UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano e
da atividade enzimática das óxido nítrico sintases no hipotálamo de
ratos submetidos à sepse experimental.**

Fábio Alves Aguilá

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Análise da concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano e da atividade enzimática das óxido nítrico sintases no hipotálamo de ratos submetidos à 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

Orientado: Fábio Alves Aguilá

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências Aplicadas à Farmácia no dia 21/09/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP.

Ribeirão Preto

2012

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.

Aguila, Fábio Alves

Análise da concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano e da atividade enzimática das óxido nítrico sintases no hipotálamo de ratos submetidos à sepse experimental. Ribeirão Preto, 2012.

75p.: il. ; 30cm.

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

Orientador: Rocha, Maria José Alves da

1. Óxido nítrico. 2. Vasopressina. 3. Ligadura e perfuração cecal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Autor: Fábio Alves Aguila

Título: Análise da concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano e da atividade enzimática das óxido nítrico sintases no hipotálamo de ratos submetidos à 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 este trabalho aos meus pais Pedro Alves da Silva (in memoriam) e Nair Aguila Martins Alves...

Aos meus irmãos Fabiano, Fabiana e Fernando Alves Aguila...

A minha namorada Marília de Souza Ferreira...

A todos os meus demais familiares e amigos...

*...pelo amor imensurável, dedicação,
incentivo e alegrias proporcionadas em toda
minha vida.*

Primeiramente a todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização desse trabalho, em meu crescimento científico, pessoal, profissional e humano durante esse período.

À minha amiga e orientadora Majô (Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha) pela confiança, paciência, dedicação e todos os conhecimentos acadêmicos, científicos e principalmente éticos adquiridos, durante a convivência na iniciação científica e posteriormente no desenvolvimento deste trabalho de mestrado.

À amiga Nadir Fernandes pela atenção, carinho e orientação técnica durante os experimentos.

Aos professores que permitiram o uso de seus laboratórios e equipamentos necessários para execução desse trabalho: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues (FMRP – USP); Prof^a. Dr^a. Lucila Leico K. Elias (FMRP – USP) e Prof. Dr. Fernando Queiróz Cunha (FMRP – USP).

Ao apoio técnico da **Kátia, Diva, Giuliana, Fernando, Serginho, Ieda e Fabíola** para a realização dos ensaios de medida das atividades enzimáticas.

Ao **Marcelo Batalhão** pelo apoio técnico e ajuda na execução das dosagens de nitrato.

À **Maria Valci dos Santos** e **Milene Mantovani** pela competência e ajuda nos radioimunoensaios.

Aos professores, os quais contribuíram para minha formação científica.

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

Aos funcionários dos Biotérios pelo importante trabalho que executaram para manter os animais em condições ideais para os experimentos.

Aos amigos do Laboratório: Adriana, Aline, Amanda, Ângelo, Bruno, Camila, Elaine, Fernanda, Fernando, Josilene, Juliana B., Juliana R., Karin, Leticia A., Letycia S., Lucas, Luís Henrique, Marcelo, Mariana, Mario, Paulo, Tatiane, Thalita, pela amizade, incentivos e pela convivência agradável.

Aos meus familiares e amigos que sempre estiveram ao meu lado.

Ao apoio financeiro das agências FAPESP e CNPq.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

*"Todo o homem é culpado do bem que não fez."
(Voltaire)*

RESUMO

AGUILA, F.A. **Análise da concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano e da atividade enzimática das NO sintases no hipotálamo de ratos submetidos à sepse experimental.** 2012. 75f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

Sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica frente a um estímulo infeccioso. Na fase inicial da doença ocorre aumento da secreção de vasopressina (AVP) e na fase tardia observamos uma redução, apesar dos elevados níveis de mediadores inflamatórios e agravamento da hipotensão que são estímulos para a secreção do hormônio. O óxido nítrico (NO), produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), parece modular a secreção de AVP dependendo do contexto fisiopatológico. Durante sepse experimental nosso grupo demonstrou que as concentrações plasmáticas de nitrato, que servem como índice da produção de NO, se elevam progressivamente durante a evolução da doença, mas não há evidências de que isto ocorra também a nível central. Nosso objetivo foi avaliar temporalmente a concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano (LCR) e a atividade enzimática das NOS no hipotálamo de ratos submetidos à sepse por ligadura e perfuração cecal (CLP). Os procedimentos, aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto (CEUA-USP, protocolo nº 10.1.294.53.7), foram realizados com ratos Wistar pesando 250 ± 30 gramas, os quais foram divididos em dois grupos: CLP e operação fictícia (OF). Após 0, 2, 6 e 24 horas das cirurgias, foi feita a coleta do LCR para a determinação da concentração de nitrato pelo método de quimiluminescência NO/ozônio. Imediatamente após os animais foram decapitados para coleta de sangue utilizado para determinação de hematócrito, sódio sérico, proteína, interleucina (IL)-1 β , nitrato e AVP plasmáticos. Também foram removidas as neurohipófises para análise do conteúdo de AVP e o hipotálamo para análise da atividade da NOS pelo método da Citrulina. Nos animais sépticos, as concentrações plasmáticas de AVP seguiram o padrão esperado, com aumento em 2h e 6h, retornando a níveis basais em 24h. Os estoques neurohipofisários de AVP reduziram em 2h e 6h retornando a níveis basais em 24h. O sódio sérico e as proteínas plasmáticas diminuíram 2h, 6h e 24h após CLP, e os hematócritos aumentaram nos mesmos períodos. As concentrações plasmáticas de IL-1 β e nitrato aumentaram 6h e mantiveram-se elevadas 24h após CLP. Entretanto, no LCR o nitrato aumentou em 6h, mas retornou a níveis basais em 24h. A atividade hipotalâmica das NOS totais e constitutivas eram de 50 a 100 vezes maiores que as das NOS induzidas e aumentaram 6h e 24h após a CLP. Os resultados deste estudo mostram que as atividades das NOS observadas no hipotálamo *ex vivo* dos ratos sépticos indicam a presença de formas viáveis das enzimas, sendo a isoforma constitutiva a mais relevante para a produção de NO nesta região cerebral. Além disso, as alterações temporais das concentrações de nitrato no LCR diferem da de nitrato plasmático, revelando um perfil diferenciado da produção de NO central em relação à periférica, e que este pode estar relacionado à secreção bifásica de AVP na sepse.

Palavras-chaves: Óxido nítrico, Vasopressina, Ligadura e perfuração cecal.

ABSTRACT

AGUILA, F.A. **Analysis of nitrate concentration in the cerebrospinal fluid and of the enzymatic activity of nitric oxide synthase in the hypothalamus of rats submitted to experimental sepsis.** 2012. 75f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

Sepsis is defined as a systemic inflammatory response to an infectious stimulus. In the initial phase of the disease the secretion of vasopressin (AVP) is increased and late is observed a reduction, although high levels of inflammatory mediators and worsening of the hypotension, which are stimuli for the hormone secretion. Nitric oxide (NO) produced by the enzyme nitric oxide synthase (NOS), appears to modulate the secretion of AVP depending on the pathophysiological context. During experimental sepsis our group demonstrated that the plasma nitrate concentrations, which serve as an index of NO production, increase gradually during the course of the disease. However, there is no evidence that this also occurs at the central level. Our aim was to evaluate the temporal nitrate concentration in the cerebrospinal fluid (CSF) and the enzymatic activity of NOS in the hypothalamus of rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP). The procedures, approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Campus of Ribeirão Preto (CEUA - USP, Protocol nº10.1.294.53.7) were performed with Wistar rats weighing 250 ± 30 grams, which were divided into two groups: CLP and Sham operation. After 0, 2, 6 and 24 hours of surgery, CSF was collected for determining the nitrate concentration by the chemiluminescence NO/ozone method. Immediately after, the animals were decapitated, blood was collected and used for hematocrit, serum sodium, protein, interleukin (IL)-1 β , nitrate and plasma AVP determination. The neurohypophysis was removed for AVP content determinations and hypothalamus for NOS activity analysis by the method of citrulline. In septic animals, plasma concentrations of AVP showed the expected pattern, an increase at 2h and 6h and returning to basal levels at 24h. The AVP neurohypophyseal stocks decreased at 2h and 6h returning to basal levels at 24h. The sodium serum and plasma proteins decreased 2h, 6h and 24h after CLP, and the hematocrit increased at the same periods. The plasma concentration of IL-1 β and nitrate increased 6h and remained elevated 24h after CLP. However, in the cerebrospinal, nitrate increased at 6h but returned to basal level in 24h. The total and constitutive NOS activities were fifty to one hundred times higher than inducible NOS and were increased 6h and 24h after CLP. These results suggest that the activity of NOS observed in the hypothalamus *ex vivo* of rats septic indicates the presence of viable forms of enzymes, and that the constitutive isoform is the most relevant for the NO production in this brain region. Moreover the temporal alterations of the nitrate concentrations in the CSF differ from the plasma nitrate, showing a different profile of the central and peripheral NO production, which may be related to biphasic AVP secretion in the sepsis.

Keywords: Nitric oxide, Vasopressin, Cecal ligation and puncture.

RESUMEN

AGUILA, F.A. **El análisis de la concentración de nitrato en el líquido cefalorraquídeo y la actividad enzimática de la óxido nítrico sintasas en el hipotálamo de ratas con sepsis experimental.** 2012. 75f. Disertación (Masters). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2012.

La sepsis se define como una respuesta inflamatoria sistêmica a un estímulo infeccioso. En la fase inicial de la enfermedad se aumenta la secreción de vasopresina (AVP) y en la fase tardía se observa reducción, a pesar de los altos niveles de mediadores inflamatorios y el agravamiento de la hipotensión que son estímulos para la secreción de la hormona. El óxido nítrico (NO) producido por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS), parece modular la secreción de AVP en función del contexto fisiopatológico. Durante la sepsis experimental nuestro grupo demostró que las concentraciones plasmáticas de nitrato, que sirven como un índice de producción de NO, aumentó gradualmente durante el curso de la enfermedad, pero no hay evidencia de que esto se produce también en el nivel central. Nuestro objetivo fue evaluar temporalmente la concentración de nitrato en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y la actividad enzimática de la NOS en el hipotálamo de ratas sometidas a sepsis por ligadura y punción cecal (CLP). Los procedimientos, aprobados por el Comité de Ética en el Uso de Animales del Campus de Ribeirão Preto (CEUA-USP, protocolo nº10.1.294.53.7) se realizaron con ratas Wistar 250 $\pm$ 30 gramos, divididos en dos grupos: CLP y la operación ficticia (OF). Después de 0, 2, 6 y 24 horas de la cirugía, se recogió LCR para determinar la concentración de nitrato por el método de quimioluminiscencia NO/ozono. Inmediatamente después los animales fueron decapitados para la recolección de sangre que se utilizó para la determinación de hematocrito, niveles séricos de sodio, proteínas, interleucina (IL)-1 β , el nitrato y el AVP plasma. También fueron removidos neurohipófisis para el análisis del contenido de AVP y el hipotálamo para el análisis de actividad de la NOS por el método de citrulina. En los animales sépticos, las concentraciones plasmáticas de AVP seguido el patrón de espera, con un aumento a las 2h y 6h y volviendo a los niveles basales a las 24h. Los inventarios de AVP neurohipofisários se redujo a las 2h y 6h regresando a los niveles basales a las 24h. Los niveles de sodio en el suero y proteínas en el plasma disminuyó 2h, 6h y 24h después de CLP, y el hematocrito aumentó en el mismo periodo. La concentración plasmática de IL-1 β e de nitrato aumentó 6h y 24 h después de CLP. Si embargo, en el líquido cefalorraquídeo el nitrato aumento a las 6h pero volvió a los niveles basales a las 24 h. La actividad de la NOS constitutiva y totales eran de cincuenta a cien veces maiores que los des NOS inducible y estaban aumentadas 6 y 24 h después del CLP. Estos resultados muestran que la actividad observada de NOS en el hipotálamo *ex vivo* de ratas séptico indica la presencia de formas viables de enzimas, y la isoforma constitutiva es el más relevante para la producción de NO en esta región del cerebro. Además, los cambios temporales de las concentraciones del nitrato en el LCR, difieren del nitrato de plasma, revelando un perfil diferente para la producción del NO central y de plasma, y que puede estar relacionado con la secreción bifásica de la vasopresina en la sepsis.

Las palabras claves: Óxido nítrico, Vasopresina, Ligadura y punción cecal.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP).	18
Figura 2. Coleta de líquido cefalorraquidiano (LCR).	19
Figura 3. Foto da superfície ventral do cérebro do rato.....	20
Figura 4. Concentração plasmática de vasopressina em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	27
Figura 5. Concentração neurohipofisária de vasopressina em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	28
Figura 6. Sódio sérico em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	29
Figura 7. Hematócrito em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	30
Figura 8. Proteínas plasmáticas em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	31
Figura 9. Interleucina 1 β (IL-1 β) plasmáticas em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	32
Figura 10. Nitrato plasmático em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	33
Figura 11. Nitrato no líquido cefalorraquidiano em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	34
Figura 12. Atividade das NOS totais no hipotálamo de animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	35
Figura 13. Atividade das NOS constitutivas no hipotálamo de animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	36
Figura 14. Atividade das NOS induzíveis no hipotálamo de animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	37
Figura 15. Atividade das NOS no hipotálamo de animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP).	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Mortalidade por gravidade e local de desenvolvimento da sepse.	5
Tabela 2. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de vasopressina plasmática.	70
Tabela 3. Efeito do estímulo séptico sobre o conteúdo da vasopressina neurohipofisária.	70
Tabela 4. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a concentração do sódio sérico.....	71
Tabela 5. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o hematócrito.	71
Tabela 6. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de proteína plasmática.	72
Tabela 7. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de Interleucina 1 β (IL-1 β) plasmática.	72
Tabela 8. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de nitrato plasmático.	73
Tabela 9. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de nitrato no líquido cefalorraquidiano (LCR).	73
Tabela 10. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a atividade das NOS no hipotálamo.	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ^{125}I - Isótopo radioativo de iodo
 ^{24}C - Isótopo radioativo de carbono
 $^{\circ}\text{C}$ - Graus Celsius
 μl - Microlitro
 μm - Micrometro
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico
ADH - Hormônio anti-diurético
AG - Aminoguanidina
ANG - Angiotensina II
ANOVA - Análise de variância simples
AP - Área postrema
AV3V - Região anteroventral do terceiro ventrículo
AVP - Arginina vasopressina
BH4 - Tetra-hidrobiopterina
BHE - Barreira hematoencefálica
bpm - Batimentos por minuto
 Ca^{2+} - Íons Cálcio
CaCl₂ - Cloreto de Cálcio
CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
CIVP - Coagulação intravascular disseminada
CLP - *Cecal ligation and puncture* ou ligadura e perfuração cecal
cm - Centímetro
CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO - Monóxido de carbono
CSF - *Cerebrospinal fluid* ou Fluido Cerebroespinhal
CVOs - Órgãos circunventriculares
dl - Decilitro
DTT - Ditionitreitol
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EERP - Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto
EGTA - Etileno de aminotetra acetato
EPM - Erro padrão da média
e.v. - Endovenosa
F - Distribuição F de Fisher-Snedecor
FAD - Flavina adenina dinucleotídeo

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCFRP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FiO₂ - Fração inspirada de oxigênio

FMN - Flavina mono nucleotídeo

FMRP Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

FORP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

FR - Frequência respiratória

g - Gramas

g - Gravidade

G - Gauge

GCs - Enzima guanilato ciclase solúvel

GMPc - 3',5'-Monofosfato de Guanosina Cíclica

h - Hora (s)

HEPES - Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico

HCl - Ácido clorídrico

HO - Heme oxigenase

i.c.v. - Intracerebroventricular

IFN- γ - Interferon gama

IL - Interleucina

ILAS - Instituto Latino-Americano de Sepse

i.p. - Intraperitoneal

ipm - Inspirações por minuto

kg - Quilograma

KH₂PO₄ - Fosfato monopotássico

l - Litros

LCR - Líquido cefalorraquidiano

L-NAME - L-NG-Nitroarginina metil éster

LPB - Proteína ligadora de LPS

LPS - Lipopolissacarídeo

LTA - Ácido lipoteicóico

LTs - Leucotrienos

M - Média

mg - Miligrama

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

min - Minuto (s)

ml - Mililitro

mM - Milimolar

mm³ - Milímetro cubico

mmHg - Milímetros de mercúrio

mmol - Milimol

MnPO - Núcleo pré-óptica mediano

MODS - *Multiple organ dysfunction syndrome* ou Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos

n - Número de animais

N - Normal

Na₂HPO₄ - Fosfato de sódio dibásico

Na₂EDTA - Ácido etilendiamintetracético disódio

NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

NaOH - Hidróxido de sódio

NF-κβ - Fator nuclear Kappa B

nm - Nanômetro

NO - Óxido nítrico

NOS - Enzima óxido nítrico sintase

NOSc - NOS constitutivas

NOS_e, NOS_{III} ou NOS₃ - NOS endotelial

NOS_i, NOS_{II} ou NOS₂ - NOS induzida

NOS_{mt} - NOS mitocondrial

NOS_n, NOS_I ou NOS₁ - NOS neuronal

NOS_t – NOS totais

NTS - Núcleo do trato solitário

O₂ - Oxigênio

OF - Operação fictícia

OVLT - *Organum vasculosum da lamina terminalis* ou órgão vascular da lâmina terminal

p - nível descritivo

PAF - Fator ativador de plaquetas

PAM - Pressão arterial média

PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns* ou Padrões moleculares associados a patógenos

PaO₂ - Pressão arterial de oxigênio

PaS – Pressão arterial sistólica

PBS - Fosfato monobásico

PCO₂ - Pressão parcial de dióxido de carbono

pg - Pico grama

PGs - Prostaglandinas

pH - Potencial hidrogeniônico

PIRO- *Predisposition, Insult infection, Response, Organ dysfunction* ou Predisposição, insulto infeccioso, Resposta e disfunção de órgãos

PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil

PVN - Núcleo paraventricular

RIA - Radioimunoensaio

RNA_m - RNA mensageiro

RNI - Razão normalizada internacional

rpm - Rotações por minuto

SARA - Síndrome da angustia respiratória no adulto

SBF ou BSA - Soro fetal bovino

SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

seg - Segundos

SFO - Órgão subfornicial

SNC - Sistema Nervoso Central

SNK - Student Newman-Keuls

SON - Núcleo supraóptico

SVO₂ - Saturação venosa de oxigênio

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

TTPA - Tempo de tromboplastina parcial ativada

UI - Unidades internacionais

USP - Universidade de São Paulo

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VLM - *Bulbo ventrolateral medial*

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 Definição de sepse	2
1.2 Epidemiologia da sepse	4
1.3 Fisiopatologia da sepse	5
1.4 Modelo de sepse experimental	6
1.5 Vasopressina	7
1.6 Vasopressina e sepse	8
1.7 Óxido nítrico	9
1.8 Óxido nítrico na sepse	11
1.9 Justificativa	12
2. OBJETIVO	14
2.1 Objetivo geral	15
2.2 Objetivos específicos	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Animais	17
3.2 Protocolo experimental	17
3.3 Anestesia	17
3.4 Sepse experimental por Ligadura e Perfuração Cecal - “Cecal Ligation and Puncture” (CLP)	18
3.5 Coleta do líquido cefalorraquidiano	19
3.6 Separação do plasma e do soro	19
3.7 Dissecção do hipotálamo	20
3.8 Dissecção da neurohipófise	20
3.9 Determinação do hematócrito	21

3.10 Determinação do sódio sérico	21
3.11 Determinação de proteínas plasmáticas	21
3.12 Determinação de Interleucina-1 β plasmática.....	22
3.13 Determinação de nitrato	22
3.14 Dosagem Hormonal.	23
3.15 Radioimunoensaio da vasopressina	23
3.16 Dosagem de proteína total da neurohipófise	24
3.17 Determinação da atividade das NOS.	24
3.18 Análise estatística	25
4. RESULTADOS	26
4.1 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a vasopressina plasmática	27
4.2 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a vasopressina neurohipofisária	27
4.3 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o sódio sérico.....	28
4.4 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o hematócrito	29
4.5 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a proteína plasmática	30
4.6 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a Interleucina 1 β plasmática	31
4.7 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o nitrato plasmático	32
4.8 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o nitrato no líquido cefalorraquidiano.	33
4.9 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a atividade das NOS totais no hipotálamo	34
4.10 Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a atividade das NOS constitutivas no hipotálamo	35
4.11 Efeito estímulo séptico por CLP sobre a atividade das NOS induzíveis no hipotálamo.	36
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	52
ANEXOS	68

1. INTRODUÇÃO

1. Definição de sepse

“Sepse” é uma palavra derivada da grega “Σήψις”, tendo como significado decomposição de material orgânico, animal ou vegetal. Sua utilização iniciou-se com Homero há mais de 2.700 anos, mas sua ligação com sinais de doença sistêmica e presença de infecção só ocorreu há cerca de 100 anos atrás, sendo utilizada como um sinônimo de “infecção grave”. Com o ganho de conhecimento sobre sua fisiopatologia, a sepse tem sido relacionada principalmente à resposta do próprio hospedeiro do que às características do microrganismo infectante (Geroulanos; Douka, 2006; Funk *et al.*, 2009; Vincent *et al.*, 2009).

A sepse tem sido caracterizada por envolver múltiplos fatores dos diferentes sistemas fisiológicos, sendo um processo extremamente complexo, podendo ser iniciada em diferentes sítios e por uma grande variedade de microrganismos. Outra característica marcante é o aparecimento de sintomas inespecíficos que diferem inter e até mesmo intra-paciente com a evolução da doença, gerando uma dificuldade na caracterização do quadro clínico da sepse (Vincent *et al.*, 2009).

Com o intuito de estabelecer uma definição objetiva da doença, assim como os parâmetros para a melhor caracterização e as diretrizes para o seu tratamento, em 1991 foi realizada a 1ª Conferência Internacional de Definições da Sepse. Esta conferência foi organizada por diversas sociedades médicas norte-americanas e europeias, cujo relatório final foi publicado na forma de um guia no ano seguinte (Bone *et al.*, 1992). Em 2001, ocorreu uma nova conferência para atualização e inclusão de novos parâmetros, os quais foram publicados em 2003 (Levy *et al.*, 2003).

Além da sepse, outros termos também foram definidos nestas duas conferências como:

Infecção - Processo patológico causado pela invasão de tecidos, fluidos e cavidades do corpo normalmente estéreis por microrganismos patogênicos.

Bacteremia - Presença de bactérias viáveis no sangue.

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) - Resposta inflamatória sistêmica a uma variedade de insultos clínicos graves, caracterizada pelo aparecimento de dois ou mais dos seguintes critérios:

Variáveis gerais: Febre (temp. axilar > 38,3 °C); Hipotermia (temp. axilar < 36,0 °C); Frequência cardíaca > 90 bpm; Taquipnéia (FR > 20 ipm ou PCO₂ < 32

mmHg); Alteração do estado mental; Edema significativo ou balanço hídrico positivo (> 20 ml/Kg em 24h); Hiperglicemia (glicemia > 120 mg/dl na ausência de diabetes).

Variáveis inflamatórias: Leucocitose (> 12.000 leucócitos/mm³); Leucopenia (< 4.000 leucócitos/mm³); Contagem de leucócitos normais, porém com mais de 10% de formas imaturas; Proteína C reativa e/ou Pro-calcitonina plasmática $>$ que 2 desvios padrões acima dos valores normais.

Variáveis hemodinâmicas: Hipotensão arterial (PaS < 90 mmHg, PAM < 70 mmHg ou queda na PaS > 40 mmHg); SVO₂ $> 70\%$; Índice cardíaco $> 3,5$ l/min.

Variáveis de disfunção orgânica: Hipoxemia arterial (PaO₂/FiO₂ < 300); Oligúria (débito urinário $< 0,5$ ml/Kg/hora por pelo menos 2h); Aumento da creatinina $> 0,5$ mg/dl; Alterações da coagulabilidade (RNI $> 1,5$ ou TTPA > 60 segundos); Íleo paralítico; Trombocitopenia (< 100.000 plaquetas/mm³); Hiperbilirrubinemia (bilirrubinas totais > 4 mg/dl).

Variáveis de perfusão tissular: Hiperlactatemia (> 1 mmol/l); Perfusão tissular periférica lentificada.

Sepse - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica concomitante a uma infecção.

Sepse Grave - Presença de sepse acompanhada de um ou mais sinais e/ou sintomas de hipoperfusão tecidual ou disfunção orgânica como: áreas de pele moteada, tempo de enchimento capilar maior que 3 segundos, oligúria (débito urinário $< 0,5$ ml/Kg/h por pelo menos 2h), lactato arterial > 2 mmol/l, alterações abruptas do estado mental ou alterações inespecíficas no eletroencefalograma, plaquetopenia ou coagulação intravascular disseminada (CIVD), lesão pulmonar aguda ou Síndrome da angústia respiratória do adulto (SARA) e disfunções cardíacas.

Choque Séptico - Estado no qual o paciente apresenta falência circulatória aguda caracterizada por hipotensão arterial persistente não responsiva a vasoconstritores e a reposição de fluidos.

Síndrome da Disfunção Múltipla de Órgãos (MODS) - Presença de função orgânica alterada em pacientes agudamente enfermos, nos quais a homeostase não pode ser mantida sem intervenção (Bone *et al.*, 1992; Levy *et al.*, 2003).

Entretanto, devido a simplicidade desta classificação frente à complexidade fisiopatológica da sepse, na conferência de 2001 foi proposto o conceito “PIRO”

(*Predisposition, Insultinfection, Response, Organ dysfunction*) que, além da resposta inflamatória leva em consideração outros cofatores como comorbidades, idade, fatores genéticos, tipo de microrganismo, local da infecção e o grau de acometimento dos órgãos para melhor caracterizar a gravidade do paciente em sepse (Levy *et al.*, 2003; Dellinger *et al.*, 2008; Vincent; Korkut, 2008).

Além disto, as definições e parâmetros utilizados na classificação vêm sendo reavaliados nas subseqüentes conferências e hoje compõem as diretrizes da “*Surviving Sepsis Campaign*” para diagnóstico precoce e tratamento adequado, com o objetivo de diminuir a taxa de mortalidade desta doença (Levy *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2006; Dellinger *et al.*, 2008; Vincent; Korkut, 2008).

1.2. Epidemiologia da sepse

Nos últimos anos a sepse e suas consequências (sepse severa e choque séptico) têm sido apontadas como as principais causas de morte em unidades de terapia intensiva (UTI) (Angus; Wax, 2001; Dellinger *et al.*, 2008).

Apesar dos avanços no tratamento e diagnóstico acredita-se que a mortalidade devido ao choque séptico vem crescendo nas últimas décadas, possivelmente devido ao envelhecimento da população, aumento no emprego de técnicas invasivas e possíveis alterações nos agentes microbianos tornando-os multirresistentes (Bone, 1991; Hanna, 2003).

Nos Estados Unidos estima-se que ocorram mais de 750 mil novos casos de sepse a cada ano (Moerer; Burchardi, 2006). Já o Brasil apresenta uma das maiores taxas mundiais de mortalidade decorrentes de sepse (Silva, 2008), sendo esta a doença com os maiores custos nos setores de saúde públicos e privados no país (Silva *et al.*, 2004), chegando a valores de 20 mil reais por paciente (Sogayar *et al.*, 2008).

De acordo com o Instituto Latino-Americano de Sepse (ILAS), responsável pela organização da “*Surviving Sepsis Campaign*” na América Latina, no seu último relatório publicado em março de 2012, a taxa de mortalidade nos hospitais públicos brasileiros chega a ser o dobro da mundial (Ilas, 2012) (Tabela1).

Tabela 1. Mortalidade por gravidade e local de desenvolvimento da sepse

	Dados Brasil Hospitais públicos (n=5638)	Dados Brasil Hospitais privados (n=4624)	Dados Brasil (ILAS 2005-2012) (n=10262)	Dados mundiais*
Gravidade				
Sepse grave	48,9%	27,0%	38,5%	23,9%
Choque séptico	73,8%	55,9%	66,2%	37,4%
Local de desenvolvimento				
Pronto socorro	57,5%	30,8%	44,0%	26,5%
Enfermaria	65,5%	45,7%	57,5%	39,8%
UTI	60,5%	55,9%	58,6%	42,8%
Global	61,5%	40,3%	51,9%	30,8%

UTI - unidade de terapia intensiva. *Dados da *Surviving Sepsis Campaign* (Crit Care Med. 2010 38(2):367-74).

Fonte: Relatório ILAS (março/2012)

1.3. Fisiopatologia da sepse

O mecanismo de resposta do hospedeiro frente à sepse é bastante complexo envolvendo componentes infecciosos, imunológicos, neurológicos, endócrinos, hemodinâmicos, cardiovasculares e até mesmo genéticos (Holmes; Russell; *et al.*, 2003; Trentzsch *et al.*, 2003; De Maio *et al.*, 2005; Salomao *et al.*, 2009). As respostas imunológicas, iniciadas pelo contato do indivíduo com o agente infeccioso, podem tanto promover o controle da infecção, como mediar as alterações funcionais, que são as bases fisiopatológicas da doença (Walley *et al.*, 1996; Ebong *et al.*, 1999; Martineau; Shek, 2000; Rios-Santos *et al.*, 2003).

O processo fisiopatológico inicia-se com a instalação e posterior proliferação dos microrganismos (bactérias Gram-positivas e/ou Gram-negativas) no sítio atingido e que podem alcançar diretamente o sistema circulatório ou proliferar localmente (Parrillo, 1993). Estes microrganismos apresentam componentes estruturais chamados padrões moleculares associados à patógenos (Pamps) que podem ser reconhecidos pelas células do sistema imune e assim iniciar a resposta inflamatória, estimulando a liberação de mediadores pelos macrófagos, neutrófilos assim como outras células do hospedeiro (Parrillo, 1993; Medzhitov; Janeway, 1997; Aderem; Ulevitch, 2000; Hanna, 2003; Sriskandan; Altmann, 2008).

Dentre os componentes de membranas presentes nestes microrganismos estão o lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias gram-negativas e o ácido lipoteicóico (LTA) das gram-positivas. Estes Pamps são reconhecidos por receptores presentes

em células do sistema imunológico, como o CD14 e os receptores toll-like (TLRs) (Aderem; Ulevitch, 2000; Read; Wyllie, 2001; Cohen, 2002; Akira, 2003; Hanna, 2003).

Durante a ativação das células imunes pelo LPS, ocorre a opsonização deste componente de membrana das bactérias, pela proteína ligadora de LPS (LPB), 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). Já o ácido lipoteicoico presente nas bactérias gram-positivas é reconhecido pelos receptores toll-like 2 (TLR-2) (Aderem; Ulevitch, 2000; Cohen, 2002; Hanna, 2003; Sriskandan; Altmann, 2008).

A ativação dos receptores TLR-2 e/ou TLR-4 resulta em uma cascata de sinalização, com consecutiva ativação da transcrição do fator nuclear kappa B (NF- κ B) resultando na transcrição de genes imunomodulatórios e, consequentemente, na liberação de mediadores inflamatórios como o Fator de necrose tumoral- α (TNF- α), Interleucinas (IL) -1, IL-6, IL-10, IL-12, Fator ativador de plaquetas (PAF), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs) pelas células imunes (Cohen, 2002; Giusti-Paiva; Branco; *et al.*, 2003; Hanna, 2003; Rios-Santos *et al.*, 2003; Sriskandan; Altmann, 2008).

A liberação excessiva destes mediadores durante a sepse pode direta ou indiretamente ativar neurônios envolvidos em diferentes funções orgânicas, como autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais produzindo os sinais e sintomas clínicos da sepse (McCann *et al.*, 2000; Engblom *et al.*, 2002; Kovacs, 2002; Hanna, 2003; Rios-Santos *et al.*, 2003; Benjamim *et al.*, 2005; Sriskandan; Altmann, 2008).

Apesar de a sepse ser causada predominantemente por bactérias, como demonstrado por Hanna em um estudo em 2003 em que 85% dos casos de choque séptico havia a coinfeção de gram-negativas e gram-positivas (Hanna, 2003), ela pode também ser causada por fungos, vírus e parasitas (Glauser *et al.*, 1991; Sands *et al.*, 1997; Kumar *et al.*, 2003).

1.4. Modelo de sepse experimental

Apesar da importância dos modelos experimentais para compreensão da fisiopatologia da doença e para o desenvolvimento de novas terapias, deve-se ter cuidado na projeção de dados obtidos de ensaios experimentais para clínicos, tendo em vista que os modelos existentes não conseguem mimetizar as complexidades

clínicas e a heterogeneidade dos pacientes sépticos (Esmon, 2004; Garrido *et al.*, 2004; Deitch, 2005; Rittirsch *et al.*, 2007).

Dentre os modelos experimentais utilizados para a indução da sepse, nós utilizamos o de Ligadura e Perfuração Cecal, ou do inglês *Cecal Ligation and Puncture* (CLP) por ser amplamente utilizado e considerado eficiente, pois além de apresentar microbiota variada (bactérias gram-negativas, gram-positivas, aeróbias, anaeróbias) do próprio organismo, ainda apresenta a injúria tecidual, foco infeccioso, liberação de produtos bacterianos e a progressão da infecção, semelhante aos casos clínicos de sepse por peritonites causadas por perfurações colônicas e diverticulites (Garrido *et al.*, 2004; Deitch, 2005; Hubbard *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006; Rittirsch *et al.*, 2007).

Outras vantagens apresentadas por este modelo incluem a simplicidade, relativa reprodutibilidade e capacidade de controle da intensidade da infecção através da alteração no diâmetro e números de perfurações cecais. Quanto às dificuldades apresentadas por este modelo, destaca-se a possibilidade de encontrar alterações nos resultados com o uso de mesmo protocolo, devido a pequenas modificações como: extensão da incisão na pele e músculo, diâmetro do ligamento cecal e volume do conteúdo fecal extravasado para a cavidade peritoneal que passam despercebidos durante a prática experimental (Singleton; Wischmeyer, 2003; Garrido *et al.*, 2004; Deitch, 2005; Hubbard *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2006; Rittirsch *et al.*, 2007).

1.5. Vasopressina

A vasopressina (AVP) ou hormônio antidiurético (ADH) é um nonapeptídeo que em sua estrutura apresenta duas cisteínas ligadas por uma ponte dissulfeto nas posições 1 e 6. Esse neuro-hormônio é sintetizado nos neurônios magnocelulares dos núcleos supraópticos (SON) e paraventriculares (PVN) do hipotálamo ou em agrupamentos de células espalhadas pelo hipotálamo lateral e medial, denominados núcleos acessórios (Du Vigneaud, 1954; George; Jacobowitz, 1975).

O hormônio é inicialmente sintetizado como uma proteína inativa de alto peso molecular denominada pré-pró-vasopressina. Este pré-pró-hormônio é composto por um peptídeo sinalizador N-terminal, a AVP ativa, a neurofisina II (uma proteína carreadora axonal) e uma glicoproteína carboxi-terminal, denominada copeptina. Os grânulos neurosecretórios contendo o hormônio ativo são transportados ao longo de

axônios pela via do eixo hipotálamo-hipófise para serem estocados em vesículas, nas dilatações bulbosas das terminações nervosas na neurohipófise, na qual a AVP é liberada para o interior dos capilares, mediante estímulos adequados (Swaab *et al.*, 1975; Barberis *et al.*, 1998; Morgenthaler *et al.*, 2006).

Os estímulos mais potentes para liberação desses hormônios são: aumento de osmolalidade plasmática, hipotensão e hipovolemia (Dunn *et al.*, 1973; Cunningham; Sawchenko, 1991; Kadekaro *et al.*, 1992). Além destes, outros estímulos como o aumento de angiotensina II (ANG II), febre, endotoxinas, NO, PGs, IL-1, náusea e estresse também têm sido descritos como capazes de estimular a liberação da AVP (Pittman; Bagdan, 1992; Pittman; Wilkinson, 1992; Holmes *et al.*, 2001; Giusti-Paiva *et al.*, 2002; Kovacs, 2002).

A AVP possui pelo menos três subtipos de receptores que estão acoplados à proteína G. O receptor V_1 (ou V_{1a}) encontra-se no coração, fígado, testículos, cérebro, rins e especialmente no músculo liso vascular. A alta densidade de receptores V_1 em células musculares lisas torna a AVP um potente vasoconstrictor (Thibonnier *et al.*, 1997; Holmes *et al.*, 2001; Holmes; Landry; *et al.*, 2003). O receptor V_2 está presente nos ductos coletores renais, sendo caracterizado pela sua ação antidiurética. Já o receptor V_3 (ou V_{1b}) é encontrado na adenohipófise e está relacionado à estimulação da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (Innamorati *et al.*, 1996; Erlenbach; Wess, 1998).

A AVP ainda pode atuar como neurotransmissor com ação regulatória da temperatura corporal (antipiréticos endógenos do sistema nervoso central) e no controle comportamental (Kovacs; De Wied, 1983; 1994; Pittman *et al.*, 1998).

1.6. Vasopressina e sepse

Tem sido descritos em vários estudos clínicos e experimentais que durante a evolução da sepse ocorre uma secreção bifásica de vasopressina bem definida. Na fase inicial, observa-se uma elevada concentração plasmática de AVP, que no decorrer do processo fisiopatológico, apesar da significativa queda da pressão arterial (que é estímulo para a secreção hormonal), diminui até atingir níveis basais, contribuindo para a hipotensão e choque vasodilatatório observadas nas fases posteriores da síndrome (Landry *et al.*, 1997; Sharshar *et al.*, 2002; Giusti-Paiva; Ruginsk; *et al.*, 2003; Westphal *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2007; Pancoto *et al.*, 2008; Athayde *et al.*, 2009).

Algumas hipóteses para esta secreção considerada, até o momento, inadequada de AVP na fase tardia da sepse são: a diminuição dos estoques neurohipofisários devido ao excessivo disparo dos barorreceptores na situação de queda da pressão arterial durante o choque (Holmes *et al.*, 2001; Sharshar *et al.*, 2002; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009), a alteração dos reflexos autonômicos, indicada pela diminuição da frequência cardíaca e ausência de bradicardia reflexa (Holmes *et al.*, 2001; Pancoto *et al.*, 2008), e ainda a excessiva produção de óxido nítrico (NO) inibindo o eixo hipotálamo-hipófise no sistema nervoso central (Holmes *et al.*, 2001; Giusti-Paiva *et al.*, 2002; Giusti-Paiva *et al.*, 2005; Carnio *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2007).

1.7. Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) tem sido descrito como parte de uma classe de mensageiros moleculares responsáveis pelo controle de uma grande variedade de funções biológicas. A produção desse radical livre biatômico é catalisada pela enzima homodimérica óxido nítrico sintase (NOS) que utiliza como precursor a L-arginina e cofatores como a nicotina adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e o oxigênio (O₂) (Knowles; Moncada, 1994; Thiemermann, 1997; Feihl *et al.*, 2001). Após a sua produção, o NO é rapidamente inativado e convertido a nitrito e/ou nitrato devido a sua reação com íons ferrosos da oxi-hemoglobina existente nas hemácias e na presença de O₂ (Moncada *et al.*, 1991; Pacher *et al.*, 2007).

A NOS consiste em um domínio oxigenase e outro redutase, possuindo cada um deles uma atividade catalítica própria. O domínio oxigenase contém sítios de ligação para o grupo heme e tetra-hidrobiopterina (BH₄) e é ligado ao domínio redutase pela calmodulina (CaM), o qual possui cofatores como flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavinamononucleotídeo (FMN) e NADPH (Bruckdorfer, 2005; Hill *et al.*, 2010).

Existem três tipos mais comuns desta enzima: a isoforma endotelial (NOSe, NOS-III ou NOS-3), e a isoforma neuronal (NOSn, NOS-I ou NOS-1), ambas constitutivas e dependentes de cálcio, e a isoforma induzível (NOSi, NOS-II ou NOS-2) que é induzida por citocinas ou outros compostos, como por exemplo o LPS (Knowles; Moncada, 1994; Wang; Marsden, 1995). Além dessas, há a isoforma mitocondrial (NOSmt), que é considerada um “*splicing*” alternativo da NOSn e está

associada à membrana interna da mitocôndria, sendo encontrada em células de fígado, rins, testículos, baço, coração, músculos e cérebro (Haynes *et al.*, 2004).

Apesar da meia-vida extremamente curta (6-8 segundos), o NO, em condições fisiológicas, é um gás hidrofóbico com passagem livre através de membranas biológicas (Moncada *et al.*, 1991; Feihl *et al.*, 2001).

Nas fibras musculares, o NO atua principalmente através de sua ligação a guanilato ciclase solúvel (GCs), que quando ativada, aumenta a produção de guanosina monofosfato cíclico (GMPc) promovendo o aumento da entrada de cálcio para o interior das células, levando a desfosforilação da miosina de cadeia leve com consequente relaxamento muscular (Moncada *et al.*, 1991; Southam; Garthwaite, 1993; Guix *et al.*, 2005).

Também tem sido descrito que o NO pode regular a liberação de AVP por atuar localmente, nos neurônios magnocelulares do SON e PVN e na neurohipófise, e/ou indiretamente através da modulação na atividade dos neurônios contidos em vias aferentes, responsáveis por transmitir os sinais vindos de variadas regiões para os neurônios magnocelulares (Vacher *et al.*, 2003; Raison *et al.*, 2011).

Embora a presença das três isoformas da NOS sejam detectadas em neurônios, a NOSn é a mais frequentemente encontrada em neurônios magnocelulares no núcleo paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) (Vincent; Kimura, 1992). Esta isoforma também é encontrada em estruturas cerebrais que apresentam fortes conexões regulatórias com o PVN e SON, tais como o *organum vasculosum da lamina terminalis* (OVLT), *órgão subfornical* (SFO), área postrema (AP), o núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e também o núcleo do trato solitário (NTS) (Summy-Long *et al.*, 1984; Bredt *et al.*, 1990; Dawson *et al.*, 1991; Vanhatalo; Soinila, 1995; Rodrigo *et al.*, 1997).

A presença da NOSn nestas estruturas indica uma provável produção central de NO, o qual poderia contribuir para a modulação da liberação de AVP (Mckinley *et al.*, 1999; Kadekaro; Summy-Long, 2000; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

De fato, em um trabalho anterior, nós observamos que a lesão eletrolítica da região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), a qual inclui o OVLT e MnPO, diminui a secreção de AVP e também a expressão da NOSn no SON, indicando uma provável importância da região AV3V e da produção de NO, oriundas da NOSn, na modulação da liberação da AVP (Aguila *et al.*, 2011).

As formas de atuação do NO em neurônios ainda não são bem esclarecidas, podendo o mesmo atuar através do aumento do GMPc, modulando as funções celulares pela ativação de proteínas quinases e fosfodiesterase, regulando canais iônicos ou ainda reagir diretamente (sem a necessidade do GMPc) com grupos tiol das proteínas da membrana celular e, assim, exercer os seus efeitos biológicos (Terrell *et al.*, 2003; Kadekaro, 2004; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2010).

1.8. Óxido nítrico na sepse

A sepse e a endotoxemia são acompanhadas por intensa produção de NO periférico, proveniente principalmente da isoforma induzível. A presença de componentes bacterianos, como o LPS e o LTA, ativa as vias intracelulares para induzir a transcrição da NOSi, a qual ocorre após um determinado período, sendo necessário algumas horas até a enzima ser detectada em macrófagos e tecidos (Chesrown *et al.*, 1994; Le Roy *et al.*, 1998; Shieh *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2006).

Durante a fase inicial da sepse, o aumento na produção de NO é importante e desejável, pois dentre os efeitos benéficos desse mediador estão a vasodilatação, prevenção da adesão plaquetária e leucocitária, aumento do fluxo sanguíneo na microcirculação e aumento da defesa do hospedeiro por sua atividade bactericida e tumoricida. Porém, na fase mais tardia da sepse, a produção de NO é exagerada, contribuindo para as características fisiopatológicas da sepse, como intensa vasodilatação periférica, hipotensão grave, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, disfunção miocárdica, falência no rolamento de leucócitos e redução da migração de neutrófilos para o foco inflamatório (Moncada *et al.*, 1991; Thiernemann, 1997; Benjamim *et al.*, 2000; Feihl *et al.*, 2001; Benjamim *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006; Rios-Santos *et al.*, 2007).

Além disso, o NO oriundo dos terminais de neurônios magnocelulares hipotalâmicos, parece participar da regulação do fluxo sanguíneo na neurohipófise (Thiernemann, 1997; Feihl *et al.*, 2001; Moncada; Higgs, 2006) e também participa da neurotransmissão e modulação neuroendócrina (Brann *et al.*, 1997; Kadekaro, 2004; Giusti-Paiva *et al.*, 2005).

Vários estudos têm evidenciado o efeito modulador do NO na secreção de AVP, mas os mesmos apresentam resultados divergentes sobre a ação do NO, sendo relatado efeito tanto estimulatório (Ota *et al.*, 1993; Raber; Bloom, 1994; Cao *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2002; Yamaguchi; Hama, 2003;

Ventura *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2007), quanto inibitório (Yasin *et al.*, 1993; Lutz-Bucher; Koch, 1994; Liu *et al.*, 1997; Kadekaro *et al.*, 1998; Kadekaro; Summy-Long, 2000; Stern; Ludwig, 2001; Giusti-Paiva *et al.*, 2002; Terrell *et al.*, 2003; Carnio *et al.*, 2005) dependendo do contexto fisiopatológico e temporal analisado e das vias de administração dos inibidores e doadores de NO usados no estudo.

Um estudo realizado em nosso laboratório, utilizando modelo de sepse polimicrobiana induzida por CLP, revelou que a administração periférica de Aminoguanidina (AG) (inibidor preferencial da NOSi) reduziu as concentrações plasmáticas de AVP observadas na fase inicial da sepse. Porém, apesar da redução da produção periférica de NO evidenciada pela avaliação do nitrato plasmático, o mesmo foi incapaz de modificar os níveis baixos do hormônio na fase tardia da sepse (Correa *et al.*, 2007).

Esses resultados sugerem que o efeito estimulatório do NO na fase aguda pode se dar, em parte, indiretamente através do seu efeito periférico nos vasos causando hipotensão e hipovolemia que estimularia a secreção de AVP.

Entretanto, pode estar ocorrendo uma produção central do NO, devido a uma incapacidade da AG em chegar e inibir as NOS do sistema nervoso central (SNC), visto que a droga foi administrada periféricamente (i.p.). Esta produção de NO central junto a de outros mediadores imunes, como as citocinas poderiam ativar os neurônios magnocelulares do SON e PVN e a neurohipófise a sintetizar e liberar AVP, já que a AG causou uma redução e não bloqueio da secreção do hormônio.

Já na fase tardia da sepse, ocorreu um aumento na concentração plasmática de nitrato mesmo nos animais que receberam AG (i.p.). Nos animais que receberam salina, este aumento foi ainda maior sugerindo uma excessiva produção periférica de NO que somada as prováveis produções no SNC causariam a inibição da secreção da vasopressina (Correa *et al.*, 2007).

É importante salientar que são escassas as evidências desta produção central aumentada de NO, assim como a da contribuição de cada isoforma da enzima NOS, para esta produção, sendo necessária a realização de novos trabalhos para fundamentá-la.

1.9. Justificativa

Inúmeros trabalhos como os citados anteriormente vêm demonstrando que o NO pode estar envolvido na secreção da AVP, sendo crescentes os indícios que

este envolvimento possa estar ocorrendo diretamente no sistema nervoso central (Giusti-Paiva *et al.*, 2002; Giusti-Paiva; Ruginsk; *et al.*, 2003). Entretanto, até o momento são escassos os trabalhos que demonstram a contribuição da atividade das NOS constitutivas e induzíveis (e consequentemente totais) no hipotálamo de ratos, assim como a produção do NO central através da concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano (LCR) nas diferentes fases da sepse induzida por ligadura e perfuração cecal (CLP).

2. OBJETIVO

2.1. Objetivo geral

Avaliar temporalmente a concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano e a atividade enzimática das diferentes isoformas das óxido nítrico sintases no hipotálamo de ratos submetidos à sepse experimental induzida por CLP.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar temporalmente a concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano de ratos submetidos à CLP;

2.2.2. Avaliar temporalmente a atividade das enzimas óxidos nítricos sintases totais, constitutivas e induzíveis no hipotálamo de ratos submetidos à CLP;

2.2.3. Avaliar temporalmente os níveis de vasopressina plasmática e neurohipofisária e comparar com a concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano e com a atividade enzimática das óxido nítrico sintases, assim como com as concentrações de IL-1 β , proteína e nitrato plasmáticos, sódio sérico e o hematócrito nos animais submetidos à CLP.

3. MATERIAIS e MÉTODOS

3.1. Animais

Os experimentos foram conduzidos utilizando ratos adultos da linhagem Wistar, de peso corporal entre 250 ± 30 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. Eles foram ambientados em gaiolas coletivas (cinco animais por gaiola) no Biotério do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, em fotoperíodo de 12/12 horas, à temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, com livre acesso à água e dieta comercial balanceada (6003/100110036, NUVILAB CR-1).

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto (Protocolo Nº 10.1.294.53.7). Os animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP que se apresentavam em grande sofrimento, foram eutanasiados seguindo critérios descritos em “Humane end points in shock research” (Nemzek *et al.*, 2004).

3.2. Protocolo experimental

Os animais foram divididos em dois grupos, CLP (ligadura e perfuração cecal) e OF (operação fictícia), os quais tiveram o líquido cefalorraquidiano (LCR) coletado em 0, 2, 6 e 24h após a cirurgia, para a determinação da concentração de nitrato. Imediatamente após a coleta do LCR, os animais foram decapitados para a coleta de sangue para determinação do hematócrito, sódio sérico, proteínas, AVP, nitrato e IL-1 plasmáticos.

Os animais ainda tiveram a neurohipófise e o hipotálamo removidos, para as respectivas determinações do conteúdo de vasopressina neurohipofisária e a determinação da atividade das NOS totais, constitutivas e induzíveis hipotalâmicas.

3.3. Anestesia

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

3.4. Sepses experimental por Ligadura e Perfuração Cecal - “Cecal Ligature and Puncture” (CLP)

A indução da sepse foi realizada pelo modelo de ligadura e perfuração cecal (CLP), o qual foi desenvolvido por Chaudry e colaboradores em 1979 (Chaudry *et al.*, 1979) e tem sido amplamente usado em nosso laboratório (Oliveira *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2007; Pancoto *et al.*, 2008; Athayde *et al.*, 2009; Bruhn *et al.*, 2009; Coelho, 2009; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2010; Saia *et al.*, 2011).

Após a anestesia com injeção intraperitoneal de solução de Tribromoetanol (TBE, AldrichChem. Corp. Inc.) 2,5% em solução salina, na dose de 1ml/100g de peso corporal, foi realizada uma incisão mediana de 2 cm no abdômen do rato, com posterior exposição do ceco. A seguir foi feita a obstrução parcial do lúmen intestinal por meio de uma ligadura parcial no segmento distal da válvula íleo cecal, seguida de 20 perfurações com agulha 16 G na borda antimesentérica do ceco. Após a saída das fezes do ceco, este foi reintroduzido na cavidade abdominal, a qual foi suturada em dois planos com pontos separados (Figura 1).

Figura 1. Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP). 1. Limpeza da região com álcool iodado. 2. Incisão abdominal de 2cm. 3. Exteriorização do ceco. 4. Deslocamento do material fecal para a extremidade do ceco. 5. Ligadura parcial a dois terços do fim do ceco. 6. Perfuração (20 vezes) com agulha 16G. 7. Reintrodução do ceco na cavidade abdominal. 8. Sutura em dois planos com pontos separados. Seta indica um dos pontos de extravasamento de material fecal.

Solução salina normal estéril (20 ml/Kg) foi administrada via subcutânea como líquido de reanimação. No grupo controle os animais foram submetidos à operação fictícia através de uma incisão no abdômen, manipulação do ceco e fechamento da cavidade abdominal, mas sem ligadura e perfuração cecal.

3.5. Coleta do líquido cefalorraquidiano

A técnica de coleta do líquido cefalorraquidiano (LCR) foi padronizada segundo o método descrito por Consiglio e colaboradores (Consiglio; Lucion, 2000). O animal após ser anestesiado é fixado ao aparelho estereotático. A cabeça é colocada no plano de fixação dos incisivos superiores com o occipital posicionado quase no plano horizontal. O corpo do animal é posicionado por baixo das barras auriculares de forma que o tórax fique posicionado verticalmente (Figura 2).

Figura 2. Coleta de líquido cefalorraquidiano (LCR). Representação esquemática do posicionamento de um rato adulto anestesiado para coleta de LCR da cisterna magna com o auxílio de um "scalp" (Consiglio; Lucion, 2000).

