, 2014.

CAUWELS, A. Nitric oxide in shock. **Kidney International**, v. 72, n. 5, p. 557–565, Sep. 2007.

CHALOTHORN, D. et al. Differences in the cellular localization and agonist-mediated internalization properties of the alpha(1)-adrenoceptor subtypes. **Molecular Pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 1008–1016, May 2002.

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

CLARKE, D.; GARG, L. C. Alpha-1 adrenergic receptors in renal medullary collecting duct cells. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 259, n. 3, p. 1081–1087, Dec. 1991.

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

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

COTECCHIA, S. The α 1-adrenergic receptors: diversity of signaling networks and regulation. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v. 30, n. 6, p. 410–419, Dec. 2010.

DAL-SECCO, D. et al. Cardiac hyporesponsiveness in severe sepsis is associated with nitric oxide-dependent activation of G protein receptor kinase. **American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology**, v. 313, n. 1, p. H149–H163, 1 Jul. 2017.

DE LEEUW, P. W.; BIRKENHÄGER, W. H. Alpha-adrenoceptors and the kidney. **Journal of Hypertension. Supplement**, v. 6, n. 2, p. S21-4, Dec. 1988.

DEBBURMAN, S. K. et al. G protein-coupled receptor kinase GRK2 is a phospholipid-dependent enzyme that can be conditionally activated by G protein betagamma subunits. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 37, p. 22552–22562, 13 Sep. 1996.

DEMPLE, B. Genetic responses against nitric oxide toxicity. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, n. 11, p. 1417–1427, Nov. 1999.

DHAKSHINAMOORTHY, S.; PORTER, A. G. Nitric oxide-induced transcriptional up-regulation of protective genes by Nrf2 via the antioxidant response element counteracts apoptosis of neuroblastoma cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 19, p. 20096–20107, 7 May 2004.

DIBONA, G. F. Neural regulation of renal tubular sodium reabsorption and renin secretion. **Federation Proceedings**, v. 44, n. 13, p. 2816–2822, Oct. 1985.

DINIZ, L. R. L. **Disfunção renal induzida por modelo polimicrobiano de sepse: Avaliação de componentes do sistema renina-angiotensina**. Doctoral dissertation—[s.l.] UFMG, Feb. 2011.

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

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

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

EDUARDO DA SILVA-SANTOS, J.; ASSREUY, J. Long-lasting changes of rat blood pressure to vasoconstrictors and vasodilators induced by nitric oxide donor infusion: involvement of potassium channels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 290, n. 1, p. 380–387, Jul. 1999.

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

ELORZA, A. et al. MAPK-dependent degradation of G protein-coupled receptor kinase 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 31, p. 29164–29173, 1 Aug. 2003.

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

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

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

FENG, W. et al. Restoration of afferent arteriolar autoregulatory behavior in ischemia-reperfusion injury in rat kidneys. **American Journal of Physiology. Renal Physiology**, v. 320, n. 3, p. F429–F441, 1 Mar. 2021.

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

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

FLEISCHMANN, C. et al. Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 193, n. 3, p. 259–272, 1 Feb. 2016.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. **Cardiovascular Research**, v. 43, n. 3, p. 532–541, 15 Aug. 1999.

FÖRSTERMANN, U.; BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the “constitutive” isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **The FASEB Journal**, v. 12, n. 10, p. 773–790, Jul. 1998.

FOSTER, M. W.; MCMAHON, T. J.; STAMLER, J. S. S-nitrosylation in health and disease. **Trends in Molecular Medicine**, v. 9, n. 4, p. 160–168, Apr. 2003.

FUKUTO, J. M.; CHO, J. Y.; SWITZER, C. H. The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. In: **Nitric Oxide**. [s.l.] Elsevier, 2000. p. 23–40.

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

FURCHGOTT, R. F. Introduction to EDRF research. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 22 Suppl 7, p. S1-2, 1993.

GARCIA-GUERRA, L. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 plays a relevant role in insulin resistance and obesity. **Diabetes**, v. 59, n. 10, p. 2407–2417, Oct. 2010.

GARG, L. C. Actions of adrenergic and cholinergic drugs on renal tubular cells. **Pharmacological Reviews**, v. 44, n. 1, p. 81–102, Mar. 1992.

GILCHRIST, A. Modulating G-protein-coupled receptors: from traditional pharmacology to allosterics. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 28, n. 8, p. 431–437, Aug. 2007.

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

GRANGER, D. L. et al. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. In: **Nitric oxide part A: sources and detection of NO; NO synthase**. Methods in Enzymology. [s.l.] Elsevier, 1996. v. 268p. 142–151.

