UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENFERMAGEM DE RIBEIRÃO PRETO

PATRÍCIA RENATA ROSSIN

Efeito da ketamina sobre a hipotensão induzida pelo choque endotoxêmico:
participação do óxido nítrico e vasopressina

Ribeirão Preto

2013

PATRÍCIA RENATA ROSSIN

Efeito da ketamina sobre a hipotensão induzida pelo choque endotoxêmico:
participação do óxido nítrico e vasopressina

Dissertação apresentada à Escola de
Enfermagem de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para obtenção do
título de Mestre em Ciências, Programa
Enfermagem Fundamental.

Linha de pesquisa: Ciência e tecnologia em
saúde

Orientador: Evelin Capellari Cárnio

Ribeirão Preto

2013

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.

Rossin, Patrícia Renata

Efeito da ketamina sobre a hipotensão induzida pelo choque endotoxêmico: participação do óxido nítrico e vasopressina.. Ribeirão Preto, 2013.

76 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Enfermagem Fundamental.

Orientador: Evelin Capellari Cárnio

1. choque séptico. 2. vasopressina. 3.óxido nítrico.
4.ketamina. 5.moxonidina.

ROSSIN, Patrícia Renata

Efeito da ketamina sobre a hipotensão induzida pelo choque endotoxêmico: participação do óxido nítrico e vasopressina.

Dissertação apresentada à Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciência, Programa Enfermagem Fundamental.

Aprovada em / /

Comissão Julgadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais **José Carlos e Helé Nice**, com todo o amor, pela orientação e apoio em todas as minhas escolhas e decisões.*

*Aos meus irmãos, **Iris e Evelyn**, pelo incentivo, companheirismo e amizade em todas as fases da minha vida.*

*A todos os **meus familiares**, pela torcida e compreensão pelos momentos em que não pude estar presente.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por me guiar em minhas decisões e por me dar força nos momentos em que mais precisei.

À minha orientadora Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio, pela amizade e por acreditar em mim e me guiar no caminho da ciência. A você, todo o meu respeito e admiração.

Ao Marcelo Batalhão, técnico do laboratório, pela imensurável ajuda na fase dos experimentos.

Aos amigos do laboratório, pelas conversas e por sempre me acalmarem e orientarem durante as fases do mestrado.

Aos técnicos do laboratório do Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues, pelo auxílio nas dosagens de vasopressina..

Aos meus cunhados, Leonel e Janaína, pelo apoio e incentivo.

Aos queridos amigos Gisele, Leandro, Josiane, Marcel e Priscila, pela amizade, companheirismo e por me impulsionarem em minhas conquistas.

Aos meus amigos do Hospital Estadual e do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, pela compreensão, pela troca de experiências e pela amizade.

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

(Madre Teresa)

RESUMO

ROSSIN, P. R. **Efeito da ketamina sobre a hipotensão induzida pelo choque endotoxêmico: participação do óxido nítrico e vasopressina.** 2013. 76f. Dissertação (Mestrado) – Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2013.

A fisiopatologia do choque séptico caracteriza-se por uma produção excessiva de mediadores inflamatórios, dentre eles o óxido nítrico (NO), conduzindo a uma hipotensão prolongada associada a um aumento inicial de vasopressina (AVP) e uma diminuição na fase tardia. A ketamina é um anestésico com propriedades cardioestimulatórias e anti-inflamatórias. O presente trabalho testou a hipótese de que a ketamina, através de suas propriedades anti-inflamatórias no choque séptico, teria uma ação inibitória sobre a síntese do óxido nítrico, favorecendo a liberação de AVP e preservando a função cardiovascular. O choque endotoxêmico foi induzido através de uma injeção i.v. de 1,5 mg/kg de lipopolissacarídeo (LPS) em ratos *Wistar* adultos machos. Após a injeção de LPS, um grupo de animais foi tratado com ketamina (10 mg/kg) e o grupo controle recebeu salina. A administração de LPS produziu uma queda significativa da pressão arterial média (PAM) ($p < 0,01$) associada a um aumento da frequência cardíaca (FC) ($p < 0,01$). Essas alterações foram acompanhadas por uma elevação significativa nas concentrações plasmáticas de AVP após duas horas ($p < 0,01$), seguida de queda nas próximas horas, e por uma elevação nas concentrações de NO plasmático ($p < 0,01$). Quando o LPS foi combinado à administração i.v. de ketamina, observou-se uma atenuação da hipotensão ($p < 0,01$) e uma potencialização na liberação de AVP ($p < 0,01$) pelo LPS. No entanto, a produção de NO após a administração da ketamina não mostrou diferença em relação ao LPS, indicando não ser esta a via utilizada pela ketamina. Para verificar o papel da ativação simpática na preservação da função cardiovascular pela ketamina no choque endotoxêmico, utilizou-se um inibidor simpático central, a moxonidina (MOXO). O pré-tratamento i.v. com MOXO (50 µg /Kg) atenuou significativamente o aumento da FC produzido pela ketamina ($p < 0,05$) apenas na segunda e quarta horas, porém com ação não significativa sobre a PAM. Estes dados sugerem um efeito cardioestimulatório da ketamina no choque séptico

principalmente por uma potencialização na liberação da AVP e esta parece não se dar pela via do NO.

Palavras-chave: Choque séptico. Vasopressina. Óxido nítrico. Ketamina. Moxonidina.

ABSTRACT

ROSSIN, P. R. **Effect of ketamine on the hypotension induced endotoxemic shock: role of nitric oxide and vasopressin.** In 2013. 76p. Dissertation (MSc) - Nursing School of Ribeirão Preto, University of São Paulo, in 2013.

The pathophysiology of septic shock is characterized by excessive production of inflammatory mediators, including nitric oxide (NO), leading to a prolonged hypotension associated with an initial increase of vasopressin (AVP) and a late phase decrease. Ketamine is an anesthetic with cardiostimulatory and anti-inflammatory properties. The present study tested the hypothesis that ketamine, through its anti-inflammatory properties in septic shock, have an inhibitory effect on the synthesis of nitric oxide, promoting the release of AVP and preserving cardiovascular function. Endotoxemic shock was induced by an iv injection of 1.5 mg / kg lipopolysaccharide (LPS) in adult male *Wistar* rats. After LPS injection, a group of animals was treated with ketamine (10 mg / kg) and the control group received saline. The LPS administration produced a significant decrease in mean arterial pressure (MAP) ($p < 0.01$) associated with an increase in heart rate (HR) ($p < 0.01$). These changes were accompanied by significant increases in plasma AVP after two hours ($p < 0.01$), followed by fall in the coming hours, and plasma NO increasing ($p < 0.01$). When LPS was combined with iv ketamine administration, there was an attenuation of hypotension ($p < 0.01$) and an enhancement in the release of AVP ($p < 0.01$) by LPS. However, the production of NO after ketamine administration showed no difference compared to LPS, indicating this is not the route used by ketamine. To verify the role of sympathetic activation in ketamine's preservation of cardiovascular function in endotoxemic shock, used a central sympathetic inhibitor, moxonidine (moxo). Pretreatment with moxo iv (50 μ g / kg) significantly attenuated the increase in HR produced by ketamine ($p < 0.05$) only in the second and fourth hour, but with no significant action on the MAP. These data suggest that the cardiostimulatory effect of ketamine in septic shock primarily occurs by potentiation of AVP release, and this does not seem to give the NO pathway.

Keywords: Septic shock. Vasopressin. Nitric oxide. Ketamine. Moxonidine.

RESUMEN

ROSSIN, P. R. **Efecto de la ketamina en la hipotensión inducida por choque endotoxémico: papel del óxido nítrico y la vasopresina.** En 2013. 76f. Tesis (Maestría) - Escuela de Enfermería de Ribeirão Preto de la Universidad de São Paulo, en 2013.

La fisiopatología del choque séptico se caracteriza por la producción excesiva de mediadores inflamatorios, incluyendo el óxido nítrico (NO), que conducen a una hipotensión prolongada asociada con un aumento inicial de la vasopresina (AVP) y una disminución en la fase tardía. La ketamina es un anestésico con propiedades cardioestimulante y propiedades anti-inflamatorias. El presente estudio prueba la hipótesis de que la ketamina, a través de sus propiedades anti-inflamatorias en el choque séptico, tiene un efecto inhibitor sobre la síntesis de óxido nítrico, la promoción de la liberación de AVP y la preservación de la función cardiovascular. El choque endotoxémico fue inducido por una inyección iv de 1,5 mg / kg de lipopolisacárido (LPS) en ratas *Wistar* macho adultas. Después de la inyección de LPS, un grupo de animales fue tratado con ketamina (10 mg / kg) y el grupo de control recibió solución salina. La administración de LPS produjo una disminución significativa en la presión arterial media (PAM) ($p < 0,01$) asociado con un aumento en la frecuencia cardíaca (FC) ($p < 0,01$). Estos cambios fueron acompañados por aumentos significativos en la AVP plasmática después de dos horas ($p < 0,01$), seguido por la caída en las próximas horas, y la elevación de plasma de NO ($p < 0,01$). La administración de LPS produjo una disminución significativa en la presión arterial media (PAM) ($p < 0,01$) asociado con un aumento en la frecuencia cardíaca (FC) ($p < 0,01$) y un aumento significativo de la AVP plasma después de dos horas ($p < 0,01$). La producción de NO también ha aumentado significativamente plasma a la cuarta hora ($p < 0,01$). Cuando LPS se combina con la administración iv de ketamina, hubo una atenuación de la hipotensión ($p < 0,01$) y una mejora en la liberación de AVP ($p < 0,01$) por LPS. Sin embargo, la producción de NO después de administración la ketamina mostró ninguna diferencia en comparación con LPS, lo que indica que esto no es la ruta utilizada por la ketamina. Para verificar el papel de

la activación simpática en la preservación de la función cardiovascular por la ketamina en endotoxémico choque, se utiliza un inhibidor simpático central, moxonidina (moxo). El pretratamiento con moxo iv (50 µg / kg) atenuó significativamente el incremento de la FC producido por ketamina ($p < 0,05$) sólo en la segunda y cuarta hora, pero con ninguna acción significativa en el PAM. Estos datos sugieren que el efecto cardioestimulante de la ketamina en lo choque séptico se produce principalmente en una potenciación de la liberación de AVP, y esto no parece dar el NO vía.

Palabras clave: Choque séptico. Vasopresina. Óxido nítrico. Ketamina. Moxonidina.

LISTA DE ABREVIATURAS

ACCP - American College of Chest Physicians

AVP – arginina vasopressina

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais

eNOS - óxido nítrico sintase endotelial

EUA – Estados Unidos da América

FC – frequência cardíaca

Δ FC – variação da frequência cardíaca

HDL – lipoproteína de alta densidade

^{125}I – iodo 125

i.c.v. – intracerebroventricular

IFN- γ – interferon gama

IL – interleucina

iNOS - óxido nítrico sintase induzida

ILAS – Instituto Latino Americano de Sepsis

i.v. – intravenosa

KET – ketamina

LBP – proteína ligadora do LPS

LPS – lipopolissacarídeo

LT – leucotrieno

LTA – ácido lipoteicoico

MODS – Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos

MOXO – moxonidina

MnPO - núcleo pré-óptico mediano

mRNA – RNA mensageiro

n – número de animais

NFκ-B – fator nuclear kappa-B

nNOS - óxido nítrico sintase neuronal

NO – óxido nítrico

NO₂ - dióxido de nitrogênio

NO₃⁻ – nitrato

NOS - óxido nítrico sintase

NTS - núcleo do trato solitário

O₃ – ozônio

OVLT - órgão vascular da lâmina terminal

PAF – fator ativador de plaquetas

PAM – pressão arterial média

ΔPAM – variação da pressão arterial média

PG – prostaglandina

PIRO - Predisposition, Insult infection, Response, Organ dysfunction

PVN – núcleo paraventricular

RI1 - receptores imidazólicos do subtipo 1

RIE – radioimunoensaio

RVLM - medula rostral ventro-lateral

SAL – salina

SCCM - Society of Critical Care Medicine

SFO - órgão subfornicial

SIRS – Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SNC – sistema nervoso central

SON – núcleo supraóptico

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

\$US – dólar

UTI – Unidade de Terapia Intensiva

Lista de Figuras

Figura 1A. Efeito da administração de salina ou LPS sobre a variação da pressão arterial média (Δ PAM). Erro! Indicador não definido.

Figura 1B. Efeito da administração de salina ou LPS sobre a variação da frequência cardíaca (Δ FC). Erro! Indicador não definido.

Figura 1C. Efeito da administração de salina ou LPS sobre as concentrações plasmáticas de AVP. Erro! Indicador não definido.

Figura 1D. Efeito da administração de salina ou LPS sobre as concentrações de nitrato plasmático. Erro! Indicador não definido.

Figura 2A. Efeito da administração da ketamina (10 mg/kg) sobre a PAM no choque endotoxêmico. Erro! Indicador não definido.

Figura 2B. Efeito da administração da ketamina (10 mg/kg) sobre a FC no choque endotoxêmico. Erro! Indicador não definido.

Figura 2C. Efeito da administração da ketamina (10 mg/kg) sobre as concentrações plasmáticas de AVP no choque endotoxêmico. Erro! Indicador não definido.

Figura 2D. Efeito da administração da ketamina (10 mg/kg) sobre as concentrações de nitrato plasmático no choque endotoxêmico. Erro! Indicador não definido.

Figura 3A. Efeito do pré-tratamento com a moxonidina (50 μ g /Kg) sobre a PAM nos animais injetados com salina + salina. Erro! Indicador não definido.

Figura 3B. Efeito do pré-tratamento com a moxonidina (50 μ g /Kg) sobre a FC nos animais injetados com salina + salina. Erro! Indicador não definido.

Figura 3C. Efeito do pré-tratamento com a moxonidina (50 μ g /Kg) sobre a ação da ketamina na hipotensão induzida pelo LPS..... Erro! Indicador não definido.

Figura 3D. Efeito do pré-tratamento com a moxonidina (50 μ g /Kg) sobre a ação da ketamina na taquicardia induzida pelo LPS..... Erro! Indicador não definido.

SUMÁRIO

1- INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Epidemiologia da sepse	19
1.2. Definições.....	20
1.3. Fisiopatologia da sepse	22
1.4. Modelos de sepse experimental	23
1.5. Arginina Vasopressina	24
1.6. Vasopressina e choque séptico	25
1.7. Óxido nítrico e choque séptico.....	26
1.8. Ketamina e choque séptico	28
1.9. Inibidor do Sistema Nervoso Simpático.....	31
2- OBJETIVOS.....	32
2.1. Objetivo geral	33
2.2. Objetivos específicos	33
3- MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1. Animais	35
3.2. Preparo dos animais.....	35
3.2.1. Procedimento de canulação da artéria femoral direita	36
3.2.2. Procedimento de canulação da veia jugular direita	37
3.3. Drogas.....	38
3.4. Indução do choque séptico.....	38
3.5. Protocolos experimentais.....	38
3.5.1. Protocolos experimentais para inibição simpática	39
3.6. Determinação da Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca.....	40
3.7. Dosagem hormonal e de nitrato plasmático	40
3.7.1. Coleta de sangue.....	40
3.7.2 Dosagem do hormônio vasopressina	40
3.7.3. Dosagem indireta do NO plasmático através do nitrato plasmático.....	42
3.8. Análise estatística	43
4- RESULTADOS.....	44

5- <i>DISCUSSÃO</i>	54
6- <i>CONCLUSÃO</i>	61
<i>REFERÊNCIAS</i>	63
<i>ANEXO</i>	75

1- INTRODUÇÃO

A sepse é uma síndrome clínica, resultado da complicação de uma infecção grave, geralmente de origem bacteriana, e que se caracteriza por uma inflamação sistêmica e lesão tecidual generalizada. As primeiras descrições de bactérias se deram em meados de 1680 por Leeuwenhock, mas apenas duzentos anos depois, com Pasteur e Koch, que a conexão entre bactérias e infecção foi feita. Finalmente, em 1914, Schottmueller descreveu que a liberação de patógenos na circulação sanguínea era a responsável pelos sinais e sintomas sistêmicos observados nas infecções (VINCENT; ABRAHAM, 2006).

Nos últimos cem anos, muito se avançou no conhecimento da sepse, de sua fisiopatologia, epidemiologia, diagnóstico e estratégias terapêuticas. Apesar disso, suas taxas de prevalência e mortalidade permanecem extremamente altas, sendo a sepse grave e o choque séptico umas das principais causas de morte em unidades de terapia intensiva (UTI) em todo o mundo (ALBERTI et. al., 2002; ANNANE et. al., 2003; ESPER; MARTIN, 2007; FLAATEN, 2004; MARTIN et al., 2003) e a décima principal causa de morte nos Estados Unidos (EUA) (HERON et al., 2009).

1.1. Epidemiologia da sepse

Segundo estudos americanos, a sepse e a sepse grave ocorrem em aproximadamente 2% de todas as hospitalizações nos EUA e em mais de 75% das hospitalizações em UTIs, ocupando cerca de 50% dos leitos intensivos, e apresentam uma taxa de mortalidade que varia de 20-50% (ANGUS et. al., 2001; DOMBROVSKIY et al., 2007; ESPER; MARTIN, 2007). A estimativa nacional para a sepse grave é de 751.000 casos/ano nos EUA, sendo que cada paciente consome,

durante sua hospitalização, cerca de \$US 22.000, o correspondente a aproximadamente \$US 17 bilhões anuais (ANGUS et. al., 2001).

No Brasil, a situação não é diferente. Em um estudo multicêntrico realizado em UTIs das regiões Sul e Sudeste nos anos de 2001/2002, foi encontrada uma incidência de sepse de aproximadamente 57/1000 pacientes hospitalizados e uma taxa de mortalidade que aumentou conforme o grau de gravidade, chegando a 52,2% no choque séptico (SILVA et al., 2004). Em outro estudo multicêntrico, conduzido pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) em pacientes adultos sépticos admitidos em 21 UTIs de hospitais públicos e privados no Brasil entre os anos 2003/2004, a taxa total de mortalidade foi de 43,8%. Este estudo também mostrou uma mediana de gastos totais durante a hospitalização de \$US 9.632 por paciente, contabilizando um gasto diário com UTI de \$US 934 por paciente (SOGAYAR et al., 2008). Dessa forma, a sepse tem representado um pesado fardo para os sistemas de saúde em todo o mundo, tanto do ponto de vista econômico como social.

1.2. Definições

Com o objetivo de oferecer uma definição prática da resposta inflamatória à infecção e melhorar a capacidade de se reconhecer a doença e de se poder intervir com uma terapêutica precocemente, a *American College of Chest Physicians* e *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) realizaram, em 1991, uma Conferência de Consenso de Sepse.

Nesta conferência foi sugerida uma estratificação de gravidade para a sepse e introduzido o termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) para

descrever a reação inflamatória sistêmica desencadeada pelo organismo frente a qualquer agressão infecciosa (causada por bactérias, fungos, vírus ou parasitas) ou não-infecciosa (como trauma, isquemia, queimaduras, pancreatite). A SIRS pode ser clinicamente definida pela instalação de duas ou mais das seguintes condições: 1) temperatura $> 38^{\circ}\text{C}$ ou $< 36^{\circ}\text{C}$; 2) frequência cardíaca $> 90\text{bpm}$; 3) frequência respiratória > 20 movimentos/min ou $\text{PaCO}_2 < 32\text{mmHg}$; 4) contagem dos leucócitos totais no sangue periférico $> 12.000/\text{mm}^3$ ou $< 4.000/\text{mm}^3$, ou ainda, presença de $> 10\%$ de formas imaturas (BONE et al., 1992).

A Sepsé foi definida como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) frente a um estímulo infeccioso. Quando a sepsé está associada a uma disfunção orgânica, como hipotensão arterial, lesão pulmonar aguda, oligúria, aumento de creatinina, hiperbilirrubinemia direta, plaquetopenia ou alteração do estado mental, o quadro é definido como Sepsé grave. O Choque séptico foi caracterizado como uma sepsé grave na qual a vasodilatação arteriolar e a hipotensão arterial são refratárias à reposição volêmica (vasoplegia), necessitando de drogas vasopressoras para restabelecer a pressão arterial. A hipotensão e a hipoperfusão tecidual podem levar a um quadro mais grave de alteração na função orgânica, que resulta em disfunção e até falência dos órgãos, denominada Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (MODS) (BONE et al., 1992; DELLINGER et al., 2008; LEVY et al., 2003).

Entretanto, diante da multifatorialidade desta condição, essa estratificação ainda foi considerada muito simplista. Em 2001 foi realizada uma nova conferência com o objetivo de revisar as definições propostas pelo Consenso de 1991. Nesta conferência, como forma de complementar as definições anteriormente sugeridas, foi introduzido o conceito de “PIRO” (*Predisposition, Insult infection, Response, Organ dysfunction*), o qual considera, além da resposta inflamatória, também outros

fatores que podem contribuir para o desenvolvimento e o desfecho do quadro séptico, como co-morbididades, idade, fatores genéticos, o processo infeccioso (tipo de microorganismo e local da infecção) e a função dos órgãos ou o grau de acometimento dos mesmos. No entanto, o conceito de PIRO ainda é muito rudimentar, sendo necessários mais testes e estudos para seu refinamento e para que possa ser aplicado na prática clínica (DELLINGER et al., 2008; LEVY et al., 2003).

1.3. Fisiopatologia da sepse

A patogênese da sepse envolve um processo complexo de ativação celular, resultando na liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas, ativação de neutrófilos, monócitos e células do endotélio microvascular, envolvimento de reflexos neuroendócrinos e ativação dos sistemas complemento, de coagulação e fibrinolítico (VINCENT; ABRAHAM, 2006).

A resposta inflamatória é, geralmente, causada pela ação de componentes da parede de bactérias como o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas, ou o ácido lipoteicóico (LTA) das gram-positivas, embora também possa ser causada por fungos, vírus e parasitas (HANNA, 2003; PARRILLO, 1993; THIEMERMANN, 1997).

A resposta desencadeada pelas bactérias gram-negativas é iniciada quando estas são rompidas ocorrendo a liberação do LPS (GLAUSER et al., 1991; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991). O LPS liga-se primeiramente à lipoproteína de alta densidade (HDL), e posteriormente, à proteína ligadora do LPS (LBP), sintetizada e liberada pelo fígado, formando o complexo LPS-LBP, que transfere o

LPS do HDL para o CD14 e receptores de membrana como os *Toll-like*, presentes principalmente na superfície de macrófagos/monócitos e neutrófilos (KARIMA et al., 1999, VINCENT; ABRAHAM, 2006).

A ativação destes receptores induz a transcrição de genes da resposta imune e inflamatória, geralmente por mecanismos mediados pelo fator nuclear kappa-B (NFk-B), resultando na liberação de vários mediadores inflamatórios (VINCENT; ABRAHAM, 2006), como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, interferon- γ (IFN- γ), fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) e óxido nítrico (NO), levando a uma amplificação da resposta inflamatória (BENJAMIM et al., 2000; BENJAMIM et al., 2005; BONE, 1991; HORN, 1998; KARIMA et al., 1999; RIOS-SANTOS et al., 2003). Esses mediadores excessivamente liberados favorecem o comprometimento endotelial, provocam vasodilatação periférica, hipovolemia, danos teciduais, ativação do sistema complemento e a evolução do quadro séptico que pode levar à morte (BONE, 1991; HANNA, 2003; MAMMEN, 1998).

1.4. Modelos de sepse experimental

Os modelos animais que retratam a sepse têm trazido inúmeras contribuições para a compreensão de sua fisiopatologia, apesar de não representarem de forma idêntica o curso fisiopatológico que ocorre clinicamente na sepse em humanos. Existem diversos modelos experimentais para o estudo da sepse, sendo o modelo de injeção de toxinas, como o LPS, um dos modelos mais utilizados (CARNIO et al., 2005; DYSON; SINGER, 2009; GIUSTI-PAIVA et al., 2002; GIUSTI-PAIVA et al., 2004; TANIGUCHI; SHIBATA; YAMAMOTO, 2001). Neste modelo, denominado

choque endotoxêmico, a administração de endotoxina em animais, mimetiza os sintomas de sepse e choque séptico, desencadeando uma variedade de respostas no organismo (RACKOW; ASTIZ, 1991).

1.5. Arginina Vasopressina

A arginina vasopressina (AVP) é um hormônio nonapeptídeo com uma ponte dissulfeto entre dois aminoácidos cisteína (BRANN et al., 1997). É sintetizada nos corpos celulares dos neurônios magnocelulares localizados nos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) do hipotálamo, sendo transportada ao longo de seus axônios até a neurohipófise, onde é armazenada em grânulos para ser secretada para a circulação após estímulo adequado (BARBERIS; MOUILLAC; DURROUX, 1998; CUNNINGHAM, SAWCHENKO, 1991).

A vasopressina é um hormônio que tem um importante papel na regulação da pressão arterial sangüínea e na osmolalidade plasmática, ativando duas diferentes classes de receptores, V1 e V2. Os receptores V1 estão presentes principalmente no músculo liso vascular e participam da vasoconstrição. Os receptores V2, nas células dos ductos coletores renais e em células endoteliais e participam da antidiurese (BEISHUIZEN; THIJS, 2003)

Os principais estímulos para a secreção de AVP são o aumento da osmolalidade plasmática, hipotensão ou hipovolemia grave (CUNNINGHAM, SAWCHENKO, 1991; KADEKARO et al., 1992). Além disso, sua liberação também pode ser regulada por mediadores inflamatórios, como PGs, NO, TNF- α , IL-1 e IL-6 (LANDGRAF et al., 1995; PALIN et al., 2009).

Alguns desses estímulos atuam via osmorreceptores ou barorreceptores. Quando há um aumento na osmolalidade plasmática, a secreção de AVP aumenta pela ativação dos osmorreceptores hipotalâmicos, localizados nas regiões dos órgãos circunventriculares desprovidas de barreira hematoencefálica, principalmente o órgão subfornicial (SFO) e o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT). Quando há queda na pressão arterial, os barorreceptores localizados no seio carotídeo e arco aórtico iniciam um arco reflexo através dos nervos vago e glossofaríngeo até o sistema nervoso central (SNC), principalmente pelo núcleo do trato solitário (NTS), que possui conexões com o PVN e SON, resultando no aumento da secreção de AVP. Quando há diminuição do volume plasmático, essa informação é detectada pelos barorreceptores atriais que, por mecanismos reflexos, estimulam a liberação de AVP, restaurando o volume plasmático a níveis normais (CUNNINGHAM; SAWCHENKO, 1991; DUNN et al., 1973; MCKINLEY et al., 2004).

1.6. Vasopressina e choque séptico

A liberação excessiva de mediadores inflamatórios durante a sepse pode direta ou indiretamente atingir o SNC e ativar neurônios envolvidos em diferentes funções orgânicas, como autonômicas e neuroendócrinas (CARNIO et al., 2006; ENGBLOM et al., 2002; KOVACS, 2002; MCCANN et al., 2000), podendo alterar o eixo hipotálamo-hipófise, inibindo ou estimulando a liberação de vários hormônios ali produzidos, como a AVP (CARNIO et al., 2006; CORREA et al., 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009; PANCOTO et al., 2008).

Estudo conduzido por Landry e colaboradores (1997) mostrou que, para valores similares de pressão sangüínea, pacientes com choque séptico

apresentavam uma menor concentração plasmática de AVP, comparados a pacientes com choque cardiogênico, e que essa concentração inadequada de AVP se deve a uma alteração na secreção do hormônio, não estando relacionada a um aumento de seu metabolismo. Estes achados sugerem que, alterações nas concentrações plasmáticas de AVP não são devidas a mudanças na pressão arterial sangüínea, mas sim a um mecanismo especificamente relacionado ao choque induzido pela endotoxemia (LANDRY et al., 1997).

Estudos clínicos e experimentais de sepse mostram um comportamento bifásico da AVP, com elevadas concentrações plasmáticas na fase inicial, seguida de rápida queda nas próximas horas. Assim, apesar da significativa queda da pressão arterial, a secreção de AVP diminui e suas concentrações permanecem inadequadamente baixas, contribuindo para a manutenção da hipotensão e do choque vasodilatador (CORREA et al., 2007; GIUSTI-PAIVA et al., 2003a; LANDRY et al., 1997; PANCOTO et al., 2008; SHARSHAR et al., 2003).

Algumas hipóteses propostas para essa secreção inadequada de AVP na sepse são: depleção dos estoques secretórios do hormônio na neuro-hipófise (OLIVEIRA-PELEGRIIN et al., 2009); insuficiência autonômica (HOLMES et al., 2001; PANCOTO et al., 2008) e redução da secreção do hormônio por liberação excessiva de óxido nítrico (CARNIO et al., 2006; CORREA et al., 2007; GIUSTI-PAIVA et al., 2002; GIUSTI-PAIVA et al., 2003b; HOLMES et al., 2001).

1.7. Óxido nítrico e choque séptico

O óxido nítrico é um mensageiro celular gasoso, que participa no controle de diversas funções fisiológicas, como regulação do tônus vascular, transmissão

neuronal e modulação de reações imunológicas e inflamatórias. Possui uma meia-vida curta (de poucos segundos) e, em condições fisiológicas, é um gás de passagem livre pelas membranas celulares, não necessitando de receptores (FEHIL; WAEBER; LIAUDET, 2001; MURAD, 1998). O NO é sintetizado a partir da oxidação do aminoácido L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) (MONCADA, HIGGS, 1993).

Três isoformas de NOS foram identificadas: a óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), inicialmente identificada em neurônios, estando envolvida na neurotransmissão (WANG; NEWTON; MARSDEN, 1999); a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS), inicialmente identificada em células endoteliais e que apresenta importante função na regulação do tônus vascular e fluxo sangüíneo (HANDA; STEPHEN; CEPINSKAS, 2008; HUTTUNEN et al., 2009); e a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), cuja expressão é regulada por citocinas e produtos bacterianos (CLEMENTI, 2003; GELLER; BILLIAR, 1998), podendo ser induzida em diversos tipos celulares em resposta à infecção. (BANDALETTOVA et al., 1993; MCLAREN et al., 2009). A iNOS possui importante papel na fisiopatologia da sepse.

Durante a fase inicial da sepse, o NO tem papel benéfico, mediando a vasodilatação e aumentando o fluxo sangüíneo na microcirculação, prevenindo adesão plaquetária e leucocitária e aumento da defesa do hospedeiro devido sua atividade bactericida e tumoricida. No entanto, na fase tardia, provavelmente quando se inicia também a ativação da iNOS, a produção de NO torna-se exagerada e deletéria, contribuindo muito para as características fisiopatológicas da sepse, como intensa vasodilatação periférica, severa hipotensão, vasoplegia, disfunção miocárdica, falência no rolamento de leucócitos e redução na migração de

neutrófilos para o foco inflamatório (FEIHL; WAEBER; LIAUDET, 2001; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991; RIOS-SANTOS et al., 2007; THIEMERMANN, 1997)

A fisiopatologia do choque séptico também envolve a ação do NO no SNC. Em estudo de Wong e colaboradores (1996), a presença de RNA mensageiro (mRNA) da iNOS foi detectado em diversas regiões do cérebro já na segunda hora após a indução da endotoxemia. Vários estudos com modelos experimentais de sepse têm demonstrado uma ação inibitória do NO sobre os neurônios vasopressinérgicos do PVN e SON do hipotálamo, sugerindo um papel modulador inibitório do NO sobre a secreção de AVP, o que contribui para a manutenção da hipotensão observada (CARNIO et al., 2006; GIUSTI-PAIVA et al., 2002; GIUSTI-PAIVA et al., 2005; ROCHA; OLIVEIRA-PELEGRIN; FARIAS-CORREA, 2006; TERRELL et al., 2003). Dessa forma, torna-se cada vez mais evidente a participação do NO na regulação do balanço hídrico e da pressão sanguínea na sepse.

1.8. Ketamina e choque séptico

A ketamina é um anestésico geral dissociativo de rápida ação, com uma meia-vida plasmática de 2 - 3 horas. Sendo um fármaco muito lipossolúvel, é distribuído para os tecidos altamente irrigados, incluindo o cérebro, fígado e rins, onde atinge concentrações quatro a cinco vezes superiores à do plasma (DUARTE, 1994).

A ketamina tem sido amplamente indicada para uso em pacientes sépticos ou graves com comprometimento cardiovascular, devido a suas propriedades cardioestimulatórias (LIPPMANN et al., 1983; TANIGUCHI et al., 2003; YLI-HANKALA et al., 1992; ZAUSIG et al., 2009). Esta recomendação baseia-se

principalmente em suas ações em aumentar a atividade do sistema nervoso simpático, que tende a manter a pressão sangüínea e preservar a função cardiovascular (WAXMAN; SHOEMAKER; LIPPMANN, 1980; WHITE; WAY; TREVOR, 1982).

Aparentemente, a ketamina exerce suas ações simpatomiméticas primariamente por estimulação direta de estruturas do SNC (IVANKOVICH et. al., 1974; WHITE; WAY; TREVOR, 1982), bloqueando a inibição tônica barorreceptora nestes neurônios (WANG et al., 2001).

Além de suas ações em preservar a função cardiovascular, a ketamina parece apresentar também outras vantagens em relação à fisiopatologia da sepse. Takenaka e colaboradores (1994) foram os primeiros a mostrar em seu estudo propriedades antiinflamatórias da ketamina, inibindo a produção de TNF- α na sepse induzida pelo LPS, tanto em camundongos *in vivo*, quanto em macrófagos *in vitro*. Em 1995, Koga e colaboradores (1995) mostraram que a ketamina levou, além da diminuição na atividade desta citocina, a uma redução na mortalidade induzida pela endotoxemia.

Outros autores também descreveram a ação da ketamina na inibição da produção de citocinas inflamatórias, como o TNF- α , IL-6 e IL-8, e do NF κ -B (que se acredita ser responsável pela transcrição dessas citocinas) em outras células inflamatórias, em resposta à endotoxemia induzida, como em culturas de células inflamatórias do sangue de camundongos (LARSEN et al., 1998) e de humanos (KAWASAKI et al., 1999; KAWASAKI et al., 2001), em células mesangiais (JIMI et al., 1997), em células gliais humanas (SAKAI et al., 2000) e em monócitos (YU et al., 2002). Essas propriedades antiinflamatórias da ketamina também foram descritas

em modelos de choque séptico *in vivo* (SAKAI et al., 2000; SONG et al., 2006; SUN et al., 2004; TANIGUCHI; SHIBATA; YAMAMOTO, 2001; TANIGUCHI et al., 2003; YU et al., 2007).

Alguns estudos descrevem uma ação dose-dependente da ketamina na sepse (KAWASAKI et al., 1999; KOGA et al., 1995; WEIGAND et al., 2000). No entanto, estudos mais recentes (SUN et al., 2004; TANIGUCHI et al., 2003) têm mostrado uma ação dose-independente desta droga, sendo que a dose de 10mg/Kg foi a que mostrou efeitos mais favoráveis quanto à hipotensão, acidose metabólica, resposta das citocinas e taxas de mortalidade (TANIGUCHI et al., 2003).

A ação da ketamina sobre a produção de NO ainda é contraditória. Shimaoka e colaboradores (1996) e Li e colaboradores (1997) encontraram uma ação inibidora da ketamina sobre a produção de NO em macrófagos, que relacionam à inibição do TNF- α pela ketamina, um fator estimulatório autócrino para a produção de NO. Entretanto, em estudo com sepse induzida pelo LPS em cultura de células gliais (astrócitos e micróglia), responsáveis por mediar as respostas imune e inflamatória no SNC, a ketamina reduziu a produção de TNF- α sem alterar a liberação de NO (SHIBAKAWA et al., 2005).

Dessa forma, o presente trabalho foi delineado para confirmar a hipótese de que a ketamina, através de suas propriedades anti-inflamatórias, estimula a liberação de AVP no choque séptico através de uma ação inibitória sobre a síntese de óxido nítrico (NO).

1.9. Inibidor do Sistema Nervoso Simpático

Os inibidores do sistema simpático sempre agem, embora em locais distintos, no sentido de impedir que a neurotransmissão adrenérgica chegue à célula efetora (vasos, coração, rins, etc.), impedindo a elevação da pressão arterial (TAVARES; PLAVNIK, 1998).

A moxonidina é um inibidor simpático central com alta afinidade de ligação com os receptores imidazolínicos do subtipo 1 (RI1) localizados na medula rostral ventro-lateral (RVLM), com pouca afinidade pelo receptor central $\alpha 2$. Essa particularidade confere a essa droga menos efeitos indesejáveis que os outros inibidores centrais, como a clonidina (MESSERLI, 2000; PRICHARD; OWENS; GRAHAM, 1997; TAVARES; PLAVNIK, 1998). No entanto, a hipotensão produzida por essas drogas de ação central ainda não está completamente compreendida.

A ação da moxonidina em diminuir a atividade simpática é demonstrada pela redução nos níveis de adrenalina, noradrenalina e renina provocada por ela em humanos (MESSERLI, 2000; PRICHARD; OWENS; GRAHAM, 1997). Em estudo de Peng e colaboradores (2009), uma dose de 50 $\mu\text{g/kg}$ administrada via intravascular em ratos, produziu uma queda prolongada na pressão sanguínea e frequência cardíaca, sendo esta a dose utilizada em nosso trabalho.

No presente estudo, a moxonidina foi utilizada para avaliar a participação da estimulação simpática nas propriedades cardioestimulatórias da ketamina.

2- OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da ketamina sobre a hipotensão e as concentrações plasmáticas de AVP e NO induzidas pelo choque séptico.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da administração da ketamina sobre a hipotensão induzida pelo choque endotoxêmico;
- Avaliar o efeito da ketamina sobre as concentrações plasmáticas de AVP no choque endotoxêmico;
- Avaliar o efeito da ketamina sobre as concentrações plasmáticas de NO no choque endotoxêmico;
- Correlacionar as concentrações plasmáticas de NO e de AVP após administração de ketamina no choque endotoxêmico;
- Avaliar a participação do sistema nervoso simpático sobre as alterações cardiovasculares induzidas pela ketamina no choque endotoxêmico.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados ratos *Wistar* adultos machos, pesando entre 200-350g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e expostos diariamente a um ciclo claro/escuro de 12:12 horas, com livre acesso à água e ração comercial balanceada. Foram mantidos em caixas plásticas com tampa aramada (5 animais por caixa), com dimensão de 1.360 cm^2 , até transferência para caixas individuais no dia anterior ao experimento. Cada caixa foi acondicionada em uma estante ventilada (Alesco Ind. E Comércio Ltda., Monte Mor, SP, Brasil), que permite o controle da iluminação, temperatura e estímulos ambientais com ciclo de claro/escuro.

Todos os protocolos experimentais foram delineados de acordo com as regras do Comitê de Ética local da Universidade de São Paulo (Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA), o qual foi aprovado conforme o protocolo nº 11.1.324.53.4 (Anexo). Cada animal foi utilizado em apenas uma sessão experimental.

3.2. Preparo dos animais

No dia anterior ao experimento, os animais foram submetidos à anestesia geral através de uma injeção intraperitoneal de 2,5% (1ml/100g de peso corporal) de 2,2,2-tribromoethanol (Aldrich, Milwaukee, WI). Os animais utilizados para as medidas de pressão arterial e frequência cardíaca tiveram a artéria femoral direita e a veia jugular externa direita canuladas. Os animais utilizados para dosagem de AVP e nitrato plasmático tiveram apenas a veia jugular externa direita canulada para as injeções endovenosas.

3.2.1. Procedimento de canulação da artéria femoral direita

Foram utilizadas cânulas confeccionadas de tubos de polietileno (Intramedic®, Becton Dickinson and Co, Sparks, MD, EUA), compostos por um segmento de PE-10 de 4,5 cm de comprimento e diâmetros interno de 0,3 mm e externo de 0,6 mm, ligado a outro segmento de PE-50 de 18,0 cm de comprimento.

Após tricotomia das regiões inguinal direita e interescapular, o animal foi fixado em uma mesa cirúrgica. Uma incisão transversal de 1,0 cm foi feita na região inguinal direita, e após a musculatura ser retraída, a artéria femoral direita foi exposta, separada e individualizada do tecido conjuntivo ao seu redor. Em seguida, foi realizada uma ligadura na parte distal e a parte proximal foi tracionada. Uma pequena incisão foi feita na parede superior da artéria, por onde a cânula foi introduzida, e permitindo a esta progredir 4,5 cm em direção à aorta abdominal. Sua fixação no local foi feita por ligaduras com fios de algodão. A extremidade distal da cânula foi exteriorizada na região interescapular, através de um trajeto subcutâneo com o auxílio de um trocáter. Após tal procedimento, a cânula foi lavada e preenchida com solução de salina isotônica heparinizada (10U/mL) e livre de pirógenos, para evitar a obstrução da cânula por sangue coagulado. A oclusão da cânula foi realizada por meio da introdução de um arame ortodôntico inoxidável de 1,5 cm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, visando dificultar o refluxo de sangue para o seu interior. No local da incisão cirúrgica, os planos foram suturados em bloco com pontos simples, utilizando-se fios de algodão.

3.2.2. Procedimento de canulação da veia jugular direita

Foram utilizadas cânulas de tubos de silicone (Silastic®, Dow Corning CO, Midland, MI, EUA) com comprimento total de 11,0 cm e diâmetro interno 0,5 mm e externo de 0,9 mm. Após tricotomia das regiões supra-clavicular direita e cervical dorsal, o animal foi fixado à mesa cirúrgica, e a veia jugular externa identificada por transparência. Uma incisão longitudinal de 0,5 cm foi feita na superfície ventral do pescoço, a cerca de 1,0 cm à direita da traquéia. A musculatura foi retraída, a veia jugular direita exposta e o tecido conjuntivo ao seu redor removido. Foi então realizada a ligadura da veia e uma pequena incisão na parede superior da mesma. Por esta incisão a cânula de silicone foi introduzida dentro da veia cava superior, através da veia jugular, permitindo que apenas 1,07 cm da cânula fossem introduzidos em direção ao átrio direito. Sua fixação no local foi feita por ligaduras com fio de algodão. A extremidade distal da cânula foi exteriorizada na região cervical dorsal através de um trajeto subcutâneo com o auxílio de um trocáter. Após este procedimento, a cânula foi lavada e preenchida com solução de salina heparinizada (10 U/mL) e livre de pirógenos, para evitar a obstrução da cânula por coágulos. A oclusão da cânula foi realizada através de um laço, feito com o auxílio de uma pinça cirúrgica. No local da incisão cirúrgica, os planos foram suturados em bloco com pontos simples, utilizando-se fios de algodão.

Após as cirurgias de canulação da artéria femoral e da veia jugular direitas, os ratos foram transferidos em caixas plásticas individuais para a estante ventilada, e mantidos sem manipulação até o início da seção experimental na manhã do dia seguinte, com livre acesso à água e ração.

3.3. Drogas

As seguintes drogas foram utilizadas nos experimentos:

- Lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na dose de 1,5 mg/kg de peso do animal;
- Ketamina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na dose de 10 mg/kg de peso do animal;
- Moxonidina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) na dose de 50 µg /kg de peso do animal.

Todas as drogas foram diluídas em salina (0,9% de NaCl) livre de pirógenos e foram administradas por via intravenosa (i.v.).

3.4. Indução do choque séptico

Para a indução do choque séptico, os animais receberam uma injeção endovenosa de LPS na dose de 1,5 mg/kg de peso corpóreo. O início do protocolo experimental, tempo zero, foi definido como o ponto em que os ratos receberam a injeção de LPS.

3.5. Protocolos experimentais

Os animais foram randomizados para um dos seguintes grupos experimentais:

- GRUPO SALINA + SALINA (SAL + SAL): onde os animais receberam 1,5 mg/kg de salina estéril i.v. e, após 30 minutos, 10 mg/kg de salina;

- GRUPO LPS + SALINA (LPS + SAL): onde os animais receberam 1,5 mg/kg de LPS i.v. e, após 30 minutos, 10 mg/kg de salina;
- GRUPO SALINA + KETAMINA (SAL + KET): onde os animais receberam 1,5 mg/kg de salina estéril i.v. e, após 30 minutos, 10 mg/kg de ketamina;
- GRUPO LPS + KETAMINA (LPS + KET): onde os animais receberam 1,5 mg/kg de LPS e, após 30 minutos, 10 mg/kg de ketamina.

3.5.1. Protocolos experimentais para inibição simpática

Com o objetivo de avaliar se os efeitos da ketamina sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) são devidos a uma ativação simpática, utilizou-se a droga moxonidina, um bloqueador simpático central. Os protocolos experimentais utilizaram apenas as medidas de pressão arterial e frequência cardíaca:

- GRUPO MOXONIDINA + LPS + KETAMINA (MOXO + LPS + KET): onde os animais receberam uma injeção de moxonidina na dose de 50 µg /Kg 15 minutos antes da injeção de LPS a 1,5mg/Kg e, após 30 minutos desta, foram injetados com ketamina a 10mg/kg;
- GRUPO MOXONIDINA + SAL + KET (MOXO + SAL +KET): onde os animais receberam uma injeção de moxonidina na dose de 50 µg /Kg 15 minutos antes da injeção de salina a 1,5mg/Kg e, após 30 minutos desta, foram injetados com ketamina a 10mg/kg;
- GRUPO MOXONIDINA + SALINA + SALINA (MOXO + SAL + SAL): onde os animais receberam uma injeção de moxonidina na dose de 50 µg /Kg 15

minutos antes da injeção de salina a 1,5mg/Kg e, após 30 minutos desta, foram injetados com salina a 10mg/Kg.

3.6. Determinação da Pressão Arterial Média e Frequência Cardíaca

Foram utilizados os animais que tiveram a artéria femoral direita canulada para a medida da pressão arterial e frequência cardíaca através de um transdutor de pressão (Grass P23XL-1) e um polígrafo (Grass P122, EUA) acoplado a um microcomputador, utilizando o programa Polyview (Astro-Med Inc, EUA).

3.7. Dosagem hormonal e de nitrato plasmático

3.7.1. Coleta de sangue

Os animais que tiveram apenas a veia jugular direita canulada para a administração das drogas endovenosas foram decapitados 2 e 4 horas após a administração do LPS ou de salina e amostras sanguíneas foram coletadas em tubos contendo 0,5 mL de heparina (10U/mL) e mantidas em gelo. As amostras foram centrifugadas (1200 g, 4°C, 20 min) para a obtenção do plasma. O plasma foi estocado a -70°C até o momento das dosagens de vasopressina e nitrato plasmático.

3.7.2 Dosagem do hormônio vasopressina

A extração do hormônio AVP foi realizada segundo técnica descrita por Moreira e colaboradores (1995), utilizando-se 1,0 mL de plasma adicionados de 2,0 mL de acetona gelada seguida de agitação contínua por 20 segundos e

centrifugação (1200 g, 4°C, 25 min), sendo o sobrenadante decantado em um tubo contendo 2,0 mL de éter de petróleo e em seguida agitado por 10 segundos e mantido em repouso por 5 minutos à 25°C para a separação das camadas. A camada superior foi aspirada com o auxílio de uma bomba de vácuo (Modelo 131-¼ CV, Prismatec, São Paulo, SP, Brasil) e a camada inferior foi liofilizada num Speed Vac (RTV 4104, Termo Electron Co., Waltham, MA, USA) sendo as amostras estocadas à -20°C para posterior dosagem por radioimunoensaio (RIE).

No dia da realização do RIE, as amostras foram ressuspensas em 250 µL de tampão AVP (tampão TRIS 0,05M com albumina humana 0,25%), sendo que, 100 µL do ressuspenso foram utilizados para o ensaio em duplicata.

No RIE, a AVP foi marcada com ¹²⁵I obtido de fonte comercial (GE Health Care Bioscience), foram utilizadas 2000 cpm/100 µL, com um volume final de incubação de 500 µL durante quatro dias, à temperatura de 4°C. O anti-soro a ser utilizado (primeiro anticorpo de coelho anti-AVP) é específico para o hormônio analisado sem reação cruzada com outros peptídeos. Foram adicionados 100 µL do primeiro anticorpo nas amostras desconhecidas e os tubos foram agitados e incubados a 4°C durante 24 horas. O hormônio marcado (100µL) foi adicionado aos tubos e estes foram agitados e incubados novamente por 24 h à 4°C. O hormônio marcado foi separado do não marcado pela técnica de anticorpo secundário (anticorpo antigamaglobulina de coelho produzido em cabra). Após a adição de 100 µL do anticorpo secundário, as amostras foram reincubadas por 24 h à 4°C, e no dia seguinte, foi adicionado à amostra 1 mL de polietilenoglicol (PEG 6,25%). As amostras foram centrifugadas (1200 g, 4°C, 25 min) e o sobrenadante foi aspirado. A

radioatividade no precipitado foi determinada com o auxílio de um contador gama (Cobra II Auto-Gamma, Packard Canberra Co., Meriden, CT, USA).

3.7.3. Dosagem indireta do NO plasmático através do nitrato plasmático

No dia da dosagem do NO plasmático, alíquotas de 50µL de amostras de plasma foram desproteinizadas por incubação com etanol absoluto 4°C e mantidas por 30 minutos em freezer (-20°C), e em seguida foram submetidas à centrifugação (4000g, 25°C, 10 min).

Para a medida do NO plasmático foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio utilizando-se o analisador Sievers® Nitric Oxide Analyzer 280 (GE Analytical Instruments, Boulder, CO. USA).

Das amostras desproteinizadas, foi utilizado o volume de 5 µL, que foi injetado na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl à 95 °C), que converge o NO em nitrato (NO_3^-) em quantidades equimolares. O NO é sugado, usando gás Hélio, para a câmara de quimioluminescência do analisador. A detecção do NO decorre de sua reação com o ozônio (O_3), formando dióxido de nitrogênio (NO_2). O NO_2 apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície fotossensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico em que a área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato na amostra. A concentração de nitrato foi calculada por

comparação com uma curva padrão usando concentrações conhecidas (5, 10, 15, 25, 50 e 100 μ M) de nitrato de sódio.

3.8. Análise estatística

Os resultados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão. Para atingir os objetivos propostos para as variáveis AVP e NO foi proposto um modelo de ANOVA desbalanceada com dois fatores e interação (KUTNER, 1974), pertencente à classe dos modelos lineares generalizados. Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos têm distribuição normal com média 0 e variância σ^2 constante. Na situação em que tal pressuposto não foi observado, foi utilizada uma transformação logarítmica na variável resposta. As comparações foram realizadas através do pós-teste por contrastes ortogonais. Os resultados foram obtidos com o auxílio do software SAS® 9.0, através da PROC GLM.

Para as comparações das variáveis PAM e FC foi utilizado o modelo de regressão linear com efeitos mistos (efeitos aleatórios e fixos). Os modelos lineares de efeitos mistos são utilizados na análise de dados em que as respostas estão agrupadas e a suposição de independência entre as observações num mesmo grupo não é adequada (SCHALL, 1991). Esses modelos têm como pressuposto que seus resíduos tem distribuição normal com média 0 e variância σ^2 constante. As comparações foram realizadas através do pós-teste por contrastes ortogonais. Este procedimento foi realizado através do software SAS® 9.0, utilizando a PROC MIXED. O nível de significância foi estabelecido em $p \leq 0,05$.

4- RESULTADOS

Para validação do modelo experimental de indução do choque endotoxêmico, foram determinados os valores de pressão arterial média, frequência cardíaca e níveis plasmáticos de AVP e nitrato durante quatro horas após a injeção de LPS ou salina.

As Figuras 1A e 1B mostram a evolução temporal do efeito da administração intravenosa de lipopolissacarídeo sobre a PAM e FC em ratos, respectivamente. Quando os animais foram injetados com LPS, ocorreu uma queda bifásica da PAM, com recuperação parcial dos níveis pressóricos na segunda hora, seguida de nova queda, que se estendeu até o final do experimento. A hipotensão induzida pelo LPS foi significativa em todos os horários analisados. Concomitantemente, ocorreu um aumento da FC, que foi estatisticamente significativo da primeira ($p < 0,01$) até a quarta hora ($p < 0,01$).

Figura 1A. Efeito da administração de salina ou LPS sobre a variação da pressão arterial média (ΔPAM). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ são significativamente diferentes comparados ao grupo controle.

Figura 1B. Efeito da administração de salina ou LPS sobre a variação da frequência cardíaca (ΔFC). ** $p < 0,01$ é significativamente diferente comparado ao grupo controle.

A Figura 1C mostra o efeito do LPS sobre as concentrações plasmáticas de AVP. Um aumento significativo nas concentrações de AVP ocorreu na segunda ($p < 0,01$) e quarta horas ($p < 0,05$) após a injeção de LPS, iniciando um padrão de queda a partir da segunda hora. Estudo piloto prévio realizado em nosso laboratório, onde as concentrações plasmáticas de AVP foram analisadas por 6 horas após a injeção de LPS, mostrou valores de AVP similares aos basais na sexta hora (dado não apresentado). Simultaneamente, ocorreu um aumento gradativo nas concentrações de nitrato plasmático, que foi significativo na segunda ($p < 0,05$) e quarta ($p < 0,01$) horas após a injeção de LPS (Figura 1D).

Figura 1C. Efeito da administração de salina ou LPS sobre as concentrações plasmáticas de AVP. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ são significativamente diferentes comparados ao grupo controle.

Figura 1D. Efeito da administração de salina ou LPS sobre as concentrações de nitrito plasmático. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ são significativamente diferentes comparados ao grupo controle.

As Figuras 2A, B, C e D apresentam a evolução temporal do efeito da administração intravenosa de ketamina na dose de 10mg/Kg sobre a PAM, FC e

concentrações plasmáticas de AVP e nitrato, respectivamente, em ratos após a injeção de LPS ou salina.

Na figura 2A, a administração de ketamina atenuou a hipotensão induzida pelo LPS, sendo significativa da primeira ($p < 0,01$) até a quarta hora ($p < 0,01$). A administração de ketamina nos animais não-sépticos levou a um aumento significativo ($p < 0,05$) da PAM apenas na primeira hora em relação ao grupo controle salina + salina, retornando a valores próximos aos basais nas próximas horas.

Figura 2A. Efeito da administração da ketamina (10 mg/kg) sobre a PAM no choque endotoxêmico. ** $p < 0,01$ é significativamente diferente comparado ao grupo LPS + salina; # $p < 0,05$ é significativamente diferente comparando grupo salina + salina.

Concomitantemente, a ketamina potencializou o aumento na FC induzido pelo LPS (Figura 2B), e esse aumento foi significativo na segunda ($p < 0,01$), terceira ($p < 0,01$) e quarta horas ($p < 0,05$). A administração de ketamina nos animais não-sépticos levou a um aumento significativo da FC apenas na segunda hora ($p < 0,05$),

permanecendo seus valores próximos ao do grupo salina + salina nos demais horários.

Figura 2B. Efeito da administração da ketamina (10 mg/kg) sobre a FC no choque endotoxêmico. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ são significativamente diferentes comparados ao grupo LPS + salina; # $p < 0,05$ é significativamente diferente comparado ao grupo salina + salina.

A Figura 2C mostra o efeito da administração de ketamina sobre as concentrações plasmáticas de vasopressina. Observa-se que a injeção de ketamina potencializou a liberação de AVP nos animais sépticos, sendo este aumento significativo na segunda ($p < 0,01$) e quarta ($p < 0,01$) horas, retornando a valores próximos dos basais na sexta hora (dado não apresentado). Não houve alteração nas concentrações plasmáticas de AVP induzida pela ketamina nos animais não-sépticos em relação ao grupo controle.

Figura 2C. Efeito da administração da ketamina (10 mg/kg) sobre as concentrações plasmáticas de AVP no choque endotóxico. ** $p < 0,01$ é significativamente diferente comparado ao grupo LPS + salina.

No entanto, na avaliação do efeito da ketamina sobre os níveis de nitrato plasmático (Figura 2D), a injeção de ketamina não alterou as concentrações de nitrato plasmático em relação aos animais injetados com LPS + salina ou salina + salina.

Figura 2D. Efeito da administração da ketamina (10 mg/kg) sobre as concentrações de nitrato plasmático no choque endotóxico.

Em um experimento separado, foi utilizada a moxonidina, um inibidor central do sistema nervoso simpático, com o objetivo de avaliar o papel da ativação simpática produzida pela ketamina na manutenção da função cardiovascular observada nos animais sépticos. A Figura 3A apresenta a evolução temporal do efeito de um pré-tratamento com moxonidina sobre a PAM em animais não-sépticos. Os níveis pressóricos dos animais que receberam o pré-tratamento permaneceram próximos aos dos animais controle, não havendo diferenças significativas.

Figura 3A. Efeito do pré-tratamento com a moxonidina (50 µg /Kg) sobre a PAM nos animais injetados com salina + salina.

Na Figura 3B, o pré-tratamento com moxonidina levou a uma queda progressiva da FC em relação ao grupo controle, sendo significativa na terceira hora ($p < 0,05$) e retornando a valores próximos ao do grupo controle na quarta hora.

Figura 3B. Efeito do pré-tratamento com a moxonidina ($50 \mu\text{g/Kg}$) sobre a FC nos animais injetados com salina + salina. * $p < 0,05$ é significativamente diferente comparado ao grupo controle.

As Figuras 3C e 3D mostram o efeito do pré-tratamento com a moxonidina sobre as alterações na PAM e FC induzidas pela ketamina em animais injetados com LPS.

Figura 3C. Efeito do pré-tratamento com a moxonidina ($50 \mu\text{g/Kg}$) sobre a ação da ketamina na hipotensão induzida pelo LPS.

A inibição simpática pela moxonidina levou a uma menor recuperação da PAM induzida pela ketamina nos animais sépticos (Figura 3C), no entanto essa diferença não foi significativa comparada ao grupo que não recebeu o pré-tratamento. Simultaneamente, a moxonidina inibiu a potencialização no aumento da FC induzido pela ketamina nos animais injetados com o LPS, sendo que a diferença nos valores do ΔFC foi significativa na segunda ($p < 0,05$) e na quarta horas ($p < 0,05$).

Figura 3D. Efeito do pré-tratamento com a moxonidina (50 μg /Kg) sobre a ação da ketamina na taquicardia induzida pelo LPS. * $p < 0,05$ é significativamente diferente comparado ao grupo LPS + ketamina.

5- DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou pela primeira vez uma potencialização na liberação de vasopressina pela ketamina, associada a uma atenuação da hipotensão induzida pelo LPS. Essa estimulação na liberação de AVP parece não se dar pela via do óxido nítrico.

A administração sistêmica de LPS em animais mimetiza os sintomas de sepse e choque séptico, desencadeando uma variedade de respostas no organismo. No presente trabalho, a administração intravenosa de LPS levou a uma queda na PAM, caracterizando o choque endotoxêmico. A queda na PAM ocorreu de forma bifásica, sendo que a primeira queda foi transitória, ocorrendo 1 hora após a administração de LPS, e a segunda progressiva e prolongada. Este padrão já foi observado anteriormente em nosso laboratório (GIUSTI-PAIVA et al., 2002).

Paya e colaboradores (1993) sugeriram que a queda inicial da PAM seria uma consequência da ativação da eNOS. Reforça esta hipótese o fato de inibidores não seletivos da NOS inibirem a queda transitória da PAM e inibidores seletivos da iNOS não interferirem nesta resposta, indicando a possível participação da eNOS na queda precoce da PAM (PAYA et al., 1993).

Os mecanismos envolvidos na manutenção da hipotensão durante o choque séptico têm sido muito estudados. A hipótese predominante é de que há um aumento na produção de NO pela iNOS (CARNIO et al., 2005; GIUSTI-PAIVA et al., 2002), que conduz à vasodilatação e um decréscimo na responsividade vascular a vasoconstrictores.

A iNOS é expressa rapidamente na musculatura vascular componente de artérias e veias, levando a uma elevada síntese local de NO, um gás vasodilatador, e produzindo uma hiporresponsividade dos vasos aos mecanismos

vasoconstrictores (VINCENT, 2000). Alguns estudos têm demonstrado que a queda na PAM pode ser inibida usando-se inibidores específicos da iNOS, diminuindo a produção de NO (GIUSTI-PAIVA et al., 2002). Estas observações conduziram à hipótese de que a inibição da NOS poderia ter benefícios terapêuticos no tratamento do choque séptico. No entanto, os benefícios observados em modelos animais não foram reprodutíveis em humanos (LOPEZ; LORENTE; STEINGRUB, 2004).

Nossos dados mostraram um aumento nos níveis plasmáticos de AVP nos animais sépticos até a segunda hora após a administração de LPS, sendo esta provavelmente a responsável pela recuperação parcial da PAM observada na Figura 1A. Esse aumento nos níveis de AVP é seguido por uma queda nas próximas horas, retornando a níveis basais na sexta hora (dado não apresentado). Isto ocorreu simultaneamente a uma profunda hipotensão secundária à administração do LPS e a um rápido aumento nas concentrações plasmáticas de NO.

A deficiência de AVP durante o choque séptico em humanos foi demonstrada por Landry e colaboradores (1997). Eles observaram que pacientes com choque séptico apresentavam níveis de AVP inapropriadamente baixos, quando comparados a pacientes com choque cardiogênico com grau similar de hipotensão. Dessa forma, a desregulação da vasopressina parece contribuir para a fisiopatologia da sepse e, recentemente, tem-se sugerido o uso da infusão de AVP como uma terapia alternativa para pacientes em choque séptico refratário à terapia vasopressora padrão (HOLMES et al., 2001; LANDRY et al., 1997; TSUNEYOSHI, 2001).

Uma possível causa para a diminuição das concentrações plasmáticas da AVP durante o choque séptico poderia ser uma depleção do conteúdo deste

hormônio na neurohipófise. No entanto, estudos anteriores demonstraram que o conteúdo neurohipofisário de AVP nos animais com choque séptico não era diferente dos animais controle (GIUSTI-PAIVA et al., 2002).

Estudo prévio de nosso laboratório mostrou pela primeira vez uma inter-relação entre a síntese de NO e a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico. Neste estudo, foi demonstrado que os níveis plasmáticos de AVP aumentam logo após uma injeção i.v. de LPS em ratos e retornam rapidamente ao basal, apesar da manutenção de uma profunda hipotensão. A injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, no entanto, manteve as concentrações de AVP elevadas e este efeito se correlacionou com a manutenção da pressão sangüínea (GIUSTI-PAIVA et al., 2002). Este mesmo padrão foi encontrado em outro estudo utilizando camundongos mutantes para o gene da enzima iNOS (CARNIO et al., 2005). Esses dados sugerem que o NO exerce uma influência tônica inibitória sobre a secreção de AVP durante o choque séptico experimental.

Além disso, a NOS e RNAm para a NOS estão presentes em neurônios magnocelulares do SON e PVN, onde a AVP é sintetizada; na neurohipófise, onde a AVP é estocada; e no órgão subfornicial (SFO), órgão vascular da lamina terminal (OVLT), núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e núcleo do trato solitário (NTS), que são estruturas anatomicamente conectadas com o SON e PVN e essenciais para o controle da secreção de AVP (CORREA et. al., 2007). Assim, o decréscimo nas concentrações plasmáticas de AVP durante o choque séptico experimental pode ser devido a uma inibição dos neurônios vasopressinérgicos pelo NO derivado da iNOS.

A ketamina é geralmente indicada para analgesia/anestesia em pacientes sépticos, devido suas ações estimuladoras sobre o sistema nervoso simpático, mantendo a pressão sangüínea e preservando a função cardíaca (WHITE; WAY; TREVOR, 1982). Em nosso estudo, a administração intravenosa de uma dose média de ketamina atenuou a hipotensão induzida pelo LPS em ratos.

Taniguchi, Shibata e Yamamoto (2001) sugeriram que, além de sua ação em aumentar a atividade simpática, a ketamina inibiria o desenvolvimento da disfunção cardiovascular também através de suas propriedades antiinflamatórias. Neste estudo, o pré-tratamento com ketamina atenuou a resposta das citocinas ao LPS, sugerindo que a prevenção no aumento do TNF- α e IL-6, que são agentes vasodilatadores, foi importante para evitar o desenvolvimento da disfunção cardiovascular. Vários outros autores descreveram este papel inibitório da ketamina sobre citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-6, IL-8 e NFk-B, *in vitro* e *in vivo* (KAWASAKI et al., 2001; ; LARSEN et al., 1998; ; SONG et al., 2006; SUN et al., 2004; TAKENAKA et al, 1994; TANIGUCHI et al., 2003; YU et al, 2002; YU et al, 2007).

Nossos dados mostram, pela primeira vez, que a administração de uma dose média de ketamina potencia significativamente a liberação de vasopressina induzida pelo LPS (Figura 2C), colaborando para a atenuação na hipotensão induzida por este modelo de choque endotoxêmico. No entanto, o grupo injetado com salina + ketamina não mostrou o mesmo padrão, mantendo níveis plasmáticos de AVP semelhantes ao do grupo salina + salina, sugerindo uma ação da ketamina sobre a liberação de AVP especificamente relacionada à fisiopatologia do choque séptico. A dose que utilizamos neste trabalho baseia-se em estudo de Taniguchi e colaboradores (2003), que mostrou efeitos mais favoráveis da ketamina quanto à

hipotensão, acidose metabólica, resposta das citocinas e taxas de mortalidade para a dose de 10mg/kg.

Em nosso estudo piloto com o grupo LPS + ketamina, encontramos que as concentrações plasmáticas de AVP retornavam a valores basais na sexta hora (dado não apresentado), o que acreditamos se dar devido à meia-vida da ketamina ser de 2-3 horas.

Pouco se sabe sobre a ação da ketamina sobre a produção de óxido nítrico na sepse. Shimaoka e colaboradores (1996) e Li e colaboradores (1997) encontraram uma ação inibidora da ketamina sobre a produção de NO em macrófagos *in vitro*. No entanto, na análise de culturas de células gliais, a ketamina não mostrou alteração significativa na liberação de NO (SHIBAKAWA et al., 2005).

Diante da provável ação tônica inibitória do NO sobre a liberação da AVP e das propriedades antiinflamatórias da ketamina, testamos a hipótese de que a ketamina estimularia a liberação de AVP através de uma ação inibitória sobre a produção de NO. No entanto, nossos dados não mostraram esta ação, visto que os níveis plasmáticos de NO nos animais sépticos que receberam a injeção de ketamina mantiveram-se semelhantes aos dos animais estimulados apenas com a endotoxina. Isto pode ser explicado por diferentes efeitos apresentados pelo NO produzido no SNC e sistemicamente, sugerindo novos estudos onde o papel do NO central seja elucidado.

Nossos dados mostraram apenas alterações pontuais nos parâmetros hemodinâmicos no grupo salina + ketamina. Diante disto, verificamos qual seria a participação da AVP e da estimulação simpática na manutenção da pressão sangüínea nos ratos sépticos injetados com ketamina. Para tanto, utilizamos um pré-

tratamento com um inibidor simpático central, a moxonidina. Os resultados mostraram um papel vasopressor produzido principalmente pela ação da AVP, em relação à estimulação simpática, na manutenção da pressão sanguínea induzida pela ketamina. Assim, nestes animais, a inibição simpática prévia inibiu significativamente a potencialização no aumento da FC induzido pela ketamina (Figura 3D), porém não evitou a recuperação da PAM (Figura 3C), preservando a função cardiovascular.

6- CONCLUSÃO

-
- A ketamina produziu uma atenuação da hipotensão induzida pelo LPS em ratos;
 - A administração de ketamina em ratos sépticos potencializou a liberação de vasopressina induzida pelo LPS e não produziu alteração em suas concentrações em animais não-sépticos;
 - A administração de ketamina não alterou a produção de NO plasmático induzida pelo LPS em ratos;
 - A potencialização na liberação de vasopressina pela ketamina no choque séptico em ratos parece não dar pela via do NO plasmático;
 - A preservação da função cardiovascular produzida pela ketamina no choque séptico em ratos parece se dar mais por sua ação potencializadora sobre a liberação de vasopressina do que por sua ação estimuladora sobre o sistema simpático.

REFERÊNCIAS¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR 6023)

ALBERTI, C. et al. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Med**, v.28, p. 108-121, 2002.

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, p.1303-1310, 2001.

ANNANE, D. et al. Current epidemiology of septic shock: The CUB-Réa Network. **Am J Respir Crit Care Med**, v.168, p.165-172, 2003.

BANDALETOVA, T. et al. Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. **Apmis**, v.101, n.4, p.330-336, 1993.

BARBERIS, C.; MOUILLAC, B.; DURROUX, T. Structural bases of vasopressin / oxytocin receptor function. **J Endocrinol**, v.156, n.2, p.223-229, 1998.

BEISHUIZEN, A.; THIJS, L. G. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary adrenal (HPA) axis. **J Endotoxin Res**, v.9, n.1, p.3-24, 2003.

BENJAMIM, C. F. et al. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis**, v.182, n.1, p.214-223, 2000.

BENJAMIM, C. F. et al. Opposing and hierarchical roles of leukotrienes in local innate immune versus vascular responses in model of sepsis. **J Immunol**, v.174, n.3, p.1616-1620, 2005.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, v.115, n.6, p.457-469, 1991.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v.101, n.6, p.1644-1655, 1992.

BRANN, D. W. et al. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinology**, v.65, n.6, p.385-395, 1997.

CARNIO, E. C. et al., Vasopressin release during endotoxaemic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Pflugers Arch - Eur J Physiol**, v.450, p.390-394, 2005.

CARNIO, E. C. et al. Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. **Endocrine Metabolic & Immune Disorders**, v.6, p.7-16, 2006.

CLEMENTI, E. The contribution of Salvador Moncada to our understanding of the biology of nitric oxide, **IUBMB Life**, v.55, n.10-11, p.563-565, 2003.

CORREA, 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, E. T.; SAWCHENKO, P. E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. **Trends Neurosci**, V.14, n.9, p.406-411, 1991.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic. **Intensive Care Med**, v.34, n.1, p.17-60, 2008.

DOMBROVSKIY, V. Y. et al. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. **Crit Care Med**, v.35, n.5, p.1244-1250, 2007.

DUARTE, D. F. Farmacocinética e farmacodinâmica dos anestésicos venosos. **Rev Bras Anesthesiol**, v.44, n.1, p.35-42, 1994.

DUNN, F. L. et al. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **J Clin Invest**, v.52, p.3212-3219, 1973.

DYSON, A.; SINGER, M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? **Crit Care Med**, v.37, p.S30-S37, Jan. 2009. Supplement 1.

ENGBLOM, D. et al. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. **J Biol Chem**, v.273, n.41, p.5-15. 2002.

ESPER, A.; MARTIN, G. S. Is severe sepsis increasing in incidence and severity? **Crit Care Med**, v.35, n.5, p.1414-1415, 2007.

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

FLAATEN, H. Epidemiology of sepsis in Norway in 1999. **Critical Care**, v.8, n.4, p. R180-R184, 2004.

GELLER, D.; BILLIAR, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metastasis Rev**, v.17, n.1, p.7-23, Mar. 1998.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med**, v.30, p.1306-1309, 2002.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflugers Arch**, v.447, n.2, p.175-180, 2003a.

GIUSTI-PAIVA, A. et al., Role of nitric oxide in lipopolyssaccharide-induced release of vasopressin in rats. **Neurosci Lett**, v.346, n.1-2, p.21-24, 2003b.

GIUSTI-PAIVA, A. et al. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by endotoxic shock in rats. **Shock**, vol. 21, n.3, p.271-275, 2004.

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.320-324, Jun. 2005.

GLAUSER, M. P. et al. Septic shock: pathogenesis. **Lancet**, v.338, n.8769, p.732-736, 1991.

HANDA, O.; STEPHEN, J.; CEPINSKAS, G. Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.295, n.4, p.H1712-H1719, Oct. 2008.

HANNA, N. Sepsis and septic shock. **Topics in Emergency Medicine**, v.25, n.2, p.158-165, 2003.

HERON, M. et al. Deaths: final data for 2006. **Natl Vital Stat Rep**, v.57, n.14, p.1-134, 2009.

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

HORN, K. D. Evolving strategies in the treatment of sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). **Q J Med**, v.91, p.265-277, 1998.

HUTTUNEN, R. et al. Endothelial nitric oxide synthase G894T (GLU298ASP) polymorphism is associated with hypotension in patients with E. coli bacteremia but not in bacteremia caused by a gram-positive organism. **Shock**, v.31, n.5, p.448-453, May. 2009.

IVANKOVICH, A. D. et al. Cardiovascular effects of centrally administered ketamine in goats. **Anesth Analg**, v.53, n.6, p.924-933, Nov/Dec. 1974.

JIMI, N. et al. Inhibitory effect of the intravenous anesthetic, ketamine, on rat mesangial cell proliferation. **Anesth Analg**, v.84, p.190-195, 1997.

KADEKARO, M. et al. Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.262, n.2, p.R310-R317, Feb. 1992.

KARIMA, R. et al. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Mol Med Today**, v.5, n.3, p.123-132, 1999.

KAWASAKI, T. et al. Ketamine supresses proinflammatory cytokine production in human whole blood in vitro. **Anesth Analg**, v.89, p.665-669, 1999.

KAWASAKI, C. et al. Ketamine isomers suppress superantigen-induced proinflammatory cytokines production in human whole blood. **Can J Anesth**, v.48, n.8, p.819-823, 2001.

KOGA, K. et al. Ketamine suppresses tumor necrosis factor alpha activity and mortality in carrageenan-sensitized endotoxin shock model. **Circ Shock**, v.44, p.160-168, 1995.

KOVACS, K. J. Neurohypophyseal hormones in the integration of physiological responses to immune challenges. **Prog Brain Res**, v.139, p.127-146, 2002.

KUTNER, M. H. "Hypothesis Testing in Linear Models (Eisenhart Model)." **American Statistician**, v.28, p.98-100, 1974.

LANDGRAF, R. et al. Interleukin-1 beta stimulates both central and peripheral release of vasopressin and oxytocin in the rat. **Eur J Neurosci**, v.7, n.4, p.592-598, 1995.

LANDRY, D. W. et al. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. **Circulation**, v.95, p.1122-1125, 1997.

LARSEN, B. et al. Effect of intravenous anesthetics on spontaneous and endotoxin-stimulated cytokine response in cultured human whole blood. **Anesthesiology**, v.89, p.1218-1227, 1998.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, v.31, n.4, p.1250-1256, 2003.

LI, C. et al. Ketamine inhibits nitric oxide synthase in lipopolysaccharide-treated rat alveolar macrophages. **Can J Anaesth**, v.44, p.989-995, 1997.

LIPPMANN, M. et al. Sequential cardiorespiratory patterns of anesthetic induction with ketamine in critically ill patients. **Crit Care Med**, v.11, p.730-734, 1983.

LOPEZ, A. LORENTE, J. A., STEINGRUB, J. Multiple-center, randomized, placebo-controlled, double-blind study of the nitric oxide synthase inhibitor 546C88: effect on survival in patients with septic shock. **Crit Care Med**, v.32, p.21-30, 2004.

MAMMEN, E. F. The haematological manifestations of sepsis. **J Antimicrob Chemother**, v.41, p.17-24, 1998. Supplement A.

MARTIN, G. S. et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. **N Engl J Med**, v.348, p.1546-1554, 2003.

MCCANN, S. M. et al. The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. **Ann N Y Acad Sci**, v.917, p.4-18, Jan. 2000.

MCKINLEY, M. J. et al. Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. **J Neuroendocrinol**, v.16, n.4, p.340-347, 2004.

MCLAREN, A. T. et al. A potential role for inducible nitric oxide synthase in the cerebral response to acute hemodilution. **Can J Anaesth**, v.56, n.7, p.502-509, Jul. 2009.

MESSERLI, F. Moxonidine: a new and versatile antihypertensive. **J Cardiovasc Pharmacol**, v.35, n.7, p.S53-S56, 2000. Supplement 4.

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

MONCADA, S.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric pathway. **N Engl J Med**, v.329, p.2002-2012, Dec. 1993.

MURAD, F. Nitric oxide signaling: would you believe that a simple free radical could be a second messenger, autacoid, paracrine substance, neurotransmitter, and hormone? **Recent Prog Horm Res**, v.53, p.43-59, 1998.

MOREIRA, A. C. et al. Radioimunoensaio da vasopressina: Montagem e padronização. **Arq Brás Endocrinol Metab**, v.56, p.54, 1995.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. et al. Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis. **Neuroimmunomodulation**, v.16, n.1, p.45-53, 2009.

PALIN, K. et al. Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.296, n.6, p.E1289-E1299, 2009.

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

PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, v.328, n.20, p.1471-1477, May. 1993.

PAYA, D. et al. Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by E. coli lipopolysaccharide in rats. **Circ Shock**, v. 41, n.2, p.103-112, 1993.

PENG, J. et al. Sympathoinhibitory mechanism of moxonidine: role of the inducible nitric oxide synthase in the rostral ventrolateral medulla. **Cardiovascular Research**, v.84, p.283-291, Jun. 2009.

PRICHARD, B. N.; OWENS, C. W.; GRAHAM, B. R. Pharmacology and clinical use of moxonidine, a new centrally acting sympatholytic antihypertensive agent. **J Hum Hypertens**, v.11, p.S29-S45, Aug. 1997. Supplement 1.

RACKOW, E. C.; ASTIZ, M. E. Pathophysiology and treatment of septic shock. **JAMA**, v.266, p.548-554, 1991.

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.61-65, Jan. 2003.

RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, v.175, n.5, p.490-497, Mar. 2007.

ROCHA, M. J. A., OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R., FARIAS-CORREA, P. B. Neurohypophyseal hormone secretion during septic shock. In: CHEN, F. J. (Org.). **New Trends in Brain Research**. New York: New Science Publisher, 2006, v.1, p.75-94.

SAKAI, T. et al. Ketamine suppresses endotoxin-induced NF-kB expression. **Can J Anesth**, v.47, n.10, p.1019-1024, 2000.

SAS Institute Inc., SAS/STAT® User's Guide, Version 9, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2003.

SHARSHAR, T. et al. Circulating vasopressin levels in septic shock. **Crit Care Med**, v.31, n.6, p.1752-1758, 2003.

SHIBAKAWA, Y. S. et al. Effects of ketamine and propofol on inflammatory responses of primary glial cell cultures stimulated with lipopolysaccharide. **Br J Anaesth**, v.95, n.6, p.803-810, Oct. 2005.

SHIMAOKA, M. et al. Ketamine inhibits nitric oxide production in mouse-activated macrophage-like cells. **Br J Anaesth**, v.77, p.238-242, 1996.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical Care**, v.8, n.4, p.R251-R260, 2004.

SCHALL, R. Estimation in generalized linear models with random effect. **Biometrika**, v. 78, n.4, p. 719-727, 1991.

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

SONG, X. M. et al. Effects of ketamine on proinflammatory cytokines and nuclear factor kappa B in polymicrobial sepsis rats. **World J Gastroenterol**, v.12, n.45, p.7350-7354, Dec, 2006.

SUN, J. et al. Effects of ketamine on NF-kappa B activity and TNF-alpha production in endotoxin-treated rats. **Annals of Clinical & Laboratory Science**, v.34, n.2, p.181-186, 2004.

TAKENAKA, I. et al. Ketamine supresses endotoxin-induced tumor necrosis factor alpha production in mice. **Anesthesiology**, v.80, p.402-408, 1994.

TANIGUCHI, T.; SHIBATA, K.; YAMAMOTO, K. Ketamine inhibits endotoxin-induced shock in rats. **Anesthesiology**, v.95, p.928-932, 2001.

TANIGUCHI, T. et al. The dose-related effects of ketamine on mortality and cytokine responses to endotoxin-induced shock in rats. **Anesth Analg**, v.97, p.1769-1772, 2003.

TAVARES, A.; PLAVNIK, F. L. Inibidores do sistema simpático. **HiperAtivo**, v.2, p.91-96, 1998.

TERRELL, M. L. et al. NO inhibition of the magnocellular neuroendocrine system in rats is independent of cGMP signaling pathway. **Exp Neurol**, v.184, n.2, p.846-856, Dec. 2003.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen Pharmacol**, v.29, n.2, p.159-166, 1997.

TSUNEYOSHI I. et al. Hemodynamic and metabolic effects of low-dose vasopressin infusion in vasodilatory septic shock. **Crit Care Med**, v.29, n.3, p.487-493, 2001.

VINCENT, J. L. et al. Effects of nitric oxide in septic shock. **Am J Resp Crit Care Med**, v.161, p.1781-1785, 2000.

VINCENT, J. L., ABRAHAM, E. The Last 100 Years of Sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, vol. 173, p.256-263, 2006.

WANG, Y.; NEWTON, D. C.; MARSDEN, A. Neuronal NOS: gene structure, mRNA diversity, and functional relevance. **Crit Rev Neurobiol**, v.13, n.1, p.21-43, 1999.

WANG, W. Z. et al. Effect of ketamine on presympathetic neurons in rostral ventrolateral medulla of rats. **Acta Pharmacol Sin**, v.22, n.2, p.97-102, Feb. 2001.

WAXMAN, K.; SHOEMAKER, W. C.; LIPPMANN, M. Cardiovascular effects of anesthetic induction with ketamine. **Anesth Analg**, v.58, n.5, p.355-358, May. 1980.

WEIGAND, M. A. et al. Ketamine modulates the stimulated adhesion molecule expression on human neutrophils in vitro. **Anesth Analg**, v.90, p.206-212, 2000.

WHITE, P. F.; WAY, W. L.; TREVOR, A. J. Ketamine: its pharmacology and therapeutic uses. **Anesthesiology**, v.56, p.119-136, 1982.

WONG, M. L. et al. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. **Nat Med**, v.2, n.5, p.581-584, 1996.

YLI-HANKALA, A. et al. Ketamine anaesthesia in a patient with septic shock. **Acta Anaesthesiol Scand**, v.36, p.483-485, 1992.

YU, Y. et al. Ketamine reduces NF kappa B activation and TNF-alpha production in rat mononuclear cells induced by lipopolysaccharide in vitro. **Ann Clin Lab Sci**, v.32, n.3, p.292-298, 2002

YU, M. et al. Effects of ketamine on levels of cytokines, NF- κ B and TLRs in rat intestine during CLP-induced sepsis. **International Immunopharmacology**, v.7, n.8, p.1076-1082, Aug. 2007.

ZAUSIG, Y. A. et al. Cardiac effects of induction agents in the septic rat heart. **Crit Care**, v.13, n.5, p.R144-151, 2009.

ANEXO

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.324.53.4), intitulado "Efeito da Ketamina nas Alterações Cardiovasculares Induzidas pelo Choque Endotoxêmico", de autoria de **Patrícia Renata Rossin**, e de **Evelin Capellari Cárnio** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 05/07/2011.

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.324.53.4), entitled: "Efeito da Ketamina nas Alterações Cardiovasculares Induzidas pelo Choque Endotoxêmico", by **Patrícia Renata Rossin** and **Evelin Capellari Cárnio**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, July 05, 2011.

Ribeirão Preto, 7 de julho de 2011.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro