UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito do MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, na produção de óxido nítrico e na liberação de vasopressina durante sepse experimental

Thalita Freitas Martins

Ribeirão Preto

2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Efeito do MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, na produção de óxido nítrico e na liberação de vasopressina durante sepse experimental

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

Orientada: Thalita Freitas Martins

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

Ribeirão Preto

2009

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.

Martins, Thalita Freitas

Efeito do MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, na produção de óxido nítrico e na liberação de vasopressina durante sepse experimental. Ribeirão Preto, 2009.

74p.:il.; 30cm.

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Biociências Aplicadas à Farmácia

Orientadora: Rocha, Maria José Alves da.

1. Sepse. 2. vasopressina. 3. leucotrienos. 4. CLP. 5. óxido nítrico.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autora: Thalita Freitas Martins

Título: Efeito do MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, na produção de óxido nítrico e na liberação de vasopressina durante sepse experimental.

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:_____

Dedico esse trabalho à minha querida e amada FAMÍLIA...

...meus pais Mariosan e Dulcinéia, que com amor, dedicação e princípios morais balizaram minha vida e me ensinaram que, com seriedade e responsabilidade podemos trilhar qualquer caminho,

...meu irmão Gabriel, por todo carinho, união e amizade,

...minha tia Evonete, pelo apoio e incentivo aos estudos,

...meus avós, tios e primos, por estarem presentes nos momentos de minha vida, me apoiando e dando força para vencer cada dificuldade.

AGRADECIMENTOS

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha pelo incentivo, paciência frente as minhas limitações e, principalmente, por contribuir para o meu crescimento acadêmico e científico. A você, meus sinceros e profundos agradecimentos.

À querida amiga Nadir Fernandes pelo apoio, carinho e orientação técnica durante os experimentos com animais.

Ao Mauro Ferreira pela disponibilidade em solucionar problemas técnicos.

À Lucimeire Resende pela atenção e dedicação em resolver questões burocráticas.

À Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, FCFRP-USP, por ceder gentilmente o composto MK-886 e pelas imprescindíveis discussões científicas.

Ao Prof. Dr. Klaus Hartfelder, FMRP-USP, pela disponibilidade frente as minhas dúvidas sobre o Western Blotting, e pela atenção de sempre.

À Profa. Dra. Andréia Machado Leopoldino, FCFRP-USP, e à Profa. Dra. Angelita Maria Stabile, EERP-USP, pelas sugestões apresentadas durante o exame de qualificação.

Ao Dr. Carlos Sorgi, da FCFRP-USP, pela ajuda em alguns experimentos e pelas discussões científicas que contribuíram diretamente para o bom andamento desse trabalho.

Aos professores que abriram as portas de seus laboratórios e permitiram o uso de equipamentos imprescindíveis para a realização de alguns experimentos:
Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, FMRP–USP
Prof. Dr. Luiz Guilherme Branco, FORP–USP
Profa. Dra. Lucila L. K. Elias, FMRP–USP
Prof. Dr. Sérgio Akira, FCFRP-USP

Aos técnicos desses laboratórios pelo auxílio no uso dos equipamentos e nas metodologias usadas:
Milene Mantovani Lopes, FMRP–USP
Sônia Aparecida Zanon, FMRP–USP
Antonio Zanardo, FCFRP-USP
Maria Valci Silva, FMRP–USP
Marina Holanda, FMRP–USP

Aos funcionários da seção de pós-graduação da FCFRP-USP, Rosana, Ana Lúcia, Eleni e Henrique pela atenção e disponibilidade.

Aos funcionários dos Biotérios pelo belo e importante trabalho que executam para manter a saúde dos animais para experimento.

Aos amigos do Laboratório, Adriana, Alfredo, Aline, Ângelo, Bruno, Camila, Carla, Elaine, Erick, Fábio, Gabriela, Josilene, Juliana, Letícia, Paulo e Walter agradeço a amizade, a convivência, o carinho e os momentos de alegria. Foi muito bom conhecer vocês.

Aos estagiários, Priscila e Wesley, obrigada pelos indispensáveis auxílios e, principalmente pela amizade e bons momentos que vivenciamos no laboratório.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

À amiga Flávia Amoroso, pela companhia, dedicação e carinho.

Enfim, agradeço todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desse trabalho e para minha formação científica.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original"
(Albert Einstein)

RESUMO

MARTINS, T.F. **Efeito do MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, na produção de óxido nítrico e na liberação de vasopressina durante sepse experimental.** 2009. 74f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

Evidências sugerem que os leucotrienos (LTs) e óxido nítrico (NO) podem apresentar um papel na liberação de vasopressina (AVP) que ocorre durante a fase inicial da sepse. Além disso, é conhecido que os LTs afetam a produção de NO. Nosso objetivo foi analisar o efeito do MK-886, um inibidor da síntese de LTs, na produção de NO e na liberação de AVP durante sepse experimental. Ratos Wistar receberam injeções i.p. de MK-886 (1.0, 2.0 ou 4.0mg/kg) ou veículo (DMSO 5%) 1h antes da ligadura e perfuração cecal (CLP) ou operação fictícia. Em um grupo a taxa de sobrevida foi monitorada durante 3 dias. Em outro grupo, os animais foram decapitados em 0, 4 e 24h após CLP ou operação fictícia, e o sangue foi coletado para a determinação da osmolalidade, sódio sérico, hematócrito, proteínas plasmáticas, nitrato sérico e cis-LTs e AVP plasmáticos. Além disso, foi avaliado o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos ratos. O CLP aumentou os níveis de nitrato sérico, perda de proteínas, hematócrito e AVP plasmática 4h após a cirurgia, além disso, causou uma mortalidade de 80% após 3 dias de observação. Os níveis de sódio sérico e a osmolalidade apresentaram reduções pequenas, enquanto os níveis de cis-LTs e o recrutamento de neutrófilos permaneceram inalterados. O pré-tratamento com qualquer concentração de MK-886 não diminuiu a produção de nitrato sérico, a perda de proteínas plasmáticas e o hematócrito. Além disso, não alterou os níveis de sódio sérico, osmolalidade, cis-LTs plasmáticos, o recrutamento de neutrófilos e a taxa de sobrevida. Porém, a liberação de AVP foi afetada de uma maneira dose-dependente na fase inicial da sepse. Na fase tardia, a AVP plasmática se manteve em concentrações basais e a administração de MK-886 não alterou essas concentrações. Os resultados sugerem que o MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, pode afetar a liberação de vasopressina na fase inicial da sepse e esse efeito parece ser independente da produção de óxido nítrico.

Palavras-chaves: Sepse, vasopressina, leucotrienos, CLP, óxido nítrico.

ABSTRACT

MARTINS, T.F. **Effect of MK-886, a LTs synthesis inhibitor, in oxide nitric production and vasopressin release during experimental sepsis.** 2009. 74f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

Evidence suggests that leukotrienes (LTs) and nitric oxide (NO) may have a role in vasopressin (AVP) release that occurs during the early phase of sepsis. Moreover, LTs are thought to affect NO production. Our objective was to analyze the effect of MK-886, a LTs synthesis inhibitor, on NO production and AVP release. Male Wistar rats received i.p. injections of MK-886 (1.0, 2.0 or 4.0mg/kg) or vehicle (DMSO 5%) 1h before cecal ligation and puncture (CLP) or sham operation. In one group the survival rate was monitored for 3 days. In another group, the animals were decapitated at 0, 4 and 24h after CLP or sham operation, and blood was collected for osmolality, serum sodium, hematocrit, plasma protein, serum nitrate and plasma cys-LTs and AVP levels measurement. Moreover, was evaluated neutrophil recruitment into the peritoneal cavities of rat. CLP increased serum nitrate levels, protein leakage, hematocrit, plasma AVP 4h after CLP, besides causing 80% mortality after 3 days of observation. The serum sodium levels and osmolality presented small reduction, while cys-LT levels and neutrophil recruitment remained unchanged. Pretreatment with any dose of MK-886 did not diminish nitrate production, protein leakage and hematocrit. Besides, not did it alter serum sodium levels, osmolality, plasma cys-LT levels and neutrophil recruitment. It also did not affect survival rate. AVP release was, however, affected in a dose-dependent manner in the early phase of sepsis. In the final phase of sepsis, plasma AVP levels remained basal and the administration of MK-886 did not alter these hormone levels. The results suggest that the MK-886, a LTs synthesis inhibitor, may affect the release of vasopressin in the early phase of sepsis and that this effect seems to be independent of nitric oxide production.

Keywords: Sepsis, vasopressin, leukotrienes, CLP, oxide nitric.

RESUMEN

MARTINS, T.F. **Efecto del MK-886, un inhibidor de la síntesis de LTs, en la producción de óxido nítrico y en la liberación de vasopresina durante sepse experimental.** 2009. 74f. Disertación (Masters). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

Evidencias sugieren que los leucotrienos (LTs) y el óxido nítrico (NO) pueden presentar un papel en la liberación de vasopressina (AVP) que ocurre durante la fase inicial de sepse. Además, se sabe que los LTs pueden afectar la producción de NO. Nuestro objetivo fue analizar el efecto do MK-886, un inhibidor de la síntesis de LTs, en la producción de NO y en la liberación de AVP. Ratones Wistar recibieron inyecciones i.p. de MK-886 (1.0, 2.0 o 4.0mg/kg) o vehículo (DMSO 5%) 1h antes de la ligadura y perforación cecal (CLP) o operación ficticia. En un grupo la tasa de sobrevida fue supervisado durante 3 días. En otro grupo, los animales fueron decapitados en 0, 4 e 24h después CLP o operación ficticia, y la sangre fue colectada para la determinación de la osmolalidad, sodio sérico, hematocrito, proteínas plasmáticas, nitrato sérico y cis-LTs y AVP plasmáticos. Además, fue avaluado el reclutamiento de neutrófilos para la cavidad peritoneal de los ratones. Lo CLP aumento los niveles de nitrato sérico, perdida de proteínas, hematócrito y AVP plasmática 4h después de la cirugía, además, causo una mortalidad de 80% después de 3 días de observación. Los niveles de sodio sérico y osmolalidad presentaron reducciones pequeñas, mientras que los niveles de cis-LTs y el reclutamiento de neutrófilos permanecieron inalterados. El pré-tratamiento con cualquier concentración de MK-886 no disminuyó la producción de nitrato, la perdida de proteínas y hematocrito. Además, no afectó los niveles de sodio sérico, osmolalidad, cis-LTs plasmáticos y el reclutamiento de neutrófilos ni alteró la tasa de sobrevida. Por tanto, la liberación de AVP fue afectada de una manera dosis-dependiente en la fase inicial de la sepse. En la fase tardía de la sepse, la AVP plasmática se mantuvo en concentraciones basáis y la administración de MK-886 no altero esas concentraciones. Los resultados sugieren que el MK-886, un inhibidor de la síntesis de LTs, puede afectar la liberación de vasopresina en la fase inicial de la sepse y ese efecto parece ser independiente de la producción de óxido nítrico.

Las palabras claves: Sepse, vasopresina, leucotrienos, CLP, óxido nítrico.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Bactérias gram-negativas e positivas promovem a liberação de óxido nítrico e de outros mediadores inflamatórios através de leucócitos ativados..... 08

Figura 2. Organização intracelular das principais enzimas envolvidas na síntese de leucotrienos..... 14

Figura 3. Interação entre cis-leucotrienos (cis-LTs) e outros mediadores inflamatórios..... 20

Figura 4. Esquema da cavidade peritoneal do rato..... 27

Figura 5. Sítio de ação do composto MK-886..... 34

Figura 6. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a sobrevida dos animais após CLP..... 36

Figura 7. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais..... 37

Figura 8. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a osmolalidade plasmática..... 39

Figura 9. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o sódio sérico..... 39

Figura 10. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o hematócrito..... 40

Figura 11. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração de proteínas plasmáticas..... 40

Figura 12. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o nitrato sérico..... 41

Figura 13. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre os níveis de cis-leucotrienos plasmáticos..... 42

Figura 14. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina..... 43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Localização subcelular das enzimas envolvidas na síntese e metabolismo de leucotrienos..... 16

Tabela 2. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais..... 71

Tabela 3. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a osmolalidade plasmática..... 71

Tabela 4. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o sódio sérico..... 72

Tabela 5. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o hematócrito..... 72

Tabela 6. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração de proteínas plasmáticas..... 73

Tabela 7. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o nitrato sérico..... 73

Tabela 8. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre os níveis de cis-leucotrienos plasmáticos..... 74

Tabela 9. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina..... 74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE - 5-hidroperoxieicosatetraenóico

5-LO - 5-lipoxigenase

5-LO$^{-/-}$ - Depleção do gene da enzima 5-LO

15-HPETE- 15-hidroperoxieicosatetraenóico

AA - Ácido araquidônico

ACCP/SCCM - *American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine*

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

ADH - Hormônio anti-diurético

AG - Aminoguanidina

ANOVA - Análise de variância simples

AVP - Arginina vasopressina

BLT_1 - Receptor 1 do LTB_4

BLT_2 - Receptor 2 do LTB_4

bpm - Batimentos por minuto

CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais

Cis-leucotrienos - Cisteinil leucotrienos

$CisLT_1$ - Receptor 1 dos cis-leucotrienos

$CisLT_2$ - Receptor 2 dos cis-leucotrienos

CLP - *Cecal ligation and puncture* ou ligadura e perfuração cecal

$cPLA_2$ - Fosfolipase A_2 citosólica

DMSO - Dimetilsulfóxido

EPM - Erro padrão da média

e.v. - Endovenosa

FLAP - Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase

G - Gauge

GPR17 - Receptor órfão acoplado à proteína G

i.c.v. - Intracerebroventricular

h - Hora (s)

HCL - Ácido clorídrico

IFN-γ - Interferon-gama

IL - Interleucina

ILAS - Instituto Latino-Americano de Sepse

I - Iodo

i.p. - Intraperitoneal

LBP - Proteína ligadora de LPS

LH - Hormônio luteinizante

LOX - Lipoxigenase

L-NAME - N^G-nitro-L-arginina metil éter

LPS - Lipopolissacarídeo

LTA - Ácido lipoteicóico

LTA_4 - Leucotrieno A_4

LTA_4-H - LTA_4 hidrolase

LTB_4 - Leucotrieno B_4

LTC_4 - Leucotrieno C_4

LTC_4-S - LTC_4 sintase

LTD_4 - Leucotrieno D_4

LTE_4 - Leucotrieno E_4

LTs - Leucotrienos

M - Média

min - minuto

mmHg - Milímetros de mercúrio

MK-571 - Antagonista do receptor 1 dos cis-leucotrienos

MK-886 - Inibidor da síntese de leucotrienos

mM - Milimolar

Montelukast - Antagonista do receptor Cis-LT_1

MODS - Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas

n - Número de animais

NF-kB - Factor nuclear Kappa B

NO - Óxido nítrico

NOS - Óxido nítrico sintase

NOSe - NOS endotelial

NOSi - NOS induzida

NOSmt - NOS mitocondrial

NOSn - NOS neuronal

°C - Graus Celsius

OF - Operação fictícia

OT - Ocitocina

PAM - Pressão Arterial Média

PAF - Fator ativador de plaquetas

PBS - Fosfato monobásico

PGs - Prostaglandinas

PVN - Núcleo paraventricular

qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RC - Área retroquiasmática

RNAm - RNA mensageiro

SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

SC - Núcleo supraquiasmático

SNC - Sistema Nervoso Central

SON - Núcleo supraóptico

TBE - Tribromoetanol

TLR - Receptor toll-like

TLR-2 - Receptor toll-like 2

TLR-4 - Receptor toll-like 4

TNF-α - Fator de necrose tumoral-alfa

UTIs - Unidades de Terapia Intensiva

V1a - Receptor V1

V1b - Receptor V3

SUMÁRIO

Resumo... i
Abstract... ii
Resumen ... iii
Lista de figuras ... iv
Lista de tabelas ... v
Lista de abreviaturas e siglas ... vi

1. INTRODUÇÃO ... 1
1.1 Sepse e Choque séptico ... 2
1.2 Modelos de sepse experimental ... 5
1.3 Fisiopatologia da Sepse ... 6
1.4 Arginina Vasopressina ... 8
1.5 Arginina vasopressina e sepse ... 10
1.6 Óxido nítrico ... 11
1.7 Leucotrienos ... 12
1.8 Leucotrienos e sepse ... 16
1.9 Leucotrienos e sistema nervoso central ... 18
1.10 Leucotrienos e óxido nítrico ... 19

2. OBJETIVOS ... 22
2.1 Objetivo geral ... 23
2.2 Objetivos específicos ... 23

3. MATERIAIS E MÉTODOS ... 24
3.1 Animais ... 25
3.2 Desenho experimental ... 25
3.3 Anestesia ... 26
3.4 Sepse experimental por "Cecal Ligation and Puncture" (CLP) ... 26
3.5 Determinação da curva de sobrevida ... 27
3.6 Recrutamento de neutrófilos para cavidade peritoneal ... 28

3.7 Determinação do hematócrito 28
3.8 Separação do plasma e do soro 29
3.9 Determinação da osmolalidade plasmática 29
3.10 Determinação de sódio sérico 30
3.11 Determinação de proteínas plasmáticas 30
3.12 Determinação de nitrato sérico 31
3.13 Determinação de cis-leucotrienos plasmáticos 31
3.14 Radioimunoensaio para vasopressina 32
3.15 Droga utilizada 33
3.16 Análise estatística 34

4. RESULTADOS 35
4.1 Efeito do MK-886 na sobrevida e no recrutamento de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos após CLP 36
4.2 Efeito do MK-886 sobre a osmolalidade, sódio sérico, hematócrito e proteínas plasmáticas 38
4.3 Efeito do MK-886 sobre o nitrato sérico e cis-leucotrienos plasmáticos 41
4.4 Efeito da administração de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina 43

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO 44

REFERÊNCIAS 54

ANEXOS 70

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sepse e Choque séptico

Nos últimos 100 anos, o nosso conhecimento aumentou em relação à "sepse", palavra de origem grega (*Σήψις, septikos)* que significa putrefação. Em 1680, foram realizadas as primeiras descrições sobre bactérias, mas já em 200 anos antes a relação entre esses microorganismos e infecção tinha sido percebida por alguns cientistas. Finalmente, em 1914, Schottmueller sugeriu que a liberação de germes patogênicos na circulação sangüínea era responsável por sinais e sintomas sistêmicos, caracterizados atualmente como sepse (VINCENT; ABRAHAM, 2006; VINCENT; KORKUT, 2008).

Em 1991, a *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) realizaram uma conferência com o objetivo de oferecer uma definição prática para sepse, a fim de melhorar a capacidade de reconhecimento da doença e assim poder intervir com a terapêutica precocemente (BONE et al., 1992).

Em 2001, foi realizada uma nova conferência com a finalidade de revisar as definições de sepse propostas por Bone e colaboradores (BONE et al., 1992). Essa segunda conferência acrescentou uma série de sinais e alterações laboratoriais comumente encontrados nos pacientes, no sentido de se obter uma definição mais específica. Além disso, foi proposto o sistema "PIRO" (***P****redisposition,* ***I****nsult infection,* ***R****esponse,* ***O****rgan dysfunction*), o qual classifica os pacientes com base nas suas condições de predisposição (comorbidades e fatores genéticos), natureza e extensão da infecção, magnitude da resposta inflamatória, e o grau de disfunção de órgãos. Esse sistema tem sido sugerido como um meio para melhor caracterizar os pacientes que apresentam sepse (LEVY et al., 2003).

De acordo com essas conferências, o termo Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) é usado para descrever uma reação inflamatória desencadeada pelo organismo frente a um processo infeccioso (bactérias, fungos ou vírus) ou não-infeccioso (pancreatite, isquemia, trauma ou grandes queimaduras). SIRS é caracterizada quando o paciente apresenta duas ou mais das seguintes condições: 1) Temperatura maior que 38 °C ou menor que 36 °C; 2) Freqüência cardíaca superior a 90 batimentos/minuto; 3) Freqüência respiratória superior a 20 movimentos/minutos; 4) Número de leucócitos no sangue periférico maior que 12.000/mm^3 ou menor que 4.000/mm^3 ou, ainda, presença de mais de 10% de formas jovens (bastonetes) (BONE et al., 1992; LEVY et al., 2003).

Sepse é definida quando o paciente apresenta uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) secundária a um processo infeccioso (BONE et al., 1992; LEVY et al., 2003).

Sepse grave é caracterizada quando a sepse é acompanhada de qualquer disfunção orgânica. Seja ela: 1) cardiovascular (hipotensão arterial); 2) respiratória (lesão pulmonar aguda levando à hipoxemia); 3) renal (oligúria e/ou creatinina elevada); 4) hepática (hiperbilirrubinemia direta); 5) hematológica (plaquetopenia); 6) e no sistema nervoso central (encefalopatia, alteração do estado mental) (BONE et al., 1992; LEVY et al., 2003; SILVA, 2006).

Choque séptico consiste, segundo as conferências, em sepse grave seguida de hipotensão arterial persistente não responsiva à reposição volêmica, necessitando de drogas vasopressoras para restabelecer a pressão arterial (BONE et al., 1992; LEVY et al., 2003; SILVA, 2006).

A hipotensão e a hipoperfusão podem levar a uma situação de função orgânica alterada, que resulta em quadro de disfunção e até em falência total dos

órgãos, denominado síndrome de disfunção múltipla de órgãos (MODS) (BONE et al., 1992; BONE; GRODZIN; BALK, 1997; LEVY et al., 2003).

Nos últimos anos, estudos epidemiológicos realizados em diferentes países tem apontado a sepse como uma das principais causa de morte em unidades de terapia intensiva (ANGUS et al., 2001; DOMBROVSKIY et al., 2007; SOGAYAR et al., 2008; HERON et al., 2009). Mais de 200 mil pacientes sépticos morrem por ano nos Estados Unidos e os custos com esses pacientes giram em torno de 17 bilhões de dólares (ANGUS et al., 2001).

No Brasil, a situação não é diferente, um estudo conduzido pelo Instituto Latino Americano de Sepse (ILAS) em 21 UTIs, revelou que a mortalidade por sepse é grande, próximo a 44%, e os custos totais giram em torno de $ 10.000 por paciente (SOGAYAR et al., 2008).

Apesar dos avanços no tratamento e diagnóstico de sepse, acredita-se que a taxa de mortalidade vem crescendo possivelmente devido ao envelhecimento da população, aumento no emprego de técnicas invasivas e prováveis alterações nos agentes microbianos, tornando-os multiresistentes (BONE, 1991; ANGUS; WAX, 2001; HANNA, 2003).

Devido ao fato do número de óbito por sepse estar aumentando continuamente (SILVA et al., 2004; DOMBROVSKIY et al., 2007), em outubro de 2002, deu-se início a uma campanha denominada sobrevivendo à sepse (*Surviving Sepsis Campaing*). O principal objetivo da mesma era reduzir a mortalidade de sepse em 25% num período de cinco anos, além de discutir alguns aspectos clínicos que devem ser levados em consideração ao se tratar os pacientes sépticos hospitalizados (DELLINGER et al., 2008). No Brasil, 43 hospitais já aderiam ao uso das condutas e pacotes preconizados pela campanha (TELES et al., 2008).

1.2. Modelos de sepse experimental

Há muita controvérsia acerca da adaptação de dados experimentais para ensaios clínicos. Modelos animais fornecem subsídios importantes sobre o processo séptico, entretanto, não representam fidedignamente o episódio típico de sepse clínica em humanos (POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008).

Apesar desta limitação, modelos experimentais são essenciais no desenvolvimento de novas terapias para sepse e choque séptico. Eles fornecem informações sobre a farmacocinética, toxicidade, e mecanismos de ação de drogas que não podem ser duplicadas através de outros métodos (POLI-DE-FIGUEIREDO et al., 2008).

Sinais e achados laboratoriais presentes na sepse humana podem ser observados em uma variedade de modelos animais, incluindo infusão intravascular de endotoxinas (LPS), peritonites bacterianas, ligadura e perfuração cecal (CLP), infecção tecidual leve, modelos de pneumonia e meningite, ou ainda a associação de dois modelos (GARRIDO, 2004; MUENZER et al., 2006). Dentre esses, os modelos mais usados são o de injeção intraperitoneal ou endovenosa de LPS e o modelo de CLP, caracterizado por ligadura parcial do ceco para diminuição do lúmen, seguido de perfurações nas bordas mesentéricas e consecutiva liberação da microbiota intestinal (GIUSTI-PAIVA; BRANCO et al., 2003; RIOS-SANTOS et al., 2003; BENJAMIM et al., 2005; CARNIO et al., 2005; GIUSTI-PAIVA; ELIAS; ANTUNES-RODRIGUES, 2005; HUBBARD et al., 2005; ATHAYDE et al., 2009).

O modelo de endotoxemia (infusão de LPS) pode reproduzir muitas características de sepse humana, contudo, não imita pontualmente a complexidade

clínica dos pacientes, por não apresentar um foco infeccioso (FREISE; BRUCKNER; SPIEGEL, 2001).

O modelo experimental com um foco infeccioso, no caso de CLP, é o mais clinicamente pertinente, pois reproduz as características imunológicas de sepse clínica. Além disso, apresenta diversidade de microrganismos (gram-positivos e negativos) e uma constante liberação de agentes infecciosos (REMICK et al., 2000; ECHTENACHER et al., 2001; FREISE; BRUCKNER; SPIEGEL, 2001; RIOS-SANTOS et al., 2003).

1.3. Fisiopatologia da Sepse

Os mecanismos de resposta do hospedeiro na sepse são de natureza bastante complexa. As respostas imunológicas, imperativas no controle da infecção, podem também mediar as alterações funcionais, que fornecem a base fisiopatológica nesta doença (WALLEY et al., 1996; EBONG et al., 1999; MARTINEAU; SHEK, 2000; RIOS-SANTOS et al., 2003).

O processo infeccioso começa com a proliferação de microrganismos gram positivos e negativos no sítio infeccioso, podendo atingir diretamente o sistema circulatório ou proliferar localmente (PARRILLO, 1993). Neste momento tem-se a produção de várias substâncias, as quais estimulam a liberação de mediadores inflamatórios pelos macrófagos, neutrófilos e outras células. Estas substâncias que desencadeiam a resposta inflamatória incluem componentes estruturais de microrganismos que constituem os chamados padrões moleculares associados à patógenos (Pamps) (PARRILLO, 1993; MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; HANNA, 2003; SRISKANDAN; ALTMANN, 2008).

Entre os exemplos de Pamps estão o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas e o ácido lipoteicóico das gram-positivas (ADEREM; ULEVITCH, 2000). Esses constituintes bacterianos são reconhecidos por receptores presentes em células do sistema imunológico, como o CD14 e os receptores toll-like (TLRs) (READ; WYLLIE, 2001; COHEN, 2002; AKIRA, 2003; HANNA, 2003).

Para que os efeitos do LPS sejam desencadeados, ele primeiramente interage com proteína ligadora de LPS (LPB), a qual opsoniza o LPS facilitando o seu reconhecimento pelo receptor CD14, presente na superfície de macrófagos e neutrófilos. Posteriormente, o complexo LPS-LPB-CD14 se liga ao receptor toll-like 4 (TLR-4) (POLTORAK et al., 1998; ADEREM; ULEVITCH, 2000; COHEN, 2002; HANNA, 2003).

Similarmente, o ácido lipoteicóico das bactérias gram-positivas geram uma série de respostas e por fim são reconhecidos pelos receptores toll-like 2 (TLR-2) (ADEREM; ULEVITCH, 2000; SRISKANDAN; ALTMANN, 2008).

A ativação do TLR-2 ou TLR-4 resulta em uma cascata de sinalização, com consecutiva ativação do fator de transcrição NF-kB, o qual culmina na liberação excessiva de mediadores e concomitantemente em uma intensa ativação de células inflamatórias (Figura 1). Alguns dos mediadores inflamatórios liberados durante a sepse são: fator de necrose tumoral α (TNF-α), interleucinas (ILs) 1, 6, 10, 12, fator ativador de plaquetas (PAF), óxido nítrico (NO) e leucotrienos (LTs) (COHEN, 2002; GIUSTI-PAIVA; BRANCO et al., 2003; HANNA, 2003; RIOS-SANTOS et al., 2003; SRISKANDAN; ALTMANN, 2008).

Esses mediadores, quando liberados em excesso, produzem os sinais e sintomas clínicos de sepse (HANNA, 2003; RIOS-SANTOS et al., 2003; BENJAMIM et al., 2005; SRISKANDAN; ALTMANN, 2008).

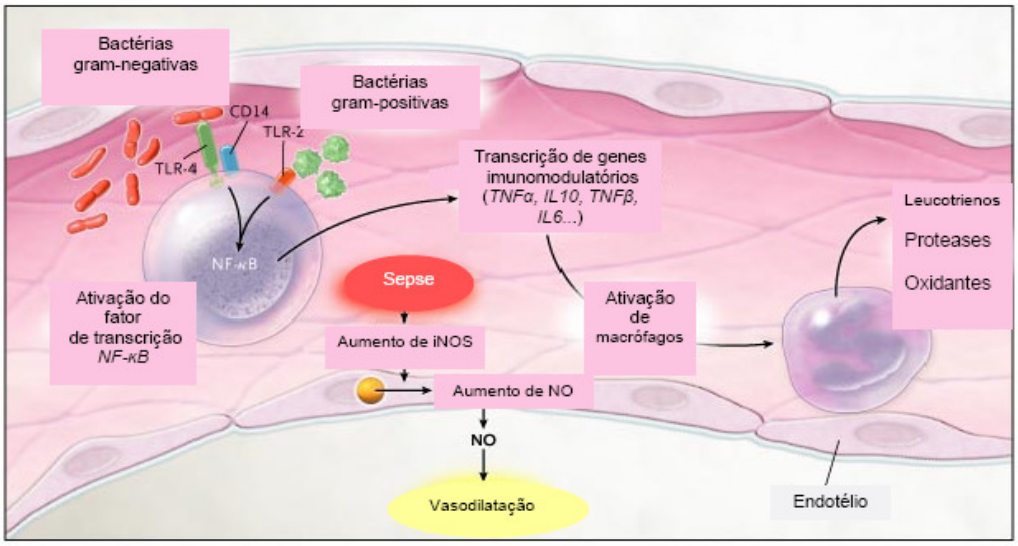

Figura 1. Bactérias gram-negativas e positivas promovem a liberação de óxido nítrico e de outros mediadores inflamatórios através de leucócitos ativados. Figura adaptada de *emcrit.org/065-132/132-sepsis.htm*

Além de produtos bacterianos, a resposta inflamatória também pode ser causada por fungos, vírus e parasitas (GLAUSER et al., 1991; SANDS et al., 1997; KUMAR; WOOD; PARRILLO, 2003). Entretanto, em 85% dos casos de choque séptico a infecção se da por bactérias gram-negativas e positivas (HANNA, 2003).

1.4. Arginina Vasopressina (AVP)

Os mediadores inflamatórios excessivamente liberados durante a sepse podem direta ou indiretamente atingir o sistema nervoso central ativando neurônios envolvidos em funções autonômicas e neuroendócrinas (MCCANN et al., 2000; ENGBLOM et al., 2002; KOVACS, 2002). Em se tratando das alterações neuroendócrinas, sabe-se que durante a sepse o eixo hipotálamo-hipófise encontra-se alterado, podendo inibir ou estimular a liberação de vários hormônios ali produzidos, como por exemplo, a vasopressina (CORREA et al., 2007; PANCOTO et al., 2008; ATHAYDE et al., 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009).

A AVP ou hormônio antidiurético (ADH) é um nonapeptídeo com uma ponte dissulfeto entre duas cisteínas. Ela é sintetizada em neurônios magnocelulares localizados nos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) do hipotálamo. A AVP e a neurofisina, proteína carreadora axonal, migram através dos axônios desses neurônios até a neurohipófise, onde o hormônio é armazenado, e posteriormente liberado para a circulação após estímulos adequados (SWAAB; NIJVELDT; POOL, 1975; BARBERIS, 1998; HOLMES et al., 2001).

O aumento da osmolalidade plasmática, hipotensão ou hipovolemia severa são os principais estímulos envolvidos na secreção de AVP. Além disso, a sua liberação também pode ser mediada por mediadores inflamatórios, como prostaglandinas (PGs), NO, TNF-α, IL-1 e IL-6 (SCHRIER; BERL; ANDERSON, 1979; SKLAR; SCHRIER, 1983; WOOD; CHEN, 1989; BROOKS; GIBSON, 1992; KOVACS; ROBERTSON, 1992; GATTI; BARTFAI, 1993; LANDGRAF et al., 1995; HOLMES et al., 2001; CORREA et al., 2007; PALIN et al., 2009).

As ações da AVP são complexas devido a sua atuação em pelo menos três subtipos de receptores acoplados à proteína G (BARBERIS; MOUILLAC; DURROUX, 1998; BIRNBAUMER, 2000; HOLMES; LANDRY; GRANTON, 2003).

O receptor V_1 (ou V_{1a}) está presente em tecidos específicos, como nos rins, coração, plaquetas, fígado, baço, testículos, cérebro e especialmente no músculo liso vascular. O papel fisiológico exato da AVP em muitos destes tecidos ainda permanece desconhecido. Porém a alta densidade do receptor V_1 nas células musculares lisas explica muitos efeitos cardiovasculares do hormônio, sendo responsável pela vasoconstrição (THIBONNIER, 1992; HOLMES et al., 2001; HOLMES; LANDRY; GRANTON, 2003; MAYBAUER et al., 2008).

O receptor V_2 está localizado nos ductos coletores renal. A ligação da AVP a este subtipo de receptor promove a incorporação de canais de água (aquaporinas) na superfície das células luminais, resultando no aumento da permeabilidade à água. Esse processo caracteriza a ação antidiurética do hormônio (INNAMORATI; SADEGHI; BIRNBAUMER, 1996; ERLENBACH; WESS, 1998; BIRNBAUMER, 2000; HOLMES; LANDRY; GRANTON, 2003).

O receptor V_3 (ou V_{1b}) é encontrado na adenohipófise e a ativação deste receptor pela AVP está relacionada à estimulação da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (LIU et al., 1994; THIBONNIER, 1997; HOLMES; LANDRY; GRANTON, 2003).

1.5. Arginina vasopressina e sepse

Estudos clínicos relatam um aumento na concentração plasmática de AVP em pacientes com sepse em fase inicial (LANDRY et al., 1997; LANDRY; OLIVER, 2001; SHARSHAR et al., 2003). Entretanto, na fase tardia da doença quando a presença da hipotensão deveria estimular a secreção do hormônio, a concentração plasmática do mesmo encontra-se inapropriadamente próximo a valores basais (LANDRY; OLIVER, 2001; SHARSHAR et al., 2003).

Há várias hipóteses para que a concentração plasmática de AVP esteja reduzida na fase tardia da sepse, como por exemplo: depleção dos estoques secretórios do hormônio na neuro-hipófise (SHARSHAR et al., 2002; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009); insuficiência autonômica (HOLMES et al., 2001; PANCOTO et al., 2008); e redução da secreção do hormônio por liberação excessiva de óxido nítrico (REID, 1994; GIUSTI-PAIVA et al., 2002; CORREA et al., 2007).

1.6. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás endógeno e a sua síntese se realiza por ação de uma enzima, a óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a produção de NO a partir do aminoácido L-arginina (PALMER; FERRIGE; MONCADA, 1987; PALMER; ASHTON; MONCADA, 1988; KNOWLES; MONCADA, 1994).

Existem quatro tipos de NOS: a NOSe (NOS endotelial), e a NOSn (NOS neuronal), ambas constitutivas e dependentes de cálcio e a NOSi (NOS induzida), que é induzida por citocinas ou outros compostos, como por exemplo o LPS (KNOWLES; MONCADA, 1994; WANG; MARSDEN, 1995). Além dessas, há descrição de uma isoforma constitutiva localizada na mitocôndria de diferentes órgãos, sendo denominada NOS mitocondrial (NOSmt) (GHAFOURIFAR; RICHTER, 1997; GIULIVI; PODEROSO; BOVERIS, 1998; BOVERIS; ALVAREZ; NAVARRO, 2002).

Durante a sepse a NOSi encontra-se ativada, havendo uma super produção de NO, que junto com outros mediadores inflamatórios é capaz de causar vasodilatação, aumento na permeabilidade vascular e conseqüente hipotensão (THIEMERMANN, 1997; KIRKEBOEN; STRAND, 1999; GIUSTI-PAIVA et al., 2002; GIUSTI-PAIVA; BRANCO et al., 2003). A hipotensão permanente pode então levar a isquemia e falência múltipla de órgãos (GLAUSER et al., 1991).

Vários estudos têm evidenciado o efeito modulador do NO na secreção de AVP, e esse efeito pode ser tanto estimulatório (OTA, 1993; VENTURA et al., 2005; CORREA et al., 2007), quanto inibitório (YASIN et al., 1993; GIUSTI-PAIVA et al., 2002; CARNIO et al., 2005) dependendo do contexto fisiopatólogico analisado.

Em se tratando de sepse, no modelo de endotoxemia, foi observado que tanto a administração central de L-NAME (inibidor da NOS), quanto de aminoguanidina (inibidor seletivo da NOSi), provocou um aumento nas concentrações plasmáticas de AVP (GIUSTI-PAIVA et al., 2002; GIUSTI-PAIVA; RUGINSK et al., 2003).

Entretanto, em nosso laboratório a administração sistêmica de aminoguanidina no modelo de sepse polimicrobiana, revelou que os animais submetidos à CLP e previamente tratados com a droga apresentaram uma redução nas concentrações plasmática de AVP, sugerindo um papel estimulatório do NO na secreção do hormônio (CORREA et al., 2007).

1.7. Leucotrienos

Identificados em 1979 (BORGEAT; SAMUELSSON, 1979; MURPHY; HAMMARSTROM; SAMUELSSON, 1979; SAMUELSSON et al., 1979), os leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (AA) por uma sequência de reações catalisadas por enzimas via padrão 5-lipoxigenase (5-LO) (PETERS-GOLDEN; BROCK, 2001).

Esses mediadores são produzidos principalmente por leucócitos, mas também podem ser sintetizados pelo músculo vascular liso, células endoteliais, eritrócitos, plaquetas e por neurônios (FITZPATRICK et al., 1984; FEINMARK; CANNON, 1986; CLAESSON; HAEGGSTROM, 1988; MACLOUF; MURPHY, 1988; HENDERSON, 1994; FARIAS et al., 2007).

Em condições fisiológicas, o AA encontra-se esterificado na posição sn-2 da membrana fosfolipídica. Durante ativação celular, por diferentes estímulos (LPS,

IL-1, TNF-α, e outros), tem-se um aumento de cálcio intracelular e consequente translocação da fosfolipase A_2 citosólica α ($cPLA_2α$) para a membrana nuclear da célula (CLARK et al., 1995; HIRABAYASHI; SHIMIZU, 2000). Este processo culmina na liberação do AA dos fosfolipídios de membrana (DENNIS, 1994; LAM, 2003). O AA liberado pode ser metabolizado por diversas vias dando origem a prostaglandinas, tromboxanos, ácido epoxieicosatetraenóico, lipoxinas, e aos LTs. Essas substâncias são coletivamente denominadas de eicosanóides (HENDERSON, 1991; NIKNAMI et al., 2009).

Para que ocorra a síntese de LTs, o AA liberado é transformado, no núcleo da célula, em ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) que, por ser instável, é rapidamente convertido em leucotrieno A_4 (LTA_4) pela ação da 5-LO (PETERS-GOLDEN; BROCK, 2001). Essa enzima é deslocada do núcleo ou do citosol para a membrana nuclear (ROUZER; KARGMAN, 1988; BROCK; MCNISH; PETERS-GOLDEN, 1995) e ativada pela proteína ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP). Esta última permanece associada à membrana nuclear (WOODS et al., 1993), e tem a propriedade de se ligar ao AA e apresentar esse substrato à 5-LO (ABRAMOVITZ et al., 1993; MANCINI et al., 1993).

Ao final da via da 5-LO, o LTA_4 é enzimaticamente hidrolizado e transformado em LTB_4, pela ação da LTA_4 hidrolase (ROUZER; MATSUMOTO; SAMUELSSON, 1986; HAEGGSTROM, 2000). Ou, ainda, em LTC_4 pela ação da LTC_4 sintase, uma proteína de membrana integral que catalisa a conjugação de LTA_4 com glutationa reduzida (PENROSE et al., 1992; LAM et al., 1994). Após a síntese do LTC_4, o mesmo pode ser metabolizado a LTD_4 e LTE_4, pela ação da gama-glutamil transferase e peptidades, respectivamente. O LTC_4 e seus

metabólitos, LTD_4 e LTE_4, são conhecidos como cisteinil leucotrienos (cis-LTs) (LAM, 2003; FLAMAND et al., 2007; MURPHY; GIJON, 2007).

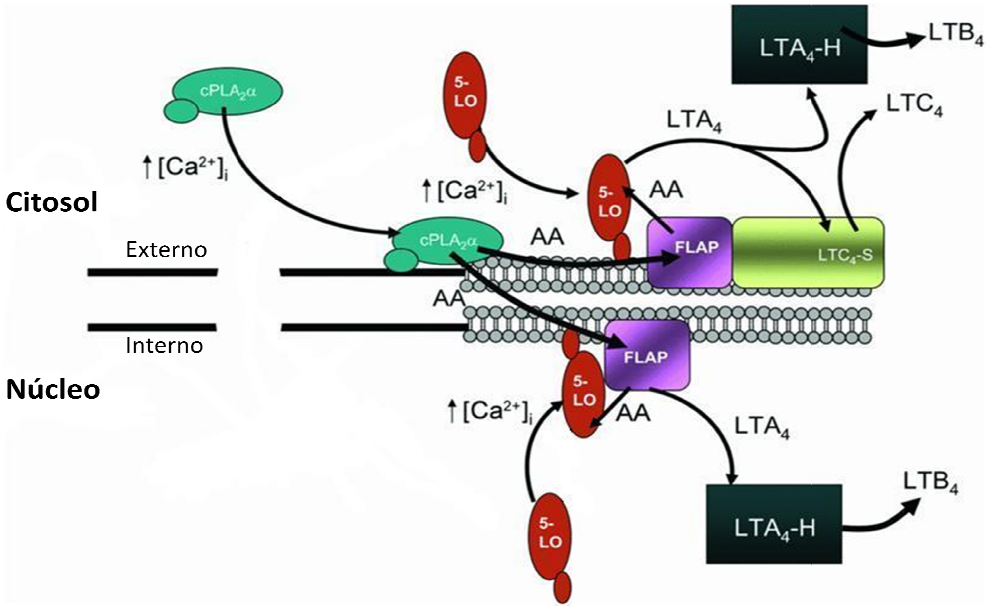

Figura 2. Organização intracelular das principais enzimas envolvidas na síntese de leucotrienos

A elevação de $[Ca^{2+}]_i$ causa translocação da $cPLA_2\alpha$ e da 5-LO para a região perinuclear, onde a FLAP e a LTC_4 sintase (LTC_4 -S) são residentes. Em algumas células, a 5-LO e a LTA_4 hidrolase (LTA_4-H) são encontradas no citosol, em outras no nucleoplasma. A $cPLA_2\alpha$ libera o AA e este é apresentado pela FLAP à 5-LO, a qual converte o AA em LTA_4. Pela ação da LTA_4-H ou LTC_4-S, o LTA_4 é convertido em LTB_4 ou LTC_4, respectivamente. A conversão de LTC_4 em seus metabólitos (LTD_4 e LTE_4) ocorre em outro momento, fora da célula. Adaptado de Murphy e Gijón (2007).

Para que os dois grupos de leucotrienos, LTB_4 e cis-LTs, promovam suas ações biológicas eles devem se ligar a receptores de membrana acoplados à proteína G. Há cinco subtipos de receptores, sendo dois deles para LTB_4 (nomeados BLT_1 e BLT_2), três para cis-LTs (conhecidos como $CisLT_1$, $CisLT_2$ e GPR17) (LYNCH, 1999; HEISE et al., 2000; KAMOHARA et al., 2001; MARTIN et al., 2001; CIANA et al., 2006).

O BLT_1 é um receptor predominantemente expresso em leucócitos humanos (YOKOMIZO; MASUDA et al., 2000), enquanto que o receptor BLT_2 está presente em vários tecidos e células humanas, principalmente no coração, fígado, pâncreas,

baço, ovário e leucócitos. Contudo, no sistema nervoso central a existência de receptores para LTB_4 ainda não foi descrita (TODA et al., 1999; YOKOMIZO; KATO et al., 2000).

O receptor $CisLT_1$ tem maior afinidade pelo LTD_4 do que pelo LTC_4 e LTE_4, e está localizado principalmente em leucócitos do sangue periférico, pulmão e baço (LYNCH, 1999; SARAU et al., 1999; HUI; FUNK, 2002).

O $CisLT_2$ tem alta afinidade pelo LTC_4 e LTD_4 e menor para o LTE_4. Originalmente, esse receptor foi encontrado no pulmão, leucócitos do sangue periférico, baço, coração, glândula adrenal, e em várias regiões do cérebro (HEISE et al., 2000; NOTHACKER et al., 2000; HUI; FUNK, 2002).

Mais recentemente, um novo receptor que se liga tanto a nucleotídeos uracil e cis-LTs têm sido descrito como receptor órfão acoplado à proteína G (GPR17). Esse receptor é homólogo aos receptores para cis-LTs e está envolvido em quadro de isquemia (CIANA et al., 2006; LECCA et al., 2008).

O LTB_4 promove quimiotaxia, ativação e adesão de leucócitos ao endotélio vascular. Dessa maneira, é o mediador responsável pelo recrutamento de leucócitos da circulação sanguínea para o tecido infectado (CUNNINGHAM; SHIPLEY; SMITH, 1980; FORD-HUTCHINSON et al., 1980; GIMBRONE; BROCK; SCHAFER, 1984; FLAMAND et al., 2007).

Os cis-LTs são melhores conhecidos pelos seus efeitos de broncoconstrição e secreção de muco através de vias aéreas, sendo respostas características de pacientes com asma (DAHLEN et al., 1980). Além disso, os cis-LTs exercem papel importante nos vasos, sendo responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular (DAHLEN et al., 1981; SMEDEGARD et al., 1982; ANDERSON; BRUNI;

KAUFMANN, 1990; SPRINGER et al., 1990; HENDERSON; KEAY; BANDLER, 1998; GOULET et al., 2000; FLAMAND et al., 2007).

Tabela 1 Localização subcelular das enzimas envolvidas na síntese e metabolismo de leucotrienos

Enzima	Células intactas	Células ativadas
$cPLA_2\alpha$	Citosol	Membrana perinuclear, complexo de golgi, retículo endoplasmático
5-LO	Citosol, nucleoplasma	Membrana perinuclear
FLAP	Membrana perinuclear	Membrana perinuclear
LTA_4-H	Citosol	Citosol, nucleoplasma
LTC_4-S	Membrana perinuclear	Membrana perinuclear

Adaptado de Murphy e Gijón (2007)

A regulação da biosíntese de LTs pode também envolver transporte de LTA_4 de uma célula à outra que apresenta LTC_4 sintase ou LTA_4 hidrolase, e assim continuar a transformação bioquímica apesar do LTA_4 apresentar uma meia vida curta (MURPHY; GIJON, 2007). Esse processo é denominado biosíntese transcelular e sugere que o ambiente celular, que é a interação célula-célula, exerce importante controle na produção de LTs (DI GENNARO et al., 2004).

1.8. Leucotrienos e sepse

Embora muitos estudos sobre os LTs evidenciem seu papel na asma (BISGAARD; LOLAND; OJ, 1999; BRATTON et al., 1999; WILSON et al., 2001; SANDRINI et al., 2003), a idéia que estes são mediadores na sepse originou estudos em animais e humanos (SPRAGUE et al., 1989; CAN et al., 1998;

ANDERSON; BLUMER, 2000; MORLION et al., 2000; RIOS-SANTOS et al., 2003; AZAB; KAPLANSKI, 2004; BENJAMIM et al., 2005; BAENKLER; LEYKAUF; JOHN, 2006; ATHAYDE et al., 2009).

Trabalhos básicos sugerem a participação dos LTs nas manifestações cardiovasculares do choque séptico (CAN et al., 1998; BENJAMIM et al., 2005). A administração de LPS a coelhos causou um declínio bifásico e severo da pressão arterial, e o pré-tratamento oral com MK-886 (5 mg/kg), inibidor da síntese de LTs, atenuou a resposta hipotensiva ao lipopolisacarídeo (CAN et al., 1998). No modelo de sepse polimicrobiana também foi possível verificar que camundongos submetidos à CLP e tratados com administração oral de MK-571 (antagonista do receptor cis-LT_1) exibem menor hipotensão induzida por sepse (BENJAMIM et al., 2005).

Além dos efeitos cardiovasculares, os LTs estão envolvidos com a sobrevivência de animais sépticos (MARSHALL et al., 1995; BENJAMIM et al., 2005; ATHAYDE et al., 2009).

Em um modelo de sepse por CLP, camundongos tratados oralmente com MK-886 (1mg Kg^{-1}) apresentaram 100% de sobrevida (BENJAMIM et al., 2005). Em experimento realizado em nosso laboratório, utilizando o mesmo modelo experimental, também verificamos um aumento na sobrevida dos ratos tratados com MK-886 por via intracerebroventricular (ATHAYDE et al., 2009).

O bloqueio de um passo na síntese do LTs (inibição da fosfolipase A_2) resultou em diminuição da produção de LTB_4 pelos neutrófilos humanos e também mostrou ser efetivo na sobrevivência de camundongos submetidos à sepse (MARSHALL et al., 1995).

Entretanto, em um estudo realizado por Morlion e colaboradores foi observado que as células mononucleares do sangue de pacientes sépticos eram

incapazes de aumentar a produção de LTC_4, e isso foi relacionado com uma menor sobrevivência desses pacientes em relação aos voluntários saudáveis. Os autores sugerem o papel dos leucotrienos como marcador de prognóstico na sepse a partir da correlação entre a capacidade de síntese de LTC_4 e a sobrevida desses pacientes (MORLION et al., 2000).

1.9. Leucotrienos e sistema nervoso central (SNC)

A presença de metabólitos do AA é amplamente distribuída em várias regiões encefálicas, e parece estar relacionada com funções neuroendócrinas (LINDGREN et al., 1985; SHIMADA et al., 2005).

A produção de LTs no SNC está associada com a existência das enzimas 5-LO e FLAP. A expressão do RNAm dessas enzimas foi determinada por RT-PCR seguida da análise por Southern blot em várias regiões do encéfalo de ratos, incluindo hipocampo e hipotálamo (LAMMERS et al., 1996).

Uma grande quantidade de LTC_4 foi detectada por imunohistoquímica e cromatografia no hipotálamo e na eminência mediana (HULTING et al., 1985; MIYAMOTO et al., 1987; SHIMADA et al., 2005).

Por meio da análise de tecidos humanos por Northern blot foi possível observar que o RNAm do receptor $CisLT_2$ era expresso em várias regiões do encéfalo, com particular concentração na hipófise e no hipotálamo (HEISE et al., 2000). Esses resultados sugerem que os cis-LTs plasmáticos podem exercer ações centrais, tendo em vista a existência de receptores neuronais para os mesmos.

Hulting e colaboradores (HULTING et al., 1985) relatam que metabólitos do AA parecem ter funções no controle da secreção de diferentes hormônios do

hipotálamo e da glândula adenohipófise. Esse papel pôde ser identificado quando os mesmo autores utilizando cultura de células da adenohipófise de ratos observaram que o LTC_4 estimula a liberação do hormônio luteinizante (LH).

O LTC_4 no SNC também parecer estar relacionado com o sistema vasopressinérgico do eixo hipotálamo-neurohipofisário. A LTC_4 sintase, mas não a LTA_4 hidrolase, foi identificada em neurônios magnocelulares vasopressinérgicos dos núcleos PVN, SON e supraquiasmático (SC) do hipotálamo e na área retroquiasmática (RC), bem como em terminações axônicas na hipófise de camundongos. Além disso, os resultados deste estudo indicaram que a LTC_4 sintase é seletiva para neurônios vasopressinérgicos, não apresentando expressão em neurônios ocitocinérgicos (SHIMADA et al., 2005). Os autores, portanto, propõem que o LTC_4, mas não o LTB_4, pode estar envolvido na regulação da secreção de vasopressina.

1.10. Leucotrienos e óxido nítrico

Uma rede complexa de interações existe entre cis-LTs e uma variedade de mediadores inflamatórios, como por exemplo, o óxido nítrico (PETERS-GOLDEN; GLEASON; TOGIAS, 2006).

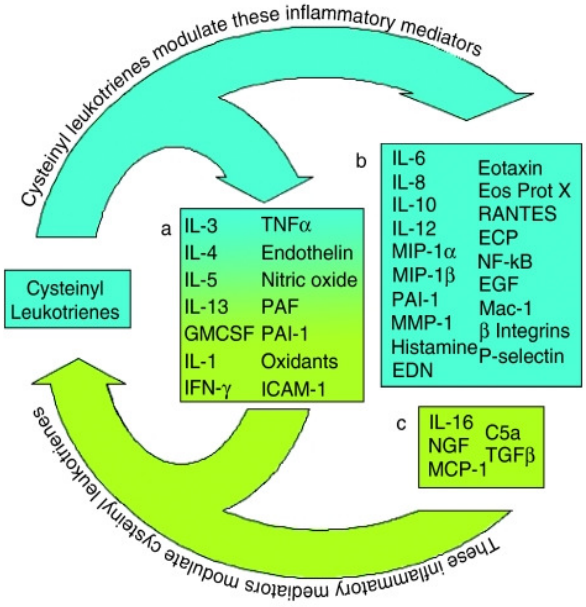

Figura 3. Interação entre cis-leucotrienos (cis-LTs) e outros mediadores inflamatórios. (a) Há a regulação bidirecional de cis-LTs com alguns mediadores; (b) os cis-LTs modulam a produção e atividade de mediadores inflamatórios; (c) e estes podem modular a atividade dos cis-LTs (PETERS-GOLDEN; GLEASON; TOGIAS, 2006).

O NO tem sido muito estudado em nosso laboratório, visto que, esse mediador apresenta efeito modulador na secreção de AVP e o seu aumento representa um marco durante sepse experimental (CORREA et al., 2007; ATHAYDE et al., 2009; COELHO, 2009). Além disso, vários estudos têm demonstrado o efeito de antagonista de receptor ou inibidores de LTs na produção desse mediador (WILSON et al., 2001; OFFER et al., 2003; WON et al., 2005; ATHAYDE et al., 2009).

Montelukast (antagonista do receptor Cis-LT_1) foi mostrado reduzir os níveis de NO em ensaios clínicos com pacientes adultos asmáticos (WILSON et al., 2001; SANDRINI et al., 2003) e com crianças (BISGAARD; LOLAND; OJ, 1999; BRATTON et al., 1999). Esse antagonista também foi mostrado reduzir a expressão da NOSi em pulmão de ratos (OFFER et al., 2003).

O tratamento de células gliais com LPS promoveu aumento do conteúdo de RNA mensageiro (RNAm) e da enzima NOSi, e conseqüente aumento da produção de NO. Quando essas células foram incubadas com MK-886, os pesquisadores observaram que havia redução tanto do conteúdo de RNAm e da proteína NOSi quanto da concentração de NO, sugerindo que a 5-LO medeia a expressão do gene da NOSi durante endotoxemia (WON et al., 2005).

Em estudo realizado em nosso laboratório com o modelo de sepse polimicrobiana por CLP, também foi possível observar uma redução dos níveis de NO com a administração central de MK-886. Neste mesmo trabalho, durante a fase inicial da sepse, a administração do inibidor, bloqueou o aumento das concentrações hipotalâmicas de LTC_4 sintase e inibiu a secreção de AVP, além disso, aumentou a sobrevida dos animais (ATHAYDE et al., 2009). Diante deste contexto, nós nos perguntamos se a administração periférica da droga provocaria as mesmas alterações na produção de NO e na liberação de AVP.

Sendo assim, esse trabalho teve como objetivo verificar os efeitos da administração intraperitoneal de MK-886 na produção de NO e na liberação de vasopressina durante sepse experimental.

2. Objetivo

2.1. Objetivo geral

Analisar o efeito do MK-886, um inibidor da síntese de leucotrienos, na produção de óxido nítrico e na liberação de vasopressina durante sepse experimental.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Analisar o efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a sobrevida e recrutamento de neutrófilos para cavidade abdominal dos animais após sepse experimental;

2.2.2. Verificar se a administração intraperitoneal de MK-886 altera o osmolalidade, sódio sérico, hematócrito, proteínas plasmáticas em animais sépticos;

2.2.3. Analisar o efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a produção de nitrato sérico e de cis-LTs plasmáticos após sepse experimental;

2.2.4. Verificar se a administração intraperitoneal de MK-886 altera a liberação de vasopressina em animais sépticos.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos foram realizados com ratos adultos da linhagem Wistar, de peso corporal 250 ± 30 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Os animais foram ambientados em caixas coletivas (5 ratos por caixa), com livre acesso à água e ração (6003/100110036, NUVILAB CR-1 Autoclavável), à temperatura de aproximadamente 25±2°C e em fotoperíodo de 12/12 horas.

Os procedimentos experimentais foram analisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto-USP (Protocolo n° 07.1.928.53.2). Animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP, se em grande sofrimento, foram eutanasiados seguindo critérios descritos em "Humane endpoints in shock research" (NEMZEK et al., 2004).

3.2. Desenho experimental

Foram utilizados animais pré-tratados com 1 ml de DMSO 5% ou MK-886 nas concentrações de 1.0 ou 2.0 ou 4.0mg/kg, administrado por via intraperitonial (i.p), 1 hora antes da sepse induzida por CLP ou operação fictícia (OF).

A seguir, em um primeiro grupo foi avaliada a sobrevida dos animais por um período de três dias. Em outro grupo, os animais foram decapitados em 0, 4 e 24 horas após a cirurgia CLP ou OF. Posteriormente, o sangue foi coletado para as determinações de osmolalidade, sódio sérico, hematócrito, proteínas plasmáticas, nitrato sérico, cis-LTs e vasopressina plasmáticos. Além disso, o lavado peritoneal

foi colhido para subsequente contagem do número de neutrófilos recrutados para a cavidade peritoneal.

3.3. Anestesia

Animais submetidos à manipulação cirúrgica foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de Tribromoetanol (TBE, Aldrich Chem. Corp. Inc.) 2,5% em solução salina, na dose de 1mL/100g de peso corporal.

3.4. Sepse experimental por "Cecal Ligation and Puncture" (CLP)

A indução da sepse foi feita pelo modelo de ligadura e perfuração cecal ("Cecal Ligation and Puncture"), o qual foi desenvolvido por Chaudry e colaboradores em 1979 (CHAUDRY; WICHTERMAN; BAUE, 1979) e tem sido amplamente usado em nosso laboratório (CORREA et al., 2007; PANCOTO et al., 2008; ATHAYDE et al., 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009). Os animais devidamente anestesiados foram submetidos à incisão mediana de 5cm no abdômen seguido de exteriorização do ceco. Os dois terços distais do ceco foram ligados, para obstrução parcial do lúmen intestinal, e perfurados por 10 vezes com agulha 16G (Figura 4). O ceco foi reintroduzido na cavidade abdominal após verificação da saída de fezes. O fechamento da cavidade abdominal foi realizado em dois planos de sutura com pontos separados. Solução salina normal estéril (7ml/animal) (HUBBARD et al., 2005) foi administrada via subcutânea como líquido de reanimação. O grupo controle foi submetido à operação fictícia (OF) sem ligadura

ou perfuração cecal. O procedimento incluiu somente laparotomia mediana com exteriorização e manipulação do ceco, e fechamento da cavidade abdominal.

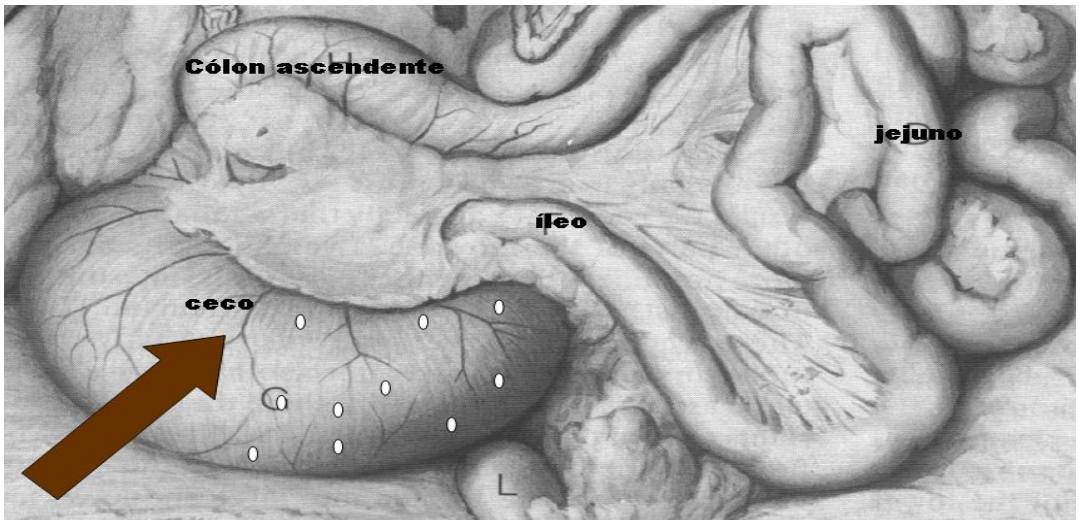

Figura 4. Esquema da cavidade peritoneal do rato. Seta indica o ponto da ligadura cecal a partir da qual foram feitas 10 perfurações com agulha 16G. Adaptado de Hebel e Stromberg (1986).

3.5. Determinação da curva de sobrevida

Sessenta ratos foram utilizados para determinação da curva de sobrevida. Os animais receberam injeção intraperitonial (i.p) de DMSO 5% (veículo) ou 1.0 ou 2.0 ou 4.0mg/kg de MK-886 e após 1 hora foram randomicamente subdivididos em 2 grupos, 5 animais foram submetidos a operação fictícia (OF) e 10 à cirurgia CLP. Os animais foram mantidos em caixas individuais com água e ração e observados por 3 dias para registro do número de óbitos.

3.6. Avaliação do recrutamento de neutrófilos para cavidade peritoneal

O Recrutamento de neutrófilos foi avaliado 4 horas após a cirurgia CLP. Os animais foram decapitados e as células presentes na cavidade peritoneal foram colhidas pela lavagem com 15 ml de PBS gelado. O lavado peritoneal foi coletado individualmente de cada animal e adicionado separadamente em tubos plásticos. A contagem do número total de células presentes no lavado foi feita empregando solução de Turk e câmara de Neubauer. As contagens diferenciais das células foram realizadas em esfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin 3, Shandon Souther Products Ltd., Cheshire, UK) e submetidas à coloração por Panótico (Laborclin LTDA, Pinhais Paraná, Brasil). Os resultados foram apresentados como o número de neutrófilos por ml de lavado peritoneal.

3.7. Determinação do hematócrito

Após a decapitação dos animais parte do sangue foi coletada do tronco para a determinação do hematócrito diretamente em microcapilares heparinizados (Perfecta, SP, Brasil). Em seguida, os microcapilares foram selados na extremidade contrária à entrada de sangue com auxílio de uma lamparina e centrifugados por 3 minutos em centrífuga apropriada (Centrimicro Mod. 211, FANEN). A leitura do hematócrito foi feita com auxílio de um cartão próprio para essa finalidade que acompanha a centrífuga. A determinação deste parâmetro foi utilizada nesse estudo como índice indireto da volemia.

3.8. Separação do plasma e do soro

Animais destinados à coleta de sangue foram decapitados em 0, 4, ou 24 horas após cirurgia CLP ou OF. Em seguida uma parte do sangue foi coletada do tronco, em tubos plásticos, mantidos sob gelo, contendo heparina (0,1ml) e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos à 4°C para a separação do plasma. O mesmo foi dividido em 3 microtubos plásticos: um contendo 1.0mL para posterior dosagem de AVP, outro com aproximadamente 500µl que foram utilizados para dosagem de cis-LTs e o último com 60µl para determinações da osmolalidade e proteínas plasmáticas.

Outra parte do sangue foi coletada em microtubos de plástico sem anticoagulante e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos à 4°C para a determinação do sódio e nitrato séricos. O plasma e o soro foram armazenados a -20ºC.

3.9. Determinação da osmolalidade plasmática

Cinqüenta microlitos (50µl) do plasma foram utilizados para a determinação da osmolalidade plasmática pelo método de abaixamento do ponto de congelação da água em micro-osmômetro (Precision System, INC., MA, EUA).

3.10. Determinação de sódio sérico

O sódio sérico foi determinado em fotômetro de chama (Micronal), devidamente calibrado com solução padrão Micronal contendo 140mEq/L de sódio e 5mEq/L de potássio, diluída em água destilada na proporção de 1:100. Cada amostra foi diluída igualmente à solução padrão (30µL do plasma em 2,90mL de água destilada), homogeneizada e aspirada no fotômetro de chama para a leitura da concentração do sódio sérico.

3.11. Determinação de proteínas plasmáticas

Dez microlitros (10µL) do plasma foram diluídos na proporção de 1:200. Dessa diluição, 10µL foram dispostos em placas com 96 poços, e posteriormente 200µL de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EUA), diluído na proporção de 1:5 com água milli-Q, foram adicionados. As concentrações das amostras foram calculadas com base na curva padrão de concentrações conhecidas (31,25; 62,5; 125; 250; 500µg/ml) de albumina fração V (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). As leituras da curva padrão e das amostras foram realizadas em Microplate Manager (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EUA) a 595 ηm e temperatura de 36ºC. Os resultados foram expressos em g/dL.

3.12. Determinação indireta de NO pela dosagem de nitrato sérico

A determinação de nitrato sérico foi realizada pela técnica de quimioluminescência NO/ozônio. O procedimento foi realizado utilizando-se 5µL de plasma desproteinizado por incubação com etanol 95% a 4ºC por 30 minutos e, centrifugado por 5 minutos a 5000 g. As amostras foram injetadas em um vaso de reação contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N à 95ºC) que converte o nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é aspirado, usando gás hélio, para a câmara de quimiluminescência do Sievers NOAnalizer (Sievers 280 NOA, Sievers, Boulder, CO, EUA). A detecção do NO decorre de sua reação com o ozônio, emitindo luz vermelha. O fóton emitido é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente gerada é convertida por um conversor analógico-digital e analisada em computador. A área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato da amostra. A concentração foi calculada por comparação com uma curva padrão usando concentrações conhecidas (0; 5; 10; 15; 30; 60 µmol) de nitrato de sódio.

3.13. Determinação de cis-leucotrienos plasmáticos

Quinhentos microlitos (500µl) do plasma foram desproteinizados e em seguida o nível de cis-LTs plasmáticos foi determinado por ELISA (Amersham, código: RPN 224). Uma placa pré-coberta com anticorpo contra cis-LTs foi fornecida pelo fabricante. Um volume de 50 ml/poço dos padrões (0–2000 pg/ml) e das amostras não conhecidas foi adicionado em duplicadas aos poços apropriados. Em seguida, uma solução de cis-LTs conjugada à peroxidade foi adicionada (50

ml/poço). A placa foi submetida à agitação leve, coberta e incubada à temperatura ambiente por 1 hora. Então, a placa foi lavada (3 vezes), e uma solução de substrato (TMB/H_2O_2) foi adicionada (150 ml/poço). A placa foi então coberta e permaneceu sob agitação leve por 30 minutos. A reação enzimática foi interrompida e 100 ml/poço de solução stop (2N H_2SO_4) foi adicionada. A placa foi lida em um leitor de micro-placa, fixado a 450 ηm. A extensão do desenvolvimento de cor é inversamente proporcional à quantidade de cis-LTs. Uma regressão linear foi usada para delinear os valores da curva padrão e calcular o conteúdo de cis-LTs das amostras.

3.14. Radioimunoensaio da arginina vasopressina plasmática (AVP)

O ensaio da AVP foi realizado após extração prévia do plasma com acetona e éter de petróleo. Em 1mL de plasma foi acrescentado 2mL de acetona, em seguida as amostras foram agitadas e centrifugadas (3000 rpm, 20 min, 4ºC). O sobrenadante foi decantado em um tubo contendo 2mL de éter de petróleo e agitado. Após a separação das duas fases líquidas (~5 minutos), a fase superior foi aspirada e o restante liofilizado e estocado a -20ºC. No dia do início do radioimunoensaio as amostras foram ressuspendidas com 250µL de tampão para AVP. As concentrações plasmáticas de AVP foram determinadas utilizando-se reagentes e protocolos de incubação comuns. Os peptídeos marcados com ^{125}I foram de fonte comercial (Ge Healthcare, EUA). O ensaio não-equilibrado foi realizado com volume de incubação de 500µL e tempo de incubação de 4 dias a 4ºC. O hormônio marcado foi separado do não marcado por um anticorpo secundário. A concentração de AVP foi medida com antisoro de diluição final

1:20.000. O antisoro foi específico sem reação cruzada com outros peptídeos conhecidos.

3.15. Droga utilizada

A droga utilizada no experimento foi o composto MK-886 (3 [1-(4-clorobenil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-y1]-2,2-ácidodimetilpropanóico), um inibidor da síntese de LTs (LTA_4, LTB_4 e cis-LTs). Essa droga apresenta esse efeito por inibir duas ações da proteína FLAP, a de se ligar ao ácido araquidônico (AA) e transferir esse substrato a 5-LO e a de estimular a utilização do AA pela enzima (ABRAMOVITZ et al., 1993; MANCINI et al., 1993). Além disso, a similaridade da FLAP com a LTC_4 sintase permite que o MK-886 também inibe esta última (LAM et al., 1994). A figura 5 mostra o sítio de ação da droga.

O solvente empregado foi o DMSO (dimetilsulfóxido) (Amresco, Sólon, Ohio, USA) 5% e as concentrações utilizadas de MK-886 foram 1.0, 2.0 e 4.0 mg/kg, em um volume de 1.0 mL. A via de administração da droga foi intraperitoneal (i.p.). Esse composto foi doado pela Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatólogicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

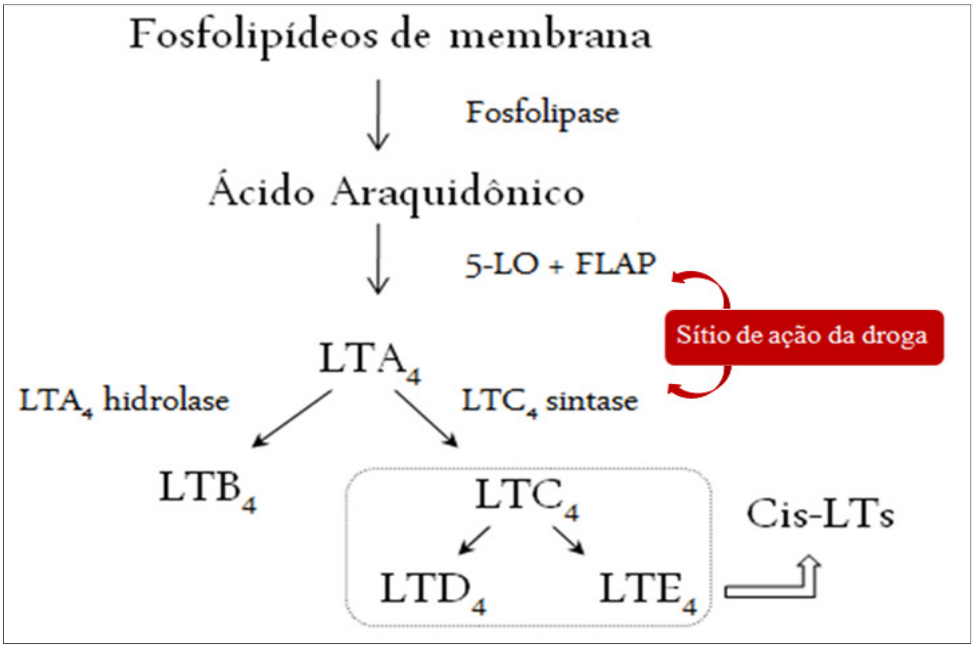

Figura 5. Sítio de ação do composto MK-886

3.16. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM). Dados referentes à osmolalidade, sódio sérico, hematócrito, proteínas plasmática, nitrato sérico, cis-LTs e vasopressina plasmáticos foram analisados utilizando ANOVA TWO-WAY seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Para a análise dos resultados relativos ao recrutamento de leucócitos para a cavidade abdominal, utilizou-se o teste ANOVA ONE-WAY. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente diferentes. A curva de sobrevida foi expressa como porcentagem de animais vivos e a estatística foi feita utilizando o teste Log-rank (Mantel-Cox).

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do MK-886 na sobrevida e no recrutamento de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos após CLP

Os animais submetidos à operação fictícia (OF+DMSO 5%) apresentaram sobrevida de 100% após 3 dias de observação e as administrações i.p. de MK-886 (1.0 ou 2.0 ou 4.0mg/kg) não interferiram na sobrevida dos mesmos (dado não demonstrado). O grupo de animais submetidos ao estímulo séptico com administração do veículo apresentou sobrevida de 20% após o segundo dia, permanecendo com essa porcentagem até o último dia analisado. A injeção i.p. de MK-886 em qualquer uma das concentrações não foi capaz de alterar a sobrevida dos animais sépticos após 3 dias de observação (Figura 6).

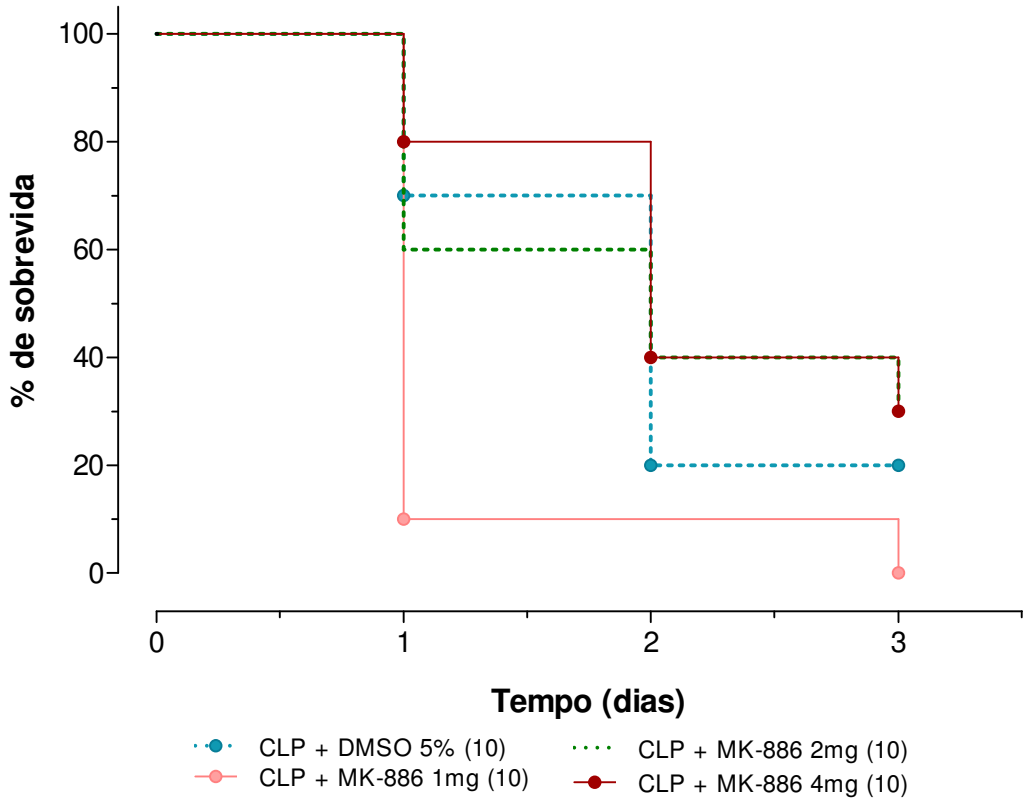

Figura 6. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a sobrevida dos animais após CLP. Número de animais entre parênteses.

A figura 7 mostra o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos 4 horas após a cirurgia CLP. Nenhuma alteração foi observada com o pré-tratamento com MK-886.

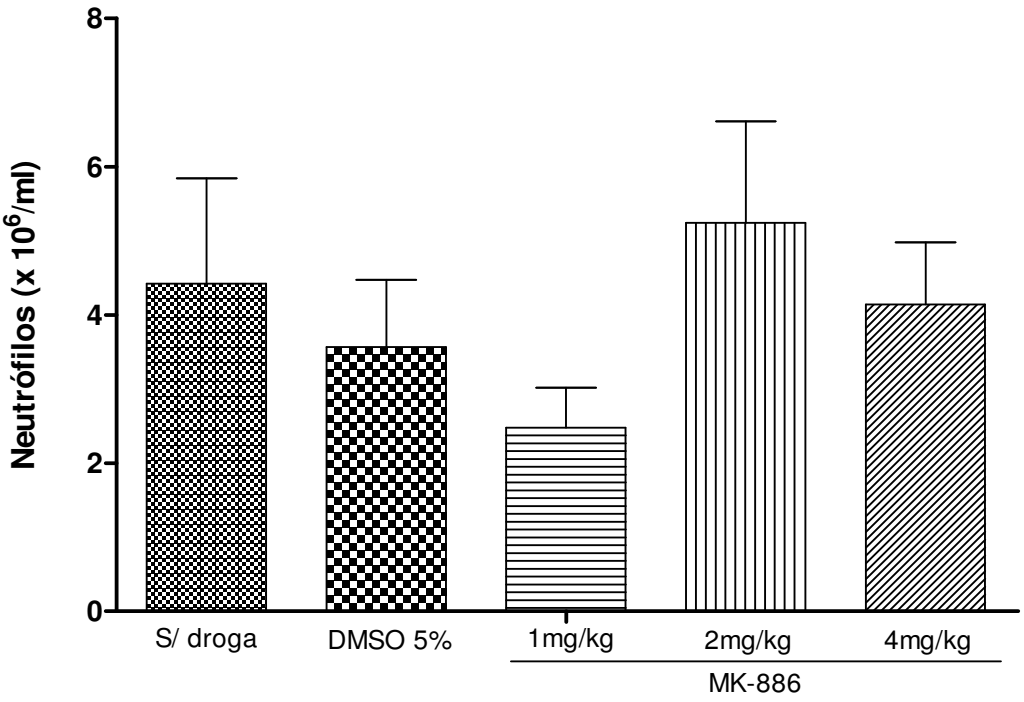

Figura 7. **Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais.** Valores expressos como média ± EPM; n = 4.

4.2. Efeito do MK-886 sobre a osmolalidade, sódio sérico, hematócrito e proteínas plasmáticas

Quanto à determinação da osmolalidade plasmática, observamos que o grupo DMSO 5% apresentou uma redução significativa da osmolalidade nos tempos 4 e 24 horas após a cirurgia CLP. Isso também foi observado nos animais que receberam MK-886 nas concentrações 2.0 ou 4.0mg/kg. Entretanto, com a administração de 1.0mg/kg da droga houve uma redução apenas em 24 horas (Figura 8).

A análise dos resultados de sódio sérico revelou que não há diferença estatística entre o grupo controle (DMSO 5%) e os tratados. No entanto, observamos uma redução de sódio em 24 horas no grupo controle (DMSO 5%+CLP) e no grupo MK-886 (1mg+CLP). Com a administração de 2.0mg/kg de MK-886 notamos uma diminuição nos níveis de sódio 4 horas após a indução da sepse (Figura 9).

No grupo DMSO 5%, a sepse provocou um aumento do hematócrito 4 horas após o estímulo. A administração de MK-886 nas concentrações 1.0, 2.0 ou 4.0mg/kg não modificou essa resposta (Figura 10).

Os níveis de proteínas plasmáticas no grupo CLP apresentaram reduzidos 4 e 24 horas após a cirurgia (DMSO 5%). Esse mesmo perfil foi observado com as concentrações 2.0 e 4.0mg/kg de MK-886. Entretanto, com a administração de 1.0mg/kg da droga houve uma redução apenas em 24 após o estímulo séptico (Figura 11).

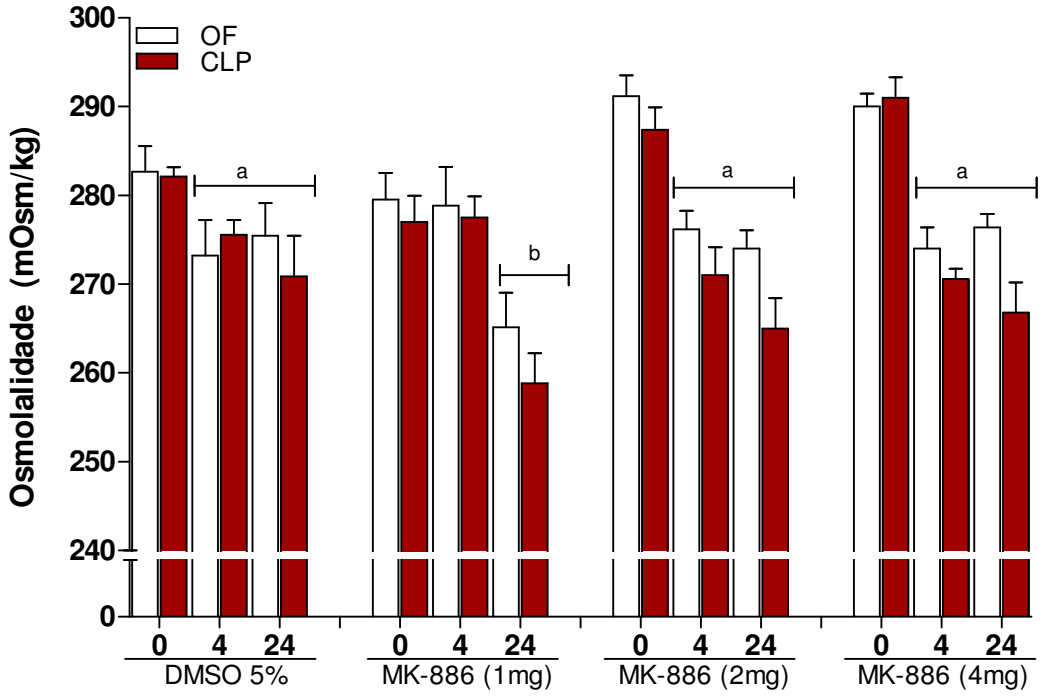

Figura 8. **Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a osmolalidade plasmática.** Valores expressos como média ± EPM. [a]p<0,05 comparado ao tempo 0h; [b]p<0,001 comparado aos tempos 0 e 4hs; n = 5-9.

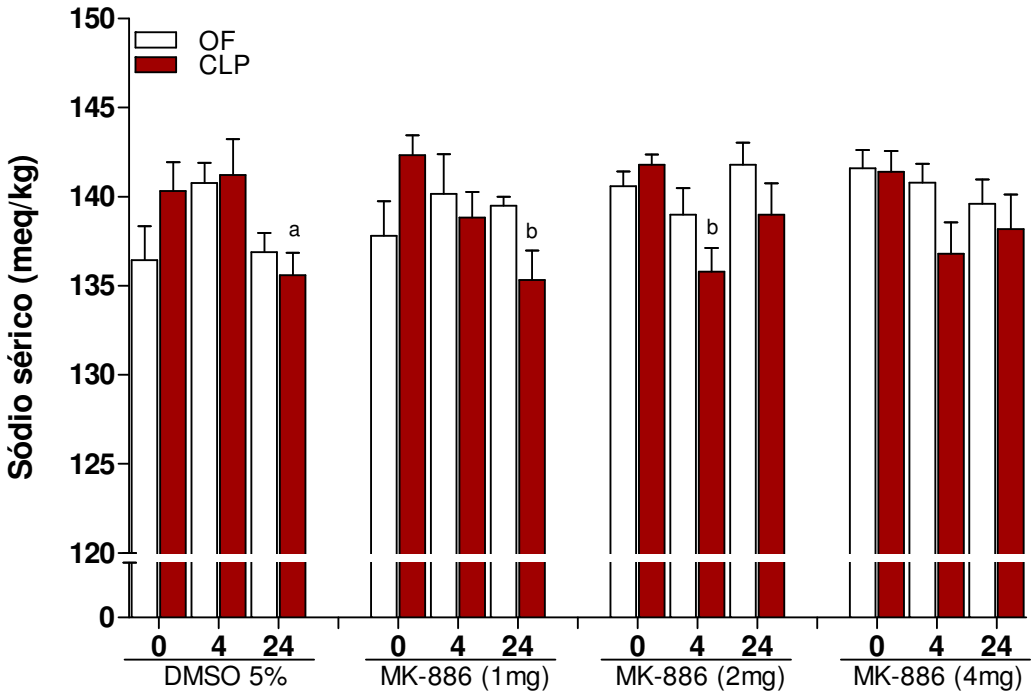

Figura 9. **Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o sódio sérico.** Valores expressos como média ± EPM. [a]p<0,001 comparado aos tempos 0 e 4hs; [b]p<0,05 comparado ao tempo 0h; n = 5-9.

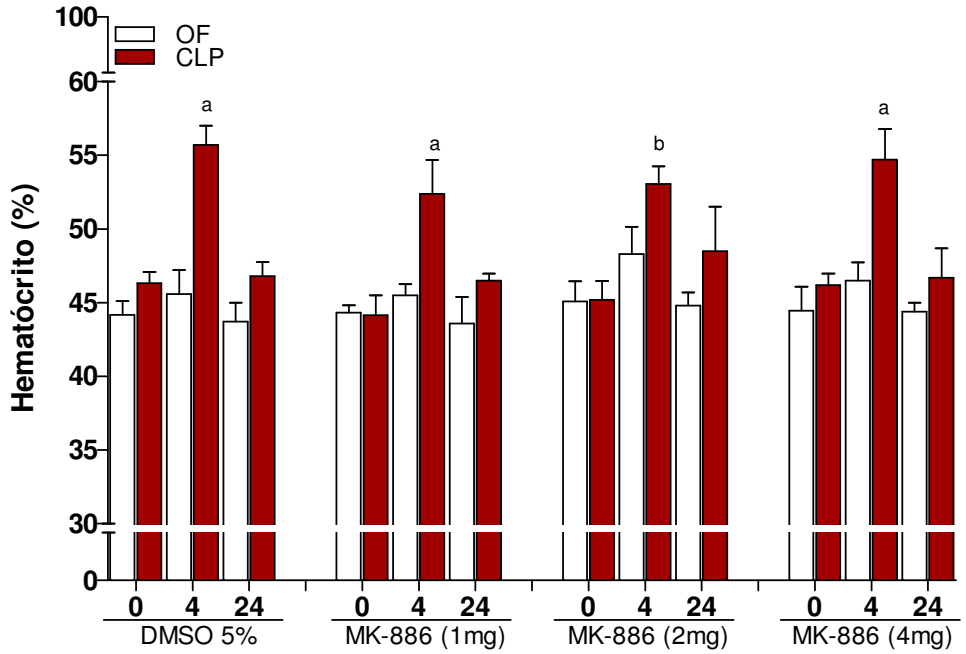

Figura 10. **Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o hematócrito.** Valores expressos como média ± EPM. [a]p<0, 5 comparado aos tempos 0 e 24hs; [b]p<0,001 comparado ao tempo 0h; n = 5-10.

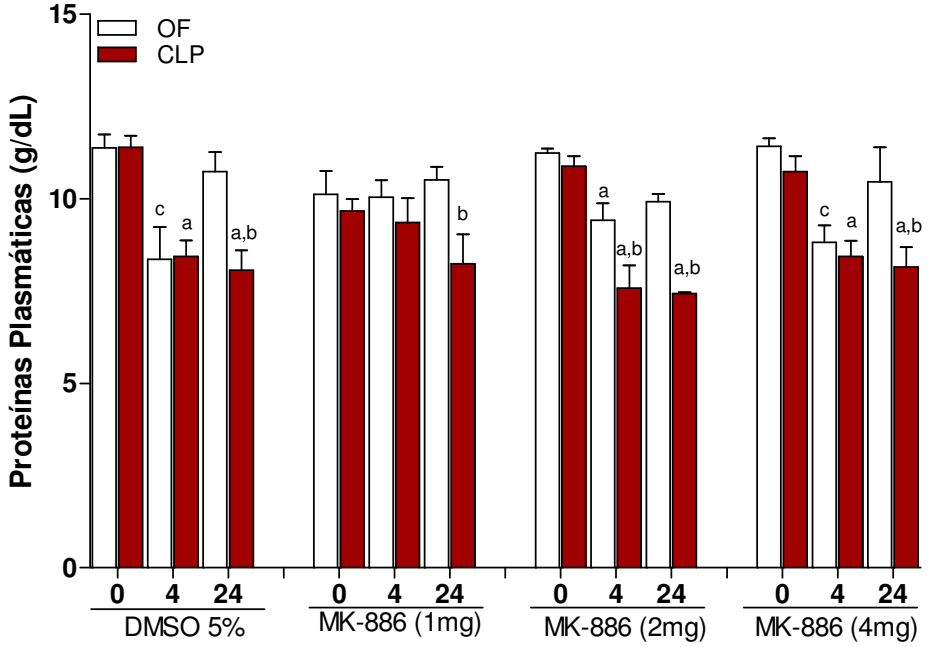

Figura 11. **Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração de proteínas plasmáticas.** Valores expressos como média ± EPM. [a]p<0,05 comparado ao tempo 0h; [b]p<0,05 comparado ao grupo OF; [c]p<0,05 comparado aos tempos 0 e 24hs; n = 5.

4.3. Efeito do MK-886 sobre o nitrato sérico e cis-leucotrienos plasmáticos

A sepse induzida pela cirurgia CLP provocou um aumento progressivo da concentração de nitrato sérico (DMSO 5%+CLP). Entretanto, com a administração de MK-886 nas concentrações 1.0, 2.0 ou 4.0 mg/kg esse aumento foi apenas em 24hs (Figura 12).

Em relação à dosagem de cis-leucotrienos plasmáticos, não observamos nenhuma alteração (Figura 13).

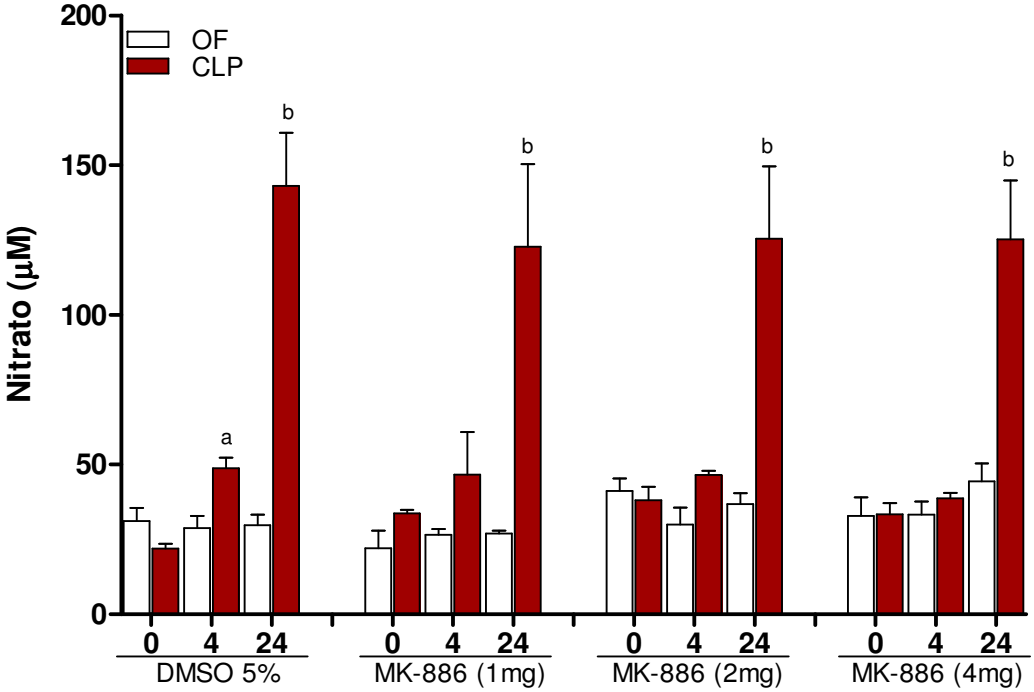

Figura 12. **Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o nitrato sérico.** Valores expressos como média ± EPM. [a]p<0,05 comparado ao tempo 0h; [b]p<0,001 comparado aos tempos 0 e 4hs; n = 6-10.

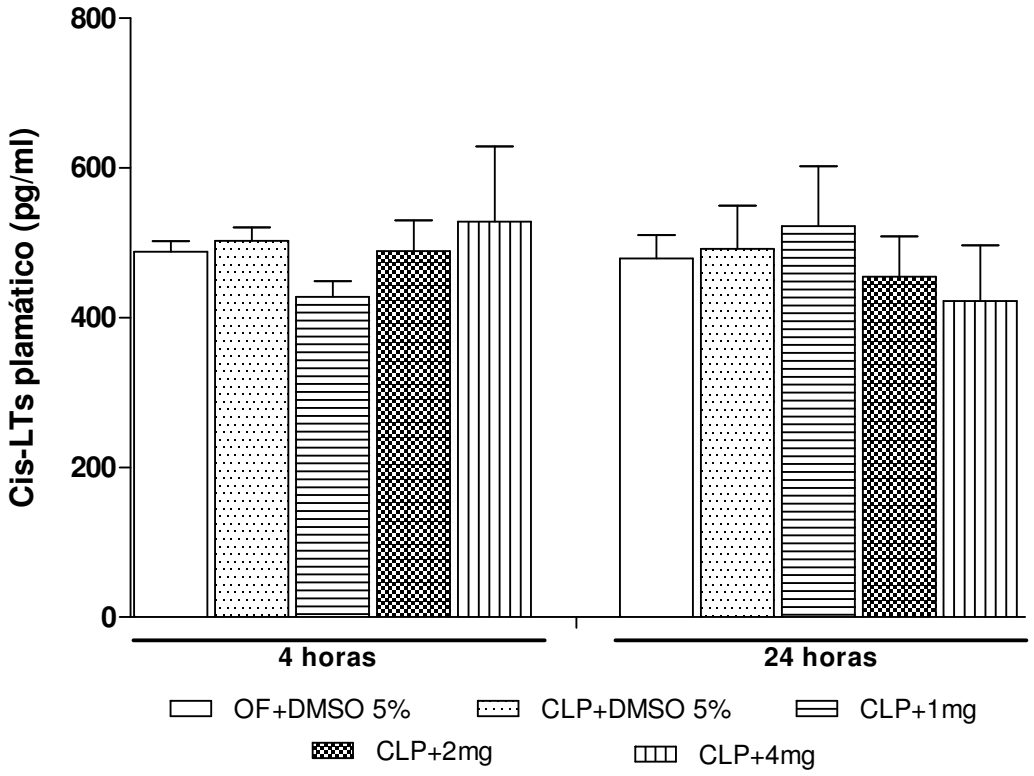

Figura 13. **Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre os níveis de cis-leucotrienos plasmáticos.** Valores expressos como média ± EPM; n = 4.

4.4. Efeito da administração de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina

A vasopressina plasmática apresentou-se aumentada 4 horas após a cirurgia CLP e em concentrações basais após 24 horas. A administração de 1.0 ou 2.0mg/kg de MK-886 reduziu esse aumento no tempo 4 horas e não provocou alteração em 24hs. A injeção de 4.0mg/kg, por sua vez, inibiu a liberação de vasopressina em 4 horas (Figura 14).

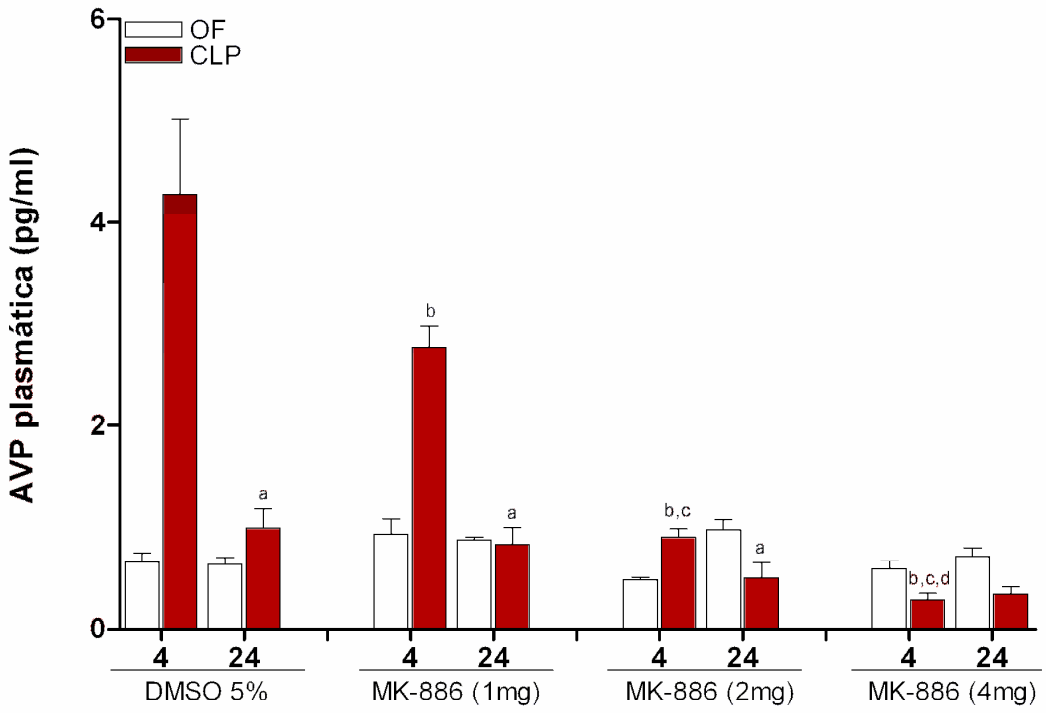

Figura 14. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina. Valores expressos como média ± EPM. [a]p<0,05 comparado ao tempo 4hs; [b]p<0,05 comparado ao grupo DMSO 5%+CLP; [c]p<0,05 comparado ao grupo 1mg+CLP; [d]p<0,05 comparado ao grupo 2mg+CLP em 4hs; n = 6-12.

5. DISCUSSÃO e CONCLUSÃO

No presente estudo, nós verificamos o efeito da administração periférica de MK-886 na taxa de sobrevida, recrutamento de neutrófilos, balanço hidroeletrolítico e na produção de NO, além do seu efeito nas proteínas, cis-LTs e AVP plasmáticos.

Os animais submetidos à cirurgia CLP desenvolveram sintomas típicos de sepse, incluindo piloereção, letargia e diarréia, características estas não apresentadas pelos animais controles (OF). Esses dados concordam com outros relatos da literatura e observações em nosso laboratório (BENJAMIM; FERREIRA; CUNHA, 2000; CORREA et al., 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009).

Além disso, nós observamos uma mortalidade de 80% nos animais que receberam o veículo (DMSO 5%), enquanto os ratos submetidos à operação fictícia mostraram sobrevivência de 100%, comprovando que a manipulação cirúrgica foi conduzida em boas condições de assepsia. O tratamento com MK-886, nas diferentes concentrações, não alterou a taxa de sobrevida desses animais.

Utilizando-se o modelo de choque endotóxico em ratos, também foi possível verificar que o pré-tratamento intraperitonial com MK-886 (1 mg/kg) não alterou a taxa de sobrevida dos animais (AZAB; KAPLANSKI, 2004), enquanto outro estudo, o qual utilizou a droga oralmente, mostrou inclusive uma piora da sobrevida de camundongos submetidos à CLP sub-letal (2 furos com agulha 24G) (RIOS-SANTOS et al., 2003). Por outro lado, em um estudo com camundongos 5-LO^{-}/$^{-}$ ou pré-tratados oralmente com MK-886, observou-se uma maior sobrevivência mesmo em face de uma redução no acúmulo de neutrófilos e um aumento no número de bactérias na cavidade peritoneal dos animais (BENJAMIM et al., 2005). Esses últimos pesquisadores concluíram que a inibição da síntese dos leucotrienos frente a uma resposta sistêmica disseminada é primordial para melhorar a sobrevida dos animais em quadro séptico (BENJAMIM et al., 2005).

No presente estudo, nós também avaliamos o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais após CLP, e não encontramos nenhuma variação com o pré-tratamento com MK-886. Rios-Santos e colaboradores (RIOS-SANTOS et al., 2003) ao usar a mesma droga também não observaram alteração no recrutamento de neutrófilos e na sobrevida de camundongos após CLP letal (14 furos cecais com agulha 21G).

Em relação ao balanço hidroeletrolítico, nós observamos uma redução significativa da osmolalidade e de sódio 4 e 24 horas após a realização da cirurgia CLP. Entretanto, outros investigadores notaram uma diminuição somente na fase tardia da sepse (18 e 24 horas) (ATHAYDE et al., 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009). Nesses mesmos estudos a redução da osmolalidade não foi acompanhada de diminuição dos níveis de sódio sérico, como nós verificamos. Além disso, tanto a administração periférica de MK-886, presente nesse trabalho, quanto à injeção central da droga, vista por Athayde e colaboradores, não alterou esses parâmetros (ATHAYDE et al., 2009).

Em trabalhos anteriores do nosso laboratório observamos um aumento progressivo da ingestão hídrica a partir da quarta hora após CLP e nenhuma alteração na diurese, mostrando que pode ocorrer uma ligeira diluição do fluído corporal, e ocasionar uma redução da osmolalidade e dos níveis de sódio sérico (CORREA et al., 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009).

Nós também observamos um aumento do hematócrito 4 horas após a cirurgia CLP, demonstrando que ocorreu hipovolemia. Esse resultado já foi anteriormente observado em nosso laboratório com o modelo de sepse por CLP com 10 furos (ATHAYDE et al., 2009) e 20 furos cecais (OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009). A injeção periférica de MK-886 nas concentrações 1.0, 2.0 e 4.0mg/kg não

causou nenhuma modificação no hematócrito. Resultado semelhante foi observado em nosso laboratório com a injeção central da droga (ATHAYDE et al., 2009).

A hipovolemia é uma alteração fisiológica freqüentemente presente na fase inicial da sepse e pode ser conseqüência do extravasamento de líquido e proteínas intravasculares para o interstício e cavidade peritoneal. Provavelmente, esse fenômeno ocorre devido ao aumento da permeabilidade vascular ocasionada pela produção de mediadores inflamatórios, como o NO e os LTs (PARRILLO, 1993; ANDREW; DENG; KAUFMAN, 2000; FISHEL; ARE; BARBUL, 2003; BENJAMIM et al., 2005).

Para avaliar o aumento da permeabilidade vascular nós verificamos a concentração de proteínas plasmáticas como um indicador dessa alteração. A sepse induzida por CLP provocou perda de proteínas 4 e 24 horas após a cirurgia, comprovando a presença de extravasamento capilar. Resultados similares foram reportados no modelo de sepse por CLP e no modelo de choque endotóxico por LPS (WANG; EVERED, 1993; CORREA et al., 2007; ATHAYDE et al., 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009). A administração periférica de MK-886 nas diferentes concentrações não afetou essa resposta. Além disso, com a injeção central de MK-886 também não foi possível verificar qualquer alteração na perda de proteínas plasmáticas (ATHAYDE et al., 2009).

Um aumento progressivo de nitrato sérico, o qual é um indicador de formação de NO (KRAFTE-JACOBS et al., 1997) foi observado após a cirurgia CLP. Esse resultado corrobora com os de prévios trabalhos obtidos em nosso laboratório (CORREA et al., 2007; ATHAYDE et al., 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009). O pré-tratamento com o MK-886 em qualquer concentração não causou alteração na produção total de NO, embora aparentemente tenha impedido o aumento

progressivo observado no grupo controle (DMSO 5%). Isso demonstra que a injeção periférica da droga parece não ter efeito inibitório na produção de NO, como foi visto por outro pesquisador de nosso laboratório com a administração central de MK-886 (ATHAYDE et al., 2009). Diferentes estudos também verificaram que o uso de inibidores da síntese de LTs inibe a produção de NO em macrófagos e em células gliais, revelando o papel estimulatório dos LTs sobre a produção desse mediador (WON et al., 2005; SFORCIN JM, 2007). Esses resultados, entretanto, se diferenciam dos nossos, e isso poderia ser explicado pelo uso de diferentes vias de administração da droga e sítio de produção de NO analisado.

Os níveis de cis-leucotrienos plasmáticos também foram determinados no presente trabalho, a fim de verificar se o MK-886 administrado intraperitonealmente inibiria a síntese desses mediadores. A produção de cis-leucotrienos encontrou-se inalterada, tanto nos animais controles (DMSO 5%), quanto nos grupos tratados com MK-886. Durante a fase aguda da sepse, é bem conhecido que as principais células relacionadas com os mecanismos de defesa do hospedeiro são neutrófilos circulantes (CONLAN, 1997; RIOS-SANTOS et al., 2003). Esse leucócito quando ativado secreta como o seu principal produto via padrão 5-LO, o LTB_4, podendo, deste modo, haver alteração sistêmica deste mediador ao invés de cis-leucotrienos (HENDERSON; KLEBANOFF, 1983; FIGUEROA et al., 2003). Para comprovarmos se o MK-886 inibe a produção de LTB_4 plasmático, teríamos que ter dosado esse mediador que deverá, entretanto, ser objeto de próximos estudos.

Nossos resultados demonstraram que o estímulo séptico provocou um aumento significativo na liberação AVP 4 horas após CLP. Esses dados estão de acordo com os obtidos em nosso laboratório em sepse induzida por 10 perfurações cecais (PANCOTO et al., 2008; ATHAYDE et al., 2009).

Nós acreditamos que o aumento da concentração plasmática de AVP possa ser atribuído, em parte, à hipovolemia observada nesse estudo, além da hipotensão presente na sepse. Embora não tenhamos verificado a pressão arterial, resultados anteriores de nosso laboratório e de outros pesquisadores demonstraram de fato, que animais submetidos à CLP apresentaram hipotensão progressiva a partir da terceira hora após a cirurgia (TORRES-DUENAS et al., 2006; PANCOTO et al., 2008; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009).

Quanto ao tratamento com 1.0 ou 2.0mg/kg de MK-886, foi possível observar uma redução nas concentrações plasmáticas de AVP na fase inicial da sepse. Já com a injeção de 4.0mg/kg da droga houve um bloqueio total do aumento da concentração plasmática do hormônio. Entretanto, esse perfil ocorreu sem nenhuma alteração na produção de NO em 4 horas. Sugerimos assim, que a administração periférica de MK-886 apresenta um efeito dose-dependente sobre a secreção de AVP, e esse efeito parece ser independente do NO.

Várias explicações possíveis podem ser oferecidas pelo efeito do MK-886 na liberação de AVP durante a fase inicial da sepse. Uma redução do aumento da concentração plasmática do hormônio, também foi observado em nosso laboratório com a inibição sistêmica da produção de NO por aminoguanidina, um inibidor da NOS induzível (CORREA et al., 2007). Este trabalho permitiu concluir que a diminuição da pressão arterial devido à liberação de NO ou outros mediadores, deve ser, pelo menos em parte responsável pela liberação de AVP na fase inicial da sepse. Similarmente, o fato do MK-886 ter reduzido ou abolido o aumento das concentrações plasmáticas de AVP também poderia ser explicado por um provável restabelecimento da pressão arterial.

Vários trabalhos têm investigado o papel de inibidores e antagonista do receptor de LTs na hipotensão de animais sépticos. Benjamim e colaboradores (BENJAMIM et al., 2005), observaram no modelo de sepse polimicrobiana por CLP, que camundongos tratados oralmente com MK-571, antagonista do receptor 1 dos cis-leucotrienos, exibiram somente hipotensão leve após sepse. Em outro estudo, investigadores demonstraram que o pré-tratamento oral com MK-886 três horas antes da infusão de LPS, inibiu significativamente o declínio da pressão arterial observada em coelhos (CAN et al., 1998). Em nosso laboratório também foi possível verificar uma melhora do quadro hipotensivo durante a fase inicial da sepse, quando os ratos submetidos à cirurgia CLP foram pré-tratados com MK-886 administrado intracerebroventricularmente (i.c.v) (ATHAYDE et al., 2009). Esses dados demonstram que o MK-886 atenua a hipotensão observada no modelo de endotoxemia e no modelo de sepse por CLP. Contudo, não sabemos se em nossos animais o pré-tratamento com MK-886 administrado intraperitonealmente alteraria a pressão arterial, apesar de não termos detectado alterações plasmáticas de cis-LTs.

Outra possível explicação seria uma ação exercida pelos LTB_4. Nossas atenções permaneceram até certo ponto relacionadas apenas com a influência dos cis-LTs na secreção de AVP, visto que a LTC_4 sintase, mas não a LTA_4 hidrolase foi colocalizada com neurônios vasopressinérgicos dos núcleos PVN e SON do hipotálamo (SHIMADA et al., 2005). Entretanto, não podemos descartar a hipótese que o LTB_4 periférico poderia estar influenciando a liberação de AVP. Em um estudo realizado por Xu e colaboradores (XU et al., 2009), o LTB_4 mostrou aumentar a expressão de TNF-α e IL1-β tanto em nível de RNAm quanto de proteína. Além disso, um recente trabalho revelou que o LTB_4 é responsável por aumentar a atividade do NF-Kβ, um fator de transcrição nuclear responsável pela produção de

vários genes de mediadores inflamatórios (SANCHEZ-GALAN et al., 2009). Alguns destes mediadores como PGs, TNF-α, IL1-β e IL-6 tem sido mostrados influenciar a secreção do hormônio (BROOKS; GIBSON, 1992; GATTI; BARTFAI, 1993; LANDGRAF et al., 1995; PALIN et al., 2009). Dessa maneira o LTB_4 poderia indiretamente ser responsável pela liberação de AVP via ativação NF-Kβ, e a sua provável inibição por MK-886 seria responsável pela redução ou bloqueio do hormônio durante a fase inicial da sepse. Em nosso trabalho não sabemos se a droga inibiria a síntese desse mediador, mas acreditamos que seria interessante um estudo que verificasse esta possibilidade.

Finalmente, a administração periférica de MK-886 poderia agir centralmente, visto que o veículo da droga pode ultrapassar a barreira hematoencefálica (IWEN, MILLER, 1987), e ser responsável pela diminuição da liberação de AVP. De fato, estudos prévios mostraram que o MK-886 administrado intraperitonealmente foi responsável por reduzir o aumento da produção de cis-LTs hipotalâmicos induzido por LPS, sugerindo assim que a droga pode atingir o sistema nervoso central (PAUL; FRAIFELD; KAPLANSKI, 1999; AZAB; KAPLANSKI, 2004). Além disso, em nosso laboratório, foi visto que a injeção i.c.v de MK-886 causou um bloqueio no aumento da LTC_4 sintase hipotalâmica 4 horas após CLP. Este bloqueio foi concomitante com a inibição do aumento nas concentrações plasmáticas de AVP que também foi observado no mesmo tempo. Este trabalho sugere, portanto, o papel estimulador dos LTs centrais na liberação de AVP (ATHAYDE et al., 2009).

Apesar da administração intraperitoneal de MK-886, durante a fase inicial da sepse, exibir um efeito modular na liberação de AVP, na fase tardia as concentrações plasmáticas do hormônio permaneceram em condições basais. Este fenômeno também foi observado em estudos clínicos (LANDRY et al., 1997;

SHARSHAR et al., 2003) e em nosso laboratório no modelo de CLP com 10 (ATHAYDE, 2007; PANCOTO et al., 2008) e 20 perfurações cecais (CORREA et al., 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009).

Em nosso laboratório vários estudos foram realizados para esclarecer os motivos pelos quais a concentração de AVP encontra-se em níveis basais na fase tardia da sepse a despeito da hipotensão. As possíveis causas incluem depleção dos estoques de AVP, insuficiência autonômica e a produção excessiva de NO (CORREA et al., 2007; PANCOTO et al., 2008; OLIVEIRA-PELEGRIN et al., 2009). De fato, nós observamos em nosso estudo concentrações altas de NO durante esse período, e a presença do mesmo poderia estar inibindo a liberação de AVP, como previamente sugerido por outros pesquisadores (GIUSTI-PAIVA et al., 2002; GIUSTI-PAIVA; ELIAS; ANTUNES-RODRIGUES, 2005; CORREA et al., 2007).

Em síntese, nossos resultados demonstraram que o modelo de sepse por CLP promoveu um aumento na liberação de AVP na fase inicial da sepse enquanto na fase tardia não houve alteração. O pré-tratamento com MK-886 reduziu as concentrações plasmáticas do hormônio de maneira dose-dependente durante a fase inicial. Considerando que não houve alterações no balanço hidroeletrolítico, proteínas e cis-LTs plasmáticos e nas concentrações de NO após o tratamento com a droga, sugerimos que a administração periférica de MK-886 esta envolvida com a liberação de AVP. Em relação à fase tardia a droga não provocou nenhuma modificação na produção de NO e a presença de altas concentrações do mesmo, poderia estar inibindo a liberação do hormônio.

Conclusão

Nossos resultados sugerem que o MK-886 administrado intraperitonealmente pode afetar a liberação de vasopressina durante a fase inicial da sepse, e esse efeito parece ser independente da produção de óxido nítrico.

REFERÊNCIAS

ABRAMOVITZ, M.; WONG, E.; COX, M. E.; RICHARDSON, C. D.; LI, C.; VICKERS, P. J. 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. **Eur J Biochem**, v.215, n.1, Jul 1, p.105-11. 1993.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v.406, n.6797, Aug 17, p.782-7. 2000.

AKIRA, S. Toll-like receptor signaling. **J Biol Chem**, v.278, n.40, Oct 3, p.38105-8. 2003.

ANDERSON, M. R.; BLUMER, J. L. Prognostic markers in sepsis: the role of leukotrienes. **Crit Care Med**, v.28, n.11, Nov, p.3762-3. 2000.

ANDERSON, W. A.; BRUNI, J. E.; KAUFMANN, A. Afferent connections of the rat's supraoptic nucleus. **Brain Res Bull**, v.24, n.2, Feb, p.191-200. 1990.

ANDREW, P.; DENG, Y.; KAUFMAN, S. Fluid extravasation from spleen reduces blood volume in endotoxemia. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.278, n.1, Jan, p.R60-5. 2000.

ANGUS, D. C.; LINDE-ZWIRBLE, W. T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M. R. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v.29, n.7, Jul, p.1303-10. 2001.

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

ATHAYDE, L. A. **O papel dos leucotrienos na secreção de vasopressina durante sepse experimental**. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. 90 p.

ATHAYDE, L. A.; OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; NOMIZO, A.; FACCIOLI, L. H.; ROCHA, M. J. Blocking central leukotrienes synthesis affects vasopressin release during sepsis. **Neuroscience**, v.160, n.4, Jun 2, p.829-36. 2009.

AZAB, A. N.; KAPLANSKI, J. Involvement of eicosanoids in the hypothermic response to lipopolysaccharide during endotoxemia in rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.70, n.1, Jan, p.67-75. 2004.

BAENKLER, M.; LEYKAUF, M.; JOHN, S. Functional analysis of eicosanoids from white blood cells in sepsis and SIRS. **J Physiol Pharmacol**, v.57 Suppl 12, Dec, p.25-33. 2006.

BARBERIS, C. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. **Journal of Endocrinology**, v.156, 1998, p.223-229. 1998.

BARBERIS, C.; MOUILLAC, B.; DURROUX, T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. **J Endocrinol**, v.156, n.2, Feb, p.223-9. 1998.

BENJAMIM, C. F.; CANETTI, C.; CUNHA, F. Q.; KUNKEL, S. L.; PETERS-GOLDEN, M. Opposing and hierarchical roles of leukotrienes in local innate immune versus vascular responses in a model of sepsis. **J Immunol**, v.174, n.3, Feb 1, p.1616-20. 2005.

BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis**, v.182, n.1, Jul, p.214-23. 2000.

BIRNBAUMER, M. Vasopressin receptors. **Trends Endocrinol Metab**, v.11, n.10, Dec, p.406-10. 2000.

BISGAARD, H.; LOLAND, L.; OJ, J. A. NO in exhaled air of asthmatic children is reduced by the leukotriene receptor antagonist montelukast. **Am J Respir Crit Care Med**, v.160, n.4, Oct, p.1227-31. 1999.

BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, v.115, n.6, Sep 15, p.457-69. 1991.

BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P.; FEIN, A. M.; KNAUS, W. A.; SCHEIN, R. M.; SIBBALD, W. J. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v.101, n.6, Jun, p.1644-55. 1992.

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

BORGEAT, P.; SAMUELSSON, B. Arachidonic acid metabolism in polymorphonuclear leukocytes: unstable intermediate in formation of dihydroxy acids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.76, n.7, Jul, p.3213-7. 1979.

BOVERIS, A.; ALVAREZ, S.; NAVARRO, A. The role of mitochondrial nitric oxide synthase in inflammation and septic shock. **Free Radic Biol Med**, v.33, n.9, Nov 1, p.1186-93. 2002.

BRATTON, D. L.; LANZ, M. J.; MIYAZAWA, N.; WHITE, C. W.; SILKOFF, P. E. Exhaled nitric oxide before and after montelukast sodium therapy in school-age children with chronic asthma: a preliminary study. **Pediatr Pulmonol**, v.28, n.6, Dec, p.402-7. 1999.

BROCK, T. G.; MCNISH, R. W.; PETERS-GOLDEN, M. Translocation and leukotriene synthetic capacity of nuclear 5-lipoxygenase in rat basophilic leukemia cells and alveolar macrophages. **J Biol Chem**, v.270, n.37, Sep 15, p.21652-8. 1995.

BROOKS, A. N.; GIBSON, F. Prostaglandin E2 enhances AVP-stimulated but not CRF-stimulated ACTH secretion from cultured fetal sheep pituitary cells. **J Endocrinol**, v.132, n.1, Jan, p.33-8. 1992.

CAN, C.; CINAR, M. G.; ULKER, S.; EVINC, A.; KOSAY, S. Effects of MK-886, a leukotriene biosynthesis inhibitor, in a rabbit model of endotoxic shock. **Eur J Pharmacol**, v.350, n.2-3, Jun 5, p.223-8. 1998.

CARNIO, E. C.; STABILE, A. M.; BATALHAO, M. E.; SILVA, J. S.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L. G.; MAGDER, S. Vasopressin release during endotoxaemic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Pflugers Arch**, v.450, n.6, Sep, p.390-4. 2005.

CHAUDRY, I. H.; WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. **Surgery**, v.85, n.2, Feb, p.205-11. 1979.

CIANA, P.; FUMAGALLI, M.; TRINCAVELLI, M. L.; VERDERIO, C.; ROSA, P.; LECCA, D.; FERRARIO, S.; PARRAVICINI, C.; CAPRA, V.; GELOSA, P.; GUERRINI, U.; BELCREDITO, S.; CIMINO, M.; SIRONI, L.; TREMOLI, E.; ROVATI, G. E.; MARTINI, C.; ABBRACCHIO, M. P. The orphan receptor GPR17 identified as a new dual uracil nucleotides/cysteinyl-leukotrienes receptor. **EMBO J**, v.25, n.19, Oct 4, p.4615-27. 2006.

CLAESSON, H. E.; HAEGGSTROM, J. Human endothelial cells stimulate leukotriene synthesis and convert granulocyte released leukotriene A4 into leukotrienes B4, C4, D4 and E4. **Eur J Biochem**, v.173, n.1, Apr 5, p.93-100. 1988.

CLARK, J. D.; SCHIEVELLA, A. R.; NALEFSKI, E. A.; LIN, L. L. Cytosolic phospholipase A2. **J Lipid Mediat Cell Signal**, v.12, n.2-3, Oct, p.83-117. 1995.

COELHO, C. H. Análise da inibição da Óxido Nítrico Sintase neuronal (nNOS) na liberação de vasopressina durante sepse experimental (Dissertação de mestrado). Ribeirão Preto: Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia, Universidade de São Paulo
2009.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.885-91. 2002.

CONLAN, J. W. Critical roles of neutrophils in host defense against experimental systemic infections of mice by Listeria monocytogenes, Salmonella typhimurium, and Yersinia enterocolitica. **Infect Immun**, v.65, n.2, Feb, p.630-5. 1997.

CORREA, P. B.; PANCOTO, J. A.; DE OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; CARNIO, E. C.; ROCHA, M. J. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, v.183, n.1-2, Feb, p.17-25. 2007.

CUNNINGHAM, F. M.; SHIPLEY, M. E.; SMITH, M. J. Aggregation of rat polymorphonuclear leucocytes in vitro. **J Pharm Pharmacol**, v.32, n.5, May, p.377-80. 1980.

DAHLEN, S. E.; BJORK, J.; HEDQVIST, P.; ARFORS, K. E.; HAMMARSTROM, S.; LINDGREN, J. A.; SAMUELSSON, B. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.78, n.6, Jun, p.3887-91. 1981.

DAHLEN, S. E.; HEDQVIST, P.; HAMMARSTROM, S.; SAMUELSSON, B. Leukotrienes are potent constrictors of human bronchi. **Nature**, v.288, n.5790, Dec 4, p.484-6. 1980.

DELLINGER, R. P.; LEVY, M. M.; CARLET, J. M.; BION, J.; PARKER, M. M.; JAESCHKE, R.; REINHART, K.; ANGUS, D. C.; BRUN-BUISSON, C.; BEALE, R.; CALANDRA, T.; DHAINAUT, J. F.; GERLACH, H.; HARVEY, M.; MARINI, J. J.; MARSHALL, J.; RANIERI, M.; RAMSAY, G.; SEVRANSKY, J.; THOMPSON, B. T.; TOWNSEND, S.; VENDER, J. S.; ZIMMERMAN, J. L.; VINCENT, J. L. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Crit Care Med**, v.36, n.1, Jan, p.296-327. 2008.

DENNIS, E. A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. **J Biol Chem**, v.269, n.18, May 6, p.13057-60. 1994.

DI GENNARO, A.; CARNINI, C.; BUCCELLATI, C.; BALLERIO, R.; ZARINI, S.; FUMAGALLI, F.; VIAPPIANI, S.; LIBRIZZI, L.; HERNANDEZ, A.; MURPHY, R. C.; CONSTANTIN, G.; DE CURTIS, M.; FOLCO, G.; SALA, A. Cysteinyl-leukotrienes receptor activation in brain inflammatory reactions and cerebral edema formation: a role for transcellular biosynthesis of cysteinyl-leukotrienes. **FASEB J**, v.18, n.7, May, p.842-4. 2004.

DOMBROVSKIY, V. Y.; MARTIN, A. A.; SUNDERRAM, J.; PAZ, H. L. Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003. **Crit Care Med**, v.35, n.5, May, p.1244-50. 2007.

EBONG, S. J.; CALL, D. R.; BOLGOS, G.; NEWCOMB, D. E.; GRANGER, J. I.; O'REILLY, M.; REMICK, D. G. Immunopathologic responses to non-lethal sepsis. **Shock**, v.12, n.2, Aug, p.118-26. 1999.

ECHTENACHER, B.; FREUDENBERG, M. A.; JACK, R. S.; MANNEL, D. N. Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. **Infect Immun**, v.69, n.12, Dec, p.7271-6. 2001.

ENGBLOM, D.; EK, M.; SAHA, S.; ERICSSON-DAHLSTRAND, A.; JAKOBSSON, P. J.; BLOMQVIST, A. Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. **J Mol Med**, v.80, n.1, Jan, p.5-15. 2002.

ERLENBACH, I.; WESS, J. Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity. **J Biol Chem**, v.273, n.41, Oct 9, p.26549-58. 1998.

FARIAS, S. E.; ZARINI, S.; PRECHT, T.; MURPHY, R. C.; HEIDENREICH, K. A. Transcellular biosynthesis of cysteinyl leukotrienes in rat neuronal and glial cells. **J Neurochem**, v.103, n.4, Nov, p.1310-8. 2007.

FEINMARK, S. J.; CANNON, P. J. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. **J Biol Chem**, v.261, n.35, Dec 15, p.16466-72. 1986.

FIGUEROA, D. J.; BORISH, L.; BARAMKI, D.; PHILIP, G.; AUSTIN, C. P.; EVANS, J. F. Expression of cysteinyl leukotriene synthetic and signalling proteins in inflammatory cells in active seasonal allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy**, v.33, n.10, Oct, p.1380-8. 2003.

FISHEL, R. S.; ARE, C.; BARBUL, A. Vessel injury and capillary leak. **Crit Care Med**, v.31, n.8 Suppl, Aug, p.S502-11. 2003.

FITZPATRICK, F.; LIGGETT, W.; MCGEE, J.; BUNTING, S.; MORTON, D.; SAMUELSSON, B. Metabolism of leukotriene A4 by human erythrocytes. A novel cellular source of leukotriene B4. **J Biol Chem**, v.259, n.18, Sep 25, p.11403-7. 1984.

FLAMAND, N.; MANCUSO, P.; SEREZANI, C. H.; BROCK, T. G. Leukotrienes: mediators that have been typecast as villains. **Cell Mol Life Sci**, v.64, n.19-20, Oct, p.2657-70. 2007.

FORD-HUTCHINSON, A. W.; BRAY, M. A.; DOIG, M. V.; SHIPLEY, M. E.; SMITH, M. J. Leukotriene B, a potent chemokinetic and aggregating substance released from polymorphonuclear leukocytes. **Nature**, v.286, n.5770, Jul 17, p.264-5. 1980.

FREISE, H.; BRUCKNER, U. B.; SPIEGEL, H. U. Animal models of sepsis. **J Invest Surg**, v.14, n.4, Jul-Aug, p.195-212. 2001.

GARRIDO, A. G., FIGUEIREDO, LUIZ FRANCISCO POLI DE, ROCHA E SILVA, MAURÍCIO. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.2, p.82-88. 2004.

GATTI, S.; BARTFAI, T. Induction of tumor necrosis factor-alpha mRNA in the brain after peripheral endotoxin treatment: comparison with interleukin-1 family and interleukin-6. **Brain Res**, v.624, n.1-2, Oct 8, p.291-4. 1993.

GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. **FEBS Lett**, v.418, n.3, Dec 1, p.291-6. 1997.

GIMBRONE, M. A., JR.; BROCK, A. F.; SCHAFER, A. I. Leukotriene B4 stimulates polymorphonuclear leukocyte adhesion to cultured vascular endothelial cells. **J Clin Invest**, v.74, n.4, Oct, p.1552-5. 1984.

GIULIVI, C.; PODEROSO, J. J.; BOVERIS, A. Production of nitric oxide by mitochondria. **J Biol Chem**, v.273, n.18, May 1, p.11038-43. 1998.

GIUSTI-PAIVA, A.; BRANCO, L. G.; DE CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CARNIO, E. C. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflugers Arch**, v.447, n.2, Nov, p.175-80. 2003.

GIUSTI-PAIVA, A.; DE CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CARNIO, E. C. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med**, v.30, n.6, Jun, p.1306-10. 2002.

GIUSTI-PAIVA, A.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Inhibitory effect of gaseous neuromodulators in vasopressin and oxytocin release induced by endotoxin in rats. **Neurosci Lett**, v.381, n.3, Jun 24, p.320-4. 2005.

GIUSTI-PAIVA, A.; RUGINSK, S. G.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L. L.; CARNIO, E. C.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. **Neurosci Lett**, v.346, n.1-2, Jul 31, p.21-4. 2003.

GLAUSER, M. P.; ZANETTI, G.; BAUMGARTNER, J. D.; COHEN, J. Septic shock: pathogenesis. **Lancet**, v.338, n.8769, Sep 21, p.732-6. 1991.
GOULET, J. L.; BYRUM, R. S.; KEY, M. L.; NGUYEN, M.; WAGONER, V. A.; KOLLER, B. H. Genetic factors determine the contribution of leukotrienes to acute inflammatory responses. **J Immunol**, v.164, n.9, May 1, p.4899-907. 2000.

HAEGGSTROM, J. Z. Structure, function, and regulation of leukotriene A4 hydrolase. **Am J Respir Crit Care Med**, v.161, n.2 Pt 2, Feb, p.S25-31. 2000.

HANNA, N. F. Sepsis and Septic Shock. **The Emerg Med**, v.25, n.2, April, 29, p.158-165. 2003.

HEISE, C. E.; O'DOWD, B. F.; FIGUEROA, D. J.; SAWYER, N.; NGUYEN, T.; IM, D. S.; STOCCO, R.; BELLEFEUILLE, J. N.; ABRAMOVITZ, M.; CHENG, R.; WILLIAMS, D. L., JR.; ZENG, Z.; LIU, Q.; MA, L.; CLEMENTS, M. K.; COULOMBE, N.; LIU, Y.; AUSTIN, C. P.; GEORGE, S. R.; O'NEILL, G. P.; METTERS, K. M.; LYNCH, K. R.; EVANS, J. F. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. **J Biol Chem**, v.275, n.39, Sep 29, p.30531-6. 2000.

HENDERSON, L. A.; KEAY, K. A.; BANDLER, R. The ventrolateral periaqueductal gray projects to caudal brainstem depressor regions: a functional-anatomical and physiological study. **Neuroscience**, v.82, n.1, Jan, p.201-21. 1998.

HENDERSON, W. R., JR. Eicosanoids and platelet-activating factor in allergic respiratory diseases. **Am Rev Respir Dis**, v.143, n.5 Pt 2, May, p.S86-90. 1991.

HENDERSON, W. R., JR. The role of leukotrienes in inflammation. **Ann Intern Med**, v.121, n.9, Nov 1, p.684-97. 1994.

HENDERSON, W. R.; KLEBANOFF, S. J. Leukotriene production and inactivation by normal, chronic granulomatous disease and myeloperoxidase-deficient neutrophils. **J Biol Chem**, v.258, n.22, Nov 25, p.13522-7. 1983.

HERON, M.; HOYERT, D. L.; MURPHY, S. L.; XU, J.; KOCHANEK, K. D.; TEJADA-VERA, B. Deaths: final data for 2006. **Natl Vital Stat Rep**, v.57, n.14, Apr 17, p.1-134. 2009.

HIRABAYASHI, T.; SHIMIZU, T. Localization and regulation of cytosolic phospholipase A(2). **Biochim Biophys Acta**, v.1488, n.1-2, Oct 31, p.124-38. 2000.

HOLMES, C. L.; LANDRY, D. W.; GRANTON, J. T. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. **Crit Care**, v.7, n.6, Dec, p.427-34. 2003.

HOLMES, C. L.; PATEL, B. M.; RUSSELL, J. A.; WALLEY, K. R. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. **Chest**, v.120, n.3, Sep, p.989-1002. 2001.

HUBBARD, W. J.; CHOUDHRY, M.; SCHWACHA, M. G.; KERBY, J. D.; RUE, L. W., 3RD; BLAND, K. I.; CHAUDRY, I. H. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v.24 Suppl 1, Dec, p.52-7. 2005.

HUI, Y.; FUNK, C. D. Cysteinyl leukotriene receptors. **Biochem Pharmacol**, v.64, n.11, Dec 1, p.1549-57. 2002.

HULTING, A. L.; LINDGREN, J. A.; HOKFELT, T.; ENEROTH, P.; WERNER, S.; PATRONO, C.; SAMUELSSON, B. Leukotriene C4 as a mediator of luteinizing hormone release from rat anterior pituitary cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.82, n.11, Jun, p.3834-8. 1985.

INNAMORATI, G.; SADEGHI, H.; BIRNBAUMER, M. A fully active nonglycosylated V2 vasopressin receptor. **Mol Pharmacol**, v.50, n.3, Sep, p.467-73. 1996.

KAMOHARA, M.; TAKASAKI, J.; MATSUMOTO, M.; MATSUMOTO, S.; SAITO, T.; SOGA, T.; MATSUSHIME, H.; FURUICHI, K. Functional characterization of cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor on human coronary artery smooth muscle cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.287, n.5, Oct 12, p.1088-92. 2001.

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

KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J**, v.298 (Pt 2), Mar 1, p.249-58. 1994.

KOVACS, K. J. Neurohypophyseal hormones in the integration of physiological responses to immune challenges. **Prog Brain Res**, v.139, p.127-46. 2002.

KOVACS, L.; ROBERTSON, G. L. Syndrome of inappropriate antidiuresis. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v.21, n.4, Dec, p.859-75. 1992.

KRAFTE-JACOBS, B.; BRILLI, R.; SZABO, C.; DENENBERG, A.; MOORE, L.; SALZMAN, A. L. Circulating methemoglobin and nitrite/nitrate concentrations as indicators of nitric oxide overproduction in critically ill children with septic shock. **Crit Care Med**, v.25, n.9, Sep, p.1588-93. 1997.

KUMAR, A.; WOOD, K.; PARRILLO, J. E. Circulating substances and energy metabolism in septic shock. **Crit Care Med**, v.31, n.2, Feb, p.632-3. 2003.

LAM, B. K. Leukotriene C(4) synthase. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v.69, n.2-3, Aug-Sep, p.111-6. 2003.

LAM, B. K.; PENROSE, J. F.; FREEMAN, G. J.; AUSTEN, K. F. Expression cloning of a cDNA for human leukotriene C4 synthase, an integral membrane protein conjugating reduced glutathione to leukotriene A4. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.91, n.16, Aug 2, p.7663-7. 1994.

LAMMERS, C. H.; SCHWEITZER, P.; FACCHINETTI, P.; ARRANG, J. M.; MADAMBA, S. G.; SIGGINS, G. R.; PIOMELLI, D. Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling. **J Neurochem**, v.66, n.1, Jan, p.147-52. 1996.

LANDGRAF, R.; NEUMANN, I.; HOLSBOER, F.; PITTMAN, Q. J. Interleukin-1 beta stimulates both central and peripheral release of vasopressin and oxytocin in the rat. **Eur J Neurosci**, v.7, n.4, Apr 1, p.592-8. 1995.

LANDRY, D. W.; LEVIN, H. R.; GALLANT, E. M.; ASHTON, R. C., JR.; SEO, S.; D'ALESSANDRO, D.; OZ, M. C.; OLIVER, J. A. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. **Circulation**, v.95, n.5, Mar 4, p.1122-5. 1997.

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

LECCA, D.; TRINCAVELLI, M. L.; GELOSA, P.; SIRONI, L.; CIANA, P.; FUMAGALLI, M.; VILLA, G.; VERDERIO, C.; GRUMELLI, C.; GUERRINI, U.; TREMOLI, E.; ROSA, P.; CUBONI, S.; MARTINI, C.; BUFFO, A.; CIMINO, M.; ABBRACCHIO, M. P. The recently identified P2Y-like receptor GPR17 is a sensor of brain damage and a new target for brain repair. **PLoS One**, v.3, n.10, p.e3579. 2008.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E.; ANGUS, D.; COOK, D.; COHEN, J.; OPAL, S. M.; VINCENT, J. L.; RAMSAY, G. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, v.31, n.4, Apr, p.1250-6. 2003.

LINDGREN, J. A.; HULTING, A. L.; HOKFELT, T.; DAHLEN, S. E.; ENEROTH, P.; WERNER, S.; PATRONO, C.; SAMUELSSON, B. Evidence for leukotriene formation and a neuroendocrine role for leukotriene C4 in rat brain. **Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res**, v.15, p.561-4. 1985.

LIU, J. P.; ENGLER, D.; FUNDER, J. W.; ROBINSON, P. J. Arginine vasopressin (AVP) causes the reversible phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein in the ovine anterior pituitary: evidence that MARCKS phosphorylation is associated with adrenocorticotropin (ACTH) secretion. **Mol Cell Endocrinol**, v.105, n.2, Nov, p.217-26. 1994.

LYNCH, K. R., G. P. O'NEILL, *ET AL.* Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. **Nature**, v.399, n.6738, Jun 24, p.789-93. 1999.

MACLOUF, J. A.; MURPHY, R. C. Transcellular metabolism of neutrophil-derived leukotriene A4 by human platelets. A potential cellular source of leukotriene C4. **J Biol Chem**, v.263, n.1, Jan 5, p.174-81. 1988.

MANCINI, J. A.; ABRAMOVITZ, M.; COX, M. E.; WONG, E.; CHARLESON, S.; PERRIER, H.; WANG, Z.; PRASIT, P.; VICKERS, P. J. 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. **FEBS Lett**, v.318, n.3, Mar 8, p.277-81. 1993.

MARSHALL, L. A.; HALL, R. H.; WINKLER, J. D.; BADGER, A.; BOLOGNESE, B.; ROSHAK, A.; FLAMBERG, P. L.; SUNG, C. M.; CHABOT-FLETCHER, M.; ADAMS, J. L.; ET AL. SB 203347, an inhibitor of 14 kDa phospholipase A2, alters human neutrophil arachidonic acid release and metabolism and prolongs survival in murine endotoxin shock. **J Pharmacol Exp Ther**, v.274, n.3, Sep, p.1254-62. 1995.

MARTIN, V.; SAWYER, N.; STOCCO, R.; UNETT, D.; LERNER, M. R.; ABRAMOVITZ, M.; FUNK, C. D. Molecular cloning and functional characterization of murine cysteinyl-leukotriene 1 (CysLT(1)) receptors. **Biochem Pharmacol**, v.62, n.9, Nov 1, p.1193-200. 2001.

MARTINEAU, L.; SHEK, P. N. Peritoneal cytokine concentrations and survival outcome in an experimental bacterial infusion model of peritonitis. **Crit Care Med**, v.28, n.3, Mar, p.788-94. 2000.

MAYBAUER, M. O.; MAYBAUER, D. M.; ENKHBAATAR, P.; TRABER, D. L. Physiology of the vasopressin receptors. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, v.22, n.2, Jun, p.253-63. 2008.

MCCANN, S. M.; KIMURA, M.; KARANTH, S.; YU, W. H.; MASTRONARDI, C. A.; RETTORI, V. The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. **Ann N Y Acad Sci**, v.917, p.4-18. 2000.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v.91, n.3, Oct 31, p.295-8. 1997.

MIYAMOTO, T.; LINDGREN, J. A.; HOKFELT, T.; SAMUELSSON, B. Regional distribution of leukotriene and mono-hydroxyeicosatetraenoic acid production in the rat brain. Highest leukotriene C4 formation in the hypothalamus. **FEBS Lett**, v.216, n.1, May 25, p.123-7. 1987.

MORLION, B. J.; TORWESTEN, E.; KUHN, K. S.; PUCHSTEIN, C.; FURST, P. Cysteinyl-leukotriene generation as a biomarker for survival in the critically ill. **Crit Care Med**, v.28, n.11, Nov, p.3655-8. 2000.

MUENZER, J. T.; DAVIS, C. G.; DUNNE, B. S.; UNSINGER, J.; DUNNE, W. M.; HOTCHKISS, R. S. Pneumonia after cecal ligation and puncture: a clinically relevant "two-hit" model of sepsis. **Shock**, v.26, n.6, Dec, p.565-70. 2006.

MURPHY, R. C.; GIJON, M. A. Biosynthesis and metabolism of leukotrienes. **Biochem J**, v.405, n.3, Aug 1, p.379-95. 2007.

MURPHY, R. C.; HAMMARSTROM, S.; SAMUELSSON, B. Leukotriene C: a slow-reacting substance from murine mastocytoma cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.76, n.9, Sep, p.4275-9. 1979.

NEMZEK, J. A.; XIAO, H. Y.; MINARD, A. E.; BOLGOS, G. L.; REMICK, D. G. Humane endpoints in shock research. **Shock**, v.21, n.1, Jan, p.17-25. 2004.

NIKNAMI, M.; PATEL, M.; WITTING, P. K.; DONG, Q. Molecules in focus: cytosolic phospholipase A2-alpha. **Int J Biochem Cell Biol**, v.41, n.5, May, p.994-7. 2009.

NOTHACKER, H. P.; WANG, Z.; ZHU, Y.; REINSCHEID, R. K.; LIN, S. H.; CIVELLI, O. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. **Mol Pharmacol**, v.58, n.6, Dec, p.1601-8. 2000.
OFFER, S.; SHOSEYOV, D.; BIBI, H.; ELIRAZ, A.; MADAR, Z. A leukotriene receptor antagonist modulates iNOS in the lung and in a leukotriene-free cell model. **Nitric Oxide**, v.9, n.1, Aug, p.10-7. 2003.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; RAVANELLI, M. I.; BRANCO, L. G.; ROCHA, M. J. Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis. **Neuroimmunomodulation**, v.16, n.1, Jan, p.45-53. 2009.

OTA, M., J. T. CROFTON, *ET AL.* . Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release. **Neuroendocrinology**, v.57, n.5, May, p.955-9. 1993.

PALIN, K.; MOREAU, M. L.; SAUVANT, J.; ORCEL, H.; NADJAR, A.; DUVOID-GUILLOU, A.; DUDIT, J.; RABIE, A.; MOOS, F. Interleukin-6 activates arginine vasopressin neurons in the supraoptic nucleus during immune challenge in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v.296, n.6, Jun, p.E1289-99. 2009.

PALMER, R. M.; ASHTON, D. S.; MONCADA, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. **Nature**, v.333, n.6174, Jun 16, p.664-6. 1988.

PALMER, R. M.; FERRIGE, A. G.; MONCADA, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. **Nature**, v.327, n.6122, Jun 11-17, p.524-6. 1987.

PANCOTO, J. A.; CORREA, P. B.; OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; ROCHA, M. J. Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture. **Auton Neurosci**, v.138, n.1-2, Feb 29, p.57-63. 2008.

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

PAUL, L.; FRAIFELD, V.; KAPLANSKI, J. Evidence supporting involvement of leukotrienes in LPS-induced hypothermia in mice. **Am J Physiol**, v.276, n.1 Pt 2, Jan, p.R52-8. 1999.

PENROSE, J. F.; GAGNON, L.; GOPPELT-STRUEBE, M.; MYERS, P.; LAM, B. K.; JACK, R. M.; AUSTEN, K. F.; SOBERMAN, R. J. Purification of human leukotriene C4 synthase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.89, n.23, Dec 1, p.11603-6. 1992.

PETERS-GOLDEN, M.; BROCK, T. G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. **FEBS Lett**, v.487, n.3, Jan 5, p.323-6. 2001.

PETERS-GOLDEN, M.; GLEASON, M. M.; TOGIAS, A. Cysteinyl leukotrienes: multi-functional mediators in allergic rhinitis. **Clin Exp Allergy**, v.36, n.6, Jun, p.689-703. 2006.

POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F.; GARRIDO, A. G.; NAKAGAWA, N.; SANNOMIYA, P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. **Shock**, v.30 Suppl 1, Oct, p.53-9. 2008.

POLTORAK, A.; HE, X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M. Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science**, v.282, n.5396, Dec 11, p.2085-8. 1998.

READ, R. C.; WYLLIE, D. H. Toll receptors and sepsis. **Curr Opin Crit Care**, v.7, n.5, Oct, p.371-5. 2001.

REID, I. A. Role of nitric oxide in the regulation of renin and vasopressin secretion. **Front Neuroendocrinol**, v.15, n.4, Dec, p.351-83. 1994.

REMICK, D. G.; NEWCOMB, D. E.; BOLGOS, G. L.; CALL, D. R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. **Shock**, v.13, n.2, Feb, p.110-6. 2000.

RIOS-SANTOS, F.; BENJAMIM, C. F.; ZAVERY, D.; FERREIRA, S. H.; CUNHA FDE, Q. A critical role of leukotriene B4 in neutrophil migration to infectious focus in cecal ligaton and puncture sepsis. **Shock**, v.19, n.1, Jan, p.61-5. 2003.

ROUZER, C. A.; KARGMAN, S. Translocation of 5-lipoxygenase to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. **J Biol Chem**, v.263, n.22, Aug 5, p.10980-8. 1988.

ROUZER, C. A.; MATSUMOTO, T.; SAMUELSSON, B. Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.83, n.4, Feb, p.857-61. 1986.

SAMUELSSON, B.; BORGEAT, P.; HAMMARSTROM, S.; MURPHY, R. C. Introduction of a nomenclature: leukotrienes. **Prostaglandins**, v.17, n.6, Jun, p.785-7. 1979.

SANCHEZ-GALAN, E.; GOMEZ-HERNANDEZ, A.; VIDAL, C.; MARTIN-VENTURA, J. L.; BLANCO-COLIO, L. M.; MUNOZ-GARCIA, B.; ORTEGA, L.; EGIDO, J.;

TUNON, J. Leukotriene B4 enhances the activity of nuclear factor-kappaB pathway through BLT1 and BLT2 receptors in atherosclerosis. **Cardiovasc Res**, v.81, n.1, Jan 1, p.216-25. 2009.

SANDRINI, A.; FERREIRA, I. M.; GUTIERREZ, C.; JARDIM, J. R.; ZAMEL, N.; CHAPMAN, K. R. Effect of montelukast on exhaled nitric oxide and nonvolatile markers of inflammation in mild asthma. **Chest**, v.124, n.4, Oct, p.1334-40. 2003.

SANDS, K. E.; BATES, D. W.; LANKEN, P. N.; GRAMAN, P. S.; HIBBERD, P. L.; KAHN, K. L.; PARSONNET, J.; PANZER, R.; ORAV, E. J.; SNYDMAN, D. R.; BLACK, E.; SCHWARTZ, J. S.; MOORE, R.; JOHNSON, B. L., JR.; PLATT, R. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. **Jama**, v.278, n.3, Jul 16, p.234-40. 1997.

SARAU, H. M.; AMES, R. S.; CHAMBERS, J.; ELLIS, C.; ELSHOURBAGY, N.; FOLEY, J. J.; SCHMIDT, D. B.; MUCCITELLI, R. M.; JENKINS, O.; MURDOCK, P. R.; HERRITY, N. C.; HALSEY, W.; SATHE, G.; MUIR, A. I.; NUTHULAGANTI, P.; DYTKO, G. M.; BUCKLEY, P. T.; WILSON, S.; BERGSMA, D. J.; HAY, D. W. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. **Mol Pharmacol**, v.56, n.3, Sep, p.657-63. 1999.

SCHRIER, R. W.; BERL, T.; ANDERSON, R. J. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. **Am J Physiol**, v.236, n.4, Apr, p.F321-32. 1979.

SFORCIN JM, N. G., MISSIMA F, SÁ-NUNES A, FACCIOLI LH. Effect of a leukotriene inhibitor (MK886) on nitric oxide and hydrogen peroxide production by macrophages of acutely and chronically stressed mice. **J Pharm Pharmacol.** , v.59, n.9, Sep, p.1249-54. 2007.

SHARSHAR, T.; BLANCHARD, A.; PAILLARD, M.; RAPHAEL, J. C.; GAJDOS, P.; ANNANE, D. Circulating vasopressin levels in septic shock. **Crit Care Med**, v.31, n.6, Jun, p.1752-8. 2003.

SHARSHAR, T.; CARLIER, R.; BLANCHARD, A.; FEYDY, A.; GRAY, F.; PAILLARD, M.; RAPHAEL, J. C.; GAJDOS, P.; ANNANE, D. Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. **Crit Care Med**, v.30, n.3, Mar, p.497-500. 2002.

SHIMADA, A.; SATOH, M.; CHIBA, Y.; SAITOH, Y.; KAWAMURA, N.; KEINO, H.; HOSOKAWA, M.; SHIMIZU, T. Highly selective localization of leukotriene C4 synthase in hypothalamic and extrahypothalamic vasopressin systems of mouse brain. **Neuroscience**, v.131, n.3, p.683-9. 2005.

SILVA, E. **Sepse: Manual**. São Paulo: Atheneu. 2006

SILVA, E.; PEDRO MDE, A.; SOGAYAR, A. C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C. L.; JANISZEWSKI, M.; CAL, R. G.; DE SOUSA, E. F.; ABE, T. P.; DE ANDRADE, J.; DE MATOS, J. D.; REZENDE, E.; ASSUNCAO, M.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C.; DE MATOS, G. F.; BENTO, A. M.; CORREA, A. D.; VIEIRA, P. C.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, v.8, n.4, Aug, p.R251-60. 2004.

SKLAR, A. H.; SCHRIER, R. W. Central nervous system mediators of vasopressin release. **Physiol Rev**, v.63, n.4, Oct, p.1243-80. 1983.

SMEDEGARD, G.; HEDQVIST, P.; DAHLEN, S. E.; REVENAS, B.; HAMMARSTROM, S.; SAMUELSSON, B. Leukotriene C4 affects pulmonary and cardiovascular dynamics in monkey. **Nature**, v.295, n.5847, Jan 28, p.327-9. 1982.

SOGAYAR, A. M.; MACHADO, F. R.; REA-NETO, A.; DORNAS, A.; GRION, C. M.; LOBO, S. M.; TURA, B. R.; SILVA, C. L.; CAL, R. G.; BEER, I.; MICHELS, V.; SAFI, J.; KAYATH, M.; SILVA, E. A multicentre, prospective study to evaluate costs of septic patients in Brazilian intensive care units. **Pharmacoeconomics**, v.26, n.5, p.425-34. 2008.

SPRAGUE, R. S.; STEPHENSON, A. H.; DAHMS, T. E.; LONIGRO, A. J. Proposed role for leukotrienes in the pathophysiology of multiple systems organ failure. **Crit Care Clin**, v.5, n.2, Apr, p.315-29. 1989.

SPRINGER, J. E.; ROBBINS, E.; MEYER, S.; BALDINO, F., JR.; LEWIS, M. E. Localization of nerve growth factor receptor mRNA in the rat basal forebrain with in situ hybridization histochemistry. **Cell Mol Neurobiol**, v.10, n.1, Mar, p.33-9. 1990.

SRISKANDAN, S.; ALTMANN, D. M. The immunology of sepsis. **J Pathol**, v.214, n.2, Jan, p.211-23. 2008.

SWAAB, D. F.; NIJVELDT, F.; POOL, C. W. Distribution of oxytocin and vasopressin in the rat supraoptic and paraventricular nucleus. **J Endocrinol**, v.67, n.3, Dec, p.461-2. 1975.

TELES, J. M.; SILVA, E.; WESTPHAL, G.; FILHO, R. C.; MACHADO, F. R. Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock**, v.30 Suppl 1, Oct, p.47-52. 2008.

THIBONNIER, M. Signal transduction of V1-vascular vasopressin receptors. **Regul Pept**, v.38, n.1, Mar 5, p.1-11. 1992.

THIBONNIER, M. P., J. A.; *ET AL*. The human V_3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and desity-dependent signaling pathways. **Endocrinology**, v.138, n.10, p.4109-22. 1997.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen Pharmacol**, v.29, n.2, Aug, p.159-66. 1997.

TODA, A.; YOKOMIZO, T.; MASUDA, K.; NAKAO, A.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Cloning and characterization of rat leukotriene B(4) receptor. **Biochem Biophys Res Commun**, v.262, n.3, Sep 7, p.806-12. 1999.

TORRES-DUENAS, D.; BENJAMIM, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. **Shock**, v.25, n.3, Mar, p.267-76. 2006.

VENTURA, R. R.; GIUSTI-PAIVA, A.; GOMES, D. A.; ELIAS, L. L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. **Neurosci Lett**, v.379, n.2, May 6, p.75-80. 2005.

VINCENT, J. L.; ABRAHAM, E. The last 100 years of sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, v.173, n.3, Feb 1, p.256-63. 2006.

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

WALLEY, K. R.; LUKACS, N. W.; STANDIFORD, T. J.; STRIETER, R. M.; KUNKEL, S. L. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infect Immun**, v.64, n.11, Nov, p.4733-8. 1996.

WANG, K.; EVERED, M. D. Endotoxin stimulates drinking in rats without changing dehydrational signals controlling thirst. **Am J Physiol**, v.265, n.5 Pt 2, Nov, p.R1043-51. 1993.

WANG, Y.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v.4, n.1, Jan, p.12-22. 1995.

WILSON, A. M.; DEMPSEY, O. J.; SIMS, E. J.; LIPWORTH, B. J. A comparison of topical budesonide and oral montelukast in seasonal allergic rhinitis and asthma. **Clin Exp Allergy**, v.31, n.4, Apr, p.616-24. 2001.

WON, J. S.; IM, Y. B.; KHAN, M.; SINGH, A. K.; SINGH, I. Involvement of phospholipase A2 and lipoxygenase in lipopolysaccharide-induced inducible nitric oxide synthase expression in glial cells. **Glia**, v.51, n.1, Jul, p.13-21. 2005.

WOOD, C. E.; CHEN, H. G. Acidemia stimulates ACTH, vasopressin, and heart rate responses in fetal sheep. **Am J Physiol**, v.257, n.2 Pt 2, Aug, p.R344-9. 1989.

WOODS, J. W.; EVANS, J. F.; ETHIER, D.; SCOTT, S.; VICKERS, P. J.; HEARN, L.; HEIBEIN, J. A.; CHARLESON, S.; SINGER, II. 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase-activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. **J Exp Med**, v.178, n.6, Dec 1, p.1935-46. 1993.

XU, S.; LU, H.; LIN, J.; CHEN, Z.; JIANG, D. Regulation of TNFalpha and IL1beta in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by leukotriene B4. **Rheumatol Int**, Oct 7. 2009.

YASIN, S.; COSTA, A.; TRAINER, P.; WINDLE, R.; FORSLING, M. L.; GROSSMAN, A. Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. **Endocrinology**, v.133, n.3, Sep, p.1466-9. 1993.

YOKOMIZO, T.; KATO, K.; TERAWAKI, K.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. A second leukotriene B(4) receptor, BLT2. A new therapeutic target in inflammation and immunological disorders. **J Exp Med**, v.192, n.3, Aug 7, p.421-32. 2000.

YOKOMIZO, T.; MASUDA, K.; KATO, K.; TODA, A.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene B4 receptor. Cloning and intracellular signaling. **Am J Respir Crit Care Med**, v.161, n.2 Pt 2, Feb, p.S51-5. 2000.

ANEXOS

Tabela 2. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 7.

Tempo (h)	Grupos									
	S/ droga		DMSO		MK-886 (1mg/kg)		MK-886 (2mg/kg)		MK-886 (4mg/kg)	
	CLP		CLP		CLP		CLP		CLP	
	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*
4	4,4 ± 1,4	4	3,6 ± 0,9	9	2,5 ± 0,5	5	5,2 ± 1,4	5	4,1 ± 0,8	5

Tabela 3. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a osmolalidade plasmática. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 8.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO				MK-886 (1mg/kg)				MK-886 (2mg/kg)				MK-886 (4mg/kg)			
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*N*
0	282,7 ± 2,9	9	282,1 ± 1,0	9	279,5 ± 3,0	6	277,0 ± 3,0	6	291,2 ± 2,3	5	287,4 ± 2,5	5	290,0 ± 1,5	5	291,0 ± 2,3	5
4	273,2 ± 4,0	9	275,6 ± 1,7	9	278,8 ± 4,4	6	277,5 ± 2,4	6	276,2 ± 2,1	5	271,0 ± 3,2	5	274,0 ± 2,4	5	270,6 ± 1,1	5
24	275,4 ± 3,7	9	270,9 ± 4,6	9	265,2 ± 3,9	6	258,8 ± 3,4	6	274,0 ± 2,1	5	265,0 ± 3,4	5	276,4 ± 1,5	5	266,8 ± 3,4	5

Tabela 4. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o sódio sérico. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 9.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO				MK-886 (1mg/kg)				MK-886 (2mg/kg)				MK-886 (4mg/kg)			
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*N*
0	136,4 ± 1,9	9	140,3 ± 1,6	9	137,8 ± 1,9	5	142,3 ± 1,1	6	140,6 ± 0,8	5	141,8 ± 0,6	5	141,6 ± 1,0	5	141,4 ± 1,2	5
4	140,8 ± 1,1	9	141,2 ± 2,0	9	140,2 ± 2,2	6	138,8 ± 1,5	6	139,0 ± 1,5	5	135,8 ± 1,3	5	140,8 ± 1,1	5	136,8 ± 1,8	5
24	136,9 ± 1,0	9	135,6 ± 1,3	10	139,5 ± 0,5	6	135,3 ± 1,7	6	141,8 ± 1,2	5	139,0 ± 1,8	5	139,6 ± 1,4	5	138,2 ± 1,9	5

Tabela 5. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre o hematócrito. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 10.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO				MK-886 (1mg/kg)				MK-886 (2mg/kg)				MK-886 (4mg/kg)			
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*N*
0	44,2 ± 0,9	11	46,3 ± 0,8	11	44,3 ± 0,5	6	44,2 ± 1,3	6	45,1 ± 1,4	5	45,2 ± 1,3	5	44,5 ± 1,6	5	46,2 ± 0,8	5
4	45,6 ± 1,6	11	55,7 ± 1,3	11	45,5 ± 0,8	6	52,4 ± 2,3	5	48,3 ± 1,9	5	53,1 ± 1,2	5	46,5 ± 1,2	5	54,7 ± 2,1	5
24	43,7 ± 1,3	11	46,8 ± 1,0	11	43,6 ± 1,8	5	46,5 ± 0,5	8	44,8 ± 0,9	5	48,5 ± 3,0	5	44,4 ± 0,6	5	46,7 ± 2.0	5

Tabela 6. Efeito da administração sistêmica de MK-886 sobre a concentração de proteínas plasmáticas. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 11.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO				MK-886 (1mg/kg)				MK-886 (2mg/kg)				MK-886 (4mg/kg)			
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*N*
0	11,4 ± 0,4	5	11,4 ± 0,3	5	10,1 ± 0,6	5	9,7 ± 0,3	5	11,2 ± 0,1	5	10,9 ± 0,3	5	11,4 ± 0,2	5	10,7 ± 0,4	5
4	8,4 ± 0,9	5	8,4 ± 0,4	5	10,4 ± 0,5	5	9,4 ± 0,7	5	9,4 ± 0,5	5	7,6 ± 0,6	5	8,8 ± 0,5	5	8,4 ± 0,4	5
24	10,7 ± 0,5	5	8,1 ± 0,5	5	10,5 ± 0,4	5	8,2 ± 0,8	5	9,9 ± 0,2	5	7,4 ± 0,0	5	10,5 ± 0,9	5	8,2 ± 0,5	4

Tabela 7. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a produção de nitrato sérico. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 12.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO				MK-886 (1mg/kg)				MK-886 (2mg/kg)				MK-886 (4mg/kg)			
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*
0	31,2 ± 4,3	10	22,0 ± 1,6	9	22,0 ± 5,9	6	33,8 ± 1,1	5	41,3 ± 4,1	6	38,1 ± 4,6	6	32,8 ± 6,2	6	33,4 ± 3,7	6
4	28,7 ± 4,2	10	48,7 ± 3,7	9	26,5 ± 1,9	6	46,6 ± 14,3	6	30,0 ± 5,6	6	46,5 ± 1,4	6	33,3 ± 4,3	6	38,7 ± 1,9	6
24	29,8 ± 3,4	10	143,1 ± 17,6	9	27,0 ± 0,9	6	122,8 ± 27,6	5	36,8 ± 3,7	6	125,5 ± 24,1	6	44,4 ± 5,9	6	125,2 ± 19,8	6

Tabela 8. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre os níveis de cis-leucotrienos plasmáticos. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 13.

Tempo (h)	Grupos									
	DMSO				MK-886 (1mg/kg)		MK-886 (2mg/kg)		MK-886 (4mg/kg)	
	OF		CLP		CLP		CLP		CLP	
	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*
4	488,1 ± 14,3	4	502,8 ± 18,0	4	427,8 ± 21,2	4	489,0 ± 41,4	4	528,6 ± 100,4	4
24	479,2 ± 31,0	4	491,9 ± 57,6	4	522,6 ± 79,7	4	454,7 ± 53,8	4	422,7 ± 74,0	4

Tabela 9. Efeito da administração intraperitoneal de MK-886 sobre a concentração de vasopressina plasmática. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na figura 14.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO				MK-886 (1mg/kg)				MK-886 (2mg/kg)				MK-886 (4mg/kg)			
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*	M ± EPM	*n*
4	0,7 ± 0,1	14	4,3 ± 0,7	11	0,9 ± 0,2	6	2,8 ± 0,2	6	0,5 ± 0,0	9	0,9 ± 0,1	7	0,6 ± 0,1	10	0,3 ± 0,1	6
24	0,6 ± 0,1	14	1,0 ± 0,2	12	0,9 ± 0,0	6	0,8 ± 0,2	6	1,0 ± 0,1	7	0,5 ± 0,2	6	0,7 ± 0,1	10	0,3 ± 0,1	5