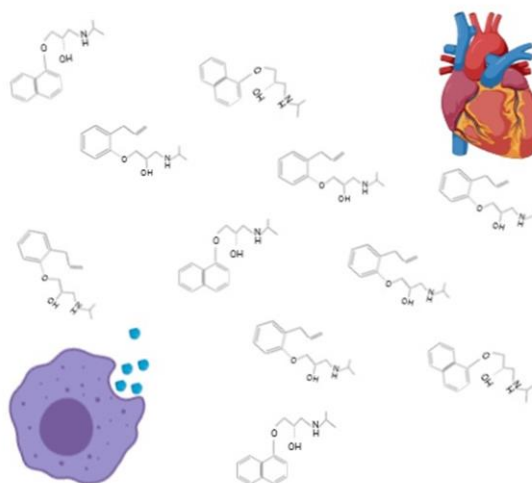


Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
Filho"

Instituto de Biociências de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e
Biotecnologia

Tese de Doutorado

Efeitos dos β -bloqueadores na sepse em camundongos



Katiussia Pinho da Silva

Botucatu-SP
2020

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E BIOTECNOLOGIA

Katiussia Pinho da Silva

Efeitos dos beta-bloqueadores na sepse em camundongos.

Tese apresentada ao Instituto de Biociências da
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
Filho” – Campus Botucatu para obtenção do título
de Doutora em Farmacologia e Biotecnologia.

Orientador: Profº Drº André Sampaio Pupo
Co-orientador: Profº Drº Fernando de Queiroz
Cunha.

Botucatu – SP
2020

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Katiussia Pinho da.

Efeito dos betas-bloqueadores na sepse em camundongos / Katiussia Pinho da Silva. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: André Sampaio Pupo Coorientador:
Fernando de Queiroz Cunha Capes: 21001006

1. Septicemia. 2. Coração. 3. Camundongo como animal de laboratório.
4. Resposta imune.

Palavras-chave: Beta-bloqueadores; Disfunção cardíaca; Eficácia;
Sepse.

Nome: Katiussia Pinho da Silva

Título: Efeitos dos beta-bloqueadores na sepse em camundongos.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Biotecnologia do Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para obtenção do título de Doutora.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Orientador: Prof. Dr. André Sampaio Pupo

Instituição: Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof. Dr. Marcos Ferreira Minicucci

Instituição: Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof. Dr. Eric José Ramos da Silva

Instituição: Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof. Dr^a. Patrícia Fidelis de Oliveira

Instituição: Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Prof. Dr. Carlos Alan Candido Dias Júnior

Instituição: Universidade Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Dedicatória

Ao meu saudoso pai “Cícero Alves” pelo seu exemplo de empatia e ética.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador “André Sampaio Pupo” :

Por saber direcionar com muita elegancia a arte de fazer ciência. Fazer ciência requer muita paciência e entusiasmo todo os dias e este talvez, tenha sido o seu maior legado para mim! Com lágrimas, muito obrigada!

Ao meu co-orientador “ Fernando de Queiroz Cunha”:

O professor Fernando é uma das pessoas mais brilhantes que eu conheço na ciência. Ele é tipo a água na natureza. Ele consegue ver o todo e atacar em pontos-chaves. Muito obrigada por me ensinar a ser água... mesmo ainda sendo pássaro! Muito Obrigada!

Ao meu dedicado companheiro, Anaximandro Braga Brito:

Se dedicar à ciência, te tornas uma pessoa egoísta. O meu egoísmo, tem te deixado sem o convívio com tua amada família.Obrigada! Obrigada pelo o companherismo do dia a dia, as conversar aleatórias sobre os mais diversos temas e, aos risos fáceis! Em lágrimas, muito obrigada!

Agradecimentos

A minha mãe Maria de Lourdes Pinho e à minha irmã Kássia Pinho, por sempre estarem comigo aonde quer que eu esteja! Amo vocês.

Ao aos técnicos do Laboratório de Inflamação e Dor, em especial, **Ana Katia dos Santos, Diva Amábile Montanha de Souza, Juliana Abumasur, Marcela, Sérgio Roberto Rosa e Ieda Regina dos Santos**, por todo o apoio e dedicação diária. Muito Obrigada!

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Dor, em especial à **Lívia Barroso** por dividir comigo o convívio com a nossa Letícia, as dores e as alegrias. À Vanessa de Fátima por me auxiliar nos experimentos com telemetria. À Camila Meireles pelo apoio nos experimentos com macrófagos e a Paula Barbim pela ajuda nos experimentos com PCR.

Ao meu amado corredor da farmacologia da Unesp-Botucatu, de quem eu morri de saudades, mas sempre era uma felicidade nossos reencontros e discussões científicas, em especial: **Mayara Caldeira Dias, José Sérgio Possomato Vieira, Letícia Cavalheiro Polonio, Gabriela Zochio, André Muller, Allan Andrew dos Santos Silva, Ediléia de Souza Paula**. Vou sentir muita falta de vocês!

Aos meus queridos e amados amigos, **Ana Beatriz Remondi e Pedro Cunha Gouvea**, por toda a dedicação e amizade. Nem sei o que faria sem vocês! **Amo vocês!**

À Banca de doutoramento, pela paciência e disponibilidade! Muito Obrigada!

À CAPES, pelo formento fornecido neste período.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino”

Paulo Freire

RESUMO

Introdução: Sepsé é uma das mais antigas síndromes reconhecidas na história da medicina. Atualmente, é descrita como uma resposta inflamatória sistêmica desregulada do hospedeiro à infecção que ocasiona diversos comprometimentos orgânicos. Neste sentido, a disfunção cardíaca é uma das características comum entre os pacientes sépticos e contribui para a taxa de mortalidade associada à sepsé. Dados recentes mostraram que a hiporesponsividade cardíaca na sepsé está relacionada à internalização dos β -adrenoceptores (β -ARs) (Dal Secco, D., *et al.*, 2017). Interessantemente, tem sido apontado o benefício hemodinâmico com a utilização do esmolol (β -bloqueador) na sepsé. É sabido que os β -bloqueadores apresentam um perfil farmacológico distinto entre eles, especialmente no que diz respeito à atividade simpatomimética intrínseca. Ou seja, alguns β -bloqueadores agem como agonistas parciais nos β -ARs e portanto, promovem certo grau de inotropismo positivo. Considerando a associação da disfunção cardíaca na sepsé com a internalização dos β -ARs, esta tese tem como racional farmacológico que os β -bloqueadores com atividade simpatomimética intrínseca (eficácias) variando de “zero” (propranolol, bisoprolol) a “moderado” (carvedilol<alprenolol<bucindolol) melhorem a função cardíaca e a resposta inflamatória por prevenir por competição a internalização dos β -ARs, e além disso garantam algum grau de contratilidade cardíaca. **Objetivo:** Investigar os efeitos do tratamento com β -bloqueadores de diferentes eficácias em camundongos sépticos. **Método:** A sepsé foi induzida em camundongos C57BL/6 machos (8 semanas) por ligação e punção cecal, seguida de tratamento com propranolol, bisoprolol, carvedilol, alprenolol ou bucindolol em doses escolhidas com base na constante de dissociação (K_D) e meia-vida de cada droga. As drogas foram administradas por via intra-peritoneal após a cirurgia, durante a fase hiperdinâmica da sepsé. Após 24 h de indução da sepsé, os camundongos foram utilizados nos seguintes experimentos: a) Ensaio com radioligante [H^3] CGP-12177 para estimar a densidade dos receptores β -ARs no coração; b) RT-qPCR, para avaliar a transcrição gênica; c) Ensaio de contração *in vitro* para avaliar a frequência cardíaca (FC); d) Teste imunoenzimático para quantificar os níveis séricos, cardíacos e em cultura isolada de macrófagos de troponina-I, IL-1 β e TNF; e) bacteremia; f) avaliação *in vivo* da hemodinâmica basal e da responsividade à isoprenalina; g) avaliação da curva de sobrevivência. **Resultados:** Houve redução na densidade dos β -ARs na superfície celular cardíaca e do RNA m para os β_1 -ARs em camundongos sépticos. Entretanto, a redução da densidade dos β -ARs observada na sepsé foi prevenida pelos tratamentos com propranolol, bisoprolol, alprenolol, mas não pelo carvedilol ou bucindolol. Interessantemente, foi observado aumento do transcrito do RNAm que codifica o β_1 -AR no coração de camundongos sépticos tratados com propranolol, bisoprolol, carvedilol ou bucindolol. Mais ainda, a reatividade do coração camundongos sépticos à isoprenalina foi severamente comprometida, mas os tratamentos com propranolol e alprenolol reverteram parcialmente a reatividade. Adicionalmente, os camundongos sépticos apresentaram altos níveis de troponina-I, IL-1 β e TNF. O tratamento com todos os β -bloqueadores reduziu os níveis séricos e local tanto de IL-1 β quanto de TNF, bem como em cultura isolada de macrófagos. Entretanto, somente os tratamentos de camundongos sépticos com propranolol ou alprenolol reduziram os níveis plasmáticos de troponina-I. Além disso, o propranolol reduziu a bacteremia, embora não tenha efeito microbicida. Camundongos sépticos apresentaram hipotensão e bradicardia e os tratamentos destes animais com propranolol, bisoprolol ou alprenolol preveniram parcialmente tanto a hipotensão quanto a bradicardia, bem como resturaram o efeito cronotrópico da isoprenalina. Mais ainda, estes tratamentos aumentaram a sobrevida dos camundongos sépticos. **Conclusão:** A presente tese apresenta os fundamentos farmacológicos para uma nova abordagem no tratamento da sepsé, uma vez que β -bloqueadores com eficácia zero (propranolol e bisoprolol) e com atividade simpatomimética intrínseca moderada (alprenolol) melhoraram a responsividade cardíaca *ex-vivo* e *in-vivo*, reduziram a resposta inflamatória sistêmica e local (no tecido cardíaco), diminuíram a lesão cardíaca e aumentaram a taxa de sobrevivência na sepsé.

PALAVRAS-CHAVES: Sepsé. Disfunção cardíaca. β -bloqueadores. Eficácia

ABSTRACT

Introduction: Sepsis is one of the oldest known syndromes in the history of medicine. Nowadays, it is described as a dysregulated systemic inflammatory response of the host to infection, which leads to several organical injuries. Thus, cardiac dysfunction is one of the common characteristics in septic patients and contributes to the mortality rate associated to sepsis. Recent data have shown that cardiac hyporesponsiveness in sepsis is related to β -adrenoceptors (β -ARs) internalization (Dal Secco, D., *et al.*, 2017). Interestingly, beneficial in hemodynamics has been showed in sepsis with the use of esmolol (β -blocker). It is known that β -blockers present a distinct pharmacological profile among them, specially regarding its intrinsic sympathomimetic activity. That is, some β -blockers acts as partial agonists in the β -ARs and therefore, promote some degree of positive inotropism. Considering the association between cardiac dysfunction in sepsis and the internalization of β -ARs, this thesis presents as pharmacological basis that β -blockers presenting intrinsic sympathomimetic activity (efficacy) ranging from “zero” (propranolol, bisoprolol) to “moderate” (carvedilol<alprenolol<bucindolol) improve cardiac function and inflammatory response by preventing by competition the internalization of β -ARs and also guaranteeing some degree of cardiac contractility. **Aim:** To investigate the effects of treatment with β -blockers presenting different efficacies in septic mice. **Methods:** Sepsis was induced in C57BL/6 male mice (8 weeks) by cecal ligation puncture, followed by treatment with propranolol, bisoprolol, carvedilol, alprenolol or bucindolol in doses chosen based on the dissociation constant (K_D) and half-life of each drug. Drugs were administrated intraperitoneally after surgery, during the hyperdynamic phase of sepsis. After 24 h from induction of sepsis, mice were used into the following experiments: a) Binding assay [H^3] CGP-12177 to estimate β -ARs density in the heart; b) RT-qPCR to evaluate genetic transcription; c) *in vitro* contraction assay to evaluate cardiac frequency (CF); d) immunoenzymatic assay to quantify levels of troponin-I, IL-1 β e TNF levels in serum, heart tissue and in isolated culture of macrophages; e) bacteremia; f) *in vitro* evaluation of basal hemodynamic and responsiveness to isoprenaline; g) evaluation of survival curve. **Results:** There was a reduction in density of β -ARs in cardiac cells surface and in mRNA to β_1 -ARs in septic mice. However, reduction in density of β -ARs in sepsis was prevented by treatment with propranolol, bisoprolol, alprenolol, but not by carvedilol or bucindolol. Interestingly, it was observed an increase in mRNA transcripts to β_1 -AR in heart from septic mice treated with propranolol, bisoprolol, carvedilol or bucindolol. Also, septic mice heart reactivity to isoprenaline was greatly compromised, but treatments with propranolol and alprenolol partially recovered heart reactivity. Moreover, septic mice presented high levels of troponin-I, IL-1 β e TNF. Treatment with all β -blockers reduced serum and local levels of IL-1 β and TNF, as well as in isolated culture of macrophages. Nevertheless, only treatments with propranolol or alprenolol in septic mice reduced plasma levels of troponin-I. Also, propranolol reduced bacteremia, although no microbicide effect was observed. Septic mice presented hypotension and bradycardia and treatment with propranolol, bisoprolol or alprenolol partially prevented both hypotension and bradycardia, as well as the recovery of chronotropic effect of isoprenaline. Moreover, treatments increased survival rate in septic mice. **Conclusion:** This thesis presents pharmacological basis to a new approach in sepsis treatment, since β -blockers presenting efficacy “zero” (propranolol and bisoprolol) and presenting “moderate” intrinsic sympathomimetic activity (alprenolol) improved *ex-vivo* and *in vitro* cardiac responsiveness, reduced systemic and local (cardiac tissue) inflammatory response, reduced cardiac injury and increased survival rate in sepsis.

KEYWORDS: Sepsis. Cardiac Dysfunction. β -blockers Efficacy

SUMÁRIO

Introdução	13
<i>Sepse: do contexto histórico as bases atuais</i>	13
<i>Impacto humano e econômico da sepse</i>	17
<i>Fisiopatologia da Sepse</i>	18
<i>Disfunção cardíaca associada à sepse (DCAS)</i>	23
<i>Manejos farmacológicos durante a sepse</i>	26
<i>Sistema adrenérgico como um modulador farmacológico durante a sepse</i>	29
<i>Adrenoceptores</i>	29
<i>β_1-Adrenoceptores como alvos terapêuticos</i>	30
Objetivo Geral	35
Objetivo Específico	35
Material e métodos	37
<i>Animais e ambiente de experimentação</i>	38
<i>Grupos experimentais e listas dos potenciais antagonistas β-ARs</i>	38
<i>Protocolo experimental de indução de sepse polimicrobiana</i>	39
<i>Protocolo de tratamento</i>	41
<i>Contagem de bactérias no sangue</i>	42
<i>Quantificação de citocinas</i>	42
<i>Ensaio de binding com radioligante [H^3] CGP-12177 em segmentos de tecido intacto</i>	43
<i>Ensaio de reação de transcriptase reversa e reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR)</i>	44
<i>Estudo de contração ventricular esquerda in vitro</i>	46
<i>Determinação bioquímica de lesão cardíaca</i>	46
<i>Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs)</i>	47
<i>Registro hemodinâmico in vivo</i>	48
Resultados	50
<i>Disfunção cardíaca mediada pela sepse é acompanhada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, hipotensão, bradicardia, perda de β-ARs, redução nos níveis do RNAm que codifica β_1-ARs e lesão miocárdica.</i>	51
<i>Propranolol ou bisoprolol ou alprenolol, mas não carvedilol e bucindolol, “protegem” o β_1-ARs da internalização mediada pela sepse em tecido intacto de coração</i>	57

<i>Camundongos sépticos tratados com propranolol ou bisoprolol ou carvedilol ou bucindolol, mas não com alprenolol, aumentam a expressão do transcrito que codifica β_1-ARs em tecido cardíaco</i>	60
<i>O tratamento de camundongos sépticos com propranolol, bisoprolol e alprenolol, mas não com carvedilol e bucindolol, aumenta o cronotropismo da isoprenalina em experimento com coração isolado.</i>	61
<i>β-bloqueadores reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos estimulados por LPS.</i>	65
<i>Somente o tratamento com propranolol resulta em menor disseminação bacteriana para a corrente sanguínea após a sepse.</i>	69
<i>A lesão cardíaca na sepse é reduzida pelo tratamento com propranolol ou alprenolol, mas não com bisoprolol, carvedilol ou bucindolol.</i>	71
<i>Camundongos sépticos tratados com propranolol ou bisoprolol ou alprenolol, mas não com carvedilol, apresentam melhora em seus registros hemodinâmicos</i>	72
<i>O tratamento de camundongos sépticos com propranolol, bisoprolol ou alprenolol aumentam o inotropismo da isoprenalina</i>	78
<i>Os tratamentos de camundongos sépticos tratados com propranolol, bisoprolol ou alprenolol, mas não carvedilol, aumentam a taxa de sobrevivência</i>	88
Discussão	90
Conclusões	104
Referencias bibliográficas	105

Introdução

Sepse: do contexto histórico as bases atuais

Sepse é uma das mais antigas síndromes reconhecidas na história da medicina. Derivada da palavra grega “sepo” - σήπω (sapro; apodrecer), sua primeira descrição é encontrada nos poemas de Homero (928 a.C), quando ele se referia ao “estado podre da matéria”. Hipócrates (400 a.C.) a descreveu como um processo de decadência biológica iniciada por agentes danosos liberados pelo cólon. A noção de contágio foi descrita pela primeira vez por Marcus Terentius Varros (100 a.C), narrando em seu livro *De re rustica libri III* que: “pequenas criaturas invisíveis aos olhos, estão presentes na atmosfera e, inspirada pelo nariz podem causar doenças graves” (*apud* FUNK; PARRILLO; KUMAR, 2009). Cerca de 100 anos depois, o médico e filósofo grego Galeno de Pergamon (129-199 d.C) teorizou que a formação de pus era fundamental para a cicatrização de tecidos lesionados (FREIBERG, 2017).

Em 1546, o médico, matemático, geógrafo e poeta italiano Girolamo Fracastoro (também conhecido como Hieronymi Fracastorii, 1483-1553) formulou a “Teoria do Contágio” e descreve três formas de contágios: direto, indireto (através de objetos infectados) ou pela transmissão à distância (FRACASTORO; WRIGHT, 1930). No entanto, esta teoria foi refutada e a hipótese mais aceita por mais de 100 anos foi a da “Geração Espontânea de Germes”, ou “Teoria da Abiogênese”. Através de métodos científicos simples, embora concludentes, o biólogo italiano Francesco Redi (1626-1697) demonstrou que o surgimento de germes só era possível após o contato direto de um inseto com a matéria orgânica e que o impedimento deste movimento (através de uma simples camada de gazes) impossibilitava seu surgimento (AUGUSTYN et al., 2020). É importante mencionar que os experimentos de Francesco Redi foram fundamentais para refutar de forma incisiva a Teoria da Abiogênese.

Dentre os acontecimentos que contribuíram de forma decisiva para a refutação da Teoria da Abiogênese está a descrição dos germes por Anthonie van Leeuwenhoek (1632–1723), um comerciante de tecidos holandês e cientista autodidata. van Leeuwenhoek usava lupas para checar a

qualidade dos tecidos que comercializava e tinha especial interesse na fabricação de lentes de aumento, o que provavelmente o levou a fabricar seus primeiros microscópios. Sem treinamento formal científico ou médico e por *serendipismo*¹, van Leeuwenhoek é o responsável por descrever as formas dos germes, segundo ele, os cocos ou esféricos; bacilos, em forma de bastões; e espiroquetas de formas espirais, os quais denominou inicialmente de “animáculos” (VAN LEEUWENHOEK; HOOLE, 1800; WOLLMAN et al., 2015). Por seus estudos, van Leeuwenhoek é considerado por muitos como um dos pais da Microbiologia.

No século XIX, o cirurgião inglês Joseph Lister (1827-1912) supôs que as feridas poderiam ser vias de acesso de agentes infecciosos ao corpo e, portanto, gerar sepse (LIDWELL, 1987). Em razão dessa suposição, Lister passou a adicionar ²ácido carbólico aos curativos de feridas resultando em redução drástica na taxa de mortalidade resultante da sepse.

A descrição de que microorganismos no sangue poderiam causar sintomas específicos e subjetivos foi apontada pela primeira vez em 1914 por Hugo Schottmuller (1867-1936) (BUDELMANN, 1969). A partir de então, termos como: septicemia, bacteremia, síndrome séptica e choque séptico eram empregados sem qualquer critério diagnóstico, apenas para indicar que o paciente exibia alguma resposta sistêmica à infecção.

Entretanto, estes termos não davam suporte clínico para distinguir os sinais e sintomas desencadeados pela sepse. Reconhecendo esta dificuldade, o *American College of Chest Physicians* (Colégio Americano de Médicos do Tórax) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM - *Sociedade de Medicina Intensiva*) definiram critérios para fundamentar uma estrutura prática e sistemática da sepse e suas sequelas (Quadro 1). Entretanto, os critérios definidos por este 1º Consenso eram limitados e insuficientes para refletir a prática clínica, uma vez que a definição de sepse poderia ser aplicada a uma variedade de infecções, não necessariamente complicadas. Por exemplo: a dor de garganta pode

¹ **Serendipismo**- é uma palavra inglesa criada pelo romancista inglês Horace Walpole, em 1754. O termo é baseado de um conto persa “Os Três Príncipes de Serendip”. A história retrata a vida de três príncipes da Ilha de Serendip (atual Sri Lanka) que viviam fazendo valiosas descobertas ao acaso.

² **Ácido carbólico** ou fenol, era utilizado para cessar o odor em esgotos durante a Revolução Industrial (1760-1840).

contemplar dois critérios de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (Systemic Inflammatory Response Syndrom - *SIRS*) tais como leucocitose e febre, e portanto, ser considerada sepse.

Quadro 1: Definição de sepse, sepse severa e choque séptico obtidas através da 1ª Conferência de Consenso sobre sepse do Colégio Americano de Médicos de Tórax e a Sociedade de Medicina Intensiva

Critérios de definição de sepse, sepse severa e choque séptico, derivados da 1ª Conferência de Consenso do Colégio Americano de Médicos de Tórax e a Sociedade de Medicina Intensiva.
▪ Sepse- definida como a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (<i>SIRS</i>) com o processo infeccioso confirmado, sendo caracterizada por pelo menos dois fatores a seguir: (a) Temperatura > 38° C ou < 36°; (b) Frequência cardíaca > 90 batimentos por minutos; (c) Frequência respiratória > 20 respirações por minutos ou pressão parcial de CO₂ < 32 mmHg; (d) Contagem de glóbulos brancos > 12 000 por mL ou < 4 000 por mL ou 10% de neutrófilos imaturos. ▪ Sepse Severa- é definida com a sepse associada à disfunção de órgão, hipoperfusão e hipotensão. ▪ Choque Séptico- é um subconjunto da sepse severa e é definida o quadro hipotensivo é mantidos após a reposição de fluidos e utilização de drogas inotrópicas e vasoativas.

Fonte: (BONE et al., 1992)

Portanto, com o objetivo de atualizar as diretrizes de manejo para sepse severa e choque séptico, o 2º Consenso de Definição de Sepse (DELLINGER et al., 2013) reuniu em 2001 diversos pesquisadores das mais diversas áreas e assim, ampliaram os critérios de diagnósticos. Porém, a maioria dos critérios definidos neste 2º Consenso ainda indicavam inflamação ou disfunção de órgão e continuavam insuficientes para identificar o paciente séptico.

Em razão destas limitações, o 3º Consenso de Definição de Sepse foi realizado em 2016 (SINGER et al., 2016) e reconheceu a sepse como uma síndrome que amplifica a resposta do hospedeiro ao patógeno envolvendo vias pró e anti-inflamatórias e que modifica vias fisiológicas não imunológicas, como: neurais, autonômicas, cardiovasculares, bioenergética e metabólicas. Além disso, o 3º Consenso avaliou várias ferramentas para o *screening* de anormalidades, sendo apontado o sistema SOFA (*Sepsis-related Organ Failure Assessment*) como instrumento clínico adequado de triagem para risco de mortalidade (Figura 1).

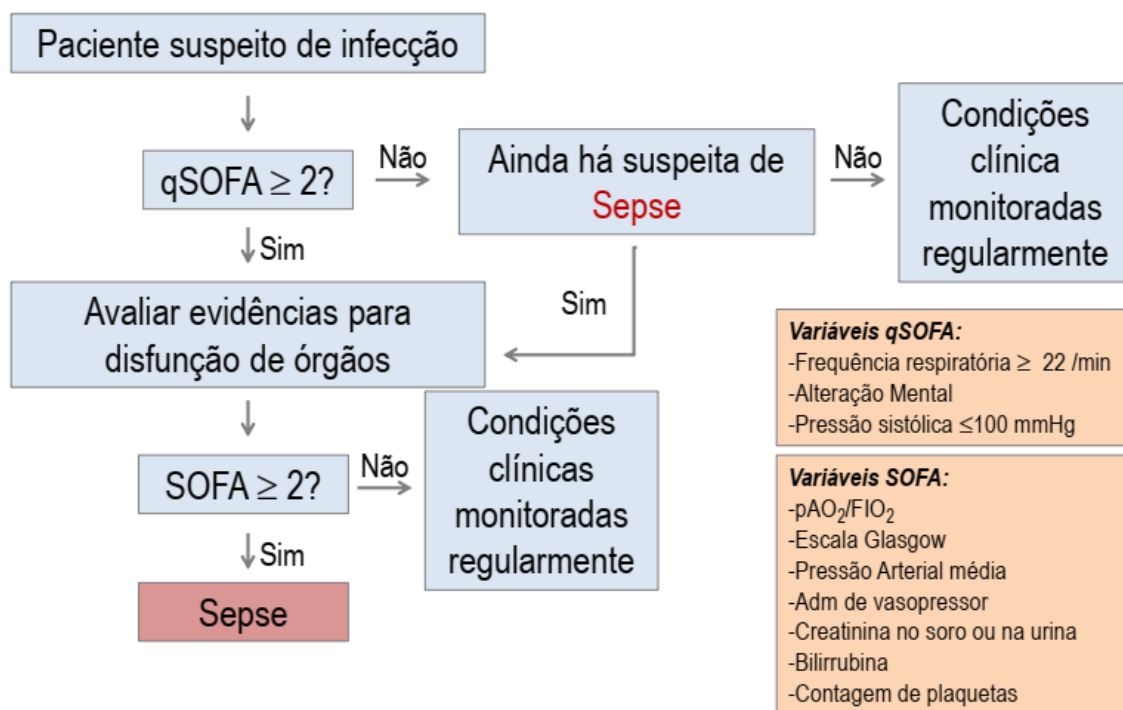


Figura 1: Esquema de identificação de clínica de pacientes sépticos baseado nas variáveis SOFA e qSOFA. qSOFA indica *quickSOFA* uma abordagem rápida para a identificação da sepse. Modificado de SINGER et al., (2016)

Impacto humano e econômico da sepse

Durante anos, a dificuldade no reconhecimento da sepse impediu um aporte terapêutico adequado, resultando em altas taxas de mortalidade. De fato, um estudo conduzido por RUDD et al., (2020) demonstra que em 1991 houve 15,7 milhões de morte, enquanto que, nos últimos 25 anos houve diminuição de aproximadamente 30% nas mortes relacionadas à sepse; numericamente, isso traduz uma redução de 15,7 milhões de óbitos em 1991 versus 11 milhões em 2017.

Um aspecto que dificulta o reconhecimento de seu impacto é que, entre todas as mortes relacionadas à sepse no ano 2017, aproximadamente 50% teve como origem uma causa não infecciosa (tais como, acidente de trânsito); uma possível explicação é a exposição do paciente a potenciais riscos nosocômios (DINÇ et al., 2016; DENSTAEDT; SINGER; STANDIFORD, 2018). Porém, quando esta estimativa é vista por décadas, o trato respiratório baixo seguido por doenças diarreicas e tuberculose ainda são as principais causas de mortalidade relacionadas à sepse (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

No Brasil, numa revisão sistemática envolvendo 217 leitos de unidades de terapia intensivas (UTI) de diversas regiões brasileiras foi identificado que o foco infeccioso para desencadear a sepse é similar aos dados supramencionados; além disso, foi estimada taxa de mortalidade relacionada à sepse acima de 200.000 mil por ano (MACHADO et al., 2017). Outra observação importante contida nesta revisão sistemática é que não há diferença na mortalidade³ entre o sistema público e privado de saúde. Embora não haja diferença na mortalidade, dados obtidos do DATASUS (Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde - SUS) tem

³ **Mortalidade**- é uma variável que se refere ao conjunto de indivíduos que morreram em um dado intervalo de tempo.

indicado maior taxa de letalidade⁴ relacionada ao SUS quando comparada aos hospitais privados (QUINTANO NEIRA; HAMACHER; JAPIASSÚ, 2018).

Mesmo com a redução da mortalidade, a incidência⁵ e os custos econômicos relacionados a sepse são altos (RHEE et al., 2017 ; KIM et al., 2019). No Brasil, no período de 2006 a 2015, a incidência foi aumentada em 50,5%, enquanto que os custos estimados aumentaram 113,3%; o custo anual em valores corresponde a R\$312 milhões de reais entre 2006-2007 e R\$624,4 milhões de reais entre 2014-2015 (QUINTANO NEIRA; HAMACHER; JAPIASSÚ, 2018). Como visto, a sepse causa grande impacto econômico e humano.

Fisiopatologia da Sepse

Como estabelecido no 3º Consenso de Definição de Sepse (SEPSE-3), *ipsis verbis*, a sepse é uma disfunção orgânica que traz risco à vida, causada pela resposta desregulada do hospedeiro à infecção (SINGER et al., 2016). A resposta do hospedeiro à infecção é iniciada a partir do reconhecimento do hospedeiro aos padrões moleculares associados aos patógenos (*pathogen-associated molecular patterns – PAMPS, tais como lipopolissacarídeos, LPS*) e às proteínas DAMPs (*damage-associated molecular patterns*) através da ligação aos receptores PRRs (*patterns-recognition receptors*); os PRRs incluem os receptores semelhantes a Toll (Toll-Like Receptors, TLRs), receptores de lectinas tipo C (C-Type Lectin Receptors, CLR), receptores do gene I induzível de ácido retinóico (retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, RIG-I) e receptores similares ao domínio de oligomerização de ligante de nucleotídeo induzido (NOD-like). A interação de PAMPs e DAMPs com seus respectivos receptores ativa um sistema complexo e redundante de sinalizações intracelulares nas células imunes, as quais culminam em respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

⁴ **Taxa de letalidade**- relaciona o número de óbitos por determinada causa e o número de pessoas que foram acometidas por tal doença ou síndrome.

⁵ **Incidência**- é o número de casos novos de uma determinada doença ou síndrome que foi iniciado no mesmo local e período.

Tanto o eixo pró-inflamatório quanto o anti-inflamatório são importantes para conter o curso clínico das infecções. Entretanto, é sabido que durante a sepse a intensidade e a direção na qual essas vias sinalizam são grandemente amplificadas e provocam danos teciduais, perda de função e aumento na susceptibilidade a doenças.

No eixo pró-inflamatório, os fagócitos são ativados a fim de eliminar a invasão dos patógenos. A ativação fagocitária aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo: TNF- α , IL-1 β , IL-6) e de moléculas e enzimas proteolíticas. No entanto, os produtos microbicidas gerados pelas células imunes (tais como: Espécies Reativas de Oxigênio ou Reactive Oxygen Species - ROS, óxido nítrico - NO e enzimas lisossômicas) e as moléculas produzidas pelos fagolisossomos são capazes de gerar lesão tecidual e consequentemente, disfunção orgânica e morte (Figura 2A) (ZHANG et al., 2010). De fato, monócitos isolados de pacientes sépticos apresentam níveis aumentados de ROS e NO (SANTOS et al., 2016), e isto tem sido associado aos mecanismos de indução de encefalopatias (HERNANDES et al., 2014), disfunção cardíaca (YAO et al., 2015 ; POTZ; SELLKE; ABID, 2016), lesão renal (GATICA et al., 2020) e injúrias hepáticas (GUO et al., 2014) observados na sepse. De forma complementar, a formação de NETs (Neutrophil Extracellular Traps), um novo mecanismo microbicida dos neutrófilos, também tem sido relatada na sepse (BRINKMANN et al., 2004). De fato, o envolvimento de NETs na lesão tecidual já foi descrito (NAKAZAWA et al., 2017; MARTINOD et al., 2017; DIMMELER; ZEIHNER, 2017) e recentemente, foi observado uma correlação positiva entre os níveis de NETs no soro e o risco de mortalidade em pacientes sépticos pediátricos (COLÓN et al., 2019a).

A ativação do eixo anti-inflamatório limita a inflamação e contém a injúria tecidual (Figura 2B). Inicialmente, o aumento de citocinas pró-inflamatórias (tais como, TNF- α , IL-1 β e IL-6) leva o endotélio vascular a produzir selectinas, ligantes de integrinas e quimiocinas com a finalidade de permitir a migração de monócitos e neutrófilos para o foco infeccioso (GINHOUX; JUNG,

2014). No entanto, a abundância de citocinas durante a sepse prejudica todo o endotélio vascular, inclusive a integridade da barreira hemato-encefálica (POBER; SESSA, 2007). As citocinas que atingem o sistema nervoso central (SNC), ativam as micróglia e mecanismos neurais são acionados para conter a inflamação. Tais reflexos neuro-inflamatórios modulam o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema nervoso autonômico simpático.

No eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o processo modulatório é iniciado em neurônios hipotalâmicos que atuam como transdutores neuroendócrinos sintetizando e liberando a corticotropina (CRH), a qual é transportada pelo sistema vascular porta hipotalâmico-hipofisário e interage com seus receptores metabotrópicos (CRH-1 e CRH-2) presentes na adenohipófise promovendo a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) na circulação sistêmica. O ACTH atua nas células do córtex da glândula adrenal liberando cortisol (KANCZKOWSKI et al., 2015). O cortisol é responsável por reduzir a inflamação (STRAUB; CUTOLO, 2016). A literatura tem sugerido que a exposição intermitente ao cortisol suprime a expressão de um antígeno leucocitário humano (especificamente HLA-DR) em células mielóides ou linfócitos T, apontando o envolvimento do cortisol na imunossupressão presente na sepse (LE TULZO et al., 2004) (Figura 2B8). Adicionalmente, altos níveis de cortisol tem sido correlacionados com a severidade de várias doenças ou síndromes (YEHYA et al., 2016), inclusive a sepse (NGUYEN et al., 2014). Dentre os vários fatores que podem estar envolvidos, acredita-se que a redução da expressão e da atividade de enzimas responsáveis pela metabolização hepática e renal de cortisol contribuem para a hipercortisolemia observada em doenças críticas e consequentemente com a imunossupressão na sepse (BOONEN et al., 2013; BOONEN; VAN DEN BERGHE, 2016).

No que diz respeito à atividade do sistema nervoso autonômico simpático (SNAS), a ação de citocinas no endotélio hemato-encefálico leva à produção de prostaglandina-E₂ (PGE₂), a qual estimula neurônios da área pré-óptica hipotalâmica que por sua vez aumentam a atividade de neurônios do núcleo para-ventricular (NPV). O NPV estimula a medula ventrolateral rostral

permitindo a liberação de glutamato. A ativação glutamatérgica estimula os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna intermédio-lateral da medula espinhal. De fato, a estimulação glutamatérgica é aumentada na sepse (ZHE et al., 2018). Em seguida, a acetilcolina (ACh) é liberada no gânglio autonômico, onde ativa receptores nicotínicos presentes no neurônio simpático pós-ganglionar, o qual libera noradrenalina em diversos órgãos, dentre eles o coração (Figura 2B9). Além disso, os neurônios pré-ganglionares simpáticos liberam ACh na medula da glândula adrenal e um *storm* catecolaminérgico é gerado (Figura 2B8). De fato, durante a sepse há altas concentrações de noradrenalina e adrenalina no plasma (FLIERL et al., 2007; KANDASAMY et al., 2015) e na urina (JAN et al., 2019). Adicionalmente, a literatura tem sugerido que o estresse adrenérgico reduz a expressão do transportador de glicose em células T CD8⁺ (QIAO et al., 2019) ocasionando reprogramação metabólica e imunossupressão, redução na densidade de adrenoceptores α_1 (α_1 -ARs) no músculo liso vascular e adrenoceptores β_1 (β_1 -ARs) no coração provocando, respectivamente, vasoplegia e insuficiência cardíaca. (TANG; LIU, 1996) (DAL-SECCO et al., 2017)

Outro aspecto importante a ser mencionado é que durante a sepse as redes de sinalizações intracelulares regulam a expressão de distintas classes gênicas e condicionam o organismo séptico na manutenção do estado inflamatório (através da expressão de citocinas inflamatórias, tais como a IL-1 β) (ZHAO et al., 2020) e hiporeativo (através do aumento da expressão de GRK-2, uma proteína que inicia o processo de dessensibilização de receptores) (KANDASAMY et al., 2015).

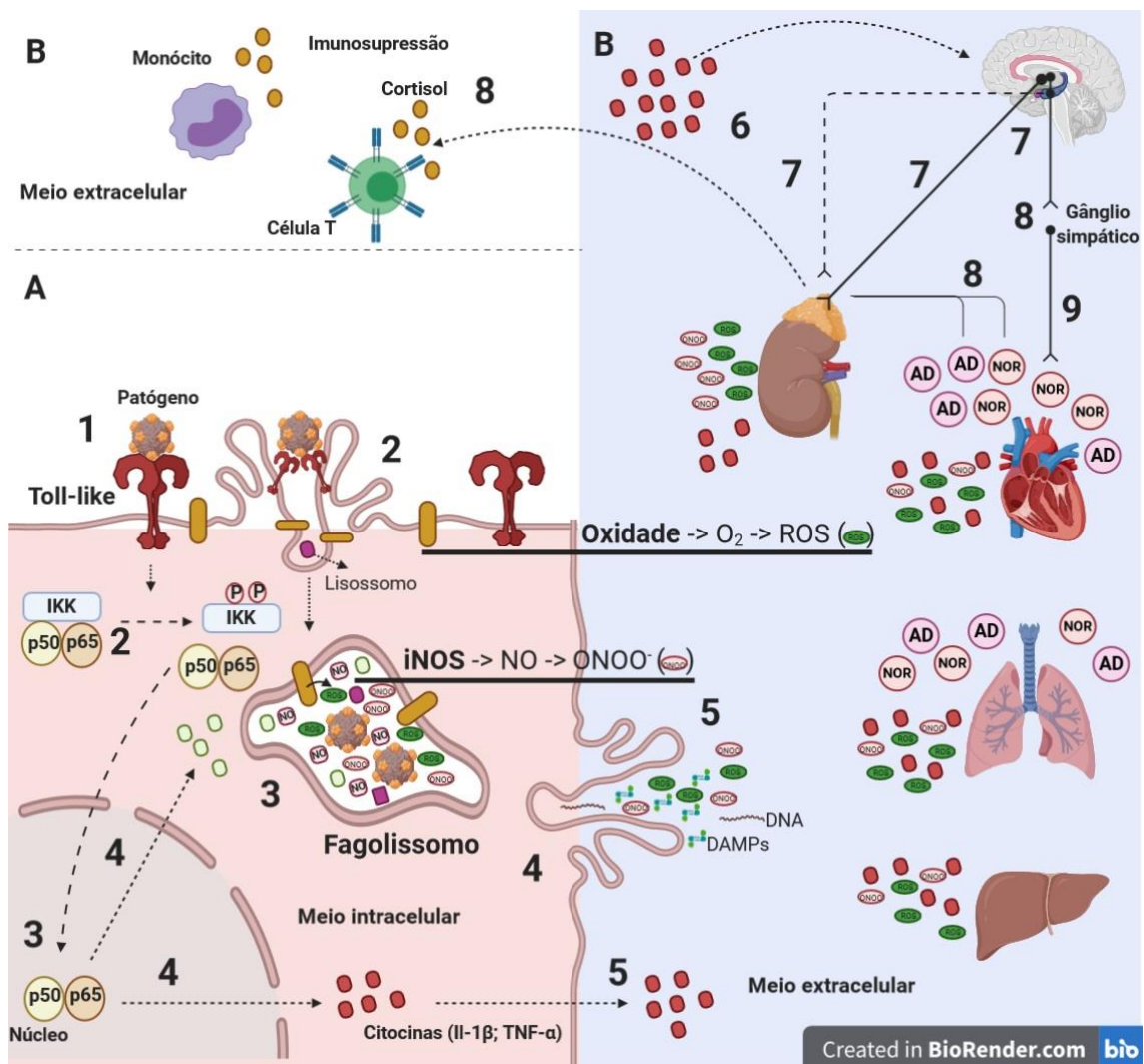


Figura 2: Fisiopatologia da Sepse. Painei A: ativação da via pró-inflamatória. Painei B: ativação da via anti-inflamatória. A fisiopatologia da sepse é iniciada (A1) através do reconhecimento do hospedeiro aos padrões moleculares associados aos patógenos (por exemplo LPS do patógeno), em sequência, ocorre a ligação aos receptores de reconhecimento padrão (neste caso, Toll-like). Em seguida, a via intracelular e a formação de fagócito são ativadas (A2). (A3) Logo após, a constituição do fagolisossomo é mediada pela invaginação da membrana com o patógeno, enzimas lisossômicas e oxidase. A via intracelular desencadeia a fosforilação do IKK permitindo a translocação do NF-KB (composto pelas subunidades p50 e p65) para o núcleo (A3). No núcleo, o NF-KB induz a formação da enzima iNOS e de citocinas pró-inflamatórias. A iNOS é incorporada ao fagolisossomo. No fagolisossomo (A3), a destruição do patógeno é mediada pela formação de óxido nítrico (NO; via iNOS), peroxinitrito (produto final da reação do NO+ superóxido e peróxido de hidrogênio) e espécie reativa de oxigênio (ROS; produto final da redução do oxigênio molecular). Logo após, os produtos microbicidas e as moléculas microbianas geradas, além de, citocinas pró-inflamatórias são liberadas no meio extracelular (A5). Na corrente sanguínea, as citocinas e os produtos liberados pelos fagolisossomos agem em vários órgãos, tais como: coração, rins, pulmão, fígado e cérebro, gerando inflamação, lesão e disfunção. A fim de conter a inflamação, os reflexos neuro-inflamatórios são ativados (B). O processo é iniciado com a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) (7). No eixo hipotálamo-hipófise-adrenal a finalidade é a formação do cortisol e sua sequente ação anti-inflamatória, no entanto, a hipercortisolemia gerada age em células mielóides (tais como: monócito) e em linfócitos (neste caso: célula T). acarretando a supressão e a expressão de um antígeno leucocitário humano, causando imunossupressão (B8). No eixo SNAS, o neurônio pré-ganglionar simpático libera acetilcolina no gânglio simpático (B8) e na adrenal (B7). No gânglio simpático, o sinal gerado permite a liberação de noradrenalina (NOR) em diversos órgãos, incluindo o coração (B9). Na adrenal, storm catecolaminérgico é gerado (B8), permitindo a ação tanto da adrenalina (AD) quanto da noradrenalina em uma variedade de órgãos.

Disfunção cardíaca associada à sepse (DCAS)

A disfunção cardíaca é um importante componente presente na sepse (FENTON; PARKER, 2016; ZHOU et al., 2017; CHEN et al., 2018), uma vez que a redução do fluxo sanguíneo contribui para redução do aporte de oxigênio para os tecidos. Neste sentido, a consequência inclui um potencial risco de isquemia, seguido por lesão e morte tecidual. Consistente com essa noção, a literatura tem sugerido que a instalação do quadro isquêmico pode agravar o quadro clínico do paciente séptico (SINGER, 2014). Dada sua importância no contexto da sepse, duas grandes teorias surgiram na década de 1950 para explicar a disfunção cardíaca associada à sepse (DCAS). A primeira teoria propõe a existência de um fator depressor do miocárdio (especificamente o LPS) e que esta estrutura bioquímica, ainda não determinada na época, contribuiria para a ocorrência da DCAS (WIGGERS, 1947). A segunda teoria foi fundamentada em experimentos com cães sépticos utilizando um implante intraperitoneal de coágulos de fibrina infectados. Segundo os autores, a sepse experimental provocada foi capaz de gerar quadros isquêmicos no coração. Baseado nesse dado experimental, foi sugerido que a DCAS pode estar associada ao quadro de redução global da perfusão miocárdica e, assim, explicaria a isquemia cardíaca originada na sepse (*apud* CUNNION; PARRILLO, 1989). No entanto, DHAINAUT J F et al., (1987) demonstraram que na cardiomiopatia séptica há aumento de fluxo coronariano, refutando a noção prévia de redução global da perfusão miocárdica.

Atualmente, tem sido proposto que um conjunto de fatores produz as alterações cardíacas presentes na sepse, dentre eles: a alteração na produção de NO e ROS (HAILESELAASSIE et al., 2017); ativação de vias apoptóticas (KONG et al., 2018); alteração na homeostase do cálcio (HOBAL et al., 2015) e prejuízo na sinalização β_1 -adrenérgica (DAL-SECCO et al., 2017), (Figura 3).

Em situações inflamatórias, a produção contínua de ROS gera danos oxidativos nas células. De fato, durante a sepse vários fatores reconhecidamente aumentam a produção de radicais livres, dentre eles, o aumento de expressão de NOX-1 (GU et al., 2018; LUPTAK et al., 2019) e iNOS (LUO et al., 2019), gerando respectivamente ROS e NO . Em última instância, há aumento na geração de espécies reativas de nitrogênio (Reactive Nitrogen Species - RNS) (IQBAL et al., 2002). Neste sentido, pesquisas tem demonstrado que RNS afetam a cadeia respiratória mitocondrial (KOHUTIAR et al., 2018), desviando o curso energético celular de ATP para lactato. O resultado é o disparo de sinalizações intracelulares que levam à morte celular programada (ZHENG et al., 2017).

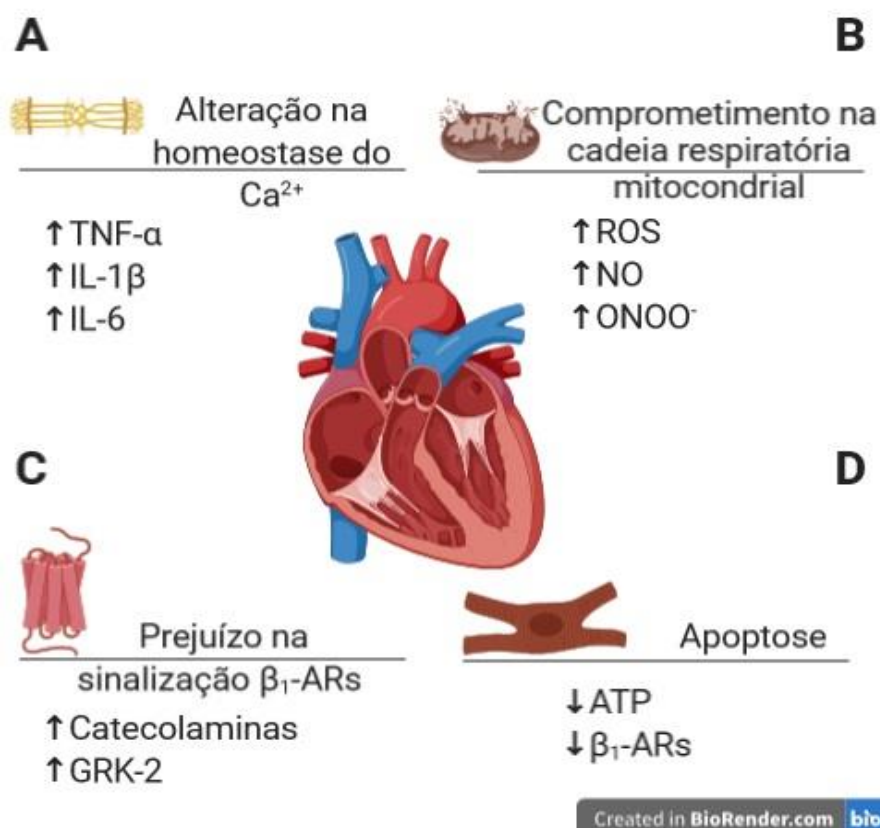


Figura 3: Ilustração dos fatores envolvidos no contexto patológico da disfunção cardíaca associada à sepse. Durante a sepse, o aumento de citocinas pró-inflamatórias (A; tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6), radicais livres (B) e catecolaminas (C) são capazes de afetar a, respectivamente, a homeostase do cálcio, a cadeia respiratória mitocondrial e sinalização celular via β_1 -ARs. Adicionalmente, o comprometimento mitocondrial reduz a produção de ATP e ativa via envolvidas na apoptose celular (D)

No contexto inflamatório séptico, a ligação do LPS aos receptores Toll-like 4 ativa a translocação do NF-KB para o núcleo induzindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: TNF- α , IL-1 β e IL-6. É sabido que essas citocinas exercem influência no sistema cardiovascular (BARTEKOVA et al., 2018) e têm papel significativo na DCAS, uma vez que elas podem levar à redução dos níveis do RNAm e da proteína SERCA 2a (KAO et al., 2010) (TSAI et al., 2015), e ao aumento da expressão do receptor sensível ao Ca^{2+} na paratireoide e no rim ocasionando hipocalcemia (HENDY; CANAFF, 2016). O conjunto destes agravos é o comprometimento da função diastólica e sistólica, respectivamente.

Outro aspecto relevante na DCAS é o comprometimento da sinalização que envolve β_1 -ARs do miocárdio. Em razão da importância dos β_1 -ARs no controle da força e da frequência cardíaca, o prejuízo na sinalização por estes receptores tem sido considerado um dos principais parâmetros de risco de mortalidade associado à sepse (SINGER et al., 2016). Apesar do tema ser relevante, a literatura sobre o tema é escassa. É sabido que a desregulação autonômica simpática eleva os níveis plasmáticos de catecolaminas (FLIERL et al., 2007; KANDASAMY et al., 2015) resultando em ativação prolongada dos β_1 -ARs. Por sua vez, os β_1 -ARs ativados são reconhecidos por proteína-kinases intracelulares (dentre elas a GRK-2, *G protein-coupled receptor kinases*), as quais fosforilam os β_1 -ARs e disparam o processo de dessensibilização e internalização destes receptores (HANSEN et al., 2006) (KOMOLOV; BENOVIC, 2018). Além disso, a literatura tem sugerido que os níveis de GRK-2 estão aumentados durante a sepse (KADOI et al., 2002; DAL-SECCO et al., 2017). Desta forma, tanto a atividade simpática aumentada quanto a maior atividade da GRK-2 podem fundamentar a redução na densidade e função dos β_1 -ARs no miocárdio e a perda de efeito de drogas inotrópicas na sepse.

Manejos farmacológicos durante a sepse

A fim de conter o curso infeccioso e hiporeativo presente na sepse, várias abordagens farmacológicas têm sido realizadas com o objetivo de melhorar o percurso clínico do paciente. Sendo assim, a estratégia terapêutica inicial é identificar o patógeno e iniciar de imediato o tratamento medicamentoso.

Vários agentes microbianos podem desencadear o processo infeccioso-inflamatório da sepse, mas entre eles, as bactérias gram-negativas tem sido o principal agente causador (TABAH et al., 2012; DIMOPOULOS et al., 2015) (Figura 3).

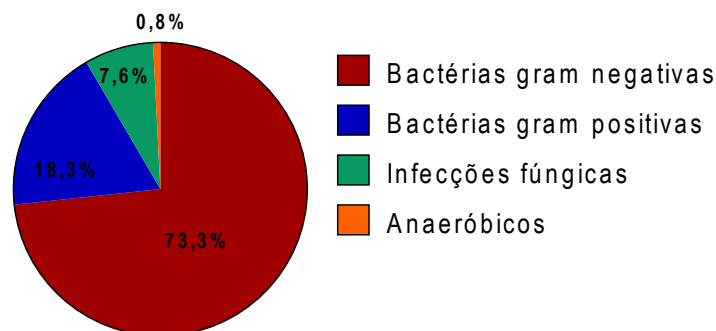


Figura 4: Principais agentes causadores de sepse (DIMOPOULOS et al., 2015).

Os principais antimicrobianos utilizados pertencem às seguintes classes terapêuticas: (a) bactérias gram negativas: β -lactâmicos (por exemplo: imipenem, meropenem; cefalosporinas) (b) bactérias gram positivas: glicopeptídeos (por exemplo: vancomicina); infecções fúngicas: imidazólicos (por exemplo: cetoconazol); anaeróbicas: metronidazol (com ação em bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas) (ILACS, 2016; RHODES et al., 2017)

Apesar da terapêutica antimicrobiana ser capaz de reduzir ou eliminar a infecção (DANNER et al., 1991), o ambiente inflamatório ainda presente na sepse emite sinais químicos capazes de ativar reflexos neuro-inflamatórios com o objetivo de limitar a inflamação. Assim, a amplificação da inflamação e a ativação das vias neurais geram no paciente séptico diversas lesões orgânicas que comprometem as funções de diversos sistemas biológicos, especialmente as funções do sistema cardiovascular.

A fim de reverter o comprometimento hemodinâmico característico da sepse, é necessário o uso de drogas vasopressoras (entre elas fenilefrina, adrenalina, noradrenalina e dopamina), inotrópicas positivas (como a dobutamina e levosimendan), ou a combinação de ambas. No entanto, a literatura é controversa quanto ao maior ou menor benefício destes medicamentos na prática clínica. Uma recente meta-análise relacionou a dopamina (um agonista de β_1 -ARs e α_1 -ARs) com o aumento da mortalidade quando comparado com os outros vasoativos e apontou o benefício do levosimendan (sensibilizador do íon Ca^{2+}) na redução da mortalidade (BELLETTI et al., 2017). Tal resultado difere do que foi observado por CHANG et al.,

(2018), o qual relata que o levosimendan não reduziu a mortalidade na sepse. Adicionalmente, uma pesquisa clínica não foi capaz de evidenciar reduções na taxa de mortalidade em pacientes sépticos tratados com levosimendan quando comparados com o placebo e, além disso, associou o uso do levosimendan ao aumento do risco de taquiarritmias supraventriculares (GORDON et al., 2016). De forma complementar, a adrenalina e a dopamina apresentam eficácias semelhantes em pacientes sépticos pediátricos (BASKE et al., 2018; WEN; XU, 2020). No entanto, é sabido que a adrenalina através da ativação dos β_2 -ARs do músculo esquelético estimula indiretamente bomba Na^+/K^+ ATPase, reduzindo a quantidade de Na^+ intracelular (MCCARTER et al., 2002). O resultado é o aumento de lactato, redução do pH sanguíneo e, contribuição para o estado crítico do paciente séptico (ROSENSTEIN; TENNENT-BROWN; HUGHES, 2018). A literatura tem sugerido que a fenilefrina (agonista seletivo de α_1 -ARs) pode agravar a disfunção cardíaca na sepse (DUCROCQ et al., 2012). Em contraste, dados recentes demonstram o benefício da fenilefrina em reduzir a inflamação e apoptose em tecido cardíaco séptico e, conseqüentemente, à melhora na contração cardíaca (LI et al., 2019a; 2019b). Apesar disso, a fenilefrina não é capaz de reduzir a mortalidade associada à sepse (VAIL et al., 2017).

Por décadas, a noradrenalina (agonista não seletivo para os receptores adrenérgicos α_1 e β) tem sido recomendada como vasopressor de primeira escolha (AVNI et al., 2015) e a dobutamina (agonista seletivo para o receptor adrenérgico β_1) como o inotrópico de primeira linha (RHODES et al., 2017). Entretanto, o estresse adrenérgico presente durante a sepse e a conseqüente perda de receptores adrenérgicos α_1 e β na superfície das células dificultam o sucesso terapêutico.

Portanto, as contradições observadas fornecem suporte conceitual para a busca de novas estratégias farmacológicas cardiotônicas e vasoconstritoras que possam contribuir para a sobrevivência do paciente séptico. Estas novas estratégias farmacológicas colocam os

adrenoceptores em posição de destaque, em razão do papel essencial que estes receptores exercem na regulação da contratilidade cardíaca e vascular.

Sistema adrenérgico como um modulador farmacológico durante a sepse

Adrenoceptores

O SNAS é composto pelas inervações simpáticas, pelos ligantes endógenos noradrenalina e adrenalina e os adrenoceptores (ARs). Os adrenoceptores são receptores de membrana pertencentes à superfamília de Receptores Acoplados à Proteína G (GPCRs). A assinatura estrutural comum à todos os GPCRs consiste em uma cadeia polipeptídica com uma porção amino-terminal extracelular e carboxi-terminal intracelular, sete domínios transmembranares hidrofóbicos (TM1-TM7) ligados por três alças extracelulares (ECL1-ECL3) e três alças intracelulares (ICL1-ICL3) (Figura 4) (ALEXANDER et al., 2017).

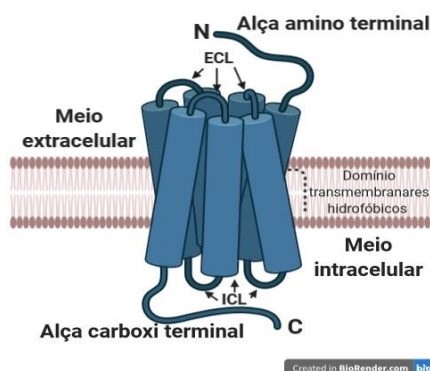


Figura 5: Ilustração da arquitetura dos adrenoceptores. A arquitetura consiste em: uma cadeia polipeptídica com uma amina-terminal extracelular, uma cadeia polipeptídica com uma carboxi-terminal, sete domínios transmembranares hidrofóbicos (TM1-TM7) ligados por três alças extracelulares (ECL1-ECL3) e três alças intracelulares (ICL1-ICL3)

Em razão da homologia na sequência de aminoácidos, características farmacológicas e acoplamento preferencial à proteína G, os 9 adrenoceptores são divididos em três subfamílias, denominadas α_1 (α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}) (AKINAGA; GARCÍA-SÁINZ; S PUPO, 2019), α_2 (α_{2A} , α_{2B} , α_{2C}) (BYLUND, 2005), β (β_1 , β_2 e β_3) (VELMURUGAN; BASKARAN; HUANG, 2019). Os 9 adrenoceptores estão diferencialmente distribuídos em uma variedade de órgãos e controlam

diversas funções homeostáticas do organismo, tais como a contração e relaxamento do músculo liso vascular e não-vascular, inibição da liberação de neurotransmissores, glicogenólise e contração da musculatura cardíaca (Figura 5) (TANK; LEE WONG, 2015). Devido a sua ampla distribuição, são importantes alvos farmacológicos para o tratamento de condições como hipertensão arterial, asma, glaucoma e o choque hipotensivo, como aquele comumente presente na sepse.

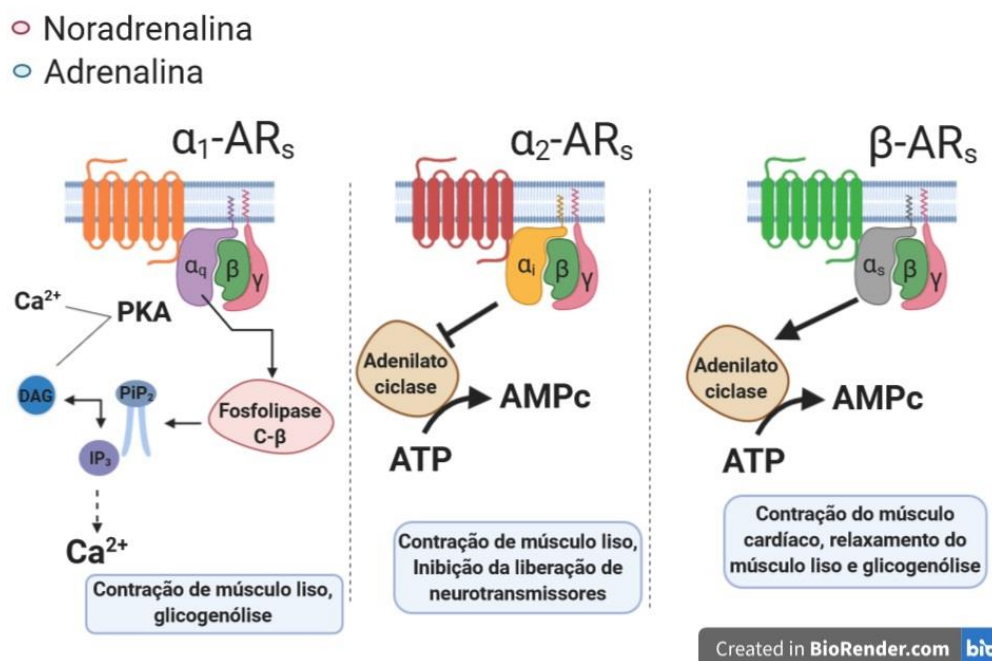


Figura 6: Ilustração dos tipos de receptores adrenérgicos e seus ligantes endógenos: noradrenalina e adrenalina. Quando ativados, os α_1 -ARs acoplam-se à proteína heterotrimérica Gq. A proteína Gq ativa a fosfolipase C- β com subsequente hidrólise do fosfolípido de membrana, fosfatidil inositol bisfosfato (PIP₂), em dois segundos mensageiros: o inositol (1,4,5)-trisfosfato ([Ins(1,4,5)P₃] ou IP₃) e o diacilglicerol (DAG) (5). A via é finalizada com o aumento de Ca²⁺ citosólico e ativação da proteína quinase C (PKC). Os α_2 -ARs quando ativados acoplam-se a proteína Gi. A proteína Gi inibe a atividade da adenilil ciclase, reduzindo a concentração intracelular de AMPc. Já os β -ARs quando ativados acoplam-se à proteína Gs. A proteína Gs estimula a atividade da adenilil ciclase, convertendo ATP em AMPc.

β_1 -Adrenoceptores como alvos terapêuticos

Graças aos estudos de Raymond Ahlquist, desde 1948 é sabido que os adrenoceptores são uma classe heterogênea de receptores, inicialmente nomeados α e β . O receptor α foi caracterizado por apresentar efeito excitatório nos músculos lisos do útero, ureter e pupila. Por outro lado, o receptor β foi associado às funções inibitórias como o relaxamento de músculos

lisos, e a uma única função excitatória, a estimulação cardíaca (AHLQUIST, 1948). Um estudo recente demonstrou através de ensaios de expressão gênica e por experimentos com o radioligante ^{125}I -Cyanopindolol que nos cardiomiócitos de camundongos 55% dos adrenoreceptores são do subtipo β_1 -ARs, 25% do subtipo α_{1B} , 8% do subtipo α_{1A} e os remanescentes 12% compostos por β_2 -ARs (MYAGMAR et al., 2017). Devido a dificuldade do acesso à tecidos humanos, existe uma literatura escassa que aborda a quantificação dos subtipos de β -ARs. Neste sentido, um estudo prévio utilizando o radioligante ^{125}I -Cyanopindolol em ensaio de competição com CGP-20712A (antagonista para os β_1 -ARs) e ICI-118,551 (antagonista para os β_2 -ARs), para quantificação dos sítios para ligação para o subtipo β_1 -ARs e β_2 -ARs, respectivamente, demonstrou a proporção dos subtipos subtipo β_1 -ARs e β_2 -ARs em amostras de músculo papilar do ventrículo esquerdo de pacientes transplantado; os dados indicam que no músculo papilar do ventrículo esquerdo coexistem ambos os receptores numa proporção aproximada de 65% de β_1 -ARs e 35% de β_2 -ARs (BUXTON et al., 1987). Tomando como base essas informações, é comum assumir que no tecido cardíaco o subtipo predominante é o β_1 -AR.

Na última década, vem sendo reconhecido que GPCRs disparam múltiplas vias de sinalização intracelular e que, dependendo da conformação na qual o ligante estabiliza o receptor, a sinalização por alguma(s) dessa(s) via(s) a sinalização pode ser mais robusta do que outras; este fenômeno tem sido chamado de “agonismo tendencioso” (PUPO et al., 2016). Por exemplo, quando comparadas as capacidades da noradrenalina são ligantes com características equilibradas, ou seja, sinalizam para ambas as vias, enquanto que, a dobutamina tem preferência pela sinalização via β -arrestina (KOOISTRA et al., 2015). É importante mencionar que, a sinalização via β -arrestina transloca o receptor para dentro do citoplasma resultando em um processo conhecido como dessensibilização (TIAN; KANG; BENOVIC, 2014). Além disso, é capaz de ativar vias que incluem quinase ativadas por mitógenos (MAPK) (EICHELE; JULLIÉ;

VON ZASTROW, 2016; JAIN et al., 2018) e AKT, na qual são importantes em proteger o coração dos processos apoptóticos (BAYOUMI et al., 2018; TEOH et al., 2018). No processo de contração cardíaca, ocorre a ativação da sinalização via proteína G_s resultando na ativação do adenilato ciclase que converte o ATP em AMPc. O AMPc media a ativação do proteína quinase A (PKA). A PKA fosforila os canais de Ca^{2+} permitindo a entrada de Ca^{2+} extracelular. O aumento de Ca^{2+} no citoplasma estimula o receptor de rianodina presente no retículo sarcoplasmático a liberar Ca^{2+} para o citoplasma. Em seguida, o Ca^{2+} se liga a troponina C e induz mudanças conformacionais na tropomiosina que libera a troponina I. A liberação da troponina I expõe os sítios de interação entre a miosina e actina permitindo o processo de contração cardíaca. Em seguida, a PKA fosforila a fosfolamban que resulta no aumento da atividade da SERCA. A SERCA intensifica o transporte do Ca^{2+} do citoplasma para o retículo sarcoplasmático resultando no relaxamento dos cardiomiócito. Além de regular o ritmo cardíaco, a sinalização via proteína G_s está envolvida na sinalização que ativa a apoptose cardíaca (COLUCCI et al., 2000) (XIA; LIU; CHENG, 2016). Sendo assim, os β_1 -ARs estão envolvidos em uma variedade de fisiopatologias que incluem a: hipertensão (FRISHMAN, 2016), disritmias cardíacas (ADAMEOVA et al., 2018), infarto do miocárdio (SIM et al., 2020) e sepse (DAL-SECCO et al., 2017). Diante disto, seus ligantes são amplamente utilizados na prática clínica e, por décadas os agonista β_1 -ARs são as drogas de escolha durante a DMAS. Adicionalmente, os antagonistas β_1 -ARs tem sido comumente empregado no controle de doenças cardiovasculares.

A aplicação clínica dos β -bloqueadores foi fundamentada experimentalmente pelo farmacologista inglês Sir James Black (1924-2010). No final da década de 60, corroborando a teoria Ahlquist's, Sir James Black demonstrou que uma droga era capaz de bloquear o efeito excitatório atribuído ao β -ARs no miocárdio. Neste sentido, Sir James Black e John Stephenson baseado na estrutura química da 1-(3'4' Diclorofenil)-2-isopropilaminoetanol hidrocloreto, um análogo da isoprenalina e descrito por apresentar efeitos inibitórios sobre a ação da adrenalina e

isoprenalina (POWELL et al., 1958), substituíram os átomos de cloro pelos os grupos de hidroxila no anel aromático. A partir desse racional farmacológico, criaram um protótipo nomeado pronetalol. Embora, o pronetalol tenha sido capaz de reduzir a frequência cardíaca basal e, antagonizar os efeitos mediados pelo incremento de adrenalina (BLACK; DUNCAN; SHANKS, 1965), foi demonstrado uma relevante atividade carcinogênica em camundongos (ALCOCK; BOND, 1964). Baseado nessa informação, substituições de grupamentos químicos foram realizadas afim de obter um composto com ação antagonista e sem atividade carcinogênica. Neste sentido, uma oxidação na posição α -naftil foi empregada, surgindo o propranolol (BLACK, 1989). A princípio, o objetivo principal no delineamento químico do propranolol foi a redução da frequência cardíaca diante da estimulação do nervo simpático, prevenindo portanto a taquicardia e reduzindo a frequência de angina *pectoris*. A finalidade era que o propranolol fosse capaz de restringir a mortalidade associada à estes eventos cardíacos. De fato, o impacto da descoberta do propranolol representou um avanço na farmacoterapia da angina *pectoris* (ARONOW, 1972) e de uma variedade de fisiopatologias cardíacas, entre elas, o infarto do miocárdio (CHADDA K et al., 1986) e a hipertensão (RAM, 2010).

A afinidade das drogas por seus alvos receptores e a eficácia intrínseca dessas drogas nesses alvos são características importantes para direcionar estudos farmacológicos e tratamentos clínicos. A literatura tem apontado que os β -bloqueadores apresentam características farmacológicas distintas daquelas inicialmente descritas. Por exemplo, o β -bloqueador prototípico propranolol apresenta afinidade semelhantes por β_1 -ARs e β_2 -ARs e se comporta como agonista inverso na formação de AMPc em ambos receptores (GALANDRIN; BOUVIER, 2006). Já o carvedilol é cerca de 4X mais seletivo para β_2 -ARs (BAKER, 2005) um agonista parcial fraco na formação de AMPc (GALANDRIN; BOUVIER, 2006). Similarmente, o alprenolol (ABRAHAMSSON, 1986) e o bucindolol são agonistas parciais de baixa eficácia (GALANDRIN; BOUVIER, 2006) para a via do AMPc.

A literatura tem apontado um paradoxal benefício na utilização de β -bloqueadores durante a sepse. Em 2013, foi investigado o uso do esmolol, um antagonista β_1 -ARs cardioseletivo, em pacientes sépticos. Os dados apresentados demonstraram uma redução em quase 50% na taxa de mortalidade quando comparado ao grupo placebo, além disso, os pacientes que fizeram o uso de esmolol precisaram de menores doses de vasoconstritores do que aqueles que não receberam (MORELLI et al., 2013). Interessantemente, foi demonstrada redução na taxa de mortalidade de pacientes que faziam o uso oral e crônico de β -bloqueadores e que mantiveram a continuidade do tratamento durante a fase aguda da sepse (FUCHS et al., 2017). Dados em modelo experimental de sepse tem reportado o benefício do esmolol em restaurar a hemodinâmica e reduzir a inflamação através da redução da ativação do NF-KB e expressão da iNOS e ativação da via AKT (KIMMOUN et al., 2015; WEI et al., 2016)

Baseado nestas informações é esperado que os ligantes de eficácia nula e de baixa eficácia protegerão por competição a dessensibilização dos β -ARs decorrente dos níveis aumentados das catecolaminas na fase de hiperatividade simpática na sepse e, ao mesmo tempo, reduzam o estado inflamatório e, consequentemente restabeleçam a hemodinâmica e a responsividade cardíaca prejudicada no decurso séptico. De acordo com estas informações, a presente tese investigou os efeitos de β -bloqueadores com diferentes eficácias no β_1 -ARs durante a sepse experimental.

Objetivo Geral

- Investigar o tratamento com β -bloqueadores de diferentes eficácias em camundongos sépticos.

Objetivo Específico

- Verificar a distribuição proteica dos β_1 -ARs em tecido cardíaco isolado de camundongos sépticos ou não, tratados ou não com diferentes β -bloqueadores;
- Determinar a expressão do transcrito que codifica os β_1 -ARs em tecido cardíaco isolado de camundongos sépticos ou não, tratados ou não com diferentes β -bloqueadores;
- Avaliar a responsividade de corações sépticos ou não, tratados ou não com diferentes β -bloqueadores;
- Examinar os níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma e em tecido cardíaco isolado de animais sépticos ou não, tratados ou não com diferentes β -bloqueadores;
- Examinar a quantidade de citocinas pró-inflamatórias em cultura isolada de macrófagos estimulados ou não com LPS e expostos ou não com diferentes β -bloqueadores;
- Examinar a quantidade de bactérias no sangue de animais sépticos ou não, tratados ou não com diferentes β -bloqueadores;
- Verificar o nível de troponina-I no plasma de animais sépticos ou não, tratados ou não com diferentes β -bloqueadores;
- Avaliar parâmetros hemodinâmicos *in vivo* de animais sépticos ou não tratados ou não com diferentes β -bloqueadores;
- Avaliar a responsividade *in vivo* de animais sépticos ou não tratados ou não com diferentes β -bloqueadores;

- Verificar a taxa de sobrevivência de animais sépticos tratados ou não com diferentes β -bloqueadores

Material e métodos

Animais e ambiente de experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem C57Bl/6 entre 6-8 semanas. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto (Protocolo Número 40/2017).

Os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto sob condições de temperatura (23-25 °C) e ciclo claro/escuro (12 horas) controlados, com água e ração *ad libitum*.

Grupos experimentais e listas dos potenciais antagonistas β -ARs

Os camundongos foram aleatoriamente separados em grupos experimentais denominados:

1. Grupo *Naive*: camundongos hígidos;
2. Grupo *Naive* tratado: camundongos hígidos que receberam pela via intraperitoneal β -bloqueador;
3. Grupo Séptico Não Tratado: camundongos submetidos ao protocolo de indução de sepse e tratados com o veículo salina (ver abaixo);
4. Grupo Séptico Tratado: camundongos submetidos ao protocolo de indução de sepse e tratados via intraperitoneal com β -bloqueadores.

Lista de β -bloqueadores investigados:

1. propranolol (“antagonista” não seletivo β -ARs) – Sigma Aldrich (código do produto: 318-98-9);

2. bisoprolol (“antagonista” seletivo β_1 -ARs) –Sigma Aldrich (código do produto: 104344-23-2);
3. carvedilol (“antagonista” não seletivo β -ARs, porém com baixa atividade agonista parcial) – Sigma Aldrich (código do produto: 72956-09-3);
4. alprenolol (antagonista não seletivo β -ARs, porém com moderada atividade agonista parcial); Sigma Aldrich (código do produto: 13707-88-5);
5. bucindolol (antagonista não seletivo β -ARs, porém com significativa atividade agonista parcial). BioCrick (código do produto: 71119-11-4);

Protocolo experimental de indução de sepse polimicrobiana

Foi utilizado o modelo de ligadura cecal e punção (*cecal ligation and puncture*, CLP) para a indução da sepse polimicrobiana. Inicialmente, os animais foram anestesiados com isoflurano 1,5% e, a partir de uma laparotomia, a região cecal foi exposta. Logo após, a junção íleo-cecal foi ligada com fio de algodão e 2 perfurações transparietais foram realizadas no ceco com agulha de calibre 21 G para indução da sepse (Rittirsch, D., *et al.*, 2008). Em seguida, o órgão foi reposicionado na cavidade abdominal e a incisão foi suturada (Figura 8). Foi realizada a análise de sobrevida e o número de sobreviventes foi registrado a cada 24 horas durante 7 dias. Quando necessário, coletas de amostras biológicas foram feitas 24 horas após a CLP.

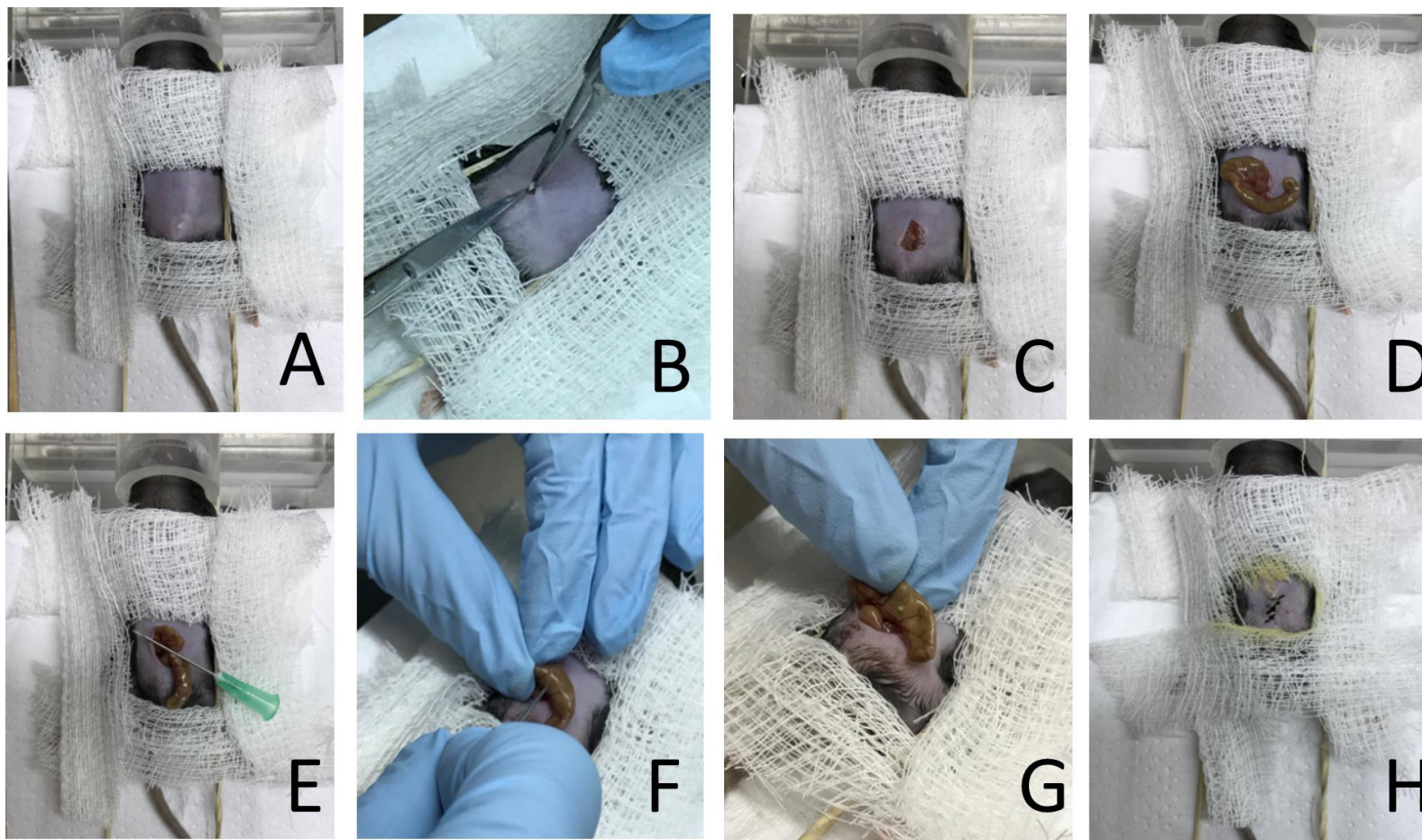


Figura 7: Sequência fotográfica de padronização da técnica cirúrgica de indução de sepse. O modelo consiste em uma laparotomia (A,B,C), seguida pela exposição do ceco (D). Em E é mostrada a região da válvula íleo-cecal identificada pela diminuição do diâmetro do órgão, seguida por: duas perfurações (F) e exposição do conteúdo cecal (G). Logo após, o órgão é reposicionado e a incisão suturada (H)

Protocolo de tratamento

O tratamento farmacológico com os β -bloqueadores foi realizado 2h após a CLP durante a fase hipercardiodinâmica da sepse (TANG; LIU, 1996) e a frequência de administração foi fundamentada no tempo de meia-vida⁶ de cada droga. A dose dos β -bloqueadores foi calculada baseando-se no volume aplicado por via intraperitoneal (100 μ L), na constante de dissociação em equilíbrio (K_D)⁷ para o β_1 -ARs (BAKER, 2005) e peso do animal, sendo estimada através do seguinte cálculo:

$$\text{Dose (ug/Kg): } \frac{\text{Volume (em ml)} \times \text{concentração da droga (em } \frac{\text{ug}}{\text{mL}}, \text{ baseada no KD)}}{\text{Peso do animal (em Kg)}}$$

Tomado como base estas informações a Tabela 1 mostra as dosagens⁸ utilizadas em cada tratamento:

Tabela 1: Dosagem empregada durante o decurso do tratamento séptico ou não.

Drogas	Dosagem						
	Dose (μ g/Kg)				Tempo de meia-vida	Frequência de tratamento	Duração do tratamento
	Volume (mL)	K_D β_1 -ARs	Peso do animal (em gramas)	Cálculo final (μ g/Kg)			
Propranolol	0,1	10^{-8} M	0,023	13	4 hs	3 vezes	12 horas
Bisoprolol	0,1	10^{-8} M	0,023	16	10 hs	1 vez	12 horas
Carvedilol	0,1	10^{-9} M	0,023	2	10 hs	1 vez	12 horas
Alprenolol	0,1	10^{-8} M	0,023	12	3 hs	4 vezes	12 horas
Bucindolol	0,1	3.10^{-9} M	0,023	0,005	-	1 vez	12 horas

⁶ **Tempo de meia-vida**- é o tempo necessário para que a concentração plasmática de uma droga se reduza para a metade do valor inicial.

⁷ **Constante de dissociação em equilíbrio (K_D)**- é a concentração da droga que se liga a 50% dos receptores.

⁸ **Dosagem**- é dose de cada droga que será administrado em uma frequência específica, durante um tempo determinado.

Contagem de bactérias no sangue

Amostras de sangue heparinizado foram adequadamente diluídas e semeadas (10 µL) sob condições estéreis em placas de Petri contendo Ágar Mueller Hinton (Difco Laboratories, Detroit, USA). As placas de cultura foram incubadas por 24 horas a 37°C e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) quantificado manualmente. Os resultados foram expressos como log de UFC/mL do sangue conforme descrito por COLÓN et al., (2019b)

Quantificação de citocinas

As dosagens de IL-1 β e TNF- α foram feitas no plasma e em sobrenadante de homogenato de coração 24 horas após sepse e em cultura de macrófagos, através do ensaio imunoenzimático, seguindo as instruções do fabricante (R&D System). Em resumo, placas de 96 poços foram cobertas com 50 µL/poço dos anticorpos específicos para cada citocina (*Pharmigen, San Diego, CA, USA*). O anticorpos foram diluídos em solução de ligação (*binding buffer*) pH 9,0 e incubados por 18-24 horas, a 4°C. As placas foram lavadas por três vezes com PBS/Tween-20 (0,05% Sigma). As ligações não específicas foram bloqueadas com 100 µL de PBS/BSA 1% por 2 horas em temperatura ambiente. As amostras e o padrão (curva padrão) foram colocados nas placas (50 µL) e incubados por 18-24 horas a 4°C. Após esse período, as placas foram lavadas com PBS/Tween e 50µL dos anticorpos biotinilados específicos para cada citocina foram adicionados. Após 1 hora, as placas foram lavadas com PSB/Tween e o conjugado avidina-peroxidase (diluição de 1:5000) foi adicionado a cada poço. Após 30 minutos de incubação, as placas serão lavadas com PBS/Tween e 100µL do substrato OPD (o-fenilenediaminadihidroclorato, *Sigma*) foi adicionado. As placas foram incubadas por 15 a 20 minutos em temperatura ambiente. A reação foi interrompida com 50µL de H₂SO₄ (1M) e a

densidade óptica medida a 490 nm em espectrofotômetro (Spectra Max-250, Molecular Devices). Os resultados foram expressos em picogramas/mL (pg/mL).

Ensaio de binding com radioligante [^3H] CGP-12177 em segmentos de tecido intacto

Os animais foram decapitados e o ventrículos foram cuidadosamente isolados e colocados em solução Krebs modificada (composição em mM: NaCl, 120,7; KCl 5,9; MgCl_2 , 1,2; CaCl_2 , 2,0; NaH_2CO_3 , 25,5; glicose, 11,5) aerada com uma mistura carbogênica (95% O_2 /5% CO_2) e mantida a 4°C (pH= 7,4). Em seguida, tiras do ventrículo esquerdo (~2x2 mm) foram preparadas para a realização do ensaio de binding, seguindo protocolo descrito em Horinouchi *et al.*, (2006). A densidade de sítios de ligação ($B_{\text{máx}}$) dos receptores β -adrenérgicos foi determinada através da Ligação Específica do [^3H] CGP-12177. Em resumo, cada tira de tecido foi incubada com uma concentração saturante de [^3H] CGP-12177 de (2000 pM) por 24 hs à 4°C em 1 ml de solução Krebs. A Ligação Não Específica foi determinada na presença 10 μM de adrenalina, também incubada por 24 hs à 4°C em 1 ml de solução Krebs.

Após o período de incubação, os segmentos de ventrículos foram secos em papel filtro, transferidos para tubos plásticos contendo 2 mL de Krebs à 4° C e vigorosamente agitados por 1 min a 1200 rpm. Posteriormente, os segmentos de ventrículos foram secos com papel de filtro e solubilizados em 500 μL de 1 M de NaOH durante 30 minutos e mantidos à 4°C. A radioatividade retida nos segmentos do ventrículo esquerdo foi determinada em alíquotas de 100 μL de cada amostra após a adição de 4 ml de líquido de cintilação (Optiphase Hi Safe 3, Perkin Elmer) em um contador de cintilação líquida (mencionar aparelho). Uma alíquota de 10 μL da amostra foi utilizada para determinação da quantidade de proteína através do método de Bradford utilizando albumina sérica como padrão (BRADFORD, 1976). A Ligação Total e a Ligação Não Específica (na presença de adrenalina 10 μM) foram calculadas pela divisão da quantidade de radioatividade na presença do radioligante pela quantidade de proteína mensurada no segmento

de ventrículo e expressada na forma fmol.mg de proteína⁻¹. Uma vez que a adrenalina é um ligante pouco lipossolúvel, seu uso na determinação da Ligação Não Específica permite estimar a densidade de receptores na superfície das células. A densidade dos receptores β -adrenérgicos na superfície (Ligação Específica) foi estimada através da equação:

$$\text{Ligação Específica} = \text{Ligação Total} - \text{Ligação Não Específica}$$

Os experimentos foram realizados em duplicatas.

Ensaio de reação de transcriptase reversa e reação de polimerase em cadeia em tempo real (RT-qPCR)

O RNA total foi isolado do tecido cardíaco de camundongos utilizando o reagente TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. A qualidade e a quantidade do RNA foram analisadas utilizando o espectofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific, MA, USA). Em seguida, 0,5 μ g de RNA total de cada amostra foi utilizado para gerar cDNA por transcrição reversa utilizando o Kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (ThermoFisher) seguindo seu protocolo. A quantificação do transcrito na amostra foi realizada no termociclador StepOnePlus (Life Technologies) utilizando *SYBR® Green real-time PCR Master Mix* (Applied Biosystems) para a expressão do gene que codifica o adrenoceptor- β_1 .

Foram utilizados os seguintes *primers* (Sigma-Aldrich):

(a) AR- β_1 *forward*: 5'-GGAGCTCCCTCGGACGAC-3'

(b) AR- β_1 *reverse*: 3'-AGCCTGGCTCTCTACACCTTG-5'

(c) GAPDH *forward*: 5'-CATCTTCTTGTGCAGTGCCA-3'

(d) GAPDH *reverse*: 3'-CGGCCAAATCCGTTAC-5'

A expressão do transcrito do gene que codifica o adrenoceptor- β_1 foi estimada pela normalização da expressão do gene *house keeper* GAPDH. Todos os primers tiveram suas sequências testadas antes do experimento para verificação de anelamentos e formação de dímeros.

Estudo de contração ventricular esquerda in vitro

Camundongos dos diferentes grupos experimentais foram mortos por decapitação. Uma toracotomia foi realizada e o coração foi rapidamente isolado e colocado em solução de Krebs gelado (4°C) com a seguinte composição (nM): NaCl, 118; KCL, 4,7; KH₂PO₄, 1,2; MgSO₄.7H₂O, 1,2; CaCl₂.2H₂O, 2,5; glicose, 11,7; pH 7,4). O tronco aórtico foi canulado com uma agulha 21G possibilitando a perfusão no aparelho de Langendoff conectado a um sistema de aquisição de dados (*Power Lab/8S, ADInstruments Pty Ltda, Austrália*) acoplado a um computador para registro da pressão ventricular esquerda. Os corações foram mantidos em perfusão retrógrada de solução de Krebs a 35°C aerada com mistura carbogênica contendo 95% O₂ e 5% CO₂. Em seguida, o átrio esquerdo foi isolado e um balão ventricular de 2 mm foi posicionado dentro do ventrículo esquerdo. O balão ventricular foi conectado a um transdutor de pressão (MLT844; AD Instruments, Castle Hill, Mew South Wales, Australia) para análise contínua da contração ventricular e inflado até 10 mmHg durante 30 minutos para a estabilização. Após a estabilização, um estímulo 10⁻⁹M isoprenalina (agonista seletivo β-ARs) foi realizado para determinar a viabilidade tecidual. Após um período de 5 minutos de repouso, uma curva concentração-resposta à isoprenalina foi construída pela adição da droga. A frequência cardíaca foi avaliada pois estima um mecanismo fundamental ligado à atividade cardíaca e, determinante para o desempenho do ventrículo esquerdo.

Determinação bioquímica de lesão cardíaca

Amostras de sangues heparinizadas foram coletadas 24 horas após a sepse e centrifugadas para aquisição do plasma (1000xg por 15 minutos em temperatura 4°C). Em seguida, foram determinados níveis de troponina-I através do Kit analítico (Elabscience; número do catálogo: E-EL-M0086) seguindo seu protocolo. A densidade óptica foi mensurada pelo leitor

de microplacas (Spectra Max-250, Molecular Devices) no comprimento de onda de 450 nm $\pm$ 2nm. Amostras hemolisadas foram descartadas do ensaio. Os resultados foram expressos em picogramas/mL (pg/mL).

Diferenciação de macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs)

Macrófagos derivados da medula óssea (MDMOs) foram obtidos como previamente descrito por (GERSUK; RAZAI; MARR, 2008). Células totipotentes da medula óssea (MO) dos fêmures de camundongos foram isoladas. A MO dos fêmures foi retirada com o auxílio de uma seringa de 3 mL (BD Ind. Cirur.) acoplada a uma agulha de 24 G $\frac{1}{2}$ (BD Ind. Cirúr.) contendo meio RPMI-1640 (Sigma) incompleto. A suspensão de MO do animal foi dividida em 4 placas de Petri pouco aderentes específicas para cultivo de macrófagos (BD OPTILUX) contendo 10 mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma), enriquecido com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Gibco, EUA), 20% (v/v) do sobrenadante de cultura de células L929 (rico em fator estimulante de colônia de macrófagos - M-CSF), Penicilina-Estreptomicina (100 U/mL) e Anfotericina B (2 μ g/mL). A cultura permaneceu em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 7 dias. No quarto dia de incubação foi adicionado mais meio de cultura enriquecido, como descrito anteriormente, para manter a cultura de célula até a diferenciação em 7 dias. A coleta dos macrófagos foi realizada utilizando PBS 1X gelado. A densidade celular requerida para os experimentos em placas (Costar) de 96 poços foi de 1x10⁵ células/poço. Após as coletas, as culturas de macrófagos foram estimuladas com os β -bloqueadores por uma hora. As concentrações das drogas foram baseada no valor do K_D, 3 vezes o valor do K_D; 10 vezes o valor do K_D. Após uma hora do estímulo com as drogas, duas diferentes abordagens foram realizadas com o objetivo de ser obter concentrações quantificáveis de TNF- α e IL1 β .

1. Macrófagos estimulados com LPS 1ug/mL durante 2 horas seguido de ATP 5uM por 30 min para estimular a produção de IL1 β .
2. Macrófagos estimulados com LPS 100ng/mL durante 4h para estimular a produção da citocina TNF- α .

Em seguida, as placas foram centrifugadas (500g por 10 minutos durante 4°C) e o sobrenadante foi coletado para quantificação das citocinas produzidas (descrito no item nomeado: **Quantificação de Citocinas**).

Registro hemodinâmico in vivo

Antes da implantação, os telêmetros (HD-X11, Data Sciences) foram esterilizados por 24 horas com solução germicida (Germi-Rio®); logo após a esterilização, a ponta do cateter do telêmetro foi preparada com um gel biocompatível (Regel Syringe, Data Sciences) para evitar formação de coágulos e bolhas. Sete dias antes do início do protocolo experimental, os camundongos foram anestesiados com isoflurano (2% de indução e 1% de manutenção) e com a utilização de um microscópio cirúrgico (Zeiss, STEMI 508), uma incisão foi realizada na carótida esquerda para a implantação do cateter acoplado a um transmissor. Após sete dias da implantação, um registro basal de duas horas foi obtido. Logo após, a jugular direita foi canulada (para a adição de doses crescentes de isoprenalina) e os camundongos foram submetidos à cirurgia para indução de sepse – CLP, conforme descrito anteriormente. Nos grupos *naïve* e *naïve* tratado, apenas a canulação na jugular direita foi realizada. Em seguida, um registro contínuo de 18 horas foi obtido e uma curva dose-resposta com isoprenalina (0,2 - 2x10⁴ ng/Kg) foi construída. A adição de uma dose de isoprenalina era acompanhada por uma lavagem com salina sendo estabelecido um período de 10 minutos entre elas (Figura 9). A pressão arterial

média, expressa em milímetros de mercúrio (mmHg) e a frequência cardíaca, em batimentos por minutos foram analisadas em *software* LabChart 8.0 (ADInstruments).

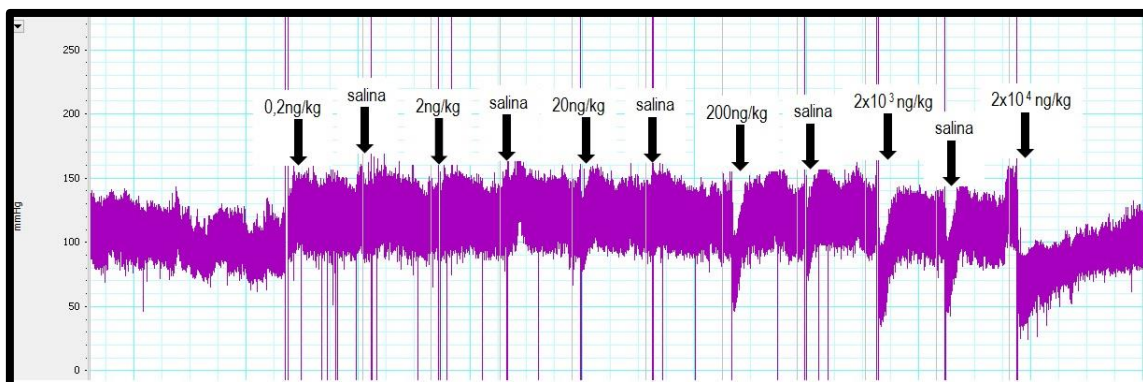


Figura 8: Representação gráfica do registro da pressão arterial pulsátil obtido de um camundongo hígido, através do *software* Labchat 7.3 acoplado ao sistema de telemetria (*AD instruments*). As setas representam o momento da administração de dose crescente de isoprenalina (0,2 ng/Kg – 2x10⁴ ng/Kg, em 20 µL) seguida de salina (20 µL) por via venosa (veia jugular direita).

Resultados

Disfunção cardíaca mediada pela sepse é acompanhada pelo aumento de citocinas pró-inflamatórias, hipotensão, bradicardia, perda de β -ARs, redução nos níveis do RNAm que codifica β_1 -ARs e lesão miocárdica.

A disfunção cardíaca é um importante componente na insuficiência cardiovascular presente na sepse, e está associada a um elevado risco de mortalidade (WALLEY, 2017). Sendo assim, o primeiro conjunto de dados que será apresentado nesta tese teve como objetivo padronizar o modelo experimental e demonstrar a disfunção cardíaca no modelo proposto de indução de sepse, a CLP.

Inicialmente, foi investigada a gênese e a progressão da sepse experimental. Sendo assim, animais sépticos e *naïves* foram observados por sete dias e uma curva de sobrevivência foi construída. Os dados obtidos mostram taxa de sobrevivência de 37% entre os camundongos sépticos, enquanto que não houve mortalidade no mesmo período entre os animais *naïve* (Figura 9). De acordo com a sobrevivência, a sepse experimental tem sido classificada em: leve (taxa de sobrevivência $\approx$ 90% durante 7 dias), moderada (taxa de sobrevivência de $\approx$ 40 % durante 7 dias) e grave (nenhum animal sobrevive além dos 7 dias) (RITTIRSCH et al., 2009). Sendo assim, o modelo de CLP usado na presente tese é classificado como um perfil moderado de sepse.

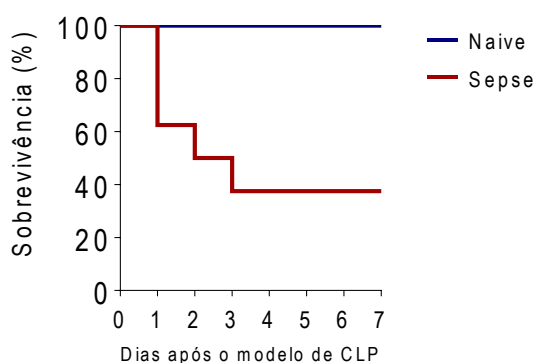


Figura 9: Curva de sobrevivência de animais não submetidos ao modelo de CLP (-) versus animais submetidos ao modelo de CLP (+). O modelo de sepse experimental (CLP- cecum ligation puncture) empregado foi iniciado com indução anestésica (isoflurano 1,5%) seguido de uma laparotomia. Logo após, o ceco é exposto, a junção ileo-cecal ligada através de um fio de algodão e duas perfurações com agulha de 18 gauge foram realizadas no ceco para indução da sepse. Em seguida, o ceco é reposicionado e a incisão suturada. Os animais submetidos ou não ao modelo de sepse experimental foram observados a cada 8 horas durante 7 dias. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevida e analisados pelo teste Log-rank (Mantel-Cox) (n=6 animais/grupo).

Em seguida, foi avaliada a disseminação bacteriana no sangue. Para isso, amostras de sangue foram coletadas após 24 horas de indução da sepse. Os resultados mostram que os camundongos sépticos apresentaram quantidades elevadas de bactérias ($\log\text{UFC/mL} = 6,4 \pm 0,5$; $n=6$; Figura 10).

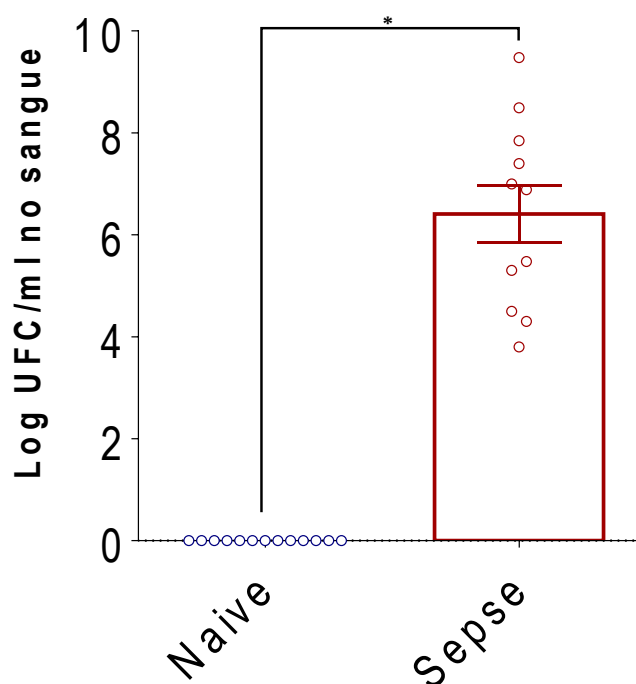


Figura 10: Camundongos *naives* e sépticos diferem quanto à quantidade de bactéria no sangue. As amostras de sangue foram coletadas após 24 de indução da sepse moderada e semeadas em ágar Mueller-Hinton. Após de 24hs de incubação à 37°C as colônias bacterianas foram contadas manualmente. Os dados foram expressos com logaritmo de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL). Os grupos experimentais foram comparados pelo teste T-students ($p < 0,05$: *naive* versus séptico). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 11-13 animais por grupo experimental.

Uma característica da fisiopatologia da sepse é a produção sistêmica de citocinas pró-inflamatórias; além disso, a literatura tem apontado que $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ são capazes de reduzir a atividade cardíaca. Diante disto, foi avaliada a quantidade de $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ sistêmica e local (tecido cardíaco). Sistemicamente, foi observado aumento de $\text{IL-1}\beta$ (Figura 11A; 807 ± 19 pg/mL, $n=6$) e $\text{TNF-}\alpha$ (Figura 11C; 1223 ± 133 pg/mL, $n=6$) nos animais sépticos, enquanto que os níveis destas citocinas nos camundongos *naives* encontraram-se abaixo do limite de detecção da técnica (Figura 11A-C; $n=6$).

No coração de camundongos sépticos, foi somente observado aumento de IL-1 β (Figura 11B; Sepse = 5,8 $\pm$ 1,3 pg/mg de proteína, n=7 vs 1,6 $\pm$ 0,1 pg/mg de proteína; n=7), mas não de TNF- α (Figura 11D).

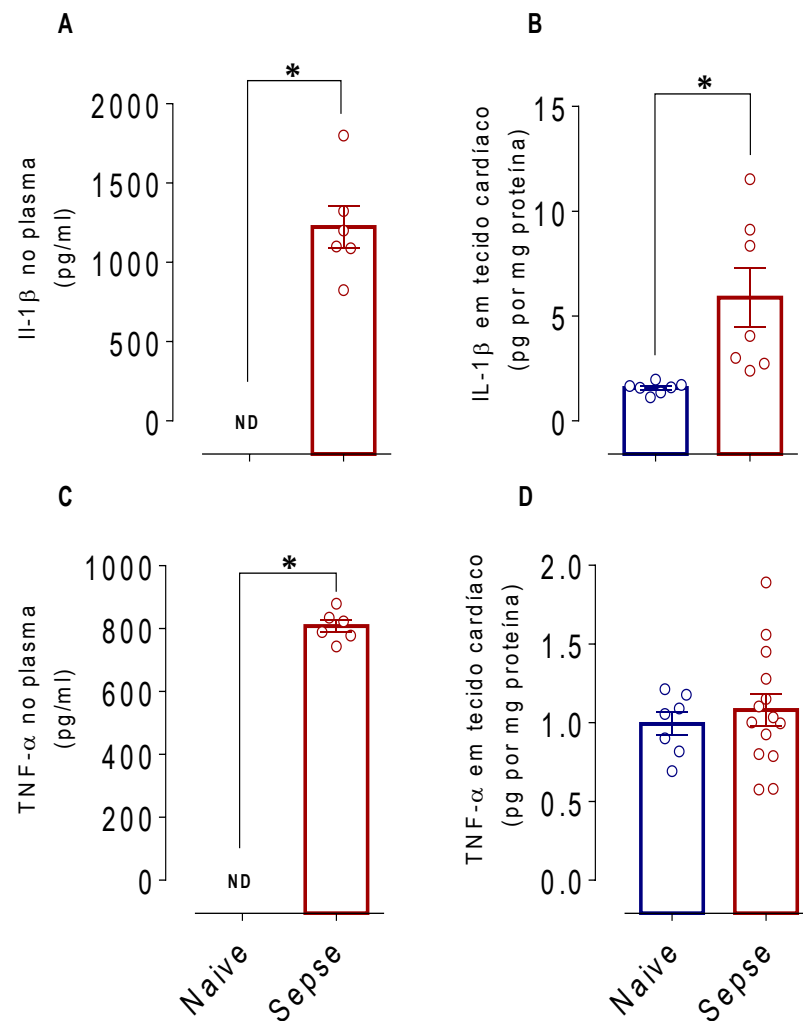


Figura 11: Quantificação de IL-1 β e TNF- α no plasma (A e C) e em tecido cardíaco (B e D) de animais *naïves* e *sépticos*. O plasma foi coletado após 24 horas de indução da sepse. Os níveis de IL-1 β e TNF- α foram quantificados por ELISA e os resultados expressos em picogramas por mL (pg/mL, em plasma) ou pg/mg de proteína do tecido cardíaco. Os *Scatter dot plot* representam a média e o erro padrão da média de 6-7 animais por grupo experimental. Os resultados foram analisados pelo Teste T-student. p<0,0001 *naïves* versus *sépticos* (em A e C) *p<0,009 *naïves* versus *sépticos* (em B). ND= não detectado

Um aspecto importante observado durante a sepse é a progressão para hipotensão e bradicardia. De fato, as alterações hemodinâmicas se instalaram rapidamente nos camundongos sépticos e após poucas horas após a CLP os animais apresentaram redução na pressão arterial média (Figura 12A) e na frequência cardíaca (Figura 12B) quando comparados aos camundongos *naives*. É importante mencionar que as medidas hemodinâmicas foram obtidas em animais acordados.

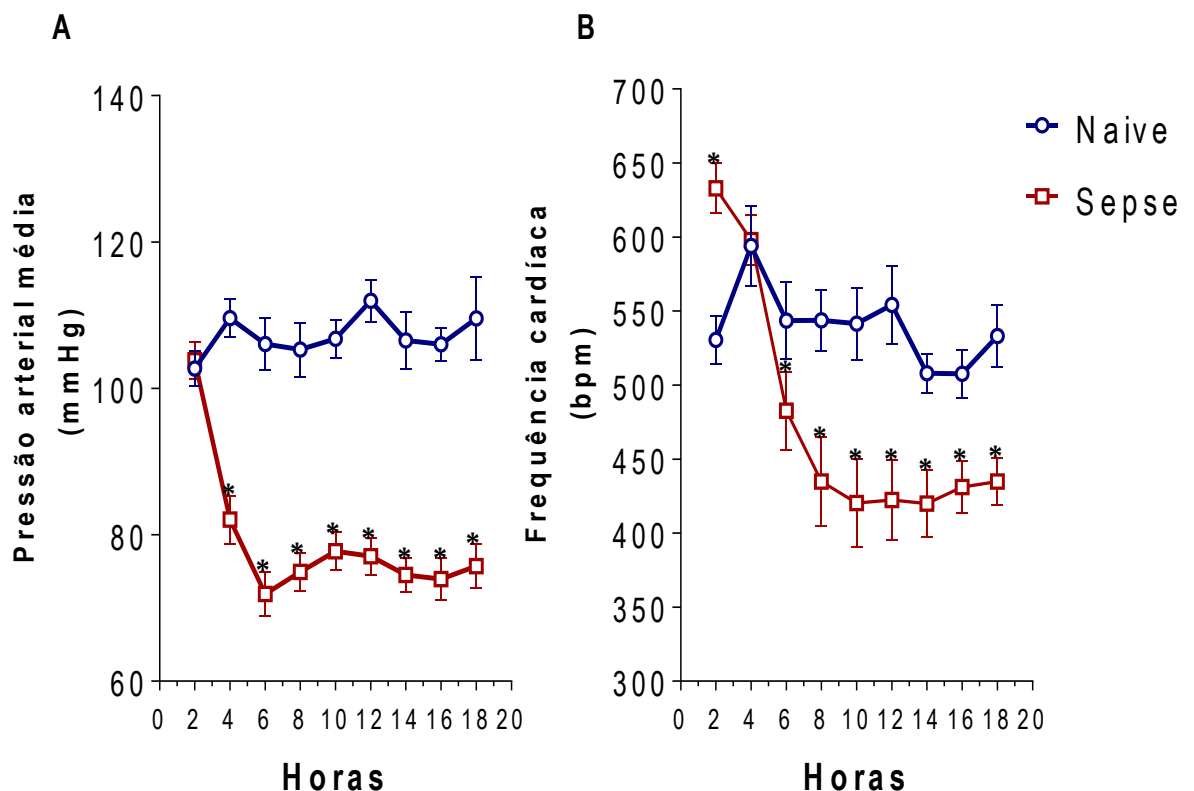


Figura 12: Registros hemodinâmicos de camundongos *naives* (●) e sépticos (■) observados por 18 horas. A: pressão arterial média, mmHg; B: frequência cardíaca, bpm. Cada ponto representa a média e o erro padrão da média de 8-20 animais. Os resultados foram expressos mmHg (A) e bpm (B) e analisado pelo teste ANOVA de duas vias. **naive* versus *sepse*

A perda da eficácia de drogas inotrópicas positivas no resgate da função cardíaca é uma característica observada durante a sepse. Para avaliar este efeito, foram isolados corações dos camundongos *naives* e sépticos, e em seguida, dois protocolos foram realizados: (1) ensaio com radioligantes [H^3] CGP-12177 para quantificar a abundância de β -ARs na superfície das células

cardíacas; (2) estudo de contração cardíaca em ex-vivo através do método de Langerdorf, para avaliar a frequência cardíaca. Os dados desses experimentos são mostrados na Figura 13.

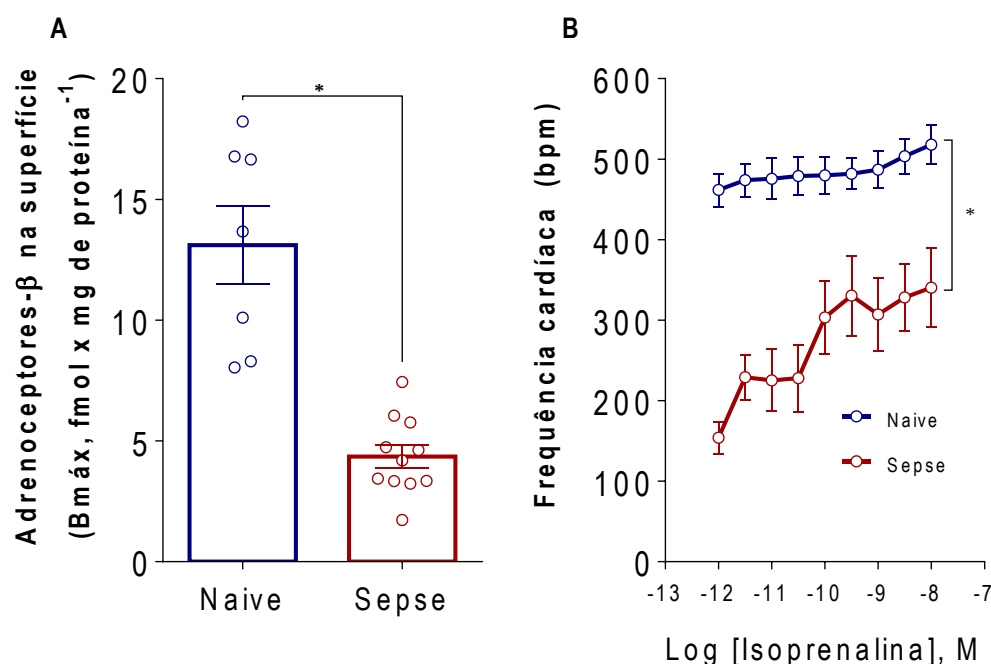


Figura 13: A perda de β -ARs na superfície de tecido cardíaco de animais sépticos (A) reduz responsividade do coração à concentrações crescentes de isoprenalina (B). Painel A, ensaios de binding foram utilizados segmentos do ventrículo esquerdo cardíaco. As barras representam a média com o erro padrão da média de 7-11 animais por grupo experimental. Os resultados foram expressos em fmol.mg de proteína⁻¹ e analisado pelo teste T-student ($p < 0,05$, *naive versus sépticos*). Painel B, curva concentração-resposta à isoprenalina (10^{-12} a 10^{-8} M) foram realizadas em coração intacto e a frequência cardíaca foi avaliada. Símbolos representam média e o erro padrão da média de 5 animais por grupo experimental. O efeito máximo (Emáx) dos diferentes grupos experimentais foi analisado através do teste T-students ($p < 0,05$, *naive versus sépticos*).

A Figura 13 mostra que na sepse há grande redução na densidade de β -ARs na superfície das células cardíacas (Figura 13A; *naive* B_{máx} = $8,8 \pm 1$ fmol.mg⁻¹ proteína, $n = 6$ vs *sepse* B_{máx} = $4,7 \pm 0,7$ fmol.mg⁻¹ proteína, $n = 5$), bem como na capacidade da isoprenalina (um agonista de β -ARs) elevar a frequência cardíaca (Figura 13B; *naive* Emáx = $555,8 \pm 22,97$ bpm, $n = 6$ vs *sepse* Emáx = $360,7 \pm 59,92$ bpm $n = 5$).

Adicionalmente, a expressão relativa do transcrito que codifica o β_1 -ARs no coração dos camundongos foi determinada 6, 12 e 24 horas após a sepse por *RT-qPCR* (Figura 14). O teste de Anova de duas vias seguida pelo teste de Dunnett's mostrou diferença estatística ($p < 0,0001$)

na expressão relativa de mRNA dos β_1 -ARs no coração de camundongos *naive* (n=8) e sépticos após 6 (n=8), 12 (n=8) e 24 horas (n=8) da CLP.

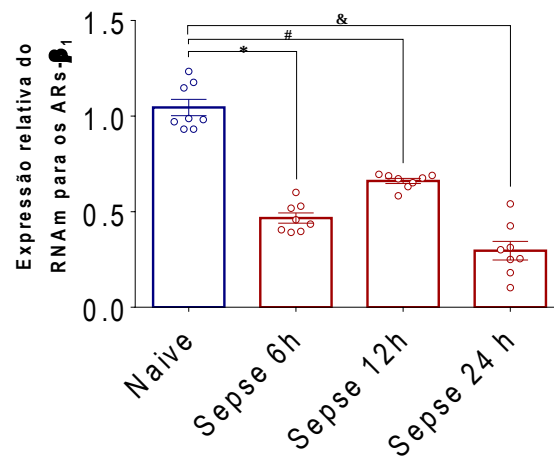


Figura 14: Redução de expressão do transcrito que codifica β_1 -AR em 6, 12 e 24 horas após a sepse. Nos ensaios de RT-pPCR foram utilizados segmentos do ventrículo esquerdo cardíaco. Os *scatter dot plot* representam a média com o erro padrão da média de 8 animais por grupo experimental. Os resultados foram expressos em relação ao grupo controle (*naive*) e analisado pelo teste ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Dunnett's. * $p < 0,0001$ *naive* versus sepse 6 h; # $p < 0,0001$ *naive* versus sepse 12 h; & $p < 0,0001$ *naive* versus sepse 6 h.

É importante mencionar que a insuficiência cardiovascular na sepse causa hipoperfusão tecidual de diversos órgãos, incluindo o coração, seguido de isquemia e lesão. Na sepse, danos no tecido cardíaco são acompanhados de aumento dos níveis de troponina-I no plasma (BESSIÈRE et al., 2013). Sendo assim, os níveis de troponina-I no plasma de camundongos *naives* e sépticos foram avaliados. O teste T-student mostra que há grande aumento troponina-I ($p < 0,0001$) no plasma de camundongos sépticos (Figura 15; *naive* $21,12 \pm 10$ pg/mL, n=7; vs sepse 733 ± 72 pg/mL, n=9).

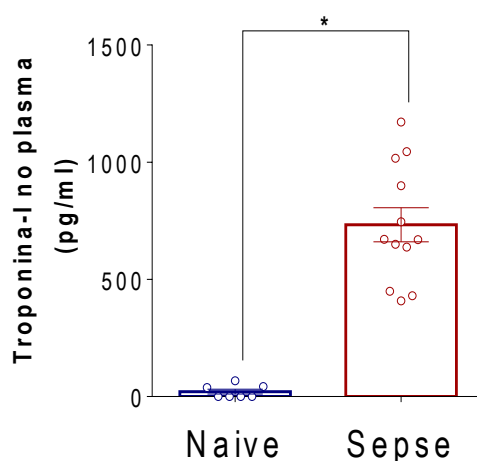


Figura 15: Quantificação de troponina-I no plasma de animais *naive* (●) e sépticos (■). O plasma foi coletado após 24 horas de indução da sepse. Os níveis de troponina-I foram quantificados por ELISA e os resultados expressos em picogramas por mL (pg/mL). Os *Scatter dot plot* representam a média e o erro padrão da média de 7-12 animais por grupo experimental. Os resultados foram analisados pelo Teste T-student. $p < 0,0001$ *naive versus sépticos*.

Esse primeiro conjunto de resultados apresentados caracterizou aspectos gerais hemodinâmicos e moleculares do modelo experimental de sepse empregado e mostrou que o modelo mimetizou o comprometimento cardíaco instalado na sepse. A seguir, serão apresentados os efeitos dos tratamentos com os β -bloqueadores sobre esses aspectos hemodinâmicos e moleculares.

Propranolol ou bisoprolol ou alprenolol, mas não carvedilol e bucindolol, “protegem” o β_1 -ARs da internalização mediada pela sepse em tecido intacto de coração

Uma pergunta relevante para a presente tese é se o tratamento com β -bloqueadores evita a perda dos β -ARs no coração de camundongos sépticos. Para responder essa pergunta, foram realizados ensaios de *binding* com o radioligante [3 H]CGP-12177 em segmento de tecido cardíaco. As Figuras 16 e 17 mostram que a perda dos β -ARs da superfície das células cardíacas foi prevenida quando os camundongos sépticos foram tratados com propranolol (Figura 16A), bisoprolol (Figura 16B) e alprenolol (Figura 17A).

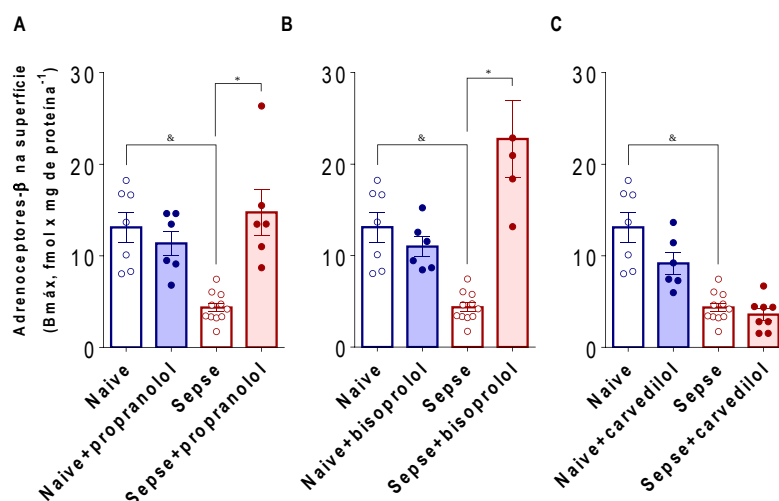


Figura 16: Efeito do tratamento *in vivo* com β -bloqueadores na densidade de β -ARs em camundongos submetidos à sepse ou não. Nos ensaios de *binding* foram utilizados segmentos do ventrículo esquerdo cardíaco. Os *scatter dot plot* representam a média e o erro padrão da média de 5-8 animais por grupo experimental. Os resultados foram expressos em fmol.mg de proteína⁻¹ e analisado pelo teste ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett's. & $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo sépticos; * grupo séptico versus grupo séptico + β -bloqueador.

Entretanto, os tratamentos dos camundongos sépticos com carvedilol (Figura 16C) e bucindolol (Figura 17B) não evitaram a perda de β -ARs. Interessantemente, houve diminuição dos β -ARs na superfície de células cardíacas de camundongos *naive* tratados com bucindolol (Figura 17B). Os valores de Bmáx (em fmol.mg de proteínas⁻¹) são representados na Tabela 2.

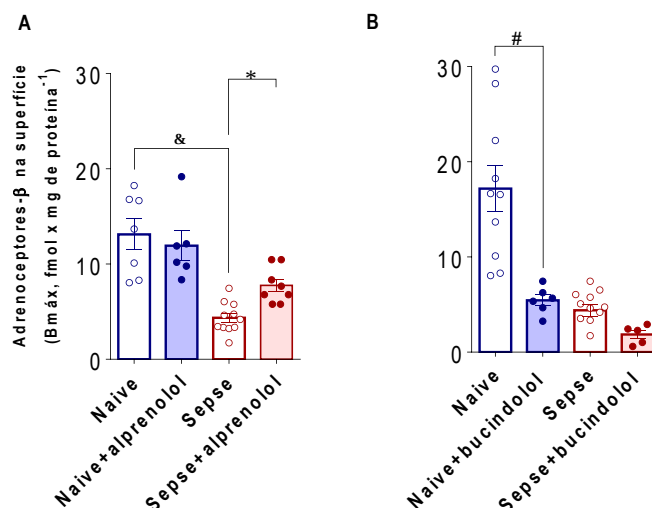


Figura 17: Efeito do tratamento *in vivo* com β -bloqueadores na densidade de β -ARs em camundongos submetidos à CLP ou não. Nos ensaios de *binding* foram utilizados segmentos do ventrículo esquerdo cardíaco. Os *scatter dot plot* representam a média com o erro padrão da média de 5-8 animais por grupo experimental. Os resultados foram expressos em fmol.mg de proteína⁻¹ e analisado pelo teste ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett's. & $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo sépticos; # grupo *naive* versus grupo *naive* + β -bloqueador; * grupo séptico versus grupo séptico + β -bloqueador.

Tabela 2: Densidade (Bmáx) dos receptores β -adrenérgicos em segmentos de ventrículos esquerdos.

Grupos Experimentais	Valores de Bmáx (fmol x mg de proteína ⁻¹)
Naive	13,1±1,6
Naive+propranolol	11,3±1,3
Naive+bisoprolol	11,0±1,0
Naive+carvedilol	9,0±1,0
Naive+alprenolol	12,0±1,5
Naive+bucindolol	5,4±0,6 [#]
Sepsis	4,3±0,5 &
Sepsis+propranolol	15,0±2,5*
Sepsis+bisoprolol	23,0±4,0*
Sepsis+carvedilol	3,5±0,6
Sepsis+alprenolol	8,0±0,6*
Sepsis+bucindolol	1,8±0,4

Os valores são expressos como a média e o erro padrão da média de 5-8 animais por grupo experimental*
Os resultados foram analisados pelo teste de Anova de uma via seguida pelo de Dunnett's. Símbolos representam diferença estatística: & *naive* versus *sepsis*; # *naive* versus *naive*+bucindolol; * *sepsis* versus *sepsis* + tratamento.

Esses dados sugerem que, o tratamento com propranolol e bisoprolol e alprenolol foram eficazes em prevenir à perda de β -ARs na célula cardíaca mediada pela sepsis.

Camundongos sépticos tratados com propranolol ou bisoprolol ou carvedilol ou bucindolol, mas não com alprenolol, aumentam a expressão do transcrito que codifica β_1 -ARs em tecido cardíaco

Um fato comum observado no tratamento com antagonistas dos β -ARs é a supregulação (*up-regulation*) desses receptores no coração (BRODDE et al., 1989a). Sendo assim, foi quantificada a expressão relativa de transcritos do gene que codifica β -ARs.

O tratamento de camundongos sépticos propranolol (Figura 18A), bisoprolol (Figura 18B), carvedilol (Figura 18B) e bucindolol (Figura 19B) aumentou a expressão de mRNA dos β_1 -ARs no tecido cardíaco. Supreendentemente, a expressão relativa mRNA do β_1 -AR não foi afetada pelo tratamento com alprenolol (Figura 19A), bem como nos camundongos *naïves* tratados com propranolol (Figura 18A), bisoprolol (Figura 18B) e carvedilol (Figura 18C). Interessantemente, foi observado o aumento da transcrição em camundongos *naïves* tratados com bucindolol (Figura 19B).

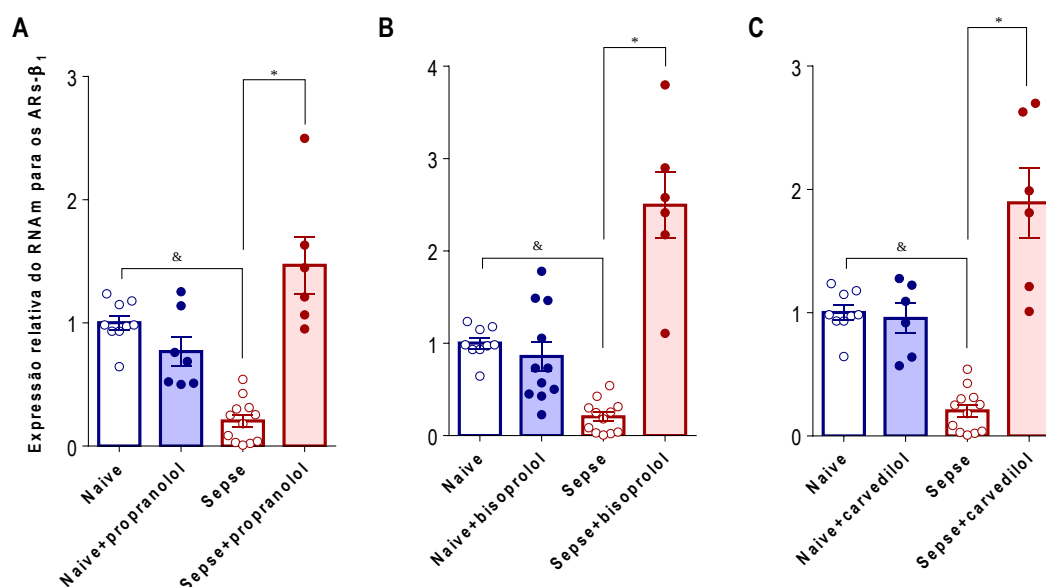


Figura 18: Efeito do tratamento *in vivo* com propranolol (A), bisoprolol (B) e carvedilol (C) na expressão relativa de β_1 -ARs em camundongos submetidos à sepse ou não. Nos ensaios de RT-pPCR foram utilizados segmentos do ventrículo esquerdo cardíaco. Os scatter dot plot representam a média e o erro padrão da média de 6-12 animais por grupo experimental. Os resultados foram expressos em relação ao grupo *naïve* e analisado pelo

teste ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett's. & $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo sépticos; * grupo séptico versus grupo séptico + β -bloqueador.

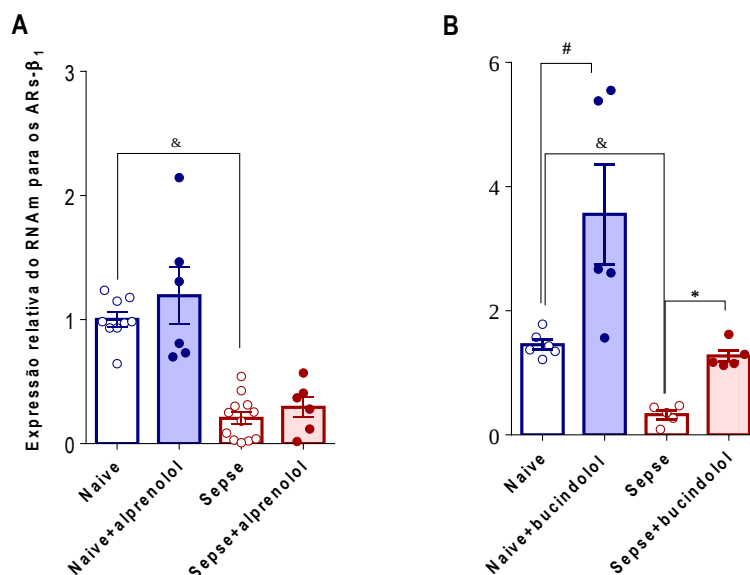


Figura 19: Efeito do tratamento *in vivo* com alprenolol (A) e bucindolol (B) na expressão relativa de β_1 -ARs em camundongos submetidos à sepse ou não. Nos ensaios de RT-pPCR foram utilizados segmentos do ventrículo esquerdo cardíaco. Os *scatter dot plot* representam a média com o erro padrão da média de 6-12 animais por grupo experimental. Os resultados foram expressos em fmol.mg de proteína⁻¹ e analisado pelo teste ANOVA de uma via seguida pelo teste de Dunnett's. & $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo sépticos; # $p < 0,05$ grupo *naive* versus *naive* + β -bloqueador; * grupo séptico versus grupo séptico + β -bloqueador.

Os dados desta seção sugerem que, animais sépticos tratados com propranolol, bisoprolol, carvedilol e bucindolol têm a expressão de β_1 -ARs aumentada no tecido cardíaco, efeito esse não observado entre os animais sépticos tratados com alprenolol.

O tratamento de camundongos sépticos com propranolol, bisoprolol e alprenolol, mas não com carvedilol e bucindolol, aumenta o cronotropismo da isoprenalina em experimento com coração isolado.

Na sepse, a incapacidade do coração responder a estímulos adrenérgicos tem sido relacionada com a perda de β_1 -ARs. Sendo assim, foi investigado se a “prevenção” da perda de β_1 -ARs e de seu mRNA observada após alguns tratamentos com β -bloqueadores (Figuras 16-17 e Figuras 18-19) reverteria o quadro hiporeativo do coração de camundongos instalado na

seps. Para isso, camundongos sépticos foram tratados com propranolol, bisoprolol, carvedilol, alprenolol e bucindolol e, após 24 horas da indução da seps por CLP, o coração foi isolado, montado num sistema Langendorff e uma curva concentração-resposta para a isoprenalina foi construída.

Como esperado, o cronotropismo positivo máximo da isoprenalina no coração de camundongos *naive* não foi afetado pelo tratamento com propranolol ($436 \pm 9,0$ bpm, $n=9$), bisoprolol ($474,5 \pm 34$ bpm, $n=9$), carvedilol (450 ± 33 bpm, $n=9$) e alprenolol (518 ± 24 bpm, $n=9$), respectivamente Figuras 20A-C e 21A. Porém, o cronotropismo positivo máximo da isoprenalina no coração de camundongos *naive* tratados bucindolol foi reduzido ($E_{\text{máx}} = 388 \pm 10$ bpm; $n=5$).

Na presença de isoprenalina, as frequências cardíacas dos corações de camundongos sépticos tratados com propranolol (Figura 20A, $E_{\text{máx}} = 468 \pm 15$ bpm, $n=6$) ou alprenolol (Figura 21A, $E_{\text{máx}} = 528 \pm 3$ bpm; $n=6$) foram bastante superiores àsquelas de camundongos sépticos que não receberam algum destes dois β -bloqueadores ($E_{\text{máx}} = 340 \pm 49$ bpm $n=5$) e semelhantes àsquelas encontradas no coração de camundongos *naive* ($E_{\text{máx}} = 518 \pm 24$ bpm $n=9$).

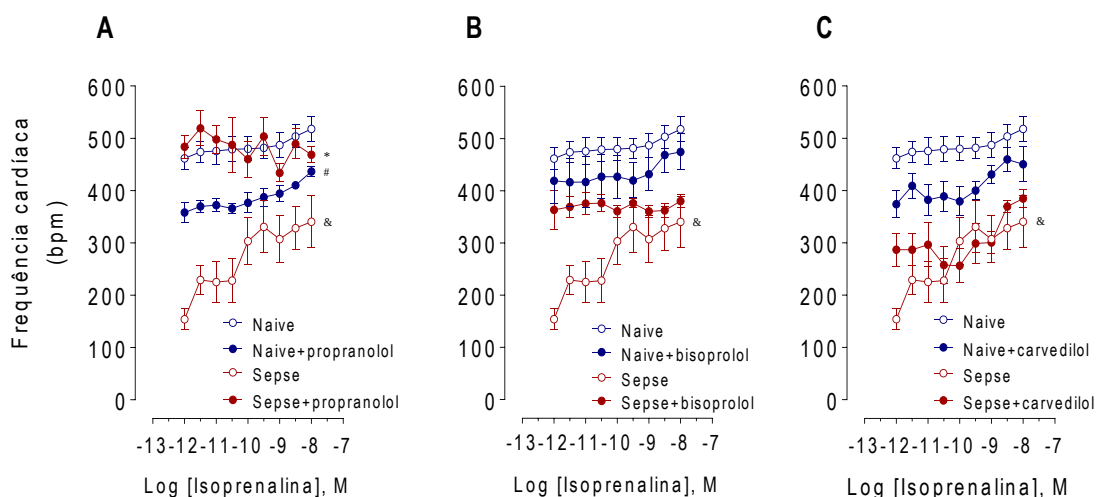


Figura 20: Animais sépticos tratados com propranolol e bisoprolol, mas não carvedilol, restabelecem a frequência cardíaca em coração isolado. Curva concentração-resposta à isoprenalina (10^{-12} a 10^{-8}) foram realizadas em coração intacto e a frequência cardíaca foi avaliada. O efeito máximo ($E_{\text{máx}}$) dos diferentes grupos experimentais foi analisado através do teste Anova de uma via seguido pelo Teste de Dunnett's (& $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo sépticos; # $p < 0,05$ grupo *naive* versus *naive* + β -bloqueador; * grupo séptico versus grupo séptico + β -bloqueador). Símbolos representam a média e o erro padrão da média de 5-6 animais por grupo experimental

No entanto, não houve prevenção do cronotropismo reduzido quando os camundongos sépticos foram tratados com carvedilol ($E_{\text{máx}} = 384 \pm 16$ bpm $n=8$), bucindolol ($E_{\text{máx}} = 260 \pm 30$ bpm $n=5$) ou bisoprolol ($E_{\text{máx}} = 380 \pm 12$ bpm $n=7$), respectivamente Figura 20C; 21B; 20B.

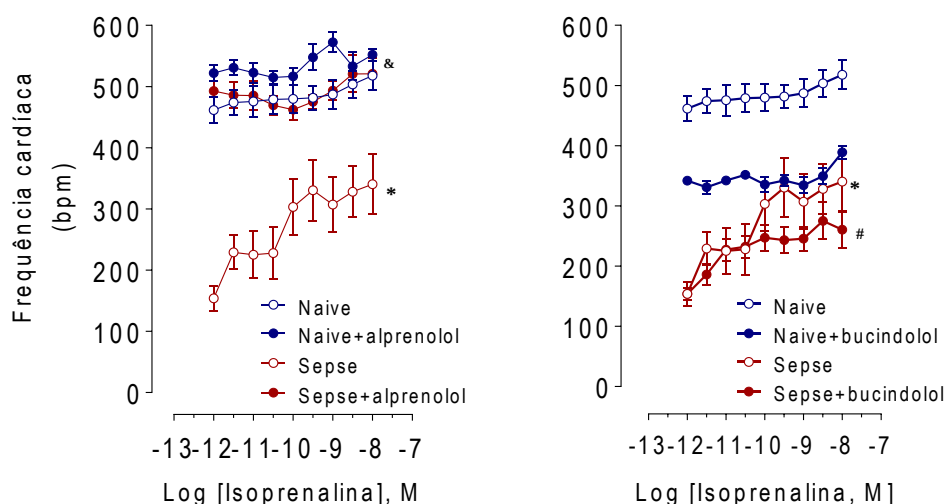


Figura 21: Animais sépticos tratados com alprenolol (A) mas não bucindolol (B) restabelecem a frequência cardíaca em coração isolado. Curva concentração-resposta à isoprenalina (10^{-12} a 10^{-8}) foram realizadas em coração intacto e a frequência cardíaca foi avaliada. O efeito máximo ($E_{\text{máx}}$) dos diferentes grupos experimentais foi analisado através do teste Anova de uma via seguido pelo Teste de Dunnett's (& $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo sépticos; # $p < 0,05$ grupo *naive* versus *naive* + β -bloqueador; * grupo séptico versus grupo séptico + β -bloqueador). Símbolos representam a média e o erro padrão da média de 5-6 animais por grupo experimental.

O tratamento com β -bloqueadores resulta em menor produção de citocinas pró-inflamatórias durante a sepse

Camundongos sépticos apresentam elevadas quantidades de citocinas pró-inflamatórias no plasma (IL-1 β e TNF- α) e no coração (IL-1 β)(Figura 12). Nesse sentido, animais sépticos foram tratados com β -bloqueadores e após 24 h, o soro e coração foram coletados.

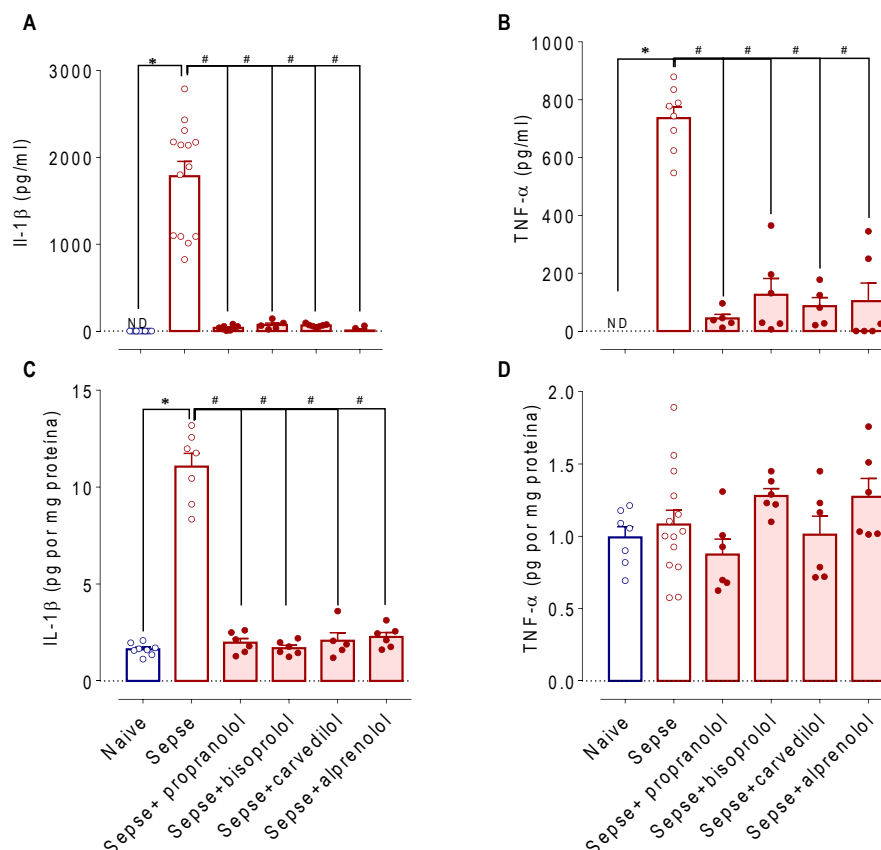


Figura 22: Animais sépticos tratados com β -bloqueadores reduzem a produção de IL-1 β (A e B, respectivamente, soro e coração) e TNF- α (C e D, respectivamente, soro e coração). Após 24 horas da indução da sepse, os animais tratados com os β -bloqueadores foram heparinizado e o sangue e o coração coletados. Em seguida os tecidos foram processados e os níveis de IL-1 β e TNF- α determinados pelo teste imunoenzimático. Os dados foram analisados através do teste Anova de uma via seguido pelo Teste de Dunnett's (* $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo séptico; # $p < 0,05$ grupo sepse versus grupo séptico+tratamento). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5-15 animais por grupo experimental.

Altos níveis de IL-1 β (1784 ± 169 pg/mL, $n=14$) e TNF- α (736 ± 39 pg/mL, $n=8$) foram encontrados no soro de camundongos sépticos (Figura 22). No entanto, os tratamentos com os β -bloqueadores reduziram os níveis plasmáticos de IL-1 β e TNF- α (IL-1 β , em pg/mL: propranolol= 37 ± 9 ; bisoprolol= 71 ± 22 ; carvedilol= 65 ± 18 ; alprenolol= 7 ± 4 ; TNF- α : propranolol= 44 ± 14 ; bisoprolol= 125 ± 56 ; carvedilol= 66 ± 29 ; alprenolol= 103 ± 62 pg/mL; $n=5-8$; Figura 22A e 22B). Além disso, os tratamentos com os β -bloqueadores reduziram os níveis de IL-1 β no coração (em pg.mg⁻¹ proteína: sépticos não tratados= $11 \pm 0,7$, tratados com propranolol= $2 \pm 0,2$; bisoprolol= $2 \pm 0,1$; carvedilol= $2 \pm 0,4$; alprenolol= $2 \pm 0,2$; $n=5-8$; Figura 22C), mas não diminuíram

os níveis de TNF- α (em pg.mg⁻¹ proteína: sépticos não tratados= 1 $\pm$ 0,09; tratados com propranolol= 0,9 $\pm$ 0,1; bisoprolol= 1,3 $\pm$ 0,05; carvedilol= 1 $\pm$ 0,1; alprenolol= 1,3 $\pm$ 0,12 n=5-14; Figura 22 D).

Os resultados desta seção mostram que todos os β -bloqueadores foram eficientes na redução de IL-1 β (sistêmica e local) e TNF- α (apenas os níveis sistêmicos). A seguir, foi investigado o efeito dos β -bloqueadores sobre a produção dessas citocinas por macrófagos.

β -bloqueadores reduzem a produção de citocinas pró-inflamatórias em cultura de macrófagos estimulados por LPS

Durante o processo inflamatório infeccioso, os macrófagos são capazes de identificar substâncias dos patógenos microbianos desencadeando a produção de citocinas por essas células. É sabido que as citocinas pró-inflamatórias, entre elas IL-1 β e TNF- α , são importantes nas reações que medeiam o processo inflamatório inicial, e que em altas concentrações (como na sepse) são capazes de reduzir a contratilidade cardíaca, o tônus da musculatura lisa vascular e promover quadros hipoglicêmicos que são incompatíveis com a vida. Neste sentido, espera-se que a redução na concentração sistêmica e local de IL-1 β e TNF- α traga benefícios ao paciente.

Como mostrado na seção anterior (Figura 22), o tratamento com β -bloqueadores reduziu os níveis IL-1 β (séricos e locais) e TNF- α (apenas séricos). Sabendo que a produção de citocinas resulta da exposição de substâncias bacterianas aos macrófagos, foi investigada a capacidade dos β -bloqueadores reduzirem a produção de IL-1 β e TNF- α por macrófagos isolados em duas situações experimentais: (1) tratamento dos macrófagos com β -bloqueadores por 60min seguida da exposição ao LPS (1 μ g/mL) por 120min mais ATP (5 μ M) por 30min para quantificação de IL-1 β ; (2) tratamento dos macrófagos com β -bloqueadores por 60min seguida da exposição ao LPS (100ng/mL) por 4h para quantificação de TNF- α .

Como mostrado na Figura 23A-J, macrófagos desafiados com LPS foram capazes de estimular a produção de IL-1 β (635 $\pm$ 29 pg/mL versus 28 $\pm$ 8 em macrófagos não desafiados) e TNF- α (1160 $\pm$ 71 pg/mL versus 24 $\pm$ 5 em macrófagos não desafiados). Os tratamentos com os β -bloqueadores diminuíram (Anova de uma via seguida pelo teste de Dunnet) as concentrações de IL-1 β (Figura 23A-E; Tabela X) e TNF- α (Figura 23A-E; Tabela 2). No entanto, não houve clara relação concentração-resposta com nenhum β -bloqueador investigado.

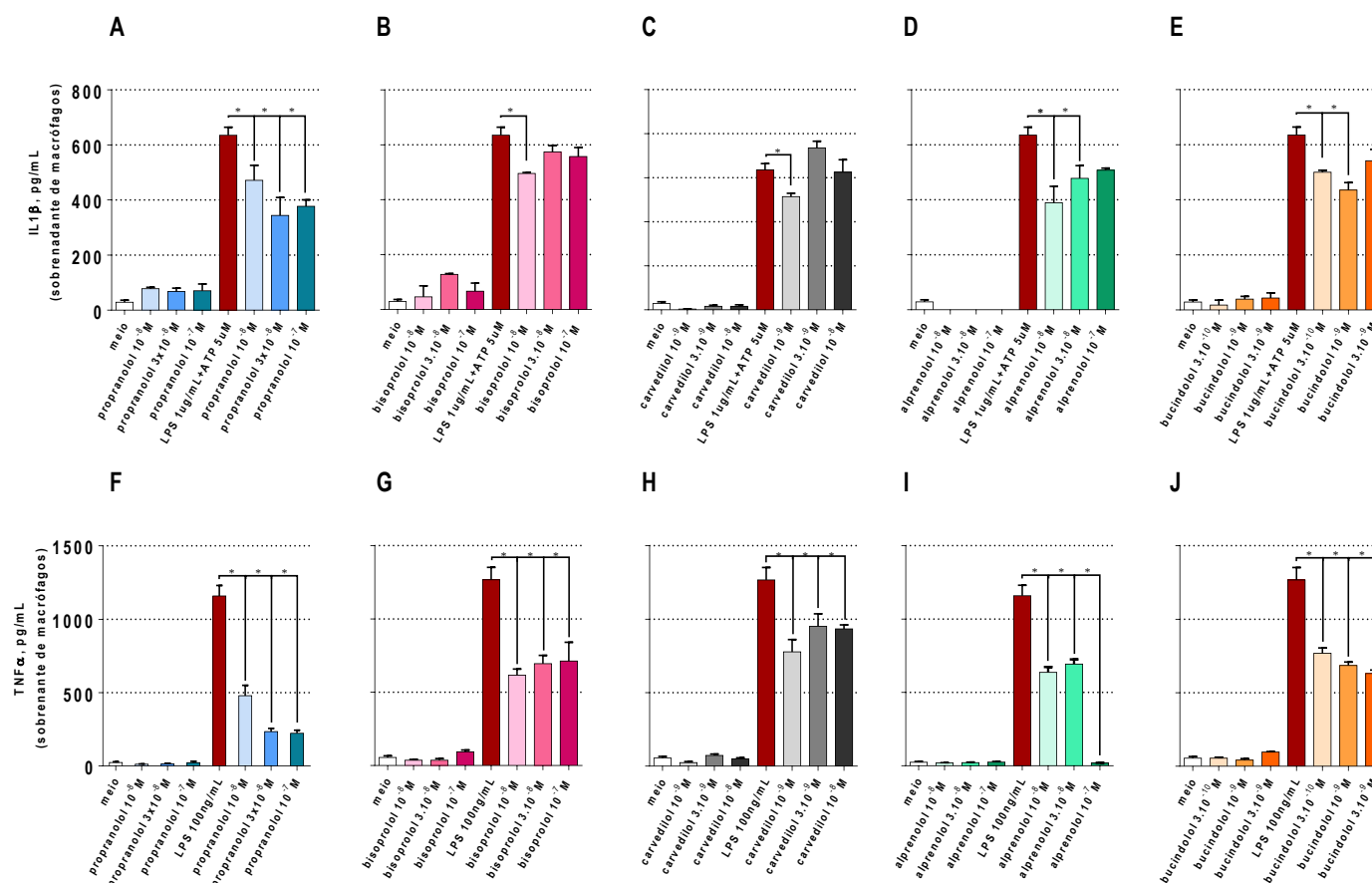


Figura 23: Macrófagos estimulados com β -bloqueadores e expostos ao LPS reduzem a produção de IL-1 β (A-E) e TNF- α (F-J). Paineis A-E: macrófagos foram estimulados com as drogas por uma hora seguida pela exposição ao LPS por duas horas mais trinta minutos de ATP 5 μ M, em seguida, IL-1 β foi quantificada. Paineis F-J: macrófagos foram estimulados com as drogas por uma hora, seguida pela exposição ao LPS por quatro horas, em seguida, TNF- α foi quantificada. As citocinas foram mensuradas em sobrenadante de macrófagos pelo método de ELISA. O experimento foi realizado em quintuplicatas e cada amostra continha 10^5 de células. As barras representam a média e o erro padrão da média. Os dados foram analisados por Anova de uma via seguido pelo Teste de Dunnett's. * $p < 0,05$ se *sepe* *versus* *sepe*+[tratamento, M]

Tabela 3: Valores de IL-1 β e TNF- α em sobrenadante de macrófagos estimulados ou não com concentrações crescentes dos β -bloqueadores (as concentrações foram baseadas no valor de K_D ; três vezes o valor de K_D ; e dez vezes o valor de K_D de cada droga) exposto ao LPS** 1 μ g/mL+ATP 5 μ M ou LPS 100ng/mL. O experimento foi realizado em quintuplicatas e cada amostra continha 10⁵ células. Os valores de p foram fornecidos através da análise de Anova de uma via com mensurações repetidas seguida pelo teste de Dunnet's.

Grupos Experimentais															
***M ϕ +LPS 1 μ g/mL+ATP 5 μ M (estímulo para a produção de IL-1 β)															
meio	Propranolol			bisoprolol			carvedilol			alprenolol			bucindolol		
	10 ⁻⁸ M	3.10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁹ M	3.10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M	3.10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	3.10 ⁻⁹ M
635 ±29	471 ±31	344 ±37	377 ±14	496 ±4	573 ±23	557 ±32	514 ±15	734 ±31	625 ±57	389 ±60	478 ±46	507 ±7	500 ±7	453 ±27	541 ±41
Valor de p	0,002	0,0002	0,0002	0,02	N.A****	N.A	0,01	N.A	N.A	0,008	0,08	N.A	0,05	0,005	N.A
M ϕ +LPS 100ng/mL (estímulo para a produção de TNF- α)															
meio	Propranolol			bisoprolol			carvedilol			alprenolol			bucindolol		
	10 ⁻⁸ M	3.10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻⁷ M	10 ⁻⁹ M	3.10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁸ M	3.10 ⁻⁸ M	10 ⁻⁷ M	3.10 ⁻¹⁰ M	10 ⁻⁹ M	10 ⁻⁷ M
1160 ±71	480 ±70	235 ±21	223 ±20	616 ±42	695 ±56	713 ±127	777 ±83	951 ±85	934 ±27	642 ±63	693 ±31	19 ±1	768 ±36	686 ±23	631 ±23
Valor de p	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0006	0,006	0,006	0,007	0,07	0,07	<0,001	<0,001	0,0001	<0,001	<0,001	<0,001

*Constante de dissociação em equilíbrio (K_D): é a concentração da droga que se liga em 50% dos receptores disponíveis para a ligação. **LPS: lipopolissacarídeo bacteriano. ***M ϕ = macrófagos. ****N.A= não aplica.

Tomados em conjunto, esses resultados demonstram que, os β -bloqueadores foram eficientes na redução de IL-1 β e TNF- α tanto no tratamento *in vivo* (Figura 22) como em cultura isolada de macrófagos.

Somente o tratamento com propranolol resulta em menor disseminação bacteriana para a corrente sanguínea após a sepse.

A Figura 24 mostra os valores de log₁₀ das unidades formadoras de colônias bacterianas por ml de sangue de camundongos sépticos (Log UFC/ml= 3,8 $\pm$ 0,3; n=11) *versus* camundongos sépticos tratados com propranolol (2,0 $\pm$ 0,2), bisoprolol (3,7 $\pm$ 0,4), carvedilol (3,2 $\pm$ 0,2), alprenolol (2,9 $\pm$ 0,2) e bucindolol (4 $\pm$ 0,4) (n=6-9). Interessantemente, foi observado que apenas o tratamento dos camundongos sépticos com propranolol reduziu a disseminação bacteriana para a corrente sanguínea quando comparados com animais sépticos não tratados.

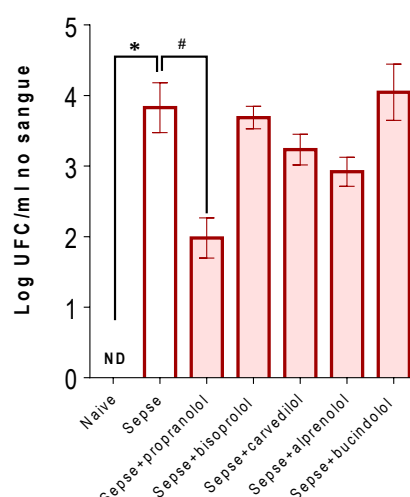


Figura 24: Tratamento com propranolol reduz o número de colônias bacterianas em animais sépticos. As amostras de sangue foram coletas após 24 de indução da sepse moderada e semeadas em ágar Mueller-Hinton. Após de 24hs de incubação à 37°C as colônias bacterianas foram contadas manualmente. Os dados foram expressos com logaritmo de unidades formadoras de colônias (UFC) por mililitro (mL). Os grupos experimentais foram comparados através do teste Anova de uma via seguido pelo Teste de Dunnett's (*p<0,05 grupo *naive* *versus* grupo séptico; # p<0,05 grupo sepse *versus* grupo séptico+propranolol). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5-6 animais por grupo experimental.

Uma vez que o propranolol reduziu a disseminação bacteriana para a corrente sanguínea na presença de propranolol, foi investigado uma possível ação microbicida direta do propranolol em cultura bacteriana de *Staphylococcus aureus* isolados de pacientes e cultivados em meio RPMI. A Figura 25 mostra que o propranolol não tem ação microbicida sobre a cultura de *Staphylococcus aureus*.

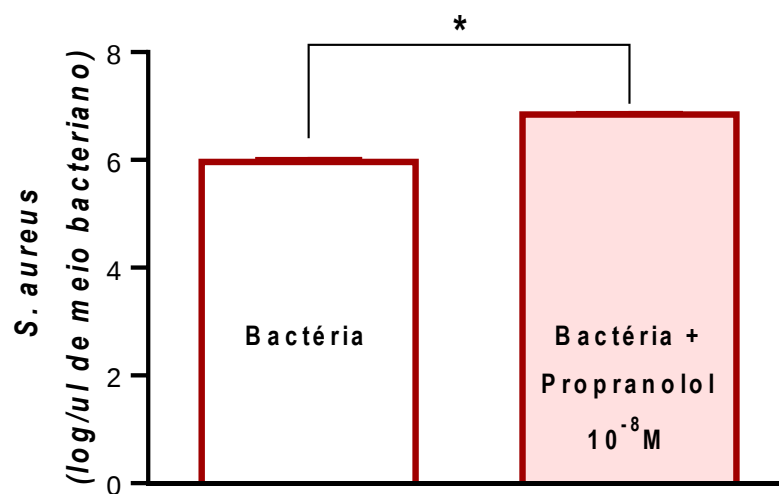


Figura 25: Propranolol não apresenta ação bactericida em colônias isoladas de *Staphylococcus aureus*. O meio de cultura bacteriano contendo propranolol ou não foi semeado em ágar Mueller-Hinton. Após de 2hs de incubação com a droga à 37°C e 5% CO₂, meio bacteriano foi semeado em ágar Mueller-Hinton e mantido em 37° C. Após 24 horas as colônias foram contadas manualmente. Os dados foram expressos com logaritmo de unidades formadoras de colônias (UFC) por microlitro (μL). Os grupos experimentais foram comparados através do teste de student's. *p<0,05 meio de cultura bacteriano sem propranolol *versus* meio de cultura bacteriano com propranolol. O experimento foi realizado em quintuplicata e os símbolos representam à média e o erro padrão da média.

O resultado desta seção indica que, camundongos sépticos tratados com propranolol apresentam melhor controle da infecção bacteriana. Entretanto, o estímulo com propranolol em cultura bacteriana evidencia que a droga não apresenta ação microbicida sobre a cultura de isoladas de *Staphylococcus aureus*.

A lesão cardíaca na sepse é reduzida pelo tratamento com propranolol ou alprenolol, mas não com bisoprolol, carvedilol ou bucindolol

Como mostrado na Figura 26, os camundongos sépticos tratados com propranolol (Figura 26A; 296 ± 7 pg/mL n=6) e alprenolol (Figura 26D; 448 ± 39 pg/ml n=6) tem menores níveis plasmáticos de troponina-I quando comparado aos animais sépticos (733 ± 72 pg/mL n=12). No entanto, a quantidade de troponina-I no plasma não é alterada pelos tratamentos com bisoprolol (Figura 26B; 861 ± 84 pg/ml n=6) e carvedilol (Figura 26C; 682 ± 110 pg/ml n=6). Supreendentemente, a quantidade de troponina-I é aumentada nos camundongos sépticos tratados com bucindolol (Figura 26E; 1910 ± 180 pg/ml n=6).

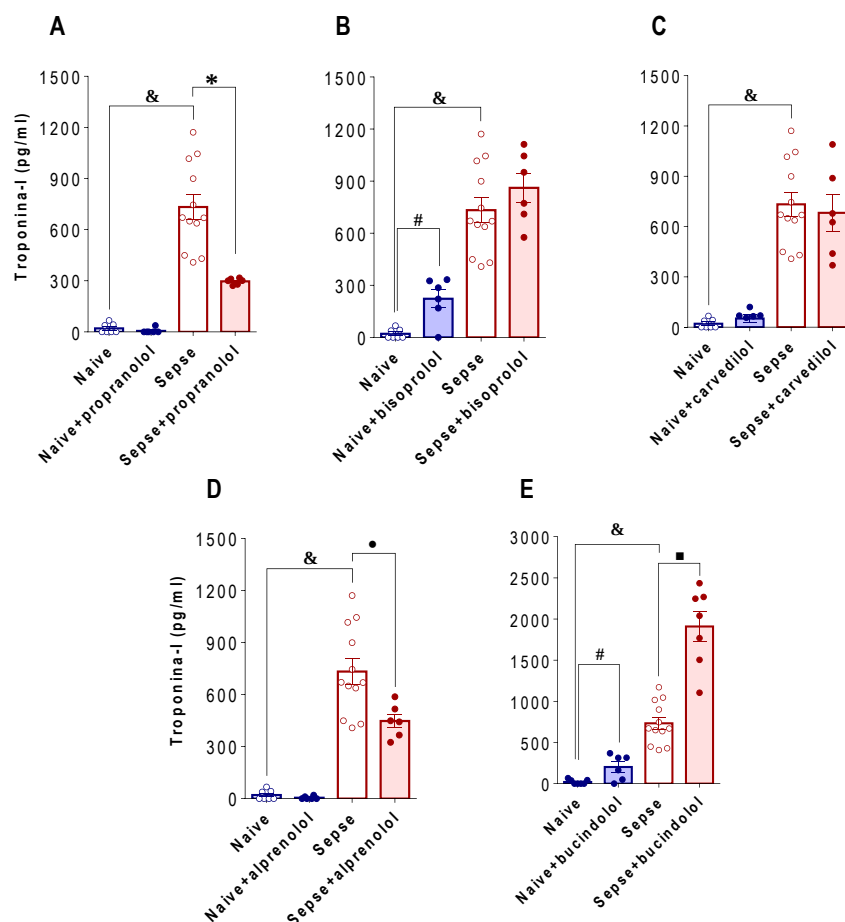


Figura 26: Animais sépticos tratados com propranolol (A) e alprenolol (D), mas não bisoprolol (B), carvedilol (C) e bucindolol (E) reduzem níveis de troponina-I no coração isolado. O plasma foi coletado após 24 horas de indução da sepse. Os níveis de troponina-I foram quantificados por ELISA e os resultados expressos em picogramas por mL (pg/mL). Os Scatter dot plot representam a média e o erro padrão da média de 6-12 animais por grupo experimental. Os resultados foram analisados pelo Teste T-student. &p<0,0001 naive versus sépticos; *p<0,0007 septic versus septic+propranolol; •p<0.01 septic versus septic+alprenolol.

Tais resultados indicam que, somente os tratamentos com propranolol e alprenolol foram eficazes para redução da lesão cardíaca mediada pela sepse experimental.

Camundongos sépticos tratados com propranolol ou bisoprolol ou alprenolol, mas não com carvedilol, apresentam melhora em seus registros hemodinâmicos

Os resultados apresentados anteriormente nesta tese mostram que os tratamentos de camundongos sépticos com propranolol, bisoprolol ou alprenolol: (1) “previnem” a perda do receptor β -adrenérgico cardíaco; (2) “melhoram” a contratilidade do coração isolado; (3) reduzem citocinas pró-inflamatórias e, (4) reduzem os níveis de troponina-I no plasma (exceto bisoprolol). Portanto, foi investigado se os efeitos supramencionados contribuem para uma melhora hemodinâmica *in vivo* na sepse. Para isso, camundongos hígidos foram anestesiados com isoflurano (2% de indução e 1% de manutenção). Em seguida, a carótida esquerda foi exposta e um cateter acoplado a um transmissor foi implantado para monitoramento da pressão arterial pulsátil. Após sete dias da implantação, a sepse por CLP foi induzida e um registro contínuo de 18h da frequência cardíaca (FC) e da pressão arterial média (PAM) foi adquirido.

Inicialmente, foram determinados através de um registro contínuo de 18 horas da PAM e FC os efeitos hemodinâmicos dos β -bloqueadores em camundongos *naive* tratados segundo um protocolo específico de administração, o qual leva em conta a afinidade e a meia-vida plasmática de cada droga (descrito na seção Materiais e Métodos em Protocolos de tratamento). Em seguida, foi calculada a área abaixo da curva (*area under the curve*, AUC) dos registros de FC e PAM, a qual associa o efeito da droga a um determinado intervalo de tempo. Os dados obtidos nos experimentos com camundongos *naive* ($AUC_{PAM} = 1776 \pm 47$; $AUC_{FC} = 9020 \pm 312$; $n = 5$) indicam que a PAM e FC não são influenciados de maneira significativa pela administração de

propranolol ($AUC_{PAM}= 1686\pm57$; $AUC_{FC}= 9162\pm307$; $n=5$), bisoprolol ($AUC_{PAM}= 1727\pm51$; $AUC_{FC}= 9091\pm97$; $n=5$), carvedilol ($AUC_{PAM}= 1674\pm30$; $AUC_{FC}=8645\pm182$; $n=5$) e alprenolol ($AUC_{PAM}= 1675\pm20$; $AUC_{FC}=9774\pm378$, $n=5$) em animais *naïves* (THAZHATH et al., 2016). Portanto, as doses de β -bloqueadores e os regimes terapêuticos escolhidos não causam quadros hipocardiodinâmicos em camundongos *naïve*.

Uma vez que os dados obtidos em corações isolados de camundongos sépticos tratados com carvedilol ou bucindolol não mostraram melhora na frequência cardíaca, limitamos os experimentos *in vivo* somente com carvedilol.

As Figuras 27 e 28 mostram a cinética da disfunção hemodinâmica (hipotensão e bradicardia) instalada na sepse durante as primeiras 18h. Entretanto, quando os camundongos sépticos são tratados com os β -bloqueadores (Tabelas 3 e 4) são observadas reversões parciais da bradicardia em 6 horas com alprenolol (Figura 28D), 8 horas com propranolol (Figura 27C) e 12 horas com bisoprolol (Figura 27D). Interessantemente, após 18 horas do início da sepse, a FC foi restabelecida nos animais tratados com propranolol, bisoprolol ou alprenolol (Tabelas 4 e 5). No entanto, a melhora da bradicardia não foi observada em camundongos sépticos tratados com carvedilol (Figura 28C). Além disso, as Figuras 27 e 28 mostram que os tratamentos dos camundongos sépticos com β -bloqueadores elevaram a PAM.

Tomados em conjuntos, esses resultados indicam que os tratamentos com os β -bloqueadores propranolol, bisoprolol e alprenolol reverteram parcialmente a disfunção cardiovascular instalada na sepse.

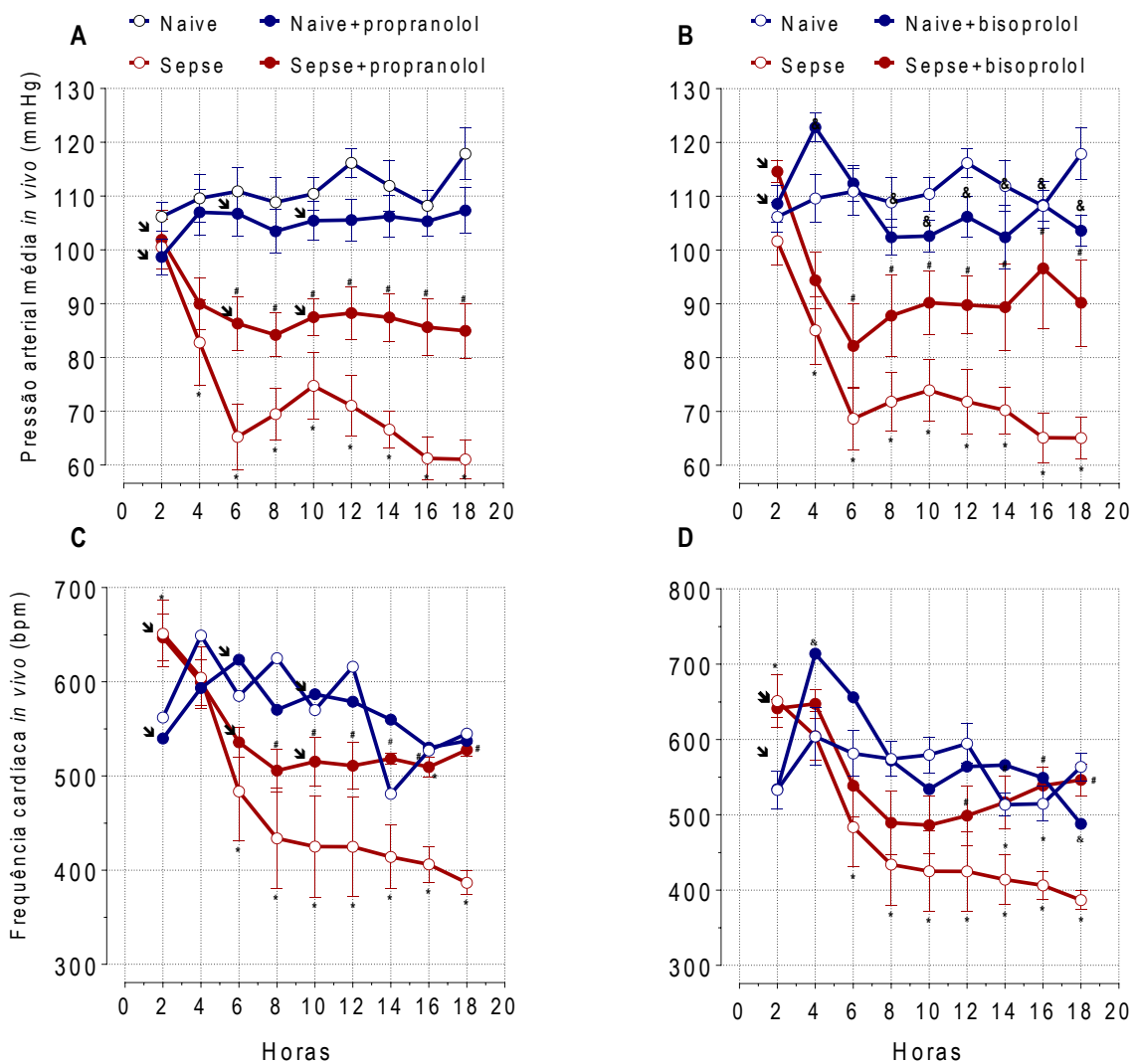


Figura 27: Animais sépticos tratados com propranolol (A e C) ou bisoprolol (B e D) apresentam melhora na pressão arterial (A e B) e frequência cardíaca (C e D) nos registros contínuos de 18 horas em relação aos animais sépticos. Animais hígidos foram anestesiados com isoflurano (2% para indução e 1% para manutenção). Em seguida, a carótida esquerda foi exposta para a implantação de um cateter acoplado a um transmissor. Após sete dias da implantação, a sepse foi realizada seguida pelo protocolo de tratamento específico de cada droga e um registro hemodinâmico contínuo de 18 horas foi adquirido. A pressão arterial média e a frequência cardíaca foram obtidas através do software LabChart 8.0 e os dados expressos respectivamente em mmHg e bpm. Os grupos experimentais foram comparados através do teste Anova de duas via seguido pelo Teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo séptico; # $p < 0,05$ grupo *sepse* versus grupo séptico+tratamento; & *naive* versus *naive*+tratamento). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5 animais por grupo experimental. A seta () representa o momento de aplicação da droga (via I.P) nos animais *naives*+tratamento ou séptico+tratamento.

Tabela 4: Valores da pressão arterial média (PAM, em mmHg) e frequência cardíaca (FC, em bpm) de animais sépticos ou não que foram tratados ou não com propranolol ou bisoprolol, obtidos através do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os valores de p foram fornecidos através da análise de Anova de duas via com mensurações repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni. *p<0,05 *naive versus seps*; &p<0,05 *naive versus naive + tratamento*; #p<0,05 *seps versus seps + tratamento*.

Horas	Naive (n=5)		Naive+propranolol (n=5)		Naive+bisoprolol (n=5)		Seps (n=5)		Seps+propranolol (n=5)		Seps+bisoprolol (n=5)	
	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC
2	106±3	532±25	98±3	539±21	108±3	570±30	100±5	651±35*	101±5	646±25	114±2 [#]	641±11
4	109±4	604±40	107±4	593±34	122±3 ^{&}	697±22 ^{&}	82±8*	604±32	89±5	599±24	94±5	647±18
6	109±4	581±30	106±4	623±17	112±3	639±8	65±6*	483±52*	86±5 [#]	535±15	82±8 [#]	538±41
8	108±4	574±23	103±4	570±34	102±3	553±10	69±5*	433±53*	84±4 [#]	505±22 [#]	88±7 [#]	489±41
10	110±3	579±23	105±3	586±19	102±3	543±10	74±6*	425±53*	87±4 [#]	515±25 [#]	90±6 [#]	486±38
12	116±3	594±26	105±4	578±20	106±4	535±8	71±6*	425±52*	88±5 [#]	510±24 [#]	89±5 [#]	498±39 [#]
14	111±5	513±14	106±4	559±14	102±6	501±16	66±3*	414±33*	87±4 [#]	518±5 [#]	89±9 [#]	516±35 [#]
16	108±3	514±22	105±3	530±17	108±4	545±9	61±4*	406±18*	85±5 [#]	509±10 [#]	96±11 [#]	538±25 [#]
18	108±5	564±18	107±4	537±21	103±3	491±11	61±3*	386±13*	85±5 [#]	528±6 [#]	90±8 [#]	546±20 [#]

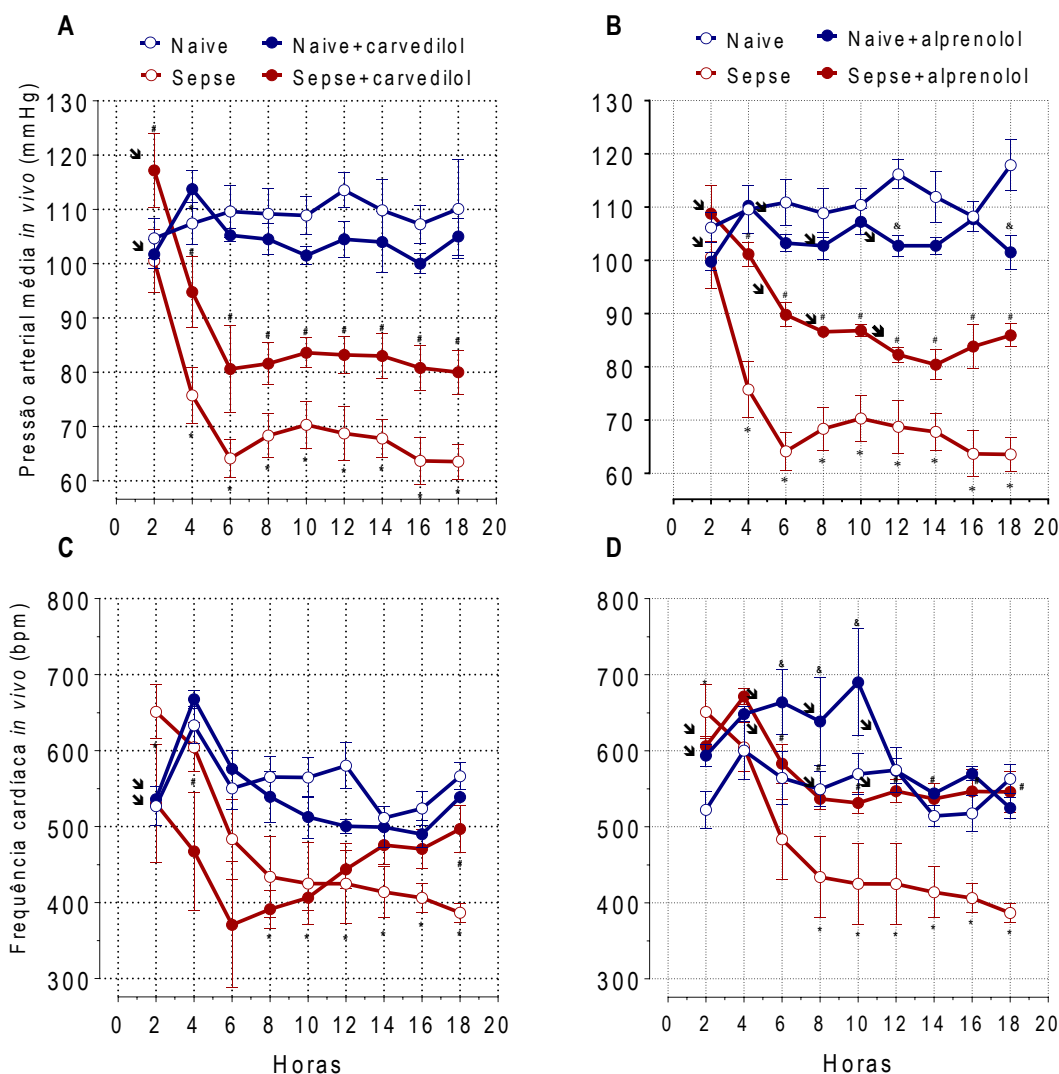


Figura 28: Animais sépticos tratados com alprenolol (B e D), mas não como carvedilol (A e C), apresentam melhora na pressão arterial (A e B) e frequência cardíaca (C e D) nos registros contínuos de 18 horas em relação aos animais sépticos. Animais hígidos foram anestesiados com isoflurano (2% para indução e 1% para manutenção). Em seguida, a carótida esquerda foi exposta para a implantação de um cateter acoplado a um transmissor. Após sete dias da implantação, a sepse foi realizada seguida pelo protocolo de tratamento específico de cada droga e um registro hemodinâmico contínuo de 18 horas foi adquirido. A pressão arterial média e a frequência cardíaca foram obtidas através do software LabChart 8.0 e os dados expressos respectivamente em mmHg e bpm. Os grupos experimentais foram comparados através do teste Anova de duas via seguido pelo Teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo séptico; # $p < 0,05$ grupo *sepsis* versus grupo séptico+tratamento; & *naive* versus *naive*+tratamento). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5 animais por grupo experimental. A seta (➡) representa o momento de aplicação da droga (via I.P) nos animais *naive*+tratamento ou séptico+tratamento.

Tabela 5: Valores da pressão arterial média (PAM, em mmHg) e frequência cardíaca (FC, em bpm) de animais sépticos ou não que foram tratados ou não com carvedilol ou alprenolol, obtidos através do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os valores de p foram fornecidos através da análise de Anova de duas via com mensurações repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni. *p<0,05 *naive versus sepse*; &p<0,05 *naive versus naive + tratamento*; #p<0,05 *sepse versus sepse + tratamento*.

Horas	Naive (n=5)		Naive+carvedilol (n=5)		Naive+alprenolol (n=5)		Sepse (n=5)		Sepse+carvedilol (n=5)		Sepse+alprenolol (n=5)	
	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC
2	105±3	526±26	101±2	536±6	99±1	593±14	100±6	646±33*	117±5	530±77#	108±5#	605±12
4	103±4	633±24	113±3	667±12	110±1	648±9	75±5*	602±33	94±5	467±77#	101±2	671±11
6	110±4	550±27	105±1	576±23	103±1	663±42&	64±3*	478±50*	80±5#	370±82	89±2#	583±25#
8	108±4	565±27	104±3	539±33	102±2	638±58&	68±4*	429±47*	81±4#	391±25	86±1#	536±14#
10	110±3	564±26	101±2	512±27	107±2	690±70&	70±4*	423±50*	83±4#	406±17	86±1#	531±14#
12	116±3	580±30	104±3	500±9	102±2&	573±16	68±5*	424±51*	83±5#	443±25	82±1#	546±14#
14	111±5	511±15	104±5	499±27	102±1	543±4	67±3*	412±34*	83±4#	475±25	80±2#	536±20#
16	103±3	523±22	100±2	490±17	107±1	569±9	63±4*	403±17*	80±5#	470±25	83±4#	546±29#
18	118±5	567±19	105±3	538±6	101±3&	524±14	64±3*	386±6*	80±4#	515±32#	86±2#	545±26#

Tomados em conjuntos, esses resultados fornecem informações importantes sobre a hemodinâmica estabelecida durante todo o percurso do tratamento com os β -bloqueadores e, nos reafirma o benefício do tratamento com propranolol, bisoprolol e alprenolol durante a sepse. Portanto, agora é necessário demonstrar se o curso do tratamento beneficia os parâmetros cardiovasculares quando estimulados *in vivo* por uma droga inotrópica. Sendo assim, a próxima seção da pesquisa diz respeito se os tratamentos supramencionados são capazes de aumentar a contratilidade cardíaca *in vivo* quando estimulado pela isoprenalina.

O tratamento de camundongos sépticos com propranolol, bisoprolol ou alprenolol aumentam o inotropismo da isoprenalina

Uma característica marcante na sepse é a perda de responsividade do coração aos agonistas adrenérgicos. Sendo assim, foi investigado se os camundongos sépticos tratados com β -bloqueadores eram responsivos à isoprenalina.

A isoprenalina é um agonista seletivo dos β -ARs e possui eficácia e afinidade muito semelhantes nos β_1 -, β_2 -, e β_3 -ARs (BAKER, 2010). No coração, predominam β_1 -ARs e a ativação destes receptores aumenta o débito cardíaco. Já nos leitos vasculares de resistência predominam β_2 -ARs, que quando ativados levam à vasodilatação e redução da resistência vascular periférica. Sendo assim, é esperado que a administração de isoprenalina aumente a frequência cardíaca e reduza a pressão arterial média. De fato, a Figura 29 mostra que administração de doses crescentes de isoprenalina (0,02-20 $\mu\text{g/Kg}$) a camundongos *naïve* aumenta a frequência cardíaca (Fig 29A), mas reduz a pressão arterial média (Fig 29B), provavelmente em razão da redução da resistência vascular periférica. A Figura 29A também mostra que o efeito inotrópico positivo da isoprenalina é grandemente perdido em camundongos sépticos. Por outro lado, a redução da pressão arterial média pela isoprenalina em camundongos

sépticos também foi pequena, provavelmente em razão do quadro hipotensivo que os animais se encontravam já no início do experimento (Figura 29B).

No entanto, o efeito inotrópico positivo da isoprenalina nos camundongos sépticos tratados com propranolol foi consideravelmente maior do que aquele observado em camundongos sépticos que não receberam o β -bloqueador (Figura 29A, Tabela 6). A hipotensão máxima induzida pela isoprenalina em camundongos sépticos tratados com propranolol não foi diferente daquela induzida em animais sépticos não tratados (Figura 29B, Tabela 6).

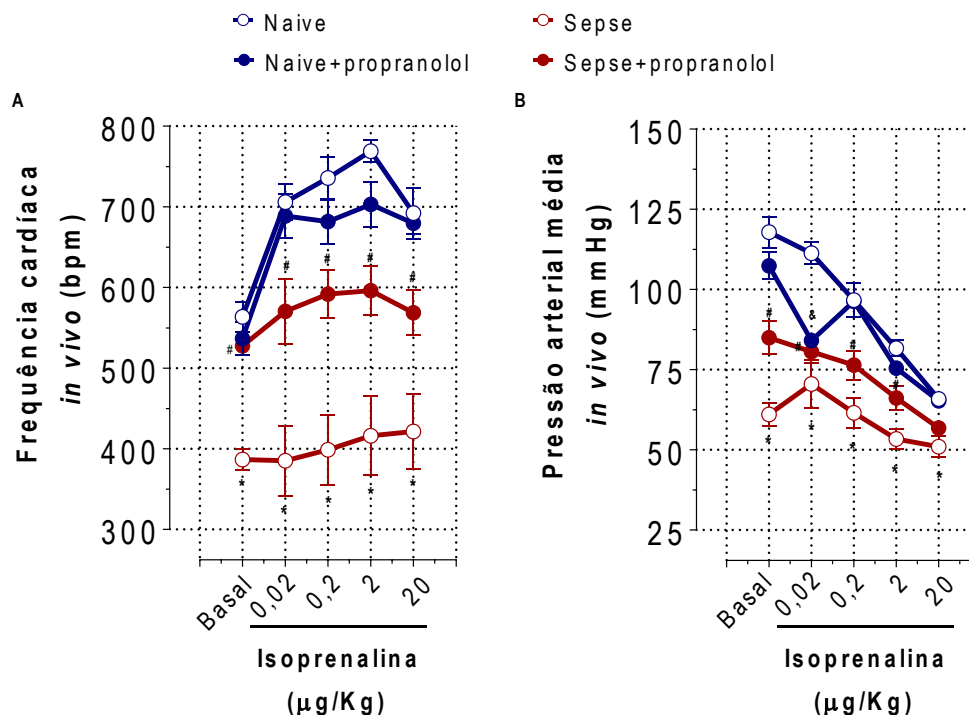


Figura 29: Animais sépticos tratados com propranolol são responsivos à estímulo inotrópico. Animais hígidos foram anestesiados com isoflurano (2% para indução e 1% para manutenção). Em seguida, a carótida esquerda foi exposta e uma incisão foi realizada para a implantação de um cateter acoplado a um transmissor. Após sete dias da implantação, a veia jugular foi canulada e a sepse foi realizada seguida pelo protocolo de tratamento específico de cada droga e um registro basal de 2 horas foi adquirido antes da construção da curva dose-resposta à isoprenalina.. Nos painéis A e B estão representadas as curvas dose-resposta obtidas pela infusão de isoprenalina via veia jugular (0,02-20 µg/Kg). Os valores da FC e PAM foram obtidos do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os grupos experimentais foram comparados através do teste Anova de duas via seguido pelo Teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo séptico; # $p < 0,05$ grupo *sepse* versus grupo séptico+tratamento; & *naive* versus *naive*+tratamento). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5 animais por grupo experimental.

Tabela 6: Valores da pressão arterial média (PAM, em mmHg) e frequência cardíaca (FC, em bpm) de animais sépticos ou não que foram tratados ou não com propranolol, obtidos através do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os valores de p foram fornecidos através da análise de Anova de duas via com mensurações repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ *naive* versus *sepse*; & $p < 0,05$ *naive* versus *naive* + propranolol; # $p < 0,05$ *sepse* versus *sepse* + propranolol.

Isoprenalina, µg/Kg	Naive (n=5)		Naive+propranolol (n=5)		Sepse (n=5)		Sepse+propranolol (n=5)	
	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM
0	564±18	118±5	537±21	107±4	386±13*	61±3*	528±6#	85±5#
0,02	700±26	111±3	688±27	84±2&	382±43*	70±7*	570±40#	80±3#
0,2	735±26	96±5	681±28	96±2	397±44*	61±4*	591±30#	76±4#
2	769±13	81±2	703±27	75±0,6	416±51*	53±3*	596±30#	66±4#
20	692±31	65±2	679±13	65±0,5	420±45*	50±3*	568±27#	56±2

Os tratamentos dos camundongos sépticos com os β -bloqueadores bisoprolol (Figura 30, Tabela 7) e alprenolol (Figura 33, Tabela 9) produziram resultados semelhantes àqueles observados com o propranolol, isto é, levaram a um aumento do efeito inotrópico positivo da isoprenalina, sem afetar a hipotensão máxima causada por este agonista. No entanto, o tratamento dos camundongos sépticos com carvedilol (Figura 31, Tabela 8) não aumentou o inotropismo positivo da isoprenalina, apesar de ter elevado a frequência cardíaca basal após 18 h da indução da sepse por CLP.

Para facilitar a comparação na intensidade de recuperação do inotropismo positivo da isoprenalina causada pelos tratamentos dos camundongos sépticos com β -bloqueadores, foram calculadas as diferenças entre as frequências cardíacas máximas induzidas pelo agonista e as respectivas frequências cardíacas basais (⁹ Δ , Figura 32). Assim, a Figura 32 mostra que nos camundongos sépticos tratados com bisoprolol ou alprenolol a isoprenalina aumentou a frequência cardíaca em cerca de 100 bpm, enquanto que tal recuperação foi menor nos animais tratados com propranolol (Δ = 69 bpm), ou com carvedilol (Δ = 29 bpm).

⁹ Δ = é a diferença entre o valor basal da frequência cardíaca (mensuração realizada antes da construção da curva de isoprenalina) e a dose que representa o ponto de platô no gráfico.

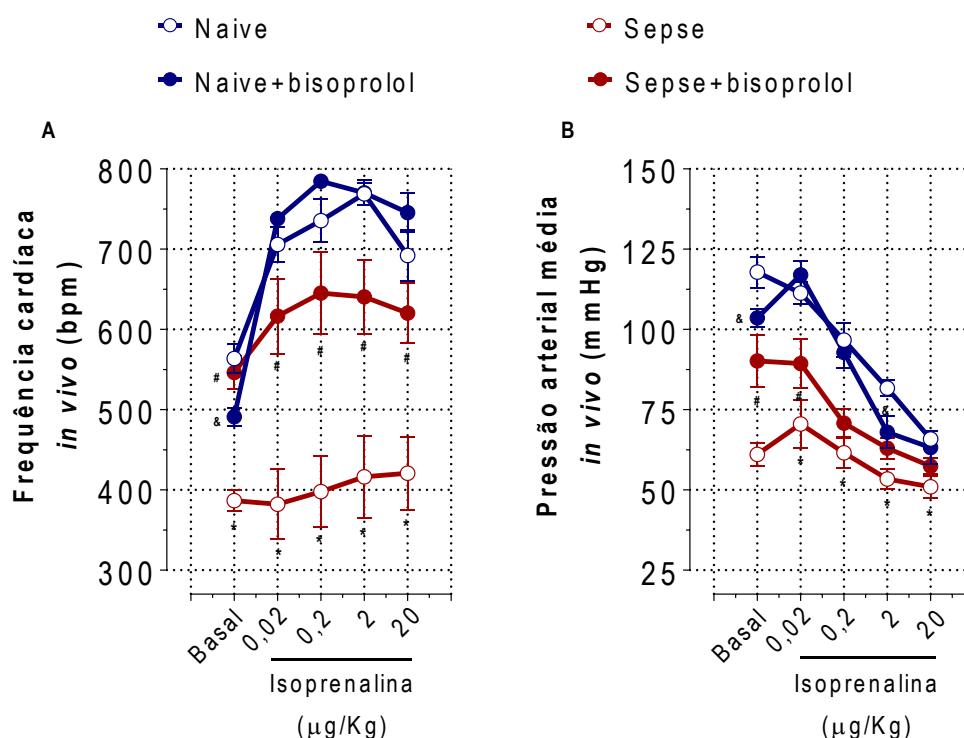


Figura 30: Animais sépticos tratados com bisoprolol são responsivos à estímulo inotrópico. Animais hígidos foram anestesiados com isoflurano (2% para indução e 1% para manutenção). Em seguida, a carótida esquerda foi exposta e uma incisão foi realizada para a implantação de um cateter acoplado a um transmissor. Após sete dias da implantação, a veia jugular foi canulada e a sepse foi realizada seguida pelo protocolo de tratamento específico de cada droga e um registro basal de 2 horas foi adquirido antes da construção da curva dose-resposta à isoprenalina.. Nos painéis A e B estão representadas as curvas dose-resposta obtidas pela infusão de isoprenalina via veia jugular (0,02-20 μg/Kg). Os valores da FC e PAM foram obtidos do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os grupos experimentais foram comparados através do teste Anova de duas via seguido pelo Teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo séptico; # $p < 0,05$ grupo *sepse* versus grupo séptico+tratamento; & *naive* versus *naive*+tratamento). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5 animais por grupo experimental

Tabela 7: Valores da pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de animais sépticos ou não que foram tratados ou não com bisoprolol, obtidos através do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os valores de p foram fornecidos através da análise de Anova de duas via com mensurações repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ *naive* versus *sepse*; & $p < 0,05$ *naive* versus *naive* + alprenolol; # $p < 0,05$ *sepse* versus *sepse* + alprenolol.

Isoprenalina, μg/Kg	Naive (n=5)		Naive+bisoprolol (n=5)		Sepse (n=5)		Sepse+bisoprolol (n=5)	
	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM
0	564±18	118±5	491±11	103±3	386±13*	61±3*	546±20#	90±8#
0,02	700±26	111±3	738±7	117±4	382±43*	70±7*	616±46#	89±7#
0,2	735±26	96±5	784±7	92±5	397±44*	61±4*	645±51#	71±4
2	769±13	81±2	770±15	68±4&	416±51*	53±3*	640±46#	63±4
20	692±31	65±2	745±24	63±5	420±45*	50±3*	620±37#	57±2

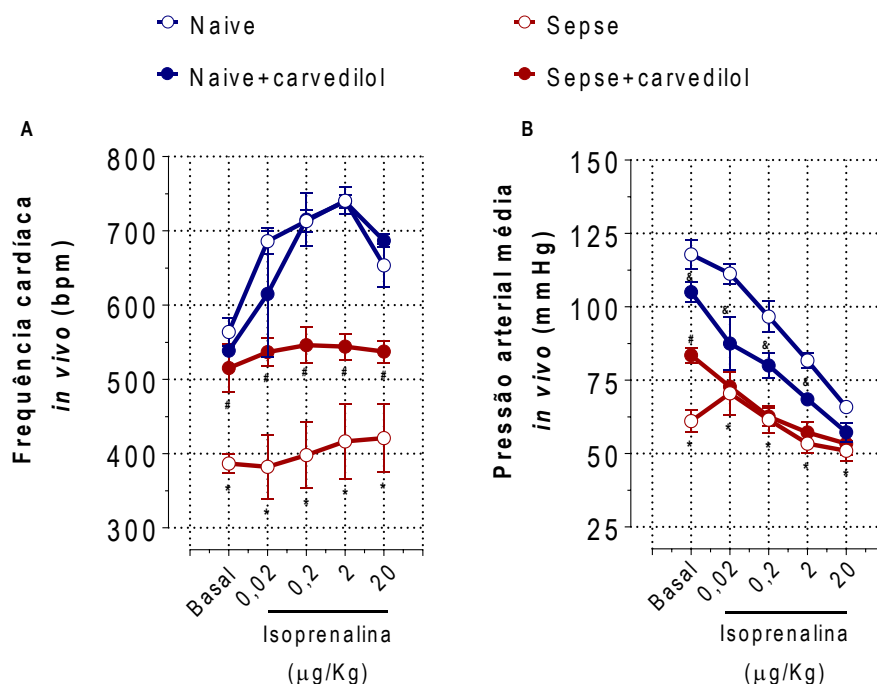


Figura 31: Animais sépticos tratados com carvedilol são pouco responsivos à estímulo inotrópico. Animais hígidos foram anestesiados com isoflurano (2% para indução e 1% para manutenção). Em seguida, a carótida esquerda foi exposta e uma incisão foi realizada para a implantação de um cateter acoplado a um transmissor. Após sete dias da implantação, a veia jugular foi canulada e a sepse foi realizada seguida pelo protocolo de tratamento específico de cada droga e um registro basal de 2 horas foi adquirido antes da construção da curva dose-resposta à isoprenalina. Nos painéis A e B estão representadas as curvas dose-resposta obtidas pela infusão de isoprenalina (0,02-20 μg/Kg) via veia jugular. Os valores da FC e PAM foram obtidos do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os grupos experimentais foram comparados através do teste Anova de duas via seguido pelo Teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo séptico; # $p < 0,05$ grupo sepse versus grupo séptico+tratamento; & *naive* versus *naive*+tratamento). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5 animais por grupo experimental.

Tabela 8: Valores da pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de animais sépticos ou não que foram tratados ou não com carvedilol, obtidos através do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os valores de p foram fornecidos através da análise de Anova de duas via com mensurações repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ *naive* versus sepse; & $p < 0,05$ *naive* versus *naive* + carvedilol; # $p < 0,05$ sepse versus sepse + carvedilol.

Isoprenalina, ng/Kg	Naive (n=5)		Naive+carvedilol (n=5)		Sepse (n=5)		Sepse+carvedilol (n=5)	
	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM
0	567±19	118±5	538±6	105±3	386±6*	64±3*	515±32#	83±42#
0,02	685±17	111±4	615±84	87±3&	383±37*	70±7*	536±19#	73±2
0,2	713±15	97±6	715±35	80±4&	398±43*	61±4*	546±24#	62±3
2	740±18	82±3	739±10	68±2	415±44*	53±3*	544±17#	57±4
20	653±28	65±2	686±9	57±3	422±47*	50±3*	537±14#	53±4

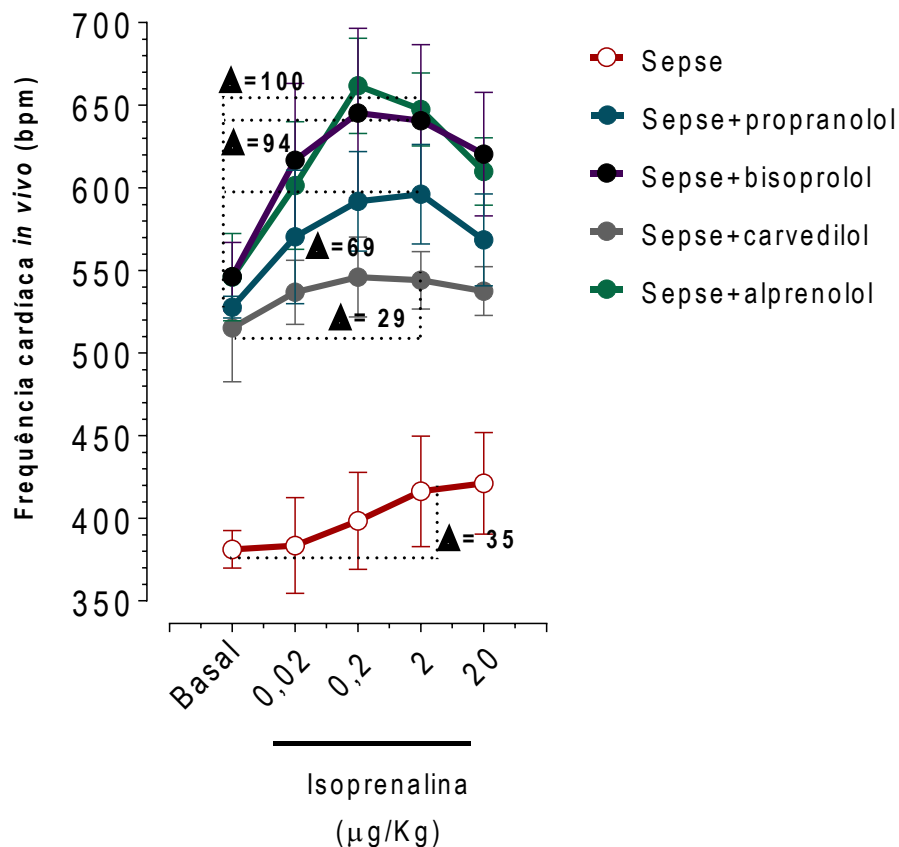


Figura 32: Curva dose-resposta à isoprenalina (0,02-20 µg/Kg) em animais sépticos que foram tratados ou não com propranolol, bisoprolol, alprenolol e carvedilol. Animais hígidos foram anestesiados com isoflurano (2% para indução e 1% para manutenção). Em seguida, a carótida esquerda foi exposta e uma incisão foi realizada para a implantação de um cateter acoplado a um transmissor. Após sete dias da implantação, a veia jugular foi canulada e a sepsis foi realizada seguida pelo protocolo de tratamento específico de cada droga e um registro basal de 2 horas foi adquirido antes da construção da curva dose-resposta à isoprenalina. Os valores de frequência cardíaca foram obtidos do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os grupos experimentais foram comparados através do teste Anova uma via seguido pelo Teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo séptico; # $p < 0,05$ grupo sepsis versus grupo séptico+tratamento). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5 animais por grupo experimental.

Os tratamentos dos camundongos sépticos com os β -bloqueadores bisoprolol (Figura 30, Tabela 7) e alprenolol (Figura 33, Tabela 9) produziram resultados semelhantes àqueles observados com o propranolol, isto é, levaram a um aumento do efeito inotrópico positivo da isoprenalina, sem afetar a hipotensão máxima causada por este agonista. No entanto, o tratamento dos camundongos sépticos com carvedilol (Figura 31, Tabela 8) não aumentou o inotropismo positivo da isoprenalina, apesar de ter elevado a frequência cardíaca basal após 18 h da indução da sepse por CLP.

Para facilitar a comparação na intensidade de recuperação do inotropismo positivo da isoprenalina causada pelos tratamentos dos camundongos sépticos com β -bloqueadores, foram calculadas as diferenças entre as frequências cardíacas máximas induzidas pelo agonista e as respectivas frequências cardíacas basais (¹⁰ Δ , Figura 32). Assim, a Figura 32 mostra que nos camundongos sépticos tratados com bisoprolol ou alprenolol, a isoprenalina aumentou a frequência cardíaca em cerca de 100 bpm, enquanto que tal recuperação foi menor nos animais tratados com propranolol (Δ = 69 bpm), ou com carvedilol (Δ = 29 bpm).

¹⁰ Δ = é a diferença entre o valor basal da frequência cardíaca (mensuração realizada antes da construção da curva de isoprenalina) e a dose que representa o ponto de platô no gráfico.

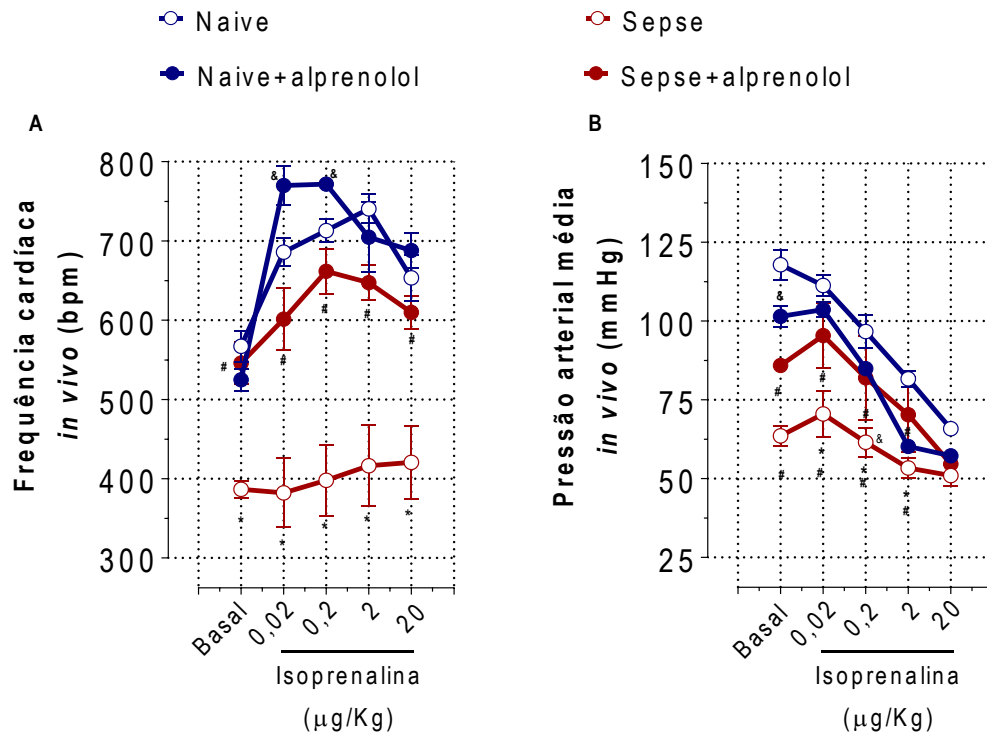


Figura 33: Animais sépticos tratados com alprenolol são responsivos à estímulo inotrópico. Animais hígidos foram anestesiados com isoflurano (2% para indução e 1% para manutenção). Em seguida, a carótida esquerda foi exposta e uma incisão foi realizada para a implantação de um cateter acoplado a um transmissor. Após sete dias da implantação, a veia jugular foi canulada e a sepse foi realizada seguida pelo protocolo de tratamento específico de cada droga e um registro basal de 2 horas foi adquirido antes da construção da curva dose-resposta à isoprenalina.. Nos painéis A e B estão representadas as curvas dose-resposta obtidas pela infusão de isoprenalina (0,02-20 μg/Kg) via veia jugular. Os valores da FC e PAM foram obtidos do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os grupos experimentais foram comparados através do teste Anova de duas via seguido pelo Teste de Bonferroni (* $p < 0,05$ grupo *naive* versus grupo séptico; # $p < 0,05$ grupo *sepse* versus grupo séptico+tratamento; & *naive* versus *naive*+tratamento). Símbolos representam à média e o erro padrão da média de 5 animais por grupo experimental.

Tabela 9: Valores da pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de animais sépticos ou não que foram tratados ou não com alprenolol, obtidos através do software LabChart 8.0 acoplado a um sistema de telemetria. Os valores de p foram fornecidos através da análise de Anova de duas via com mensurações repetidas seguidas pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ *naive* versus *sepse*; & $p < 0,05$ *naive* versus *naive* + alprenolol; # $p < 0,05$ *sepse* versus *sepse* + alprenolol.

Isoprenalina, μg/Kg	Naive (n=5)		Naive+alprenolol (n=5)		Sepse (n=5)		Sepse+alprenolol (n=5)	
	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM	FC	PAM
0	567±19	118±5	524±14	101±3	386±6*	64±3*	545±26#	86±2#
0,02	685±17	111±4	769±25	103±2&	383±37*	70±7*	601±38#	95±10#
0,2	713±15	97±6	771±8	84±2	398±43*	61±4*	661±28#	81±13#
2	740±18	82±3	704±27	60±2&	415±44*	53±3*	647±22#	70±11#
20	653±28	65±2	687±22	57±2	422±47*	50±3	609±20#	54±2

No geral, esses resultados demonstram que, camundongos sépticos tratados com propranolol ou bisoprolol ou alprenolol, melhoram suas respostas hemodinâmicas antes e após a administração de um agonista β -adrenérgico quando comparado aos camundongos sépticos. No entanto, camundongos tratados com carvedilol embora apresentem valores basais diferentes dos sépticos, não respondem com a mesma dinâmica dos demais tratamentos.

Os tratamentos de camundongos sépticos tratados com propranolol, bisoprolol ou alprenolol, mas não carvedilol, aumentam a taxa de sobrevivência

A curva de sobrevivência é uma boa ferramenta para analisar o quanto o tratamento afeta a sobrevivência (horas, dias ou semanas) em determinada síndrome ou doença. Assim, foi verificado se os tratamentos com β -bloqueadores aumentam a taxa de sobrevivência dos camundongos submetidos à sepse por CLP. Para isso, camundongos *naive* e sépticos foram submetidos aos diferentes tratamentos com β -bloqueadores (descrito na seção: Materiais e Métodos; item: protocolo de tratamento) e observados por 7 dias.

A Figura 34 mostra as curvas de sobrevivência de camundongos *naive*, sépticos e sépticos que foram tratados com propranolol, bisoprolol, carvedilol ou alprenolol. A mortalidade após 7 dias foi reduzida pelos tratamentos dos camundongos sépticos com propranolol, bisoprolol ou alprenolol (tabela 10). No entanto, camundongos sépticos tratados com carvedilol mostraram taxa de sobrevivência semelhante àquela de camundongos sépticos que não receberam β -bloqueadores.

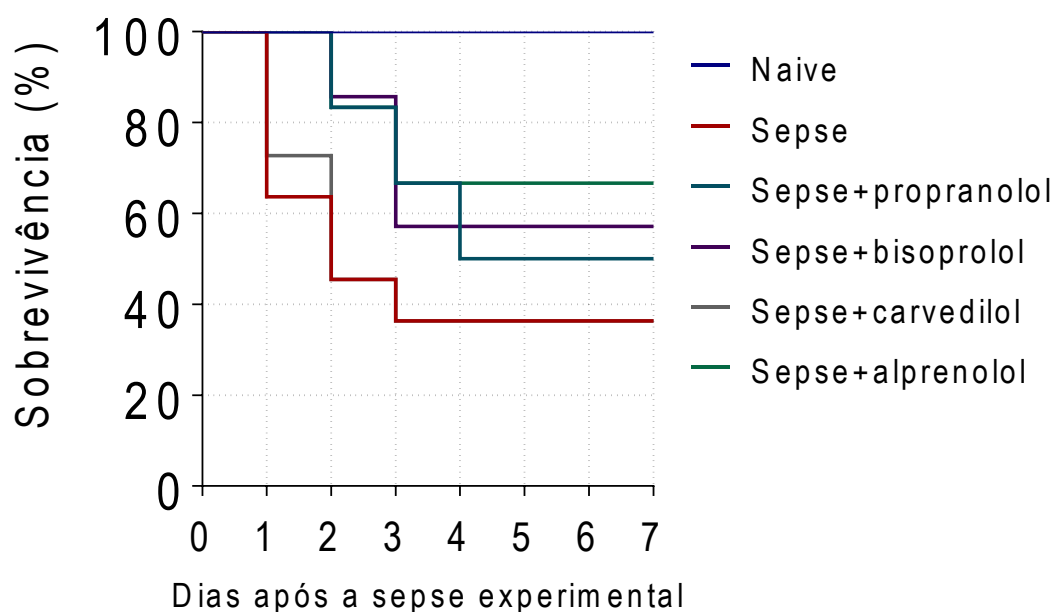


Figura 34: Animais sépticos tratados com propranolol ou bisoprolol ou carvedilol ou alprenolol aumentam a taxa de sobrevivência em relação aos animais sépticos. O modelo de sepse experimental (CLP- cecum ligation puncture) empregado foi iniciado com indução anestésica (isoflurano 1,5%) seguido de uma laparotomia. Logo após, o ceco é exposto, a junção íleo-cecal ligada através de um fio de algodão e duas perfurações com agulha de 18 gauge foram realizadas no ceco para indução da sepse. Em seguida, o ceco é reposicionado e a incisão suturada. Os animais submetidos ou não ao modelo de sepse experimental foram observados a cada 8 horas durante 7 dias. Os resultados foram expressos como porcentagem de sobrevivência e obtidos pelo teste Log-rank (Mantel-Cox) (n=11 animais/grupo).

Tabela 10: Taxa de sobrevivência de animais sépticos ou não que foram tratados com propranolol ou bisoprolol ou carvedilol ou alprenolol. Os valores são expressos em porcentagens e obtidos pelo teste Log-rank (Mantel-Cox).

Dias	Grupos experimentais (n=11/grupo)					
	Naive	Sepse	Sepse+ propranolol	Sepse+ Bisoprolol	Sepse+ carvedilol	Sepse+ Alprenolol
	Taxa de sobrevivência (%)					
1	100	63,636	100	100	72,727	100
2	100	45,455	83,33	85,714	45,454	83,333
3	100	36,364	66,66	57,147	36,363	66,667
4	100	36,364	50	57,147	36,363	66,667
5	100	36,364	50	57,147	36,363	66,667
6	100	36,364	50	57,147	36,363	66,667
7	100	36,364	50	57,147	36,363	66,667

Discussão

Recentemente, novas terapêuticas farmacológicas tem surgido para melhorar o quadro hemodinâmico hiporeativo instalado na sepse. As novas estratégias implementadas abordam diversas sinalizações, dentre elas a ativação da via apelinérgica (COQUEREL et al., 2018) e estabilização do complexo Ca^{2+} -troponina C (YANG et al., 2019). Entretanto, os tratamentos propostos não tem sido eficientes na reversão da disfunção cardiovascular (ANTCLIFFE et al., 2019) e por essa razão, a prática clínica continua limitada a medicamentos utilizados desde a década de 1970, tais como a noradrenalina (agonista α_1 , α_2 e β -ARs) e a dobutamina (agonista β -ARs) (WALTERS; MCGOWAN, 1964; REGNIER et al., 1979; STRATTON; BERLIN; ARBO, 2017). Na busca de fundamentos para uma nova abordagem farmacológica para a prevenção da disfunção cardíaca na sepse, a presente tese explorou os efeitos de vários ligantes com diferentes eficácias intrínsecas nos receptores β -adrenérgicos.

A afinidade e eficácia são propriedades farmacológicas que determinam o sucesso terapêutico da prática clínica. Didaticamente, a afinidade é descrita pela capacidade de um ligante ocupar seu receptor, seja ele um agonista ou antagonista; já a eficácia é a propriedade da droga que define sua capacidade de desencadear processos bioquímicos de transdução de sinal que resultam na ação farmacológica, permitindo que essa droga seja chamada de agonista caso a sinalização seja disparada (eficácia positiva), agonista inverso quando o receptor é desacoplado de sua via de transdução (eficácia negativa), ou antagonista se sua ação resulta apenas da competição pela ligação ao receptor (eficácia nula) (KENAKIN, 2012). Baseado nesse racional farmacológico, drogas vastamente utilizadas na prática clínica e popularmente conhecidas como β -bloqueadores têm sido descritas na literatura como agonistas inversos para ação mediada através do acoplamento a proteína G_s (e.g. propranolol e bisoprolol) (MAACK et al., 2001; BAKER; HALL; HILL, 2003) ou agonistas parciais (baixas eficácias) para esta mesma

via de sinalização (e.g. carvedilol e alprenolol) (GALANDRIN; BOUVIER, 2006) (ABRAHAMSSON, 1986). Além disso, em razão de suas afinidades, muitos dos chamados β -bloqueadores apresentam discreta seletividade para os β_1 -ARs (os quais predominam no coração) em relação aos β_2 -ARs (os quais predominam no músculo liso vascular e dos brônquios) (BAKER, 2005; BAKER, 2010). Para a escolha das doses dos β -bloqueadores empregadas nos tratamentos farmacológicos experimentais na presente tese, foram levados em consideração a afinidade de cada ligante pelo β_1 -AR e o tempo de meia-vida plasmática de cada fármaco para garantir ocupação de 50% dos receptores durante a fase hipercardiodinâmica da sepse. Além disso, também foi considerada a eficácia de cada droga no β_1 -AR com a expectativa de que, além de “proteger” os receptores da dessensibilização/internalização, eles também garantissem variados “graus” de inotropismo positivo que poderiam minimizar a disfunção cardíaca resultante do processo inflamatório na sepse.

A regulação de receptores por dessensibilização/internalização pode ser entendida como um processo fisiológico que participa da manutenção da homeostase ao permitir a regulação fina da intensidade da comunicação celular, mas cuja desregulação desse padrão dinâmico é capaz de perturbar os mais variados sistemas biológicos, como por exemplo o sistema cardiovascular, nociceptivo, o respiratório, entre outros (ZOU et al., 2018; KAN et al., 2018; NADEEM et al., 2019). Neste sentido, a redução de receptores na superfície das células ao longo do processo inflamatório séptico tem sido apontado como um dos fatores influentes na manutenção do estado infeccioso e hiporeativo. Como parte do que contribui para a persistência da infecção, foi observado em neutrófilos de pacientes sépticos o aumento na expressão de GRK-2 e GRK-5 acompanhado da redução dos receptores para IL-8 e leucotrieno B₄, ambos GPCRs, cuja consequência foi o comprometimento na migração dos fagócitos para o foco infeccioso e na eliminação de microorganismos invasores por fagocitose (ARRAES et al., 2006). Similarmente, foi reportado aumento na atividade da GRK-2 em tecido cardíaco de camundongos submetidos

ao modelo experimental de sepse por *CLP* acompanhado da redução de β -ARs na membrana plasmática (THANGAMALAI et al., 2014; DAL-SECCO et al., 2017), contribuindo sobremaneira para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca instalada durante a sepse. De maneira interessante, variadas patologias que podem ocasionar insuficiência cardíaca também convergem para a redução na quantidade de β -ARs no miocárdio (BRODDE et al., 1989b; MONTÓ et al., 2012; FERRARA et al., 2014).

Estudos prévios tem reportado que durante o estímulo crônico com a isoprenalina (uma catecolamina sintética agonista seletiva dos β -ARs) podem ocorrer reduções das densidades de β_1 -ARs e β_2 -ARs (MCLEAN; MILLIGAN, 2000) e que o tempo meia-vida para a recuperação nos níveis basais de ambos receptores na membrana plasmática foi estimada em aproximadamente 45 horas e 18 horas, respectivamente (SNAVELY; ZIEGLER; INSEL, 1985). Portanto, é possível que entre os principais fatores responsáveis por reduzir a densidade dos β -ARs na sepse estejam os altos níveis circulantes de catecolaminas endógenas (FLIERL et al., 2007; SAKAI et al., 2017; JAN et al., 2019), o aumento da expressão e da atividade da GRK-2 favorecendo a dessensibilização/internalização (THANGAMALAI et al., 2014; DAL-SECCO et al., 2017), e a lenta taxa de recuperação dos receptores à membrana plasmática. Como consequência final, esses fatores levam à redução da frequência cardíaca e da responsividade do miocárdio aos agonistas β -adrenérgicos (SAKAI et al., 2017b).

Na presente tese, a redução na densidade dos β -ARs em tecido cardíaco de camundongos sépticos foi prevenida nos animais tratados com propranolol, bisoprolol ou alprenolol, enquanto que os tratamentos com carvedilol ou bucindolol foram incapazes de proteger os β -ARs da internalização observada na sepse. Tais achados apontam que a simples competição dos β -bloqueadores com as catecolaminas endógenas pelos β -ARs não explica as prevenções da redução de densidade, uma vez que todas estas drogas competem com as catecolaminas, mas nem todas elas apresentaram este efeito “preventivo”. Assim, é possível

inferir três possíveis causas para as diferenças observadas entre os tratamentos com os β -bloqueadores: (1) algumas destas drogas aumentam a transcrição do RNAm que codifica os β_1 -ARs, enquanto que outras não têm tal efeito; (2) algumas destas drogas podem ser agonistas tendenciosos que modulam a interação dos β -ARs com as β -arrestinas (proteínas envolvidas no processo de internalização) e alteram a internalização, e (3) algumas destas drogas alteram a velocidade de reciclagem do receptor do compartimento intracelular para a membrana plasmática. Estas hipóteses são discutidas à seguir.

Primeiramente, é sabido que no contexto inflamatório há regulação da transcrição de genes que codificam diversas citocinas (tais como: IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) (MENG et al., 2013; LAI et al., 2017; LAUKOVA et al., 2018; WANG et al., 2018) enzimas (tais como: iNOS e NOX-2) (NADEEM et al., 2017; LAUKOVA et al., 2018; WANG et al., 2018)), fatores transcricionais (por exemplo: NF-KB) (MENG et al., 2013; LAI et al., 2017) e GPCR's (entre eles: α_{1B} -ARs e β_1 -ARs no baço; endotelina-1a e endotelina-1b no pulmão (LAUKOVA et al., 2018; MATSUISHI et al., 2016). Mais ainda, em doenças inflamatórias cardíacas há redução na transcrição gênica (MONTÓ et al., 2015) e na densidade dos β -ARs (BRODDE et al., 1989a; BRODDE et al., 1989b; LO PRESTI et al., 2009). No entanto, existem poucos estudos associando a redução na transcrição do RNAm para os β_1 -ARs no tecido cardíaco e sepse. Na verdade, esses poucos estudos relatam resultados contraditórios (THANGAMALAI et al., 2014; SAKAI et al., 2017). De forma semelhante ao encontrado na presente tese, THANGAMALAI et al., (2014) observaram redução de RNAm do β_1 -AR no decurso da sepse, diferentemente de Sakai et al., (2017), os quais não observaram mudanças significativas na expressão do β_1 -AR no ventrículo esquerdo de camundongos submetidos ao modelo experimental de sepse. Não obstante, os resultados da presente tese mostram que os tratamentos com β -bloqueadores (exceto o alprenolol) aumentam a expressão relativa do mRNA do β_1 -AR no coração de camundongos sépticos, mas não no coração de camundongos naive (exceto o bucindolol). De fato, a capacidade dos β -bloqueadores

propranolol e metoprolol aumentarem a expressão relativa do RNAm do β_1 -ARs já foi relatada em pacientes sob tratamento crônico da insuficiência cardíaca (BRODDE et al., 1989a). Porém, o aumento da expressão relativa do RNAm do β_1 -AR no coração dos camundongos sépticos tratados com carvedilol e bucindolol não foi acompanhado do aumento desses receptores na superfície das células cardíacas, e isto pode estar relacionado ao agonismo tendencioso descrito para essas drogas. É interessante mencionar que ao interagirem com β_1 -ARs, o carvedilol e o bucindolol promovem a ativação das ERK 1/2 (proteínas serina-treonina quinases) de uma maneira bifásica (VAN DER WESTHUIZEN et al., 2014), sendo a ativação precoce dependente da proteína G (BLAUKAT et al., 2000; DAHL et al., 2019) e a ativação tardia dependente de β -arrestinas (EISHINGDRELO et al., 2015; KUMARI et al., 2019). Além disso, alguns estudos indicam que o carvedilol é um agonista tendencioso que favorece a fosforilação dos β_1 -ARs por GRKs (KIM et al., 2008), bem como o recrutamento de β -arrestinas e a internalização do receptor (WISLER et al., 2007; WANG et al., 2017). De forma semelhante, a incubação de cultura de miócitos cardíacos com bucindolol reduziu a densidade de β_1 -ARs nestas células (ASANO et al., 2001). Por outro lado, é sabido que o alprenolol reverte a redistribuição de β_1 -ARs induzida pela isoprenalina na membrana plasmática de cardiomiócitos de rato (NOOH; MANCARELLA; BAHOUTH., 2018). Portanto, é possível que as maiores densidades de β -ARs no coração de camundongos sépticos tratados com β -bloqueadores resultem do aumento da transcrição gênica (propranolol, bisoprolol), ou de uma combinação deste efeito com a alteração da translocação do receptor nos diferentes compartimentos celulares (alprenolol). Mais ainda, os resultados da presente tese não mostraram nenhuma relação entre a eficácia intrínseca dos β -bloqueadores e a capacidade deles aumentarem a densidade de β -ARs no coração dos camundongos sépticos, uma vez que tal efeito foi observado tanto com drogas de eficácia “nula” (propranolol), quanto com drogas de eficácia “moderada” (alprenolol).

No presente estudo, o coração isolado de camundongos sépticos apresentou menor responsividade à isoprenalina, e tal resultado é consistente com a literatura (DAL-SECCO et al., 2017). De forma relevante para os propósitos desta tese, a reatividade do coração isolado de camundongos sépticos à isoprenalina foi aumentada quando os animais haviam sido tratados com propranolol, bisoprolol e alprenolol, os mesmos β -bloqueadores que aumentaram as densidades de β -ARs no coração. Portanto, é razoável atribuir pelo menos parte do aumento da responsividade cardíaca à maior densidade de β -ARs funcionais na membrana plasmática dos cardiomiócitos. Estudos semelhantes apontam que, assim como os β -bloqueadores investigados na presente tese, a atorvastatina aumenta a expressão de β_1 -ARs (mRNA e proteína) no tecido cardíaco de camundongos sépticos e, conseqüentemente, a performance cardíaca (THANGAMALAI et al., 2014). Outras drogas como o levosimendan (sensibilizador da ligação Ca^{2+} a troponina C) e a milrinona (inibidor da fosfodiesterase III) apresentaram benefício cardiovascular em animais sépticos e, foi sugerido que esse efeito se deu por redução plasmática de troponina-I (marcador clínico de injúria cardíaca) e citocinas pro-inflamatórias ($\text{TNF-}\alpha$, IL-6, IL-1 β) (YAMASHITA et al., 2018).

Na sepse há um desbalanço entre as sinalizações pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Neste sentido, o processo séptico é iniciado pelo estado hiperinflamatório (aumento de $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6, sistema complemento, entre outros) favorecendo a instalação de diversas lesões orgânicas, incluindo as cardíacas (FATTAHI; WARD, 2017; WANG et al., 2020). De fato, no presente estudo os camundongos sépticos apresentaram elevados níveis sistêmico e local de $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 β , os quais foram reduzidos pelos tratamentos com β -bloqueadores. Na verdade, é bem estabelecido que os β -bloqueadores reduzem os níveis dessas citocinas em diversas condições inflamatórias. Em um modelo de inflamação articular pela administração de carragenina na articulação temporomandibular de ratas, o tratamento com propranolol resultou em menor liberação das citocinas pró-inflamatórias $\text{TNF-}\alpha$ e IL-1 β no local (ZANELATTO et

al., 2018). Foi também demonstrado que o tratamento com baixas doses de propranolol (0,1 mg/Kg) reduziu os níveis de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β) no tecido gengival de animais submetidos a um modelo de periodontite (RODRIGUES et al., 2012). De forma semelhante, o bisoprolol reduz os níveis de citocinas pró-inflamatórias em cultura isolada de monócitos (MADEJ et al., 2009), o esmolol em ratos sépticos (LU et al., 2017) e o carvedilol em modelo de periodontite e conjutivite (DE ARAÚJO JÚNIOR et al., 2013; CHEN; HONG, 2016).

Tem sido descrito que na sepse essa resposta inflamatória é rapidamente seguida de um estado anti-inflamatório (KANASHIRO et al., 2017), o qual reduz a ação dos fagócitos, comprometendo a fagocitose e consequentemente, a resposta local à infecção (TANG et al., 1998; DAL-SECCO et al., 2017). É interessante observar que de forma equivalente ao processo inflamatório-infeccioso séptico, há comprometimento na sinalização β -adrenérgica em diversas condições inflamatórias. Por exemplo, há redução na sinalização por β_2 -ARs em células dendríticas num modelo de artrite reumatóide e isto foi associado a maior atividade das GRKs (WU et al., 2016); também há alteração da densidade de β_2 -ARs em cardiomiócitos de ratos com disfunção cardíaca associada a hiperinsulinemia em modelo de diabetes (WANG et al., 2017b); e a atividade da GRK-2 em macrófagos associados ao tumor é reduzida, induzindo a polarização para um perfil antiinflamatório no ambiente tumoral, o qual favorece a progressão do carcinoma hepatocelular (WU et al., 2019). Em geral, os resultados desses estudos podem estar fundamentados no fato que as principais células do sistema imune relacionadas à produção de citocinas pró-inflamatórias são os macrófagos (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). As vias pró-inflamatórias nessas células são normalmente desencadeadas pela combinação de padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs), como o lipopolissacarídeo (LPS), e ao dano (DAMPs) como o HMGB1, com receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). De maneira geral, são disparadas sinalizações que culminam na ativação de vias intracelulares que levam à dissociação do complexo IKB/NF-KB, permitindo a translocação do fator transcrional NF-kB

para o núcleo e a indução da expressão de vários genes pró-inflamatórios (LIU et al., 2017). É sabido que o adrenoceptor predominante na superfície dos macrófagos é o β_2 -ARs (MAGOCSI et al., 2007; LAMKIN et al., 2016). Canonicamente, a ativação dos β_2 -ARs estimula a proteína G_s e consequentemente a adenilil ciclase, aumentando as concentrações intracelulares de AMPc. O AMPc modula a atividade do NF- κ B através de mecanismos múltiplos, que incluem: i) bloqueio da atividade da IKK β , a enzima que fosforila o I κ B, evitando a dissociação do complexo I κ B/NF- κ B; ii) redução da atividade de proteínas envolvidas no processo de ubiquitinação do I κ B, aumentando sua concentração no meio intracelular e possibilitando o acoplamento com NF- κ B livre no citoplasma, o que impede sua translocação nuclear. Em conjunto, ambos os mecanismos resultam na regulação negativa da atividade do NF- κ B (GERLO et al., 2011). Juntamente com o AMPc, tem sido sugerido, também, que esse efeito anti-inflamatório possa estar associado à ação modulatória das β -arrestinas sobre o complexo IKK-NF κ B (KOLMUS; TAVERNIER; GERLO, 2015). Partindo desse racional, é possível que β -bloqueadores de eficácia nula a moderada ocupem os β_2 -ARs e, por diminuir o recrutamento de β -arrestinas, as deixem livres para impedir a fosforilação do complexo IKK-NF κ B e prevenir a translocação nuclear do NF- κ B, resultando em menor produção de mediadores inflamatórios (WITHEROW et al., 2004). De fato, camundongos sépticos nocautes para β -arrestina-2 apresentaram elevados níveis séricos de IL-6 (FAN et al., 2010). Em conjunto, esse racional oferece suporte para a interpretação dos resultados experimentais obtidos na presente tese à respeito da produção *in-vivo* e *in-vitro* dessas citocinas. Nos dados *in-vivo*, as quantidades sistêmica e local (observada em tecido cardíaco) de TNF- α e IL-1 β foram menores em camundongos sépticos tratados com propranolol, bisoprolol, carvedilol, alprenolol e bucindolol. Corroborando o que foi observado *in-vivo*, os resultados *in-vitro* mostraram redução de TNF- α e IL-1 β em culturas isoladas de macrófagos tratadas com doses crescentes dos β -bloqueadores e estimuladas com LPS. No

entanto, vale mencionar que no presente estudo nenhuma relação concentração-dependente foi observada para os efeitos dos β -bloqueadores na produção in vitro dessas citocinas.

De forma inusitada, apenas o tratamento dos camundongos sépticos com propranolol reduziu a bacteremia. Sabe-se que um dos fatores desencadeadores da sepse é a falência da migração de neutrófilos para o local primário da infecção, onde ocorre falha do controle infeccioso local e consequente disseminação bacteriana para a corrente sanguínea (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; SHAO et al., 2020). Não há uma clara explicação para ausência deste efeito com os outros β -bloqueadores, e além disso o propranolol não teve ação direta microbica nos ensaios de *killing* no presente trabalho.

Um dos parâmetros avaliados nesta tese para estimar a lesão cardíaca na sepse foi o nível plasmático de troponina-I. A troponina-I, juntamente com a troponina-T e a troponina-C estão presentes no sarcoplasma dos cardiomiócitos e atuam em conjunto para a regulação da contratilidade cardíaca (KATRUKHA, 2013). Embora as troponinas existam em uma variedade de células contráteis, como nos cardiomiócitos e no músculo esquelético (BOWMAN; LINDERT, 2019), a troponina I é encontrada predominantemente no sarcoplasma cardíaco. Sendo assim, o extravazamento de troponina-I para a corrente sanguínea tem sido usado como um eficiente indicador de injúrias cardíacas (SANDOVAL et al., 2017; CHAPMAN et al., 2017; STELZLE et al., 2018). Assim, a elevação plasmática de troponina-I é um prognóstico de mortalidade em vários cenários clínicos (ALATASSI et al., 2018). De fato, pacientes sépticos apresentam altos níveis séricos de troponina-I (LANDESBURG et al., 2014) e sua associação com a mortalidade tem sido relatada (SU et al., 2018). Embora pouco elucidadas, as causas da elevação sérica de troponina-I parecem estar associadas tanto a condições isquêmicas (LI et al., 2016) quanto não isquêmicas cardíacas, tais como a miocardite (KAKINO; YOKOYAMA; ESHIMA, 2018), a atividade física de resistência (AENGEVAEREN VINCENT L. et al., 2019) e a insuficiência cardíaca (KAYA et al., 2008), entre outras. É consenso que as lesões orgânicas ocupam papel central no

monitoramento do paciente séptico (SINGER et al., 2016), portanto, é aceitável apontar a inflamação como o pilar fundamental que provoca a geração de produtos lesivos às células (tais como ROS e RNS), incluíse as cardíacas (YAO et al., 2015) (PRAUCHNER, 2017), e ativam vias relacionadas à morte celular inflamatória, tais como a piroptose (LI et al., 2019c). Apesar de todos os ligantes β -adrenérgicos reduzirem as citocinas pró-inflamatórias, somente o propranolol e alprenolol reduziram os níveis plasmáticos de troponina-I. Assim, será importante investigar se o propranolol e o alprenolol são capazes de deprimir as vias relacionadas à piroptose. Interessantemente, a literatura tem sugerido que o propranolol estimula a via apoptótica e, baseado neste racional farmacológico, tem sido a droga de escolha no tratamento do hemangioma infantil (ROTTER; DE OLIVEIRA, 2017). Por outro lado, os níveis plasmáticos de troponina-I foram maiores nos animais sépticos tratados com bucindolol, inclusive no animais *naïves*, enquanto que o tratamento de animais sépticos com bisoprolol e carvedilol não resultaram em diferenças no níveis dessa proteína ao serem comparados com os animais sépticos controles. Em outras condições fisiopatológicas, tais como cardiotoxicidade induzida por antraciclina (AVILA et al., 2018), cardiomiopatia induzida por doxorubicina (ALANAZI et al., 2020) e fibrilação atrial permanente (HORJEN et al., 2016), menores níveis de troponina-I foram observados em decorrência do tratamento com carvedilol.

A disfunção cardíaca desenvolvida durante a sepse é uma complicação comum em humanos e mimetizada em modelos animais de experimentação (HOFFMAN et al., 2019). Na vigência da depressão miocárdica na sepse é possível que o comprometimento hemodinâmico instalado gere um relevante estado isquêmico global. De fato, a função cardíaca garante o aporte sanguíneo oxigenado para todas as células do organismo, cuja falha provoca isquemia seguida de morte (JUNGI et al., 2018). Consistente com essa noção, estudos clínicos têm destacado a importância da depressão da função cardíaca no aumento da mortalidade em pacientes sépticos (BROWN et al., 2012; SANFILIPPO et al., 2015). Outra importante questão

apresentada em recentes pesquisas é o risco elevado ao desenvolvimento de fisiopatologias cardíacas em paciente que sobreviveram à sepse (OU et al., 2016; LAI et al., 2018). Portanto, é necessário apresentar estratégias farmacológicas que abordem a proteção cardíaca no decorso da sepse. Associado a esse evento fisiopatológico e, baseado no mesmo racional, pacientes sépticos apresentam hiporresponsividade vascular a agonistas adrenérgicos (BURGDORFF; BUCHER; SCHUMANN, 2018) resultante da dessensibilização dos α_1 -ARs presentes na musculatura lisa vascular (SCHMIDT et al., 2009; KANDASAMY et al., 2015). Consistente com o exposto, a aquisição por telemetria de registros hemodinâmicos nos camundongos sépticos na presente tese mostrou quadros hipotensivo e bradicárdico persistentes no decorso temporal investigado. Tomando como base os dados obtidos nos protocolos experimentais em corações isolados de camundongos sépticos no presente trabalho, era esperado que os tratamentos com propranolol, bisoprolol ou alprenolol melhorassem a bradicardia desenvolvida nos animais sépticos. De fato, os tratamentos supramencionados trouxeram benefícios para a dinâmica cardíaca *in vivo*. No entanto, houve diferenças temporais entre os efeitos produzidos pelos β -bloqueadores, possivelmente resultantes das diferenças significativas quanto ao tempo de meia-vida de cada droga, os quais foram efetivamente considerados no desenho da posologia, mas que talvez não tenham sido suficientemente compensados. A comparação dos resultados da presente tese com os de outros estudos confirma o benefício cardiovascular trazido pelo tratamento com outros β -bloqueadores, como o esmolol (VOLZ-ZANG et al., 1994; MORELLI et al., 2013) e o landiolol (UNGER et al., 2018) em pacientes sépticos. É importante mencionar que os benefícios cardiovasculares observados nesses pacientes é baseado na manutenção da frequência cardíaca em uma faixa de 80-94 batimentos por minuto (valor de frequência cardíaca adequada em adultos= 70 a 80 batimentos por minutos, bpm). A explicação sugerida pelos autores é que a taquicardia observada, no início da sepse, impede que o coração bombeie, com eficiência, o aporte sanguíneo necessário para suprir a demanda de oxigênio requerida para

manter a fisiologia dos sistemas orgânicos e, conseqüentemente, resulte em uma inadequada perfusão tecidual, isquemia e morte. Portanto, a redução na frequência cardíaca permite um quadro adequado durante a função diastólica, permitindo um enchimento ventricular apropriado, melhorando o volume sistólico final (relação entre o volume de sangue bombeado pelo coração - em mL- pela área da superfície do corpo, em m²) e, conseqüentemente, a eficiência do trabalho cardíaco e o consumo de oxigênio; de acordo com os autores, tal melhoria contribui para o aumento na taxa de sobrevivência. De fato, o protocolo experimental de tratamento com os β -bloqueadores empregado nesta tese pesquisa focou no período hipercadiodinâmico da sepse. Adicionalmente, já foi relatado que a combinação de baixas doses metoprolol (β -bloqueador com tempo de meia-vida de aproximadamente 5 horas) e a milrinona (inibidor da fosfodiesterase 3) reduziu a frequência cardíaca de pacientes sépticos na fase inicial da sepse (antes do tratamento= 110 ± 19 bpm, com o tratamento= 84 ± 17 bpm -em 6 horas de tratamento-; 78 ± 14 bpm -após 96 horas do tratamento) gerando melhorias no volume sistólico e no índice cardíaco (parâmetro que relaciona o débito cardíaco em um minuto pela área da superfície corporal) (SCHMITTINGER et al., 2008). Contrariando às expectativas, foi observada uma melhora significativa na bradicardia dos camundongos sépticos tratados com carvedilol apenas após 18 horas. É possível que esse resultados tenham sido consequência de uma melhora expressiva no estado inflamatório, uma vez que a dose de carvedilol (baseada no K_D para o β_1 -AR = 3×10^{-8} M; e K_D para o β_2 -AR = 3×10^{-10} M) (BAKER, 2005) utilizada no tratamento permite a ocupação tanto dos β_1 como dos β_2 -ARs. Como discutido anteriormente, o carvedilol é capaz de recrutar β -arrestinas (WISLER et al., 2007b; FAN, 2014), o que poderia reduzir a dissociação do complexo IKK/NF κ B (KOLMUS; TAVERNIER; GERLO, 2015), e conseqüentemente diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e IL- β (DE ARAÚJO JÚNIOR et al., 2013).

Com a hemodinâmica comprometida, a falha na responsividade às drogas adrenérgicas no coração séptico traça uma provável evolução do quadro clínico do paciente para a morte

(SINGER et al., 2016). De fato, camundongos sépticos apresentaram redução significativa da responsividade à isoprenalina (presente tese) e à dobutamina (SAKAI et al., 2017b). Um importante e relevante achado experimental desta tese é que camundongos sépticos tratados com propranolol, bisoprolol ou alprenolol são responsivos às doses crescentes de isoprenalina, enquanto que os camundongos sépticos tratados com carvedilol mostraram apenas uma discreta responsividade. Tais resultados indicam que a prevenção na perda dos β -ARs da membrana plasmática das células cardíacas observada nos experimentos de *binding* do ^3H -CGP-12177 após o tratamento dos camundongos sépticos com propranolol, bisoprolol ou alprenolol se traduz em melhoras na reatividade cardíaca à isoprenalina. Entretanto, houve diferenças nas “melhoras” produzidas pelos os tratamentos supramencionados, as quais podem estar relacionadas com a eficácia intrínseca desses β -bloqueadores (propranolol=bisoprolol<alprenolol) nos β_1 -ARs. Em outras palavras, nos camundongos sépticos, a intensidade da “melhora” na responsividade cardíaca à isoprenalina parece ser proporcional ao “grau” de agonismo parcial de cada um destes β -bloqueadores. Porém, estes resultados diferem do que foi descrito por CHANG et al., (2020) após a administração de LPS em ratos para mimetizar o choque séptico, onde a co-administração contínua de propranolol e adrenalina promoveu acentuada bradicárdia durante as 4h de registro. Entretanto, deve ser considerado que os resultados de CHANG et al., (2020) com propranolol e adrenalina foram obtidos apenas na fase inicial e hipercardiodinâmica da sepse, quando há um *storm* de catecolaminas (FLIERL et al., 2007; SAKAI et al., 2017; JAN et al., 2019); assim, a infusão contínua de adrenalina pode acentuar a dessensibilização dos β -ARs (THANGAMALAI et al., 2014; DAL-SECCO et al., 2017) e, consequentemente, prejudicar a frequência cardíaca.

Os tratamentos dos camundongos sépticos com propranolol, bisoprolol ou alprenolol tiveram impacto na sobrevivência dos animais 7 dias após a indução da sepse por *CLP*. Na verdade, camundongos sépticos tratados com bisoprolol, propranolol ou alprenolol tiveram a sobrevivência

aumentada já à partir do 3º dia após a sepse, enquanto que o carvedilol reduziu a mortalidade apenas nas primeiras 24 horas. Em concordância com estes resultados, foi descrito que o esmolol aumentou a taxa de sobrevivência de pacientes sépticos (MORELLI et al., 2013). Além disso, um estudo prospectivo observacional associou o uso oral e continuado de β -bloqueadores durante a sepse com a redução na mortalidade (FUCHS et al., 2017).

Tomados em conjunto, os achados da presente tese fundamentam a utilização de β -bloqueadores com eficácia nula (propranolol e bisoprolol) ou moderada (alprenolol) na sepse. Os benefícios desses β -bloqueadores na sepse resultam em reduções do estado inflamatório sistêmico e local, da lesão cardíaca, e do aumento da responsividade cardíaca às catecolaminas endógenas e exógenas, contribuindo para o aumento na taxa de sobrevivência na sepse. Porém, pelo menos quatro aspectos importantes devem ser considerados no uso de β -bloqueadores em pacientes sépticos, sendo eles o momento adequado para início do tratamento, a dosagem, a farmacocinética e a eficácia intrínseca dessas drogas.

Conclusões

- A sepse experimental leva à perda dos β -ARs em tecido cardíaco e os β -bloqueadores de eficácia nula (propranolol e bisoprolol) ou moderada (alprenolol) preveniram tal perda. Além disso, foi aumentado a transcrição gênica dos β_1 -ARs após tratamento com maioria dos ligantes testado, com exceção do alprenolol;
- Corações isolados de camundongos sépticos são hiporesponsivos à isoprenalina e o tratamento com os β -bloqueadores de eficácia nula (propranolol e bisoprolol) ou moderada (alprenolol) melhora a performance contrátil ventricular;
- Todos os β -bloqueadores investigados reduziram os níveis de TNF- α e IL-1 β sistêmico e local, bem como reduziram os níveis destas citocinas em culturas de macrófagos estimulados por LPS;
- Embora todos os ligantes β -adrenérgicos reduzam as citocinas pró-inflamatórias, somente o propranolol foi capaz de reduzir a bacteremia;
- O tratamento de camundongos sépticos com propranolol ou alprenolol reduz a lesão cardíaca, como indicado pelos níveis plasmáticos de troponina-I;
- Camundongos sépticos apresentam uma hemodinâmica e responsividade cardíaca prejudicada, e o tratamento com propranolol, bisoprolol ou alprenolol melhoram a bradicardia instalada, além de restaurar parcialmente a responsividade ao estímulo adrenérgico;
- O tratamento com propranolol, bisoprolol ou alprenolol aumenta a taxa de sobrevivência dos camundongos sépticos.

Referencias bibliográficas

ABRAHAMSSON, T. The beta 1- and beta 2-adrenoceptor stimulatory effects of alprenolol, oxprenolol and pindolol: a study in the isolated right atrium and uterus of the rat. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 87, n. 4, p. 657–664, 1986. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1986.tb14582.x.

ADAMEOVA, Adriana; ELIMBAN, Vijayan; GANGULY, Paul K.; DHALLA, Naranjan S. β -1 adrenoceptors and AT1 receptors may not be involved in catecholamine-induced lethal arrhythmias. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, [S. l.], v. 97, n. 6, p. 570–576, 2018. DOI: 10.1139/cjpp-2018-0531.

AENGEVAEREN VINCENT L.; HOPMAN MARIA T.E.; THOMPSON PAUL D.; BAKKER ESMÉE A.; GEORGE KEITH P.; THIJSEN DICK H.J.; EIJSVOGELS THIJS M.H. Exercise-Induced Cardiac Troponin I Increase and Incident Mortality and Cardiovascular Events. **Circulation**, [S. l.], v. 140, n. 10, p. 804–814, 2019. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.119.041627.

AHLQUIST, Raymond P. A STUDY OF THE ADRENOTROPIC RECEPTORS. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, [S. l.], v. 153, n. 3, p. 586–600, 1948. DOI: 10.1152/ajplegacy.1948.153.3.586.

AKINAGA, Juliana; GARCÍA-SÁINZ, J. Adolfo; S PUPO, André. Updates in the function and regulation of $\alpha(1)$ -adrenoceptors. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 176, n. 14, p. 2343–2357, 2019. DOI: 10.1111/bph.14617.

ALANAZI, Abeer; FADDA, Laila; ALHUSAINI, Ahlam; AHMAD, Rehab. Antioxidant, antiapoptotic, and antifibrotic effects of the combination of liposomal resveratrol and carvedilol against doxorubicin-induced cardiomyopathy in rats. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, [S. l.], v. n/a, n. n/a, p. e22492, 2020. DOI: 10.1002/jbt.22492.

ALATASSI, Abdulaleem; HABBAL, Mohamad; TAMIM, Hani; SADAT, Musharaf; AL QASIM, Eman; ARABI, Yaseen M. Association between troponin-I levels and outcome in critically ill patients admitted to non-cardiac intensive care unit with high prevalence of cardiovascular risk factors. **BMC anesthesiology**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 54–54, 2018. DOI: 10.1186/s12871-018-0515-7.

ALCOCK, SJ; BOND, PA. Observations on the toxicity of Alderlin (pronethalol) in laboratory animals. **Proc. Europ. Soc. Stud. Drug Toxicity**, [S. l.], v. 4, p. 30–39, 1964.

ALEXANDER, Stephen PH et al. THE CONCISE GUIDE TO PHARMACOLOGY 2017/18: G protein-coupled receptors. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 174, n. S1, p. S17–S129, 2017. DOI: 10.1111/bph.13878.

ANTCLIFFE, David B. et al. Levosimendan in septic shock in patients with biochemical evidence of cardiac dysfunction: a subgroup analysis of the LeoPARDS randomised trial. **Intensive Care Medicine**, [S. l.], v. 45, n. 10, p. 1392–1400, 2019. DOI: 10.1007/s00134-019-05731-w.

ARONOW, Wilbert S. The medical treatment of angina pectoris VI. Propranolol as an antianginal drug. **American Heart Journal**, [S. l.], v. 84, n. 5, p. 706–709, 1972. DOI: 10.1016/0002-8703(72)90187-1.

ARRAES, Sandra Mara A. et al. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. **Blood**, [S. l.], v. 108, n. 9, p. 2906–2913, 2006. DOI: 10.1182/blood-2006-05-024638.

ASANO, Koji; ZISMAN, Lawrence S.; YOSHIKAWA, Tsutomu; HEADLEY, Violetta; BRISTOW, Michael R.; PORT, David J. Bucindolol, a Nonselective β 1- and β 2-Adrenergic Receptor Antagonist, Decreases β -Adrenergic Receptor Density in Cultured Embryonic Chick Cardiac Myocyte Membranes. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [S. l.], v. 37, n. 6, 2001. Disponível em: https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Fulltext/2001/06000/Bucindolol,_a_Nonselective__1__and__2_Adrenergic.5.aspx.

AUGUSTYN, Adam et al. **Francesco Redi**. 2020. Disponível em: <https://www.britannica.com/biography/Francesco-Redi>.

AVILA, Mônica Samuel et al. Carvedilol for Prevention of Chemotherapy-Related Cardiotoxicity: The CECCY Trial. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 71, n. 20, p. 2281–2290, 2018. DOI: 10.1016/j.jacc.2018.02.049.

AVNI, Tomer; LADOR, Adi; LEV, Shaul; LEIBOVICI, Leonard; PAUL, Mical; GROSSMAN, Alon. Vasopressors for the Treatment of Septic Shock: Systematic Review and Meta-Analysis. **PloS one**, [S. l.], v. 10, n. 8, p. e0129305–e0129305, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0129305.

BAKER, Jillian G. The selectivity of beta-adrenoceptor antagonists at the human beta1, beta2 and beta3 adrenoceptors. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 144, n. 3, p. 317–322, 2005. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706048.

BAKER, Jillian G. The selectivity of beta-adrenoceptor agonists at human beta1-, beta2- and beta3-adrenoceptors. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 160, n. 5, p. 1048–1061, 2010. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2010.00754.x.

BAKER, Jillian G.; HALL, Ian P.; HILL, Stephen J. Agonist and Inverse Agonist Actions of β -Blockers at the Human β 2-Adrenoceptor Provide Evidence for Agonist-Directed Signaling. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 64, n. 6, p. 1357, 2003. DOI: 10.1124/mol.64.6.1357.

BARTEKOVA, Monika; RADOSINSKA, Jana; JELEMENSKY, Marek; DHALLA, Naranjan S. Role of cytokines and inflammation in heart function during health and disease. **Heart Failure Reviews**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 733–758, 2018. DOI: 10.1007/s10741-018-9716-x.

BASKE, Kishore; SAINI, Shiv Sajan; DUTTA, Sourabh; SUNDARAM, Venkateshan. Epinephrine versus dopamine in neonatal septic shock: a double-blind randomized controlled trial. **European journal of pediatrics**, Germany, v. 177, n. 9, p. 1335–1342, 2018. DOI: 10.1007/s00431-018-3195-x.

BAYOUMI, Ahmed S.; PARK, Kyoung-Mi; WANG, Yongchao; TEOH, Jian-Peng; AONUMA, Tatsuya; TANG, Yaoliang; SU, Huabo; WEINTRAUB, Neal L.; KIM, Il-Man. A carvedilol-responsive microRNA, miR-125b-5p protects the heart from acute myocardial infarction by repressing pro-apoptotic bak1 and klf13 in cardiomyocytes. **Journal of molecular and cellular cardiology**, [S. l.], v. 114, p. 72–82, 2018. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2017.11.003.

BELLETTI, Alessandro; BENEDETTO, Umberto; BIONDI-ZOCCAI, Giuseppe; LEGGIERI, Carlo; SILVANI, Paolo; ANGELINI, Gianni D.; ZANGRILLO, Alberto; LANDONI, Giovanni. The effect of

vasoactive drugs on mortality in patients with severe sepsis and septic shock. A network meta-analysis of randomized trials. **Journal of critical care**, United States, v. 37, p. 91–98, 2017. DOI: 10.1016/j.jcrc.2016.08.010.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. d. Q. Role of Nitric Oxide in the Failure of Neutrophil Migration in Sepsis. **The Journal of Infectious Diseases**, [S. l.], v. 182, n. 1, p. 214–223, 2000. DOI: 10.1086/315682.

BESSIÈRE, Francis; KHENIFER, Safia; DUBOURG, Julie; DURIEU, Isabelle; LEGA, Jean-Christophe. Prognostic value of troponins in sepsis: a meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, [S. l.], v. 39, n. 7, p. 1181–1189, 2013. DOI: 10.1007/s00134-013-2902-3.

BLACK, J. Drugs from emasculated hormones: the principle of syntopic antagonism. **Science**, [S. l.], v. 245, n. 4917, p. 486, 1989. DOI: 10.1126/science.2569237.

BLACK, J. W.; DUNCAN, W. A.; SHANKS, R. G. Comparison of some properties of pronethalol and propranolol. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, [S. l.], v. 25, n. 3, p. 577–591, 1965. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1965.tb01782.x.

BLAUKAT, A.; BARAC, A.; CROSS, M. J.; OFFERMANN, S.; DIKIC, I. G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals. **Molecular and cellular biology**, [S. l.], v. 20, n. 18, p. 6837–6848, 2000. DOI: 10.1128/mcb.20.18.6837-6848.2000.

BONE, Roger C.; BALK, Robert A.; CERRA, Frank B.; DELLINGER, R. Phillip; FEIN, Alan M.; KNAUS, William A.; SCHEIN, Roland M. H.; SIBBALD, William J. Definitions for Sepsis and Organ Failure and Guidelines for the Use of Innovative Therapies in Sepsis. **CHEST**, [S. l.], v. 101, n. 6, p. 1644–1655, 1992. DOI: 10.1378/chest.101.6.1644.

BOONEN, Eva et al. Reduced cortisol metabolism during critical illness. **The New England journal of medicine**, [S. l.], v. 368, n. 16, p. 1477–1488, 2013. DOI: 10.1056/NEJMoa1214969.

BOONEN, Eva; VAN DEN BERGHE, Greet. MECHANISMS IN ENDOCRINOLOGY: New concepts to further unravel adrenal insufficiency during critical illness. **European Journal of Endocrinology**, [S. l.], v. 175, n. 1, p. R1–R9, 2016. DOI: 10.1530/EJE-15-1098.

BOWMAN, Jacob D.; LINDERT, Steffen. Computational Studies of Cardiac and Skeletal Troponin. **Frontiers in Molecular Biosciences**, [S. l.], v. 6, p. 68, 2019. DOI: 10.3389/fmolb.2019.00068.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 72, n. 1, p. 248–254, 1976. DOI: 10.1016/0003-2697(76)90527-3.

BRINKMANN, Volker; REICHARD, Ulrike; GOOSMANN, Christian; FAULER, Beatrix; UHLEMANN, Yvonne; WEISS, David S.; WEINRAUCH, Yvette; ZYCHLINSKY, Arturo. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, [S. l.], v. 303, n. 5663, p. 1532, 2004. DOI: 10.1126/science.1092385.

BRODDE, O. E.; ZERKOWSKI, H. R.; BORST, H. G.; MAIER, W.; MICHEL, M. C. Drug- and disease-induced changes of human cardiac β 1- and β 2-adrenoceptors. **European Heart Journal**, [S. l.], v. 10, n. suppl_B, p. 38–44, 1989. a. DOI: 10.1093/eurheartj/10.suppl_B.38.

BRODDE, Otto-Erich; ZERKOWSKI, Hans-Reinhard; DOETSCH, Norbert; MOTOMURA, Shigeru; KHAMSSI, Massud; MICHEL, Martin C. Myocardial beta-adrenoceptor changes in heart failure: concomitant reduction in beta₁- and beta₂-adrenoceptor function related to the degree of heart failure in patients with mitral valve disease. **Journal of the American College of Cardiology**, [S. l.], v. 14, n. 2, p. 323–331, 1989. DOI: 10.1016/0735-1097(89)90181-2.

BROWN, Samuel M.; PITTMAN, Joel E.; HIRSHBERG, Eliotte L.; JONES, Jason P.; LANSPA, Michael J.; KUTTLER, Kathryn G.; LITWIN, Sheldon E.; GRISSOM, Colin K. Diastolic dysfunction and mortality in early severe sepsis and septic shock: a prospective, observational echocardiography study. **Critical ultrasound journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 8–8, 2012. DOI: 10.1186/2036-7902-4-8.

BUDELMANN, G. [Hugo Schottmüller, 1867-1936. The problem of sepsis]. **Der Internist**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 92–101, 1969.

BURGDORFF, A. M.; BUCHER, M.; SCHUMANN, J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. **The Journal of international medical research**, [S. l.], v. 46, n. 4, p. 1303–1310, 2018. DOI: 10.1177/0300060517743836.

BUXTON, B. F.; JONES, C. R.; MOLENAAR, P.; SUMMERS, R. J. Characterization and autoradiographic localization of beta-adrenoceptor subtypes in human cardiac tissues. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 92, n. 2, p. 299–310, 1987. DOI: 10.1111/j.1476-5381.1987.tb11324.x.

BYLUND, David B. Alpha-2 adrenoceptor subtypes: are more better? **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 144, n. 2, p. 159–160, 2005. DOI: 10.1038/sj.bjp.0706060.

CHADDA K; GOLDSTEIN S; BYINGTON R; CURB J D. Effect of propranolol after acute myocardial infarction in patients with congestive heart failure. **Circulation**, [S. l.], v. 73, n. 3, p. 503–510, 1986. DOI: 10.1161/01.CIR.73.3.503.

CHANG, Wei; XIE, Jian-Feng; XU, Jing-Yuan; YANG, Yi. Effect of levosimendan on mortality in severe sepsis and septic shock: a meta-analysis of randomised trials. **BMJ open**, [S. l.], v. 8, n. 3, p. e019338–e019338, 2018. DOI: 10.1136/bmjopen-2017-019338.

CHANG, Yun-Te; HUANG, Wei-Chun; CHENG, Chin-Chang; KE, Meng-Wei; TSAI, Jung-Shun; HUNG, Yao-Min; HUANG, Neng-Chyan; HUANG, Mu-Shun; WANN, Shue-Ren. Effects of epinephrine on heart rate variability and cytokines in a rat sepsis model. **Bosnian Journal of Basic Medical Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 88–98, 2020. DOI: 10.17305/bjbms.2018.3565.

CHAPMAN, Andrew R. et al. Association of High-Sensitivity Cardiac Troponin I Concentration With Cardiac Outcomes in Patients With Suspected Acute Coronary Syndrome. **JAMA**, [S. l.], v. 318, n. 19, p. 1913–1924, 2017. DOI: 10.1001/jama.2017.17488.

CHEN, Jing et al. Trimetazidine Attenuates Cardiac Dysfunction in Endotoxemia and Sepsis by Promoting Neutrophil Migration. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 9, p. 2015–2015, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02015.

CHEN, Ying; HONG, Xianfei. Effects of carvedilol reduce conjunctivitis through changes in inflammation, NGF and VEGF levels in a rat model. **Experimental and therapeutic medicine**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 1987–1992, 2016. DOI: 10.3892/etm.2016.3140.

COLÓN, David F. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. **Critical care (London, England)**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 113–113, 2019. a. DOI: 10.1186/s13054-019-2407-8.

COLÓN, David F. et al. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. **Critical care (London, England)**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 113–113, 2019. b. DOI: 10.1186/s13054-019-2407-8.

COLUCCI, W. S.; SAWYER, D. B.; SINGH, K.; COMMUNAL, C. Adrenergic overload and apoptosis in heart failure: implications for therapy. **Journal of cardiac failure**, United States, v. 6, n. 2 Suppl 1, p. 1–7, 2000.

COQUEREL, David; SAINCILY, Xavier; DUMONT, Lauralyne; SARRET, Philippe; MARSAULT, Éric; AUGER-MESSIER, Mannix; LESUR, Olivier. The apelinergic system as an alternative to catecholamines in low-output septic shock. **Critical care (London, England)**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 10–10, 2018. DOI: 10.1186/s13054-018-1942-z.

CUNNION, RE; PARRILLO, JE. Myocardial dysfunction in sepsis. **Crit Care Clin**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 99–118, 1989.

DAHL, Erika F.; WU, Steven C.; HEALY, Chastity L.; PERRY, Jocelyn; O'CONNELL, Timothy D. ERK mediated survival signaling is dependent on the Gq-G-protein coupled receptor type and subcellular localization in adult cardiac myocytes. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, [S. l.], v. 127, p. 67–73, 2019. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.11.020.

DAL-SECCO, Daniela 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**, [S. l.], v. 313, n. 1, p. H149–H163, 2017. DOI: 10.1152/ajpheart.00052.2016.

DANNER, Robert L.; ELIN, Ronald J.; HOSSEINI, Jeanette M.; WESLEY, Robert A.; REILLY, Joseph M.; PARILLO, Joseph E. Endotoxemia in Human Septic Shock. **CHEST**, [S. l.], v. 99, n. 1, p. 169–175, 1991. DOI: 10.1378/chest.99.1.169.

DE ARAÚJO JÚNIOR, Raimundo Fernandes; SOUZA, Tatiana Oliveira; DE MEDEIROS, Caroline Addison Xavier; DE SOUZA, Lélia Batista; FREITAS, Maria de Lourdes; DE LUCENA, Hévio Freitas; DO SOCORRO COSTA FEITOSA ALVES, Maria; DE ARAÚJO, Aurigena Antunes. Carvedilol decrease IL-1 β and TNF- α , inhibits MMP-2, MMP-9, COX-2, and RANKL expression, and up-regulates OPG in a rat model of periodontitis. **PloS one**, [S. l.], v. 8, n. 7, p. e66391–e66391, 2013. DOI: 10.1371/journal.pone.0066391.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Severe Sepsis and Septic Shock, 2012. **Intensive Care Medicine**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 165–228, 2013. DOI: 10.1007/s00134-012-2769-8.

DENSTAEDT, Scott J.; SINGER, Benjamin H.; STANDIFORD, Theodore J. Sepsis and Nosocomial Infection: Patient Characteristics, Mechanisms, and Modulation. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 9, p. 2446–2446, 2018. DOI: 10.3389/fimmu.2018.02446.

DHAINAUT J F; HUYGHEBAERT M F; MONSALLIER J F; LEFEVRE G; DALL'AVA-SANTUCCI J; BRUNET F; VILLEMANT D; CARLI A; RAICHVARG D. Coronary hemodynamics and

myocardial metabolism of lactate, free fatty acids, glucose, and ketones in patients with septic shock. **Circulation**, [S. I.], v. 75, n. 3, p. 533–541, 1987. DOI: 10.1161/01.CIR.75.3.533.

DIMMELER, Stefanie; ZEIHNER, Andreas M. Netting Insights into Fibrosis. **New England Journal of Medicine**, [S. I.], v. 376, n. 15, p. 1475–1477, 2017. DOI: 10.1056/NEJMcibr1616598.

DIMOPOULOS, G.; KOULENTI, D.; TABAH, A.; POULAKOU, G.; VESIN, A.; ARVANITI, K. Bloodstream infections in ICU with increased resistance: epidemiology and outcomes. **Minerva Anesthesiol**, [S. I.], v. 81, n. 4, p. 405–418, 2015.

DINÇ, Fatih; AKALIN, Halis; ÖZAKIN, Cüneyt; SINIRTAŞ, Melda; KEBABÇI, Nesrin; IŞÇIMEN, Remzi; KELEBEK GİRGİN, Nermin; KAHVECI, Ferda. Comparison of blood culture and multiplex real-time PCR for the diagnosis of nosocomial sepsis. **Minerva anesthesiologica**, [S. I.], v. 82, n. 3, p. 301–309, 2016.

DUCROCQ, Nicolas, M. D.; KIMMOUN, Antoine, M. D.; FURMANIUK, Anna, M. Sc.; HEKALO, Zerin, M. Sc.; MASKALI, Fatiha, Ph. D.; POUSSIER, Sylvain, Ph. D.; MARIE, Pierre-Yves, M. D., Ph. D.; LEVY, Bruno, M. D., Ph. D. Comparison of Equipressor Doses of Norepinephrine, Epinephrine, and Phenylephrine on Septic Myocardial Dysfunction. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, [S. I.], v. 116, n. 5, p. 1083–1091, 2012. DOI: 10.1097/ALN.0b013e31824f9669.

EICHEL, K.; JULLIÉ, D.; VON ZASTROW, M. β -Arrestin drives MAP kinase signalling from clathrin-coated structures after GPCR dissociation. **Nature cell biology**, [S. I.], v. 18, n. 3, p. 303–310, 2016. DOI: 10.1038/ncb3307.

EISHINGDRELO, Haifeng; SUN, Wei; LI, Hua; WANG, Li; EISHINGDRELO, Alex; DAI, Sheng; MCKEW, John C.; ZHENG, Wei. ERK and β -arrestin interaction: a converging point of signaling pathways for multiple types of cell surface receptors. **Journal of biomolecular screening**, [S. I.], v. 20, n. 3, p. 341–349, 2015. DOI: 10.1177/1087057114557233.

FAN, Hongkuan. β -Arrestins 1 and 2 are critical regulators of inflammation. **Innate immunity**, [S. I.], v. 20, n. 5, p. 451–460, 2014. DOI: 10.1177/1753425913501098.

FAN, Hongkuan; BITTO, Alessandra; ZINGARELLI, Basilia; LUTTRELL, Louis M.; BORG, Keith; HALUSHKA, Perry V.; COOK, James A. Beta-arrestin 2 negatively regulates sepsis-induced inflammation. **Immunology**, [S. I.], v. 130, n. 3, p. 344–351, 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2009.03185.x.

FATTAHI, Fatemeh; WARD, Peter A. Complement and sepsis-induced heart dysfunction. **Molecular immunology**, [S. I.], v. 84, p. 57–64, 2017. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.11.012.

FENTON, Kimberly E.; PARKER, Margaret M. Cardiac Function and Dysfunction in Sepsis. **Sepsis**, [S. I.], v. 37, n. 2, p. 289–298, 2016. DOI: 10.1016/j.ccm.2016.01.014.

FERRARA, Nicola; KOMICI, Klara; CORBI, Graziamaria; PAGANO, Gennaro; FURGI, Giuseppe; RENGO, Carlo; FEMMINELLA, Grazia Daniela; LEOSCO, Dario; BONADUCE, Domenico. β -adrenergic receptor responsiveness in aging heart and clinical implications. **Frontiers in Physiology**, [S. I.], v. 4, p. 396, 2014. DOI: 10.3389/fphys.2013.00396.

FLIERL, Michael A. et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury. **Nature**, [S. I.], v. 449, n. 7163, p. 721–725, 2007. DOI: 10.1038/nature06185.

FRACASTORO, Girolamo; WRIGHT, WC. **De Contagione, Libri III, Translation and notes**. New York: London: G. P. Putnam's sons, 1930.

FREIBERG, Jeffrey A. The mythos of laudable pus along with an explanation for its origin. **Journal of Community Hospital Internal Medicine Perspectives**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 196–198, 2017. DOI: 10.1080/20009666.2017.1343077.

FRISHMAN, William H. Beta-Adrenergic Receptor Blockers in Hypertension: Alive and Well. **Controversies in Hypertension**, [S. l.], v. 59, n. 3, p. 247–252, 2016. DOI: 10.1016/j.pcad.2016.10.005.

FUCHS, C. et al. Continuing chronic beta-blockade in the acute phase of severe sepsis and septic shock is associated with decreased mortality rates up to 90 days. **British journal of anaesthesia**, England, v. 119, n. 4, p. 616–625, 2017. DOI: 10.1093/bja/aex231.

FUNK, Duane J.; PARRILLO, Joseph E.; KUMAR, Anand. Sepsis and Septic Shock: A History. **Critical Care Clinics**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 83–101, 2009. DOI: 10.1016/j.ccc.2008.12.003.

GALANDRIN, Ségolène; BOUVIER, Michel. Distinct Signaling Profiles of β_1 and β_2 Adrenergic Receptor Ligands toward Adenylyl Cyclase and Mitogen-Activated Protein Kinase Reveals the Pluridimensionality of Efficacy. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 70, n. 5, p. 1575, 2006. DOI: 10.1124/mol.106.026716.

GATICA, Sebastian et al. TRPM7 mediates kidney injury, endothelial hyperpermeability and mortality during endotoxemia. **Laboratory Investigation**, [S. l.], v. 100, n. 2, p. 234–249, 2020. DOI: 10.1038/s41374-019-0304-z.

GERLO, Sarah; KOOLJMAN, Ron; BECK, Ilse M.; KOLMUS, Krzysztof; SPOOREN, Anneleen; HAEGEMAN, Guy. Cyclic AMP: a selective modulator of NF- κ B action. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [S. l.], v. 68, n. 23, p. 3823–3841, 2011. DOI: 10.1007/s00018-011-0757-8.

GINHOUX, Florent; JUNG, Steffen. Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 392–404, 2014. DOI: 10.1038/nri3671.

GORDON, Anthony C. et al. Levosimendan for the Prevention of Acute Organ Dysfunction in Sepsis. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 375, n. 17, p. 1638–1648, 2016. DOI: 10.1056/NEJMoa1609409.

GU, Jiaqi et al. Maresin 1 attenuates mitochondrial dysfunction through the ALX/cAMP/ROS pathway in the cecal ligation and puncture mouse model and sepsis patients. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, United States, v. 98, n. 6, p. 715–733, 2018. DOI: 10.1038/s41374-018-0031-x.

GUO, Yuan; ZHANG, Yi; HONG, Kai; LUO, Fengyan; GU, Qiuping; LU, Nonghua; BAI, Aiping. AMPK inhibition blocks ROS-NF κ B signaling and attenuates endotoxemia-induced liver injury. **PloS one**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. e86881–e86881, 2014. DOI: 10.1371/journal.pone.0086881.

HAILESELASSIE, Bereketab et al. Myocardial oxidative stress correlates with left ventricular dysfunction on strain echocardiography in a rodent model of sepsis. **Intensive care medicine experimental**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 21–21, 2017. DOI: 10.1186/s40635-017-0134-5.

HANSEN, Jakob Lerche; THEILADE, Juliane; APLIN, Mark; SHEIKH, Søren P. Role of G-Protein-Coupled Receptor Kinase 2 in the Heart—Do Regulatory Mechanisms Open Novel Therapeutic Perspectives? **Trends in Cardiovascular Medicine**, [S. l.], v. 16, n. 5, p. 169–177, 2006. DOI: 10.1016/j.tcm.2006.03.004.

HENDY, Geoffrey N.; CANAFF, Lucie. Calcium-sensing receptor, proinflammatory cytokines and calcium homeostasis. **Seminars in cell & developmental biology**, England, v. 49, p. 37–43, 2016. DOI: 10.1016/j.semcdb.2015.11.006.

HERNANDES, Marina S. et al. The role of Nox2-derived ROS in the development of cognitive impairment after sepsis. **Journal of neuroinflammation**, [S. l.], v. 11, p. 36–36, 2014. DOI: 10.1186/1742-2094-11-36.

HOBAL, Ion A.; EDGECOMB, Jessica; LABARGE, Kara; COLUCCI, Wilson S. Dysregulation of intracellular calcium transporters in animal models of sepsis-induced cardiomyopathy. **Shock (Augusta, Ga.)**, [S. l.], v. 43, n. 1, p. 3–15, 2015. DOI: 10.1097/SHK.0000000000000261.

HOFFMAN, Matthew et al. Myocardial Strain and Cardiac Output are Preferable Measurements for Cardiac Dysfunction and Can Predict Mortality in Septic Mice. **Journal of the American Heart Association**, [S. l.], v. 8, n. 10, p. e012260–e012260, 2019. DOI: 10.1161/JAHA.119.012260.

HORJEN, Anja Wiedswang; ULIMOEN, Sara Reinvik; ENGER, Steve; NORSETH, Jon; SELJEFLØT, Ingebjørg; ARNESEN, Harald; TVEIT, Arnliot. Troponin I levels in permanent atrial fibrillation-impact of rate control and exercise testing. **BMC cardiovascular disorders**, [S. l.], v. 16, p. 79–79, 2016. DOI: 10.1186/s12872-016-0255-x.

ILACS. **GUIA DE TERAPIA ANTIMICROBIANA EMPÍRICA PARA SEPSE E CHOQUE SÉPTICO** Instituto Latino Americano de Sepsis, , 2016. Disponível em: <https://ilas.org.br/ferramentas/guia-antibioticoterapia-empirica>. Acesso em: 3 mar. 2020.

IQBAL, Mubeen; COHEN, Rubin I.; MARZOUK, Kamel; LIU, Shu Fang. Time course of nitric oxide, peroxynitrite, and antioxidants in the endotoxemic heart. **Critical care medicine**, United States, v. 30, n. 6, p. 1291–1296, 2002. DOI: 10.1097/00003246-200206000-00021.

JAIN, Ruchi; WATSON, Uchenna; VASUDEVAN, Lakshmi; SAINI, Deepak K. ERK Activation Pathways Downstream of GPCRs. **International review of cell and molecular biology**, Netherlands, v. 338, p. 79–109, 2018. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2018.02.003.

JAN, Sheng-Ling; LIN, Ming-Chih; CHAN, Sheng-Ching; LEE, Hsiu-Fen; CHEN, Po-Yen; HUANG, Fang-Liang. Urine catecholamines in children with severe Enterovirus A71 infection: comparison with paediatric septic shock. **Biomarkers**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 277–285, 2019. DOI: 10.1080/1354750X.2018.1556339.

JUNGL, S. et al. Enhanced Cardiac S100A1 Expression Improves Recovery from Global Ischemia-Reperfusion Injury. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, [S. l.], v. 11, n. 3, p. 236–245, 2018. DOI: 10.1007/s12265-018-9788-y.

KADOI, Yuji; SAITO, Shigeru; KAWAHARA, Fuminori; NISHIHARA, Fumio; GOTO, Fumio. G-protein coupled receptor kinase 2 is altered during septic shock in rats. **The Journal of surgical research**, United States, v. 108, n. 1, p. 69–76, 2002. DOI: 10.1006/jsre.2002.6524.

KAKINO, Takamori; YOKOYAMA, Hirotake; ESHIMA, Kenichi. Significance of troponin I level as a marker of disease activity in the management of acute necrotizing eosinophilic myocarditis with normal peripheral eosinophil count: a case report. **European heart journal. Case reports**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. yty139–yty139, 2018. DOI: 10.1093/ehjcr/tyt139.

KAN, Hung-Wei; CHANG, Chin-Hong; LIN, Chih-Lung; LEE, Yi-Chen; HSIEH, Sung-Tsang; HSIEH, Yu-Lin. Downregulation of adenosine and adenosine A1 receptor contributes to neuropathic pain in resiniferatoxin neuropathy. **Pain**, [S. l.], v. 159, n. 8, p. 1580–1591, 2018. DOI: 10.1097/j.pain.0000000000001246.

KANASHIRO, Alexandre et al. Therapeutic potential and limitations of cholinergic anti-inflammatory pathway in sepsis. **Pharmacological research**, [S. l.], v. 117, p. 1–8, 2017. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.12.014.

KANCZKOWSKI, Waldemar; SUE, Mariko; ZACHAROWSKI, Kai; REINCKE, Martin; BORNSTEIN, Stefan R. The role of adrenal gland microenvironment in the HPA axis function and dysfunction during sepsis. **Sixteenth Conference on the Adrenal Cortex (Adrenal 2014)**, [S. l.], v. 408, p. 241–248, 2015. DOI: 10.1016/j.mce.2014.12.019.

KANDASAMY, Kannan 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**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 100–113, 2015. DOI: 10.1177/1074248415587968.

KAO, Yu-Hsun; CHEN, Yao-Chang; CHENG, Chen-Chuan; LEE, Ting-I.; CHEN, Yi-Jen; CHEN, Shih-Ann. Tumor necrosis factor- α decreases sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expressions via the promoter methylation in cardiomyocytes. **Critical care medicine**, United States, v. 38, n. 1, p. 217–222, 2010. DOI: 10.1097/CCM.0b013e3181b4a854.

KATRUKHA, I. A. Human cardiac troponin complex. Structure and functions. **Biochemistry (Moscow)**, [S. l.], v. 78, n. 13, p. 1447–1465, 2013. DOI: 10.1134/S0006297913130063.

KAYA, Ziya et al. Identification of cardiac troponin I sequence motifs leading to heart failure by induction of myocardial inflammation and fibrosis. **Circulation**, [S. l.], v. 118, n. 20, p. 2063–2072, 2008. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.788711.

KENAKIN, Terry. **Pharmacology in drug discovery- understanding drug response**. 1^a ed. United States of America: Elsevier, 2012.

KIM, Il-Man; TILLEY, Douglas G.; CHEN, Juhsien; SALAZAR, Natasha C.; WHALEN, Erin J.; VIOLIN, Jonathan D.; ROCKMAN, Howard A. β -Blockers alprenolol and carvedilol stimulate β -arrestin-mediated EGFR transactivation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 105, n. 38, p. 14555, 2008. DOI: 10.1073/pnas.0804745105.

KIM, Joonghee; KIM, Kyuseok; LEE, Heeyoung; AHN, Soyeon. Epidemiology of sepsis in Korea: a population-based study of incidence, mortality, cost and risk factors for death in sepsis. **Clinical and experimental emergency medicine**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 49–63, 2019. DOI: 10.15441/ceem.18.007.

KIMMOUN, Antoine; LOUIS, Huguette; AL KATTANI, Narimane; DELEMAZURE, Julie; DESSALES, Nicolas; WEI, Chaojie; MARIE, Pierre Yves; ISSA, Khodor; LEVY, Bruno. β 1-Adrenergic Inhibition Improves Cardiac and Vascular Function in Experimental Septic Shock*.

Critical Care Medicine, [S. l.], v. 43, n. 9, 2015. Disponível em: https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2015/09000/_1_Adrenergic_Inhibition_Improves_Cardiac_and.44.aspx.

KOHUTIAR, M.; ECKHARDT, A.; MIKŠÍK, I.; ŠANTOROVÁ, P.; WILHELM, J. Proteomic analysis of peroxynitrite-induced protein nitration in isolated beef heart mitochondria. **Physiological research**, Czech Republic, v. 67, n. 2, p. 239–250, 2018. DOI: 10.33549/physiolres.933608.

KOLMUS, Krzysztof; TAVERNIER, Jan; GERLO, Sarah. β 2-Adrenergic receptors in immunity and inflammation: Stressing NF- κ B. **Brain, Behavior, and Immunity**, [S. l.], v. 45, p. 297–310, 2015. DOI: 10.1016/j.bbi.2014.10.007.

KOMOLOV, Konstantin E.; BENOVIĆ, Jeffrey L. G protein-coupled receptor kinases: Past, present and future. **Cellular signalling**, [S. l.], v. 41, p. 17–24, 2018. DOI: 10.1016/j.cellsig.2017.07.004.

KONG, Weilan et al. GTS-21 Protected Against LPS-Induced Sepsis Myocardial Injury in Mice Through α 7nAChR. **Inflammation**, United States, v. 41, n. 3, p. 1073–1083, 2018. DOI: 10.1007/s10753-018-0759-x.

KOOISTRA, Albert J.; LEURS, Rob; DE ESCH, Iwan J. P.; DE GRAAF, Chris. Structure-Based Prediction of G-Protein-Coupled Receptor Ligand Function: A β -Adrenoceptor Case Study. **Journal of Chemical Information and Modeling**, [S. l.], v. 55, n. 5, p. 1045–1061, 2015. DOI: 10.1021/acs.jcim.5b00066.

KUMARI, Punita; DWIVEDI, Hemlata; BAIDYA, Mithu; SHUKLA, Arun K. Chapter 9 - Measuring agonist-induced ERK MAP kinase phosphorylation for G-protein-coupled receptors. In: SHUKLA, Arun K. (org.). **Methods in Cell Biology**. [s.l.] : Academic Press, 2019. v. 149p. 141–153. DOI: 10.1016/bs.mcb.2018.09.015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091679X18301389>.

LAI, Chih-Cheng; LEE, Meng-Tse Gabriel; LEE, Wan-Chien; CHAO, Christin Chih-Ting; HSU, Tzu-Chun; LEE, Si-Huei; LEE, Chien-Chang; NATIONAL TAIWAN UNIVERSITY HOSPITAL HEALTH DATA SCIENCE RESEARCH GROUP. Susceptible period for cardiovascular complications in patients recovering from sepsis. **CMAJ : Canadian Medical Association journal = journal de l'Association medicale canadienne**, [S. l.], v. 190, n. 36, p. E1062–E1069, 2018. DOI: 10.1503/cmaj.171284.

LAI, Jin-lun et al. Indirubin Inhibits LPS-Induced Inflammation via TLR4 Abrogation Mediated by the NF- κ B and MAPK Signaling Pathways. **Inflammation**, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 1–12, 2017. DOI: 10.1007/s10753-016-0447-7.

LAMKIN, Donald M. et al. β -Adrenergic-stimulated macrophages: Comprehensive localization in the M1-M2 spectrum. **Brain, behavior, and immunity**, [S. l.], v. 57, p. 338–346, 2016. DOI: 10.1016/j.bbi.2016.07.162.

LANDESBURG, Giora et al. Troponin Elevation in Severe Sepsis and Septic Shock: The Role of Left Ventricular Diastolic Dysfunction and Right Ventricular Dilatation*. **Read Online: Critical Care Medicine | Society of Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 42, n. 4, 2014. Disponível em: https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2014/04000/Troponin_Elevation_in_Severe_Sepsis_and_Septic.4.aspx.

LAUKOVA, M.; VARGOVIC, Peter; ROKYTOVA, I.; MANZ, G.; KVETNANSKY, R. Repeated Stress Exaggerates Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in the Rat Spleen. **Cellular and Molecular Neurobiology**, [S. l.], v. 38, n. 1, p. 195–208, 2018. DOI: 10.1007/s10571-017-0546-5.

LE TULZO, Yves et al. Monocyte Human Leukocyte Antigen–DR Transcriptional Downregulation by Cortisol during Septic Shock. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 169, n. 10, p. 1144–1151, 2004. DOI: 10.1164/rccm.200309-1329OC.

LI, Hong-Mei; LI, Kai-Ying; XING, Yun; TANG, Xiang-Xu; YANG, Duo-Meng; DAI, Xiao-Meng; LU, Da-Xiang; WANG, Hua-Dong. Phenylephrine Attenuated Sepsis-Induced Cardiac Inflammation and Mitochondrial Injury Through an Effect on the PI3K/Akt Signaling Pathway. **Journal of cardiovascular pharmacology**, United States, v. 73, n. 3, p. 186–194, 2019. a. DOI: 10.1097/FJC.0000000000000651.

LI, Hongmei; XING, Yun; YANG, Duomeng; TANG, Xiangxu; LU, Daxiang; WANG, Huadong. Alpha-1 Adrenergic Receptor Agonist Phenylephrine Inhibits Sepsis-Induced Cardiomyocyte Apoptosis and Cardiac Dysfunction via Activating ERK1/2 Signal Pathway. **Shock (Augusta, Ga.)**, United States, v. 52, n. 1, p. 122–133, 2019. b. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001205.

LI, Hongyan; ZHANG, Shanshan; LI, Faliang; QIN, Lijie. NLRX1 attenuates apoptosis and inflammatory responses in myocardial ischemia by inhibiting MAVS-dependent NLRP3 inflammasome activation. **Molecular Immunology**, [S. l.], v. 76, p. 90–97, 2016. DOI: 10.1016/j.molimm.2016.06.013.

LI, Ning; ZHOU, Heng; WU, Haiming; WU, Qingqing; DUAN, Mingxia; DENG, Wei; TANG, Qizhu. STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3. **Redox biology**, [S. l.], v. 24, p. 101215–101215, 2019. c. DOI: 10.1016/j.redox.2019.101215.

LIDWELL, O. M. Joseph Lister and infection from the air. **Epidemiology and infection**, [S. l.], v. 99, n. 3, p. 568–578, 1987. DOI: 10.1017/s0950268800066425.

LIU, Ting; ZHANG, Lingyun; JOO, Donghyun; SUN, Shao-Cong. NF-κB signaling in inflammation. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 17023, 2017. DOI: 10.1038/sigtrans.2017.23.

LO PRESTI, M. S.; RIVAROLA, H. W.; FERNÁNDEZ, A. R.; ENDERS, J. E.; LEVIN, G.; FRETES, R.; CERBAN, F. M.; GARRIDO, V. V.; PAGLINI-OLIVA, P. Involvement of the β-adrenergic system in the cardiac chronic form of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology**, [S. l.], v. 136, n. 8, p. 905–918, 2009. DOI: 10.1017/S0031182009006337.

LU, Yang; YANG, Yang; HE, Xin; DONG, Shangwen; WANG, Wanhua; WANG, Donghao; ZHANG, Peng. Esmolol reduces apoptosis and inflammation in early sepsis rats with abdominal infection. **The American Journal of Emergency Medicine**, [S. l.], v. 35, n. 10, p. 1480–1484, 2017. DOI: 10.1016/j.ajem.2017.04.056.

LUO, Rong; CHEN, Xuepin; MA, Huihui; YAO, Chao; LIU, Mingjiang; TAO, Jianhong; LI, Xiaoping. Myocardial caspase-3 and NF-κB activation promotes calpain-induced septic apoptosis: The role of Akt/eNOS/NO pathway. **Life sciences**, Netherlands, v. 222, p. 195–202, 2019. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.02.048.

LUPTAK, Ivan; CROTEAU, Dominique; VALENTINE, Catherine; QIN, Fuzhong; SIWIK, Deborah A.; REMICK, Daniel G.; COLUCCI, Wilson S.; HOBAL, Ion A. Myocardial Redox Hormesis Protects the Heart of Female Mice in Sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, United States, v. 52, n. 1, p. 52–60, 2019. DOI: 10.1097/SHK.0000000000001245.

MAACK, C.; TYROLLER, S.; SCHNABEL, P.; CREMERS, B.; DABEW, E.; SÜDKAMP, M.; BÖHM, M. Characterization of β 1-selectivity, adrenoceptor-Gs-protein interaction and inverse agonism of nebivolol in human myocardium. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 132, n. 8, p. 1817–1826, 2001. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703992.

MACHADO, Flavia 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**, [S. l.], v. 17, n. 11, p. 1180–1189, 2017. DOI: 10.1016/S1473-3099(17)30322-5.

MADEJ, A.; BULDAK, L.; BASIAK, M.; SZKROBKA, W.; DULAWA, A.; OKOPIEN, B. The effects of 1 month antihypertensive treatment with perindopril, bisoprolol or both on the ex vivo ability of monocytes to secrete inflammatory cytokines. **Int J Clin Pharmacol Ther**, [S. l.], v. 47, n. 11, p. 686–694, 2009.

MAGOCSI, Maria; VIZI, E. Sylvester; SELMECZY, Zsolt; BRÓZIK, Anna; SZELENYI, Judith. Multiple G-protein-coupling specificity of beta-adrenoceptor in macrophages. **Immunology**, [S. l.], v. 122, n. 4, p. 503–513, 2007. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2007.02658.x.

MATSUISHI, Yujiro et al. Landiolol hydrochloride ameliorates acute lung injury in a rat model of early sepsis through the suppression of elevated levels of pulmonary endothelin-1. **Life Sciences**, [S. l.], v. 166, p. 27–33, 2016. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.10.010.

MCCARTER, Freda D.; NIERMAN, S. Renee; JAMES, J. Howard; WANG, Li; KING, Jy-Kung; FRIEND, Lou Ann; FISCHER, Josef E. Role of skeletal muscle Na⁺-K⁺ ATPase activity in increased lactate production in sub-acute sepsis. **Life sciences**, Netherlands, v. 70, n. 16, p. 1875–1888, 2002. DOI: 10.1016/s0024-3205(02)01475-3.

MCLEAN, Alison J.; MILLIGAN, Graeme. Ligand regulation of green fluorescent protein-tagged forms of the human β 1- and β 2-adrenoceptors; comparisons with the unmodified receptors. **British Journal of Pharmacology**, [S. l.], v. 130, n. 8, p. 1825–1832, 2000. DOI: 10.1038/sj.bjp.0703506.

MENG, Tao; YU, Jingya; LEI, Zhen; WU, Jianbo; WANG, Shuqin; BO, Qiyu; ZHANG, Xinyu; MA, Zhiyong; YU, Jingui. Propofol reduces lipopolysaccharide-induced, NADPH oxidase (NOX 2) mediated TNF- α and IL-6 production in macrophages. **Clinical & developmental immunology**, [S. l.], v. 2013, p. 325481–325481, 2013. DOI: 10.1155/2013/325481.

MONTÓ, Fermi et al. β 2- and β 1-Adrenoceptor Expression Exhibits a Common Regulatory Pattern With GRK2 and GRK5 in Human and Animal Models of Cardiovascular Diseases. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, [S. l.], v. 66, n. 5, 2015. Disponível em: https://journals.lww.com/cardiovascularpharm/Fulltext/2015/11000/_2__and__1_Adrenoceptor_Expression_Exhibits_a.8.aspx.

MONTÓ, Fermi; OLIVER, Eduardo; VICENTE, Diana; RUEDA, Joaquín; AGÜERO, Jaime; ALMENAR, Luis; IVORRA, Maria Dolores; BARETTINO, Domingo; D'OCON, Pilar. Different expression of adrenoceptors and GRKs in the human myocardium depends on heart failure

ethiology and correlates to clinical variables. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [S. I.], v. 303, n. 3, p. H368–H376, 2012. DOI: 10.1152/ajpheart.01061.2011.

MORELLI, Andrea et al. Effect of Heart Rate Control With Esmolol on Hemodynamic and Clinical Outcomes in Patients With Septic Shock: A Randomized Clinical Trial. **JAMA**, [S. I.], v. 310, n. 16, p. 1683–1691, 2013. DOI: 10.1001/jama.2013.278477.

MYAGMAR, Bat-Erdene et al. Adrenergic Receptors in Individual Ventricular Myocytes: The Beta-1 and Alpha-1B Are in All Cells, the Alpha-1A Is in a Subpopulation, and the Beta-2 and Beta-3 Are Mostly Absent. **Circulation research**, [S. I.], v. 120, n. 7, p. 1103–1115, 2017. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.310520.

NADEEM, Ahmed; AL-HARBI, Naif O.; AHMAD, Sheikh F.; IBRAHIM, Khalid E.; ALOTAIBI, Moureq R.; SIDDIQUI, Nahid; ALSHARARI, Shakir D.; ATTIA, Sabry M.; AL-HARBI, Mohammad M. Protease activated receptor-2 mediated upregulation of IL-17 receptor signaling on airway epithelial cells is responsible for neutrophilic infiltration during acute exposure of house dust mite allergens in mice. **Chemico-Biological Interactions**, [S. I.], v. 304, p. 52–60, 2019. DOI: 10.1016/j.cbi.2019.03.001.

NADEEM, Ahmed; SIDDIQUI, Nahid; AL-HARBI, Naif O.; ATTIA, Sabry M.; ALSHARARI, Shakir D.; AHMAD, Sheikh F. Acute lung injury leads to depression-like symptoms through upregulation of neutrophilic and neuronal NADPH oxidase signaling in a murine model. **International Immunopharmacology**, [S. I.], v. 47, p. 218–226, 2017. DOI: 10.1016/j.intimp.2017.04.010.

NAKAZAWA, Daigo et al. Histones and Neutrophil Extracellular Traps Enhance Tubular Necrosis and Remote Organ Injury in Ischemic AKI. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, [S. I.], v. 28, n. 6, p. 1753–1768, 2017. DOI: 10.1681/ASN.2016080925.

NGUYEN, Duc Nam; HUYGHENS, Luc; ZHANG, Haibo; SCHIETTECATTE, Johan; SMITZ, Johan; VINCENT, Jean-Louis. Cortisol is an associated-risk factor of brain dysfunction in patients with severe sepsis and septic shock. **BioMed research international**, [S. I.], v. 2014, p. 712742–712742, 2014. DOI: 10.1155/2014/712742.

NOOH, Mohammed M.; MANCARELLA, Salvatore; BAHOUTH, Suleiman W. Novel Paradigms Governing β_1 -Adrenergic Receptor Trafficking in Primary Adult Rat Cardiac Myocytes. **Molecular Pharmacology**, [S. I.], v. 94, n. 2, p. 862, 2018. DOI: 10.1124/mol.118.112045.

OU, Shuo-Ming; CHU, Hsi; CHAO, Pei-Wen; LEE, Yi-Jung; KUO, Shu-Chen; CHEN, Tzeng-Ji; TSENG, Ching-Min; SHIH, Chia-Jen; CHEN, Yung-Tai. Long-Term Mortality and Major Adverse Cardiovascular Events in Sepsis Survivors. A Nationwide Population-based Study. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, [S. I.], v. 194, n. 2, p. 209–217, 2016. DOI: 10.1164/rccm.201510-2023OC.

PALLET, Nicolas. Neutrophil Extracellular Traps Orchestrate Necroinflammation. **Journal of the American Society of Nephrology : JASN**, [S. I.], v. 28, n. 6, p. 1670–1672, 2017. DOI: 10.1681/ASN.2017010064.

POBER, Jordan S.; SESSA, William C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, [S. I.], v. 7, n. 10, p. 803–815, 2007. DOI: 10.1038/nri2171.

POTZ, Brittany A.; SELLKE, Frank W.; ABID, M. Ruhul. Endothelial ROS and Impaired Myocardial Oxygen Consumption in Sepsis-induced Cardiac Dysfunction. **Journal of intensive and critical care**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 20, 2016. DOI: 10.21767/2471-8505.100020.

POWELL, C. E.; SLATER, I. H.; LECOMPTE, Lester; WADDELL, James E. BLOCKING OF INHIBITORY ADRENERGIC RECEPTORS BY A DICHLORO ANALOG OF ISOPROTERENOL. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S. l.], v. 122, n. 4, p. 480, 1958.

PRAUCHNER, Carlos André. Oxidative stress in sepsis: Pathophysiological implications justifying antioxidant co-therapy. **Burns**, [S. l.], v. 43, n. 3, p. 471–485, 2017. DOI: 10.1016/j.burns.2016.09.023.

PUPO, André S.; DUARTE, Diego A.; LIMA, Vanessa; TEIXEIRA, Larissa B.; PARREIRAS-E-SILVA, Lucas T.; COSTA-NETO, Claudio M. Recent updates on GPCR biased agonism. **Pharmacological research**, Netherlands, v. 112, p. 49–57, 2016. DOI: 10.1016/j.phrs.2016.01.031.

QIAO, Guanxi; BUCSEK, Mark J.; WINDER, Nicolette M.; CHEN, Minhui; GIRIDHARAN, Thejaswini; OLEJNICZAK, Scott H.; HYLANDER, Bonnie L.; REPASKY, Elizabeth A. β -Adrenergic signaling blocks murine CD8(+) T-cell metabolic reprogramming during activation: a mechanism for immunosuppression by adrenergic stress. **Cancer immunology, immunotherapy : CII**, [S. l.], v. 68, n. 1, p. 11–22, 2019. DOI: 10.1007/s00262-018-2243-8.

QUINTANO NEIRA, Ricardo Alfredo; HAMACHER, Silvio; JAPIASSÚ, André Miguel. Epidemiology of sepsis in Brazil: Incidence, lethality, costs, and other indicators for Brazilian Unified Health System hospitalizations from 2006 to 2015. **PloS one**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. e0195873–e0195873, 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0195873.

RAM, C. Venkata S. Beta-Blockers in Hypertension. **American Journal of Cardiology**, [S. l.], v. 106, n. 12, p. 1819–1825, 2010. DOI: 10.1016/j.amjcard.2010.08.023.

REGNIER, B.; SAFRAN, D.; CARLET, J.; TEISSEIRE, B. Comparative haemodynamic effects of dopamine and dobutamine in septic shock. **Intensive Care Med**, [S. l.], v. 5, n. 3, p. 115–120, 1979. DOI: 10.1007/bf01683192.

RHEE, Chanu et al. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. **JAMA**, [S. l.], v. 318, n. 13, p. 1241–1249, 2017. DOI: 10.1001/jama.2017.13836.

RHODES, Andrew et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 45, n. 3, 2017. Disponível em: https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2017/03000/Surviving_Sepsis_Campaign__International.15.aspx.

RITTIRSCH, Daniel; HUBER-LANG, Markus S.; FLIERL, Michael A.; WARD, Peter A. Immunodissection of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009. DOI: 10.1038/nprot.2008.214.

RODRIGUES, W. F.; MADEIRA, M. F. M.; DA SILVA, T. A.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; MIGUEL, C. B.; DIAS-DA-SILVA, V. J.; BARBOSA-NETO, O.; LOPES, A. H.; NAPIMOGA, M. H. Low dose of propranolol down-modulates bone resorption by inhibiting inflammation and

osteoclast differentiation. **British journal of pharmacology**, [S. l.], v. 165, n. 7, p. 2140–2151, 2012. DOI: 10.1111/j.1476-5381.2011.01686.x.

ROSENSTEIN, Patricia G.; TENNENT-BROWN, Brett S.; HUGHES, Dez. Clinical use of plasma lactate concentration. Part 1: Physiology, pathophysiology, and measurement. **Journal of veterinary emergency and critical care (San Antonio, Tex. : 2001)**, United States, v. 28, n. 2, p. 85–105, 2018. DOI: 10.1111/vec.12708.

ROTTER, Anita; DE OLIVEIRA, Zilda Najjar Prado. Infantile hemangioma: pathogenesis and mechanisms of action of propranolol. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, [S. l.], v. 15, n. 12, p. 1185–1190, 2017. DOI: 10.1111/ddg.13365.

RUDD, Kristina E. et al. Global, regional, and national sepsis incidence and mortality, 1990-2017: analysis for the Global Burden of Disease Study. **Lancet (London, England)**, [S. l.], v. 395, n. 10219, p. 200–211, 2020. DOI: 10.1016/S0140-6736(19)32989-7.

SAKAI, Mari; SUZUKI, Tokiko; TOMITA, Kengo; YAMASHITA, Shigeyuki; PALIKHE, Sailesh; HATTORI, Kohshi; YOSHIMURA, Naoki; MATSUDA, Naoyuki; HATTORI, Yuichi. Diminished responsiveness to dobutamine as an inotrope in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis: attribution to phosphodiesterase 4 upregulation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 312, n. 6, p. H1224–H1237, 2017. a. DOI: 10.1152/ajpheart.00828.2016.

SAKAI, Mari; SUZUKI, Tokiko; TOMITA, Kengo; YAMASHITA, Shigeyuki; PALIKHE, Sailesh; HATTORI, Kohshi; YOSHIMURA, Naoki; MATSUDA, Naoyuki; HATTORI, Yuichi. Diminished responsiveness to dobutamine as an inotrope in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis: attribution to phosphodiesterase 4 upregulation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, [S. l.], v. 312, n. 6, p. H1224–H1237, 2017. b. DOI: 10.1152/ajpheart.00828.2016.

SANDOVAL, Yader et al. Rapid Rule-Out of Acute Myocardial Injury Using a Single High-Sensitivity Cardiac Troponin I Measurement. **Clinical Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 1, p. 369–376, 2017. DOI: 10.1373/clinchem.2016.264523.

SANFILIPPO, Filippo; CORREDOR, Carlos; FLETCHER, Nick; LANDESBURG, Giora; BENEDETTO, Umberto; FOEX, Pierre; CECCONI, Maurizio. Diastolic dysfunction and mortality in septic patients: a systematic review and meta-analysis. **Intensive Care Medicine**, [S. l.], v. 41, n. 6, p. 1004–1013, 2015. DOI: 10.1007/s00134-015-3748-7.

SANTOS, Sidnéia S.; CARMO, Amanda M.; BRUNIALTI, Milena K. C.; MACHADO, Flavia R.; AZEVEDO, Luciano C.; ASSUNÇÃO, Murillo; TREVELIN, Sílvia C.; CUNHA, Fernando Q.; SALOMAO, Reinaldo. Modulation of monocytes in septic patients: preserved phagocytic activity, increased ROS and NO generation, and decreased production of inflammatory cytokines. **Intensive care medicine experimental**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 5–5, 2016. DOI: 10.1186/s40635-016-0078-1.

SCHMIDT, Christoph; KURT, Birgül; HÖCHERL, Klaus; BUCHER, Michael. INHIBITION OF NF- κ B ACTIVITY PREVENTS DOWNREGULATION OF α 1-ADRENERGIC RECEPTORS AND CIRCULATORY FAILURE DURING CLP-INDUCED SEPSIS. **Shock**, [S. l.], v. 32, n. 3, 2009. Disponível em: https://journals.lww.com/shockjournal/Fulltext/2009/09000/INHIBITION_OF_NF__B_ACTIVITY_PREVENTS.2.aspx.

SCHMITTINGER, Christian A.; DÜNSER, Martin W.; HALLER, Maria; ULMER, Hanno; LUCKNER, Günter; TORGERSEN, Christian; JOCHBERGER, Stefan; HASIBEDER, Walter R. Combined milrinone and enteral metoprolol therapy in patients with septic myocardial depression. **Critical care (London, England)**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. R99–R99, 2008. DOI: 10.1186/cc6976.

SHAO, Shu-Li; CONG, Hai-Yan; WANG, Ming-Yi; LIU, Peng. The diagnostic roles of neutrophil in bloodstream infections. **Immunobiology**, [S. l.], v. 225, n. 1, p. 151858, 2020. DOI: 10.1016/j.imbio.2019.10.007.

SHAPOURI-MOGHADDAM, Abbas et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 2018. DOI: 10.1002/jcp.26429.

SIM, Doo Sun et al. Effect of Low-Dose Nebivolol in Patients with Acute Myocardial Infarction: A Multi-Center Observational Study. **Chonnam medical journal**, [S. l.], v. 56, n. 1, p. 55–61, 2020. DOI: 10.4068/cmj.2020.56.1.55.

SINGER, Mervyn. The role of mitochondrial dysfunction in sepsis-induced multi-organ failure. **Virulence**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 66–72, 2014. DOI: 10.4161/viru.26907.

SINGER, Mervyn et al. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **JAMA**, [S. l.], v. 315, n. 8, p. 801–810, 2016. DOI: 10.1001/jama.2016.0287.

SNAVELY, M. D.; ZIEGLER, M. G.; INSEL, P. A. A new approach to determine rates of receptor appearance and disappearance in vivo. Application to agonist-mediated down-regulation of rat renal cortical beta 1- and beta 2-adrenergic receptors. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 19, 1985.

STELZLE, Dominik; SHAH, Anoop S. V.; ANAND, Atul; STRACHAN, Fiona E.; CHAPMAN, Andrew R.; DENVIR, Martin A.; MILLS, Nicholas L.; MCALLISTER, David A. High-sensitivity cardiac troponin I and risk of heart failure in patients with suspected acute coronary syndrome: a cohort study. **European heart journal. Quality of care & clinical outcomes**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 36–42, 2018. DOI: 10.1093/ehjqcco/qcx022.

STRATTON, LEEANNE; BERLIN, David A.; ARBO, John E. Vasopressors and Inotropes in Sepsis. **Severe Sepsis Care in the Emergency Department**, [S. l.], v. 35, n. 1, p. 75–91, 2017. DOI: 10.1016/j.emc.2016.09.005.

STRAUB, Rainer H.; CUTOLO, Maurizio. Glucocorticoids and chronic inflammation. **Rheumatology**, [S. l.], v. 55, n. suppl_2, p. ii6–ii14, 2016. DOI: 10.1093/rheumatology/kew348.

SU, Wen-Lin; SHUI, Hao-Ai; LAN, Chou-Chin; YANG, Mei-Chen; HSIEH, Chien-An; JANG, Shih-Jung; CHUNG, Hsueh-Wen; WU, Yao-Kuang. Cardiovascular Parameters Associated With Troponin I as Indicators for 14-Day Mortality in Patients With Septic Shock. **The American Journal of the Medical Sciences**, [S. l.], v. 356, n. 3, p. 244–253, 2018. DOI: 10.1016/j.amjms.2018.05.008.

TABAH, Alexis et al. Characteristics and determinants of outcome of hospital-acquired bloodstream infections in intensive care units: the EUROBACT International Cohort Study. **Intensive Care Medicine**, [S. l.], v. 38, n. 12, p. 1930–1945, 2012. DOI: 10.1007/s00134-012-2695-9.

TANG, C.; LIU, M. S. Initial externalization followed by internalization of beta-adrenergic receptors in rat heart during sepsis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 270, n. 1, p. R254–R263, 1996. DOI: 10.1152/ajpregu.1996.270.1.R254.

TANG, Chaoshu; YANG, Jung; WU, Li-Ling; DONG, Lin-Wang; LIU, Maw-Shung. Phosphorylation of β -adrenergic receptor leads to its redistribution in rat heart during sepsis. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, [S. l.], v. 274, n. 4, p. R1078–R1086, 1998. DOI: 10.1152/ajpregu.1998.274.4.R1078.

TANK, A. William; LEE WONG, Dona. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. **Comprehensive Physiology**, United States, v. 5, n. 1, p. 1–15, 2015. DOI: 10.1002/cphy.c140007.

TEOH, Jian-Peng; BAYOUMI, Ahmed S.; AONUMA, Tatsuya; XU, Yanyan; JOHNSON, John A.; SU, Huabo; WEINTRAUB, Neal L.; TANG, Yaoliang; KIM, Il-Man. β -arrestin-biased agonism of β -adrenergic receptor regulates Dicer-mediated microRNA maturation to promote cardioprotective signaling. **Journal of molecular and cellular cardiology**, [S. l.], v. 118, p. 225–236, 2018. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2018.04.001.

THANGAMALAI, Ramasamy et al. Atorvastatin prevents sepsis-induced downregulation of myocardial β 1-adrenoceptors and decreased cAMP response in mice. **Shock (Augusta, Ga.)**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 406–412, 2014. DOI: 10.1097/shk.0000000000000138.

THAZHATH, Sony S. et al. Acute effects of the glucagon-like peptide-1 receptor agonist, exenatide, on blood pressure and heart rate responses to intraduodenal glucose infusion in type 2 diabetes. **Diabetes and Vascular Disease Research**, [S. l.], v. 14, n. 1, p. 59–63, 2016. DOI: 10.1177/1479164116666761.

TIAN, Xufan; KANG, Dong Soo; BENOVIC, Jeffrey L. β -arrestins and G protein-coupled receptor trafficking. **Handbook of experimental pharmacology**, [S. l.], v. 219, p. 173–186, 2014. DOI: 10.1007/978-3-642-41199-1_9.

TSAI, Chia-Ti et al. TNF- α down-regulates sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase expression and leads to left ventricular diastolic dysfunction through binding of NF- κ B to promoter response element. **Cardiovascular research**, England, v. 105, n. 3, p. 318–329, 2015. DOI: 10.1093/cvr/cvv008.

UNGER, Martin et al. Landiolol in patients with septic shock resident in an intensive care unit (LANDI-SEP): study protocol for a randomized controlled trial. **Trials**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 637–637, 2018. DOI: 10.1186/s13063-018-3024-6.

VAIL, Emily; GERSHENGORN, Hayley B.; HUA, May; WALKEY, Allan J.; RUBENFELD, Gordon; WUNSCH, Hannah. Association Between US Norepinephrine Shortage and Mortality Among Patients With Septic Shock. **JAMA**, United States, v. 317, n. 14, p. 1433–1442, 2017. DOI: 10.1001/jama.2017.2841.

VAN DER WESTHUIZEN, Emma T.; BRETON, Billy; CHRISTOPOULOS, Arthur; BOUVIER, Michel. Quantification of Ligand Bias for Clinically Relevant β_2 -Adrenergic Receptor Ligands: Implications for Drug Taxonomy. **Molecular Pharmacology**, [S. l.], v. 85, n. 3, p. 492, 2014. DOI: 10.1124/mol.113.088880.

VAN LEEUWENHOEK, Anthony; HOOLE, S. The select works of Anthony Van Leeuwenhoek, containing his microscopical discoveries in many of the works of nature. *In: Gale ECCO*. [s.l.: s.n.]. v. 1.

VELMURUGAN, Bharath Kumar; BASKARAN, Rathinasamy; HUANG, Chih-Yang. Detailed insight on β -adrenoceptors as therapeutic targets. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 117, p. 109039, 2019. DOI: 10.1016/j.biopha.2019.109039.

VOLZ-ZANG, C.; ECKRICH, B.; JAHN, P.; SCHNEIDROWSKI, B.; SCHULTE, B.; PALM, D. Esmolol, an ultrashort-acting, selective β_1 -adrenoceptor antagonist: pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. **European Journal of Clinical Pharmacology**, [S. l.], v. 46, n. 5, p. 399–404, 1994. DOI: 10.1007/BF00191900.

WALLEY, Keith R. New Approaches to Modifying Inotropy in Sepsis-Induced Myocardial Dysfunction*. **Critical Care Medicine**, [S. l.], v. 45, n. 4, 2017. Disponível em: https://journals.lww.com/ccmjournal/Fulltext/2017/04000/New_Approaches_to_Modifying_Inotrop_y_in.30.aspx.

WALTERS, G.; MCGOWAN, G. K. USE OF NORADRENALINE IN HYPOTENSIVE STATES COMPLICATING BACTERIAL INFECTION. **Originally published as Volume 2, Issue 7353**, [S. l.], v. 284, n. 7353, p. 225–227, 1964. DOI: 10.1016/S0140-6736(64)90181-3.

WANG, Jialu; HANADA, Kenji; STAUS, Dean P.; MAKARA, Michael A.; DAHAL, Giri Raj; CHEN, Qiang; AHLES, Andrea; ENGELHARDT, Stefan; ROCKMAN, Howard A. Gai is required for carvedilol-induced β_1 adrenergic receptor β -arrestin biased signaling. **Nature Communications**, [S. l.], v. 8, n. 1, p. 1706, 2017. a. DOI: 10.1038/s41467-017-01855-z.

WANG, Longqiong et al. Selenium Pretreatment Alleviated LPS-Induced Immunological Stress Via Upregulation of Several Selenoprotein Encoding Genes in Murine RAW264.7 Cells. **Biological Trace Element Research**, [S. l.], v. 186, n. 2, p. 505–513, 2018. DOI: 10.1007/s12011-018-1333-y.

WANG, Lu et al. GDF3 Protects Mice against Sepsis-Induced Cardiac Dysfunction and Mortality by Suppression of Macrophage Pro-Inflammatory Phenotype. **Cells**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 120, 2020. DOI: 10.3390/cells9010120.

WANG, Qingtong et al. Inhibiting Insulin-Mediated β_2 -Adrenergic Receptor Activation Prevents Diabetes-Associated Cardiac Dysfunction. **Circulation**, [S. l.], v. 135, n. 1, p. 73–88, 2017. b. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.022281.

WEI, Chaojie; LOUIS, Huguette; SCHMITT, Margaux; ALBUISSON, Eliane; ORLOWSKI, Sophie; LEVY, Bruno; KIMMOUN, Antoine. Effects of low doses of esmolol on cardiac and vascular function in experimental septic shock. **Critical care (London, England)**, [S. l.], v. 20, n. 1, p. 407–407, 2016. DOI: 10.1186/s13054-016-1580-2.

WEN, Lingling; XU, Liangyin. The efficacy of dopamine versus epinephrine for pediatric or neonatal septic shock: a meta-analysis of randomized controlled studies. **Italian journal of pediatrics**, [S. l.], v. 46, n. 1, p. 6–6, 2020. DOI: 10.1186/s13052-019-0768-x.

WIGGERS, Carl J. Myocardial depression in shock: A survey of cardiodynamic studies. **American Heart Journal**, [S. l.], v. 33, n. 5, p. 633–650, 1947. DOI: 10.1016/0002-8703(47)90079-3.

WISLER, James W.; DEWIRE, Scott M.; WHALEN, Erin J.; VIOLIN, Jonathan D.; DRAKE, Matthew T.; AHN, Seungkirl; SHENOY, Sudha K.; LEFKOWITZ, Robert J. A unique mechanism of β -blocker action: Carvedilol stimulates β -arrestin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 104, n. 42, p. 16657, 2007. a. DOI: 10.1073/pnas.0707936104.

WISLER, James W.; DEWIRE, Scott M.; WHALEN, Erin J.; VIOLIN, Jonathan D.; DRAKE, Matthew T.; AHN, Seungkirl; SHENOY, Sudha K.; LEFKOWITZ, Robert J. A unique mechanism of β -blocker action: Carvedilol stimulates β -arrestin signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 104, n. 42, p. 16657, 2007. b. DOI: 10.1073/pnas.0707936104.

WITHEROW, D. Scott; GARRISON, Tiffany Runyan; MILLER, William E.; LEFKOWITZ, Robert J. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 101, n. 23, p. 8603–8607, 2004. DOI: 10.1073/pnas.0402851101.

WOLLMAN, Adam J. M.; NUDD, Richard; HEDLUND, Erik G.; LEAKE, Mark C. From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope. **Open biology**, [S. l.], v. 5, n. 4, p. 150019–150019, 2015. DOI: 10.1098/rsob.150019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global Health Estimates 2016: death by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2016**. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>. Acesso em: 25 fev. 2020.

WU, Huaxun et al. β 2-adrenoceptor signaling reduction in dendritic cells is involved in the inflammatory response in adjuvant-induced arthritic rats. **Scientific reports**, [S. l.], v. 6, p. 24548–24548, 2016. DOI: 10.1038/srep24548.

WU, Jing-Jing; YANG, Yang; PENG, Wen-Ting; SUN, Jia-Chang; SUN, Wu-Yi; WEI, Wei. G protein-coupled receptor kinase 2 regulating β 2-adrenergic receptor signaling in M2-polarized macrophages contributes to hepatocellular carcinoma progression. **OncoTargets and therapy**, [S. l.], v. 12, p. 5499–5513, 2019. DOI: 10.2147/OTT.S209291.

XIA, Peng; LIU, Yuening; CHENG, Zhaokang. Signaling Pathways in Cardiac Myocyte Apoptosis. **BioMed research international**, [S. l.], v. 2016, p. 9583268–9583268, 2016. DOI: 10.1155/2016/9583268.

YAMASHITA, Shigeyuki et al. Cardioprotective and functional effects of levosimendan and milrinone in mice with cecal ligation and puncture-induced sepsis. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, [S. l.], v. 391, n. 9, p. 1021–1032, 2018. DOI: 10.1007/s00210-018-1527-z.

YANG, Fei; ZHAO, Li Na; SUN, Yi; CHEN, Zhuang. Levosimendan as a new force in the treatment of sepsis-induced cardiomyopathy: mechanism and clinical application. **The Journal of international medical research**, [S. l.], v. 47, n. 5, p. 1817–1828, 2019. DOI: 10.1177/0300060519837103.

YAO, Xiao; CARLSON, Deborah; SUN, Yuxiao; MA, Lisha; WOLF, Steven E.; MINEI, Joseph P.; ZANG, Qun S. Mitochondrial ROS Induces Cardiac Inflammation via a Pathway through mtDNA Damage in a Pneumonia-Related Sepsis Model. **PloS one**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. e0139416–e0139416, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0139416.

ZANELATTO, F. B.; DIAS, E. V.; TEIXEIRA, J. M.; SARTORI, C. R.; PARADA, C. A.; TAMBELLI, C. H. Anti-inflammatory effects of propranolol in the temporomandibular joint of female rats and its contribution to antinociceptive action. **European Journal of Pain**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 572–582, 2018. DOI: 10.1002/ejp.1143.

ZHANG, Qin; RAOOF, Mustafa; CHEN, Yu; SUMI, Yuka; SURSAL, Tolga; JUNGER, Wolfgang; BROHI, Karim; ITAGAKI, Kiyoshi; HAUSER, Carl J. Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury. **Nature**, [S. l.], v. 464, n. 7285, p. 104–107, 2010. DOI: 10.1038/nature08780.

ZHAO, Zhan et al. A novel role of NLRP3-generated IL-1 β in the acute-chronic transition of peripheral lipopolysaccharide-elicited neuroinflammation: implications for sepsis-associated neurodegeneration. **Journal of neuroinflammation**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 64–64, 2020. DOI: 10.1186/s12974-020-1728-5.

ZHE, Zhai; HONGYUAN, Bi; WENJUAN, Qiao; PENG, Wang; XIAOWEI, Liu; YAN, Gao. Blockade of glutamate receptor ameliorates lipopolysaccharide-induced sepsis through regulation of neuropeptides. **Bioscience reports**, [S. l.], v. 38, n. 3, p. BSR20171629, 2018. DOI: 10.1042/BSR20171629.

ZHENG, Zhibo et al. Enhanced Glycolytic Metabolism Contributes to Cardiac Dysfunction in Polymicrobial Sepsis. **The Journal of infectious diseases**, [S. l.], v. 215, n. 9, p. 1396–1406, 2017. DOI: 10.1093/infdis/jix138.

ZHOU, Yu et al. MicroRNA-155 attenuates late sepsis-induced cardiac dysfunction through JNK and β -arrestin 2. **Oncotarget**, [S. l.], v. 8, n. 29, p. 47317–47329, 2017. DOI: 10.18632/oncotarget.17636.

ZOU, Lifang et al. Downregulation of P2Y₁₂ in the superior cervical ganglia alleviates abnormal sympathetic activity after myocardial ischemia. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 233, n. 4, p. 3375–3383, 2018. DOI: 10.1002/jcp.26184.