Com o animal nessa posição é possível a visualização de uma pequena depressão entre a protuberância occipital e o processo espinhoso do Atlas. Um "scalp" conectado a uma seringa de 1mL é inserido verticalmente e centralmente nesta superfície. Com uma leve aspiração o LCR é coletado no "scalp", posteriormente transferido para um tubo âmbar e congelado com o auxílio de gelo seco. Quando constatado qualquer traço de sangue durante a coleta do LCR, a amostra é prontamente desprezada. As amostras foram conservadas em freezer a menos 80°C até a realização das dosagens.

3.6. Separação do plasma e do soro

Após a decapitação dos animais uma parte do sangue foi coletada do tronco em dois diferentes tubos plásticos e mantidos em gelo, sendo um sem anticoagulante e o outro com heparina sódica (100 UI/ml) para obtenção de soro e plasma respectivamente. Os tubos foram então centrifugados a 1600xg por 20 min para a separação do soro e do plasma. O soro e uma alíquota de plasma foram

mantidos a 4°C e logo utilizados para dosagens diversas, outra alíquota com 1ml de plasma foi armazenada a - 80°C para posterior dosagem hormonal.

3.7. Dissecção do hipotálamo

Após a decapitação dos ratos e remoção do encéfalo, o hipotálamo basal foi rapidamente dissecado, congelado em gelo seco e posteriormente armazenado a - 80°C até o momento de sua utilização.

A região dissecada engloba a porção anterior e médio-basal do hipotálamo, indo rostralmente da porção anterior do quiasma óptico até à porção anterior dos núcleos mamilares, incluindo o *organum vasculosum da lamina terminalis* (OVLT), núcleos supraópticos (SON), paraventriculares (PVN), núcleo supra-quiasmático, núcleo arqueado, núcleo ventromedial e áreas periventriculares. Duas secções longitudinais foram realizadas, bilateralmente, com 1mm da linha mediana, delimitando a área do bloco de tecido. A profundidade do fragmento foi de aproximadamente 2,0mm de espessura (altura) (figura 3).

Figura 3. Foto da superfície ventral do cérebro do rato. O hexágono preto demarca a área do hipotálamo basal retirada para futuro processamento (Athayde, 2007).

3.8. Dissecção da neurohipófise

Após a remoção do encéfalo da cavidade craniana, a hipófise que permanece na sela túrcica teve a neurohipófise separada da adenohipófise com o auxílio de uma pinça de dissecção. A seguir a neurohipófise foi armazenada em um tubo contendo 200µl de HCl 0,1N, o qual foi congelado com o auxílio de gelo seco e armazenado a - 80°C até o momento de sua utilização.

3.9. Determinação do hematócrito

Após a decapitação dos animais, parte do sangue foi coletada do tronco e diretamente colocada em microcapilares heparinizados (Perfecta, SP, Brasil) para a determinação do hematócrito. 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.

3.10. Determinação de sódio sérico

O sódio sérico foi determinado em fotômetro de chama (Micronal), devidamente calibrado com solução padrão Micronal contendo 140 mEq/L de sódio diluída em água destilada na proporção de 1:100. Cada amostra foi diluída da mesma maneira, mantendo a mesma diluição (50µl do plasma em 4,95 ml de água destilada), homogeneizada e aspirada no fotômetro de chama para a leitura da concentração do sódio sérico.

3.11. Determinação de proteínas plasmáticas

Uma alíquota de 10µl do plasma armazenado a 4°C foram diluídos na proporção de 1:100. Em placas de 96 poços (TPP, Suíça) foram pipetados 10µL da amostra ou padrão na diluição 1:100 e adicionados 200µL de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EUA) diluído na proporção de 1:5 com água milli-Q.

As concentrações das amostras foram calculadas com base na curva padrão de concentrações conhecidas (0,03; 0,06; 0,12; 0,25; 0,5µg/µL) 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 595nm à temperatura de 36°C. Os resultados foram expressos em g/dL.

3.12. Determinação de Interleucina 1 β plasmática

A concentração da Interleucina-1 β (IL-1 β) no plasma foi determinada em duplicata através da técnica de ELISA (Enzyme Linked Sorbent Assay) de acordo com as instruções do fabricante do kit (BD Biosciences Pharmingen).

As placas de 96 poços foram sensibilizadas overnight a 4°C, com anticorpo de captura monoclonal (100 μ L por poço) diluído em tampão de ligação carbonato de sódio 0,1M (pH 8,2). No dia seguinte, os poços das placas foram lavados por 3 vezes com PBS/Tween-20 (0,05%), bloqueados com 100 μ L de soro bovino fetal (SBF) 10% em PBS por 1 hora em temperatura ambiente e novamente lavados por 3 vezes com PBS/Tween-20 (0,05%). Posteriormente foram adicionados 100 μ L de padrões ou plasma em cada poço e incubados por 2 h em temperatura ambiente.

Após 3 lavagens com PBS/Tween-20 (0,05%), os poços foram incubados com 100 μ L de anticorpo monoclonal de detecção biotinilado anti-IL-1 β (em PBS contendo 10% de SBF), junto com o conjugado estreptoavidina peroxidase, diluído no anticorpo de detecção, de acordo com as instruções do fabricante.

Após mais 3 lavagens com PBS/Tween-20 (0,05%) foi adicionado 100 μ L (por poço) da solução substrato (tetra-metil-benzidina e peróxido de hidrogênio, em volumes iguais), e a seguir os poços foram incubado por 30 minutos em temperatura ambiente, protegida da luz. Finalmente a reação foi interrompida com o auxílio de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2N e analisada em leitor de ELISA (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, EUA), a 450 nm. A concentração presente em cada amostra foi obtida pela comparação com a curva obtida das leituras dos valores das soluções padrões de citocinas recombinantes. A sensibilidade do Kit de ELISA foi de 5 pg/mL.

3.13. Determinação de nitrato

As determinações das concentrações de nitrato no plasma, assim como no líquido cefalorraquidiano foram obtidas pela técnica de quimiluminescência NO/ozônio.

Os procedimentos foram realizados utilizando-se 20 μ L de plasma ou do líquido cefalorraquidiano, os quais foram desproteinizados por incubação com 40 μ L de etanol 95% a 4°C por 30 minutos e, centrifugados por 5 minutos a 5000g. Amostras do sobrenadante (10 μ L) foram injetadas em um vaso de reação contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N à 95°C) que converte o

nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é aspirado, usando gás hélio, para a câmara de quimiluminescência do aparelho Sievers NO Analysis (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.

3.14. Dosagem Hormonal

As amostras de plasma assim como as de neurohipófise foram processadas para a realização do radioimunoensaio para vasopressina (AVP).

A AVP foi extraída do plasma através do método acetona/éter de petróleo. Inicialmente em 1mL de plasma é acrescentado 2 mL de acetona e as amostras foram agitadas e centrifugadas a 3000 rpm, 20 min, 4°C. A seguir o sobrenadante foi colocado em um tubo contendo 2mL de éter de petróleo e a solução foi agitada. Após 5 minutos, temos a separação em duas fases líquidas onde a fase superior foi aspirada, sendo o restante liofilizado e estocado a -20°C até a análise. No momento do ensaio, as amostras plasmáticas são ressuspensas com 250 μL de tampão do ensaio para a vasopressina.

As neurohipófises foram homogeneizadas em 200 μL de HCl 0,1N e 50 μL do homogeneizado foi utilizado para dosagem de proteínas totais sendo o restante utilizado para quantificação de vasopressina. No momento do ensaio, o homogeneizado foi diluído à 1:40.000 com tampão de ensaio para vasopressina.

3.15. Radioimunoensaio da vasopressina

Para a determinação das concentrações plasmáticas e neurohipofisárias de AVP foram utilizados reagentes e protocolos de incubação comuns.

Os tampões foram Na_2HPO_4 (0,062M) e Na_2EDTA (0,013M) com 0,5% BSA em pH 7,5 e o peptídeo marcado com ^{125}I foi de fonte comercial (DupontCo., Boston, MA, USA). O ensaio não-equilibrado foi realizado com volume de incubação de 500 μL e tempo de incubação de 4 dias a 4°C. A concentração de AVP foi medida com

anti-soro de diluição final 1:60.000. O anti-soro foi específico sem reação cruzada com outros peptídeos conhecidos. O hormônio marcado foi separado do não marcado por um anticorpo secundário produzido no laboratório do Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues (FMRP-USP), onde o radioimunoensaio foi realizado. A dose mínima detectável foi de 0,09 pg/tubo. As concentrações plasmáticas de AVP (expressas em pg de AVP/ml de plasma) são calculadas levando em conta a correção pelo volume de plasma. Já para obter as concentrações neurohipofisárias, além do volume ainda é levada em consideração a concentração proteica do homogeneizado neurohipofisário, sendo a concentração final expressa em pg de AVP/ μ g de proteína.

3.16. Dosagem de proteína total da neurohipófise

Alíquotas de 10 μ L dos homogeneizados da neurohipófise foram utilizados para dosagem de proteína pelo método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976). Todas as leituras foram realizadas utilizando-se o fotocolorímetro (Microplater reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) no comprimento de onda de 595 nm. O conteúdo da proteína tissular foi expresso em μ g/ μ L.

3.17. Determinação da atividade das NOS

A determinação da atividade das NOS foi realizada segundo modificação do método da citrulina descrito por Bredt e Synder (Bredt; Snyder, 1990).

Os hipotálamos removidos foram homogeneizados em 200 μ L de tampão de homogeneização (TrisHCl 50 mM, pH 7.4, 320mM sacarose, 1 mM EDTA, 10 μ g/ml Leupeptina, 1 mM de DTT, 2 μ g/ml de aprotinina, 1 mM PMSF e 10 μ g/ml de inibidor de proteases (Roche C11836145001)). Os homogeneizados foram centrifugados (10 min., 10000g, 4°C) e o sobrenadante dividido em 4 tubos contendo 3 deles 40 μ L para determinação da atividade das enzimas NOS e 10 μ L para dosagem de proteínas.

Em um dos tubos utilizados para a determinação da atividade das enzimas foram adicionados apenas 100 μ L de tampão do ensaio (50mM de KH_2PO_4 ; 1,2mM de MgCl_2 ; 0,25mM de CaCl_2 ; 0,12mM de β -NADPH; 60mM de L-valina; 1,2mM de L-citrulina; 22,5mM de L-arginina; 4mM de FMN; 50mM de BH_4 ; 4mM de FAD; 1mM de DTT e 80,000 cpm [^{14}C]-Larginina). No outro foram adicionados 100 μ L de tampão de ensaio contendo inibidores da NOS (L-NAME 1mM e cloridrato de aminoguanidina

22,5mM). No último foram adicionados 100 µl de tampão de ensaio contendo quelante de Cálcio (EGTA 10mM), para inibir as isoformas constitutivas.

Após incubação de uma hora em temperatura ambiente a reação nos três tubos foi parada com a adição de 1 ml de resina de troca iônica DOWEX 50W em suspensão, a 4°C, previamente ativada com NaOH e diluída em HEPES 100 mM, 10 mM EDTA, pH 5,5. Após agitação a resina contendo L-arginina não utilizada foi removida por centrifugação (10000g, 10 min) e 400 µl de sobrenadante contendo L-citrulina marcada foram adicionados a 3 ml de líquido de cintilação (Ecolite / ICN - 882475). A radioatividade foi determinada em contador de cintilação beta.

O quarto tubo contendo 10 µl da alíquota foi utilizado para determinar a concentração de proteína pelo método de Bradford – Comassie Plus Protein Assay Reagent (ThermoCientific –1856210).

Através da diferença de radiação lida entre os 3 tubos teste, e a correção pela concentração proteica do sobrenadante deste quarto tubo, é determinada as atividades totais das diferentes isoformas da NOS, a atividade das NOS constitutivas e a atividade das NOS induzíveis, sendo ambas expressas como picomoles de [¹⁴C]-L-citrulina/mg de proteína/min.

3.18. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média ± erro padrão da média (EPM) e analisados utilizando ANOVA TWO-WAY seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. Valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente diferentes. O número de animais (n) esta apresentado no texto e/ou na legenda das figuras.

4. RESULTADOS

4.1. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a vasopressina plasmática

As análises estatísticas revelaram que as concentrações plasmáticas de AVP são alteradas pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,46)} = 119,24$; $P < 0,001$) e ao longo do tempo ($F_{(2,46)} = 27,52$; $P < 0,001$), sendo possível observar também interação entre ambos ($F_{(2,46)} = 26,61$; $P < 0,001$). O pós-teste, mostrou que no grupo OF não há alteração nas concentrações plasmáticas de AVP em nenhum dos tempos analisados. Já no grupo CLP houve aumento em 2 e 6 horas após a cirurgia ($P < 0,05$). Entretanto 24 horas após a cirurgia as concentrações plasmáticas do hormônio retornaram aos níveis basais, não apresentando diferença em relação ao OF ($P > 0,05$) (Figura 4, Tabela 02 do Anexo).

Figura 4. Concentração plasmática de vasopressina em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, ° $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo e ° $P < 0,05$ comparado ao grupo 6h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.2. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a vasopressina neurohipofisária

As análises estatísticas revelaram que os conteúdos neurohipofisários de AVP são alterados pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,57)} = 18,12$; $P < 0,001$), mas não ao longo do tempo ($F_{(2,57)} = 1,11$; $P > 0,05$), apesar de ser possível observar interação entre ambos ($F_{(2,57)} = 4,23$; $P = 0,019$). O pós-teste, revelou que no grupo OF não há alteração na concentração neurohipofisária de AVP em nenhum dos tempos analisados. Já os grupos estimulados com CLP apresentaram, em relação ao grupo

OF, diminuição 2 e 6 horas após a cirurgia ($P<0,05$), retornado aos níveis basais em 24 horas ($P<0,05$) (Figura 5, Tabela 03 do Anexo).

Figura 5. Concentração neurohipofisária de vasopressina em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P<0,05$ comparado com OF no mesmo tempo e ° $P<0,05$ comparado ao grupo 6h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.3. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o sódio sérico

As análises estatísticas revelaram que as concentrações do sódio sérico são alteradas pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,62)} = 21,31$; $P<0,001$) e ao longo do tempo ($F_{(3,62)} = 28,92$; $P<0,001$), sendo possível observar também interação entre ambos ($F_{(3,62)} = 3,07$; $P=0,034$). O pós-teste revelou que no grupo OF há uma diminuição do sódio sérico em 2 e 6 horas retornando aos níveis basais em 24 horas. Já os grupos estimulados com CLP, as concentrações do sódio sérico apresentaram uma redução em 2, 6 e 24 horas, sendo que nesta última mostrou uma tendência a retornar para valores basais ($P<0,05$). Observamos uma diminuição do sódio sérico nos grupos CLP em relação ao OF em 6 e 24 horas ($P<0,05$) (Figura 6, Tabela 04 do Anexo).

Figura 6. Sódio sérico em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo, † $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo e ° $P < 0,05$ comparado ao grupo 6h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.4. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o hematócrito

As análises estatísticas revelaram que os hematócritos são alterados pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,63)} = 117,61$; $P < 0,001$) e ao longo do tempo ($F_{(3,63)} = 58,58$; $P < 0,001$), sendo possível observar também interação entre ambos ($F_{(3,63)} = 12,53$; $P < 0,001$). O pós-teste revelou que no grupo OF ocorreu um aumento em 2 e 6 horas e uma diminuição em 24 horas após a cirurgia. Já nos grupos CLP, os hematócritos aumentaram 2, 6 e em 24 horas, embora neste último tempo o aumento foi menor quando comparado aos outros dois primeiros ($P < 0,05$). Comparando os dois grupos dentro dos mesmos tempos, observamos um aumento do hematócrito nos grupos CLP em relação ao OF em 2, 6 e 24 horas ($P < 0,05$) (Figura 7, Tabela 05 do Anexo).

Figura 7. Hematócrito em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo, + $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo e ° $P < 0,05$ comparado ao grupo 6h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.5. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a proteína plasmática

As análises estatísticas revelaram que as concentrações de proteínas plasmáticas são alteradas pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,63)} = 99,35$; $P < 0,001$) e ao longo do tempo ($F_{(3,63)} = 48,46$; $P < 0,001$), sendo possível observar também interação entre ambos ($F_{(3,63)} = 30,14$; $P < 0,001$). O pós-teste revelou uma leve diminuição nas concentrações de proteínas plasmáticas em 6 horas seguida de um aumento em 24 horas no grupo OF. Já nos grupos estimulados com CLP, as concentrações de proteínas plasmáticas diminuíram 2, 6 e 24 horas após a CLP ($P < 0,05$). Comparando os dois grupos dentro dos mesmos tempos, observamos um aumento das concentrações de proteínas plasmáticas nos grupos CLP em relação ao OF em 0h e uma diminuição nos demais tempos ($P < 0,05$) (Figura 8, Tabela 06 do Anexo).

Figura 8. Proteínas plasmáticas em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo, † $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo e ‡ $P < 0,05$ comparado ao grupo 6h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.6. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a Interleucina-1 β plasmática

As análises estatísticas revelaram que as concentrações plasmáticas de Interleucina 1 β (IL-1 β) são alteradas pelo estímulo séptico ($F_{(1,68)} = 27,08$; $P < 0,001$) e ao longo do tempo ($F_{(3,68)} = 12,26$; $P < 0,001$), sendo possível observar também interação entre ambos ($F_{(3,68)} = 8,35$; $P < 0,001$). O pós-teste, revelou que no grupo OF não há alterações nas concentrações plasmáticas de IL-1 β em nenhum dos tempos analisados. Já os grupos estimulados com CLP apresentaram aumento 6 e 24 horas após a cirurgia, sendo de menor intensidade neste ultimo tempo ($P < 0,05$). Comparando os dois grupos dentro dos mesmos tempos, observamos um aumento das concentrações plasmáticas de IL-1 β nos grupos CLP em relação ao OF em 6 e 24h ($P < 0,05$) (Figura 9, Tabela 07 do Anexo).

Figura 9. Interleucina 1 β plasmáticas em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo, + $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo e ° $p < 0,05$ comparado ao grupo 6h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.7. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o nitrato plasmático

As análises estatísticas revelaram que as concentrações de nitrato plasmático são alteradas pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,122)} = 21,03$; $P < 0,001$) e ao longo do tempo ($F_{(3,122)} = 17,41$; $P < 0,001$), sendo possível observar também interação entre ambos ($F_{(3,122)} = 7,49$; $P < 0,001$). O pós-teste revelou um aumento apenas em 24 horas na concentração de nitrato plasmático no grupo OF. Já os grupos estimulados com CLP, as concentrações plasmáticas de nitrato aumentaram em 6 e 24 horas ($P < 0,05$) (Figura 10, Tabela 08 do Anexo).

Figura 10. Nitrato plasmático em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo e + $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.8. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o nitrato no líquido cefalorraquidiano

As análises estatísticas revelaram que as concentrações de nitrato no líquido cefalorraquidiano (LCR) são alteradas pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,62)} = 13,10$; $P < 0,001$), mas não ao longo do tempo ($F_{(3,62)} = 2,39$; $P = 0,077$), apesar de ser possível observar interação entre ambos ($F_{(3,62)} = 4,37$; $P = 0,007$). O pós-teste, revelou que no grupo OF não há alterações nas concentrações de nitrato no LCR em nenhum dos tempos analisados. Já dentro do grupo CLP, ocorreu aumento em 6 horas após a cirurgia ($P < 0,05$) (Figura 11, Tabela 09 do Anexo).

Figura 11. Nitrato no líquido cefalorraquidiano em animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo, + $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo e ° $p < 0,05$ comparado ao grupo 6h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.9. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a atividade das NOS totais no hipotálamo

As análises estatísticas revelaram que as atividades das NOS totais no hipotálamo são alteradas pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,79)} = 4,41$; $P = 0,039$) e ao longo do tempo ($F_{(3,79)} = 9,28$; $P < 0,001$), sendo possível observar também interação entre ambos ($F_{(3,79)} = 4,85$; $P = 0,004$). O pós-teste, revelou que no grupo OF não há alterações nas atividades das NOS totais hipotalâmicas em nenhum dos tempos analisados. Já os grupos estimulados com CLP apresentaram aumento em 6 e 24 horas após a cirurgia ($P < 0,05$). Comparando os dois grupos dentro dos mesmos tempos, observamos um aumento das atividades das NOS totais do hipotálamo nos grupos CLP em relação ao OF em 6h e 24h ($P < 0,05$) (Figuras 12 e 15, Tabela 10 do Anexo).

Figura 12. Atividade das NOS totais no hipotálamo de animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo e + $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.10. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a atividade das NOS constitutivas no hipotálamo

As análises estatísticas revelaram que as atividades das NOS constitutivas do hipotálamo não são alteradas pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,76)} = 3,73$; $P = 0,057$), mas sim ao longo do tempo ($F_{(3,76)} = 10,25$; $P < 0,001$), sendo possível observar interação entre ambos ($F_{(3,76)} = 4,36$; $P = 0,007$). O pós-teste, revelou que no grupo OF não há alterações nas atividades das NOS constitutivas hipotalâmicas em nenhum dos tempos analisados. Já os grupos estimulados com CLP apresentaram aumento em 6h e 24 horas após a cirurgia ($P < 0,05$). Comparando os dois grupos dentro dos mesmos tempos, observamos um aumento das atividades das NOS constitutivas do hipotálamo nos grupos CLP em relação ao OF em 6h e 24h ($P < 0,05$) (Figuras 13 e 15, Tabela 10 do Anexo).

Figura 13. Atividade das NOS constitutiva no hipotálamo de animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo e + $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

4.11. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a atividade das NOS induzíveis no hipotálamo

As análises estatísticas revelaram que as atividades das NOS induzíveis das do hipotálamo não são alteradas pelo estímulo séptico por CLP ($F_{(1,68)} = 0,78$; $P = 0,382$), mas sim ao longo do tempo ($F_{(3,68)} = 5,23$; $P = 0,003$), sendo possível observar interação entre ambos ($F_{(3,68)} = 3,47$; $P = 0,021$). O pós-teste, revelou que no grupo OF não há alterações nas atividades das NOS induzíveis hipotalâmicas em nenhum dos tempos analisados. Já os grupos estimulados com CLP apresentaram aumento em 0 e 24 horas após a cirurgia ($P < 0,05$). Comparando os dois grupos dentro dos mesmos tempos, observamos um aumento das atividades das NOS induzíveis do hipotálamo nos grupos CLP em relação ao OF apenas em 0h ($P < 0,05$) (Figuras 14 e 15, Tabela 10 do Anexo).

Figura 14. Atividade das NOS induzível no hipotálamo de animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparado com OF no mesmo tempo, # $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h no mesmo estímulo, ° $P < 0,05$ comparado ao grupo 2h no mesmo estímulo e ° $P < 0,05$ comparado ao grupo 6h no mesmo estímulo. Número de animais por grupo encontra-se entre parênteses na base de cada coluna.

Figura 15. Atividade das NOS no hipotálamo de animais submetidos à operação fictícia (OF) e ligadura e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média $\pm$ EPM. * $P < 0,05$ comparados aos valores basais (OF, 0h).

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo, nós avaliamos temporalmente as alterações causadas pela sepse experimental induzida por CLP na concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano (LCR) e nas atividades enzimáticas das oxido nítrico sintases (NOS_t, NOS_c e NOS_i) no hipotálamo de ratos. Também foram verificadas as alterações nos níveis de AVP plasmática e neurohipofisária, assim como no de IL-1, nitrato e proteína plasmáticos, sódio séricos e hematócrito.

O desenvolvimento e evolução do quadro de sepse nos animais após a CLP foram observados através da presença dos sintomas típicos bem descritos, que incluem: piloereção, letargia, diarreia, dilatação abdominal, exsudato ao longo dos olhos e nariz, além de alta mortalidade em períodos mais avançados (Mansart *et al.*, 2003; Torres-Duenas *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2007; Pancoto *et al.*, 2008; Athayde *et al.*, 2009; Fernandes *et al.*, 2009; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011). Estas características não estavam presentes nos animais controles (OF).

Os animais submetidos à CLP apresentaram um padrão de secreção bifásico de vasopressina como vem sendo comumente descrito no decorrer dos quadros de sepse clínica e experimental. Como já mencionado anteriormente, na fase inicial da sepse é observada uma elevada concentração plasmática de AVP, a qual diminui com a evolução do processo fisiopatológico chegando a níveis basais, apesar da significativa queda da pressão arterial e hipovolemia. Isto contribui ainda mais para o agravamento da hipotensão e consequente choque séptico (Landry *et al.*, 1997; Giusti-Paiva; Ruginsk; *et al.*, 2003; Sharshar *et al.*, 2003; Westphal *et al.*, 2004; Correa *et al.*, 2007; Pancoto *et al.*, 2008; Athayde *et al.*, 2009; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009).

Uma das hipóteses propostas para as baixas concentrações plasmáticas de AVP na fase tardia da sepse seria a diminuição dos estoques neurohipofisários postulada por Holmes (Holmes *et al.*, 2001), inferida posteriormente por análise de ressonância magnética em humanos (Sharshar *et al.*, 2002) e finalmente quantificada por RIA em ratos (Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009).

Os nossos dados se opõem a esta hipótese, pois apesar de haver uma queda dos estoques em 2 e 6 horas após a CLP, causada provavelmente pela excessiva liberação de AVP, os animais apresentaram uma recuperação dos estoques neurohipofisários em 24 horas após a CLP, corroborando os resultados anteriores de nosso laboratório (Athayde *et al.*, 2009; Coelho, 2009). Esta recuperação dos estoques neurohipofisários de AVP também foi vista no modelo de endotoxemia por

LPS, 6 horas após estímulo (Giusti-Paiva *et al.*, 2002), sugerindo que a diminuição dos estoques deste hormônio não seria o principal motivo de seus baixos níveis plasmáticos na fase tardia.

Estes achados indicam a existência de outros mecanismos mais importantes para esta deficiência na secreção de AVP, como alterações dos reflexos autonômicos (Holmes *et al.*, 2001; Pancoto *et al.*, 2008) e/ou excessiva produção de mediadores inflamatórios como o óxido nítrico (NO) no sistema nervoso central, que poderiam inibir a síntese e liberação deste hormônio (Holmes *et al.*, 2001; Giusti-Paiva *et al.*, 2002; Giusti-Paiva *et al.*, 2005; Carnio *et al.*, 2006; Rocha *et al.*, 2006; Correa *et al.*, 2007).

Como a osmolalidade plasmática, a hipovolemia e a hipotensão são descritas como os estímulos mais potentes para a liberação da AVP (Dunn *et al.*, 1973; Cunningham; Sawchenko, 1991; Kadekaro *et al.*, 1992), procuramos avaliar a participação dos mesmos nesta resposta bifásica, através da medida indireta de proteína plasmática, sódio sérico e hematócrito.

As alterações na osmolalidade plasmática, que são determinadas principalmente por alterações nas concentrações de sódio e em menor grau nas de proteínas plasmáticas, podem regular tanto a secreção de AVP como a sede. O aumento da osmolalidade plasmática leva à ativação de osmorreceptores hipotalâmicos localizados em regiões desprovidas de barreira hematoencefálica dos *órgãos circunventriculares* (CVOs) principalmente o *órgão subfornical* (SFO) e o *organum vasculosum da lamina terminalis* (OVLT). A ativação dessas estruturas, além de promover sede por ativar o SFO, é sinalizada através das múltiplas conexões aos SON e PVN estimulando a síntese e liberação de AVP (Dunn *et al.*, 1973; McKinley *et al.*, 2004).

Apesar de não termos efetuado a medida direta da osmolalidade, nós encontramos uma redução significativa nas concentrações de sódio sérico (eletrólito mais abundante no plasma) em 2 e 6 horas após a CLP, a qual teve uma ligeira recuperação em 24 horas, mas não o suficiente para retornar aos níveis basais. Esta redução de sódio juntamente com os resultados de osmolalidade observados em estudos anteriores de nosso laboratório (Correa *et al.*, 2007; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009) nos permite inferir que os animais apresentaram uma redução da osmolalidade nestes mesmos períodos. Esta redução provavelmente está ocorrendo devido a uma diluição do fluido corporal causada pelo aumento da ingestão hídrica e

nenhuma alteração na diurese, como observado visualmente neste estudo, mas comprovada em estudos prévios (Correa *et al.*, 2007; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009).

Esta diminuição da concentração de sódio sérico e da osmolalidade plasmática se opõe ao padrão de secreção de AVP encontrada no quadro de sepse. Em 2 e 6 horas após CLP, a redução de sódio e osmolalidade favoreceria a redução dos níveis de AVP, mas nestes tempos foram registrados níveis elevados do hormônio no plasma. Já em 24 horas, quando se tem uma tendência à recuperação dos níveis de sódio, que poderia contribuir para aumentar a secreção de AVP, as concentrações hormonais plasmáticas caem a níveis basais.

Isto revela que o padrão de secreção bifásica da AVP é independente da osmolalidade e sódio sérico, indicando uma maior participação das alterações volêmicas, da pressão arterial e dos mediadores inflamatórios em sua regulação.

A hipovolemia é uma alteração fisiológica frequentemente presente na fase inicial da sepse devido ao extravasamento de líquido, eletrólitos e proteínas intravasculares para o interstício e cavidade peritoneal. Esse fenômeno ocorre por ação de enzimas proteolíticas agindo sobre as células endoteliais, aumentando os espaços entre elas e, conseqüentemente, a permeabilidade vênular. As ativações destas enzimas são estimuladas pelo aumento na produção de mediadores inflamatórios como o NO, citocinas, proteínas de complemento e os LTs (Parrillo, 1993; Andrew *et al.*, 2000; Fishel *et al.*, 2003; Benjamim *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2007; Pancoto *et al.*, 2008; Athayde *et al.*, 2009; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009). Sabendo que o extravasamento de líquido, eletrólitos e proteínas intravasculares causa hipovolemia com retenção das hemácias (Landry; Oliver, 2001; Benjamim *et al.*, 2005), a mesma pode ser avaliada indiretamente pelo aumento de hematócrito (Takanishi *et al.*, 2008) e diminuição da concentração de proteína plasmática.

Realmente observamos um aumento do hematócrito em 2 e 6 horas com uma tendência de retornar a níveis basais em 24 horas após a cirurgia CLP, juntamente com uma redução da concentração de proteínas plasmáticas em 2, 6 e 24 horas corroborando os trabalhos anteriores de nosso grupo (Oliveira *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2007; Pancoto *et al.*, 2008; Athayde *et al.*, 2009; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009).

Embora não tenhamos verificado diretamente a hipovolemia e a pressão arterial, os resultados apresentados de hematócrito e proteína plasmática e os descritos em estudos prévios (Torres-Duenas *et al.*, 2006; Pancoto *et al.*, 2008;

Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009), nos permitem inferir que os animais submetidos à CLP apresentaram um provável quadro de hipovolemia e hipotensão.

Tanto a hipovolemia como a hipotensão são capazes de ativarem mecanorreceptores localizados em regiões de baixa e alta pressão, os quais enviam sinais através dos nervos vago e glossofaríngeo para as regiões autonômicas do tronco cerebral. O *núcleo do trato solitário* (NTS), *área postrema* (AP) e *bulbo ventrolateral medial* (VLM) são importantes regiões de integração sináptica para os reflexos que irão resultar nas respostas autonômicas e neuroendócrinas para manutenção do volume e pressão sanguínea, culminando com os estímulos enviados aos núcleos: PVN e SON, para a síntese de AVP e seu posterior transporte e liberação na neurohipófise, e ativação do órgão subfornicial (SFO) promovendo sede (Johnson; Thunhorst, 1997; Mckinley *et al.*, 2004; Bruhn *et al.*, 2009).

Além disso, a hipovolemia e a hipotensão promovem a liberação de renina pelo rim que leva à formação de angiotensina II (ANG II), um potente indutor da sede, vasoconstritor e promotor da secreção de aldosterona pelo córtex adrenal. A ANG II circulante, através da ligação com seus receptores, é capaz de ativar os *órgãos circunventriculares* (CVOs) como o *órgão subfornical* (SFO) e *organum vasculosum da lamina terminalis* (OVLT). A ativação dessas estruturas, além de promover sede por ativar o SFO, é sinalizada através das múltiplas conexões aos SON e PVN estimulando a síntese e liberação da AVP (Cunningham; Sawchenko, 1991; Johnson; Thunhorst, 1997; Mckinley *et al.*, 2004).

Nós acreditamos que o aumento da concentração plasmática de AVP em 2 e 6 horas após CLP pode ser atribuída, em parte, à hipovolemia e hipotensão, mas as mesmas não explicam os baixos níveis do hormônio em 24 horas, pois os animais apresentam um agravamento da hipovolemia e hipotensão neste tempo, que são estímulos para a liberação de AVP.

Estes achados evidenciam a existência de outros fatores mais importantes que a hipovolemia e hipotensão, para o controle da secreção bifásica de AVP durante a sepse. Um destes fatores pode ser os mediadores inflamatórios, excessivamente liberados nesta condição, que podem direta ou indiretamente chegar ao sistema nervoso central e alterar a atividade de neurônios envolvidos em diferentes funções orgânicas, como autonômicas e neuroendócrinas (Correa *et al.*, 2007; Pancoto *et al.*, 2008; Athayde *et al.*, 2009; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009).

Os principais mediadores inflamatórios liberados durante a sepse são óxido nítrico (NO), interleucinas (IL1, IL-6, IL-8, IL-12), fator de necrose tumoral α (TNF- α), leucotrienos (LTs), interferon gama (IFN- γ), fator ativador de plaquetas (PAF) e prostaglandinas (PGs) (Annane *et al.*, 2005; Sriskandan; Altmann, 2008; Athayde *et al.*, 2009).

O TNF- α vem sendo descrito como a primeira citocina a aparecer em processos infecciosos e suas concentrações diminuem progressivamente e ao mesmo tempo em que estimula o aparecimento da IL-1 β que por sua vez afeta a produção de IL-6 (Walley *et al.*, 1996; Ebong *et al.*, 1999).

Em nosso estudo não foram analisados os níveis plasmático de TNF- α , pois os mesmos foram indetectáveis no plasma conforme testes realizados previamente em nosso laboratório e resultados descritos em estudos com camundongos, que mostram que o TNF- α pode estar presente no plasma após sepse, porém em concentrações muito baixas (Ebong *et al.*, 1999).

As concentrações plasmáticas de IL-1 β mostraram um aumento a partir da 6 horas após a CLP com uma pequena redução em 24 horas, mas permanecendo elevada em relação a 0 e 2 horas.

O LPS e as citocinas circulantes, especialmente, a IL-1 β , estimulam a expressão de mediadores inflamatórios no cérebro através de estruturas contidas nos CVOs (Rivest *et al.*, 2000). Estas estruturas que são altamente vascularizadas e desprovidas de barreira hematoencefálica (BHE) promovem a comunicação bilateral entre o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC) (Wong; Bongiorno; *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1997; Rivest *et al.*, 2000).

As células endoteliais das paredes vasculares dos CVOs e de glias perivasculares expressam constitutivamente o receptor tipo1 de IL-1, que quando ativado induz a expressão de NOSi e também da própria IL-1 β (Wong; Bongiorno; *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1997).

Apesar destas citocinas (TNF- α , IL1- β e IL-6) poderem influenciar, em parte, a secreção de AVP (Brooks; Gibson, 1992; Landgraf *et al.*, 1995; Palin *et al.*, 2009), elas não parecem ser as mais importantes.

Nós observamos que após 2 horas da CLP os níveis de IL-1 β não estão elevados e a concentração plasmática de AVP já aumentou e em 24 horas a IL-1 β ainda se encontra elevada apesar das concentrações hormonais terem retornado aos valores basais.

Outro mediador que vem ganhando destaque na fisiopatologia da sepse é o NO, devido aos seus diferentes sítios de atuação e a presença de muitos dados contraditórios. O NO, no local da infecção, promove aumento da defesa do hospedeiro por sua atividade bactericida, vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo na microcirculação e prevenção da adesão plaquetária e leucocitária, já sua ação periférica inclui vasodilatação periférica, hipotensão grave e hiporresponsividade a agentes vasoconstritores (Moncada *et al.*, 1991; Thiernemann, 1997; Benjamim *et al.*, 2000; Feihl *et al.*, 2001; Benjamim *et al.*, 2002; Fernandes *et al.*, 2006; Rios-Santos *et al.*, 2007). Já centralmente ele pode participar da neurotransmissão e modulação neuroendócrina (Brann *et al.*, 1997; Kadekaro, 2004; Giusti-Paiva *et al.*, 2005), além de regular o fluxo sanguíneo em regiões importantes, como por exemplo, na neurohipófise (Thiernemann, 1997; Feihl *et al.*, 2001; Moncada; Higgs, 2006).

O índice de produção de NO pode ser avaliado por meio da dosagem de nitrato que é o produto da oxidação do NO, como proposto por Krafte-Jacobs (Krafte-Jacobs *et al.*, 1997).

Em nossos experimentos, os animais submetidos à CLP apresentaram as concentrações plasmáticas de nitrato aumentadas em 6 e 24 horas, concordando com resultados de outros estudos do grupo que mostraram aumento a partir da 4ª hora após o início da sepse polimicrobiana (Correa *et al.*, 2007; Pancoto *et al.*, 2008; Athayde *et al.*, 2009; Oliveira-Pelegrin *et al.*, 2009).

O aumento de nitrato plasmático observado se deve principalmente ao aumento da expressão e atividade da NOSi periférica. A presença de componentes bacterianos, como o LPS e/ou LTA, ativam vias intracelulares para induzir a expressão da NOSi, a qual necessita do período de algumas horas até ser detectada em macrófagos e tecidos de animais como células endoteliais e/ou da musculatura lisa vascular (Chesrown *et al.*, 1994; Spink *et al.*, 1995; Le Roy *et al.*, 1998; Shieh *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2006).

Este aumento na produção do NO pela ativação da NOSi leva a uma potente vasodilatação periférica, aumento da permeabilidade vascular e queda na pressão arterial (Xia; Krukoff, 2001; Giusti-Paiva *et al.*, 2002; Giusti-Paiva; Branco; *et al.*, 2003; Giusti-Paiva; Ruginsk; *et al.*, 2003).

Como a queda na pressão arterial é estímulo para a secreção de AVP, a mesma poderia contribuir, pelo menos em parte, para o aumento das concentrações

plasmáticas deste hormônio em 6 horas. De fato isto foi comprovado em um estudo prévio de nosso laboratório, que o bloqueio seletivo da NOSi periférica com Aminoguanidina (AG) foi capaz de reverter a hipotensão e reduzir a concentração plasmática de AVP após 6 horas da CLP (Correa *et al.*, 2007).

Apesar desta ação periférica do aumento da produção de NO conseguir promover a queda na pressão arterial e consequentemente causar uma elevação nas concentrações plasmáticas de AVP nas fases iniciais da sepse, ela não permite explicar os níveis basais deste hormônio em 24 horas após a CLP. Neste tempo, a produção periférica de NO está elevada, como visto pelas concentrações plasmáticas de nitrato, contribuindo para o agravamento da hipotensão apresentada pelos animais, que seria estímulo a secreção de AVP, mas a mesma não ocorre. Porém, estes achados não excluem a participação do NO na secreção hormonal neste período, pois o mesmo pode ocorrer diretamente no SNC, independente da regulação cardiovascular.

Diferentes estímulos para a liberação de AVP (processos infecciosos, estimulação osmótica, desidratação, expansão do volume sanguíneo e hipovolemia) são citados como indutores de um aumento na expressão do RNAm e/ou da própria enzima e/ou ainda das atividades das diferentes isoformas da NOS em neurônios vasopressinérgicos, sugerindo uma ação moduladora do NO na síntese de AVP (Kadowaki *et al.*, 1994; Villar *et al.*, 1994; Ueta *et al.*, 1995; Hatakeyama *et al.*, 1996; Ueta *et al.*, 1998; Holmes *et al.*, 2001; Serino *et al.*, 2001; Ventura *et al.*, 2002; Yao *et al.*, 2005; Ryu *et al.*, 2008; Aguila *et al.*, 2011).

Entretanto os estudos sobre a função do NO na liberação de AVP têm apresentado inúmeras divergências, ora mostrando efeito estimulatório (Ota *et al.*, 1993; Raber; Bloom, 1994; Cao *et al.*, 1996; Yamaguchi *et al.*, 2000; Ventura *et al.*, 2002; Yamaguchi; Hama, 2003; Ventura *et al.*, 2005; Correa *et al.*, 2007), ora inibitório (Yasin *et al.*, 1993; Lutz-Bucher; Koch, 1994; Liu *et al.*, 1997; Kadekaro *et al.*, 1998; Kadekaro; Summy-Long, 2000; Stern; Ludwig, 2001; Giusti-Paiva *et al.*, 2002; Terrell *et al.*, 2003; Carnio *et al.*, 2005) dependendo do contexto fisiopatológico e temporal analisado, assim como das vias de administração e dos inibidores e doadores de NO utilizados nos estudos.

Nos animais submetidos à CLP, a dosagem de nitrato no líquido cefalorraquidiano mostrou um aumento em suas concentrações 6 horas após a

indução da sepse, com posterior redução em 24 horas, mostrando um perfil diferente do encontrado perifericamente que permanece elevado neste período.

Wong e colaboradores (Wong; Rettori; *et al.*, 1996) demonstraram que 6 horas após a endotoxemia causada por administração i.p. de LPS, ocorre um aumento tanto de mRNA para NOSi quanto de nitrato no líquido cefalorraquidiano. As concentrações de nitrato no líquido cefalorraquidiano devem estar relacionadas com a produção do NO pela atividade enzimática das oxido nítrico sintases (NOS) em regiões periventriculares e sua capacidade de difundir pelas membranas celulares chegando até as cavidades ventriculares (Wong; Rettori; *et al.*, 1996).

Estudo feito em secções hipotalâmicas *in vitro*, mostrou aumento da secreção de AVP com a adição de doador de NO e diminuição com o uso de inibidores da NOS (Raber; Bloom, 1994). Um aumento transitório dose dependente da liberação deste hormônio também foi visto *in vivo* após administração i.c.v. de doador de NO ou L-arginina (substrato da NOS) em ratos (Ota *et al.*, 1993; Cao *et al.*, 1996).

Estes estudos sugerem que o NO seria estimulatório para a secreção de AVP. Assim, a queda na produção central de NO em 24 horas após a CLP poderia ser, pelo menos parcialmente, responsável pela diminuição da secreção de AVP refletida nas concentrações plasmáticas basais deste hormônio neste período.

No intuito de avaliar alterações na atividade das NOS hipotalâmicas, que podem refletir na produção do NO após indução de sepse, analisamos a produção de L-citrulina em hipotálamo *ex-vivo* de ratos pelo método modificado de Bredt e Synder (Bredt; Snyder, 1990). Observamos que ocorre um aumento na atividade da NOS total em 6 e 24 horas após a CLP, e este aumento é causado quase que exclusivamente pela atividade da NOS constitutiva.

Em 24 horas ocorre um aumento nas atividades das NOS induzidas, mas devido às diferenças nas grandezas em relação as NOS constitutivas (50 a 100 vezes), as primeiras parecem não influenciar de maneira significativa nas atividades das NOS totais, como fica mais evidente na observação da figura 15 dos resultados, em que as atividades das NOS estão apresentadas juntas em um gráfico de mesma escala.

Este aumento nas atividades das NOS totais, *ex vivo*, em 24 horas não implica na maior produção de NO no SNC, já que, como mencionado anteriormente, este estudo foi realizado em condições ideais de substratos, temperatura, e ausência de muitas outras substâncias contidas no SNC que poderiam interferir na

produção do NO. O aumento das atividades, observadas neste estudo, nos permite apenas inferir que as enzimas NOS estão presentes em suas formas viáveis na região hipotalâmica.

A aparente discrepância entre a redução da produção de NO observada pela queda na concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano e a manutenção da elevada atividade observada em 24 horas, no estudo *ex vivo*, pode ser explicada pelas condições que a NOS está sendo exposta durante a fisiopatologia da sepse no SNC do animal.

Para que as diferentes isoformas das NOS exerçam suas atividades e consequente produção do NO é necessário a presença de alguns cofatores como oxigênio (O_2), nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fostato-hidrogênio (NADPH), flavinas e biopterinas. As isoformas ditas constitutivas (NOS_n e NOS_e) ainda dependem da presença de íons Cálcio (Ca^{2+}) para exercer sua atividade.

A presença de quantidades apropriadas do substrato L-arginina (aminoácido semi-essencial produzido no organismo, em quantidade insuficiente) e a ausência de substâncias inibidoras, com capacidade de se ligarem aos sítios ativos e inibirem a síntese enzimática, ainda são pré-requisitos para a produção de NO pelas enzimas (Wang; Marsden, 1995).

Como já descrito anteriormente a sepse pode progredir para a sepse grave e choque séptico, onde ocorrem as anormalidades circulatórias como: depleção do volume intravascular, vasodilatação periférica, depressão miocárdica e aumento do metabolismo. Estas anormalidades circulatórias levam ao desequilíbrio entre a necessidade e a demanda de oxigênio, resultando em hipóxia global ou choque a qual reflete na gravidade da doença (Takala *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2004).

Esta diminuição na disponibilidade de oxigênio que ocorre na fase tardia poderia contribuir em parte para uma diminuição da atividade enzimática no SNC (*in vivo*) e menor produção de NO central em 24 horas. Outra possibilidade é a deficiência de L-arginina, como substrato para a NOS, pelo fato do mesmo ser consumido durante as fases iniciais da sepse e a dificuldade de reposição devido à ineficiência do sistema circulatório nas fases mais tardias da sepse como é vista em animais em 24 horas. Assim, o experimento com o hipotálamo *ex vivo* pode não refletir exatamente o que estaria acontecendo na fase tardia da sepse *in vivo*.

Finalmente o monóxido de carbono (CO) vem sendo descrito como um provável modulador da atividade da NOS e formação da NO intracelular, pela sua

capacidade de se ligar ao grupamento heme das NOS e inibir suas atividades (White; Marletta, 1992).

O CO é produzido endogenamente pela ação da enzima heme oxigenase (HO) que através da clivagem do grupamento heme, produz CO, biliverdina e ferro. Esta enzima apresenta-se em mamíferos sob três isoformas: HO-1, HO-2 e HO-3, sendo as duas primeiras expressas em diversos tecidos, incluindo o SNC, podendo atuar nas neurotransmissões pela produção de CO (Maines, 1996; Snyder; Baranano, 2001; Boehning; Snyder, 2003; Gomes *et al.*, 2010).

Também foi visto que o NO exógeno/endógeno tem a capacidade de aumentar a expressão do gene HO-1 e consequentemente a produção e liberação de CO (Wagner *et al.*, 1997; Vesely *et al.*, 1998; Thorup *et al.*, 1999).

Tendo em vista estes achados, sugerimos que o aumento da produção central de NO em 6 horas após a CLP serviria, pelo menos em parte, como estímulo para a expressão da HO-1 e consequente aumento das concentrações de CO nas horas subsequentes. Este aumento de CO inibiria as enzimas NOS contidas nas regiões periventriculares, incluindo as do hipotálamo. Esta inibição diminuiria a produção de NO e sua consequente migração através das membranas até as cavidades ventriculares, o que refletiria na queda da concentração de nitrato no líquido cefalorraquidiano observado 24 horas após a indução da sepse por CLP.

Finalmente esta diminuição da produção central de NO, diminuiria a estimulação dos núcleos hipotalâmicos como o SON e PVN, promovendo a redução da síntese e posterior liberação de AVP refletindo na queda das concentrações plasmáticas deste hormônio, como observado em 24h.

Em síntese, nossos resultados demonstraram que a sepse provocou:

- a) Aumento nas concentrações plasmáticas de AVP em 2 e 6 horas após CLP, retornando a níveis basais em 24 horas;
- b) Diminuição das concentrações de sódio sérico em 6 e 24 horas após CLP;
- c) Diminuição das concentrações de proteína plasmática em 2, 6 e 24 horas após CLP;
- d) Aumento dos hematócritos em 2, 6 e 24 horas após CLP;
- e) Aumento das concentrações de IL-1 β plasmáticas em 6 e 24 horas após CLP, sendo nesta última em menor intensidade;

f) Aumento das concentrações de nitrato, no plasma em 6 e 24 horas e no líquido cefalorraquidiano apenas em 6 horas.

g) Aumento nas atividades hipotálamicas *ex vivo* das NOS totais e constitutivas em 6 e 24 horas após a CLP e levemente das NOS induzidas em 0 e 24 horas após a CLP (entretanto os resultados obtidos nos ensaios *ex vivo* pode não refletir o que está acontecendo exatamente *in vivo*).

6. CONCLUSÃO

6. Conclusão

As atividades das NOS observadas no hipotálamo *ex vivo* dos ratos sépticos, indicam a presença de formas viáveis das enzimas, sendo a isoforma constitutiva a mais relevante para a produção de NO nesta região. Já a concentração de nitrato basal no LCR observada 24 horas após a CLP, difere da de nitrato plasmático que está elevada no mesmo período, sugerindo um perfil diferenciado da produção de NO central em relação a periférica, e que este pode estar relacionado à secreção bifásica de AVP observada na sepse.

REFERÊNCIAS

- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-7, Aug 17 2000.
- AGUILA, F. A.; OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; YAO, S. T.; MURPHY, D.; ROCHA, M. J. Anteroventral third ventricle (AV3V) lesion affects hypothalamic neuronal nitric oxide synthase (nNOS) expression following water deprivation. **Brain Res Bull**, v. 86, n. 3-4, p. 239-45, Oct 10 2011.
- AKIRA, S. Toll-like receptor signaling. **J Biol Chem**, v. 278, n. 40, p. 38105-8, Oct 3 2003.
- 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, p. R60-5, Jan 2000.
- ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7 Suppl, p. S109-16, Jul 2001.
- ANNANE, D.; BELLISSANT, E.; CAVAILLON, J. M. Septic shock. **Lancet**, v. 365, n. 9453, p. 63-78, Jan 1-7 2005.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L. L.; VALENCA, M. M.; MCCANN, S. M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 169-208, Jan 2004.
- ATHAYDE, L. A. **Participação dos leucotrienos na secreção de vasopressina durante sepse experimental**. 2007. (Mestrado). Biociências aplicadas à Farmácia, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Ribeirão Preto.
- 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, p. 829-36, Jun 2 2009.
- BARBERIS, C.; MOUILLAC, B.; DURROUX, T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. **J Endocrinol**, v. 156, n. 2, p. 223-9, Feb 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, p. 1616-20, Feb 1 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, p. 214-23, Jul 2000.
- BENJAMIM, C. F.; SILVA, J. S.; FORTES, Z. B.; OLIVEIRA, M. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. **Infect Immun**, v. 70, n. 7, p. 3602-10, Jul 2002.

- BOEHNING, D.; SNYDER, S. H. Novel neural modulators. **Annu Rev Neurosci**, v. 26, p. 105-31, 2003.
- BONE, R. C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Intern Med**, v. 115, n. 6, p. 457-69, Sep 15 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, p. 1644-55, Jun 1992.
- BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H.; RICHARD, D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. **Front Neuroendocrinol**, v. 15, n. 3, p. 231-74, Sep 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, v. 72, p. 248-54, May 7 1976.
- BRANN, D. W.; BHAT, G. K.; LAMAR, C. A.; MAHESH, V. B. Gaseous transmitters and neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinology**, v. 65, n. 6, p. 385-95, Jun 1997.
- BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. **Nature**, v. 347, n. 6295, p. 768-70, Oct 25 1990.
- BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 87, n. 2, p. 682-5, Jan 1990.
- 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, p. 33-8, Jan 1992.
- BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Mol Aspects Med**, v. 26, n. 1-2, p. 3-31, Feb-Apr 2005.
- BRUHN, F. H.; CORREA, P. B.; OLIVEIRA-PELEGRI, G. R.; ROCHA, M. J. Blocking systemic nitric oxide production alters neuronal activation in brain structures involved in cardiovascular regulation during polymicrobial sepsis. **Neurosci Lett**, v. 453, n. 3, p. 141-6, Apr 10 2009.
- CAO, L.; SUN, X.; SHEN, E. Nitric oxide stimulates both the basal and reflex release of vasopressin in anesthetized rats. **Neurosci Lett**, v. 221, n. 1, p. 49-52, Dec 27 1996.
- CARNIO, E. C.; MORETO, V.; GIUSTI-PAIVA, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide

- in vasopressin and oxytocin release. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 137-42, Jun 2006.
- 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, p. 390-4, Sep 2005.
- CHAUDRY, I. H.; WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E. Effect of sepsis on tissue adenine nucleotide levels. **Surgery**, v. 85, n. 2, p. 205-11, Feb 1979.
- CHESROWN, S. E.; MONNIER, J.; VISNER, G.; NICK, H. S. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by LPS, INF-gamma, TGF-beta, and IL-10 in murine macrophage cell lines and rat peritoneal macrophages. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 200, n. 1, p. 126-34, Apr 15 1994.
- COELHO, C. H. **Análise da inibição da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na liberação de vasopressina durante sepse experimental**. 2009. 75 pag (Mestrado). Biociências Aplicadas à Farmácia, UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, Ribeirão Preto.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-91, Dec 19-26 2002.
- CONSIGLIO, A. R.; LUCION, A. B. Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. **Brain Res Brain Res Protoc**, v. 5, n. 1, p. 109-14, Feb 2000.
- 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, p. 17-25, Feb 2007.
- CUNNINGHAM, E. T., JR.; SAWCHENKO, P. E. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. **Trends Neurosci**, v. 14, n. 9, p. 406-11, Sep 1991.
- DAWSON, T. M.; BREDT, D. S.; FOTUHI, M.; HWANG, P. M.; SNYDER, S. H. Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, n. 17, p. 7797-801, Sep 1 1991.
- DE MAIO, A.; TORRES, M. B.; REEVES, R. H. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. **Shock**, v. 23, n. 1, p. 11-7, Jan 2005.
- DEITCH, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection. **Shock**, v. 24 Suppl 1, p. 19-23, Dec 2005.

- 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, p. 296-327, Jan 2008.
- DU VIGNEAUD, V. Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. **Harvey Lect**, v. 50, p. 1-26, 1954.
- DUNN, F. L.; BRENNAN, T. J.; NELSON, A. E.; ROBERTSON, G. L. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **J Clin Invest**, v. 52, n. 12, p. 3212-9, Dec 1973.
- EBONG, S.; CALL, D.; NEMZEK, J.; BOLGOS, G.; NEWCOMB, D.; REMICK, D. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. **Infect Immun**, v. 67, n. 12, p. 6603-10, Dec 1999.
- 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, p. 118-26, Aug 1999.
- 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 (Berl)**, v. 80, n. 1, p. 5-15, Jan 2002.
- ERLENBACH, I.; WESS, J. Molecular basis of V2 vasopressin receptor/Gs coupling selectivity. **J Biol Chem**, v. 273, n. 41, p. 26549-58, Oct 9 1998.
- ESMON, C. T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? **Crit Care Med**, v. 32, n. 5 Suppl, p. S219-22, May 2004.
- FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacol Ther**, v. 91, n. 3, p. 179-213, Sep 2001.
- FERNANDES, D.; DA SILVA-SANTOS, J. E.; DUMA, D.; VILLELA, C. G.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Nitric oxide-dependent reduction in soluble guanylate cyclase functionality accounts for early lipopolysaccharide-induced changes in vascular reactivity. **Mol Pharmacol**, v. 69, n. 3, p. 983-90, Mar 2006.
- FERNANDES, D.; SORDI, R.; PACHECO, L. K.; NARDI, G. M.; HECKERT, B. T.; VILLELA, C. G.; LOBO, A. R.; BARJA-FIDALGO, C.; ASSREUY, J. Late, but not early, inhibition of soluble guanylate cyclase decreases mortality in a rat sepsis model. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 328, n. 3, p. 991-9, Mar 2009.

- FISHEL, R. S.; ARE, C.; BARBUL, A. Vessel injury and capillary leak. **Crit Care Med**, v. 31, n. 8 Suppl, p. S502-11, Aug 2003.
- FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and septic shock: a history. **Crit Care Clin**, v. 25, n. 1, p. 83-101, viii, Jan 2009.
- GARRIDO, A. J.; POLI DE FIGUEIREDO, L. F.; ROCHA E SILVA, M. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 2, p. 82-88, Mar-Apr 2004.
- GEORGE, J. M.; JACOBOWITZ, D. M. Localization of vasopressin in discrete areas of the rat hypothalamus. **Brain Res**, v. 93, n. 2, p. 363-6, Aug 8 1975.
- GEROULANOS, S.; DOUKA, E. T. Historical perspective of the word "sepsis". **Intensive Care Med**, v. 32, n. 12, p. 2077, Dec 2006.
- 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, p. 175-80, Nov 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, p. 1306-10, Jun 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, p. 320-4, Jun 24 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, p. 21-4, Jul 31 2003.
- GLAUSER, M. P.; ZANETTI, G.; BAUMGARTNER, J. D.; COHEN, J. Septic shock: pathogenesis. **Lancet**, v. 338, n. 8769, p. 732-6, Sep 21 1991.
- GOMES, D. A.; GIUSTI-PAIVA, A.; VENTURA, R. R.; ELIAS, L. L.; CUNHA, F. Q.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Carbon monoxide and nitric oxide modulate hyperosmolality-induced oxytocin secretion by the hypothalamus in vitro. **Biosci Rep**, v. 30, n. 5, p. 351-7, Oct 2010.
- GUIX, F. X.; URIBESALGO, I.; COMA, M.; MUNOZ, F. J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. **Prog Neurobiol**, v. 76, n. 2, p. 126-52, Jun 2005.
- HANNA, N. Sepsis and septic shock. **Topics in Emergency Medicine**, v. 25, n. 2, p. 158-165, 2003.

- HATAKEYAMA, S.; KAWAI, Y.; UEYAMA, T.; SENBA, E. Nitric oxide synthase-containing magnocellular neurons of the rat hypothalamus synthesize oxytocin and vasopressin and express Fos following stress stimuli. **J Chem Neuroanat**, v. 11, n. 4, p. 243-56, Oct 1996.
- HAYNES, V.; ELFERING, S.; TRAASETH, N.; GIULIVI, C. Mitochondrial nitric-oxide synthase: enzyme expression, characterization, and regulation. **J Bioenerg Biomembr**, v. 36, n. 4, p. 341-6, Aug 2004.
- HILL, B. G.; DRANKA, B. P.; BAILEY, S. M.; LANCASTER, J. R., JR.; DARLEY-USMAR, V. M. What part of NO don't you understand? Some answers to the cardinal questions in nitric oxide biology. **J Biol Chem**, v. 285, n. 26, p. 19699-704, Jun 25 2010.
- 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, p. 427-34, Dec 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, p. 989-1002, Sep 2001.
- HOLMES, C. L.; RUSSELL, J. A.; WALLEY, K. R. Genetic polymorphisms in sepsis and septic shock: role in prognosis and potential for therapy. **Chest**, v. 124, n. 3, p. 1103-15, Sep 2003.
- 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, p. 52-7, Dec 2005.
- ILAS. **Relatório Nacional - Campanha Sobrevivendo à Sepsis**. INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. São Paulo: Março - 2012, p.14. 2012
- INNAMORATI, G.; SADEGHI, H.; BIRNBAUMER, M. A fully active nonglycosylated V2 vasopressin receptor. **Mol Pharmacol**, v. 50, n. 3, p. 467-73, Sep 1996.
- JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, v. 18, n. 3, p. 292-353, Jul 1997.
- KADEKARO, M. Nitric oxide modulation of the hypothalamo-neurohypophyseal system. **Braz J Med Biol Res**, v. 37, n. 4, p. 441-50, Apr 2004.
- KADEKARO, M.; SUMMY-LONG, J. Y. Centrally produced nitric oxide and the regulation of body fluid and blood pressure homeostases. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 27, n. 5-6, p. 450-9, May-Jun 2000.
- KADEKARO, M.; SUMMY-LONG, J. Y.; FREEMAN, S.; HARRIS, J. S.; TERRELL, M. L.; EISENBERG, H. M. Cerebral metabolic responses and vasopressin and

- oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. **Am J Physiol**, v. 262, n. 2 Pt 2, p. R310-7, Feb 1992.
- KADEKARO, M.; TERRELL, M. L.; LIU, H.; GESTL, S.; BUI, V.; SUMMY-LONG, J. Y. Effects of L-NAME on cerebral metabolic, vasopressin, oxytocin, and blood pressure responses in hemorrhaged rats. **Am J Physiol**, v. 274, n. 4 Pt 2, p. R1070-7, Apr 1998.
- KADOWAKI, K.; KISHIMOTO, J.; LENG, G.; EMSON, P. C. Up-regulation of nitric oxide synthase (NOS) gene expression together with NOS activity in the rat hypothalamo-hypophyseal system after chronic salt loading: evidence of a neuromodulatory role of nitric oxide in arginine vasopressin and oxytocin secretion. **Endocrinology**, v. 134, n. 3, p. 1011-7, Mar 1994.
- KNOWLES, R. G.; MONCADA, S. Nitric oxide synthases in mammals. **Biochem J**, v. 298 (Pt 2), p. 249-58, Mar 1 1994.
- KOVACS, G. L.; DE WIED, D. Hormonally active arginine-vasopressin suppresses endotoxin-induced fever in rats: lack of effect of oxytocin and a behaviorally active vasopressin fragment. **Neuroendocrinology**, v. 37, n. 4, p. 258-61, Oct 1983.
- KOVACS, G. L.; DE WIED, D. Peptidergic modulation of learning and memory processes. **Pharmacol Rev**, v. 46, n. 3, p. 269-91, Sep 1994.
- KOVACS, K. J. Neurohypophyseal hormones in the integration of physiological responses to immune challenges. **Prog Brain Res**, v. 139, p. 127-46, 2002.
- 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, p. 1588-93, Sep 1997.
- KUMAR, A.; WOOD, K.; PARRILLO, J. E. Circulating substances and energy metabolism in septic shock. **Crit Care Med**, v. 31, n. 2, p. 632-3, Feb 2003.
- 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, p. 592-8, Apr 1 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, p. 1122-5, Mar 4 1997.
- LANDRY, D. W.; OLIVER, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. **N Engl J Med**, v. 345, n. 8, p. 588-95, Aug 23 2001.
- LE ROY, D.; HEUMANN, D.; GLAUSER, M. P.; MAUEL, J.; SMITH, J.; BETZ CORRADIN, S. Nitric oxide production in experimental gram-negative

- infection: studies with cytokine receptor-deficient mice. **Shock**, v. 10, n. 1, p. 37-42, Jul 1998.
- 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. **Intensive Care Med**, v. 29, n. 4, p. 530-8, Apr 2003.
- LIN, N. T.; YANG, F. L.; LEE, R. P.; PENG, T. C.; CHEN, H. I. Inducible nitric oxide synthase mediates cytokine release: the time course in conscious and septic rats. **Life Sci**, v. 78, n. 10, p. 1038-43, Feb 2 2006.
- LIU, Q. S.; JIA, Y. S.; JU, G. Nitric oxide inhibits neuronal activity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamic slices. **Brain Res Bull**, v. 43, n. 2, p. 121-5, 1997.
- LUTZ-BUCHER, B.; KOCH, B. Evidence for an inhibitory effect of nitric oxides on neuropeptide secretion from isolated neural lobe of the rat pituitary gland. **Neurosci Lett**, v. 165, n. 1-2, p. 48-50, Jan 3 1994.
- MAINES, M. Carbon monoxide and nitric oxide homology: differential modulation of heme oxygenases in brain and detection of protein and activity. **Methods Enzymol**, v. 268, p. 473-88, 1996.
- MANSART, A.; BOLLAERT, P. E.; LEVY, B.; NICOLAS, M. B.; MALLIE, J. P. Comparative effects of dexamethasone and L-canavanine in experimental septic shock. **Eur J Pharmacol**, v. 475, n. 1-3, p. 61-7, Aug 15 2003.
- 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, p. 788-94, Mar 2000.
- MARTINS, T. F.; SORGI, C. A.; FACCIOLI, L. H.; ROCHA, M. J. Leukotriene synthesis inhibitor decreases vasopressin release in the early phase of sepsis. **J Neuroimmunol**, v. 238, n. 1-2, p. 52-7, Sep 15 2011.
- 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.
- MCKINLEY, M. J.; GERSTBERGER, R.; MATHAI, M. L.; OLDFIELD, B. J.; SCHMID, H. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. **J Clin Neurosci**, v. 6, n. 4, p. 289-301, Jul 1999.
- MCKINLEY, M. J.; MATHAI, M. L.; MCALLEN, R. M.; MCCLEAR, R. C.; MISELIS, R. R.; PENNINGTON, G. L.; VIVAS, L.; WADE, J. D.; OLDFIELD, B. J. Vasopressin secretion: osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. **J Neuroendocrinol**, v. 16, n. 4, p. 340-7, Apr 2004.

- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A., JR. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. **Cell**, v. 91, n. 3, p. 295-8, Oct 31 1997.
- MELVILLE, R. J.; FORSLING, M. L.; FRIZIS, H. I.; LEQUESNE, L. P. Stimulus for vasopressin release during elective intra-abdominal operations. **Br J Surg**, v. 72, n. 12, p. 979-82, Dec 1985.
- MELVILLE, R. J.; FRIZIS, H. I.; FORSLING, M. L.; LEQUESNE, L. P. The stimulus for vasopressin release during laparoscopy. **Surg Gynecol Obstet**, v. 161, n. 3, p. 253-6, Sep 1985.
- MOERER, O.; BURCHARDI, H. [The cost of sepsis]. **Anaesthesist**, v. 55 Suppl 1, p. 36-42, Jun 2006.
- MONCADA, S.; HIGGS, E. A. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br J Pharmacol**, v. 147 Suppl 1, p. S193-201, Jan 2006.
- MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, n. 2, p. 109-42, Jun 1991.
- MORGENTHALER, N. G.; STRUCK, J.; ALONSO, C.; BERGMANN, A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. **Clin Chem**, v. 52, n. 1, p. 112-9, Jan 2006.
- 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, p. 17-25, Jan 2004.
- OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; AGUILA, F. A.; BASSO, P. J.; ROCHA, M. J. Role of central NO-cGMP pathway in vasopressin and oxytocin gene expression during sepsis. **Peptides**, v. 31, n. 10, p. 1847-52, Oct 2010.
- 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, p. 45-53, Jan 2009.
- OLIVEIRA, G. R.; ELIAS, L. L. K.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; DA ROCHA, M. J. A. Time course of nitric oxide formation and secretion of vasopressin and oxytocin in an experimental model of polymicrobial sepsis. **Faseb Journal**, v. 19, n. 5, p. A1222-A1222, Mar 2005.
- OTA, M.; CROFTON, J. T.; FESTAVAN, G. T.; SHARE, L. Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release. **Neuroendocrinology**, v. 57, n. 5, p. 955-9, May 1993.
- PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, v. 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007.
- 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, p. E1289-99, Jun 2009.
- 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, p. 57-63, Feb 29 2008.
- PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, v. 328, n. 20, p. 1471-7, May 20 1993.
- PITTMAN, Q. J.; BAGDAN, B. Vasopressin involvement in central control of blood pressure. **Prog Brain Res**, v. 91, p. 69-74, 1992.
- PITTMAN, Q. J.; CHEN, X.; MOUIHATE, A.; HIRASAWA, M.; MARTIN, S. Arginine vasopressin, fever and temperature regulation. **Prog Brain Res**, v. 119, p. 383-92, 1998.
- PITTMAN, Q. J.; WILKINSON, M. F. Central arginine vasopressin and endogenous antipyresis. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 70, n. 5, p. 786-90, May 1992.
- RABER, J.; BLOOM, F. E. IL-2 induces vasopressin release from the hypothalamus and the amygdala: role of nitric oxide-mediated signaling. **J Neurosci**, v. 14, n. 10, p. 6187-95, Oct 1994.
- RAISON, D.; HARDIN-POUZET, H.; GRANGE-MESSENT, V. Differential involvement of noradrenaline and nitric oxide in the regulation of vasopressin and oxytocin expression in rat supraoptic nucleus. **J Neurosci Res**, v. 89, n. 5, p. 764-72, May 2011.
- READ, R. C.; WYLLIE, D. H. Toll receptors and sepsis. **Curr Opin Crit Care**, v. 7, n. 5, p. 371-5, Oct 2001.
- RIOS-SANTOS, F.; ALVES-FILHO, J. C.; SOUTO, F. O.; SPILLER, F.; FREITAS, A.; LOTUFO, C. M.; SOARES, M. B.; DOS SANTOS, R. R.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, n. 5, p. 490-7, Mar 1 2007.
- 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 ligation and puncture sepsis. **Shock**, v. 19, n. 1, p. 61-5, Jan 2003.
- RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 1, p. 137-43, Jan 2007.
- RIVEST, S.; LACROIX, S.; VALLIERES, L.; NADEAU, S.; ZHANG, J.; LAFLAMME, N. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular

- nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 223, n. 1, p. 22-38, Jan 2000.
- ROCHA, M. J. A.; OLIVEIRA, G. R.; FARIAS-CORRÊA, P. B. Neurohypophyseal hormone secretion during septic shock. In: CHEN, F. J. (Ed.). **New Trends in Brain Research**. New York: Nova Science Publishers, 2006. p.75-94.
- RODRIGO, J.; RIVEROS-MORENO, V.; BENTURA, M. L.; UTTENTHAL, L. O.; HIGGS, E. A.; FERNANDEZ, A. P.; POLAK, J. M.; MONCADA, S.; MARTINEZ-MURILLO, R. Subcellular localization of nitric oxide synthase in the cerebral ventricular system, subfornical organ, area postrema, and blood vessels of the rat brain. **J Comp Neurol**, v. 378, n. 4, p. 522-34, Feb 24 1997.
- RYU, V.; LEE, J. H.; UM, J. W.; YOO, S. B.; LEE, J.; CHUNG, K. C.; JAHNG, J. W. Water-deprivation-induced expression of neuronal nitric oxide synthase in the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. **J Neurosci Res**, v. 86, n. 6, p. 1371-9, May 1 2008.
- SAIA, R. S.; OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; DA SILVA, M. E.; AGUILA, F. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; ROCHA, M. J.; CARNIO, E. C. Neonatal endotoxin exposure changes neuroendocrine, cardiovascular function and mortality during polymicrobial sepsis in adult rats. **Regul Pept**, v. 169, n. 1-3, p. 21-30, Aug 8 2011.
- SALOMAO, R.; BRUNIALTI, M. K.; GOMES, N. E.; MENDES, M. E.; DIAZ, R. S.; KOMNINAKIS, S.; MACHADO, F. R.; DA SILVA, I. D.; RIGATO, O. Toll-like receptor pathway signaling is differently regulated in neutrophils and peripheral mononuclear cells of patients with sepsis, severe sepsis, and septic shock. **Crit Care Med**, v. 37, n. 1, p. 132-9, Jan 2009.
- 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, p. 234-40, Jul 16 1997.
- SERINO, R.; UETA, Y.; HANAMIYA, M.; NOMURA, M.; YAMAMOTO, Y.; YAMAGUCHI, K. I.; NAKASHIMA, Y.; YAMASHITA, H. Increased levels of hypothalamic neuronal nitric oxide synthase and vasopressin in salt-loaded Dahl rat. **Auton Neurosci**, v. 87, n. 2-3, p. 225-35, Mar 23 2001.
- 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, p. 1752-8, Jun 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, p. 497-500, Mar 2002.

- SHIEH, P.; ZHOU, M.; ORNAN, D. A.; CHAUDRY, I. H.; WANG, P. Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitric oxide occurs later than the onset of the hyperdynamic response during sepsis. **Shock**, v. 13, n. 4, p. 325-9, 2000.
- SILVA, E. **Sepse: Manual**. São Paulo: Atheneu, 2008. 164
- SILVA, E.; AKAMINE, N.; SALOMAO, R.; TOWNSEND, S. R.; DELLINGER, R. P.; LEVY, M. Surviving sepsis campaign: a project to change sepsis trajectory. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v. 6, n. 2, p. 217-22, Jun 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, p. R251-60, Aug 2004.
- SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. **Eur Surg Res**, v. 35, n. 6, p. 486-91, Nov-Dec 2003.
- SNYDER, S. H.; BARANANO, D. E. Heme oxygenase: a font of multiple messengers. **Neuropsychopharmacology**, v. 25, n. 3, p. 294-8, Sep 2001.
- 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.
- SOUTHAM, E.; GARTHWAITE, J. The nitric oxide-cyclic GMP signalling pathway in rat brain. **Neuropharmacology**, v. 32, n. 11, p. 1267-77, Nov 1993.
- SPINK, J.; COHEN, J.; EVANS, T. J. The cytokine responsive vascular smooth muscle cell enhancer of inducible nitric oxide synthase. Activation by nuclear factor-kappa B. **J Biol Chem**, v. 270, n. 49, p. 29541-7, Dec 8 1995.
- SRISKANDAN, S.; ALTMANN, D. M. The immunology of sepsis. **J Pathol**, v. 214, n. 2, p. 211-23, Jan 2008.
- STERN, J. E.; LUDWIG, M. NO inhibits supraoptic oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 6, p. R1815-22, Jun 2001.
- SUMMY-LONG, J. Y.; SALISBURY, R.; MARIETTA, M. P.; HARTMAN, R. D.; WEISZ, J. Pathways of hydrogen utilization from NADPH generated by glucose-6-phosphate dehydrogenase in circumventricular organs and the hypothalamo-neurohypophysial system: a cytochemical study. **Brain Res**, v. 294, n. 1, p. 23-35, Feb 27 1984.

- 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, p. 461-2, Dec 1975.
- TAKALA, A.; NUPPONEN, I.; KYLANPAA-BACK, M. L.; REPO, H. Markers of inflammation in sepsis. **Ann Med**, v. 34, n. 7-8, p. 614-23, 2002.
- TAKANISHI, D. M.; YU, M.; LURIE, F.; BIUK-AGHAI, E.; YAMAUCHI, H.; HO, H. C.; CHAPITAL, A. D. Peripheral blood hematocrit in critically ill surgical patients: an imprecise surrogate of true red blood cell volume. **Anesth Analg**, v. 106, n. 6, p. 1808-12, Jun 2008.
- TERRELL, M. L.; SALAS, N.; BUI, V.; SUMMY-LONG, J. Y.; KADEKARO, M. NO inhibition of the magnocellular neuroendocrine system in rats is independent of cGMP signaling pathway. **Exp Neurol**, v. 184, n. 2, p. 846-56, Dec 2003.
- THIBONNIER, M.; PRESTON, J. A.; DULIN, N.; WILKINS, P. L.; BERTI-MATTERA, L. N.; MATTERA, R. The human V3 pituitary vasopressin receptor: ligand binding profile and density-dependent signaling pathways. **Endocrinology**, v. 138, n. 10, p. 4109-22, Oct 1997.
- THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen Pharmacol**, v. 29, n. 2, p. 159-66, Aug 1997.
- THORUP, C.; JONES, C. L.; GROSS, S. S.; MOORE, L. C.; GOLIGORSKY, M. S. Carbon monoxide induces vasodilation and nitric oxide release but suppresses endothelial NOS. **Am J Physiol**, v. 277, n. 6 Pt 2, p. F882-9, Dec 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, p. 267-76, Mar 2006.
- TRENTZSCH, H.; STEWART, D.; PAIDAS, C. N.; DE MAIO, A. The combination of polymicrobial sepsis and endotoxin results in an inflammatory process that could not be predicted from the independent insults. **J Surg Res**, v. 111, n. 2, p. 203-8, May 15 2003.
- UETA, Y.; LEVY, A.; CHOWDREY, H. S.; LIGHTMAN, S. L. Water deprivation in the rat induces nitric oxide synthase (NOS) gene expression in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. **Neurosci Res**, v. 23, n. 3, p. 317-9, Oct 1995.
- UETA, Y.; LEVY, A.; LIGHTMAN, S. L.; HARA, Y.; SERINO, R.; NOMURA, M.; SHIBUYA, I.; HATTORI, Y.; YAMASHITA, H. Hypovolemia upregulates the expression of neuronal nitric oxide synthase gene in the paraventricular and supraoptic nuclei of rats. **Brain Res**, v. 790, n. 1-2, p. 25-32, Apr 20 1998.

- VACHER, C. M.; HARDIN-POUZET, H.; STEINBUSCH, H. W.; CALAS, A.; DE VENTE, J. The effects of nitric oxide on magnocellular neurons could involve multiple indirect cyclic GMP-dependent pathways. **Eur J Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 455-66, Feb 2003.
- VANHATALO, S.; SOINILA, S. Nitric oxide synthase in the hypothalamo-pituitary pathways. **J Chem Neuroanat**, v. 8, n. 3, p. 165-73, Mar 1995.
- 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, p. 75-80, May 6 2005.
- VENTURA, R. R.; GOMES, D. A.; REIS, W. L.; ELIAS, L. L.; CASTRO, M.; VALENCA, M. M.; CARNIO, E. C.; RETTORI, V.; MCCANN, S. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Nitrgic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n. 9, p. 1101-9, Sep 2002.
- VESELY, M. J.; EXON, D. J.; CLARK, J. E.; FORESTI, R.; GREEN, C. J.; MOTTERLINI, R. Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro. **Am J Physiol**, v. 275, n. 4 Pt 1, p. C1087-94, Oct 1998.
- VILLAR, M. J.; CECCATELLI, S.; RONNQVIST, M.; HOKFELT, T. Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. **Brain Res**, v. 644, n. 2, p. 273-81, May 2 1994.
- VINCENT, J. L.; KORKUT, H. A. Defining sepsis. **Clin Chest Med**, v. 29, n. 4, p. 585-90, vii, Dec 2008.
- VINCENT, J. L.; MARTINEZ, E. O.; SILVA, E. Evolving concepts in sepsis definitions. **Crit Care Clin**, v. 25, n. 4, p. 665-75, vii, Oct 2009.
- VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-84, 1992.
- WAGNER, C. T.; DURANTE, W.; CHRISTODOULIDES, N.; HELLUMS, J. D.; SCHAFER, A. I. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. **J Clin Invest**, v. 100, n. 3, p. 589-96, Aug 1 1997.
- 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, p. 4733-8, Nov 1996.
- WANG, Y.; MARSDEN, P. A. Nitric oxide synthases: biochemical and molecular regulation. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 4, n. 1, p. 12-22, Jan 1995.

- WESTPHAL, M.; FREISE, H.; KEHREL, B. E.; BONE, H. G.; VAN AKEN, H.; SIELENKAMPER, A. W. Arginine vasopressin compromises gut mucosal microcirculation in septic rats. **Crit Care Med**, v. 32, n. 1, p. 194-200, Jan 2004.
- WHITE, K. A.; MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. **Biochemistry**, v. 31, n. 29, p. 6627-31, Jul 28 1992.
- WONG, M. L.; BONGIORNO, P. B.; AL-SHEKHLEE, A.; ESPOSITO, A.; KHATRI, P.; LICINIO, J. IL-1 beta, IL-1 receptor type I and iNOS gene expression in rat brain vasculature and perivascular areas. **Neuroreport**, v. 7, n. 15-17, p. 2445-8, Nov 4 1996.
- WONG, M. L.; BONGIORNO, P. B.; RETTORI, V.; MCCANN, S. M.; LICINIO, J. Interleukin (IL) 1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-10, and IL-13 gene expression in the central nervous system and anterior pituitary during systemic inflammation: pathophysiological implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 1, p. 227-32, Jan 7 1997.
- WONG, M. L.; RETTORI, V.; AL-SHEKHLEE, A.; BONGIORNO, P. B.; CANTEROS, G.; MCCANN, S. M.; GOLD, P. W.; LICINIO, J. Inducible nitric oxide synthase gene expression in the brain during systemic inflammation. **Nat Med**, v. 2, n. 5, p. 581-4, May 1996.
- XIA, Y.; KRUKOFF, T. L. Cardiovascular responses to subseptic doses of endotoxin contribute to differential neuronal activation in rat brain. **Brain Res Mol Brain Res**, v. 89, n. 1-2, p. 71-85, Apr 18 2001.
- YAMAGUCHI, K.; HAMA, H. A study on the mechanism by which sodium nitroprusside, a nitric oxide donor, applied to the anteroventral third ventricular region provokes facilitation of vasopressin secretion in conscious rats. **Brain Res**, v. 968, n. 1, p. 35-43, Apr 4 2003.
- YAMAGUCHI, K.; WATANABE, K.; YAMAYA, K. Evaluation for roles of nitric oxide generated in the anteroventral third ventricular region in controlling vasopressin secretion and cardiovascular system of conscious rats. **Eur J Endocrinol**, v. 143, n. 4, p. 523-33, Oct 2000.
- YAO, S. T.; GOURAUD, S.; PATON, J. F.; MURPHY, D. Water deprivation increases the expression of neuronal nitric oxide synthase (nNOS) but not orexin-A in the lateral hypothalamic area of the rat. **J Comp Neurol**, v. 490, n. 2, p. 180-93, Sep 19 2005.
- 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, p. 1466-9, Sep 1993.

Tabela 2. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de vasopressina plasmática. Dados expressos em pg AVP/mL. Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (*n*) dos dados representados na figura 4.

Tempo (h)	Grupos			
	OF		CLP	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
2	7,64 ± 1,45	11	6,16 ± 0,89	10
6	8,04 ± 1,36	10	5,35 ± 1,05	14
24	7,42 ± 1,41	9	7,15 ± 2,15	10

Tabela 3. Efeito do estímulo séptico sobre o conteúdo da vasopressina neurohipofisária. Dados expressos em pg AVP/ µg Proteína. Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (*n*) dos dados representados na figura 5.

Tempo (h)	Grupos			
	OF		CLP	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
2	0,74 ± 0,23	10	2,86 ± 0,40	8
6	0,60 ± 0,12	12	3,15 ± 1,11	9
24	0,63 ± 0,05	6	0,65 ± 0,65	7

Tabela 4. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a concentração do sódio sérico. Dados expressos em meq/L. Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (*n*) dos dados representados na figura 6.

Tempo (h)	Grupos			
	OF		CLP	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	142,25 ± 2,60	8	141,88 ± 2,47	8
2	138,75 ± 0,71	8	136,89 ± 2,47	9
6	137,50 ± 0,93	8	135,09 ± 2,34	11
24	143,43 ± 1,90	7	138,73 ± 2,15	11

Tabela 5. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre o hematócrito. Dados expressos em %. Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (*n*) dos dados representados na figura 7.

Tempo (h)	Grupos			
	OF		CLP	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	44,69 ± 3,20	8	45,00 ± 3,12	8
2	50,81 ± 1,77	8	58,56 ± 3,62	9
6	47,50 ± 1,56	9	57,59 ± 3,71	11
24	38,94 ± 0,86	8	50,20 ± 2,96	10

Tabela 6. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de proteína plasmática. Dados expressos em g/dL. Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (*n*) dos dados representados na figura 8.

Tempo (h)	Grupos			
	OF		CLP	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	4,24 ± 0,12	8	4,52 ± 0,18	10
2	4,06 ± 0,12	6	3,52 ± 0,25	10
6	3,94 ± 0,20	10	3,12 ± 0,28	11
24	4,44 ± 0,23	8	3,40 ± 0,26	8

Tabela 7. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de Interleucina 1β (IL-1β) plasmática. Dados expressos em pg/mL. Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (*n*) dos dados representados na figura 9.

Tempo (h)	Grupos			
	OF		CLP	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	0,00 ± 0,00	8	0,00 ± 0,00	8
2	0,00 ± 0,00	8	78,09 ± 129,44	10
6	68,75 ± 86,95	10	639,18 ± 435,92	12
24	0,00 ± 0,00	8	429,77 ± 228,02	12

Tabela 8. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de nitrato plasmático. Dados expressos em μM . Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (n) dos dados representados na figura 10.

Tempo (h)	Grupos			
	OF		CLP	
	M $\pm$ EPM	n	M $\pm$ EPM	n
0	20,21 $\pm$ 9,03	14	18,71 $\pm$ 8,87	15
2	21,75 $\pm$ 9,64	15	22,31 $\pm$ 9,27	18
6	19,56 $\pm$ 9,49	15	72,26 $\pm$ 55,58	22
24	44,76 $\pm$ 16,87	14	90,25 $\pm$ 47,95	16

Tabela 9. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre as concentrações de nitrato no fluido cerebrospinal. Dados expressos em μM . Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (n) dos dados representados na figura 11.

Tempo (h)	Grupos			
	OF		CLP	
	M $\pm$ EPM	n	M $\pm$ EPM	n
0	12,37 $\pm$ 3,48	9	12,45 $\pm$ 2,64	9
2	10,83 $\pm$ 3,11	9	13,84 $\pm$ 7,02	10
6	10,19 $\pm$ 1,91	9	23,22 $\pm$ 11,43	10
24	12,11 $\pm$ 2,61	9	16,35 $\pm$ 5,46	5

Tabela 10. Efeito do estímulo séptico por CLP sobre a atividade das NOS no hipotálamo. Dados expressos em pM [C14]-L-citrulina/mg de proteína/min. Média (M), erro padrão da média (EPM) e número de animais por grupo (*n*) dos dados representados nas figuras 12, 13, 14 e 15.

Tempo (h)	Grupos											
	Total				Constitutiva				Induzível			
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0,1	1,12 ± 0,22	9	0,98 ± 0,11	9	1,10 ± 0,22	9	0,96 ± 0,12	9	0,012 ± 0,003	9	0,020 ± 0,011	13
2	1,13 ± 0,21	12	1,10 ± 0,23	14	1,05 ± 0,28	12	1,07 ± 0,23	14	0,013 ± 0,005	8	0,010 ± 0,003	8
6	1,23 ± 0,43	16	1,61 ± 0,29	13	1,24 ± 0,41	15	1,58 ± 0,30	13	0,020 ± 0,009	10	0,015 ± 0,006	12
24	1,16 ± 0,05	7	1,45 ± 0,15	7	1,10 ± 0,02	5	1,41 ± 0,17	7	0,018 ± 0,007	10	0,024 ± 0,002	6

Observações:

Os dados de AVP plasmática no tempo 0 hora, não foram apresentados pelo motivo dos mesmos apresentarem concentrações plasmáticas elevadas tanto nos animais submetidos à CLP quanto à OF.

Este aumento já foi visto em trabalhos anteriores em nosso laboratório e foi atribuído ao estresse, dano tecidual e ativação de osmorreceptores viscerais. Este aumento acentuado, de certa forma, mascara e dificulta a análise dos resultados referente ao verdadeiro foco do estudo que no caso foi a sepse.

Dados semelhantes a este aumento das concentrações plasmáticas de AVP encontrados por nós, foram relatados em humanos após 3 minutos da abertura e manipulação intraperitoneal (Melville; Forsling; *et al.*, 1985). A elevação dos níveis de AVP seria causada provavelmente pela ativação do sistema autonômico pela manipulação do peritônio (Melville; Frizis; *et al.*, 1985) e/ou pela desidratação local e ativação de osmorreceptores viscerais que induzem a liberação de vasopressina via vagal no momento do procedimento cirúrgico (Bourque *et al.*, 1994).

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

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 10.1.294.53.7), intitulado "Análise do Conteúdo e Atividade Enzimática das NO Sintases no Hipotálamo de Ratos Submetidos à Sepse Experimental", de autoria de **Fábio Alves Aguilá** e de **Maria José Alves da Rocha** por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 09/06/2010.

This is to certify that the work (Protocol number 10.1.294.53.7), entitled: "Análise do Conteúdo e Atividade Enzimática das NO Sintases no Hipotálamo de Ratos Submetidos à Sepse Experimental", by **Fábio Alves Aguilá** and **Maria José Alves da Rocha**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the Campus of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, June 09, 2010.

Ribeirão Preto, 14 de junho de 2010.

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

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro