UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Secreção de vasopressina e ocitocina após estímulo osmótico e
hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse**

Lucas Favaretto Tazinafo

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Secreção de vasopressina e ocitocina após estímulo osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Biociências Aplicadas à Farmácia para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Biociências
Aplicadas à Farmácia.

Orientado: Lucas Favaretto Tazinafo

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria José Alves da Rocha

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia em 14/11/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto
2014

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.

Favaretto Tazinafo, Lucas

Secreção de vasopressina e ocitocina após estímulo osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse. Ribeirão Preto, 2014.

68 p. : il. ; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Rocha, Maria José Alves.

1. Hipotálamo. 2. Neurohipófise. 3. Sobrevivência.
4. Hiperosmolalidade. 5. Ligação cecal e punção

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome do aluno: Lucas Favaretto Tazinafo

Secreção de vasopressina e ocitocina após estímulo osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes a sepse

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

À FAPESP, processo número 2012/16035-5.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Maria José Alves da Rocha.

À auxiliar de laboratório Nadir Martins Fernandes.

Aos colegas de laboratório: Gabriela Ravanelli de Oliveira Pelegrin, Aline de Souza Soares, Luís Henrique Angenendt da Costa, Fazal Wahab, Letycia Silvano da Silva, Nilton Nascimento dos Santos Júnior, Paulo Basso, Fábio Alves Aguila, Juliana Borges Pereira, Tatiana Tocchini Felippotti, Carlos Henrique Rocha Catalão, Mariana Rossin e Julia Zanon.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida”.
(Carl Sagan)

RESUMO

TAZINAFO, L. F. **Secreção de vasopressina e ocitocina após estímulo osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse.** 2014. 68f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Vários estudos clínicos e experimentais relatam o aumento das concentrações plasmáticas de vasopressina (AVP) na fase inicial da sepse, como tentativa de restabelecer a pressão sanguínea que nesta fase começa a diminuir. Porém em uma fase mais tardia da doença, as concentrações do hormônio estão reduzidas mesmo sob um quadro de hipotensão progressiva, um dos principais estímulos para aumento da secreção deste hormônio. Este padrão de secreção hormonal alterada também parece ocorrer com o outro hormônio neurohipofisário, ocitocina (OT). O objetivo deste trabalho foi analisar a secreção dos hormônios AVP e OT, após estímulos osmótico e hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse. A sepse foi induzida pelo método de ligação cecal e punção (CLP) (1 perfuração com agulha 14G) e os animais observados por 10 dias. Os sobreviventes foram submetidos à estímulo osmótico por desidratação (retirada de água para beber da gaiola) por dois dias, ou hipovolêmico por injeção intraperitoneal (i.p) de Polietileno glicol (PEG) (PEG-4000, 200mg/ml de PBS) por 90 minutos. Os animais controles foram hidratados ou receberam injeção intraperitoneal de PBS 0,01M. Após os estímulos, os animais foram decapitados para coleta de sangue e neurohipófise, para as análises de hematócrito, sódio sérico, osmolalidade plasmática, e dosagem hormonal de AVP e OT plasmática e neurohipofisária. **Resultados:** Os animais sobreviventes à sepse mantiveram a capacidade de responder aos estímulos com relação à secreção de AVP. Porém estes animais apresentaram uma secreção diminuída de OT após desidratação embora nenhuma alteração de secreção aparente ao estímulo volêmico. **Conclusão:** Animais sobreviventes à sepse apresentam alterações no padrão de resposta hormonal do eixo hipotálamo-neurohipofisário ao estímulo osmótico sem aparente alteração quando o estímulo é volêmico, sugerindo que seus osmorreceptores encontram-se alterados.

Palavras-chave: Hipotálamo, Neurohipófise, Sobrevivência, Hiperosmolalidade, Ligação cecal e punção.

ABSTRACT

TAZINAFO, L. F. **Vasopressin and oxytocin secretion after osmotic and hypovolemic stimuli in sepsis surviving animals**. 2014. 68f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Many clinical and experimental studies reported the increase of plasma vasopressin (AVP) concentration in the early phase of sepsis, as an attempt to restore blood pressure that begins to decrease at this stage. However, in a later stage of the disease, the hormone concentrations are reduced even under a state of progressive hypotension, one of the major stimulus for the increase of secretion of this hormone. This pattern of impaired hormonal secretion during sepsis also seems to happen to the other pituitary hormone, oxytocin (OT). The aim of this study was to evaluate the secretion of the hormones AVP and OT after osmotic and hypovolemic stimuli in sepsis surviving animals. Sepsis was induced by cecal ligation and perforation (CLP) (1 perforation with 14G needle) and the animals observed for 10 days. The survivors were submitted to osmotic stimulus by dehydration (privation of drinking water from the Cage) for two days, or hypovolemic by intraperitoneal (i.p) injection of polyethylene glycol (PEG) (PEG-4000, 200mg/ml of PBS) for 90 minutes. The control animals were hydrated or that received intraperitoneal injection of PBS 0,01M. After the stimuli, the animals were decapitated for the collection of blood and neurohypophysis, for the analysis of hematocrit, serum sodium, plasma osmolality and hormonal analysis of AVP and OT in the plasma and neurohypophysis. **Results:** Sepsis surviving animals maintained the capacity of answering the stimulus with AVP secretion. But these animals presented a lowered secretion of OT after dehydration, while they presented no alterations in secretion after volemic stimulus. **Conclusion:** Sepsis surviving animals presented alterations in the pattern of hormonal answer for the osmotic stimulus, with lowered secretion of OT, apparently there are no alterations in the pattern of a hormonal secretion after hypovolemia.

Key Words: Hypothalamus, Neurohypophysis, Survival, Hyperosmolality, Cecal ligation and puncture.

RESUMEN

TAZINAFO, L. F. **Secreción de vasopresina y oxitocina después de estímulos osmóticos y hipovolémicos en animales supervivientes la sepsis.** 2014. 68f. Disertación (Máster). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Varios estudios clínicos y experimentales reportan un aumento en las concentraciones plasmáticas de vasopresina (AVP) en la fase inicial de la sepsis, un intento de restaurar la presión arterial que en esta etapa empieza a disminuir. Pero en una fase posterior de la enfermedad, las concentraciones de hormonas siguen reducidas bajo a un marco de la hipotensión progresiva, uno de los principales estímulos para el aumento de la secreción de esta hormona. Este patrón de secreción hormonal alterada también parece ocurrir con la otra hormona neurohipofisária, oxitocina (OT). El objetivo de este estudio fue analizar la secreción de hormonas neurohipofisario AVP y la OT, después de estímulos osmóticos y hipovolémicos en animales que sobrevivieron a la sepsis. La sepsis fue inducida por el método de ligadura y punción cecal (CLP) (1 perforación con aguja 14G) y los animales observados durante 10 días. Los sobrevivientes fueron sometidos a estímulos osmóticos por deshidratación (Retiro de agua para beber de la jaula) durante dos días, o hipovolémico por inyección intraperitoneal (i.p) de Poli etilenglicol (PEG) (PEG-4000, 200mg/ml de PBS) durante 90 minutos. Los animales de control fueron hidratados o que recibieron inyección intraperitoneal de 0,01 M PBS. Después del estímulo, los animales fueron decapitados para la recogida de sangre y neurohipófisis, para el análisis de hematocrito, sodio sérico, osmolalidad plasmática y la dosis hormonal de la vasopresina y la oxitocina en plasma y neurohipofisaria. Resultados: Los animales que sobrevivieron a la sepsis han conservado la capacidad de responder a los estímulos en relación a la secreción de AVP. Pero, estos animales muestran una secreción alterada de OT después de la deshidratación, aunque no hay cambio de secreción aparente en el estímulo volémico. Conclusión: Animales sobrevivientes de sepsis exhiben alteraciones en la respuesta hormonal al estímulo osmótico, con reducción de la secreción de OT. Aparentemente, no hay cambios en el patrón de respuesta a la hipovolemia.

Palabras Clave: Hipotálamo, Neurohipófisis, Supervivencia, hiperosmolaridad, ligadura y punción cecal.

Lista de Figuras

Figura 1 Semelhança entre AVP e OT.....	2
Figura 2. Curva de Sobrevida	23
Figura 3. Análise do hematócrito após desidratação.....	24
Figura 4. Determinação de sódio sérico após desidratação.....	25
Figura 5. Osmolalidade Plasmática após desidratação.....	26
Figura 6. Efeito da desidratação sobre a vasopressina.....	27
Figura 7. Efeito da desidratação sobre a secreção de OT.....	28
Figura 8. Determinação do conteúdo Neurohipofisário de AVP.....	29
Figura 9. Determinação do conteúdo Neurohipofisário de OT.....	30
Figura 10. Efeito do PEG i.p sobre o hematócrito.....	31
Figura 11. Efeito da hipovolemia induzida sobre Sódio Sérico.....	32
Figura 12. Determinação da osmolalidade plasmática após hipovolemia.	33
Figura 13. Efeito da hipovolemia sobre AVP plasmática.....	34
Figura 14. Efeito da Hipovolemia sobre OT plasmática.....	35
Figura 15. Determinação do conteúdo neurohipofisário de OT após hipovolemia.....	36
Figura 16. Determinação do conteúdo neurohipofisário de AVP após hipovolemia	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Análise do hematócrito(%) após estímulo de desidratação.....	24
Tabela 2. Determinação de sódio sérico (meq/L) após estímulo de Desidratação...	25
Tabela 3. Determinação da osmolalidade plasmática (mOsm/Kg) após desidratação.	26
Tabela 4. Concentração plasmática de AVP (pg/mL) após desidratação.....	27
Tabela 5. Concentração plasmática de OT após desidratação	28
Tabela 6. Determinação do conteúdo de AVP na NH após desidratação.....	29
Tabela 7. Determinação do conteúdo de OT na NH após desidratação	30
Tabela 8. : Efeito da Hipovolemia induzida sobre o hematócrito(%)	31
Tabela 9. Efeito da hipovolemia induzida sobre Sódio Sérico (meq/L)	32
Tabela 10. Determinação da osmolalidade plasmática após hipovolemia induzida por PEG.	33
Tabela 11. Concentração plasmática de AVP Polietileno glicol.....	34
Tabela 12. Concentração plasmática de OT após indução de hipovolemia	35
Tabela 13. Determinação de conteúdo neurohipofisário de OT (ng/µg de proteínas) após estímulo hipovolêmico.....	36
Tabela 14. Determinação de conteúdo neurohipofisário de AVP) após estímulo hipovolêmico por polietilenoglicol.....	37

Abreviaturas e siglas

AVP	- Vasopressina
OT	- Ocitocina
CLP	- Ligação cecal e punção
PEG	- Polietileno glicol
PBS	- Phosphate Buffered Saline
ACCP	- American College of Chest Physicians
SIRS	- Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
PIRO	- Predisposition, Insult Infection, Response, Organ dysfunction
PRR	- Receptor de reconhecimento de padrão
ACTH	- Hormônio Adrenocorticotrófico
SAE	- Encefalopatia associada à sepse
CNS	- Sistema nervoso central
IL-1 β	- Interleucina-1 β
iNOS	- Isoforma induzida de Óxido Nítrico Sintase
HIF-1	- Hypoxia inducible factor-1
LPS	- Lipopolissacarídeo
SON	- Núcleo Supraótico
PVN	- Núcleo Paraventricular
IL-1	- Interleucina-1
NO	- Óxido nítrico
eNOS	- Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal
NOS	- Óxido nítrico sintase
OVLT	- <i>Organum vasculosum da lamina terminalis</i>
SFO	- Órgão subfornical
CVO	- Órgão circumventricular
AV3V	- anteroventral do terceiro ventrículo
OF	- Operação Fictícia
NH	- Neurohipofise

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	v
Abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Vasopressina (AVP) e Ocitocina (OT).....	2
1.2. Sepses	4
1.3. Resposta a Microrganismos	6
1.4. Fisiopatologia da sepses: Encefalopatia associada à sepses	6
1.5. Fisiopatologia da sepses: iNOS	8
1.6. AVP e OT na Sepses.....	9
1.7. Modelo experimental de indução de sepses	10
1.8. Osmorreceptores: Região AV3V e OVLT	10
1.9. Prejuízo em longo prazo	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. Objetivo	15
2.2. Objetivo específico	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1. Animais	17
3.2. Protocolo Experimental	17
3.3. Anestesia	18
3.4. Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP)	18
3.5. Hematócrito	18
3.6. Separação do plasma e do soro	19
3.7. Sódio sérico	19
3.8. Osmolalidade plasmática	19
3.9. Dosagem hormonal Plasmática.....	19
3.10. Dosagem de AVP e OT na NH.....	20
3.11. Análise estatística	21
4. RESULTADOS	22
4.1. Curva de Sobrevida	23
DESIDRATAÇÃO	24
4.2. Análise do hematócrito	24
4.3. Determinação do Sódio Sérico	25
4.4. Determinação da Osmolalidade Plasmática	26
4.5. Efeito da Desidratação sobre a secreção de Vasopressina	26
4.6. Efeito da desidratação sobre a secreção de OT em animais sobreviventes à sepses	27
4.7. Determinação do conteúdo Neurohipofisário de AVP	28
4.8. Determinação do conteúdo Neurohipofisário de OT	29

HIPOVOLEMIA	30
4.9. Efeito da injeção de solução de PEG i.p sobre o hematócrito	30
4.10. Efeito da hipovolemia induzida sobre Sódio Sérico	31
4.11. Determinação da osmolalidade plasmática.	32
4.12. Efeito da hipovolemia sobre AVP plasmática	33
4.13. Efeito da Hipovolemia sobre OT plasmática	34
4.14. Determinação do conteúdo neurohipofisário de OT	35
4.15. Determinação do conteúdo neurohipofisário de AVP	36
 5. DISCUSSÃO	 38
 6. CONCLUSÃO	 44
 7. REFERÊNCIAS	 45
 8. ANEXO	 54

INTRODUÇÃO

1.1. Vasopressina (AVP) e Ocitocina (OT)

AVP e OT são hormônios sintetizados principalmente nos núcleos supraópticos (SON) e paraventriculares (PVN) do hipotálamo, mas também em agrupamento de células espalhadas pelo hipotálamo medial e lateral, os núcleos acessórios (Cunningham e Sawchenko, 1991). Eles são transportados em vesículas através de axônios que se projetam para a neurohipófise, por onde são secretados segundo estímulos fisiológicos adequados como a hipotensão, aumento da osmolalidade (estímulo osmótico) e hipovolemia (Sawchenko e Swanson, 1983; Cunningham e Sawchenko, 1991). A liberação destes hormônios é desencadeada via alterações no potencial de ação causado nas células do núcleo PVN e SON e propagados até as terminações nervosas neurohipofisárias. O estímulo de liberação pode tanto ser para um dos hormônios ou ambos os hormônios. Eles diferem somente em 2 aminoácidos e além de semelhantes estruturalmente, existe uma similaridade nas suas funções (Figura 1).

Ocitocina		Vasopressina	
1	Cisteína	1	Cisteína
2	Tirosina	2	Tirosina
3	Isoleucina	3	Fenilalanina
4	Glutamina	4	Glutamina
5	Asparagina	5	Asparagina
6	Cisteína	6	Cisteína
7	Prolina	7	Prolina
8	Leucina	8	Arginina
9	Glicina	9	Glicina

Figura 1. Semelhança entre AVP e OT. Os hormônios nonapeptídicos OT e AVP se assemelham em sete aminoácidos, com diferenças nas posições 3 e 8, sendo que o AVP possui Fenilalanina e Arginina, Ocitocina possui Isoleucina e Leucina, respectivamente (Cunningham e Sawchenko, 1991).

A AVP, ou hormônio antidiurético, é um hormônio essencial para a regulação do volume de fluidos no organismo, da osmolalidade e da constrição vascular. Também participa de funções comportamentais e cognitivas, como estresse, reconhecimento social, respostas de medo, depressão e ansiedade (Dunn, Brennan et al., 1973; Peixoto, 2003; Antunes-Rodrigues, De Castro et al., 2004; Giusti-Paiva, Martinez et al., 2007). Ela também age como um neurotransmissor regulando o ritmo circadiano, a termorregulação e a liberação de Hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). (Sharman, 2008).

A OT exerce suas atividades através de receptores acoplados à proteína-G, que são amplamente expressos pelo corpo (Erbas, 2013; Jankowski, 2000; Tan, 2007). A OT é liberada durante o parto ou a amamentação e está também relacionada com a proteção contra lesões teciduais (Elands, De Kloet et al., 1992; Kimura, 1995; Iseri, Sener et al., 2005). As ações fisiológicas mais conhecidas estão relacionadas aos órgãos femininos, porém também possui ação na ejaculação e nos testículos com a diminuição da síntese de androgênicos (Cunningham e Sawchenko, 1991; McGregor e Lang, 2001). Outras funções da OT são aumento da secreção de insulina, oxidação da glicose e aumento dos triglicerídeos dos adipócitos, potencialização do efeito antidiurético e natriurético da AVP nos rins, efeito vasoconstritor fraco e efeitos comportamentais (Cunningham e Sawchenko, 1991; McGregor e Lang, 2001).

Porém, no rato, a OT também possui funções relacionadas ao equilíbrio da concentração de sódio e regulação da osmolalidade, da mesma forma que a AVP, sendo potencialmente natriurética e tendo as alterações osmóticas como um mecanismo de regulação de sua secreção. (Verbalis, Mangione et al., 1991; Conrad, Gellai et al., 1993; Bourque e Oliet, 1997).

Outros estímulos como febre, aumento da angiotensina II, endotoxinas, estresse, náusea, interleucina-1 (IL-1), prostaglandinas, hipóxia e acidose também são capazes de estimular a liberação desses hormônios. (Dunn, Brennan et al., 1973; Cunningham e Sawchenko, 1991; Leone e Boyle, 2006).

A AVP age sobre os receptores V1, V2 e V3. Os receptores V1 são encontrados na musculatura vascular lisa da circulação sistêmica, esplênica, renal e coronariana. Suas principais funções nos vasos é induzir vasoconstrição. Via V1, a AVP ainda parece ter uma participação no fígado induzindo glicogenólise, além de ter participação na regulação de temperatura corporal e regulação do ciclo sono-

vigília (Cunningham e Sawchenko, 1991; Holmes, Patel *et al.*, 2001). Receptores V2 para AVP são predominantemente encontrados nos ductos coletores renais. Estes receptores possuem papel fundamental na regulação do volume plasmático e controle da osmolalidade. Receptores V3 estão envolvidos na liberação de ACTH e podem agir como neurotransmissores ou então mediadores envolvidos na consolidação da memória e termorregulação. (Sharman, 2008).

1.2. Sepses

Sepses e suas complicações são reconhecidas por pesquisadores e profissionais da área de saúde como uma das maiores causas de mortalidade em pacientes internados em unidades de terapia intensiva em todo o mundo. A taxa de mortalidade desta doença/síndrome variou de 25 e 61% de acordo com o relato clínico em hospitais da Europa, América do Norte e América do Sul, ao longo das últimas décadas (Peixoto, 2003; Vincent e Korkut, 2008; Levy, Dellinger *et al.*, 2010; Mann, Baun *et al.*, 2012). A Sepses é responsável por entre 2 e 11% de todas as admissões de pacientes em leitos de unidades de terapia intensiva, levando a gastos de até 16,7 bilhões de dólares anuais, apenas nos Estados Unidos (Angus e Wax, 2001; Lagu, Rothberg *et al.*, 2012; Guirgis, Khadpe *et al.*, 2014).

É considerada um estado complexo de doença, ou uma síndrome, resultado de uma resposta inflamatória sistêmica e exagerada do organismo a microrganismos patogênicos ou potencialmente patogênicos. Esta resposta alterada do sistema imune, característica da sepses, é prejudicial ao paciente, podendo levar a complicações como falha múltipla dos órgãos e até a morte. Pode afetar indivíduos de todas as faixas etárias, mas principalmente crianças e idosos, podendo atingir tanto homens como mulheres, independentemente de etnia ou região em que habitam (Bone, Balk *et al.*, 1992; Peixoto, 2003; Vincent e Korkut, 2008; Calsavara, Rodrigues *et al.*, 2013; Kanczkowski, Alexaki *et al.*, 2013).

Uma detecção rápida dos sintomas e um tratamento agressivo criam uma oportunidade de melhor recuperação do paciente, levando a uma grande redução de custos nas unidades de terapia intensiva, enquanto aumenta a taxa de sobrevivência de pacientes acometidos (Moore, Jones *et al.*, 2009; Moore, McKinley *et al.*, 2011; Mann, Baun *et al.*, 2012). O maior desafio para a pesquisa e o tratamento da sepses está relacionado com a padronização dos sinais e sintomas que determinam esta

doença complexa. Muitas vezes os profissionais da área da saúde demoram a perceber a sintomatologia e o tratamento se torna pouco eficiente (Vincent e Korkut, 2008).

Quanto à necessidade dos profissionais de saúde padronizar a definição de sepse, duas conferências se destacam: em 1991, o American College of Chest Physicians (ACCP) e a Society of Critical Care Medicine propuseram o termo SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) e a partir de SIRS definiram os termos Sepse, Sepse grave e Choque séptico (Bone, Balk et al., 1992; Vincent e Korkut, 2008). SIRS foi definida como sendo a presença de ao menos dois dos quatro critérios clínicos listados: temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C; batimentos cardíacos acima de 90 /minuto; frequência respiratória acima de 20 expirações/minutos ou hiperventilação com PaCO₂ abaixo de 32mmHg; leucocitose igual ou maior que 12000/mm³, leucopenia igual ou menor que 4000/mm³ número de neutrófilos imaturos acima de 10%. Porém a SIRS não é específica da sepse e pode estar presente em várias doenças. Sepse foi definida como SIRS adicionada de um processo infeccioso confirmado. Sepse grave seria a sepse com hipoperfusão de pelo menos um órgão e hipotensão associada à sepse. Choque séptico é definido como a sepse grave com hipotensão refratária ao tratamento por reposição volêmica, sendo necessária a utilização de drogas vasopressoras (Bone, Balk et al., 1992; Vincent e Korkut, 2008).

Frente a críticas sobre a baixa especificidade desta definição da sepse, o que limitaria o seu uso clínico, uma nova conferência foi realizada em 2001, onde foi sugerida a expansão da lista de sinais e sintomas, o que poderia surtir em um melhor diagnóstico da doença, embora nenhum destes sinais e sintomas seja específico da sepse. (Levy, Fink et al., 2003).

Em 2003, porém, para melhor definir a gravidade do paciente com sepse, foi definido o termo PIRO (Predisposition, Insult Infection, Response, Organ dysfunction) que considera, além da resposta inflamatória, diversos outros fatores, como idade, fatores genéticos, o tipo de microrganismo, local de infecção e o quadro de agravamento da função dos diferentes órgãos. (Levy, Fink et al., 2003; Vincent e Korkut, 2008).

1.3. Resposta a Microrganismos

A presença de microrganismos em locais normalmente estéreis pode causar infecção e consequentemente uma resposta do organismo àquele patógeno em potencial. (Levy, Fink et al., 2003).

As células do sistema imune inato do organismo têm a capacidade de reconhecer diversos fatores de virulência de microrganismos através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs), o que inicia a resposta imune com a produção de mediadores. (Akira, Uematsu et al., 2006; Ramachandran, 2014). São exemplos de fatores de virulência bacterianos: os lipopolissacarídeos de bactérias gram-negativas ou ácido lipoteicóico de bactérias gram-positivas. (Parrillo, 1993; Glauser, Heumann et al., 1994; Ramachandran, 2014).

A resposta do organismo a microrganismos também inclui alterações hemodinâmicas e liberação de hormônios como o ACTH, a OT e a AVP. Estes hormônios têm ações importantes na manutenção do balanço hemodinâmico e também possuem funções na regulação da temperatura corporal e modulação da resposta inflamatória. (Schaller, Waeber et al., 1985; Kasting, 1986; Rivier, Chizzonite et al., 1989; Berczi, 1998; Mccann, Antunes-Rodrigues et al., 2000; Phelps, Dong et al., 2001; De Carvalho Borges, Carnio et al., 2006).

1.4. Fisiopatologia da sepse: Encefalopatia associada à sepse

O processo fisiopatológico da sepse envolve a interação de alguns componentes, como imunológicos, endócrinos e genéticos, frente a componentes infecciosos, ocasionando na produção exagerada de mediadores inflamatórios diversos e o consequente desequilíbrio de algumas funções fisiológicas (Wong, Bongiorno et al., 1997; Konsman, Kelley et al., 1999; Trentzsch, Stewart et al., 2003; Maxime, Siami et al., 2007; Siami, Annane et al., 2008; Salomao, Brunialti et al., 2009). São exemplos de mediadores produzidos durante a sepse: citocinas, óxido nítrico, fator ativador de plaquetas, leucotrienos e prostaglandinas (Bone, 1991; Rios-Santos, Benjamim et al., 2003; Siami, Annane et al., 2008; Oliveira-Pelegrin, Aguila et al., 2010).

A resposta inflamatória exagerada e hipoperfusão de tecidos induzida pela sepse podem levar a disfunção múltipla dos órgãos, assim como alterações no sistema nervoso central (CNS), as quais podem causar uma condição conhecida como encefalopatia associada à sepse (SAE). (Calsavara, Rodrigues et al., 2013).

A fisiopatologia da SAE é bastante complexa e envolve processos isquêmicos e neuroinflamatórios. Estes dois processos resultam em disfunção celular e envolvem estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e falha bioenergética. Em um nível neuronal, estas complicações comprometem a sobrevivência da célula e a neurotransmissão. (Bozza, D'avila et al., 2013; Sharshar, Mazeraud et al., 2014).

Por definição, SAE não é relacionada a uma infecção do CNS, mas aos mediadores liberados durante a sepse. (Sharshar, Mazeraud et al., 2014) Níveis aumentados de citocinas, principalmente a interleucina-1 β (IL-1 β), parecem induzir a expressão de genes da isoforma induzida de Óxido Nítrico Sintase (iNOS) no hipotálamo. A iNOS produz grande quantidade do NO (Óxido Nítrico), o qual pode agir na bioenergética mitocondrial, afetando o consumo de oxigênio e podendo levar a um quadro de hipóxia metabólica. Esta condição pode induzir a formação do fator de transcrição funcional HIF-1 (Hypoxia inducible factor-1), que regula a expressão de vários genes envolvidos na via da morte celular programada (apoptose) (Wong, Bongiorno et al., 1996; Wong, Rettori et al., 1996; Bruick, 2000; Sharp e Bernaudin, 2004; Oliveira-Pelegrin, Basso et al., 2014).

Em condições neuroinflamatórias como SAE, morte celular pode acontecer por necrose ou apoptose, devido à hipóxia, estresse oxidativo e outros fatores citotóxicos. Através de imagem cerebral, é possível notar em pacientes com SAE regiões com lesões, sugerindo permeabilidade na barreira hematoencefálica aumentada, o que pode ser relacionado a um pior prognóstico da doença. (Siami, Annane et al., 2008; Bozza, D'avila et al., 2013).

Em um estudo usando o modelo de CLP (Ligação cecal e punção) para a indução de sepse em ratos, foi observada atividade mitocondrial diminuída principalmente após 6 horas da indução de sepse, em diversas estruturas cerebrais (Comim, Rezin et al., 2008). Disfunção da cadeia transportadora de elétrons da mitocôndria e o estresse oxidativo parecem ter uma associação com as disfunções cerebrais características da SAE. Esta disfunção mitocondrial é mais provável ser secundária a uma resposta inflamatória do que uma redução na pressão sanguínea. (Comim, Rezin et al., 2008; Bozza, D'avila et al., 2013).

1.5. Fisiopatologia da sepse: iNOS

O NO é um importante mediador gasoso de nosso organismo. Produzido pelas sintases de óxido nítrico, o NO atua no controle da pressão e fluxo sanguíneo. Porém, sua produção em excesso também está associada à hipotensão e hiporreatividade vascular, características do choque séptico (Kirkeboen e Strand, 1999).

Existem três isoformas de NOS, sendo duas delas constitutivas, a óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e uma isoforma induzida (iNOS). Durante a sepse, quando a iNOS também é ativada, as concentrações de NO começam a se elevar exageradamente e contribui para diversas características fisiopatológicas da sepse, como por exemplo: intensa vasodilatação periférica (consequentemente hipotensão grave), hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, disfunção miocárdica e redução da migração dos neutrófilos para o foco da inflamação. Altos níveis de NO podem levar à morte celular de duas formas: necrose pela depleção de fonte de energia e apoptose mediado por estresse nitrosativo/oxidativo (Bozza, D'avila et al., 2013).

Além destes efeitos, o NO pode modular a secreção hormonal, podendo ser um dos responsáveis pela alteração da secreção de AVP e OT na fase inicial da sepse. A administração de inibidor de NOS eleva as concentrações plasmáticas de AVP e OT, indicando um papel inibitório do NO sobre estes dois hormônios. (Kadekaro, Liu et al., 1997; Kadekaro e Summy-Long, 2000; Giusti-Paiva, Ruginsk et al., 2003). Na fase inicial da sepse, há um aumento na expressão de c-fos, um indicativo de ativação de neurônios do SON e PVN, núcleos hipotalâmicos responsáveis pelas sínteses de AVP e OT e em estruturas que possuem aferências nesses núcleos, como o *organum vasculosum da lamina terminalis* (OVLT), órgão subfornical (SFO), núcleo do trato solitário, área postrema, locus coeruleus e a medula ventro lateral bulbar (Correa, Pancoto et al., 2007; Bruhn, Correa et al., 2009). Já em uma fase mais tardia da sepse, quando o NO está em níveis mais elevados, as quantidades de células positivas à proteína Fos nos núcleos vasopressinérgicos e ocitocinérgicos magnocelulares estão bastante diminuídas, o que aparentemente compromete a reposição dos estoques neurohipofisários de AVP. (Correa, Pancoto et al., 2007; Pancoto, Correa et al., 2008; Athayde, Oliveira-

Pelegrin et al., 2009; Oliveira-Pelegrin, Ravanelli et al., 2009). Além disso, o NO é um gás de meia vida curta e o produto de sua degradação pode contribuir com processos de danos nas membranas celulares por peroxidação lipídica (Moncada, Palmer et al., 1991).

1.6. AVP E OT na Seps

Vários estudos clínicos e experimentais relatam o aumento das concentrações plasmáticas de AVP, como tentativa de restabelecer a pressão sanguínea que começa a diminuir na fase inicial da seps (Wilson, Brackett et al., 1981; Brackett, Schaefer et al., 1985; Landry e Oliver, 2001; Sharshar, Blanchard et al., 2003; Pancoto, Correa et al., 2008; Sonnevile, Guidoux et al., 2010).

Já na fase tardia da doença, os pacientes apresentam concentrações plasmáticas reduzidas de AVP, mesmo em quadro progressivo de hipotensão, um dos principais estímulos para aumento da secreção do hormônio, sinalizando assim uma falência do sistema hipotálamo-neurohipofisário (Sharshar, Blanchard et al., 2003; Jochberger, Mayr et al., 2006; Siami, Bailly-Salin et al., 2010). Acredita-se que a depleção no conteúdo neurohipofisário seria uma das causas para esta secreção inapropriada de AVP após 24 horas do início da seps (Sharshar, Carlier et al., 2002).

Essa diminuição de AVP contribui para a progressão da hipotensão podendo levar ao choque séptico (Landry e Oliver, 2001; Sharshar, Blanchard et al., 2003; Siami, Polito et al., 2013). Estes resultados clínicos foram comprovados experimentalmente em nosso laboratório onde foi usado o modelo de injeção de LPS ou CLP para a indução de seps em ratos (Borges e Da Rocha, 2006; De Carvalho Borges, Carnio et al., 2006; Correa, Pancoto et al., 2007; Pancoto, Correa et al., 2008; Athayde, Oliveira-Pelegrin et al., 2009; Oliveira-Pelegrin, Ravanelli et al., 2009).

OT pode agir como um agente imunomodulatório ou anti-inflamatório durante os processos de reparação tecidual e seps experimental, através do equilíbrio entre citocinas proinflamatórias e anti-inflamatórias (Tan, 2007; Erbas, 2012; Erbas, 2013).

Na fase inicial da seps, a OT apresenta um padrão de secreção similar ao da AVP, quando sua concentração plasmática aumenta drasticamente, porém em uma fase tardia, a OT também retorna a níveis basais, possivelmente como no caso da

AVP por conta o efeito inibitório do NO produzido em elevada quantidade (Oliveira-Pelegrin, Saia et al, 2013).

1.7. Modelo experimental de indução de sepse

Administração do lipopolissacarídeo (LPS), um dos principais componentes bacterianos que geram uma resposta do sistema imunológico, tem sido usado como modelo de indução de choque endotóxico. (De Carvalho Borges, Carnio et al., 2006) O modelo de endotoxemia, por injeção de LPS, é reproduzível e simples. Os sinais da endotoxemia, em camundongos, acontecem de forma bastante rápida e esta é uma das desvantagens deste modelo. O surgimento das citocinas pró-inflamatórias é muito rápido e se diferencia do aumento mais baixo e prolongado das citocinas nos casos em pacientes sépticos. (Nemzek, Hugunin et al., 2008).

Um modelo mais complexo e bastante usado é o CLP, que consiste em uma lesão intestinal causada por uma cirurgia, onde há a ligadura parcial do ceco do animal, perfuração com uma agulha na borda antimesentérica e exposição das fezes. Após reintrodução do ceco à cavidade peritoneal e sutura, a microbiota intestinal que extravasa para o peritônio irá causar a sepse, neste caso, polimicrobiana, o que mimetiza alguns casos de pacientes (Wichterman, Baue et al., 1980; Dejager, Pinheiro et al., 2011).

Este modelo é considerado um dos melhores modelos de indução experimental de sepse em animais, possuindo várias características e resultados em comum com a sepse humana nas UTIs. Este modelo experimental não tem sido usado apenas para investigar a fisiopatologia da sepse, mas também é utilizado para avaliar possíveis terapias. (Brooks, Osabutey, et al, 2007; Hubbard, Choudhry, et al, 2005).

1.8. Osmorreceptores: Região AV3V e OVLT

É amplamente aceito que a barreira hematoencefálica impede o acesso de pirogênios ou citocinas ao encéfalo, que medeia respostas importantes à inflamação sistêmica. Também é muito bem documentada a existência de órgãos circunventriculares (CVOs), que carecem de uma barreira hematoencefálica e

interagem com outros núcleos hipotalâmicos envolvidos em mecanismos neuroendócrinos (De Carvalho Borges, Carnio et al., 2006). Vários estudos têm associado estas estruturas ao controle da temperatura corporal, pressão arterial e alterações no consumo de água. (Elmqvist, Scammell et al., 1997; De Carvalho Borges, Carnio et al., 2006).

Osmorreceptores centrais na região anteroventral do terceiro ventrículo AV3V, localizados fora da barreira hematoencefálica, monitoram a osmolalidade plasmática sistêmica. Osmorreceptores periféricos são encontrados na veia porta hepática e dão sinalização sobre a osmolalidade de alimentos e fluidos ingeridos (Sharman, 2008).

Tem sido relatado que a região AV3V em torno do OVLT é um dos locais de onde a informação humoral de citocinas é convertida em sinais neurais para o desenvolvimento de uma resposta de fase aguda no choque séptico. A região AV3V é funcionalmente relacionada à regulação de comportamento, e atividades neuronais e hormonais envolvidas na homeostase de fluido corporal e do sistema cardiovascular (Bealer, Caldwell et al., 1988; Russell, Blackburn et al., 1988; Antunes-Rodrigues, De Castro et al., 2004).

Lesão nesta região, que destrói o OVLT, a porção ventral do núcleo preóptico mediano e núcleo preóptico periventricular, bloqueia a secreção de AVP e OT em resposta a um estímulo osmótico. (Gruber, Wilkin et al., 1986; Wilkin, Gruber et al., 1986; Blackburn, Leng et al., 1987; Russell, Blackburn et al., 1989; Ludwig, Callahan et al., 1996; Mckinley, Mathai et al., 2004; De Carvalho Borges, Carnio et al., 2006)

1.9. Prejuízo em longo prazo

Sepse grave está associada a prejuízo cognitivo de longo termo, como alterações na capacidade de memorização, atenção e concentração, além de inaptidão funcional entre os sobreviventes. Possivelmente, um grande espectro de doenças pode ocorrer, variando de uma alteração pequena e transitória até uma disfunção cerebral irreversível, variando de um delírio agudo até uma queda cognitiva crônica. (Hopkins, Weaver et al., 1999; Heyland, Hopman et al., 2000; Guirgis, Khadpe et al., 2014). Além disso, sobreviventes à sepsis tem demonstrado ter uma queda no funcionamento físico, habilidade de cuidar de si mesmo,

depressão, maior sensibilidade à dor e saúde em geral debilitada (Brown e Bal-Price, 2003; Bozza, D'avila et al., 2013; Guirgis, Khadpe et al., 2014).

Tanto animais em modelo experimental da sepse como pacientes sobreviventes a sepse apresentam prejuízos cognitivos relacionados à sepse. Estas alterações podem estar relacionadas parcialmente com o estresse oxidativo e encefalopatia. Pacientes sobreviventes à sepse apresentaram sinais de dano oxidativo em algumas regiões do cérebro. Terapias que previnem o dano oxidativo cerebral estão associadas à redução do prejuízo cognitivo em ratos (Guirgis, Khadpe et al., 2014). Em ratos, as sequelas no aprendizado, comportamento tipo depressivo e alteração na memória foi detectada após 10 dias da indução da sepse. (Tuon, Comim et al., 2008).

Por anos, o foco de estudo dos investigadores tem sido a redução da mortalidade de pacientes com sepse, sendo que estes esforços aumentaram o relato de morbidades. Alguns resultados indicam a prevalência de disfunção renal, pulmonar e hepática em pacientes sobreviventes à sepse. Estas disfunções podem causar diversas complicações como dependência de hemodiálise ou cirrose e coagulopatias. Estas complicações mostram a importância de entendermos a prevalência de diferentes disfunções de órgãos em longo prazo e as estratégias para prevenir as falhas de órgãos individuais. (Guirgis, Khadpe et al., 2014)

Também foi observado que uma grande porcentagem dos pacientes em estágios avançados de choque séptico e ainda internados, podem não responder adequadamente a um estímulo osmótico empregado para a secreção de AVP, mantendo este hormônio em níveis basais (Siami, Bailly-Salin et al., 2010). Cerca de 60% dos pacientes em recuperação do choque séptico também apresentam uma incapacidade em responder com a secreção deste hormônio ao mesmo estímulo osmótico. Aparentemente, os pacientes não respondedores ao estímulo apresentam uma persistência no prejuízo da resposta por meses após a liberação destes pacientes do hospital. Ocorre, também, queda da percepção da sede, sugerindo uma alteração funcional ou estrutural dos osmorreceptores, sensíveis à variação osmótica. Os osmorreceptores podem estar diminuídos, possivelmente por apoptose, que parece ocorrer também em neurônios hipotalâmicos durante o choque séptico (Sharshar, Gray et al., 2003; Bourque, 2008; Siami, Polito et al., 2013).

Entretanto, não há relatos de alterações de secreção de OT em pacientes sobreviventes à sepse, e também nenhum relato sobre a alteração do eixo hipotálamo-neurohipofisário em animais que sobreviveram à doença.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo

Verificar se há comprometimento do eixo hipotálamo-neurohipofisário, que ocasione alterações da secreção de AVP e OT, após estímulo osmótico e/ ou hipovolêmico em animais sobreviventes à sepse.

2.2. Objetivos específicos

Verificar as concentrações plasmáticas e neurohipofisárias dos hormônios nonapeptídeos AVP e OT, após estímulo osmótico e/ou hipovolêmico, através da desidratação por privação da ingestão de água, ou estímulo volêmico puro, por injeção de Polietilenoglicol (PEG), em animais que sobreviveram à sepse.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram usados ratos Wistar machos pesando entre 250 e 300g provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo do Campus de Ribeirão Preto. Estes animais foram separados em gaiolas individuais 24 horas antes da cirurgia, com água e ração ad libitum e temperatura controlada em $\pm 25^{\circ}\text{C}$.

Os critérios de “humane endpoints in shock research” foram utilizados para o sacrifício dos animais submetidos à CLP em sofrimento intenso (Nemzek, Xiao et al., 2004). Após os experimentos, estes animais foram retornados às caixas individuais onde permaneceram durante sua recuperação.

3.2. Protocolo Experimental

Os animais ou tiveram sepse induzida por CLP ou foram submetidos à Operação Fictícia (OF) e a seguir foram observados durante 10 dias para análise de sobrevivência. Aqueles que sobreviveram foram divididos em dois grupos. Um primeiro grupo de animais sobreviventes foi submetido à desidratação por 2 dias pela retirada de água para beber de suas gaiolas. Um segundo grupo foi submetido à hipovolemia com injeção intraperitoneal de solução de polietilenoglicol (PEG-4000, 200mg/ml de PBS) no volume de 2ml/100g de animal. Os controles foram animais hidratados ou que receberam injeção intraperitoneal de PBS 0,01M. Após a desidratação ou noventa minutos da indução de hipovolemia com o PEG, os animais foram decapitados e tiveram o sangue coletado para as análises do hematócrito, osmolalidade, sódio sérico e dos hormônios AVP e OT no plasma. O cérebro do animal foi removido e a neurohipófise foi dissecada e armazenada em microtubos plásticos com 200 μl de HCl 0,1N até o momento da dosagem dos hormônios por radioimunoensaio. Este protocolo foi aprovado pela comissão de ética no uso de animais do Campus de Ribeirão Preto (CEUA nº 11.1.1640.53.7).

Indução de sepse

3.3. Anestesia

Todos os animais que foram submetidos à manipulação cirúrgica foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução 2,5% de Tribromoetanol (TBE, AldrichChem. Corp. Inc.) em solução salina, na dose de 1ml/100g de peso corporal do rato.

3.4. Cirurgia de ligação cecal e punção (CLP)

Após serem devidamente anestesiados, os ratos foram submetidos à incisão central de aproximadamente 2 cm no abdômen, seguido de exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) no segmento distal da válvula ileocecal. Posteriormente, o ceco foi perfurado (uma perfuração) com agulha 14G na borda antimesentérica. Após a verificação da saída de fezes do ceco, este foi reintroduzido na cavidade abdominal e o fechamento da mesma foi realizado em dois planos de sutura com poliéster. Solução salina normal foi aplicada por via subcutânea, como líquido de reanimação (50mL/kg). Ceftriaxona (30mg/Kg) e clindamicina (25mg/Kg) foram administrados a cada 6h por 3 dias via subcutânea (iniciando-se 6h após CLP). O grupo controle foi submetido à cirurgia fictícia, sem ligadura nem perfuração cecal. O procedimento cirúrgico incluiu, somente, laparotomia mediana, manipulação do ceco e fechamento da cavidade abdominal e ao animal foi administrado salina em volume correspondente à administração de antibióticos. (Tuon, Comim et al., 2008). Os animais foram submetidos à cirurgia no período da manhã, entre 08h00min e 10h00min.

Determinação de hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, AVP e OT plasmáticas e na neurohipófise.

3.5. Hematócrito

Após a decapitação, parte do sangue foi coletada em tubos de microcapilaridade heparinizados (Fisher) para determinação de hematócrito, Os

tubos foram selados na extremidade contrária à entrada de sangue com auxílio de uma lamparina e centrifugados por 3 minutos em centrífuga própria para hematócrito (Centímicro Mod. 211, FANEN). A leitura do hematócrito foi feita com auxílio de um cartão próprio para esta finalidade.

3.6. Separação do plasma e do soro

Após a decapitação dos animais, uma parte do sangue foi coletada do tronco em tubos plásticos, mantidos sob gelo, contendo heparina e centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos. O plasma obtido foi dividido em dois microtubos plásticos: um com 2.0 ml para posterior dosagem hormonal e outro com aproximadamente 0,5 mL que foi utilizado para determinação de osmolalidade. Outra parte do sangue foi coletada em microtubos de plástico sem anticoagulante e centrifugada a 3500 rpm por 20 minutos para a determinação do sódio sérico. O plasma e o soro foram armazenados a -80°C após a coleta e até o momento das dosagens.

3.7. Sódio sérico

O sódio sérico foi determinado em fotômetro de chama (Micronal), calibrado com solução padrão Micronal contendo 140mEq/L de sódio e 5mEq/L de potássio, diluída em água destilada em proporção 1:100. As amostras foram diluídas na mesma proporção do padrão (30µL do soro em 2,97 mL de água destilada), homogeneizadas com o auxílio de um vórtex e aspirada no fotômetro de chama para a leitura da concentração de sódio sérico.

3.8. Osmolalidade plasmática

300 µL de plasma foram utilizados para a determinação da osmolalidade plasmática pelo método do abaixamento do ponto de congelamento da água em micro-osmômetro (Advanced Instruments, INC.).

3.9. Dosagem hormonal Plasmática.

As dosagens hormonais de AVP e OT foram realizadas utilizando a técnica de radioimunoensaio (RIE) no laboratório do Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues. Todas as amostras provenientes de um mesmo experimento foram determinadas em duplicata, em um mesmo ensaio. O sangue foi coletado após a decapitação, em tubos plásticos, contendo heparina sódica na concentração de 5000UI/ml (10 µL/2 ml). O plasma foi então separado por centrifugação (3500 rpm, 4°C, 20min) e as alíquotas mantidas em freezer (-80°C) até o momento das dosagens hormonais.

Para as dosagens, o plasma é usado para extrair os hormônios usando acetona e éter de petróleo. O produto final da extração é liofilizado e estocado em -20°C até o início do RIE.

Os hormônios AVP e OT foram dosados utilizando-se anti-soros específicos em diluição final de 1:60.000 e 1:90.000, respectivamente. Os peptídeos marcados com I¹²⁵ foram separados dos não marcados utilizando um anticorpo secundário produzido no laboratório aonde o ensaio foi realizado.

3.10. Dosagem de AVP e OT na NH

A neurohipófise coletada foi homogeneizada com a utilização de um sonicador e estocada em freezer (-80°C) para a dosagem do conteúdo hormonal de AVP e OT (Elias, Antunes-Rodrigues et al., 1997).

No momento da dosagem pelo método de RIE, foi necessário calcular a concentração de proteínas totais da Neurohipófise (pelo método de Bradford). Após, 10ul dos homogenados de NH foram dispostos em microplatas de 96 poços, junto com 200ul de “protein assay dye Reagent Concentrate”, diluídos na porção de 1:5 em água milliQ. A leitura da curva padrão de albumina e das amostras foi feita em leitor de microplatas Synergy em amplitude de onda de 595 nm e temperatura de 37°C. Estes resultados foram necessários para normalizar as concentrações de AVP e OT na Neurohipófise.

A neurohipófise foi diluída 1:40.000 e 1:80.000 para a dosagem de AVP e OT, respectivamente. A diluição foi feita em tampão específico, sem a necessidade de liofilizar as amostras. Os anti-soros, peptídeos marcados e anticorpos secundários empregados no RIE para a NH são os mesmos utilizados para o RIE do plasma.

3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Para análise estatística foram utilizados testes como one way ou two way ANOVA, seguidos por pós-teste Student Newman Keuls. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

4.1. Curva de Sobrevida

Cento e dois animais foram selecionados para a cirurgia de CLP. Eles foram observados diariamente e a data de morte dos ratos era anotada para a montagem de uma curva de sobrevida. Ao todo, 35,29% dos animais induzidos à sepse pelo modelo de CLP morreram entre os primeiros nove dias. Nenhum animal morreu após décimo dia. (Figura 2) Até o quarto dia de acompanhamento, a mortalidade foi de 14,71%, a mesma porcentagem de morte entre os dias 4 e 7. Entre os dias 7 e 9 a mortalidade foi de 5,88%.

Todos os animais submetidos à OF sobreviveram.

Figura 2. Curva de Sobrevida. Porcentagem de sobrevida em relação ao tempo de observação dos animais. Os animais sobreviventes foram induzidos à desidratação ou hipovolemia. Ao todo foram 102 animais induzidos à sepse (CLP) e 71 animais operação fictícia (OF).

DESIDRATAÇÃO

4.2. Análise do hematócrito

Após submeter os animais a dois dias de desidratação, a análise por hematócrito constatou hipovolemia (Tabela 1) (Figura 3). Não foi detectada diferença estatística entre animais sobreviventes à sepse (CLP) ou com operação fictícia (OF).

Tabela 1: Análise do hematócrito (%) após estímulo de desidratação.

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
Hidratado	42,5±1,2	8	43,1±1,3	10
Desidratado	50,0±1,1*	7	50,5±1,5*	7

Desidratação. * <0,05 comparados a Hidratação dentro do mesmo grupo. Resultados descritos como Média ± erro padrão da média

Figura 3. Análise do hematócrito após desidratação. Hematócrito do sangue de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou à sepse por CLP, após estímulo osmótico através da privação de água por dois dias ou controle (Hidratado). * p<0,05 (vs Hidratado).

4.3. Determinação do Sódio Sérico

Tanto os animais submetidos à CLP, quanto OF, apresentaram um aumento de sódio sérico após desidratação por dois dias, sendo mais acentuado nos animais sobreviventes à sepse. (Tabela 2) (Figura 4).

Tabela 2: Determinação de sódio sérico (meq/L) após estímulo de Desidratação.

Estímulo	GRUPOS			
	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
Hidratação	147,8±1,0	5	151,4±0,6§	5
Desidratação	154,0±0,3*	6	155,7±0,5*§	7

Desidratação. *<0,05 comparados a Hidratação dentro do mesmo grupos; CLP. §<0,05 comparado a Operação Fictícia dentro do mesmo estímulo. Resultados descritos como Média ±erro padrão da média

Figura 4. Determinação de sódio sérico após desidratação. Sódio sérico em animais submetidos à operação fictícia (OF) ou sepse (CLP) após estímulo osmótico por desidratação por dois dias *p<0,05 (vs Hidratado), §p<0,05 (vs OF).

4.4. Determinação da Osmolalidade Plasmática

Comparação dos valores da osmolalidade em animais CLP e OF, mostrou um aumento significativo sem diferença entre os grupos de animais sépticos e OF (Tabela 3) (Figura 5).

Tabela 3: Determinação da osmolalidade plasmática (mOsm/Kg) após desidratação.

Estímulo	GRUPO			
	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
Hidratação	298,4±1,6	9	303,0±1,1	7
Desidratação	316,4±2,8*	5	311,3±2,1*	4

Desidratação. * $p < 0,05$ comparados a Hidratação dentro do mesmo grupo. Resultados descritos como Média $\pm$ erro padrão da média

Figura 5. Osmolalidade Plasmática após desidratação. Osmolalidade plasmática de animais sobreviventes à sepse (CLP) ou operação fictícia (OF) após desidratação por dois dias. * $p < 0,05$ (vs Hidratado).

4.5. Efeito da Desidratação sobre a secreção de Vasopressina

A análise das concentrações de AVP plasmática demonstra um aumento na secreção do hormônio em resposta à desidratação, tanto nos animais sobreviventes à sepse quanto nos animais do grupo OF, sem diferença entre os grupos. As

concentrações hormonais de AVP foram determinadas por radioimunoensaio (Tabela 4) (Figura 6).

Tabela 4: Concentração Plasmática de Vasopressina (pg/mL) após desidratação

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
Hidratação	1,5±0,4	7	2,2±0,4	9
Desidratação	5,8±0,6*	6	5,6±1,0*	7

Desidratação. *<0,05 comparados a Hidratação dentro do mesmo grupo. Resultados descritos como Média ±erro padrão da média

Figura 6. Efeito da desidratação sobre a vasopressina. Concentrações de AVP plasmática em animais sobreviventes à sepse (CLP) ou operação fictícia (OF) e desidratados por dois dias. *p<0,05 (vs Hidratado)

4.6. Efeito da desidratação sobre a secreção de OT em animais sobreviventes à sepse

A dosagem de OT plasmática mostrou aumento na secreção de hormônio após dois dias de desidratação, tanto nos animais submetidos à CLP como OF. Porém, entre os grupos de animais desidratados, os sobreviventes à sepse possuíram uma menor secreção de OT. (tabela 5) (Figura 7).

Tabela 5: Concentração de OT plasmática após desidratação.

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
Hidratação	1,5±0,6	6	1,2±0,1	7
Desidratação	6,6±0,5*	3	4,1±0,4*§	4

Desidratação. *<0,05 comparados a Hidratação dentro dos mesmos grupos. CLP. §<0,05 comparado a Operação Fictícia dentro do mesmo estímulo. Resultados descritos como Média ±erro padrão da média

Figura 7. Efeito da desidratação sobre a secreção de OT Concentrações plasmáticas de ocitocina em animais sobreviventes à sepse (CLP) ou operação fictícia (OF), após estímulo osmótico por desidratação. *p<0,05 (vs Hidratado); §p<0,05 (vs OF).

4.7. Determinação do conteúdo Neurohipofisário de AVP

Após determinar as concentrações de AVP por RIA, foi possível observar que tanto os animais CLP como OF, apresentaram uma redução no conteúdo hormonal de AVP na neurohipófise sem apresentar diferença entre os grupos (Tabela 6) (Figura 8).

Tabela 6: Determinação do conteúdo de AVP na NH após desidratação (ng/μg de proteínas totais).

Estímulo	GRUPOS			
	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
Hidratação	7,8±1,2	3	6,0±0,6	5
Desidratação	4,0±1,0*	3	1,9±0,6*	7

Desidratação. *<0,05 comparados a Hidratação dentro dos mesmos grupos. Resultados descritos como Média ± erro padrão da média

Figura 8. Determinação do conteúdo Neurohipofisário de AVP. Conteúdo neurohipofisário de vasopressina em animais sobreviventes a sepse (CLP) ou operação fictícia (OF), após desidratação. *p<0,05 (vs Hidratado).

4.8. Determinação do conteúdo Neurohipofisário de OT

Realizando-se o RIA para OT em amostras de neurohipófise, foi possível notar a redução no conteúdo neurohipofisário de OT apenas nos animais OF submetidos à desidratação (Tabela 7) (Figura 9). Os animais sobreviventes a sepse mantiveram níveis elevados de hormônio

Tabela 7: Determinação do conteúdo de OT na NH após desidratação (ng/μg de proteínas totais).

Estímulo	GRUPOS			
	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
Hidratação	5,6±0,4	4	5,4±0,6	8
Desidratação	2,5±0,3*	3	4,8±0,9	3

Desidratação. *<0,05 comparados a Hidratação dentro do mesmo grupo. Resultados descritos como Média ± erro padrão da média

Figura 9. Determinação do conteúdo Neurohipofisário de OT. Conteúdo neurohipofisário de OT em animais sobreviventes ao CLP ou OF após estímulo osmótico por retirada de água para beber por dois dias. *p<0,05 (vs Hidratado). Análise feita por Two Way ANOVA, seguido de SNK.

HIPOVOLEMIA

4.9. Efeito da injeção de solução de PEG i.p sobre o hematócrito

A análise do hematócrito mostrou que houve aumento do hematócrito nos animais que receberam injeção intraperitoneal de solução de PEG, caracterizando hipovolemia após 90 minutos de estímulo. Não houve diferença estatística entre animais CLP e OF (Tabela 8) (Figura 10).

Tabela 8: Efeito da Hipovolemia induzida sobre o hematócrito (%)

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
PBS	38,6±0,8	5	39,2±1,0	9
PEG	44,4±1,1*	5	47,8±1,2*	8

Polietilenoglicol (PEG). *<0,05 comparados a PBS dentro dos grupos. Resultados descritos como Média ± erro padrão da média.

Figura 10. Efeito do PEG i.p sobre o hematócrito Hematócrito de animais sobreviventes à sepse induzida pelo modelo de CLP ou de animais do grupo operação fictícia (OF), após estímulo volêmico por injeção intraperitoneal de polietileno glicol por 90 minutos. *p<0,05 (vs PBS).

4.10. Efeito da hipovolemia induzida sobre Sódio Sérico

Não foram detectadas alterações no sódio sérico dos animais sobreviventes à sepse e OF, após estímulo hipovolêmico. (Tabela 9) (Figura 11).

Tabela 9: Efeito da hipovolemia induzida sobre Sódio Sérico (meq/L)

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
PBS	146,4±4,5	7	146,5±2,2	10
PEG	139,9±1,1	7	147,9±1,2	7

Resultados descritos como Média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 11. **Efeito da hipovolemia induzida sobre Sódio Sérico.** Sódio sérico em animais submetidos à OF ou CLP após estímulo volêmico por injeção intraperitoneal de PEG.

4.11. Determinação da osmolalidade plasmática.

Não houve alterações na osmolalidade plasmática, após injeção de PEG ou PBS nos animais sobreviventes à sepse ou OF. (Tabela 10) (Figura 12).

Tabela 10: Determinação da osmolalidade plasmática (mOsm/Kg) após hipovolemia induzida por PEG.

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
PBS	306±1,1	6	307,7±0,9	8
PEG	305,3±0,7	6	306,4±0,8	8

Resultados descritos como Média ± erro padrão da média.

Figura 12. Determinação da osmolalidade plasmática após hipovolemia, Osmolalidade plasmática em amostras de plasma de animais sobreviventes à sepse ou com operação fictícia (OF) após estímulo hipovolêmico induzido por PEG Não houve diferenças estatísticas.

4.12. Efeito da hipovolemia sobre AVP plasmática

Após estímulo volêmico foi possível notar aumento da secreção de AVP em animais submetidos à hipovolemia (Tabela 11) (Figura 13). A análise estatística não detectou diferenças significativas entre animais sobreviventes à sepse e animais OF

Tabela 11: Concentração de AVP plasmática (pg/ml) após Polietileno glicol.

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
PBS	0,7±0,1	7	0,938±0,225	9
PEG	3,1±0,6*	8	4,389±0,701*	9

Polietilenoglicol (PEG). *<0,05 comparados a PBS dentro dos grupos. Resultados descritos como Média ±erro padrão da média

Figura 13. Efeito da hipovolemia sobre AVP plasmática. Concentrações plasmáticas de vasopressina de animais sobreviventes à sepse induzida por CLP ou com operação fictícia (OF) após estímulo hipovolêmico por injeção i.p. de PEG *p<0.05(vs PBS)

4.13. Efeito da Hipovolemia sobre OT plasmática

Tanto os animais CLP como OF submetidos à hipovolemia apresentaram secreção aumentada de OT em relação aos seus controles (PBS) e sem diferença entre os grupos. (Tabela 12) (Figura 14).

Tabela 12: Concentração de OT plasmática (pg/ml) após indução de hipovolemia.

Estímulo	GRUPOS			
	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
PBS	1,9±0,2	8	2,2±0,3	15
PEG	5,1±0,7*	8	5,8±0,9*	12

Polietilenoglicol (PEG). * $<0,05$ comparados a PBS dentro dos grupos. Resultados descritos como Média $\pm$ erro padrão da média

Figura 14. Efeito da Hipovolemia sobre OT plasmática. OT plasmática em animais sobreviventes à sepse pelo modelo de CLP ou OF e submetidos a estímulo volêmico por injeção intraperitoneal de PEG. * $p<0,05$ (vs PBS).

4.14. Determinação do conteúdo neurohipofisário de OT

As concentrações de OT na NH foram analisadas por RIA e então normalizadas pelas concentrações de proteínas totais na NH pelo método de Bradford. A quantificação do conteúdo de OT na neurohipófise não mostrou alterações em nenhum dos grupos (Tabela 13) (Figura 15).

Tabela 13: Determinação de conteúdo neurohipofisário (ng/μg de proteínas plasmáticas) após estímulo hipovolêmico.

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
PBS	5,6±0,5	2	5,2±0,7	3
PEG	4,7±0,3	3	5,0±1,0	5

Resultados descritos como Média ± erro padrão da média.

Figura 15: Determinação do conteúdo neurohipofisário de OT após hipovolemia. Conteúdo de OT na neurohipófise de animais sobreviventes à sepse induzida por CLP ou operação fictícia e submetidos à hipovolemia por injeção de PEG ou controle (PBS).

4.15. Determinação do conteúdo neurohipofisário de AVP

Não foi observada alteração no conteúdo neurohipofisário de AVP em nenhum dos grupos observados. A desidratação não foi capaz de alterar o conteúdo do hormônio no grupo séptico ou com operação fictícia. (Tabela 14) (Figura 16).

Tabela 14: Quantificação de Vasopressina neurohipofisária (ng/μg de proteínas plasmáticas) após estímulo hipovolêmico por Polietilenoglicol.

GRUPOS				
Estímulo	Operação Fictícia	N	Sepse Polimicrobiana (CLP)	N
PBS	1374,7±97,4	4	1045,2±115,2	7
PEG	1613,4±289,4	3	1165,2±176,4	6

Resultados descritos como Média ± erro padrão da média.

Figura 16. Determinação do conteúdo neurohipofisário de AVP após hipovolemia. Conteúdo de vasopressina neurohipofisária em animais sobreviventes à sepse induzida por CLP ou operação fictícia (OF) e submetidos ao estímulo volêmico por injeção intraperitoneal de polietileno glicol (PEG).

DISCUSSÃO

5. Discussão.

No presente trabalho, sepse foi induzida por CLP, um modelo experimental que mimetiza a complexidade da sepse humana (Garrido, Figueiredo et al., 2004; Correa, Pancoto et al., 2007; Dejager, Pinheiro et al., 2011). Este método envolve insultos como trauma tissular através da laparotomia e infecção através do extravazamento de microbiota intestinal no peritônio, causando peritonite e ativando uma resposta inflamatória que levará à sepse. (Wichterman, Baue et al., 1980; Dejager, Pinheiro et al., 2011).

O diâmetro da agulha e o número de furos influenciam no resultado da CLP, permitindo variar a gravidade da doença nos animais submetidos à cirurgia. Para possibilitar a comparação de nossos resultados com trabalhos anteriores, foi escolhido o protocolo de um furo com agulha 14G seguido de administração de antibióticos. (Ritter, Andrades et al., 2003)

Para que não houvesse grandes variações na intensidade da sepse, a CLP foi realizada por um mesmo operador em todos os experimentos. Além disso, a sutura, a administração de antibióticos e o acompanhamento da evolução da doença no animal foram realizados pelos mesmos operadores ou observadores, todos os dias. A mortalidade dos animais sepse-induzidos deste trabalho foi semelhante à mortalidade descrita em outros trabalhos e todos os animais apresentaram sinais clínicos de sepse, incluindo letargia e piloereção. (Ritter, Andrades *et al.*, 2003; Tuon, Comim *et al.*, 2008; Cassol-Jr, Comim *et al.*, 2010; Comim, Cassol *et al.*, 2012)

Trabalhos anteriores, utilizando o mesmo protocolo experimental, demonstraram a estagnação na curva de sobrevivência dos animais durante os dez dias iniciais após a indução da doença (Ritter, Andrades *et al.*, 2003; Cassol-Jr, Comim *et al.*, 2010; Comim, Cassol *et al.*, 2012). Além disso, os níveis de nitrato plasmático (indicadores de produção de NO) encontram-se aumentados 24 horas após a sepse, mostrando uma grande queda após 48 horas do estímulo séptico em ratos. Isto é um indicativo da diminuição da atividade do iNOS após este período (Oliveira-Pelegrin, Basso et al., 2013). Outro dado importante é que a Caspase-3 encontra-se diminuída em animais sobreviventes à sepse, pelo mesmo modelo de CLP, na região do hipocampo. (Comim, Barichello et al., 2013). Estes resultados sugerem que não há mais morte neuronal relacionada à sepse após dez dias de recuperação

e também não há mais a ação inibidora do NO sobre os núcleos secretores de AVP e OT.

Animais sobreviventes à sepse apresentam alterações cognitivas duradouras, comportamento depressivo e memória alterada (Cassol-Jr, Comim *et al.*, 2010; Comim, Cassol *et al.*, 2012). Em pacientes sobreviventes à sepse, perda na qualidade de vida, depressão, alterações na memória também foram observados (Hopkins, Weaver *et al.*, 1999; Heyland, Hopman *et al.*, 2000). Embora em nosso trabalho os resultados coletados sejam referentes a um período de 10 a 12 dias de sobrevivência à doença, é possível que as alterações aqui descritas se mantenham em longo prazo. Trabalhos futuros poderão confirmar esta hipótese.

Após sobreviverem à sepse, dois grupos de animais (CLP e OF) foram submetidos à desidratação, como estímulo osmótico. O aumento da osmolalidade foi verificado em todos estes animais privados de ingerir água por dois dias, sem diferenças entre animais submetidos à doença e animais OF. Interessantemente, a natremia também foi observada nestes animais, sendo mais elevada nos animais sobreviventes à sepse, mesmo nos animais CLP que não foram submetidos à desidratação.

É importante lembrar que desidratação é tanto um estímulo osmótico como um estímulo volêmico, por conta da perda de líquidos, levando ao aumento da osmolalidade, mas também a um quadro de hipovolemia (Dunn, Brennan *et al.*, 1973). As análises de hematócrito permitem uma avaliação indireta da volemia nos animais submetidos à privação de ingestão de água, possibilitando a constatação de que os animais após dois dias de estímulo apresentaram um quadro de hipovolemia.

Alterações de 2% na osmolalidade ou 8% na volemia são estímulos suficientes para induzir a secreção de AVP e OT em ratos (Dunn, Brennan *et al.*, 1973; Cunningham e Sawchenko, 1991; Oliveira, Franci *et al.*, 2004). Todos os animais submetidos à desidratação apresentaram secreção elevada de AVP e OT, embora algumas diferenças foram observadas entre os grupos. Assim, enquanto nenhuma alteração foi verificada para as concentrações plasmáticas de AVP, no caso da OT foi possível observar uma secreção menor nos animais sobreviventes à sepse.

Interessantemente, os resultados do conteúdo neurohipofisário de OT comprovam essa redução de secreção, já que a dosagem tecidual do hormônio nos animais sobreviventes à sepse foi maior que a apresentada pelos animais OF após

desidratação. Desta forma, apenas nos animais OF submetidos à desidratação foi notável uma diferença na redução do conteúdo neurohipofisário. Portanto, a menor redução da OT na NH de animais sobreviventes à sepse e submetidos à desidratação parece ser um reflexo da secreção diminuída deste hormônio.

O aumento do sódio sérico, nos animais sobreviventes à sepse e induzidos a desidratação, poderia ser reflexo de uma ação hiponatrêmica reduzida no organismo, reflexo da secreção diminuída de OT. Porém, aparentemente, os níveis de OT nos animais do grupo CLP e que permaneceram com ingestão de água *ad libitum* não se alteraram, o que não explicaria o aumento do sódio sérico também nos animais sobreviventes à sepse e que se mantiveram hidratados.

Os animais que receberam injeção intraperitoneal de PEG 4000 apresentaram valores aumentados de hematócrito, caracterizando hipovolemia, sem diferença entre os animais sobreviventes à sepse e animais do grupo OF. Nenhuma alteração na natremia ou osmolalidade plasmática foi observada nestes animais, caracterizando o estímulo como indutor de apenas hipovolemia, sem que ocorra também alteração da osmolalidade. Este dado reforça a hipótese de que os animais sobreviventes à sepse e induzidos a uma hipernatremia por desidratação possuem uma alteração no sódio sérico mais acentuada por conta dos valores alterados da secreção de OT.

Ao contrário da desidratação, após o estímulo volêmico puro por PEG não notamos diferenças nas concentrações plasmáticas dos dois hormônios neurohipofisários. Portanto, as diferenças no padrão de resposta observadas em animais desidratados possivelmente são um reflexo de uma osmorregulação alterada em relação à secreção de OT, sem nenhuma alteração em relação à AVP.

Recentemente, demonstramos o aumento da expressão de caspase-3 clivada nos neurônios magnocelulares do SON de animais sépticos (Oliveira-Pelegrin, Basso et al., 2013). Estes resultados sugerem que apoptose ocorreu nestes neurônios e, portanto, a morte neuronal prejudicaria a secreção de OT nos animais sépticos (Oliveira-Pelegrin, Basso et al., 2014). Entretanto, não avaliamos o que aconteceu com os neurônios do núcleo paraventricular, que seria o núcleo responsável pela maior produção de OT. Acreditamos, contudo, que apoptose tenha acontecido em alguns destes neurônios ou mesmo nos osmorreceptores durante a sepse, o que pode ter refletido em uma menor secreção de OT nos animais sobreviventes e estimulados osmoticamente com desidratação.

