**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

LUÍS HENRIQUE ANGENENDT DA COSTA

**Avaliação do comprometimento hipotalâmico na secreção de
vasopressina durante a sepse**

**RIBEIRÃO PRETO
2015**

LUIS HENRIQUE ANGENENDT DA COSTA

Avaliação do comprometimento hipotalâmico na secreção de
vasopressina durante a sepse

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Neurologia
(Subárea: Neurociências)

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria José Alves
da Rocha

RIBEIRÃO PRETO

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Costa, Luis Henrique Angenendt da

Avaliação do comprometimento hipotalâmico na secreção de vasopressina durante a sepse. Ribeirão Preto, 2015.

68 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Neurologia.

Orientador: Rocha, Maria José Alves da

1. Sepse. 2. Vasopressina. 3. Microglia. 4. Neuroinflamação. 5. Apoptose.

Nome: COSTA, Luis Henrique Angenendt da

Título: Avaliação do comprometimento hipotalâmico na secreção de vasopressina durante a sepse

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Aos meus pais **Aldo** e **Rosana**, que me mostram que na simplicidade é que está o verdadeiro amor.

Àquele e/ou àquilo que nos dá força, esperança e coragem para tornar o mundo e nós mesmos melhores.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a Dr^a Maria José Alves da Rocha (Majô) pela orientação, confiança, atenção, ajuda e oportunidades que me ofereceu durante o mestrado. Meu sincero agradecimento!

Ao Prof. Fabrice Chrétien que me recebeu para estágio em seu laboratório no Institute Pasteur (Paris, França) e ao Prof. Tarek Sharshar por ter mediado o intercâmbio entre nossos grupos de pesquisa.

À Nadir, pela amizade, cafés e auxílio técnico nos experimentos.

Aos atuais e antigos colegas do Laboratório de Neuroimunoendocrinologia (FORP/USP): Aline, Fábio, Gabi, Juliana, Josi, Letycia, Luanne, Lucas, Marcelo, Mari, Paulo, Rodrigo, Tati e especialmente ao Caique e Nilton pela amizade, auxílio nos experimentos e partilha de angústias e risadas.

A todos da Unité d'Histopathologie Humaine et Modèles Animaux (Institute Pasteur), em especial ao Aurélien, Rafael e Patrícia por me receberem com amizade e abertos à troca de conhecimento.

Aos velhos e novos amigos: Dálit, Diego, Duh, Cintia, Fabrício, Igor, João, Max, Mônica, Pothó e Tila por me acompanharem pacientemente e compensarem o peso da caminhada com momentos alegres.

Aos animais que, com suas vidas, possibilitaram a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Eu disse a uma amiga:

- A vida sempre super exigiu de mim.

Ela disse:

-Mas lembre-se de que você também super exige da vida.

Sim.

Clarice Lispector

É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.'

Theodore Roosevelt

RESUMO

COSTA, L. H. A. **Avaliação do comprometimento hipotalâmico na secreção de vasopressina durante a sepse**. 2015. 68f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2015.

Sepse e suas complicações (sepse grave e choque séptico) ainda são a principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva em todo o mundo. Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado que na fase inicial da sepse a concentração plasmática de arginina vasopressina (AVP) está elevada. No entanto, durante o processo fisiopatológico os níveis plasmáticos da mesma permanecem inadequadamente baixos, apesar de haver hipotensão persistente. Uma das hipóteses sugeridas para essa deficiência relativa de AVP é a apoptose de neurônios vasopressinérgicos. Nosso objetivo foi identificar elementos envolvidos na morte celular hipotalâmica, além de avaliar o comportamento de células gliais e da barreira hematoencefálica (BHE) durante a sepse. Ratos Wistar foram submetidos à sepse por ligadura e punção cecal (CLP) ou não manipulados (naive) como controle e então divididos em dois grupos. No primeiro, foram perfundidos e os cérebros coletados para imunohistoquímica. Outro grupo foi decapitado para a retirada de sangue para dosagem de interferon- gama (IFN- γ) e encéfalo para análise da expressão de proteínas no hipotálamo ou nos núcleos supraópticos (SON) e paraventriculares (PVN). Um terceiro foi separado para investigação da permeabilidade da BHE. Apesar de aumento da imunomarcagem de CD8 e MHC-I no SON dos animais sépticos, não encontramos indícios de morte celular mediada por células imunes. No SON e PVN de animais sépticos, a expressão de fatores envolvidos na ativação da via extrínseca de apoptose (tBID, caspase-8 clivada) se manteve inalterada, enquanto fatores anti-apoptóticos relacionados à via intrínseca (BCL-2, BCL-xL) estavam diminuídos no hipotálamo. No SON destes animais a micróglia assumiu uma morfologia associada à sua ativação, concomitante com o aumento plasmático de IFN- γ . Houve rompimento transitório da BHE no hipotálamo após 6 horas do CLP. Os resultados indicam que a via intrínseca de apoptose parece ser a responsável pela morte celular que é observada nos núcleos vasopressinérgicos e essa condição está temporalmente associada à ativação microglial e rompimento da BHE.

Palavras chave: apoptose, micróglia, barreira hematoencefálica, núcleo supraóptico

ABSTRACT

COSTA, L. H. A. **Evaluation of hypothalamic impairment in vasopressin secretion during sepsis**. 2015. 68f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2015.

Sepsis and its complications (severe sepsis and septic shock) remain as the main cause of death in intensive care units worldwide. Clinical and experimental studies have shown that in the early phase of sepsis the plasma concentration of arginine vasopressin (AVP) is increased. However, during the pathophysiological process the plasma levels remain inadequately low, despite of persistent hypotension. One of the hypothesis suggested for this relative deficiency is the apoptosis of vasopressinergic neurons. Our objective was to identify elements involved in the hypothalamic cellular death and evaluate the modifications of glial cells and blood-brain-barrier (BBB) during sepsis. Wistar rats were submitted to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP) or non-manipulated (naïve), as control and then divided in two groups. In the first one, they were perfused and brains were collected for immunohistochemistry. In another one they were decapitated for blood collection and further plasma interferon-gama (IFN- γ) analysis by ELISA. Brain was also collected for apoptosis-related proteins expression analysis in the hypothalamus or in the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei. A third set was separated for the investigation of BBB permeability. Despite of increased immunostaining for CD8 and MHC-I in the SON of septic animals, we did not find evidence of cell death mediated by immune cells. In the SON and PVN of septic animals, the expression of proteins involved in the activation of the extrinsic apoptosis pathway (tBID, cleaved caspase-8) was not altered, whereas anti-apoptotic factors related to the intrinsic pathway (BCL-2, BCL-xL) were decreased. In the SON of these animals, microglia assumed a morphology related to its activation, associated with the increase of plasma IFN- γ . There was a transitory breakdown of BBB in hypothalamus after 6 hours following CLP. The results indicate that the intrinsic apoptosis pathway seems to be responsible for the cell death observed in vasopressinergic nuclei and this condition is temporally associated with microglial activation and BBB leaking.

Keywords: apoptosis, microglia, blood-brain barrier, supraoptic nucleus

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Vias intrínseca e extrínseca de apoptose.....	21
Figura 2- Apoptose mediada por células imunes	22
Figura 3- Protocolo experimental.....	31
Figura 4- Foto da superfície ventral de cérebro de rato.....	34
Figura 5- Imunoreatividade para CD8 no SON e PVN	39
Figura 6- Imunoreatividade para CD8 no hipotálamo	40
Figura 7- Imunoreatividade para MHC-I no SON.....	41
Figura 8- Expressão de CD8 no hipotálamo.....	43
Figura 9- Expressão de granzima B no hipotálamo.....	43
Figura 10- Expressão de perforina no hipotálamo.....	43
Figura 11- Expressão de caspase-8 clivada no SON e PVN.....	43
Figura 12- Expressão de tBID clivada no SON e PVN	44
Figura 13- Expressão de BCL-2 no hipotálamo.....	44
Figura 14- Expressão de BCL-xL no hipotálamo	45
Figura 15- Imunoreatividade para HIF -1 α no SON	45
Figura 16- Imunoreatividade para GFAP no SON	46
Figura 17- Expressão de GFAP no hipotálamo	47
Figura 18- Imunofluorescência para IBA-1 no SON	48
Figura 19- Avaliação da permeabilidade da BHE	49
Figura 20- Níveis plasmáticos de interferon-gama	49

LISTA DE SIGLAS

APC- Célula apresentadora de antígeno

AVP- Arginina Vasopressina

ATP- Adenosina trifosfato

BHE- Barreira hematoencefálica

CD- *Cluster of differentiation*

CLP- *Cecal Ligation and Puncture*

DNA- Ácido desoxirribonucleico

ELISA- *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

EPM- Erro padrão da média

FADD- *Fas associated death domain*

GFAP- *Glial fibrillary acidic protein*

HIF- *Hypoxia- inducible factor*

IFN- γ - Interferon-gama

IBA-1- *Ionized calcium binding adaptor molecule 1*

IL- Interleucina

ILAS- Instituto Latino Americano de Sepsis

LT- Leucotrieno

MHC- Complexo principal de histocompatibilidade

MMP- Metaloproteinase de matriz

NADPH- Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato reduzido

NGF- Fator de crescimento do nervo

NO- Óxido nítrico

NOS_e- Óxido nítrico sintase endotelial

NOS_i- Óxido nítrico sintase induzida

NOS_n- Óxido nítrico sintase neuronal

NOS_{mt}- Óxido nítrico sintase mitocondrial

OVLT- *Organum vasculosum laminae terminalis*

PAF- Fator de agregação plaquetária

PG- Prostaglandina

PVN- Núcleo paraventricular

ROS- Espécies reativas de oxigênio

SNC- Sistema nervoso central

SON- Núcleo supraóptico

TBE- Tribromoetanol

tBID- *Trunkated BID*

TNF- α - *Tumor necrosis factor alpha*

TNFR- Receptor para TNF

TRADD- Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain protein

TRAIL- *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Sepses, sepse grave e choque séptico.....	15
1.2 Fisiopatologia da Sepses	15
1.3 Vasopressina (AVP)	17
1.4 Óxido nítrico (NO) e estresse oxidativo	18
1.5 Apoptose	19
1.6 Complexo principal de histocompatibilidade (MHC)	22
1.7 Células gliais	24
1.8 Barreira Hematoencefálica (BHE)	25
 2. OBJETIVOS	 27
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
 3. MATERIAL E MÉTODOS	 29
3.1 Animais	30
3.2 Planejamento experimental	30
3.3 Anestesia e Indução da sepse por “ligadura e punção cecal” (CLP)	31
3.4 Preparo e coleta do tecido cerebral	31
3.5 Imunofluorescência/ Imunohistoquímica	32
3.6 Dissecção de SON, PVN e hipotálamo	33
3.7 Western blot	34
3.8 ELISA	35
3.9 Teste de permeabilidade da barreira hematoencefálica	35
3.10 Análise Estatística	36
 4. RESULTADOS	 37
4.1 Avaliação dos fatores envolvidos nos mecanismos de apoptose	38
4.2 Avaliação das células gliais	45
4.2.1 Astrócitos	46
4.2.2. Micróglia	47
4.3 Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica	48

4.4 Avaliação da concentração plasmática de IFN- γ	49
5. DISCUSSÃO	50
6. CONCLUSÃO	56
REFERÊNCIAS	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sepses, sepse grave e choque séptico

Sepses é definida como uma resposta inflamatória sistêmica resultante de uma complexa interação entre o organismo e um agente infeccioso, como bactérias Gram-negativas ou gram-positivas, fungos, parasitas ou vírus (BONE, 1991; BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992; VINCENT; KORKUT, 2008).

Quando a sepses está associada à hipotensão, hipoperfusão ou disfunção de pelo menos um órgão define-se sepses grave (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992; LEVY et al., 2003). Já a definição de choque séptico se aplica à evolução deste quadro, caracterizado por um estado de falência circulatória aguda com hipotensão arterial não responsiva à reposição volêmica, fazendo-se necessária uma terapia vasopressora para manutenção da pressão arterial a valores estáveis (PARRILLO, 1993; BONE; GRODZIN; BALK, 1997; LEVY et al., 2003). A hipotensão e a hipoperfusão podem alterar as funções normais do organismo, resultando em disfunção e até em completa falência dos órgãos, denominada síndrome de disfunção múltipla de órgãos (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992; LEVY et al., 2003).

Apesar dos avanços terapêuticos consideráveis, a sepses grave e o choque séptico ainda são as maiores causas de mortes em Unidades de Terapia Intensiva em todo o mundo (MARTIN et al., 2003; STOLLER et al., 2015). Esse fato pode estar associado ao envelhecimento da população, ao aumento do número de técnicas cirúrgicas invasivas, da classificação do quadro patológico dentro da terminologia corrente e pelo desconhecimento das medidas interventivas a serem adotadas em cada fase desse complexo processo fisiopatológico.

No Brasil, como na maioria dos países em desenvolvimento, a mortalidade é ainda mais elevada (43,9%, chegando a 57,6% em hospitais públicos) (ILAS, 2015). Adicionalmente, a sepses gera gastos imensos ao sistema de saúde, girando em torno de 24 bilhões de dólares anuais nos Estados Unidos (LAGU et al., 2012). Assim, nota-se o grande problema de saúde pública que é a sepses e destacamos a importância de contínua investigação clínica e experimental dessa condição.

1.2 Fisiopatologia da Sepses

A sepse é uma condição multifatorial dependente da interação de componentes infecciosos, imunológicos, endócrinos, hemodinâmicos, cardiovasculares e até genéticos (HOLMES; RUSSELL; WALLEY, 2003; TRENTZSCH et al., 2003; DE MAIO; TORRES; REEVES, 2005). Estas interações podem levar a uma resposta exacerbada do organismo com produção excessiva de mediadores inflamatórios e consequentes alterações fisiológicas (BONE, 1991; BONE; GRODZIN; BALK, 1997; ANNANE; BELLISSANT; CAVAILLON, 2005). O fator de necrose tumoral α (TNF- α), as interleucinas (IL) 1, IL-6, IL-8, IL-12, óxido nítrico (NO), fator de ativação plaquetária (PAF), leucotrienos (LTs) e prostaglandinas (PGs) são alguns dos mediadores inflamatórios produzidos durante a sepse. Eles apresentam interações complexas, podendo ser sinérgicas ou antagônicas, atuando para aumentar a resposta do hospedeiro à infecção e limitar a inflamação ou romper a homeostase por estimular a produção de outros mediadores. (RIOS-SANTOS et al., 2003).

Esses mediadores liberados excessivamente durante a sepse podem direta ou indiretamente alcançar o sistema nervoso central (SNC) alterando a atividade de neurônios envolvidos em diferentes funções orgânicas, como autonômicas e neuroendócrinas. O eixo hipotálamo-hipófise pode estar comprometido causando as alterações neuroendócrinas (CORRÊA et al., 2007; PANCOTO et al., 2008; ATHAYDE et al., 2009).

Apesar da dificuldade de se estabelecer parâmetros fisiológicos e/ou bioquímicos para estadiar clinicamente o paciente nos diferentes momentos da sepse, é possível dividi-la em dois momentos distintos, nos quais o hormônio arginina vasopressina (AVP) pode atuar como biomarcador (MUTLU; FACTOR, 2004). Estudos clínicos e experimentais relatam uma resposta bifásica na secreção do hormônio durante a sepse, sendo a fase inicial ou fase aguda caracterizada por elevada concentração plasmática de AVP. Com o decorrer do processo fisiopatológico, apesar da significativa queda da pressão arterial, a secreção de AVP diminui e as concentrações permanecem inadequadamente baixas, contribuindo para o choque hipovolêmico (SHARSHAR et al., 2003a; CORRÊA et al., 2007; PANCOTO et al., 2008; ATHAYDE et al., 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009). Algumas hipóteses para a deficiência relativa na secreção de AVP na fase tardia da sepse são: diminuição dos estoques neurohipofisários (SHARSHAR et al., 2002; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009), alteração dos reflexos autonômicos (HOLMES et

al., 2001; PANCOTO et al., 2008), excessiva produção central de NO (SHARSHAR et al., 2003b; GIUSTI-PAIVA; ELIAS; ANTUNES-RODRIGUES, 2005) a apoptose de neurônios vasopressinérgicos (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013; OLIVEIRA-PELEGRIN, BASSO e ROCHA, 2014).

1.3 Vasopressina (AVP)

A AVP, também denominada hormônio antidiurético, é um nonapeptídeo sintetizado nos neurônios magnocelulares dos núcleos supraópticos (SON) e paraventriculares (PVN) do hipotálamo e em agrupamentos de células espalhadas pelo hipotálamo lateral e medial, denominadas núcleos acessórios (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; IOVINO et al., 2012).

Na etapa inicial da síntese de AVP nos núcleos hipotalâmicos ocorre a produção de uma proteína de alto peso molecular denominada pré-pro-AVP. Essa proteína é estruturalmente composta por um peptídeo sinalizador, a AVP propriamente dita, a neurofisina II (um carreador axonal responsável pelo transporte do hormônio dos núcleos até a neurohipófise) e pela copeptina (um glicopeptídeo localizado na porção carboxi-terminal da molécula) (LAND et al., 1982; MORGENTHALER et al., 2006; MORGENTHALER et al., 2007). A pré-pró-AVP é clivada durante o processo de transporte do SON e PVN até a neurohipófise liberando copeptina e AVP na circulação sistêmica. As vesículas neurosecretórias ficam estocadas em dilatações das terminações nervosas na neurohipófise e sofrem exocitose quando uma despolarização se propaga a estes terminais, a partir do hipotálamo, liberando o hormônio e copeptina para circulação em quantidades estequiometricamente iguais (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; MORGENTHALER et al., 2006).

Os estímulos mais potentes para liberação de AVP são o aumento de osmolalidade plasmática, a hipotensão e a hipovolemia (DUNN et al., 1973; KADEKARO et al., 1992). Outros estímulos como aumento de angiotensina II, febre, hipercapnia, endotoxinas, PG, IL-1, catecolaminas e estresse também são capazes de estimular a liberação do hormônio (NAITO et al., 1991; HOLMES et al., 2001). As funções periféricas da AVP são principalmente manter o balanço hidroeletrolítico

(através de canais de aquaporina do ducto coletor renal após ativação de receptores de vasopressina tipo V2) e regular a pressão arterial (por meio de receptores do tipo V1a na musculatura lisa vascular, que leva à vasoconstrição) (FUJIWARA et al., 2012; PARK; KWON, 2015). Outras funções incluem a participação na glicogenólise hepática, agregação plaquetária e coagulação sanguínea (CUNNINGHAM ; SAWCHENKO, 1991).

1.4 Óxido nítrico (NO) e estresse oxidativo

A produção do NO é catalisada pela enzima NO sintase (NOS) que utiliza como precursor a L-arginina e consumindo nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH) e oxigênio (O₂) (PALMER; MONCADA, 1989; FEIHL; WAEBER; LIAUDET, 2001). Existem três isoformas de NOS: a endotelial (NOS_e) e a neuronal (NOS_n), que são constitutivas e dependentes do aumento de cálcio intracelular para a ativação, e a isoforma induzida (NOS_i), ativada principalmente por citocinas. A NOS_i é independente do aumento de cálcio intracelular, menos sensível a auto-inibição por NO do que as isoformas constitutivas e é minimamente encontrada em situações fisiológicas normais dentro do SNC (AMITAI, 2010). Existe ainda a NOS mitocondrial (NOS_{mt}), que é uma isoforma constitutiva derivada de “*splicing*” alternativo da NOS_n e associada à membrana interna da mitocôndria, sendo encontrada em células de fígado, rins, testículos, baço, coração, músculos e cérebro (FEIHL; WAEBER; LIAUDET, 2001).

Na sepse, o grande aumento de NO no SNC, principalmente após ativação da NOS_i, pode influenciar a bioenergética mitocondrial e induzir estados de estresse oxidativo ou “hipóxia metabólica”. A hipóxia leva à expressão e estabilização da subunidade alfa do fator hipóxia-induzido 1 (HIF-1 α) (CHAVEZ et al., 2000; SHARP; BERNAUDIN, 2004; ERUSALIMSKY; MONCADA, 2007). Sua dimerização com HIF-1 β forma o HIF1, que regula a expressão de vários genes relacionados ao metabolismo energético, mas também de genes pró-apoptóticos da família BCL₂ (BRUICK, 2000; SHARP; BERNAUDIN, 2004). O HIF1 também pode ser ativado pelo aumento de citocinas e fatores de crescimento como fator de necrose tumoral α (TNF- α) e IL-1 β (SHARP; BERNAUDIN, 2004). Recentemente, em nosso laboratório

foi demonstrado que durante a sepse há um aumento de IL-1 β e da expressão de NOSi nos SON e PVN do hipotálamo de ratos (OLIVEIRA-PELEGRIN; BASSO; ROCHA, 2014). Consequentemente ocorre o aumento da produção de NO central que desregula a bioenergética mitocondrial, causando o estresse oxidativo e hipóxia metabólica. Este estado, por sua vez, leva ao aumento da expressão do fator induzido por hipóxia 1 (HIF-1) que modula a expressão de genes pró-apoptóticos e ativa a via intrínseca de morte celular programada em neurônios magnocelulares (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013; OLIVEIRA-PELEGRIN; BASSO; ROCHA, 2014).

1.5 Apoptose

Apoptose ou “morte celular programada” possui papel crucial nos processos de embriogênese, no desenvolvimento normal, na manutenção de alguns tecidos adultos onde o curso de renovação celular é por muitas vezes requisitado e na resposta imune quando as células do organismo sofrem algum tipo de lesão causada por doenças ou agentes nocivos (RAFF *et al.*, 1993; ELMORE, 2007).

A apoptose é dependente de adenosina trifosfato (ATP) e pode ocorrer por diversos mecanismos que dependerão do equilíbrio de proteínas pró e anti-apoptóticas, da variedade de estímulos e do estágio do ciclo celular. O processo de apoptose pode ser iniciado por três principais vias: 1) através da mitocôndria, também chamada via intrínseca 2) por receptor, também conhecida como via extrínseca e 3) por granzimas/perforinas, realizada por linfócitos T CD8⁺ (LT-CD8⁺) e células *natural killers* (NK) (HOTCHKISS et al., 2000; BANTEL; SCHULZE-OSTHOFF, 2009; MEMOS et al., 2009).

A via apoptótica intrínseca, mediada pela caspase-9, é iniciada através da mitocôndria, que tem a capacidade de amplificar os sinais apoptóticos (HOTCHKISS et al., 2000). Após o estresse celular, causado por espécies reativas de oxigênio, radiação e/ou agentes quimioterápicos, proteínas pró-apoptóticas (BAX, BAK, BID e BAD) deslocam-se para a superfície da mitocôndria onde as proteínas anti-apoptóticas (BCL-2 e a Bcl-XL) estão localizadas (HENGARTNER, 2000). O desbalanço e a interação entre proteínas pró e anti-apoptóticas causa perturbação às funções normais das proteínas anti-apoptóticas, levando a alteração da

permeabilidade da membrana mitocondrial externa (HENGARTNER, 2000; OBERHOLZER et al., 2001). Assim, ocorre a liberação de proteínas mitocondriais para o citosol, como o citocromo-c, que interage com uma proteína chamada fator de ativação de protease associada a apoptose 1 (Apaf-1) e pró-caspase-9 formando o apoptossomo, o qual intermediará a clivagem da caspase-3 e consequente morte celular (MIGNOTTE; VAYSSIERE, 1998; GUPTA, 2003).

As caspases pertencem a um grupo de enzimas conhecidas como cisteínas proteases e estão presentes dentro da célula como zimogênios ou pró-formas inativas capazes de reconhecer e clivar substratos que possuam resíduos de aspartato (KOTHAKOTA et al., 1997; SHIOIRI et al., 2009). Estes zimogênios podem ser clivados, tornando-se enzimas ativas que irão clivar outros componentes celulares essenciais, como proteínas estruturais do citoesqueleto e proteínas nucleares. As caspases também podem ativar enzimas degradadoras como a DNase, que cliva o DNA no núcleo (GREEN, 2000; OBERHOLZER et al., 2001).

A via extrínseca de apoptose, também conhecida como via de apoptose mediada por receptor, consiste na sensibilização dos chamados “receptores de morte” (*death receptors*), localizados na superfície celular. Os principais *death receptors* incluem: CD95 (Fas), receptor de fator de necrose tumoral 1 (TNFR1) e receptores TRAIL 1 e 2 (TRAILR-1 e TRAILR-2) (LAVRIK, 2014). Ao serem ativados por seus respectivos ligantes, uma série de processos culmina na formação do *death-inducing signaling complex* (DISC), um agregado de moléculas que inclui os *death domains* ligados aos receptores e morte, uma proteína adaptadora (FADD, TRADD) e uma procaspase (procaspase-8 e -10) (MC GUIRE, BEYAERT e VAN LOO, 2011; FOUQUÉ; DEBURE; LEGEMBRE, 2014). Esse processo culmina na clivagem dessas procaspases para uma forma ativada, que atuam como proteases, ativando a caspase-3 (MC GUIRE; BEYAERT; VAN LOO, 2011).

A via intrínseca da apoptose pode ser ativada pela via extrínseca através da proteína BID. Esta proteína, ao ser clivada pela caspase-8 na cascata da via extrínseca, forma um intermediário chamado *trunkated* BID (tBID) que pode se translocar para a mitocôndria e ativar a oligomerização de proteína BAX na superfície mitocondrial, iniciando a via intrínseca de apoptose (GREEN, 2000).

Figura 1: Figura representando a ativação da via intrínseca (1) e extrínseca (2) de apoptose (HENGARTNER, 2000).

O processo de morte celular também pode ocorrer pela ação de células imunes, quando ocorre a exocitose de grânulos tóxicos por linfócitos citotóxicos (CTL ou LT-CD8⁺) ou células *natural killers* direcionadas às células infectadas ou gravemente lesionadas, em um processo mediado por uma ação sinérgica entre granzimas e perforinas (BARRY ; BLEACKLEY, 2002). Diversos tipos de granzimas foram identificados, sendo as granzimas A e B as mais relevantes no processo apoptótico. A primeira pode causar a morte celular num processo independente de caspase, clivando o DNA, enquanto a segunda pode desencadear a cascata de ativação de diversas caspases ou ativar diretamente a caspase-3 (EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012). As granzimas B também possuem a capacidade de ativar a

proteína BID, levando a formação de t-BID e consequente ativação da via intrínseca de apoptose (BARRY; BLEACKLEY, 2002; EWEN; KANE; BLEACKLEY, 2012).

Figura 2: Figura representando a via apoptose mediada por células imunes (HENGARTNER, 2000).

Como visto, todas as vias apoptóticas levam a ativação de caspases efetoras, sendo a caspase-3 uma das mais importantes, porém não única e não ubíqua. A ativação da caspase-3 resultará na clivagem de proteínas celulares chaves no processo de apoptose (PORTER; JÄNICKE, 1999; ELMORE, 2007).

1.6 Complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC – *major histocompatibility complex*) é um grupo de genes que codifica suas respectivas glicoproteínas estruturalmente relacionadas, o MHC de classe I (MHC-I) e o MHC de classe II (MHC-II). É considerada uma molécula apresentadora de antígeno, auxiliando na resposta imunológica humoral e celular, sendo componente essencial para a maturação de linfócitos T no timo durante o desenvolvimento das células imunes (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013). O MHC-I está presente em praticamente todas as células nucleadas do nosso organismo e apresenta peptídeos derivados de proteínas sintetizadas endogenamente especificamente para linfócitos T citotóxicos (BLUM; WEARSCH; CRESSWELL, 2013; MINTERN; MACRI; VILLADANGOS, 2015). As moléculas de MHC-II estão presentes principalmente nas células apresentadoras de antígenos (APCs) como células dendríticas, macrófagos e células B e no endotélio vascular. O MHC-II apresenta peptídeos derivados de proteínas sintetizadas exogenamente, estimulando especificamente linfócitos T CD4⁺ (RYAN; COBB, 2012).

Estudo de SCHEIKL et al (2012), utilizando um modelo animal transgênico que expressa um antígeno *self* em todo SNC, mostrou que a introdução de LT-CD8⁺ específicos contra esse antígeno acarretou no comprometimento de magnocélulas hipotalâmicas, resultando em destruição celular e no desenvolvimento de *diabetes insipidus* nesses animais. A análise dessa situação mostrou ocorrer *up-regulation* de moléculas do MHC-I nessas magnocélulas dependente da citocina interferon- γ (IFN- γ).

Outro estudo também mostrou que a injeção intraperitoneal de *Trypanosoma brucei brucei* causou aumento na expressão de MHC-I nos órgãos circunventriculares e nos SON e PVN, causado possivelmente pela ação de citocinas (IL-1, TNF- α) e/ou fatores neurotróficos (fator de crescimento do nervo – NGF) na neurohipófise, enviando sinais retrógrados do terminal axonal para o corpo celular e associada à Infiltração de LT-CD8⁺ nessas regiões (SCHULTZBERG et al., 1989).

Tem sido mostrado que a AVP, mesmo em baixas concentrações, pode mimetizar a função de IL-2 na síntese de IFN- γ em algumas células imunológicas através da estimulação de receptores vasopressinérgicos do tipo V₁ na superfície dessas células, mostrando o efeito imunorregulatório desse hormônio no organismo (JOHNSON; TORRES, 1985). Adicionalmente, a concentração de IFN- γ parece

estar mais aumentada no choque séptico do que na sepse grave (BOZZA et al., 2007). Portanto, o aumento de AVP na fase inicial da sepse poderia ser prejudicial às próprias células que sintetizam o hormônio.

1.7 Células gliais

As células gliais no SNC, também chamada de neuroglia, incluem os astrócitos, micróglia e oligodendrócitos. Inicialmente consideradas apenas como células de suporte para os neurônios, atualmente se sabe que estão envolvidas em inúmeras funções fisiológicas e patológicas cerebrais (LIU; TANG; FENG, 2011).

A micróglia se constitui de células mielóides semelhantes a macrófagos e são a primeira linha de defesa imune frente a patógenos e lesões cerebrais. Sua origem, ao menos em camundongos, parece ser de macrófagos do saco vitelínico que migram para o sistema nervoso central na fase inicial da embriogênese e não da diferenciação de células vindas da hematopoiese na medula óssea e de macrófagos da circulação (SAIJO; GLASS, 2011). Sua ação inflamatória ocorre através da produção de mediadores como prostaglandinas, citocinas, proteases, quimiocinas, fatores de coagulação, reagentes de fase aguda, geradores de radicais livre, inibidores de proteases, anafilotoxinas, integrinas, fatores fibrinolíticos e outras neurotoxinas não identificadas (MCGEER; MCGEER, 2008).

As células gliais, porém, também tem participação na manutenção da homeostase cerebral em situações não-patológicas. Já foi demonstrado seu papel na regulação da neurogênese através da remoção de células progenitoras neurais apoptóticas (CUNNINGHAM; MARTÍNEZ-CERDEÑO; NOCTOR, 2013); na fagocitose de sinapses neuronais fracas ou disfuncionais (SCHAFER et al., 2012; JI et al., 2013); no suporte neuronal através da liberação de fatores tróficos (UENO et al., 2013); na eliminação de células mortas e debris em todo o SNC (TAKAHASHI; ROCHFORD; NEUMANN, 2005), dentre outras funções.

Os astrócitos possuem essa mesma função dual, com importante papel defensivo durante o dano cerebral, mas também atuando na manutenção da homeostase. Estão intimamente relacionados à manutenção da barreira hematoencefálica (WOLBURG et al., 2009), controle do metabolismo e energia local

e sistêmico (HSUCHOU et al., 2009; BOUZIER-SORE; PELLERIN, 2013), além de ter importante função nas sinapses. As células astrocitárias são membros da chamada “sinapse tripartite”, onde igualmente participam da transmissão cerebral junto com os neurônios pré e pós-sinápticos, uma vez que são capazes de liberar transmissores (gliotransmissores) como glutamato (ARAQUE et al., 1999; TASKER et al., 2012) e taurina (CHOE, OLSON e BOURQUE, 2012). De fato, já foi demonstrado por microscopia eletrônica que os astrócitos estão em justaposição com as espinhas dendríticas no SON (HATTON, 2002).

Em situações patológicas envolvendo dano cerebral, os astrócitos podem ser benéficos para a recuperação tecidual, bem como para retardar a lesão, de acordo com a extensão e duração da mesma. O estado reativo dessas células em resposta à injúria é chamado de gliose reativa ou astrogliose. Ao redor da área lesionada, astrócitos reativos podem formar uma barreira física cartilaginosa e firme, que isola a lesão e previne uma resposta inflamatória exacerbada local que poderia levar a um dano ainda mais extenso (FAULKNER et al., 2004). Por outro lado, quando ativadas, essas células também podem se tornar fonte de citocinas e outros mediadores que desencadeiam uma resposta inflamatória prejudicial ao tecido (GORINA et al., 2011; FU et al., 2014; KARVE; TAYLOR; CRACK, 2015).

1.8 Barreira Hematoencefálica (BHE)

A BHE consiste em uma estrutura altamente especializada cuja finalidade é regular a comunicação entre o cérebro e a circulação sistêmica. É formada por diversos tipos celulares: células endoteliais especializadas, astrócitos (projetam suas ramificações na lâmina basal, formando uma barreira), pericitos (ocupam o espaço perivascular, regulando o tônus e reparo vascular e angiogênese), além dos neurônios (projetam suas terminações para a BHE) (TAJES et al., 2014). As células endoteliais da BHE possuem características distintas que fornecem maior restrição na permeabilidade da barreira. Elas são dotadas de estruturas complexas chamadas *tight junctions* (zônulas de oclusão) e *aderens junctions* (junções de aderência), que possuem funções próprias e atuam de maneira sinérgica (TIETZ; ENGELHARDT, 2015). As *tight junctions* regulam a difusão de solutos e íons pela via paracelular através da interação física extracelular de suas três principais proteínas (occludina,

claudina e JAM) (KHAN; ASIF, 2015; TIETZ; ENGELHARDT, 2015). As *aderens junctions* formam um cinturão contínuo de adesão entre células vizinhas, através de glicoproteínas transmembrânicas da superfamília das caderinas (PETTY; LO, 2002; TAJES et al., 2014).

As células da BHE possuem em suas membranas receptores para citocinas, quimiocinas e receptores do tipo *toll*, portanto respondem à presença de moléculas imunoativas (BANKS, 2015). A ação de espécies reativas de oxigênio (ROS), metaloproteinases de matriz (MMP), citocinas pró-inflamatórias, adesão de leucócitos, dentre outros fatores, leva ao aumento da permeabilidade da BHE, através da redução da expressão de proteínas das *tight junctions*, comprometimento no transporte de moléculas, separação de pericitos, perda astrocitárias, rompimento da membrana basal (OBERMEIER; DANEMAN; RANSOHOFF, 2013). Como consequência da quebra dessa barreira, o cérebro se torna mais vulnerável à ação de moléculas neurotóxicas, podendo induzir um quadro neuroinflamatório e neurodegenerativo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os mecanismos hipotalâmicos envolvidos na deficiência de secreção de vasopressina na fase tardia da sepse, com ênfase no processo de apoptose de células dos núcleos produtores desse hormônio.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os fatores envolvidos na morte celular cerebral mediada por células imunes, assim como a ativação das vias extrínseca e intrínseca de apoptose na sepse
- Analisar a morfologia das células gliais hipotalâmicas durante a sepse
- Analisar o comprometimento da barreira hematoencefálica durante a sepse

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Os experimentos foram realizados com ratos Wistar adultos, de peso corporal entre 250-300 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo *Campus* de Ribeirão Preto, ambientados em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola) no Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em fotoperíodo de 12/12 horas, em temperatura de ($25 \pm 2^{\circ}\text{C}$), com livre acesso à água e dieta comercial balanceada (Nuvilab CR-1 Atutoclavável, NUVITAL Nutrientes S/A). Os procedimentos realizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo - *Campus* de Ribeirão Preto (CEUA 13.1.337.53.0).

3.2 Planejamento experimental

Os animais dos grupos controle não-manipulado (NAIVE) ou submetidos à sepse por ligadura e punção cecal (CLP) foram divididos em três grupos. No primeiro, após 6 e 24 horas da cirurgia os animais foram perfundidos, os cérebros foram coletados e o tecido foi congelado e preparado para imunohistoquímica/imunofluorescência. Outro grupo de animais foi decapitado para a retirada de sangue e encéfalo, também 6 e 24 horas após a cirurgia. O sangue foi usado para dosagens de IFN- γ . O encéfalo foi removido e imediatamente congelado para dissecação dos núcleos supraópticos (SON) e paraventriculares (PVN) ou do hipotálamo para avaliação da expressão proteica por Western blot. Um terceiro grupo foi separado para análise de permeabilidade da barreira hematoencefálica. O procedimento cirúrgico foi realizado sempre no período entre 8:00 e 10:00 horas (Fig. 1)

Figura 3: Figura representando o protocolo experimental do projeto.

3.3 Anestesia e Indução da sepse por “ligadura e punção cecal” (CLP)

Após estarem devidamente anestesiados com injeção intraperitoneal de tribromoetanol (TBE) 2,5% (Sigma-Aldrich) em solução salina (25mg/0,1kg), os animais foram submetidos à incisão mediana de 2 cm no abdômen seguido de exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) da válvula íleocecal. Posteriormente, o ceco foi perfurado com 10 furos com agulha 16G. Após verificação do extravazamento de fezes do ceco, este foi novamente introduzido na cavidade abdominal. O fechamento da cavidade abdominal foi realizado em dois planos de sutura com pontos separados. Solução salina normal foi aplicada via subcutânea como líquido de reanimação (20mL/Kg).

3.4 Preparo e coleta do tecido cerebral

Os animais profundamente anestesiados com TBE 2,5% foram perfundidos 6 e 24 horas após o estímulo. Para a perfusão foi feita uma incisão na região torácica

do rato e, após a visualização do coração, uma agulha de ponta romba conectada a uma bomba peristáltica foi introduzida no ápice do ventrículo esquerdo até a saída da aorta. Em seguida, um corte foi feito no átrio direito para permitir a saída de sangue e líquidos. Para a perfusão de cada animal foram utilizados 300ml de solução de PBS (0,01M, pH 7,4) seguido por 300ml de solução de paraformaldeído a 4% (PFA 4%) numa velocidade de infusão de 15 ml/min. Após o fim da perfusão os cérebros foram removidos e pós-fixados com o mesmo fixador por 4 horas e posteriormente imersos em solução de sacarose 30% em PBS por 3 dias.

3.5 Imunofluorescência/ Imunohistoquímica

O tecido fixado foi seccionado em criostato (Microm HM-505-E) em secções de 30µm contendo o núcleo supraóptico. As secções foram inicialmente lavadas com PBS (0,01M - pH 7,4) por 15 minutos. A exposição de antígeno foi feita em tampão Tris/EDTA 10/1mM – pH 9,0 por 5 minutos, seguida do aquecimento em estufa a 70°C por 30 minutos em tampão citrato de sódio 10mM – pH 6,0. Após lavagem com PBS por 15 minutos os sítios de ligação inespecífica foram bloqueados durante 60 minutos por uma solução contendo soro normal de cabra (NGS) (5%) e triton X-100 (0,3%) diluídos em PBS. Em seguida, sem lavagem, mas retirando o excesso de solução de bloqueio, as secções foram incubadas por 24h a 4°C com anticorpos específicos para IBA-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*/ 1:1000, WAKO), um marcador de micróglia; anti-AVP (1:10000, Peninsula) e HIF-1α (1:50, Santa Cruz). Posteriormente, as secções foram incubadas com anticorpo secundário apropriado conjugado com fluoróforo (*goat anti-rabbit* Alexa Fluor 594 *conjugate* ou *goat anti-mouse* Alexa Fluor 488 *conjugate*, 1:1000, Life Technologies). As secções foram montadas em lâminas gelatinizadas e os cortes cobertos com *antifade reagent* + DAPI (*Prolong Gold*, ThermoFisher Scientific). As imagens foram obtidas em microscópio confocal (Leica SP5) no Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal – LMMC da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP).

Os cortes destinados à imunohistoquímica seguiram o mesmo protocolo de lavagem e exposição antigênica, seguido do bloqueio das peroxidases endógenas com peróxido de hidrogênio (1% em PBS) durante 10 minutos. Após 1 hora de

bloqueio com soro normal de cabra 5%, os cortes foram incubados *overnight* a 4°C com anticorpo anti-CD8 (1:1000, Santa Cruz), anti-MHC-I (1:1000, Ingemnex) e anti-GFAP (*glial fibrillary acidic protein*, 1:7000, Millipore). Após nova lavagem, as secções foram incubadas durante 90 min à temperatura ambiente com anticorpo secundário anti-*rabbit* biotinilado (Vectastain® Elite® ABC kit). diluídos a 1:2000 em PBS contendo 1% de BSA, 1% NGS e 0,3% de Triton X-100. Após lavagem em PBS, as secções foram incubadas com o complexo avidina-biotina-peroxidase durante 30 min (ABC, Vectastain) e mais uma vez lavadas em PBS antes da incubação com 0,05% de 3-3'-diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio a 0,015%. Finalmente, as secções foram montadas em lâminas gelatinizadas, desidratadas e cobertas com lamínulas (Knittel glass, 24 x 60 mm) usando meio de montagem apropriado (Entellan, Merck).

3.6 Dissecção de SON, PVN e hipotálamo

A remoção dos núcleos hipotalâmicos foi feita conforme a técnica descrita por Palkovits (1973), usando agulhas com diâmetros internos de 1200µm e 1400µm para a punção de SON e PVN, respectivamente. Naqueles animais em que todo o hipotálamo foi analisado, dissecou-se a porção anterior e médio-basal do hipotálamo, desde a porção anterior do quiasma óptico até à porção anterior dos núcleos mamilares, incluindo o *organum vasculosum da lamina terminalis* (OVLT), núcleos supraópticos (SON), paraventriculares (PVN), núcleo supra-quiasmático, núcleo arqueado, núcleo ventromedial e áreas periventriculares. A profundidade do fragmento foi de aproximadamente 2,0 mm de espessura (Fig. 02).

Figura 4: Foto da superfície ventral do cérebro do rato. O hexágono com contorno preto demarca a área do hipotálamo retirada.

3.7 Western blot

Após dissecação os núcleos SON e PVN e os hipotálamos foram homogeneizados por ultrassom em tampão RIPA (Sigma-Aldrich) com 10% de mix de inibidores de protease (Sigma-Aldrich) diluído 1:10 e 0,5% de fluoreto de fenilmetilsulfonila (PMSF, Sigma-Aldrich) 200mM em metanol. Após agitação em gelo por 2 horas, as amostras foram centrifugadas a 3500xg por 20 min a 4 °C para coleta do sobrenadante. A quantidade de proteína total de cada amostra foi determinada a 592nm usando ensaio com ácido bicinconínico (BCA) de acordo com as instruções do fabricante (Pierce BCA protein assay kit). Quantidades iguais de proteína total (40µg) foram diluídas em tampão Laemmli 2x (Sigma-Aldrich) e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (125V, 90 min). Marcadores de peso molecular de 10kDa a 245kDa (Prism Ultra Protein Ladder) foram aplicados em um dos poços do gel para visualização da separação e qualidade de transferência. Após eletroforese, as proteínas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (0,45µm; Amersham) em sistema de tanque de blotting sob uma corrente de 300V durante 2h em tampão de transferência contendo 20% de metanol. A membrana foi incubada *overnight* a 4°C com anticorpos contra caspase-8 clivada (IMGNEX, 1:2000), tBID (Millipore, 1:1500), CD8 (SantaCruz, 1:2000), perforina (Santa Cruz. 1:500), granzima B (Abcam, 1:1000), BCL-2 (Santa Cruz, 1:1000), BCL-xL (Abcam, 1:2000), GFAP (Milipore, 1:7000) e anti-β-actina (Santa Cruz, 1:2000). Anticorpos secundários conjugados com HRP (*horseradish peroxidase*) anti-*rabbit* (Abcam) e anti-*mouse* (Santa Cruz) foram diluídos 1:10000

em PBS-T com BSA 1% e as membranas foram incubadas com agitação durante 2h a 4°C. A detecção foi feita usando um kit de reação quimioluminescente (ECL prime, Amersham) e as bandas detectadas quantificadas pelo software ImageLab 5.2.1 (BioRad). Os resultados foram transformados em unidades arbitrárias de densidade óptica e expresso pela razão de β -actina (controle interno).

3.8 ELISA

A determinação dos níveis plasmáticos de IFN- γ foi feita de acordo com as orientações do fabricante do kit (ERIFNG, LifeTechnologies). Brevemente, 100 μ l da curva padrão ou das amostras foram pipetados numa placa de 96 poços e incubados por 2,5 horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados 3 vezes com *wash buffer* e posteriormente incubados com anticorpo biotilado (100 μ l) por 1 hora. Após nova lavagem, adicionou-se 100 μ l de estreptavidina-HRP por 45 minutos em temperatura ambiente. Lavou-se novamente e foi pipetado 100 μ l de TMB (tetrametilbenzidina) e reagiu por 30 minutos em ambiente escuro antes da adição de 50 μ l de solução de parada (H₂SO₄ 0,2M). A absorbância foi analisada em leitor de placas (Synergy H1, Biorad) a 450nm e 550nm.

3.9 Teste de permeabilidade da barreira hematoencefálica

Animais de todos os grupos receberam injeção de 1 ml do corante azul de Evans 2% (iv- veia peniana) diluídos em solução salina (NaCl 0,9%). O azul de Evans forma um complexo com a albumina sérica, originando compostos com peso molecular superiores a 60 kDa, que em condições normais não atravessam a BHE. O corante é deixado circular por 1 h e então os animais são perfundidos com 200 ml solução salina. Os cérebros foram retirados e o hipotálamo removido. O hipotálamo foi homogeneizado em 200 μ l de ácido tricloroacético 50% e um dos hemisférios cerebrais em 2ml da mesma solução. As amostras foram centrifugadas a 3000g a 4°C por 20 min e o sobrenadante foi diluído em etanol na proporção 1:1 (v/v). A

mensuração da absorbância do corante azul de Evans foi realizada através de espectofotometria (SynergyH1, BioTek), com leitura em 630 nm. Para a determinação da concentração do corante no tecido foi utilizada uma curva padrão com diluições seriadas da solução estoque do corante (100 – 0,78 ng/ml). Os dados foram expressos em ng de azul de Evans/g de tecido cerebral.

3.10 *Análise Estatística*

Todos os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Em variáveis com distribuição normal foi utilizado o teste estatístico ANOVA, enquanto as que não possuíam distribuição normal foram submetidas à análise não paramétrica pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido dos pós-testes adequados a cada análise- Tukey (paramétricos) e Dunn (não-paramétrico). Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação dos fatores envolvidos nos mecanismos de apoptose

Tanto o núcleo supraóptico como paraventricular apresentaram o mesmo padrão de marcação para CD8. No grupo NAIVE, em geral não se observou imunomarcação para CD8 nestes núcleos, havendo somente em pequena quantidade junto ao epêndima do terceiro ventrículo, próximo ao PVN. Nos animais do grupo de 24 horas, porém, encontramos um notável aumento da imunomarcação para CD8 em ambos os núcleos (Fig. 03). Nota-se também uma infiltração celular disseminada por todo o hipotálamo desses animais (Fig. 04). A imunohistoquímica para MHC-I mostrou que não houve diferença de marcação para o antígeno no PVN entre os animais controles e submetidos ao CLP, após 24 horas. No SON podemos verificar um discreto aumento na imunomarcação nos animais sépticos de 24 horas comparados ao NAIVE (Fig. 05).

Figura 5. Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para CD8 em secções coronais de núcleos supraópticos e paraventriculares de animais controles (naive) e submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h). As imagens foram obtidas por microscópio óptico. Objetiva: 10x. Escala = 50µm.

Figura 6. Fotomicrografia ilustrando imunorreatividade para CD8 em secções coronais através do hipotálamo de animal submetido a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-24h) de). Objetiva: 5x

Figura 7. Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para MHC-I em secções coronais através dos núcleos supraópticos e paraventriculares de animais controles (naive) e 24h após sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP). Os cortes foram corados com cresil violeta. As setas indicam as imunomarcações positivas. As imagens foram obtidas por microscópio óptico. Objetiva: 40x. Escala = 50μm

Ao analisarmos por western blot expressão das proteínas CD8, granzima B e perforina hipotalâmicas, assim como de caspase-8 clivada e tBID nos núcleos supraóptico e paraventricular, não foi encontrada nenhuma diferença nos animais sépticos. A expressão de proteínas anti-apoptóticas hipotalâmicas se mostrou diminuída em 6 horas (BCL-xL) e 24 horas (BCL-xL e BCL-2) após o estímulo séptico.

FIGURA 8: Expressão de CD8 no hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=5-7$.

FIGURA 9: Expressão de Granzima B no hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos à sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=5-7$.

FIGURA 10: Expressão de perforina no hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=5-7$.

FIGURA 11: Expressão de caspase-8 clivada nos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) do hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=4$

FIGURA 12: Expressão de *truncated BID* (tBID) nos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) do hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=4-7$

FIGURA 13: Expressão de BCL-2 no hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=6-7$. * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo naive

FIGURA 14: Expressão de BCL-xL no hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos à sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=6-7$. * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo naive.

FIGURA 15: Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para AVP (verde), HIF-1α (vermelho) e DAPI (azul) em secções coronais através dos núcleos supraópticos de animais controles (naive) e 24h após sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP). As imagens foram obtidas em microscópio confocal. Objetiva: 60x + zoom óptico 3x. Escala = 20μm

4.2 Avaliação das células gliais

4.2.1 Astrócitos

Primeiramente analisamos a morfologia dos astrócitos no núcleo supraóptico através de imunohistoquímica. Em todos os animais nota-se intensa imunomarcagem na região da lâmina ventral glial (LVG). Nos animais controle e CLP-6h, podemos identificar longas ramificações que se projetam para o interior do núcleo, enquanto que após 24 horas elas se encontram muito mais curtas e próximas à LVG (Fig. 13). Quantificamos o conteúdo hipotalâmico de GFAP, mas não encontramos diferenças entre os grupos analisados (Fig. 14)

FIGURA 16: Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para GFAP em secções coronais de núcleos supraópticos de animais controles e submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal, após 6 e 24 horas. As setas indicam os filamentos astrocitários. As imagens foram obtidas por microscópio óptico. Objetiva: 40x. Escala = 10µm.

FIGURA 17: Expressão de GFAP no hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=6-7$

4.2.2 *Micróglia*

A análise morfológica (Fig. 15) das células microgliais no SON indicou diferenças entre os grupos estudados. Enquanto nos animais controle essas células apresentam ramificações longas e finas (A e B), passadas 24 horas do estímulo séptico os animais passaram a apresentar células com processos mais curtos e espessos (C e D).

FIGURA 18: Fotomicrografias ilustrando imunorreatividade para Iba-1 (verde) e DAPI (azul) em secções coronais através dos núcleos supraópticos de animais controles (naive) e 24h após sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP). As setas indicam células microgliais ativadas. As imagens foram obtidas em microscópio confocal. Objetiva: 40x (A e C), zoom 3x (B e D). Escala = 50μm

4.3 Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica

Não houve alteração na permeabilidade ao Azul de Evans no encéfalo como um todo nos animais sépticos. Porém no hipotálamo desses mesmos animais nota-

se um aumento do extravasamento passadas 6 horas do CLP, com retorno aos valores basais após 24 horas.

FIGURA 19: Avaliação da permeabilidade da barreira hematoencefálica no encéfalo e no hipotálamo de animais não manipulados (naive) ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h). As barras representam a média $\pm$ EPM. $n=4-7$. * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo naive.

4.4 Avaliação da concentração plasmática de IFN- γ

Ao dosarmos os níveis de IFN- γ nos diferentes grupos experimentais por ELISA, notamos que o grupo CLP-24h apresenta um aumento da concentração dessa citocina no plasma (Fig. 16).

FIGURA 20: Concentrações plasmáticas de interferon gama (IFN- γ) de animais não manipulados (naive) ou submetidos a sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP-6 e 24h), As colunas representam a média $\pm$ EPM de $n=6-7$. * = $p \leq 0,05$ comparado ao grupo naive.

5 DISCUSSÃO

O presente trabalho se baseia na linha de investigação acerca dos eventos fisiopatológicos envolvidos no comprometimento da secreção de vasopressina durante a fase tardia sepse. Nossa proposta foi investigar a apoptose hipotalâmica como um dos mecanismos dessa deficiência, assim como as respostas gliais e da barreira hematoencefálica frente ao estímulo séptico.

Primeiramente investigamos a participação de fatores envolvidos na ativação de morte celular mediada por células imunes. Buscamos evidências para uma possível infiltração de linfócitos no hipotálamo dos animais sépticos. As análises imunocitoquímicas para CD8 indicaram a presença dessas células de maneira generalizada pelo hipotálamo de alguns animais sépticos após 24hs. Entretanto ao quantificarmos por western blot a expressão dessa mesma proteína (CD8) no hipotálamo não encontramos diferenças dos controles. Acreditamos que em uma parcela dos animais sépticos, devidos a condições individuais, há de fato a infiltração cerebral de linfócitos citotóxicos. Mas quando analisamos após agruparmos os resultados individuais, esses resultados se “diluem” e não há diferença estatística.

Há na literatura poucos trabalhos investigando a ação de LT-CD8+ no sistema nervoso central durante infecções sistêmicas, principalmente bacterianas. Sabe-se que na ausência de inflamação, células TCD8 naives são incapazes de cruzar a barreira hematoencefálica. Normalmente, essas células devem ser ativadas periféricamente em linfonodos por meio da apresentação de um antígeno específico acoplado à molécula de MHC classe I das células apresentadoras de antígeno (APC). Porém, os antígenos apresentados pelo MHC-I são tipicamente derivados do processamento de proteínas intracelulares, portanto não haveria como peptídeos cerebrais serem apresentados periféricamente. Entretanto, as APC são capazes de realizar a *crosspresentation*, isto é, adquirir antígenos exógenos (por endocitose ou fagocitose), processá-los e apresentá-los via MHC-I. Tal processo ocorre com maior frequência em condições inflamatórias (GOVERMAN, 2009).

As células endoteliais do SNC, mesmo em condições não-inflamatórias, expressam MHC-I, podendo potencialmente apresentar antígenos cerebrais, uma vez que já foi mostrado que a injeção de um peptídeo diretamente no parênquima cerebral foi capaz de se acoplar à molécula de MHC-I de células endoteliais e promover uma entrada antígeno-específica de linfócitos CD8+ no cérebro (GALEA et al., 2007; PÜNTENER et al., 2012).

Apesar de encontrarmos discreto aumento de imunomarcagem para MHC-I no SON de animais sépticos, não houve diferenças na expressão de granzima B e de perforina hipotalâmicas nesses mesmos animais. Isso mostra que apesar de poder ocorrer a migração desses linfócitos TCD8+ no cérebro não significa que os mesmos estejam ativados e induzindo a morte de outras células.

Também pesquisamos o envolvimento da ativação dos *death receptors* especificamente nos núcleos supraópticos e paraventriculares do hipotálamo. Avaliamos a presença da forma ativada/ clivada da caspase-8 e de tBID, porém após 24 horas de estímulo séptico não constatamos nenhuma alteração em ambos os núcleos.

Apesar de não termos encontrado alterações significativas que pudessem mostrar o envolvimento de vias não-mitochondriais em nossos experimentos, ressaltamos que essas vias podem estar ativadas em um momento posterior da doença. De fato, nossas análises se concentraram na fase aguda da sepse (6h) e na fase tardia (24h), considerando a deficiência de AVP. O quadro inflamatório, porém, progride conforme o avanço da doença e não se descarta uma possível ativação futura dos receptores de morte nos neurônios. A resposta citotóxica por linfócitos CD8 pode levar ainda mais tempo, visto que depende de processamento celular e apresentação do antígeno pelo complexo principal de histocompatibilidade classe 1 (MHC-1) para iniciar a liberação de grânulos de granzima/perforina (RYAN; COBB, 2012).

Enquanto a via extrínseca de apoptose parece estar inativa nos períodos de tempo estudados, a via intrínseca já está passando por alterações, uma vez que nossos resultados mostram a diminuição das proteínas anti-apoptóticas BCL-2 e BCL-xL hipotalâmicas. Essas proteínas atuam a fim de manter a homeostase mitocondrial, evitando o aumento da permeabilidade da membrana externa da organela. De fato, uma superexpressão de BCL-2/ BCL-xL inibe a translocação e oligomerização das proteínas pro-apoptóticas BAX/BAK evitando a perda do potencial de membrana mitocondrial e a liberação de citocromo-c para o citoplasma (KIM, 2005; Leber, LIN; ANDREWS, 2010). Portanto, a diminuição dessas proteínas no hipotálamo durante a sepse deixaria os neurônios mais suscetíveis à morte celular. O BCL-xL tem uma capacidade ainda maior para inibir a permeabilização da membrana mitocondrial que o BCL-2 (KEOGH *et al.*, 2000) e já na fase inicial da sepse seus valores no hipotálamo já se encontram diminuídos. Esse dado corrobora

com resultados anteriores do nosso grupo que demonstraram que já após 6 horas há um aumento de citocromo-c no SON e PVN, além da translocação citoplasmática do mesmo, assim como de caspase-3 clivada (OLIVEIRA-PELEGRIN, BASSO e ROCHA, 2014).

Nossos resultados mostraram ainda que os neurônios vasopressinérgicos não estão em estado de normóxia, observado pelo aumento da expressão de HIF-1 α nesses neurônios através de imunofluorescência. As moléculas de IL-1 β e NO, que estão aumentadas em SON e PVN na sepse, possuem importante papel na indução, ativação e estabilização de HIF-1 (HADDAD, 2002). Já se sabe também que HIF-1 α é capaz de aumentar a expressão de fatores envolvidos na morte celular e na regulação do ciclo celular, como o BCL-2 e as proteínas p21 e p53 (CARMELIET *et al.*, 1998).

Em resumo, esses resultados nos levam a inferir que é a ativação da via mitocondrial de apoptose a responsável pela morte neuronal de neurônios do SON e PVN e que as vias de apoptose ligadas a células imunes ou à ativação do receptor de morte não desempenham qualquer tarefa no período estudado deste nosso modelo. Conforme já discutido em outros trabalhos (OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2013; OLIVEIRA-PELEGRIN; BASSO; ROCHA, 2014), há um possível desbalanço energético mitocondrial nos neurônios vasopressinérgicos, induzido por um aumento de citocinas e mediadores inflamatórios, principalmente óxido nítrico (NO) e IL-1 β . De fato, ao se bloquear centralmente o receptor para IL-1 β , observa-se uma diminuição da expressão gênica de fatores relacionados ao estresse oxidativo e apoptose no hipotálamo, além de aumento na secreção de AVP na fase tardia e diminuição da atividade de óxido nítrico sintase, mostrando a importância dessa citocina na deficiência de vasopressina na sepse (WAHAB *et al.*, 2015). Em diversas condições patológicas cerebrais já foi mostrado o envolvimento da IL-1 β na fisiopatologia da doença, sendo que as células gliais, principalmente a micróglia, tem importante papel na sua produção, (SMITH *et al.*, 2012).

A análise imunohistoquímica da micróglia no SON mostrou diferenças entre animais controles e sépticos. A classificação morfológica dessas células tem sido usada para definir se elas estão ativadas ou não: células “em repouso” apresentam ramificações longas, sendo relacionada à imunovigilância e modelação sináptica, enquanto células ativadas têm uma forma ameboide, com processos mais curtos e espessos (KETTENMANN *et al.*, 2011; MORRISON; FILOSA, 2013). Após 24 horas

de CLP, constatamos no SON células microgliais com morfologia compatível com sua ativação. Quando ativada a micróglia pode assumir dois fenótipos diferentes, com funções e ações distintas. A ativação clássica (fenótipo M1), estimulado por LPS e/ou IFN- γ , é relacionado a um estado pró-inflamatório e produção de moléculas neurotóxicas, como citocinas (IL-1 β , TNF- α , IL-6) e NO, enquanto a via alternativa (fenótipo M2) é induzida por IL-4 e IL-13, sendo relacionada ao reparo tecidual (EGGEN et al., 2013). Apesar de discreto, observamos um aumento plasmático de IFN- γ em 24h, que poderia contribuir para tornar essas células ativas e produtoras de citocinas inflamatórias. Mesmo sendo periférica, essa citocina pode chegar ao cérebro pelos órgãos circumventriculares (CVOs), estruturas altamente vascularizadas que são isentas de barreira hematoencefálica e que se comunicam com SON e PVN (RIVEST et al., 2000). Assim, esta citocina poderia contribuir para a ativação microglial que poderia ser ao menos em parte responsável pelos aumentos de IL-1 β e NO observados nos núcleos produtores de vasopressina e que desencadeiam o comprometimento neuronal.

A análise dos resultados relativos aos astrócitos, uma segunda célula glial, requer mais atenção, visto que além de uma função imune, ela tem características próprias no SON, principalmente quanto à regulação sináptica. Os dados de *western blot* mostraram que não há uma reatividade astrocitária aumentada no hipotálamo de nossos animais. Apesar da microglia e astrócitos realizarem um íntimo *crosstalking*, a ativação de astrócitos costuma ser posterior (LIU; TANG; FENG, 2011). Porém, mesmo não estando reativos, mudanças morfológicas dos astrócitos no núcleo supraóptico durante a sepse foram observadas: após 24 horas de sepse há uma retração dos filamentos astrocitários no SON. Tal conformação deveria levar a uma menor captação de glutamato pelos astrócitos, permitindo uma maior ativação de receptores NMDA extrassinápticos neuronais, que levaria à despolarização e consequente liberação de AVP (JOE; SCOTT; BROWN, 2014; NASKAR; STERN, 2014). Entretanto isso não ocorre na fase tardia talvez porque os estoques hipofisários de vasopressina estão reduzidos devido a alterações na síntese do hormônio conforme mostrado em trabalhos anteriores do laboratório (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2010).

Observamos também que há um comprometimento da BHE do hipotálamo dos animais sépticos, como demonstramos pelo aumento da permeabilidade ao Azul de Evans. Diversos fenômenos podem explicar essa alteração, como a presença de

citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF- α (CANDELARIO-JALIL et al., 2007), e óxido nítrico (MINAMI et al., 1998; BOJE e LAKHMAN, 2000); a BHE inclusive possui receptores para diversas citocinas, além de receptores do tipo *toll* (BANKS, 2015). Além disso, sabemos que durante a sepse, além de presença de componentes bacterianos, os níveis de citocinas (IL-6, TNF- α , IL-1 β) estão aumentados na corrente sanguínea, mesmo na fase inicial da doença (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2013). Desse modo, as citocinas circulantes periféricas podem chegar à BHE e levar ao comprometimento de sua integridade. Também já foi observado o envolvimento da vasopressina no rompimento da BHE (MANAENKO et al., 2011; ZEYNALOV et al., 2015). Relembramos que após 6 horas do CLP é que os níveis plasmáticos de AVP estão mais elevados, o que coincide com o comprometimento da BHE hipotalâmica.

Diversos estudos experimentais já mostraram que há comprometimento da barreira hematoencefálica durante a sepse (FLIERL et al., 2008; NISHIOKU et al., 2009; CARDOSO et al., 2012; MICHELS et al., 2015). Observamos que apesar do estímulo séptico ser constante, após 24 horas não há diferença nos valores hipotalâmicos de Azul de Evans, porém já foi demonstrado que essa alteração em outras regiões cerebrais também é transitória (VIEIRA et al., 2015). Adicionalmente, mesmo que não exista um rompimento da BHE, os mecanismos de transporte celular podem estar alterados, permitindo a transposição de citocinas plasmáticas para o tecido cerebral (BANKS, 2015). Desse modo, moléculas da circulação sistêmica podem alcançar o hipotálamo e promover a ativação das células microgliais e levar à produção de mediadores prejudiciais aos neurônios.

Em suma, nossos resultados se adicionam àqueles já estudados, principalmente pelo nosso grupo, no que se refere à fisiopatologia da deficiência da secreção de AVP durante a sepse. Esperamos que tais achados auxiliem a elucidar os mecanismos da disfunção cerebral que ocorre nessa doença e possam contribuir no avanço da busca de intervenções terapêuticas que tragam maiores benefícios aos pacientes.

6 CONCLUSÃO

Nos períodos de tempo estudados em nosso modelo experimental de sepse não encontramos evidências de ativação hipotalâmica da via extrínseca de apoptose ou mediada por células imunes, enquanto que a via intrínseca já está ativada. Tal ativação parece estar temporalmente associada à ativação microglial e ao rompimento da barreira hematoencefálica.

REFERÊNCIAS

AMITAL, Y. Physiologic role for "inducible" nitric oxide synthase: a new form of astrocytic-neuronal interface. **Glia**, v. 58, n. 15, p. 1775-81, 2010.

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7, p. 1303-10, 2001.

ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; CAVAILLON, J. M. Septic shock. **Lancet**, v. 365, n. 9453, p. 63-78, 2005.

ARAQUE, A. et al. Tripartite synapses: glia, the unacknowledged partner. **Trends Neurosci**, v. 22, n. 5, p. 208-15, 1999.

ATHAYDE, L.A.. **Participação dos leucotrienos na secreção de vasopressina durante sepse experimental**, 2007. Dissertação (Mestrado em Biociências aplicadas à Farmácia)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

ATHAYDE, L. A. et al. Blocking central leukotrienes synthesis affects vasopressin release during sepsis. **Neuroscience**, v. 160, n. 4, p. 829-36, Jn 2009.

BANKS, W. A. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. **Brain Behav Immun**, v. 44, p. 1-8, 2015.

BANTEL, H.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Cell death in sepsis: a matter of how, when, and where. **Crit Care**, v. 13, n. 4, p. 173, 2009.

BARRY, M.; BLEACKLEY, R. C. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. **Nat Rev Immunol**, v. 2, n. 6, p. 401-9, 2002.

BLUM, J. S.; WEARSCH, P. A.; CRESSWELL, P. Pathways of antigen processing. **Annu Rev Immunol**, v. 31, p. 443-73, 2013.

BOJE, K. M.; LAKHMAN, S. S. Nitric oxide redox species exert differential permeability effects on the blood-brain barrier. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 293, n. 2, p. 545-50, 2000.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, v. 115, n. 6, p. 457-69, 1991.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, n. 1, p. 235-43, 1997.

BONE, R. C.; SIBBALD, W. J.; SPRUNG, C. L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481-3, 1992.

BOUZIER-SORE, A. K.; PELLERIN, L. Unraveling the complex metabolic nature of astrocytes. **Front Cell Neurosci**, v. 7, p. 179, 2013.

BOZZA, F. A. et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. **Crit Care**, v. 11, n. 2, p. R49, 2007.

BRUICK, R. K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 97, n. 16, p. 9082-7, 2000.

CANDELARIO-JALIL, E. et al. Cyclooxygenase inhibition limits blood-brain barrier disruption following intracerebral injection of tumor necrosis factor-alpha in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 323, n. 2, p. 488-98, 2007.

CARDOSO, F. L. et al. Exposure to lipopolysaccharide and/or unconjugated bilirubin impair the integrity and function of brain microvascular endothelial cells. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e35919, 2012.

CARMELIET, P. et al. Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. **Nature**, v. 394, n. 6692, p. 485-90, 1998.

CHAVEZ, J. C. et al. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha in the brain of rats during chronic hypoxia. **J Appl Physiol**, v. 89, n. 5, p. 1937-42, 2000.

CHOE, K. Y.; OLSON, J. E.; BOURQUE, C. W. Taurine release by astrocytes modulates osmosensitive glycine receptor tone and excitability in the adult supraoptic nucleus. **J Neurosci**, v. 32, n. 36, p. 12518-27, 2012.

CORRÊA, P. B. et al. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, v. 183, n. 1-2, p. 17-25, 2007.

CUNNINGHAM, C. L.; MARTÍNEZ-CERDEÑO, V.; NOCTOR, S. C. Diversity of neural precursor cell types in the prenatal macaque cerebral cortex exists largely within the astroglial cell lineage. **PLoS One**, v. 8, n. 5, p. e63848, 2013.

CUNNINGHAM, E. T.; SAWCHENKO, P. E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 406-11, 1991.

DE MAIO, A.; TORRES, M. B.; REEVES, R. H. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. **Shock**, v. 23, n. 1, p. 11-7, Jan 2005.

DUNN, F. L. et al. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **J Clin Invest**, v. 52, n. 12, p. 3212-9, 1973.

EGGEN, B. J. et al. Microglial phenotype and adaptation. **J Neuroimmune Pharmacol**, v. 8, n. 4, p. 807-23, 2013.

ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

ERUSALIMSKY, J. D.; MONCADA, S. Nitric oxide and mitochondrial signaling: from physiology to pathophysiology. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 27, n. 12, p. 2524-31, 2007.

EWEN, C. L.; KANE, K. P.; BLEACKLEY, R. C. A quarter century of granzymes. **Cell Death Differ**, v. 19, n. 1, p. 28-35, 2012.

FAULKNER, J. R. et al. Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. **J Neurosci**, v. 24, n. 9, p. 2143-55, 2004.

FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacol Ther**, v. 91, n. 3, p. 179-213, 2001.

FLIERL, M. A. et al. The role of C5a in the innate immune response after experimental blunt chest trauma. **Shock**, v. 29, n. 1, p. 25-31, 2008.

FOUQUÉ, A.; DEBURE, L.; LEGEMBRE, P. The CD95/CD95L signaling pathway: a role in carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1846, n. 1, p. 130-41, 2014.

FU, H. Q. et al. Prolonged neuroinflammation after lipopolysaccharide exposure in aged rats. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e106331, 2014.

FUJIWARA, Y. et al. The roles of V1a vasopressin receptors in blood pressure homeostasis: a review of studies on V1a receptor knockout mice. **Clin Exp Nephrol**, v. 16, n. 1, p. 30-4, 2012.

GALEA, I. et al. An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier. **J Exp Med**, v. 204, n. 9, p. 2023-30, 2007.

GIUSTI-PAIVA, A.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Inhibitory effect of gaseous neuromodulators in vasopressin and oxytocin release induced by endotoxin in rats. **Neurosci Lett**, v. 381, n. 3, p. 320-4, 2005.

GORINA, R. et al. Astrocyte TLR4 activation induces a proinflammatory environment through the interplay between MyD88-dependent NFκB signaling, MAPK, and Jak1/Stat1 pathways. **Glia**, v. 59, n. 2, p. 242-55, 2011.

GOVERMAN, J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. **Nat Rev Immunol**, v. 9, n. 6, p. 393-407, 2009.

GREEN, D. R. Apoptotic pathways: paper wraps stone blunts scissors. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 1-4, 2000.

GUPTA, S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. **Int J Oncol**, v. 22, n. 1, p. 15-20, Jun 2003.

HADDAD, J. J. Recombinant human interleukin (IL)-1 beta-mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism. **Eur Cytokine Netw**, v. 13, n. 2, p. 250-60, 2002.

HATTON, G. I. Glial-neuronal interactions in the mammalian brain. **Adv Physiol Educ**, v. 26, n. 1-4, p. 225-37, 2002.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-6, 2000.

HOLMES, C. L. et al. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. **Chest**, v. 120, n. 3, p. 989-1002, 2001.

HOLMES, C. L.; RUSSELL, J. A.; WALLEY, K. R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. **Chest**, v. 124, n. 3, p. 1103-15, 2003.

HOTCHKISS, R. S. et al. Caspase inhibitors improve survival in sepsis: a critical role of the lymphocyte. **Nat Immunol**, v. 1, n. 6, p. 496-501, 2000.

HSUCHOU, H. et al. Obesity induces functional astrocytic leptin receptors in hypothalamus. **Brain**, v. 132, n. Pt 4, p. 889-902, 2009.

IOVINO, M et. al. Vasopressin secretion control: central neural pathways, neurotransmitters and effects of drugs. **Curr Pharm Des**, v. 18, p. 4714-24, 2012.

ILAS (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE), 2015. Relatório Nacional-Campanha Sobrevivendo à Sepsis. Disponível em <<http://www.sepsisnet.org/pg.php?v=dados-brasileiros>>. Acesso em: 29. set. 2015.

JI, K. et al. Microglia actively regulate the number of functional synapses. **PLoS One**, v. 8, n. 2, p. e56293, 2013.

JOE, N.; SCOTT, V.; BROWN, C. H. Glial regulation of extrasynaptic NMDA receptor-mediated excitation of supraoptic nucleus neurones during dehydration. **J Neuroendocrinol**, v. 26, n. 1, p. 35-42, 2014.

JOHNSON, H. M.; TORRES, B. A. Regulation of lymphokine production by arginine vasopressin and oxytocin: modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones. **J Immunol**, v. 135, n. 2 Suppl, p. 773s-775s, 1985.

KADEKARO, M. et al. Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. **Am J Physiol**, v. 262, n. 2 Pt 2, p. R310-7, 1992.

KARVE, I. P.; TAYLOR, J. M.; CRACK, P. J. The contribution of astrocytes and microglia to traumatic brain injury. **Br J Pharmacol**, 2015.

KEOGH, S. A. et al. Failure of Bcl-2 to block cytochrome c redistribution during TRAIL-induced apoptosis. **FEBS Lett**, v. 471, n. 1, p. 93-8, 2000.

KETTENMANN, H. et al. Physiology of microglia. **Physiol Rev**, v. 91, n. 2, p. 461-553, 2011.

KHAN, N.; ASIF, A. R. Transcriptional regulators of claudins in epithelial tight junctions. **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 219843, 2015.

KIM, R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 333, n. 2, p. 336-43, 2005.

KOTHAKOTA, S. et al. Caspase-3-generated fragment of gelsolin: effector of morphological change in apoptosis. **Science**, v. 278, n. 5336, p. 294-8, Oct 1997.

LAGU, T. et al. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. **Crit Care Med**, v. 40, n. 3, p. 754-61, 2012.

LAND, H. et al. Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin-neurophysin II precursor. **Nature**, v. 295, n. 5847, p. 299-303, 1982.

LAVRIK, I. N. Systems biology of death receptor networks: live and let die. **Cell Death Dis**, v. 5, p. e1259, 2014.

LEBER, B.; LIN, J.; ANDREWS, D. W. Still embedded together binding to membranes regulates Bcl-2 protein interactions. **Oncogene**, v. 29, n. 38, p. 5221-30, 2010.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, v. 29, n. 4, p. 530-8, 2003.

LIU, W.; TANG, Y.; FENG, J. Cross talk between activation of microglia and astrocytes in pathological conditions in the central nervous system. **Life Sci**, v. 89, n. 5-6, p. 141-6, Aug 2011.

MANAENKO, A. et al. Arginine-vasopressin V1a receptor inhibition improves neurologic outcomes following an intracerebral hemorrhagic brain injury. **Neurochem Int**, v. 58, n. 4, p. 542-8, 2011.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v. 348, n. 16, p. 1546-54, Apr 2003.

MC GUIRE, C.; BEYAERT, R.; VAN LOO, G. Death receptor signalling in central nervous system inflammation and demyelination. **Trends Neurosci**, v. 34, n. 12, p. 619-28, 2011.

MCGEER, P. L.; MCGEER, E. G. Glial reactions in Parkinson's disease. **Mov Disord**, v. 23, n. 4, p. 474-83, 2008.

MEMOS, N. et al. Administration of Human Protein-C concentrate prevents apoptotic brain cell death after experimental sepsis. **Brain Res**, v. 1264, p. 119-26, 2009.

MICHELS, M. et al. CD40-CD40 Ligand Pathway is a Major Component of Acute Neuroinflammation and Contributes to Long-term Cognitive Dysfunction after Sepsis. **Mol Med**, v. 21, p. 219-26, 2015.

MIGNOTTE, B.; VAYSSIERE, J. L. Mitochondria and apoptosis. **Eur J Biochem**, v. 252, n. 1, p. 1-15, Feb 1998.

MINAMI, T. et al. Roles of nitric oxide and prostaglandins in the increased permeability of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide. **Environ Toxicol Pharmacol**, v. 5, n. 1, p. 35-41, 1998.

MINTERN, J. D.; MACRI, C.; VILLADANGOS, J. A. Modulation of antigen presentation by intracellular trafficking. **Curr Opin Immunol**, v. 34, p. 16-21, 2015.

MORGENTHALER, N. G. et al. Copeptin, a stable peptide of the arginine vasopressin precursor, is elevated in hemorrhagic and septic shock. **Shock**, v. 28, n. 2, p. 219-26, 2007.

_____. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. **Clin Chem**, v. 52, n. 1, p. 112-9, Jan 2006.

MORRISON, H. W.; FILOSA, J. A. A quantitative spatiotemporal analysis of microglia morphology during ischemic stroke and reperfusion. **J Neuroinflammation**, v. 10, p. 4, 2013.

MUTLU, G. M.; FACTOR, P. Role of vasopressin in the management of septic shock. **Intensive Care Med**, v. 30, n. 7, p. 1276-91, 2004.

NAITO, Y. et al. Effects of interleukins on plasma arginine vasopressin and oxytocin levels in conscious, freely moving rats. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 174, n. 3, p. 1189-95, 1991.

NASKAR, K.; STERN, J. E. A functional coupling between extrasynaptic NMDA receptors and A-type K⁺ channels under astrocyte control regulates hypothalamic neurosecretory neuronal activity. **J Physiol**, v. 592, n. Pt 13, p. 2813-27, 2014.

NISHIOKU, T. et al. Detachment of brain pericytes from the basal lamina is involved in disruption of the blood-brain barrier caused by lipopolysaccharide-induced sepsis in mice. **Cell Mol Neurobiol**, v. 29, n. 3, p. 309-16, 2009.

OBERHOLZER, C. et al. Apoptosis in sepsis: a new target for therapeutic exploration. **FASEB J**, v. 15, n. 6, p. 879-92, 2001.

OBERMEIER, B.; DANEMAN, R.; RANSOHOFF, R. M. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. **Nat Med**, v. 19, n. 12, p. 1584-96, 2013.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; BASSO, P. J.; ROCHA, M. J. Cellular bioenergetics changes in magnocellular neurons may affect copeptin expression in the late phase of sepsis. **J Neuroimmunol**, v. 267, n. 1-2, p. 28-34, 2014.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. et al. Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, v. 258, n. 1-2, p. 10-6, 2013.

_____. Central NOS inhibition differentially affects vasopressin gene expression in hypothalamic nuclei in septic rats. **J Neuroimmunol**, v. 227, n. 1-2, p. 80-6, Oct 2010.

_____. Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis. **Neuroimmunomodulation**, v. 16, n. 1, p. 45-53, 2009.

PALMER, R. M.; MONCADA, S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 158, n. 1, p. 348-52, 1989.

PANCOTO, J. A. et al. Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Auton Neurosci**, v. 138, n. 1-2, p. 57-63, 2008.

PARK, E. J.; KWON, T. H. A Minireview on Vasopressin-regulated Aquaporin-2 in Kidney Collecting Duct Cells. **Electrolyte Blood Press**, v. 13, n. 1, p. 1-6, 2015.

PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, v. 328, n. 20, p. 1471-7, 1993.

PETTY, M. A.; LO, E. H. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. **Prog Neurobiol**, v. 68, n. 5, p. 311-23, 2002.

PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. **Cell Death Differ**, v. 6, n. 2, p. 99-104, 1999.

PÜNTENER, U. et al. Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. **J Neuroinflammation**, v. 9, p. 146, 2012.

RAFF, M. C. et al. Programmed cell death and the control of cell survival: lessons from the nervous system. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 695-700, 1993.

RIOS-SANTOS, F. et al. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligation and puncture sepsis. **Shock**, v. 19, n. 1, p. 61-5, 2003.

RIVEST, S. et al. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 223, n. 1, p. 22-38, 2000.

RYAN, S. O.; COBB, B. A. Roles for major histocompatibility complex glycosylation in immune function. **Semin Immunopathol**, v. 34, n. 3, p. 425-41, May 2012.

SAIJO, K.; GLASS, C. K. Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 775-87, 2011.

SCHAFER, D. P. et al. Microglia sculpt postnatal neural circuits in an activity and complement-dependent manner. **Neuron**, v. 74, n. 4, p. 691-705, 2012.

SCHULTZBERG, M. et al. Early major histocompatibility complex (MHC) class I antigen induction in hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei in trypanosome-infected rats. **J Neuroimmunol**, v. 24, n. 1-2, p. 105-12, 1989.

SHARP, F. R.; BERNAUDIN, M. HIF1 and oxygen sensing in the brain. **Nat Rev Neurosci**, v. 5, n. 6, p. 437-48, 2004.

SHARSHAR, T. et al. Circulating vasopressin levels in septic shock. **Crit Care Med**, v. 31, n. 6, p. 1752-8, 2003a.

_____. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Lancet**, v. 362, n. 9398, p. 1799-805, 2003b.

_____. Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. **Crit Care Med**, v. 30, n. 3, p. 497-500, 2002.

SHIOIRI, T. et al. Caspase-3 is activated and rapidly released from human umbilical vein endothelial cells in response to lipopolysaccharide. **Biochim Biophys Acta**, v. 1792, n. 10, p. 1011-8, 2009.

SMITH, J. A. et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in neurodegenerative diseases. **Brain Res Bull**, v. 87, n. 1, p. 10-20, 2012.

STOLLER, J. et al. Epidemiology of severe sepsis: 2008-2012. **J Crit Care**, Oct 2015.

TAJES, M. et al. The blood-brain barrier: structure, function and therapeutic approaches to cross it. **Mol Membr Biol**, v. 31, n. 5, p. 152-67, 2014.

TAKAHASHI, K.; ROCHFORD, C. D.; NEUMANN, H. Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. **J Exp Med**, v. 201, n. 4, p. 647-57, 2005.

TASKER, J. G. et al. Glial regulation of neuronal function: from synapse to systems physiology. **J Neuroendocrinol**, v. 24, n. 4, p. 566-76, 2012.

TIETZ, S.; ENGELHARDT, B. Brain barriers: Crosstalk between complex tight junctions and adherens junctions. **J Cell Biol**, v. 209, n. 4, p. 493-506, 2015.

TRENTZSCH, H. et al. The combination of polymicrobial sepsis and endotoxin results in an inflammatory process that could not be predicted from the independent insults. **J Surg Res**, v. 111, n. 2, p. 203-8, 2003.

UENO, M. et al. Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. **Nat Neurosci**, v. 16, n. 5, p. 543-51, 2013.

VIEIRA, A. A. et al. Obesity promotes oxidative stress and exacerbates sepsis-induced brain damage. **Curr Neurovasc Res**, v. 12, n. 2, p. 147-54, 2015.

VINCENT, J. L.; KORKUT, H. A. Defining sepsis. **Clin Chest Med**, v. 29, n. 4, p. 585-90, vii, 2008.

WAHAB, F. et al. Interleukin-1 receptor antagonist decreases cerebrospinal fluid nitric oxide levels and increases vasopressin secretion in the late phase of sepsis in rats. **Endocrine**, v. 49, n. 1, p. 215-21, 2015.

WILLIAMS, M. D. et al. Hospitalized cancer patients with severe sepsis: analysis of incidence, mortality, and associated costs of care. **Crit Care**, v. 8, n. 5, p. R291-8, Oct 2004.

WOLBURG, H. et al. Agrin, aquaporin-4, and astrocyte polarity as an important feature of the blood-brain barrier. **Neuroscientist**, v. 15, n. 2, p. 180-93, 2009.

ZEYNALOV, E. et al. Arginine-Vasopressin Receptor Blocker Conivaptan Reduces Brain Edema and Blood-Brain Barrier Disruption after Experimental Stroke in Mice. **PLoS One**, v. 10, n. 8, p. e0136121, 2015.