GROS, R. et al. G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 99, n. 9, p. 2087–2093, 1 May 1997.

GROVES, A. C. et al. Plasma catecholamines in patients with serious postoperative infection. **Annals of Surgery**, v. 178, n. 1, p. 102–107, Jul. 1973.

GUREVICH, V. V.; GUREVICH, E. V. GPCR signaling regulation: the role of grks and arrestins. **Frontiers in pharmacology**, v. 10, p. 125, 19 Feb. 2019.

HALLENGREN, M. et al. Septic shock and the use of norepinephrine in an intermediate care unit: Mortality and adverse events. **Plos One**, v. 12, n. 8, p. e0183073, 24 Aug. 2017.

HAYASHI, H. et al. S-Nitrosylation of β -Arrestins Biases Receptor Signaling and Confers Ligand Independence. **Molecular Cell**, v. 70, n. 3, p. 473- 487.e6, 3 May 2018.

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

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

HOREWICZ, V. V. et al. FPR2/ALX activation reverses LPS-induced vascular hyporeactivity in aorta and increases survival in a pneumosepsis model. **European Journal of Pharmacology**, v. 746, p. 267–273, 5 Jan. 2015.

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

HOTCHKISS, R. S. et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction. **Critical Care Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230–1251, Jul. 1999.

HOTCHKISS, R. S. et al. Sepsis and septic shock. **Nature reviews. Disease primers**, v. 2, p. 16045, 30 Jun. 2016.

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

HUANG, Z. M. et al. Convergence of G protein-coupled receptor and S-nitrosylation signaling determines the outcome to cardiac ischemic injury. **Science Signaling**, v. 6, n. 299, p. ra95, 29 Oct. 2013.

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

IACCARINO, G. et al. Reciprocal in vivo regulation of myocardial G protein-coupled receptor kinase expression by beta-adrenergic receptor stimulation and blockade. **Circulation**, v. 98, n. 17, p. 1783–1789, 27 Oct. 1998

IACOVELLI, L. et al. Regulation of G-protein-coupled receptor kinase subtypes by calcium sensor proteins. **The FASEB Journal**, v. 13, n. 1, p. 1–8, Jan. 1999.

IDALGO, G. C. et al. PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DA SEPSE NAS UNIDADES DE SAÚDE DO ABC PAULISTA, ENTRE OS ANOS DE 2018 E 2020. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 101178, Jan. 2021.

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

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

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

KANDASAMY, K. et al. Erythropoietin Reverses Sepsis-Induced Vasoplegia to Norepinephrine Through Preservation of α 1D-Adrenoceptor mRNA Expression and Inhibition of GRK2-Mediated Desensitization in Mouse Aorta. **Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics**, v. 21, n. 1, p. 100–113, Jan. 2016.

KARA, E. et al. A phosphorylation cluster of five serine and threonine residues in the C-terminus of the follicle-stimulating hormone receptor is important for desensitization but not for beta-arrestin-mediated ERK activation. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 11, p. 3014–3026, Nov. 2006.

KHWAJA, A. KDIGO clinical practice guidelines for acute kidney injury. **Nephron. Clinical practice**, v. 120, n. 4, p. c179-84, 7 Aug. 2012.

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

KILBOURN, R. G. et al. Reversal of endotoxin-mediated shock by NG-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 172, n. 3, p. 1132–1138, 15 Nov. 1990.

KOEPPEN, B. M.; STANTON, B. A. Glomerular filtration and renal blood flow. In: **Renal Physiology**. [s.l.] Elsevier, 2013. p. 27–43.

KOMOLOV, K. E.; BENOVIC, J. L. G protein-coupled receptor kinases: Past, present and future. **Cellular Signalling**, v. 41, p. 17–24, Jan. 2018.

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

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

LANGENBERG, C. et al. The histopathology of septic acute kidney injury: a systematic review. **Critical Care**, v. 12, n. 2, p. R38, 6 Mar. 2008.

LANKADEVA, Y. R. et al. Intrarenal and urinary oxygenation during norepinephrine resuscitation in ovine septic acute kidney injury. **Kidney International**, v. 90, n. 1, p. 100–108, Jul. 2016.

LEE, C.-M.; TRIPATHI, S.; MORGAN, E. T. Nitric oxide-regulated proteolysis of human CYP2B6 via the ubiquitin-proteasome system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 108, p. 478–486, Jul. 2017.

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

LI, J.-L. et al. Assessment of clinical sepsis-associated biomarkers in a septic mouse model. **The Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 6, p. 2410–2422, Jun. 2018.

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

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

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

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

MACHADO, F. R. et al. The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1180–1189, Nov. 2017.

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

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

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

MAYOR, F. et al. G Protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): A novel modulator of insulin resistance. **Archives of physiology and biochemistry**, v. 117, n. 3, p. 125–130, Jul. 2011.

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

MEHTA, P. K.; GRIENDLING, K. K. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 292, n. 1, p. C82-97, Jan. 2007.

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

MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147 Suppl 1, p. S193-201, Jan. 2006.

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

MONCADA, S. et al. An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. **Nature**, v. 263, n. 5579, p. 663–665, 21 Oct. 1976.

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.

NAJAFI, A. et al. β -adrenergic receptor signalling and its functional consequences in the diseased heart. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 46, n. 4, p. 362–374, Apr. 2016.

NAMAS, R. et al. Sepsis: Something old, something new, and a systems view. **Journal of Critical Care**, v. 27, n. 3, p. 314.e1–11, Jun. 2012.

NDUKA, O. O.; PARRILLO, J. E. The pathophysiology of septic shock. **Critical Care Clinics**, v. 25, n. 4, p. 677–702, vii, Oct. 2009.

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

OCHOA, J. B. et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Annals of Surgery**, v. 214, n. 5, p. 621–626, Nov. 1991.

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

OLDHAM, W. M.; HAMM, H. E. Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 9, n. 1, p. 60–71, Jan. 2008.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiological Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315–424, Jan. 2007.

PALMER, T. M.; BENOVIC, J. L.; STILES, G. L. Agonist-dependent phosphorylation and desensitization of the rat A3 adenosine receptor. Evidence for a G-protein-coupled receptor kinase-mediated mechanism. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 49, p. 29607–29613, 8 Dec. 1995.

PAOLI, C. J. et al. Epidemiology and Costs of Sepsis in the United States-An Analysis Based on Timing of Diagnosis and Severity Level. **Critical Care Medicine**, v. 46, n. 12, p. 1889–1897, Dec. 2018.

PAO, C. S.; BARKER, B. L.; BENOVIC, J. L. Role of the amino terminus of G protein-coupled receptor kinase 2 in receptor phosphorylation. **Biochemistry**, v. 48, n. 30, p. 7325–7333, 4 Aug. 2009.

PAULA-NETO, H. A. et al. Inhibition of guanylyl cyclase restores neutrophil migration and maintains bactericidal activity increasing survival in sepsis. **Shock**, v. 35, n. 1, p. 17–27, Jan. 2011.

PEERAPORN RATANA, S. et al. Acute kidney injury from sepsis: current concepts, epidemiology, pathophysiology, prevention and treatment. **Kidney International**, v. 96, n. 5, p. 1083–1099, 7 Jun. 2019.

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

PENELA, P. et al. Beta-arrestin- and c-Src-dependent degradation of G-protein-coupled receptor kinase 2. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 18, p. 5129–5138, 17 Sep. 2001.

PENELA, P. et al. Mechanisms of regulation of G protein-coupled receptor kinases (GRKs) and cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**, v. 69, n. 1, p. 46–56, Jan. 2006.

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

PENELA, P. et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a multifunctional signaling hub. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 22, p. 4423–4446, Nov. 2019.

PENN, R. B.; PRONIN, A. N.; BENOVIC, J. L. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. **Trends in cardiovascular medicine**, v. 10, n. 2, p. 81–89, Feb. 2000.

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

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

PIERCE, K. L.; LEFKOWITZ, R. J. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 2, n. 10, p. 727–733, Oct. 2001.

PRONIN, A. N.; CARMAN, C. V.; BENOVIC, J. L. Structure-function analysis of G protein-coupled receptor kinase-5. Role of the carboxyl terminus in kinase regulation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 47, p. 31510–31518, 20 Nov. 1998.

PRONIN, A. N. et al. Regulation of G protein-coupled receptor kinases by calmodulin and localization of the calmodulin binding domain. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 29, p. 18273–18280, 18 Jul. 1997.

RAMOS-RUIZ, R. et al. Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. **Circulation**, v. 101, n. 17, p. 2083–2089, 2 May 2000.

RIBAS, C. et al. The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 4, p. 913–922, Apr. 2007.

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

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

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

ROSALES, T. O. Envolvimento da cinase de receptor acoplado à proteína G2 (GRK2) e do receptor a1 adrenérgico renal na sepse: um mecanismo para falência renal? 2017.

RUDD, K. E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **The Lancet**, v. 395, n. 10219, p. 200–211, 18 Jan. 2020.

SALLESE, M. et al. Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq. **Molecular Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 826–831, Apr. 2000.

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

SATO, P. Y. et al. The evolving impact of g protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. **Physiological Reviews**, v. 95, n. 2, p. 377–404, Apr. 2015.

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

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

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

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

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

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research. Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, Sep. 2004.

SHIINA, T. et al. Clathrin box in G protein-coupled receptor kinase 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 35, p. 33019–33026, 31 Aug. 2001.

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

SKUBE, S. J. et al. Acute kidney injury and sepsis. **Surgical Infections**, v. 19, n. 2, p. 216–224, 5 Jan. 2018.

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

SOTOCINAL, S. G. et al. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. **Molecular Pain**, v. 7, p. 55, 29 Jul. 2011.

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

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

STRASSER, R. H. et al. Beta-agonist- and prostaglandin E1-induced translocation of the beta-adrenergic receptor kinase: evidence that the kinase may act on multiple adenylate

cyclase-coupled receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 17, p. 6362–6366, Sep. 1986.

SZABÓ, C. et al. Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock. **British Journal of Pharmacology**, v. 108, n. 3, p. 786–792, Mar. 1993.

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide production in various forms of circulatory shock. **New horizons (Baltimore, Md.)**, v. 3, n. 1, p. 2–32, Feb. 1995.

TAGUCHI, K. et al. G protein-coupled receptor kinase 2, with β -arrestin 2, impairs insulin-induced Akt/endothelial nitric oxide synthase signaling in ob/ob mouse aorta. **Diabetes**, v. 61, n. 8, p. 1978–1985, Aug. 2012.

TAGUCHI, K. et al. Tonic inhibition by G protein-coupled receptor kinase 2 of Akt/endothelial nitric-oxide synthase signaling in human vascular endothelial cells under conditions of hyperglycemia with high insulin levels. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 349, n. 2, p. 199–208, May 2014.

TAGUCHI, K. et al. Suppression of GRK2 expression reduces endothelial dysfunction by restoring glucose homeostasis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 8436, 16 Aug. 2017.

TAKASU, O. et al. Mechanisms of cardiac and renal dysfunction in patients dying of sepsis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 187, n. 5, p. 509–517, 1 Mar. 2013.

TAMION, F. et al. Erythropoietin and renin as biological markers in critically ill patients. **Critical Care**, v. 8, n. 5, p. R328-35, Oct. 2004.

TANIOKA, T. et al. Inducible nitric-oxide synthase and nitric oxide donor decrease insulin receptor substrate-2 protein expression by promoting proteasome-dependent

degradation in pancreatic beta-cells: involvement of glycogen synthase kinase-3beta. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 33, p. 29388–29396, 19 Aug. 2011.

TUCKER, W. D.; ARORA, Y.; MAHAJAN, K. Anatomy, Blood Vessels. In: **StatPearls**. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing, 2021.

TUTUNEA-FATAN, E. et al. GRK2 targeted knock-down results in spontaneous hypertension, and altered vascular GPCR signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 8, p. 5141–5155, 20 Feb. 2015.

TUTUNEA-FATAN, E. et al. GRK2 knockdown in mice exacerbates kidney injury and alters renal mechanisms of blood pressure regulation. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 11415, 30 Jul. 2018.

UENO, M.; LEE, T. J. Endotoxin decreases the contractile responses of the porcine basilar artery to vasoactive substances. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 13, n. 4, p. 712–719, Jul. 1993.

UMANS, J. G. et al. Effects of endotoxin in vivo on endothelial and smooth-muscle function in rabbit and rat aorta. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 148, n. 6 Pt 1, p. 1638–1645, Dec. 1993.

WHALEN, E. J. et al. Regulation of beta-adrenergic receptor signaling by S-nitrosylation of G-protein-coupled receptor kinase 2. **Cell**, v. 129, n. 3, p. 511–522, 4 May 2007.

WILSON, S. K. The effects of angiotensin II and norepinephrine on afferent arterioles in the rat. **Kidney International**, v. 30, n. 6, p. 895–905, Dec. 1986.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 25, n. 4–5, p. 434–456, Sep. 1998.

WINK, D. A. et al. The Chemical Biology of Nitric Oxide. Balancing Nitric Oxide with Oxidative and Nitrosative Stress. In: MAYER, B. (Ed.). . **Nitric Oxide**. Handbook of Experimental Pharmacology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000. v. 143p. 7–29.

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

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

YU, H.-P. et al. Hyporeactivity of renal artery to angiotensin II in septic rats. **The Chinese journal of physiology**, v. 51, n. 5, p. 301–307, 31 Oct. 2008.

ZAMORA, R. et al. A DNA microarray study of nitric oxide-induced genes in mouse hepatocytes: implications for hepatic heme oxygenase-1 expression in ischemia/reperfusion. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 7, n. 3, p. 165–186, Nov. 2002.

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