Hipovolemia e hipotensão causam ativação de estruturas do tronco cerebral, com projeções aos núcleos SON e PVN, responsáveis pela síntese e secreção de AVP e OT (Cunningham e Sawchenko, 1991; McKinley e Johnson, 2004). A diferença de via de sinalização entre alterações de osmolalidade e volume extracelular poderia explicar o porquê de haver resposta normal da OT frente a um estímulo volêmico, mas uma resposta reduzida a um estímulo de desidratação, que é tanto um estímulo osmótico como volêmico. As respostas às alterações da volemia são transmitidas para o hipotálamo via nervo vago, enquanto as respostas frente às alterações da osmorregulação são transmitidas via CVOs, ao SON e PVN, sendo que os CVOs são estruturas mais vulneráveis à citocinas, óxido nítrico e outros mediadores inflamatórios da sepse.

É importante lembrar que os próprios núcleos magnocelulares hipotalâmicos atuam como osmorreceptores e sinalizadores para a secreção hormonal. (Leng, Dyball et al., 1988). Então, a capacidade de resposta fisiológica dos núcleos hipotalâmicos e das regiões CVOs ao estímulo osmótico, encontra-se bastante reduzida ou perdida na fase da recuperação da doença. Isto não significa, porém, a diminuição de síntese de OT em níveis comprometedores, já que a secreção do hormônio encontra-se apenas reduzida, mas não abolida.

Mais da metade dos pacientes em uma fase pós-aguda do choque séptico que foram considerados não responsivos a um estímulo de secreção de vasopressina, tiveram origem abdominal da infecção que desencadeou o processo de sepse (Siami, Bailly-Salin et al., 2010). A sepse induzida pelo modelo de CLP, que leva a peritonite, aparentemente falhou em mostrar uma proporção de animais responsivos e não responsivos aos estímulos. Isto pode ter ocorrido por conta de a população de ratos, utilizada neste trabalho, ser bastante homogênea, sendo que a linhagem dos animais, a idade e peso serem muito parecidos. O mesmo protocolo experimental poderia ser usado em animais de outras linhagens, em diferentes idades ou também em animais fêmeas, em busca de novos dados que auxiliem a investigar a fisiopatologia da doença.

A proporção de responsivos e não responsivos a um estímulo osmótico, com a secreção, ou não, de AVP, também foi possível ser notada em pacientes que sobreviveram à doença (Siami, Polito et al., 2013). Curiosamente, os pacientes não responsivos tenderam a ter uma falha hepática mais acentuada. Talvez por consequência disto, os osmorreceptores do sistema porta hepático poderiam estar

deficientes em funcionamento, afetando a osmorregulação (Siami, Bailly-Salin et al., 2010). Nossos resultados não mostram uma proporção de animais não responsivos para a secreção de AVP, mas mostra que os animais sobreviventes à sepse possuem uma resposta alterada a desidratação, com a secreção reduzida de OT.

Um próximo objetivo em nosso trabalho poderia ser uma avaliação do funcionamento de receptores centrais e periféricos e também da secreção de hormônios neurohipofisários após a indução de estímulo osmótico puro nos animais que sobreviverem à sepse.

Resumindo, nossos resultados mostram que, após desidratação, os animais apresentam aumento de osmolalidade e também hipovolemia, sendo ambos estímulos para secreção de AVP e OT. Hipovolemia também foi verificada em animais que receberam injeção intraperitoneal de PEG 4000. Ambos os hormônios neurohipofisários apresentaram elevação nos níveis plasmáticos após os diferentes estímulos, porém com valores mais baixos de OT frente ao estímulo da desidratação. A dosagem de OT na NH confirma a secreção diminuída do hormônio frente aos estímulos osmótico e hipovolêmico da desidratação.

6. Conclusão

Animais sobreviventes à sepse apresentam alterações no padrão de resposta hormonal do eixo Hipotálamo-Neurohipofisário ao estímulo osmótico sem aparente alteração quando o estímulo é volêmico, sugerindo que seus osmorreceptores encontram-se alterados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, S. *et al.* Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* [S.I.], v. 124, n. 4, p. 783-801, Feb 24 2006.
- ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. *Crit Care Med* [S.I.], v. 29, n. 7 Suppl, p. S109-16, Jul 2001.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. *et al.* Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* [S.I.], v. 84, n. 1, p. 169-208, Jan 2004.
- ATHAYDE, L. A. *et al.* Blocking central leukotrienes synthesis affects vasopressin release during sepsis. *Neuroscience* [S.I.], v. 160, n. 4, p. 829-36, Jun 2 2009.
- BEALER, S. L. *et al.* Mechanisms of altered sodium excretion after preoptic hypothalamic lesions. *Am J Physiol* [S.I.], v. 254, n. 1 Pt 2, p. R84-9, Jan 1988.
- BERCZI, I. Neurohormonal host defense in endotoxin shock. *Ann N Y Acad Sci* [S.I.], v. 840, p. 787-802, May 1 1998.
- BLACKBURN, R. E. *et al.* Control of magnocellular oxytocin neurones by the region anterior and ventral to the third ventricle (AV3V region) in rats. *J Endocrinol* [S.I.], v. 114, n. 2, p. 253-61, Aug 1987.
- BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* [S.I.], v. 115, n. 6, p. 457-69, Sep 15 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* [S.I.], v. 101, n. 6, p. 1644-55, Jun 1992.
- BORGES, B. C.; DA ROCHA, M. J. Participation of the subfornical nucleus in hypothalamic-neurohypophyseal axis activation during the early phase of endotoxic shock. *Neurosci Lett* [S.I.], v. 404, n. 1-2, p. 227-31, Aug 14 2006.
- BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* [S.I.], v. 9, n. 7, p. 519-31, Jul 2008.
- BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H. Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* [S.I.], v. 59, p. 601-19, 1997.
- BOZZA, F. A. *et al.* Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock* [S.I.], v. 39 Suppl 1, p. 10-6, May 2013.
- BRACKETT, D. J. *et al.* Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. *Circ Shock* [S.I.], v. 17, n. 4, p. 273-84, 1985.

BROWN, G. C.; BAL-PRICE, A. Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Mol Neurobiol* [S.l.], v. 27, n. 3, p. 325-55, Jun 2003.

BROOKS, H. F. *et al.* Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis* [S.l.], v. 22, n. 3-4, p. 353-73, Dec 2007.

BRUHN, F. H. *et al.* Blocking systemic nitric oxide production alters neuronal activation in brain structures involved in cardiovascular regulation during polymicrobial sepsis. *Neurosci Lett* [S.l.], v. 453, n. 3, p. 141-6, Apr 10 2009.

BRUICK, R. K. Expression of the gene encoding the proapoptotic Nip3 protein is induced by hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.l.], v. 97, n. 16, p. 9082-7, Aug 1 2000.

CALSAVARA, A. C. *et al.* Late anxiety-like behavior and neuroinflammation in mice subjected to sublethal polymicrobial sepsis. *Neurotox Res* [S.l.], v. 24, n. 2, p. 103-8, Aug 2013.

CASSOL-JR, O. J. *et al.* Treatment with cannabidiol reverses oxidative stress parameters, cognitive impairment and mortality in rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture. *Brain Res* [S.l.], v. 1348, p. 128-38, Aug 12 2010.

COMIM, C. M. *et al.* Caspase-3 mediates in part hippocampal apoptosis in sepsis. *Mol Neurobiol* [S.l.], v. 47, n. 1, p. 394-8, Feb 2013.

COMIM, C. M. *et al.* Erythropoietin reverts cognitive impairment and alters the oxidative parameters and energetic metabolism in sepsis animal model. *J Neural Transm* [S.l.], v. 119, n. 11, p. 1267-74, Nov 2012.

COMIM, C. M. *et al.* Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion* [S.l.], v. 8, n. 4, p. 313-8, Sep 2008.

CONRAD, K. P. *et al.* Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann N Y Acad Sci* [S.l.], v. 689, p. 346-62, Jul 22 1993.

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

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

DE CARVALHO BORGES, B. *et al.* Lesion of the anteroventral third ventricle (AV3V) reduces hypothalamic activation and hypophyseal hormone secretion induced by lipopolysaccharide in rats. *Brain Res* [S.l.], v. 1115, n. 1, p. 83-91, Oct 18 2006.

- DEJAGER, L. *et al.* Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* [S.l.], v. 19, n. 4, p. 198-208, Apr 2011.
- DUNN, F. L. *et al.* The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest* [S.l.], v. 52, n. 12, p. 3212-9, Dec 1973.
- ELANDS, J. *et al.* Neurohypophyseal hormone receptors: relation to behavior. *Prog Brain Res* [S.l.], v. 91, p. 459-64, 1992.
- ELIAS, L. L. *et al.* Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. *J Clin Endocrinol Metab* [S.l.], v. 82, n. 4, p. 1243-7, Apr 1997.
- ELMQUIST, J. K. *et al.* Mechanisms of CNS response to systemic immune challenge: the febrile response. *Trends Neurosci* [S.l.], v. 20, n. 12, p. 565-70, Dec 1997.
- ERBAS, O. *et al.* Amelioration of rotenone-induced dopaminergic cell death in the striatum by oxytocin treatment. *Peptides* [S.l.], v. 38, n. 2, p. 312-7, Dec 2012.
- ERBAS, O. *et al.* Comparison of melatonin and oxytocin in the prevention of critical illness polyneuropathy in rats with experimentally induced sepsis. *J Surg Res* [S.l.], v. 183, n. 1, p. 313-20, Jul 2013.
- GARRIDO, A. G. *et al.* Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. v. 19, p.82-88, 2004.
- GIUSTI-PAIVA, A. *et al.* Vasopressin mediates the pressor effect of hypertonic saline solution in endotoxic shock. *SHOCK* [S.l.], v. 27, n. 4, p. 416-21, Apr 2007.
- GIUSTI-PAIVA, A. *et al.* Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. *Neurosci Lett* [S.l.], v. 346, n. 1-2, p. 21-4, Jul 31 2003.
- GLAUSER, M. P. *et al.* Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin Infect Dis* [S.l.], v. 18 Suppl 2, p. S205-16, Feb 1994.
- GRUBER, K. A. *et al.* Neurohypophyseal hormone release and biosynthesis in rats with lesions of the anteroventral third ventricle (AV3V) region. *Brain Res* [S.l.], v. 378, n. 1, p. 115-9, Jul 16 1986.
- GUIRGIS, F. W. *et al.* Persistent organ dysfunction after severe sepsis: a systematic review. *J Crit Care* [S.l.], v. 29, n. 3, p. 320-6, Jun 2014.
- HEYLAND, D. K. *et al.* Long-term health-related quality of life in survivors of sepsis. Short Form 36: a valid and reliable measure of health-related quality of life. *Crit Care Med* [S.l.], v. 28, n. 11, p. 3599-605, Nov 2000.
- HOLMES, C. L. *et al.* Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest* [S.l.], v. 120, n. 3, p. 989-1002, Sep 2001.

HOPKINS, R. O. *et al.* Neuropsychological sequelae and impaired health status in survivors of severe acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* [S.I.], v. 160, n. 1, p. 50-6, Jul 1999.

HUBBARD, W. J. *et al.* Cecal ligation and puncture. *Shock* [S.I.], v. 24, p. 52-7, Jan 2005.

ISERI, S. O. *et al.* Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. *J Surg Res* [S.I.], v. 126, n. 1, p. 73-81, Jun 1 2005.

JANKOWSKI, M. *et al.* Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 97, n. 11, p. 6207-11, May 2000.

JOCHBERGER, S. *et al.* Serum vasopressin concentrations in critically ill patients. *Crit Care Med* [S.I.], v. 34, n. 2, p. 293-9, Feb 2006.

KADEKARO, M. *et al.* Role of NO on vasopressin and oxytocin release and blood pressure responses during osmotic stimulation in rats. *Am J Physiol* [S.I.], v. 273, n. 3 Pt 2, p. R1024-30, Sep 1997.

KADEKARO, M.; SUMMY-LONG, J. Y. Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostases. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [S.I.], v. 27, n. 5-6, p. 450-9, May-Jun 2000.

KANCZKOWSKI, W. *et al.* Hypothalamo-pituitary and immune-dependent adrenal regulation during systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.I.], v. 110, n. 36, p. 14801-6, Sep 3 2013.

KASTING, N. W. Characteristics of body temperature, vasopressin, and oxytocin responses to endotoxin in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* [S.I.], v. 64, n. 12, p. 1575-8, Dec 1986.

KIMURA, T. Investigation of the oxytocin receptor at the molecular level. *Adv Exp Med Biol* [S.I.], v. 395, p. 259-68, 1995.

KIRKEBOEN, K. A.; STRAND, O. A. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* [S.I.], v. 43, n. 3, p. 275-88, Mar 1999.

KONSMAN, J. P. *et al.* Temporal and spatial relationships between lipopolysaccharide-induced expression of Fos, interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in rat brain. *Neuroscience* [S.I.], v. 89, n. 2, p. 535-48, Mar 1999.

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

LANDRY, D. W.; OLIVER, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. *N Engl J Med* [S.I.], v. 345, n. 8, p. 588-95, Aug 23 2001.

LENG, G. *et al.* Neurophysiology of body fluid homeostasis. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* [S.I.], v. 90, n. 4, p. 781-8, 1988.

LEONE, M.; BOYLE, W. A. Decreased vasopressin responsiveness in vasodilatory septic shock-like conditions. *Crit Care Med* [S.I.], v. 34, n. 4, p. 1126-30, Apr 2006.

LEVY, M. M. *et al.* The Surviving Sepsis Campaign: results of an international guideline-based performance improvement program targeting severe sepsis. *Intensive Care Med* [S.I.], v. 36, n. 2, p. 222-31, Feb 2010.

LEVY, M. M. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med* [S.I.], v. 31, n. 4, p. 1250-6, Apr 2003.

LUDWIG, M. *et al.* Neural input modulates osmotically stimulated release of vasopressin into the supraoptic nucleus. *Am J Physiol* [S.I.], v. 270, n. 5 Pt 1, p. E787-92, May 1996.

MANN, E. A. *et al.* Comparison of mortality associated with sepsis in the burn, trauma, and general intensive care unit patient: a systematic review of the literature. *Shock* [S.I.], v. 37, n. 1, p. 4-16, Jan 2012.

MAXIME, V. *et al.* Metabolism modulators in sepsis: the abnormal pituitary response. *Crit Care Med* [S.I.], v. 35, n. 9 Suppl, p. S596-601, Sep 2007.

MCCANN, S. M. *et al.* Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz J Med Biol Res* [S.I.], v. 33, n. 10, p. 1121-31, Oct 2000.

MCGREGOR, G. P.; LANG, R. E. Oxytocin in the male: an old hormone growing sexy with age. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* [S.I.], v. 109, n. 2, p. 83-6, 2001.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci* [S.I.], v. 19, p. 1-6, Feb 2004.

MCKINLEY, M. J. *et al.* Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J Neuroendocrinol* [S.I.], v. 16, n. 4, p. 340-7, Apr 2004.

MONCADA, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* [S.I.], v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991.

MOORE, L. J. *et al.* Validation of a screening tool for the early identification of sepsis. *J Trauma* [S.I.], v. 66, n. 6, p. 1539-46; discussion 1546-7, Jun 2009.

MOORE, L. J. *et al.* The epidemiology of sepsis in general surgery patients. *J Trauma* [S.I.], v. 70, n. 3, p. 672-80, Mar 2011.

NEMZEK, J. A. *et al.* Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being. *Comp Med* [S.I.], v. 58, n. 2, p. 120-8, Apr 2008.

NEMZEK, J. A. *et al.* Humane endpoints in shock research. *SHOCK* [S.I.], v. 21, n. 1, p. 17-25, Jan 2004.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. *et al.* Role of central NO-cGMP pathway in vasopressin and oxytocin gene expression during sepsis. *Peptides* [S.I.], v. 31, n. 10, p. 1847-52, Oct 2010.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. *et al.* Cellular bioenergetics changes in magnocellular neurons may affect copeptin expression in the late phase of sepsis. *J Neuroimmunol* [S.I.], v. 267, n. 1-2, p. 28-34, Feb 15 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* [S.I.], v. 258, n. 1-2, p. 10-6, May 15 2013.

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

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R. *et al.* Oxytocin affects nitric oxide and cytokine production by sepsis-sensitized macrophages. *J Neuroimmunol* [S.I.], v. 20, n. 2, p. 65-67, Nov 2013.

OLIVEIRA, G. R. *et al.* Alterations in the central vasopressin and oxytocin axis after lesion of a brain osmotic sensory region. *Brain Res Bull* [S.I.], v. 63, n. 6, p. 515-20, Jul 15 2004.

PANCOTO, J. A. *et al.* Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. *Auton Neurosci* [S.I.], v. 138, n. 1-2, p. 57-63, Feb 29 2008.

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

PEIXOTO, M. C. Vasopressina - Papel nos comportamentos, Aprendizagem e Memória., v. 5, p.14, 2003. Acesso em: 2006.

PHELPS, C. P. *et al.* Plasma interleukin-1beta, prolactin, ACTH and corticosterone responses to endotoxin after damage of the anterior hypothalamic area. *Neuroimmunomodulation* [S.I.], v. 9, n. 6, p. 340-51, 2001.

RAMACHANDRAN, G. Gram-positive and gram-negative bacterial toxins in sepsis: a brief review. *Virulence* [S.I.], v. 5, n. 1, p. 213-8, Jan 1 2014.

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

RITTER, C. *et al.* Oxidative parameters and mortality in sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Intensive Care Med* [S.I.], v. 29, n. 10, p. 1782-9, Oct 2003.

RIVIER, C. *et al.* In the mouse, the activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by a lipopolysaccharide (endotoxin) is mediated through interleukin-1. *Endocrinology* [S.l.], v. 125, n. 6, p. 2800-5, Dec 1989.

RUSSELL, J. A. *et al.* The role of the AV3V region in the control of magnocellular oxytocin neurons. *Brain Res Bull* [S.l.], v. 20, n. 6, p. 803-10, Jun 1988.

RUSSELL, J. A. *et al.* Ablation of the region anterior and ventral to the third ventricle (AV3V region) does not impede parturition in rats. *J Endocrinol* [S.l.], v. 121, n. 1, p. 109-15, Apr 1989.

SALOMAO, R. *et al.* Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Crit Care Med* [S.l.], v. 37, n. 1, p. 132-9, Jan 2009.

SAWCHENKO, P. E.; SWANSON, L. W. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* [S.l.], v. 218, n. 2, p. 121-44, Aug 1 1983.

SCHALLER, M. D. *et al.* Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia. *Am J Physiol* [S.l.], v. 249, n. 6 Pt 2, p. H1086-92, Dec 1985.

SHARMAN, A. Vasopressin and its role in critical care. *Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain*. v. 8. n. 42008. p. 4.

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

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

SHARSHAR, T. *et al.* Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. *Crit Care Med* [S.l.], v. 30, n. 3, p. 497-500, Mar 2002.

SHARSHAR, T. *et al.* Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet* [S.l.], v. 362, n. 9398, p. 1799-805, Nov 29 2003.

SHARSHAR, T. *et al.* Brain perfusion in sepsis or to resolve the macro part of the micro. *Crit Care Med* [S.l.], v. 42, n. 2, p. 485-6, Feb 2014.

SIAMI, S. *et al.* The encephalopathy in sepsis. *Crit Care Clin* [S.l.], v. 24, n. 1, p. 67-82, viii, Jan 2008.

SIAMI, S. *et al.* Osmoregulation of vasopressin secretion is altered in the postacute phase of septic shock. *Crit Care Med* [S.l.], v. 38, n. 10, p. 1962-9, Oct 2010.

SIAMI, S. *et al.* Thirst perception and osmoregulation of vasopressin secretion are altered during recovery from septic shock. *PLoS One* [S.l.], v. 8, n. 11, p. e80190, 2013.

SONNEVILLE, R. *et al.* Vasopressin synthesis by the magnocellular neurons is different in the supraoptic nucleus and in the paraventricular nucleus in human and experimental septic shock. *Brain Pathol* [S.l.], v. 20, n. 3, p. 613-22, May 2010.

TAN, DX. *et al.* One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species. *J Pineal Res* [S.l.], v.42, n.1, p.28-42, Jan 2007.

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* [S.l.], v. 111, n. 2, p. 203-8, May 15 2003.

TUON, L. *et al.* Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med* [S.l.], v. 34, n. 9, p. 1724-31, Sep 2008.

VERBALIS, J. G. *et al.* Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology* [S.l.], v. 128, n. 3, p. 1317-22, Mar 1991.

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

WICHTERMAN, K. A. *et al.* Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* [S.l.], v. 29, n. 2, p. 189-201, Aug 1980.

WILKIN, L. D. *et al.* Changes in magnocellular-neurohypophyseal vasopressin following anteroventral third-ventricle (AV3V) lesions. *J Cardiovasc Pharmacol* [S.l.], v. 8 Suppl 7, p. S70-5, 1986.

WILSON, M. F. *et al.* Elevated plasma vasopressin concentrations during endotoxin and *E. coli* shock. *Adv Shock Res* [S.l.], v. 6, p. 15-26, 1981.

WONG, M. L. *et al.* IL-1 beta, IL-1 receptor type I and iNOS gene expression in rat brain vasculature and perivascular areas. *Neuroreport* [S.l.], v. 7, n. 15-17, p. 2445-8, Nov 4 1996.

WONG, M. L. *et al.* Interleukin (IL) 1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-10, and IL-13 gene expression in the central nervous system and anterior pituitary during systemic inflammation: pathophysiological implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* [S.l.], v. 94, n. 1, p. 227-32, Jan 7 1997.

WONG, M. L. *et al.* Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. *Nat Med* [S.l.], v. 2, n. 5, p. 581-4, May 1996.

ANEXO

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 11.1.1640.53.7), intitulado "Secreção de Vasopressina e Ocitocina após Estímulo Osmótico e Hipovolêmico em Animais Sobreviventes a Sepsis", de autoria de **Lucas Favaretto Tazinafo** e de **Maria José Alves da Rocha**, 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 07.02.2013.

Colaboradores:

This is to certify that the work (Protocol number 11.1.1640.53.7), entitled: "Secreção de Vasopressina e Ocitocina após Estímulo Osmótico e Hipovolêmico em Animais Sobreviventes a Sepsis", by **Lucas Favaretto Tazinafo** and **Maria José Alves da Rocha**, 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, February, 07 2013.

Ribeirão Preto, 20 de fevereiro de 2013.

Presidente da CEUA
Profa. Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro