UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da inibição da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na
liberação de vasopressina durante sepse experimental**

Camila Henriques Coelho

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Análise da inibição da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na
liberação de vasopressina durante sepse experimental**

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

Orientada: Camila Henriques Coelho
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria José Alves da
Rocha

Ribeirão Preto
2009

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Coelho, Camila Henriques

Análise da inibição da Óxido Nítrico Sintase neuronal (nNOS) na liberação de vasopressina durante sepse experimental. Ribeirão Preto, 2009.

75 pag.: Il.; 30 cm.

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP

Orientadora: Rocha, Maria José Alves da.

1. Sepse. 2. Vasopressina. 3. Óxido Nítrico. 4. NOS neuronal.

Nome: COELHO, Camila Henriques

Título: Análise da inibição da Óxido Nítrico Sintase neuronal (nNOS) na liberação de vasopressina durante sepse experimental

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

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

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Aos Professores do Laboratório de Neuroendocrinologia do depto de Fisiologia da FMRP-USP por cederem a estrutura física de seu laboratório, equipamentos e pessoal técnico a fim de que fossem realizados experimentos imprescindíveis para a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme Branco, da FORP, por ceder o espaço físico de seu laboratório para a realização de alguns experimentos.

Ao Laboratório de Fisiologia Aplicada à Enfermagem (EERP-USP), por ceder gentilmente parte do 7-nitroindazol utilizada neste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiróz Cunha (FMRP-USP), que através da técnica **Fabyola Mestriner**, viabilizou os ensaios de atividade da NOS.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akyra Uyemura que viabilizou a dosagem de creatinina e glicose através do técnico **João José Franco**, da FCFRP.

Às professoras das disciplinas de Microbiologia Clínica, Dra. Ana Lúcia da Costa Darini e Imunologia, Dra. Lúcia Helena Faccioli pelos ensinamentos pedagógicos e científicos imensuráveis durante os Estágios do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

Aos membros da Comissão de Ética em Uso de Animais do Campus de Ribeirão Preto (CEUA), pelas ricas discussões nas reuniões, acerca das condutas em experimentação animal.

Aos membros da Comissão dos Assuntos de Moradia do Campus da USP - Ribeirão Preto pela oportunidade de representar os pós-graduandos em seus interesses.

*À auxiliar técnica **Nadir Fernandes**, pela grande ajuda durante os experimentos com animais.*

*Às técnicas **Marina Holanda, Milene Mantovani e Maria Valci** (FMRP) pela ajuda nas dosagens de proteínas, vasopressina e nitrato sérico.*

*Aos coordenadores dos **Biotérios** da FORP e da FCFRP, pela ajuda.*

*Aos funcionários da **Secretaria de Pós-Graduação da FCFRP-USP**, pela atenção.*

*Aos amigos do Laboratório de Neuroimunoendocrinologia, **Adriana, Bruno, Carla, Erick, Fábio, Josi, Juliana, Paulo, Priscila, Thalita e Walter** do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da FORP, pelo companheirismo e convivência agradável, e em especial à **Dra. Gabriela Ravanelli de Oliveira Pelegrin** que dedicou muito do seu tempo contribuindo intelectualmente para o desenvolvimento deste trabalho.*

*Aos amigos **Cláudia Peres, Daniel Remígio, Deisy Okamura, Iraci João, Juliana Souza, Leandro Máximo, Natália Pimenta, Niege Mendes, Rafael Mariano e Dra. Paula Regina de Souza**, pelo apoio incondicional durante o período de execução deste trabalho.*

*Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pela concessão da bolsa de mestrado.*

*A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. **Minha eterna gratidão.***

"No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade"
(Albert Einsten)

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Resumen	iii
Lista de figuras	iv
Lista de abreviaturas e siglas	v
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1 Animais	12
3.2 Protocolo Experimental	12
3.3 Anestesia	13
3.4 Fármaco	13
3.5 Cirurgia	14
3.6 Determinação da curva de sobrevivência	14
3.7 Coleta de sangue, e remoção de hipotálamo e neurohipófise	14
3.8 Determinação do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade creatinina, glicose e proteínas plasmáticas	15
3.8.1 Hematócrito	15
3.8.2 Sódio sérico	15
3.8.3 Osmolalidade plasmática	16
3.8.4 Creatinina e glicose plasmáticas	16
3.8.5 Proteínas plasmáticas	16
3.8.6 Determinação indireta de NO pela dosagem de nitrato sérico	17
3.8.7 Determinação da atividade da NOS neuronal	17
3.9 Dosagem Hormonal	18
3.9.1 Extração de vasopressina do plasma	18
3.9.2 Radioimunoensaio para AVP	18
3.10 Análise estatística	19
4. RESULTADOS	20
4.1 Curva de sobrevivência	20
4.2 Efeito do 7-nitroindazol nas concentrações plasmáticas de proteínas, hematócrito, osmolalidade e sódio sérico	21
4.2.1 Hematócrito e Proteínas plasmáticas	21
4.2.2 Osmolalidade plasmática e Sódio sérico	23
4.3 Efeito do 7-nitroindazol nas concentrações de glicose e creatinina plasmáticas	24
4.3.1 Glicose	24
4.3.2 Creatinina	25
4.4 Efeito do 7-nitroindazol nas concentrações séricas de nitrato	26
4.5 Efeito do 7-nitroindazol na atividade da Óxido Nítrico Sintase neuronal	27

4.6 Efeito do 7-nitroindazol nas concentrações de vasopressina plasmática e neurohipofisária	28
4.6.1 Vasopressina plasmática	28
4.6.2 Vasopressina neurohipofisária.....	29
5. DISCUSSÃO	30
6. CONCLUSÕES	35
7. REFERÊNCIAS	36
ANEXO	47
TABELAS.....	48

RESUMO

COELHO, C.H. **Análise da inibição da óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) na liberação de vasopressina durante sepse experimental.** 2009. 75f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

A fisiopatologia da sepse se caracteriza por hipotensão acompanhada de aumento da secreção de vasopressina (AVP) na fase inicial e diminuição numa fase mais tardia. Essa hipotensão é em parte devido ao aumento da quantidade de óxido nítrico, que juntamente com outros mediadores tem sua produção aumentada durante a sepse. A óxido nítrico sintase (NOS) é responsável pela síntese deste mediador, e sua isoforma neuronal (nNOS) está presente no músculo esquelético, pulmões, testículos, próstata, pele e também nos neurônios vasopressinérgicos do hipotálamo. O presente trabalho avaliou a participação do óxido nítrico produzido pela isoforma neuronal de NOS sobre a secreção temporal de AVP durante a sepse experimental. Ratos Wistar receberam injeção i.p. de 7-nitroindazol (50mg/kg ou 80mg/kg), inibidor específico da NOS neuronal, ou DMSO 10% + óleo de gergelim na proporção 1:9 (veículo) e após 30 minutos foram submetidos ao estímulo séptico por ligadura e perfuração cecal (CLP) ou à operação fictícia (OF). Em um grupo de animais, a sobrevivência foi avaliada durante 5 dias. Em outro grupo, os animais foram decapitados 0, 4, 6, 18 e 24 horas após a cirurgia e o sangue processado para determinação do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas, glicose, creatinina, nitrato sérico e AVP plasmática. A neurohipófise foi removida para a determinação do conteúdo de AVP, e o hipotálamo dissecado para a determinação da atividade da NOS total. A mortalidade observada após CLP não foi modificada com o pré-tratamento com 7-NI (50mg/kg), assim como os aumentos temporais de hematócrito, glicose e nitrato sérico observados. As proteínas plasmáticas e o sódio sérico apresentaram diminuição após CLP e o pré-tratamento com 7-NI antecipou a perda proteica e postergou a diminuição do sódio sérico. Os animais após CLP não apresentaram alterações de creatinina e osmolalidade, entretanto quando pré-tratados com 7-NI, apresentaram aumento em 6 e 18 horas e diminuição a partir de 4hs, respectivamente. A atividade da NOS total no hipotálamo aumentou nos tempos determinados de 4 e 24 horas após CLP e este aumento foi reduzido com o pré-tratamento com o 7-NI nas doses de 50 e 80mg/kg, respectivamente. O conteúdo neurohipofisário de AVP diminuiu em 4, 6 e 18 horas após CLP e o pré-tratamento com 7-NI reduziu os estoques apenas em 0 e 6 horas. As concentrações plasmáticas de vasopressina apresentaram-se aumentadas somente 6 horas após CLP e o pré-tratamento não alterou essas concentrações. Esses resultados permitem concluir que o NO produzido pela NOS neuronal não teria uma tarefa substancial na secreção de vasopressina durante sepse experimental.

Palavras-chave: sepse polimicrobiana, vasopressina, óxido nítrico, NOS neuronal, CLP

ABSTRACT

COELHO, C.H. **Analysis of inhibition of neuronal nitric oxide synthase in vasopressin secretion during experimental sepsis.** 2009. 75f. Dissertation (Master) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

The pathophysiology of sepsis is characterized by hypotension accompanied by increase of vasopressin secretion (AVP) in early phase and decrease during late phase. This hypotension is due, in part, to the increase of nitric oxide (NO) production, that, like other mediators, shows high production during sepsis. Nitric oxide synthase (NOS) is responsible by synthesis of NO. The neuronal isoform of NOS is present in skeletal muscle, testicles, prostate, skin and vasopressinergic neurons of hypothalamus. The present work evaluated the participation of nitric oxide produced by neuronal NOS in temporal vasopressin secretion during experimental sepsis. Rats Wistar received intraperitoneal injection of 7-nitroindazole (50 or 80 mg/kg), an inhibitor of neuronal nitric oxide synthase activity, or DMSO 10% + sesame oil in the proportion 1:9 (vehicle) and after 30 minutes, they were submitted to septic stimulus by cecal ligation and puncture (CLP) or to sham operation. In one of the groups, the survival rate was evaluated during 5 days. In other group, the animals were decapitated 0, 4, 6, 18 and 24 hours after CLP and the blood was processed to determinate haematocrit, serum sodium, osmolality, proteins, glucose, creatinine, serum nitrate, and plasma AVP. Neurohypophysis was removed to determination of vasopressin content, and hypothalamus was dissected to determinate total NOS activity. Mortality observed after CLP was not affected by peripheral injection of 7-nitroindazole (50 mg/kg) as well as haematocrit, glucose and nitrate increase. Serum sodium and plasma protein decreased after CLP and the treatment anticipated the loss protein, and delayed serum sodium decrease. CLP animals didn't show creatinine and osmolality alterations, but when treated with 7-nitroindazole, showed increase 6 and 18 hours, and decrease 4 hours, respectively. NOS activity in hypothalamus increased 4 and 24 hours after CLP, and was reduced with 7-NI pretreatment (50 and 80 mg/kg respectively). AVP neurohypophysis content diminished 4, 6 and 18 hours after CLP and 7-NI reduced the content just at 0 and 6 hours. Vasopressin plasma concentration increased just 6 hours after CLP and 7-NI pretreatment didn't alter this parameter. We concluded that NO produced by neuronal NOS doesn't have a substantial role in vasopressin secretion during experimental sepsis.

Keywords: polymicrobial sepsis, vasopressin, nitric oxide, neuronal NOS, CLP

RESUMEN

COELHO, C.H. **Análisis de la inhibición del óxido nítrico sintasa neuronal (nNOS) en la liberación de vasopresina durante sepsis experimental.** 2009. XXf. Disertación (Masters) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, 2009.

La fisiopatología de sepsis se caracteriza por hipertensión acompañada de un aumento de secreción de vasopresina (AVP) en fase inicial y disminución en una fase más tarde. Esa hipertensión es en parte, debido al aumento del óxido nítrico, que junto con otros mediadores tiene su producción incrementada durante la sepsis. El óxido nítrico sintasa (NOS) es responsable por síntesis de este mediador, y su isoforma neuronal (nNOS) está presente en el músculo esquelético, pulmones, testículos, próstata, piel y neuronas vasopresinérgicas del hipotálamo. El presente trabajo avaluó la participación del óxido nítrico producido por isoforma neuronales de NOS sobre la secreción temporal de AVP durante la sepsis experimental. Roedores Wistar recibieron inyección i.p. de 7-nitroindazol (50mg/kg), inhibidor específico de NOS neuronal, DMSO 10% + aceite de sésamo en proporción de 1:9 (vehículo) y después de 30 minutos fueron sometidos al estímulo séptico por ligadura y perforación cecal (CLP) o la operación ficticia (OF). En un grupo de animales, la sobrevivencia fue evaluada durante 5 días. En otro grupo, los animales fueron decapitados en 0, 4, 6, 18 e 24 horas después de la cirugía y la sangre fue procesada para el cálculo de hematocrito, sodio sérico, osmolalidad, proteínas, glucosa, creatinina, nitrato de suero y AVP plasmática. La neurohipófisis fue eliminada para el cálculo del contenido de AVP, y el hipotálamo disecado para el cálculo de la actividad de NOS total. La mortalidad observada después del CLP no fue modificada con el pré-tratamiento con 7-NI (50 mg/kg), así como los aumentos temporales de hematocrito, glucosa y nitrato sérico observados. Las proteínas plasmáticas y el sodio sérico presentaron disminución después del CLP y el tratamiento con 7-NI anticipó la pérdida proteica y postergó la disminución del sodio sérico. Los animales después de CLP no presentaron alteraciones de creatinina y osmolalidad, mientras que cuando fueron tratados con 7-NI presentaron aumento en 6 y 18 horas y disminución a partir de 4 horas, respectivamente. La actividad de la NOS total en el hipotálamo aumentó en los tiempos determinados de 4 y 24 horas después del CLP y este aumento fue reducido con el pretratamiento con el 7-NI en las dosis de 50 y 80 mg/kg, respectivamente. El contenido neurohipofisiario de AVP disminuyó en 4, 6 e 18 horas después de CLP y el pretratamiento con 7-NI redujo el contenido apenas en 0 y 6h. Las concentraciones plasmáticas de vasopresina se aumentaron solamente 6h después de CLP y el pretratamiento no alteró esas concentraciones. Esos resultados permiten concluir que el NO producido por la NOS neuronal no tendría una tarea substancial en la secreción de vasopresina durante sepsis experimental.

Palavras-chave: sepsis polimicrobiana, vasopresina, óxido nítrico, NOS neuronales, CLP

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da manipulação nos ratos durante a cirurgia de CLP.....	04
Figura 2. Estrutura da óxido nítrico sintase neuronal.....	10
Figura 3. Curva de sobrevivência dos animais pré-tratados com inibidor de óxido nítrico sintase neuronal (7-NI 50 mg/kg) ou veículo (DMSO 10% + óleo de gergelim), submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP.....	20
Figura 4. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-nitroindazol no hematócrito de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP.....	21
Figura 5. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na concentração de proteínas plasmáticas de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP.....	22
Figura 6. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na osmolalidade plasmática de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP.....	23
Figura 7. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) no sódio sérico de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP.....	24
Figura 8. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na concentração de glicose plasmática dos animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.....	24
Figura 9. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na concentração plasmática de creatinina dos animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.....	25
Figura 10. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na produção de nitrato de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP.....	26
Figura 11. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 ou 80 mg/kg) na atividade da NOS no hipotálamo de animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP.....	27
Figura 12. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na concentração plasmática de vasopressina dos ratos submetidos à operação fictícia (OF) ou LP.....	28
Figura 13. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) no conteúdo neurohipofisário de vasopressina em animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS

C¹⁴	Carbono 14
16 G	16 gauge
7NI	7-nitroindazol
ANOVA	Análise de Variância simples
AVP	Arginina vasopressina
BH₄	Biopterina
Bpm	Batimentos por minuto
CaCl₂	Cloreto De Cálcio
CEUA	Comissão de Ética em uso de animais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CLP	<i>Cecal Ligation and Puncture</i> (Ligadura e perfuração cecal)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
EGTA	Etileno de aminotetra acetato
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HCl	Ácido Clorídrico
HEPES	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico
I	Iodo
i.c.v.	Intracerebroventricular
IL-1	Interleucina 1
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
kb	Kilobase
L-NAME	<i>N –nitro – L arginine methyle hydrochloride</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
mM	Milimolar
n	número de animais

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeoP
NH₂	Terminal Amina
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NOS_e	Óxido nítrico sintase endotelial
NOS_i	Óxido nítrico sintase induzida
NOS_n	Óxido nítrico sintase neuronal
NOS_{mt}	Óxido nítrico sintase mitocondrial
O₂	Gás oxigênio
OF	Operação fictícia
PAF	<i>Platelet-activating factor</i> (Fator de agregação plaquetária)
PG	Prostaglandina
PMSF	<i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i>
PDZ/GLGF	Domínio presente na estrutura da nNOS
PVN	Núcleo paraventricular
RNA m	Ácido ribonucleico mensageiro
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNK	Student Newman Keuls
SON	Núcleo supraótico
TBE	Tribomoetanol
TNFα	Fator de necrose tumoral – α
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
μL	microlitro

Introdução

Sepse, sepse severa e choque séptico

Em 1879, Louis Pasteur mostrou pela primeira vez a presença de bactérias em pacientes com sepse puerperal e quando uma dessas pacientes sobreviveu à infecção, Pasteur sugeriu que a resposta natural do organismo havia sido vitoriosa. A opinião de Pasteur, há mais de 100 anos, foi consistente com a definição atual de sepse, palavra de origem grega *Σήψις*, *septikós* (que causa putrefação no sangue). A Sociedade de Terapia Intensiva Americana define que sepse consiste na resposta inflamatória sistêmica (SIRS) a uma infecção (DELLINGER *et al.*, 2008), que e pode ser determinada pela instalação de dois ou mais dos seguintes sintomas: temperatura $> 38^{\circ} \text{C}$ ou $< 36^{\circ} \text{C}$; frequência cardíaca $> 90 \text{ bpm}$; frequência respiratória > 20 movimentos/minutos; número de leucócitos no sangue periférico $> 12000/\text{mm}^3$ ou $< 4000/\text{mm}^3$, ou, ainda presença de $> 10\%$ de bastonetes (ABRAHAM *et al.*, 2000; SILVA, 2008). A SIRS, síndrome esta que pode ter origem multifatorial (queimaduras, pancreatite, politraumatismo e/ou cirurgias), acomete cerca de 70% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva, e aproximadamente 10 a 25% destes são diagnosticados com sepse (BRUN-BUISSON *et al.*, 1995; SALVO *et al.*, 1995).

Quando um paciente desenvolve qualquer disfunção orgânica, como por exemplo, hipotensão arterial, lesão pulmonar aguda, oligúria, aumento de creatinina, hiperbilirrubinemia direta, plaquetopenia ou alteração do estado mental, obrigatoriamente induzida pela sepse, o quadro é denominado sepse grave (SILVA, 2008).

A sequência desse processo fisiopatológico é o choque séptico, no qual a vasodilatação arteriolar e hipotensão são refratárias à sobrecarga hídrica intravenosa, sendo necessária a administração de vasopressores. A hipotensão e a hipoperfusão podem levar a um quadro mais grave de alteração na função orgânica, que resulta em disfunção e até falência total dos órgãos, denominado síndrome de disfunção múltipla de órgãos (MODS) (BONE *et al.*, 1992; BONE *et al.*, 1997; HANNA, 2003; DELLINGER *et al.*, 2008).

A sepse é considerada a principal causa de morte nas Unidades de Terapia Intensiva em todo o mundo. A sepse grave e o choque séptico são responsáveis por

taxas de mortalidade de 40 a 60%. Nos Estados Unidos, é estimado que mais de 700 mil casos de sepse ocorram a cada ano (SANDS *et al.*, 1997; BURCHARDI *et al.*, 2004; MOERER *et al.*, 2006). No Brasil o quadro não é diferente e alguns dados mostram que nosso país apresenta uma das maiores taxas mundiais de mortalidade decorrentes de sepse (SILVA, 2008). No Brasil, essa síndrome é a maior causa de geração de custos nos setores de saúde públicos e privados (SILVA *et al.*, 2004), devidos principalmente à necessidade de equipamentos sofisticados, medicamentos caros e trabalho intenso de equipes multiprofissionais (SHAPIRO *et al.*, 2008). Vários consensos tem sido propostos a fim de se estabelecerem estratégias de tratamento e discussões fisiopatológicas acerca da sepse (BONE *et al.*, 1992; DELLINGER *et al.*, 2008). Nos últimos consensos vem sendo proposto o emprego da *Campanha Sobrevivendo à Sepse* que foi concebida pela Sociedade Européia de Cuidados Médicos Intensivos, Fórum Internacional de Sepse e pela Sociedade Americana de Cuidados Médicos Intensivos (DELLINGER *et al.*, 2008; TOWNSEND *et al.*, 2008). Esta campanha tem por objetivo diminuir a mortalidade da sepse em 25% num período de 5 anos e propor a utilização de condutas e pacotes de intervenção, além de discutir alguns aspectos clínicos que devem ser levados em consideração ao se tratar os pacientes sépticos hospitalizados. No Brasil, o uso dessas condutas e pacotes preconizados pela Campanha *Sobrevivendo à Sepse* tem se mostrado eficaz na redução de mortalidade após sepse (TELES *et al.*, 2008).

Modelos de sepse experimental

Os modelos animais que retratam a sepse têm trazido imensuráveis contribuições para a compreensão de sua fisiopatologia, apesar de não expressarem um curso fisiopatológico idêntico ao que ocorre clinicamente (ESMON, 2004; DYSON *et al.*, 2009). Existem diversos modelos experimentais para estudo da sepse, como, por exemplo, os modelos de injeção de toxinas, de bactérias vivas e os de sepse de origem abdominal (DYSON *et al.*, 2009). Alguns estudos associam mais de um modelo em um mesmo animal a fim de se retratar a sepse de forma mais complexa (MARSHALL *et al.*, 2005; MUENZER *et al.*, 2006).

Os modelos mais utilizados são os de injeção intraperitoneal (i.p.) ou endovenosa (e.v.) de LPS (lipopolissacarídeo), e o modelo de CLP (*cecal ligation and puncture*/ ligadura e perfuração cecal) (WICHTERMAN *et al.*, 1980; BAKER *et al.*, 1983; AIURA *et al.*, 1995; VILLA *et al.*, 1995; WALLEY *et al.*, 1996; SALKOWSKI *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 1999; BENJAMIM *et al.*, 2000; CARNIO *et al.*, 2005; CORREA *et al.*, 2007; ATHAYDE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009).

O modelo de sepse experimental que melhor retrata a sepse polimicrobiana principalmente de origem abdominal é o CLP, que se caracteriza por lesão intestinal com consecutiva liberação da microbiota endógena realizada por ligadura parcial do ceco para diminuição do lúmen e perfurações nas bordas mesentéricas. A liberação da microbiota resulta numa peritonite que expõe o hospedeiro a todo tipo de microrganismos da flora intestinal, incluindo as bactérias Gram-positivas e negativas. Dessa forma a resposta inflamatória neste modelo é mais complexa que a dos outros modelos de sepse e endotoxemia, e o quadro de expressão de mediadores inflamatórios se assemelha ao que ocorre na clínica (BAKER *et al.*, 1983; VILLA *et al.*, 1995; SALKOWSKI *et al.*, 1998; KOO *et al.*, 1999; BENJAMIM *et al.*, 2000; ECHTENACHER *et al.*, 2001; BENAMAR *et al.*, 2002).

Recentemente tem sido descrito em trabalhos clínicos, que podem existir encefalopatias associadas ou induzidas pela sepse que comprometem a função do sistema nervoso central, através de mudanças no metabolismo, alterações na sinalização celular pelos mediadores inflamatórios e funções regulatórias exercidas pelo cérebro por todo o corpo (PYTEL *et al.*, 2009). Similarmente ao que ocorre na patologia do paciente séptico, os ratos submetidos ao modelo de CLP apresentam deficiência de memória em longo prazo e perda neuronal (SEMMLER *et al.*, 2007).

Um esquema das regiões manipuladas durante a cirurgia de CLP é apresentado a seguir:

Fig. 1 - Esquema da manipulação nos ratos durante a cirurgia de CLP. a) Abertura do peritônio b) Retirada do ceco c) Ligadura d) Perfuração e) Introdução do ceco na cavidade abdominal f) Sutura da região abdominal g) Injeção subcutânea de salina.

Alterações Fisiopatológicas na Seps

A seps é consequência da invasão da circulação sanguínea por bactérias, fungos, vírus e/ou protozoários. A seps de origem bacteriana é mais frequentemente encontrada, embora a seps de origem fúngica venha sendo bastante diagnosticada em pacientes imunodeprimidos, que são acometidos principalmente por *Candida albicans*, a espécie responsável pela quarta maior causa de infecção sanguínea nos Estados Unidos (MARR, 2004; CHAKRABARTI *et al.*, 2009).

As principais bactérias causadoras de seps são *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (ZAIDI *et al.*, 2009). Recentemente, vêm aumentando os registros de casos de seps por *Staphylococcus coagulase*

negativos, principalmente pela sua contribuição na formação de biofilmes em superfícies de materiais hospitalares (VON EIFF *et al.*, 2001; PIETTE *et al.*, 2009).

A presença das bactérias na circulação promove uma série de eventos imunológicos que resultam na ativação dos receptores Toll-like 4 e Toll-like 2, (SCHUSTER *et al.*, 2000; SABROE *et al.*, 2005; PIETTE *et al.*, 2009; SHALHUB *et al.*, 2009) aos quais se ligam os componentes de membrana, LPS (Gram-negativas) e o ácido lipoteicóico (Gram-positivas), respectivamente. Essa ativação por sua vez promove a subsequente ativação do fator de transcrição NF- κ B que induz a liberação excessiva de mediadores e uma intensa ativação de células inflamatórias resultando em um quadro de desequilíbrio. Assim, o organismo mostra-se incapaz de controlar esta situação para retornar às condições fisiológicas normais (BONE, 1991; PARRILLO, 1993; BONE *et al.*, 1997; SANDS *et al.*, 1997; LANDRY *et al.*, 2001; DELLINGER, 2003; DELLINGER *et al.*, 2008).

Os principais mediadores inflamatórios liberados durante a sepse são TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, NO, Fator ativador de plaquetas (PAF), Prostaglandinas (PG) e Leucotrienos (LT) (ANNANE *et al.*, 2005; SRISKANDAN *et al.*, 2008; ATHAYDE *et al.*, 2009). O papel das citocinas é bastante importante no desenvolvimento da resposta fisiopatológica à sepse. O TNF- α , ou fator de necrose tumoral, por exemplo, é o primeiro mediador a ser detectado na circulação sanguínea após a invasão de microrganismo ou componente da membrana celular de bactérias e a deficiência deste mediador leva à atenuação da hiper-inflamação e da infecção abdominal, prevenindo a indução da falência múltipla de órgãos e morte (SECHER *et al.*, 2009).

A amplificação da resposta inflamatória na sepse pode comprometer o funcionamento de vários órgãos e tecidos, promovendo a morte de células como as da medula adrenal, timócitos e linfócitos, dentre outros tipos celulares (WARD, 2008; HOFER *et al.*, 2009; LANG *et al.*, 2009; PINHEIRO DA SILVA *et al.*, 2009).

Esses mediadores excessivamente liberados durante a sepse podem direta ou indiretamente chegar ao sistema nervoso central alterando 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).

Na fase inicial da sepse são relatadas altas concentrações plasmáticas de vasopressina. No decorrer desse processo fisiopatológico, apesar da significativa

queda da volemia e da pressão arterial, estímulos para a liberação do hormônio, a concentração de vasopressina permanece em valores basais, o que contribui para a hipotensão e choque cardio-circulatório (KASTING, 1986; LANDRY *et al.*, 1997; OKAMOTO *et al.*, 2000; GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2002; SHARSHAR *et al.*, 2003; CORREA *et al.*, 2007; PANCOTO *et al.*, 2008).

Em ratos, as concentrações plasmáticas de AVP aumentam nas duas primeiras horas após a administração de LPS e diminuem nas próximas 6 horas até a queda em 24 horas (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2002; GIUSTI-PAIVA, BRANCO *et al.*, 2003), e após CLP foi visto também uma secreção inadequadamente reduzida de vasopressina 24 horas após a cirurgia, quando a pressão arterial média era significativamente diminuída em relação ao nível basal do mesmo animal (WESTPHAL *et al.*, 2004; CORREA *et al.*, 2007; ATHAYDE *et al.*, 2009)

O mesmo padrão de aumento inicial das concentrações plasmáticas de vasopressina seguido de queda pode ser observado em cães e macacos (WILSON *et al.*, 1981) e em carneiros (DADOUN *et al.*, 1998).

Em pacientes com choque séptico, foi demonstrado que as concentrações plasmáticas de vasopressina são bem menores que as de pacientes com choque cardiogênico com o mesmo grau de hipotensão sugerindo que a secreção do hormônio encontra-se deficiente ou alterada (LANDRY *et al.*, 1997).

Embora não saibamos a razão dessa secreção inadequada de AVP, a análise do conteúdo hormonal hipotalâmico e neurohipofisário revelou que existe um atraso na resposta de reposição dos estoques hipofisários sugerindo que nesses animais o eixo hipotálamo-hipófise encontra-se alterado (OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009).

Alguns mecanismos propostos para esta alteração do eixo hipotálamo-hipófise que causaria alterações na secreção de vasopressina têm sido sugeridos tais como: depleção dos estoques de vasopressina na neurohipófise devido ao excessivo disparo dos barorreceptores na situação de queda da pressão arterial; insuficiência autonômica observada pela diminuição da frequência cardíaca e ausência de bradicardia reflexa durante a infusão de vasopressina em pacientes em choque séptico, e em ratos pela constatação do enfraquecimento do controle autonômico do coração e vasos durante sepse polimicrobiana (LANDRY *et al.*, 1997; PANCOTO *et al.*, 2008); excessiva produção de óxido nítrico (NO) durante o choque séptico que inibiria a síntese e/ou liberação de vasopressina (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2002; GIUSTI-PAIVA, RUGINSK *et al.*, 2003; CORREA *et al.*, 2007).

Óxido nítrico na sepse

O radical livre óxido nítrico (NO) é um mensageiro celular que atua em importantes processos fisiológicos, incluindo regulação do tônus vascular, transmissão neuronal, modulação de reações imunológicas e inflamatórias, crescimento, sobrevivência, apoptose, proliferação e diferenciação celular além de ser um eficiente agente bactericida e tumoricida (DIMMELER *et al.*, 1997; MADHUSOODANAN *et al.*, 2007; KANWAR *et al.*, 2009). Apesar dessas importantes funções o aumento progressivo da produção de NO, como ocorre na sepse, torna-se tóxico ao organismo e contribui para o comprometimento cardiovascular e quando excessivamente liberado pode direta ou indiretamente chegar ao sistema nervoso central alterando a atividade de neurônios envolvidos em diferentes funções orgânicas, dentre as quais a síntese de vasopressina (CORREA *et al.*, 2007; PANCOTO *et al.*, 2008; ATHAYDE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009). Além disso, o NO oriundo dos terminais dos neurônios magnocelulares do hipotálamo parece participar da regulação do fluxo sanguíneo na neurohipófise (THIEMERMANN, 1997; FEIHL *et al.*, 2001; MONCADA *et al.*, 2006).

O NO apresenta meia vida de poucos segundos *in vivo* (GELLER *et al.*, 1998; ORLANDO *et al.*, 2008) e um alto coeficiente de difusão nas membranas celulares (FEIHL *et al.*, 2001). Desde que foi descoberta a formação de nitrato e nitrito a partir do aminoácido L-arginina em macrófagos (HIBBS *et al.*, 1987), sabe-se que a síntese do NO endógeno resulta da oxidação deste aminoácido, a qual promove a conversão em L-citrulina. A produção desse radical livre é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) e promove o consumo de NADPH e O₂ (PALMEF *et al.*, 1989; KNOWLES *et al.*, 1994; THIEMERMANN, 1997; FEIHL *et al.*, 2001). São conhecidas quatro isoformas de óxido nítrico sintase, relatadas a seguir.

A isoforma induzida (iNOS ou NOS2), cuja expressão é regulada por citocinas e produtos bacterianos (GELLER *et al.*, 1998; CLEMENTI, 2003), pode ser induzida nos macrófagos, hepatócitos, microglia, eritrócitos, músculo liso vascular, rins, pâncreas e cérebro (BANDALETTOVA *et al.*, 1993; MCLAREN *et al.*, 2009) em resposta à infecção e mostrou ser, ao contrário das constitutivas, independente de cálcio para sua ativação. Durante a sepse esta isoforma apresenta importante tarefa na produção de NO periférico (CORREA *et al.*, 2007). Em nosso laboratório, 6h após

CLP, observamos concomitantemente aumento da hipotensão e da concentração plasmática de NO e AVP, e após 24 horas, uma diminuição da concentração plasmática do hormônio, apesar do aumento da hipotensão. A administração intraperitoneal de aminoguanidina (inibidor da isoforma iNOS), bloqueou a hipotensão e reverteu este aumento em 6 horas, mostrando que a hipotensão teria uma tarefa substancial no aumento da vasopressina durante a sepse induzida por CLP. No entanto, em 24 horas, o inibidor da NOS induzida não conseguiu alterar as concentrações plasmáticas do hormônio, sugerindo que as altas concentrações de NO produzido pela NOS induzida estariam impedindo a secreção de vasopressina (CORREA, PANCOTO *et al.*, 2007).

A isoforma endotelial (eNOS ou NOS3) produz o NO que apresenta importante função na regulação do tônus vascular e fluxo sanguíneo, pois é a isoforma responsável pela atividade do fator de relaxamento dependente do endotélio, descrito por Furchgott and Zawadzki em 1980 (FURCHGOTT *et al.*, 1980). Durante a sepse essa isoforma é associada com hipotensão e no cérebro é relacionada com ativação e disfunção de células endoteliais (HANDA *et al.*, 2008; HUTTUNEN *et al.*, 2009).

A isoforma neuronal (nNOS ou NOS1) é responsável pela produção do NO que atua como no sistema nervoso e no sistema cardiovascular e está presente nos rins, músculo esquelético, miocárdio e pâncreas (WANG *et al.*, 1999; ABRAHAM *et al.*, 2000; ROTHE *et al.*, 2005). Esta enzima atua na regulação da homeostase dos fluidos corporais, na fisiologia neuroendócrina, no controle da motilidade de alguns músculos, na função sexual e na biologia de mioblastos e miócitos (HALL *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 1999), mas pouco se sabe sobre a tarefa desta enzima durante a sepse.

A nNOS consiste de 4299 nucleotídeos, codificando 1434 aminoácidos e possui um peso molecular de 160 kb (HALL *et al.*, 1994; BOISSEL *et al.*, 1998; GELLER *et al.*, 1998). O monômero de nNOS é inativo, o dímero é a forma ativa e a dimerização requer tetrabiopterina (BH4), heme e a ligação à L-arginina (ZHOU *et al.*, 2009). O monômero de NOS neuronal exibe uma estrutura contendo um domínio oxigenase (N-terminal) e um domínio redutase (C-terminal), o qual pode ser separado por um motivo de ligação de calmodulina. O domínio oxigenase, que se liga ao substrato L-arginina, contém um sítio de ligação de tetrabiopterina e um sítio ativo heme, além de possuir um sítio de ligação para o zinco o qual facilita a

dimerização da nNOS. O domínio redutase, ao qual se liga o substrato NADPH, contém um sítio de ligação para FMN (Flavina mononucleotídeo) e FAD (*flavina* adenina dinucleotídeo) (SOUTHAN *et al.*, 1996; ALDERTON *et al.*, 2001; ZHOU *et al.*, 2009). A estrutura da enzima encontra-se esquematizada na figura abaixo:

Figura 2. Estrutura da óxido nítrico sintase neuronal

Fonte: www.biochemj.org/bj/357/0593/bj3570593a01.jpg

O gene responsável pela atividade da enzima óxido nítrico sintase neuronal é localizado no cromossomo 12 em humanos e ratos, e é compreendido por 29 éxons e 28 íntrons (KISHIMOTO *et al.*, 1992; DENG *et al.*, 1995). A localização subcelular da proteína nNOS varia entre os diferentes tipos celulares. Nos neurônios, são encontradas proteínas solúveis e particuladas. Dependendo do tipo celular, a enzima particulada representa de 30 a 60 % da proteína total de nNOS (ARBONES *et al.*, 1996; RODRIGO *et al.*, 1997). Essa representação variada se deve provavelmente aos motivos de ligação PDZ/GLGF encontrados nas sequências das terminações NH₂ da proteína nNOS (FORSTERMANN *et al.*, 1998). Esse motivo participa das interações proteína-proteína com outras proteínas associadas à membrana (PONTING *et al.*, 1997; SCHEPENS *et al.*, 1997; ZHOU *et al.*, 2009). A lista de neurônios que contêm NOS neuronal continua a expandir, e atualmente é difícil encontrar um tecido cerebral que não tenha neurônios que produzem NO (VINCENT *et al.*, 1992).

Nos neurônios, a nNOS é localizada principalmente no terminal pós-sináptico, onde ela é ativada por aumento dos níveis intracelulares de cálcio

(VALTSCHANOFF *et al.*, 2001). A nNOS tem importante tarefa não só nas funções fisiológicas neuronais (liberação de neurotransmissor, desenvolvimento neural, regeneração, plasticidade sináptica, e regulação da expressão gênica), mas também em uma série de desordens neurológicas nas quais a produção excessiva de NO leva a injúria neural (FORSTERMANN *et al.*, 1998). A expressão de nNOS pode ser observada no bulbo olfatório, hipófise, glândula pineal, cordão espinhal (REUSS *et al.*, 1995; CECCATELLI, 1997) e nos núcleos supraóptico e paraventricular do hipotálamo (CECCATELLI, 1997; YUAN *et al.*, 2006; ORLANDO *et al.*, 2008). A enzima pode ser ativada por interleucinas, através de neurônios colinérgicos, e pelo próprio NO (XU *et al.*, 2007; MCCANN *et al.*, 1998).

A descoberta das estruturas cristalinas do domínio oxigenase da isoforma de nNOS, e a consequente elucidação sobre os sítios de ligação para grupo heme, biopterina e L-arginina, permitiram o desenho dos inibidores da enzima (ALDERTON *et al.*, 2001; LI *et al.*, 2005).

Foi demonstrado que o composto 7-nitroindazol (7-NI) compete com o sítio heme de ligação da L-arginina à NOS neuronal (WOLFF;GRIBIN, 1994; WOLFF, LUBESKIE *et al.*, 1994). Essa competitividade não ocorre com as outras isoformas *in vivo*, e assim o 7-NI atua como um inibidor seletivo da NOS neuronal quando administrado sistematicamente (KALISCH *et al.*, 1996; SOUTHAN *et al.*, 1996; HANDY *et al.*, 1998; XU *et al.*, 2000; VENTURA *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2007).

Diversos trabalhos vêm mostrando que esse composto possui o efeito benéfico de não alterar a pressão arterial (WOLFF;GRIBIN, 1994; KALISCH *et al.*, 1996; SOUTHAN *et al.*, 1996; COERT *et al.*, 2003) enquanto outros estudos têm demonstrado que a alteração de efeitos cardiovasculares pelo 7-NI pode ser possível, principalmente por modular a atividade da eNOS, que tem o uma tarefa na regulação da vasodilatação (SOUTHAN *et al.*, 1996; KELLOGG *et al.*, 2008; CACANYIOVA *et al.*, 2009).

Visto que a isoforma neuronal da NOS está presente nos neurônios magnocelulares do hipotálamo (CECCATELLI, 1997; YUAN *et al.*, 2006; ORLANDO *et al.*, 2008) e a inibição farmacológica da nNOS mostrou diminuir a liberação de vasopressina após 24 horas de sobrecarga salina em ratos (VENTURA *et al.*, 2005), acredita-se que o emprego do fármaco inibidor seletivo de NOS neuronal poderia trazer maiores contribuições para desvendar a tarefa do NO oriundo desta isoforma na liberação de vasopressina durante a sepse.

Objetivos

2.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do óxido nítrico oriundo da isoforma neuronal de NOS na liberação de vasopressina durante a sepse induzida por CLP.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar a inibição da nNOS sobre a sobrevivência dos animais após sepse experimental.

2.2.2. Avaliar se a inibição da nNOS altera o hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas, glicose e creatinina plasmáticas e nitrato sérico.

2.2.3. Avaliar a eficácia do inibidor específico de NOS neuronal na inibição da atividade da NOS total no hipotálamo após sepse experimentalmente induzida por ligadura e perfuração cecal.

2.2.4. Avaliar se a inibição da nNOS altera o conteúdo neurohipofisário e as concentrações plasmáticas de vasopressina durante sepse experimental.

Material e Métodos

3.1 Animais

Os animais utilizados para os experimentos foram ratos adultos (peso corporal de 250 a 300 g) da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central do Campus da USP - Ribeirão Preto. Os animais foram ambientados em gaiolas coletivas com no máximo cinco animais por gaiola e mantidos em fotoperíodo de 12/12 horas, à temperatura aproximada de 25 ± 2 °C, com livre acesso à água e dieta comercial balanceada (Nuvilab CR-1 Autoclavável, NUVITAL Nutrientes S/A). No dia anterior ao experimento os animais foram colocados em gaiolas individuais.

Os procedimentos com animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da USP - Campus de Ribeirão Preto, e assim, estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela mesma (Protocolo nº 08.1.350.53.1).

Os critérios do consenso “Humane end points in shock research”, foram utilizados, quando necessários, para sacrificar os animais submetidos à CLP em sofrimento intenso ao longo dos tempos analisados (NEMZEK *et al.*, 2004). Assim, por exemplo, alguns animais a serem sacrificados 24 horas após a cirurgia e que se encontravam em sofrimento intenso após 22 horas, foram sacrificados neste momento e considerados como sendo de 24 horas.

3.2 Protocolo Experimental

Os animais foram divididos nos seguintes grupos: CLP (ligadura e perfuração cecal) e OF (sham/operação fictícia). Estes dois grupos, por sua vez, foram submetidos ao tratamento com veículo (óleo de gergelim e DMSO 10%, na proporção de 1:9 e volume final de 0,5 mL) ou com fármaco inibidor de nNOS (7-nitroindazol). Em um grupo foi feita a observação da sobrevivência e em outro, os animais foram decapitados em cinco tempos diferentes após a cirurgia (0, 4, 6, 18 e 24h) a fim de se estabelecer uma análise temporal de alguns parâmetros durante a sepse. O sangue foi coletado para determinação do hematócrito, sódio e nitrato séricos, osmolalidade, proteínas, creatinina, glicose e vasopressina plasmáticas.

O hipotálamo e a neurohipófise foram removidos, a fim de se determinar a atividade da NOS total e o conteúdo vasopressinérgico, respectivamente.

3.3 Anestesia

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

3.4 Fármaco

Foi utilizado um inibidor seletivo de NOS neuronal, o 7-nitroindazol (7-NI), nas doses de 50 e 80 mg/kg. A escolha da dose de 50 mg/kg foi baseada em estudos com ratos mostrando que ela é capaz de produzir níveis detectáveis de 7-NI no soro por mais de 13 horas (BUSH *et al.*, 2000) e é capaz de inibir a atividade da NOS no hipotálamo (VENTURA *et al.*, 2005).

O grupo no qual foi injetado 80 mg/kg de 7-NI foi utilizado para determinação da atividade da NOS no hipotálamo, a fim de se certificar que o aumento da dose inibiria mais eficientemente a enzima. O fármaco foi aplicado 30 minutos antes da cirurgia CLP ou da operação fictícia.

Para a dissolução do 7-nitroindazol foi utilizado o veículo DMSO 10% e óleo de gergelim na proporção de 1:9 (50 µL de DMSO puro e 450 µL de óleo de gergelim). Este veículo foi escolhido por promover a dissolução completa do 7-NI e foi utilizado em diversos outros trabalhos (KALISCH *et al.*, 1996; COERT *et al.*, 2003; VENTURA *et al.*, 2005; CUI *et al.*, 2007).

3.5 Cirurgias

A fim de se realizar a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP), após a anestesia, foi realizada uma incisão mediana de 2 cm no abdômen do rato, para exposição do ceco. A seguir foi criada uma obstrução, através de ligadura parcial no segmento distal da válvula íleo cecal. Posteriormente, o ceco foi perfurado (10 perfurações) com agulha 16 G na borda antimesentérica. Após a saída das fezes do ceco, este foi introduzido na cavidade abdominal. O fechamento da cavidade abdominal foi realizado em dois planos de sutura com pontos separados. Solução salina normal estéril (20 mL/Kg) foi administrada via subcutânea como líquido de reanimação. O grupo operação fictícia foi submetido à incisão no abdômen, manipulação do ceco e fechamento da cavidade abdominal, mas sem ligadura nem perfuração cecal.

3.6 Determinação da curva de sobrevivência

Trinta animais foram usados para determinação da curva de sobrevivência, sendo que dez deles foram submetidos à operação fictícia e vinte ao estímulo séptico por CLP. Metade de cada grupo foi tratada com veículo e a outra metade com 7-nitroindazol. Após os procedimentos, os animais foram mantidos em gaiolas individuais com água e ração comercial *ad libitum* e observados por 5 dias, para registro do número de óbitos.

3.7 Coleta de sangue, e remoção de hipotálamo e neurohipófise

Os animais destinados à coleta de sangue, neurohipófise e hipotálamo, foram decapitados 0, 4, 6, 18 ou 24 horas após OF ou CLP. O sangue foi coletado em microcapilares heparinizados para determinação de hematócrito (Perfecta) e em três diferentes tubos plásticos: (1) sem anticoagulante, no tubo de 1,5 mL, (2) com

heparina sódica (100 UI/mL), no tubo de 5 mL para obtenção de soro e plasma respectivamente, e (3) com EDTA fluoretado a fim de se obter plasma para dosagem de creatinina e glicose. O hipotálamo e a neurohipófise foram removidos e imediatamente congelados em gelo seco, e posteriormente estocados em freezer a -70°C até serem avaliados a atividade da NOS e o conteúdo de vasopressina, respectivamente. O soro, armazenado a 4°C, foi usado para determinação do sódio e nitrato. O plasma heparinizado e o fluoretado foram armazenados em 3 tubos distintos para serem utilizado na mensuração de osmolalidade, proteínas plasmáticas, glicose e creatinina (armazenado a 4°C) e dosagem de vasopressina por radioimunoensaio (armazenado a -20 °C).

3.8. Determinação do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade creatinina, glicose e proteínas plasmáticas

3.8.1 Hematócrito

Os microcapilares heparinizados (Perfecta) foram selados na extremidade contrária à entrada de sangue com auxílio de uma lamparina e centrifugados por 2 minutos em centrífuga própria para determinação de hematócrito (Centrimicro Mod. 211, FANEN). A leitura do hematócrito foi feita com auxílio de um cartão próprio para essa finalidade e que acompanha a centrífuga.

3.8.2 Sódio sérico

O sódio sérico foi determinado em fotômetro de chama (Micronal), devidamente calibrado com solução padrão Micronal contendo 140m Eq/L de sódio e 5m Eq/L de potássio, diluída em água destilada na proporção de 1:100. Cada amostra foi diluída igualmente na solução padrão (30µL de soro em 2970 µL de água

destilada), homogeneizada e aspirada no fotômetro de chama para a leitura da concentração do sódio sérico.

3.8.3 Osmolalidade plasmática

50 μ L do plasma armazenado a 4°C foi utilizado para a determinação da osmolalidade plasmática pelo método de abaixamento do ponto de congelação da água em micro-osmômetro (Precision System, INC.).

3.8.4 Creatinina e glicose plasmáticas

A avaliação da concentração plasmática de glicose e creatinina foi realizada em espectrofotômetro com o uso de kits diagnósticos da LabTest, seguindo as normas do fabricante.

3.8.5 Proteínas plasmáticas

Dez microlitros do plasma armazenado a 4°C foram diluídos na proporção de 1:200. Dessa diluição, 10 μ L foram dispostos em placas com 96 poços, e posteriormente 200 μ L de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.), diluído na proporção de 1:5 com água milli-Q, foram adicionados. As leituras da curva padrão e das amostras foram realizadas em Microplate Manager (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 595 nm e temperatura de 36°C. Os resultados foram expressos em g/dL.

3.8.6 Determinação indireta de NO pela dosagem de nitrato sérico

A determinação de nitrato plasmático foi realizada pela técnica de quimioluminescência NO/ozônio. O procedimento foi realizado utilizando-se 5 µL de plasma desproteinizado por incubação com etanol 95% a 4°C por 30 minutos e, posteriormente, centrifugado por 5 minutos a 5000 g. As amostras foram injetadas em um vaso de reação contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N à 95°C) que converte o nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é aspirado, usando gás hélio, para a câmara de quimiluminescência do Sievers NOAnalyzer (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.

3.8.7 Determinação da atividade da NOS neuronal

A determinação da atividade da NOS foi realizada pela modificação do método da citrulina descrito por Bredt e Synder (BREDT; SYNDER, 1990). Os hipotálamos removidos foram sonicados em 200 µL de tampão de homogeneização [(1mM de DTT, 1 mM de EGTA, 1 mM de PMSF, 10 g/mL de aprotinina, 10 g/mL de inibidor de proteases (Roche C11836145001)]. O homogenato foi centrifugado 10 minutos a 10000 rpm, a 4°C e alíquotas do sobrenadante (40 µL) foram adicionadas a 100 µL de tampão do ensaio (20 mM de HEPES, 1.25 mM de CaCl₂, 1 mM de DDT, 100 M de tetrahydrobiopterina (BH₄), 1 mM de NADPH, 80,000 cpm [C¹⁴]-L-arginina) e incubadas por uma hora a temperatura ambiente.

A reação foi parada com a adição de 1 mL de suspensão de resina de troca iônica DOWEX 50W diluída em HEPES 20 mM, pH 5,5 e centrifugada por 5 minutos a 10000 rpm, 4°C. Após a centrifugação, 400 µL de sobrenadante foram adicionados a 3 mL de líquido de cintilação (Ecolite / ICN - 882475) e a radioatividade foi determinada em contador de cintilação beta. O sobrenadante foi

utilizado para determinar a concentração de proteína pelo método de Bradford – Comassie Plus Protein Assay reagent (Thermo Cientific –1856210). A atividade da NOS foi expressa como picomoles $[C^{14}]$ -l-citrulina/mg de proteína/min.

3.9 Dosagem Hormonal

3.9.1 Extração de vasopressina do plasma

O plasma armazenado a -20°C foi utilizado para dosagem de AVP por radioimunoensaio após extração com acetona e éter de petróleo. Um mililitro de plasma de cada amostra foi submetido à extração do nonapeptídeo e após liofilização foi novamente estocado a -20°C . No dia da realização do radioimunoensaio as amostras foram ressuspensas em 250 μL de tampão para AVP.

3.9.2 Radioimunoensaio para AVP

As concentrações plasmáticas de AVP foram determinadas utilizando-se reagentes e protocolos de incubação comuns. Os peptídeos marcados com ^{125}I foram de fonte comercial (Amersham Bioscience). O ensaio não-equilibrado foi realizado com volume de incubação de 500 μL e tempo de incubação de 4 dias a 4°C . A AVP foi medida com antisoro de diluição final 1:60.000. O antisoro 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.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados pelo teste de análise de variância de duas vias (Two-Way ANOVA), e quando necessário foram realizadas comparações dentro do grupo pelo teste de Student Newman-Keuls (SNK). Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. O número de animais (n) está apresentado no texto e/ou na legenda das figuras.

Resultados

4.1 Curva de sobrevivência

Para determinação do efeito da inibição periférica de nNOS na mortalidade por sepse polimicrobiana, a sobrevida de animais pré-tratados com injeção i.p. de 7-NI e seu respectivo veículo (DMSO 10% + óleo de gergelim na proporção de 1:9) foi observada por cinco dias. O número de óbitos foi registrado a cada 24h.

Cinco animais tratados com veículo e cinco tratados com 7-NI foram submetidos à operação fictícia (OF). Todos os animais submetidos à operação fictícia independentemente do pré-tratamento apresentaram sobrevida de 100% após cinco dias. O grupo de dez animais pré-tratados com veículo e submetidos à CLP apresentou quatro mortes no primeiro dia, nenhuma no segundo dia e três do terceiro ao quinto dia do experimento.

Os outros dez animais pré-tratados com o inibidor da nNOS apresentou uma morte no primeiro dia e três no segundo dia, não apresentando mortes a partir do terceiro dia. Apesar de uma tendência à melhora da sobrevida com o tratamento por inibidor de nNOS, correlacionando-se os dois grupos não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,1403$).

Figura 3. Curva de sobrevivência dos animais pré-tratados com inibidor de óxido nítrico sintase neuronal (7-NI 50 mg/kg) ou veículo (DMSO 10% + óleo de gergelim), submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP. O fármaco ou veículo foram injetados via intraperitoneal 30 minutos antes da operação fictícia (OF) ou da cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP). Os dados mostram a porcentagem de sobrevida em cada grupo. Número de animais (n) entre parênteses.

4.2. Efeito do 7-nitroindazol nas concentrações plasmáticas de proteínas, hematócrito, osmolalidade e sódio sérico

4.2.1. Hematócrito e Proteínas plasmáticas

A análise dos resultados de hematócrito por ANOVA seguida do teste de SNK mostrou que nos animais CLP pré-tratados com DMSO 10% e óleo de gergelim houve efeito do tempo ($F_{(4,57)} = 9,78$; $P < 0,001$), do estímulo CLP ($F_{(1,57)} = 6,12$; $P = 0,017$) e interação entre ambos ($F_{(4,57)} = 3,605$; $P = 0,012$). Neste grupo, constatou-se aumento do hematócrito nos tempos 4 horas em relação a todos os outros tempos e no tempo 6 horas em relação ao tempos de 0h e 24h, e ao grupo OF. Já no grupo CLP pré-tratado com 7-NI foi observado efeito do tempo ($F_{(4,57)} = 3,69$; $P = 0,011$), do estímulo (CLP) ($F_{(1,57)} = 6,35$; $P = 0,015$) e interação entre ambos ($F_{(4,57)} = 3,22$; $P = 0,020$), sendo visto aumento do hematócrito, nos tempos 4 e 18 horas no grupo CLP que se diferenciou do grupo OF e do tempo 24 h. Não houve alteração com nenhum dos tratamentos no grupo operação fictícia.

Figura 4. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-nitroindazol no hematócrito de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 6 por grupo. ^a $P < 0,05$ comparados aos tempos 0, 6, 18 e 24 horas. ^b $P < 0,05$ comparado aos tempos, 0 e 24 horas. ^c $P < 0,05$ comparado ao grupo OF. ^d $P < 0,05$ comparado aos tempos 4 e 18 horas.

A análise de concentração de proteínas plasmáticas por ANOVA seguida de SNK revelou nos animais CLP tratados com DMSO 10% + óleo de gergelim, efeito do tempo ($F_{(4,59)} = 6,09$; $P < 0,001$). Após CLP, as concentrações plasmáticas de proteínas no tempo de 6 horas foram diminuídas e retornaram às concentrações basais em 24 horas. Após o uso do fármaco inibidor de NOS neuronal foi verificado efeito do tempo ($F_{(4,59)} = 5,43$; $P = 0,001$) e estímulo ($F_{(4,59)} = 5,09$; $P = 0,028$). Os animais tratados com 7-NI mostraram suas concentrações de proteínas diminuídas nos tempos quatro e 6 horas, após CLP, sugerindo assim, que o fármaco injetado poderia estar antecipando o decréscimo da quantidade das proteínas plasmáticas. Após o pré-tratamento com 7-NI, as concentrações de proteínas plasmáticas foram diferentes entre os animais submetidos à OF ou à CLP no tempo 4h. Não houve alteração temporal com nenhum dos tratamentos no grupo operação fictícia.

Figura 5. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI na concentração de proteínas plasmáticas de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 6 por grupo. ^a $P < 0,05$ comparado aos tempos 0 e 24h. ^b $P < 0,05$ comparado ao grupo OF.

4.2.2 Osmolalidade plasmática e Sódio sérico

Os resultados de osmolalidade plasmática foram analisados por ANOVA seguida do teste de SNK. Os animais CLP tratados com veículo não apresentaram alteração, mas os tratados com 7-NI apresentaram diminuição da osmolalidade em todos os tempos a partir de 4 horas após CLP.

Figura 6. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI na osmolalidade plasmática de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 6 por grupo. ^aP<0,05 comparado ao tempo 0h.

Em relação à concentração de sódio sérico, nos animais CLP tratados com veículo houve uma pequena diminuição no tempo 6 horas, mas que retornou aos níveis basais em 24 horas. Nos animais CLP tratados com 7-NI houve uma pequena redução de sódio sérico no tempo de 24 horas após CLP, mostrando efeito do tratamento com o fármaco ($F_{(4,58)}=5,264$; $P<0,001$). Não houve alteração com nenhum dos tratamentos no grupo operação fictícia.

Figura 7. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) no sódio sérico de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 6 por grupo. ^aP<0,05 comparado ao tempo 0h. ^cP<0,05 comparado ao grupo OF. ^dP<0,01 comparado ao grupo veículo.

4.3 Efeito do 7-nitroindazol nas concentrações de glicose e creatinina plasmáticas

4.3.1 Glicose

Figura 8. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na concentração de glicose plasmática dos animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 5 por grupo. ^aP<0,05 comparado aos animais intactos e aos animais nos tempos 6, 18 e 24 h. ^bP<0,05 comparado ao tempo 18 horas.

ANOVA seguida de SNK dos resultados de glicose plasmática revelou efeito de tempo ($F_{(1,38)}=11.651$; $P<0,001$). Nos animais do grupo veículo foi visto aumento da glicose após 4 horas de CLP, em relação aos animais intactos e aos animais sacrificados nos tempos 6, 18 e 24 horas. Os animais pré-tratados com 7-NI mostraram aumento de glicose também no tempo 4 horas após CLP, e este aumento foi visto em relação ao tempo 18 horas.

4.3.2 Creatinina

Os animais submetidos à CLP e tratados com veículos não apresentaram alteração na concentração de creatinina plasmática após a cirurgia. ANOVA seguida do teste de SNK para a concentração plasmática de creatinina em animais pré-tratados com 7-NI revelou efeito do tempo ($F_{(1,32)}=4.66$; $P=0,007$), e se caracterizou por aumento na concentração nos tempos 6 e 18h. Não foram encontradas diferenças nos valores determinados entre o grupo tratado com veículo e o grupo tratado com 7-NI.

Figura 9. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na concentração plasmática de creatinina dos animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 5 por grupo. ^a $P<0,05$ comparado ao tempo 4h.

4.4 Efeito do 7-nitroindazol nas concentrações séricas de nitrato

Em relação à análise do nitrato sérico, nos animais tratados com veículo foi verificado efeito do tempo no grupo CLP ($F_{(1,53)}=7,66$; $P<0,005$). Em 18 horas houve aumento em relação ao tempo 0h e retorno às concentrações basais em 24 horas. Além disto, no tempo de 6 horas foi encontrada diferença entre os grupos OF e CLP. Nos animais pré-tratados com 7-NI foi encontrado efeito do tempo ($F_{(4,57)}=6,940$; $P<0,001$), refletido no aumento às 6, 18 e 24h após CLP. Além disso foi observado efeito do estímulo ($F_{(1,57)}=36,114$; $P<0,001$), mostrando diferença entre OF e CLP nos tempos 4 e 6 horas.

Figura 10. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na produção de nitrato de animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 4 a 6 por grupo. ^a $P<0,05$ comparado ao tempo 0h. ^b $P<0,05$ comparado ao grupo OF.

4.5 Efeito do 7-nitroindazol na atividade da Óxido Nítrico Sintase neuronal

Os dados do conteúdo hipotalâmico de Óxido Nítrico Sintase nos animais submetidos à CLP e tratados com veículo (DMSO 10% + óleo de gergelim) ou 7-NI foram submetidos à ANOVA seguida de SNK e mostraram efeito do tratamento ($F_{(1,30)}=32,90$; $P<0,001$) e do tempo ($F_{(1,30)}=6,21$; $P=0,002$). Nos animais tratados com veículo foi visto um aumento da atividade da NOS, quando comparado com o grupo dos animais intactos, após 4 horas e que persistiu após 24 horas de CLP.

Os resultados mostram que houve a inibição da atividade da enzima com o uso do 7-nitroindazol, na dose de 50 mg/kg após sepse experimentalmente induzida por CLP, nos animais intactos e nos tempos 0, 4 e 24 horas ($P<0,05$).

Além disso, foi visto que com o aumento da dose para 80 mg/kg, houve uma inibição mais significativa da atividade da enzima em 4 horas comparando-se com o resultado encontrado no mesmo tempo com a dose de 50 mg/kg ($P<0,001$). No entanto em 24 horas após CLP, o aumento da dose não mostrou resultado estatisticamente diferente do encontrado com uso de 50 mg/kg de 7-NI.

Figura 11. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 ou 80 mg/kg) na atividade da NOS no hipotálamo de animais submetidos à sepse polimicrobiana por CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 3 por grupo. ^a $P<0,001$ comparado ao animal intacto. ^b $P<0,001$ comparado ao mesmo tempo no grupo tratado com veículo. ^c $P<0,001$ comparado ao mesmo tempo no grupo tratado com 7-NI (50 mg/kg).

4.6 Efeito do 7-nitroindazol nas concentrações plasmáticas e no conteúdo neurohipofisário de vasopressina

4.6.1 Vasopressina plasmática

Os dados da concentração plasmática de AVP nos animais CLP tratados com veículo (DMSO 10% + óleo de gergelim) e 7-NI foram submetidos à ANOVA seguida de SNK e foi visto um aumento na concentração do hormônio nos animais submetidos a OF e CLP e sacrificados no tempo 0 horas. Em 4 horas, houve um retorno aos níveis basais e às 6 horas um aumento que se mostrou diferente dos tempos 4, 18 e 24 horas. O tratamento com 7-NI não alterou o perfil de liberação do hormônio e, portanto, o aumento da concentração em 6 horas permaneceu após a injeção do fármaco.

Figura 12. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) na concentração plasmática de vasopressina dos animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 3 a 6 por grupo. ^aP<0,05 comparado ao animal intacto e aos tempos 4, 18 e 24 horas. ^bP<0,05 comparado ao grupo OF.

4.6.2 Vasopressina neurohipofisária

A análise do conteúdo neurohipofisário de vasopressina dos animais tratados com veículo (óleo de gergelim + DMSO 10%), mostrou efeito do tempo ($F_{(4,55)} = 3,62$; $P < 0,05$), refletido pela diminuição da concentração de AVP nos tempos 4, 6 e 18 horas e retornando aos níveis basais após 24 horas de CLP. Após a administração intraperitoneal de 7-nitroindazol foi verificado efeito do tempo ($F_{(4,57)} = 2,89$; $P < 0,05$) e da interação entre tempo e estímulo ($F_{(4,57)} = 3,31$; $P < 0,05$), onde foi vista redução dos estoques neurohipofisários de AVP apenas 6h após CLP. Foi vista redução do conteúdo nos animais OF, após 4 horas.

Figura 13. Efeito da injeção intraperitoneal de 7-NI (50 mg/kg) no conteúdo neurohipofisário de vasopressina em animais submetidos à operação fictícia (OF) ou CLP. Os dados representam média $\pm$ erro padrão da média. Número de animais: 5 a 6 por grupo. ^a $P < 0,05$ comparado ao grupo 0h. ^b $P < 0,05$ comparado ao tempo 4 horas. ^c $P < 0,05$ comparado ao grupo CLP. ^d $P < 0,05$ comparado ao tempo 0h do grupo veículo.

Discussão

Dentre os diversos modelos de sepse experimental existentes (DEITCH, 1998; MARSHALL *et al.*, 2005; REMICK *et al.*, 2005; MUENZER *et al.*, 2006) o modelo de CLP se caracteriza pela sua simplicidade, reprodutibilidade e por proporcionar o controle do grau da contaminação bacteriana, através da escolha do tamanho da agulha e do número de perfurações (HUBBARD *et al.*, 2005).

Neste trabalho os nossos animais apresentaram os sintomas descritos para a sepse tais como: secreção na área ocular, letargia, pêlos arrepiados, e um comportamento menos agitado dentro das gaiolas.

É bastante discutido se é benéfica ou não a inibição das isoformas de óxido sintase durante o choque séptico (NAVA *et al.*, 1991; WOLKOW, 1998; TORRES-DUENAS *et al.*, 2006). Alguns trabalhos vêm mostrando que a inibição da isoforma neuronal durante a sepse em ovinos, tem sido benéfica (ENKHBAATAR *et al.*, 2003; ENKHBAATAR *et al.*, 2009) ao passo que Cui e colaboradores mostraram que a inibição genética da isoforma neuronal da NOS diminuiu a sobrevivência de camundongos sépticos, explicada pela alteração na produção de citocinas como TNF- λ , IL-6, IFN- γ , IL-10, IL-4 e IL-1 β (CUI *et al.*, 2007). Não há ainda no presente momento trabalhos mostrando se a inibição farmacológica da NOS neuronal após a sepse em ratos altera a sobrevivência. Diante disso, decidimos avaliar o efeito do pré-tratamento do 7-NI sobre a sobrevida dos animais sépticos, e foi visto que o fármaco não alterou a sobrevida, conforme visto por outros pesquisadores que usaram a dose de 80 mg/kg de 7-NI em camundongos sépticos (CUI *et al.*, 2007).

A dose de 50 mg/kg, por nós utilizada para avaliar a sobrevivência é descrita como sendo suficiente para reduzir a atividade da NOS no hipotálamo, hipocampo, córtex, cerebelo e substância negra (KALISCH *et al.*, 1996; VENTURA *et al.*, 2005). Além disso, nesta dose, o fármaco mostra-se detectável em níveis séricos por mais de 13 horas (BUSH *et al.*, 2000). Outros inibidores específicos de nNOS são conhecidos, como L-NA, L-MNA, 3-bromo-7-nitroindazol e a espermina, mas no entanto, o 7-nitroindazol é o mais específico deles, principalmente para células neuronais (SOUTHAN *et al.*, 1996), e por isso, o mais utilizado. Este fármaco inibe a atividade da Óxido Nítrico Sintase neuronal através da ligação ao grupo heme da enzima, e subsequentemente, interferindo na ligação da tetrahidrobiopterina à enzima (BUSH *et al.*, 2000).

Em nossos experimentos, houve um aumento do hematócrito no grupo CLP, quatro e 6 horas após tratamento com veículo, caracterizando assim um quadro de

hipovolemia, que pode ser explicada pelo possível extravasamento de líquido intravascular para o interstício e cavidade peritoneal (PARRILLO, 1993; ANDREW *et al.*, 2000).

Sabe-se que mudanças na pressão arterial e no volume sanguíneo são percebidas por mecanorreceptores e esta informação é enviada via nervos vago e glossofaríngeo, para as regiões autonômicas. O núcleo do trato solitário (NTS) e a medula ventro-lateral são importantes regiões de integração sináptica para os reflexos que irão resultar nas respostas autonômicas e neuroendócrinas para manutenção do volume e pressão sanguínea. A medula ventrolateral recebe projeções do NTS para as células noradrenérgicas, da área A1, localizada caudalmente e para as células noradrenérgicas localizadas na área C1, mais rostral. A área A1 projeta para as divisões magnocelulares dos núcleos supraótico e paraventricular e a medula ventrolateral rostral está envolvida no controle autonômico cardiovascular (BRUHN *et al.*, 2009).

Sabendo então, que a hipovolemia é um dos estímulos para liberação de vasopressina, decidiu-se neste trabalho, determinar a volemia através do hematócrito do sangue periférico, que se trata de um índice bastante utilizado para se determinar alterações de volume extracelular (TAKANISHI *et al.*, 2008).

Neste trabalho, a hipovolemia pode ter participado do aumento da liberação de vasopressina no tempo de 6 horas. A administração de 7-NI não alterou substancialmente o quadro de hipovolemia, sugerindo que outros mediadores que não o NO oriundo da NOS neuronal, tenham participação mais efetiva na alteração deste parâmetro durante a sepse. Acompanhada da hipovolemia, a perda proteica é uma importante alteração que ocorre neste quadro inflamatório e ao avaliar a concentração das proteínas plasmáticas, foi observada após CLP no grupo tratado com veículo, uma diminuição no tempo de 6h e recuperação da concentração no tempo 24h. Resultados semelhantes foram observados no modelo de choque endotóxico por LPS (WANG *et al.*, 1993) e em nosso laboratório no modelo de sepse por CLP com 20 perfurações cecais (CORREA *et al.*, 2007). A injeção i.p. de 7-NI antecipou a diminuição da concentração de proteínas para o tempo de 4 horas, mas essa redução não se mostrou diferente do valor encontrado para o grupo tratado com veículo. Diante disso, conclui-se que outros mediadores, além do NO, como citocinas, prostaglandinas e leucotrienos estariam envolvidos no controle da permeabilidade vascular durante a sepse.

Outro estímulo bastante importante para a liberação de vasopressina é o aumento da osmolalidade, que é determinada principalmente por alterações na concentração de sódio e em menor grau de proteínas plasmáticas. Apesar de ligeira diminuição na concentração de sódio sérico e proteínas no grupo veículo, a osmolalidade plasmática nesses animais não foi alterada. Após o tratamento com 7-NI o sódio diminuiu na fase aguda e tardia, e a perda de proteínas foi mais intensa, e assim acredita-se que a diminuição da osmolalidade vista com o uso do fármaco poderia ser explicada pela redução temporal de sódio e em menor grau de proteínas. Estes resultados corroboram com o trabalho de pesquisadores que demonstraram que o tratamento crônico com 7-NI parece alterar a retenção de água e sódio (XU *et al.*, 2000).

A creatinina foi determinada visto que um aumento na sua concentração plasmática é característica de disfunção renal e/ou hipoperfusão tecidual, que pode acometer pacientes com sepse severa (LIAW *et al.*, 2005). Os animais tratados com veículo não apresentaram alteração da concentração de creatinina, mas o tratamento com inibidor da NOS neuronal alterou este parâmetro, visto que foi encontrado um aumento em seis e 18 h, sugerindo que o NO oriundo desta isoforma da NOS poderia ter alguma participação na regulação da função renal. Além disso, alguns trabalhos vêm mostrando que a diminuição da NOS neuronal no rim está associada com a presença de lesão renal crônica em ratos (BAYLIS, 2008; SMITH *et al.*, 2009).

Na sepse, pode ser encontrada, também, a reposta endócrino-metabólica ao trauma, que é retratada pela resistência à insulina, intolerância à glicose e hiperglicemia (MARIK *et al.*, 2004; DENG *et al.*, 2009). O aumento da concentração de glicose na sepse, devido também ao aumento de TNF- α apresenta efeitos indesejáveis, como inibição da capacidade fagocítica de monócitos, função de neutrófilos, e alteração da expressão de interleucinas (TURINA *et al.*, 2005; DENG *et al.*, 2009). Considerando que valores normais de glicose plasmática em ratos sejam semelhantes aos de humanos (ELAHI *et al.*, 1985) observou-se neste trabalho que a cirurgia de CLP causou hiperglicemia. Após o tratamento com 7-nitroindazol, constatou-se que a isoforma neuronal não exerceu função importante nessa resposta ou no controle glicêmico em animais com sepse polimicrobiana, visto que os resultados após a injeção intraperitoneal não se mostraram diferentes dos encontrados no grupo tratado com veículo.

A atividade da NOS, determinada pelo método proposto por Bredt e cols (BREDT *et al.*, 1990), mostrou-se aumentada nos tempos determinados de 4 e 24 horas após CLP, no hipotálamo dos animais tratados com veículo. O pré- tratamento com 7-NI reduziu a atividade do óxido nítrico sintase nos tempos analisados. Decidiu-se utilizar a dose de 80 mg/kg, a fim de comprovar a eficácia do fármaco (CUI *et al.*, 2007). Após a determinação da inibição da atividade da enzima com o 7-NI, decidiu-se então verificar se ocorreriam alterações nas concentrações séricas dos metabólitos de óxido nítrico nos ratos submetidos à CLP, já que a literatura refere que a pressão arterial não é alterada com o uso deste fármaco (WOLFF;GRIBIN, 1994; KALISCH *et al.*, 1996; SOUTHAN *et al.*, 1996; COERT *et al.*, 2003).

A concentração plasmática de nitrato em animais do grupo CLP tratados com veículo aumentou a partir de 6h após indução do estímulo, resultado este já previamente observado em nosso laboratório (CORREA *et al.*, 2007; ATHAYDE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009). Entretanto, a administração periférica do inibidor de nNOS (50 mg/kg) não alterou esta concentração, sugerindo que a produção do NO durante a sepse seja proveniente de outras isoformas de NOS, que não a neuronal.

Analisando-se as concentrações plasmáticas de AVP foi observado que no tempo 0h ocorreu um grande aumento de vasopressina, tanto nos animais submetidos à CLP quanto à OF. Este aumento já foi visto em trabalhos anteriores em nosso laboratório e pode ser atribuído ao estresse da manipulação, ao dano cecal, e à ativação de osmorreceptores viscerais.

Em humanos, dentro de 3 minutos após a abertura do peritônio e início da manipulação intraperitoneal a concentração de vasopressina plasmática está bastante aumentada (MELVILLE, FORSLING *et al.*, 1985). Durante uma operação abdominal, sem alterações de pressão sanguínea e osmolalidade, os estímulos nervosos gerados pela manipulação do peritônio seriam os fatores determinantes para o aumento da secreção de vasopressina, provavelmente via sistema autonômico (MELVILLE, FRIZIS *et al.*, 1985).

A exposição do intestino para a manipulação cecal pode causar desidratação local e ativar osmorreceptores viscerais, os quais via aferências vagais também induzem a liberação de vasopressina e seriam então responsáveis pelo aumento

imediatamente das concentrações plasmáticas de vasopressina visto logo após a cirurgia (BOURQUE *et al.*, 1994).

Neste trabalho, as concentrações plasmáticas de AVP aumentaram 6 horas após CLP corroborando com resultados do nosso laboratório, que de fato têm mostrado aumento da secreção de AVP nos tempos 4 e/ou 6h neste modelo de sepse (CORREA *et al.*, 2007; PANCOTO *et al.*, 2008; ATHAYDE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009). Após o tratamento com 7-NI as concentrações plasmáticas continuaram aumentadas após 6 horas contrastando com resultados em animais cirróticos nos quais 7-NI injetado por gavagem mostrou reverter o aumento plasmático de vasopressina observado nesse modelo experimental (XU *et al.*, 2000). Acreditamos que esta modulação da NOS neuronal na liberação de AVP vista nos animais cirróticos não tenha sido vista no modelo de sepse, por este apresentar um padrão de expressão de mediadores inflamatórios distinto do modelo de cirrose (BYL *et al.*, 1993).

Os estoques de vasopressina na neurohipófise, nos animais tratados com veículo, apresentaram uma diminuição temporal (4, 6 e 18h) e uma recuperação em 24h, concordando com os achados do nosso laboratório (ATHAYDE *et al.*, 2009; OLIVEIRA-PELEGRIN *et al.*, 2009). O pré-tratamento com 7-NI reduziu os estoques no tempo 0h e impediu a redução em 4 horas. Diante disso, conclui-se que a inibição farmacológica da NOS neuronal, através de injeção intraperitoneal de 7-NI, não altera a liberação de vasopressina após sepse experimental.

Conclusões

Com base nos resultados obtidos podemos concluir que o NO oriundo da NOS neuronal não tem participação importante nas alterações de volemia, glicose plasmática, proteínas e na liberação de vasopressina durante sepse experimental. Entretanto parece ter uma tarefa no controle da função renal durante esta situação patológica.

Referências

ABRAHAM, E., M. A. MATTHAY, C. A. DINARELLO, J. L. VINCENT, J. COHEN, S. M. OPAL, M. GLAUSER, *et al.* Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. **Crit Care Med**, v.28, n.1, Jan, p.232-5. 2000.

AIURA, K., M. UEDA, M. ENDO ;M. KITAJIMA. Circulating concentrations and physiologic role of atrial natriuretic peptide during endotoxic shock in the rat. **Crit Care Med**, v.23, n.11, Nov, p.1898-906. 1995.

ALDERTON, W. K., C. E. COOPER ;R. G. KNOWLES. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochem J**, v.357, n.Pt 3, Aug 1, p.593-615. 2001.

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

ANNANE, D., E. BELLISSANT ;J. M. CAVAILLON. Septic shock. **Lancet**, v.365, n.9453, Jan 1, p.63-78. 2005.

ARBONES, M. L., J. RIBERA, L. AGULLO, M. A. BALTRONS, A. CASANOVAS, V. RIVEROS-MORENO ;A. GARCIA. Characteristics of nitric oxide synthase type I of rat cerebellar astrocytes. **Glia**, v.18, n.3, Nov, p.224-32. 1996.

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

BAKER, C. C., I. H. CHAUDRY, H. O. GAINES ;A. E. BAUE. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v.94, n.2, Aug, p.331-5. 1983.

BANDALETOVA, T., I. BROUET, H. BARTSCH, T. SUGIMURA, H. ESUMI ;H. OHSHIMA. Immunohistochemical localization of an inducible form of nitric oxide synthase in various organs of rats treated with *Propionibacterium acnes* and lipopolysaccharide. **Apmis**, v.101, n.4, Apr, p.330-6. 1993.

BAYLIS, C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.294, n.1, Jan, p.F1-9. 2008.

BENAMAR, K., E. B. GELLER ;M. W. ADLER. Effect of a mu-opioid receptor-selective antagonist on interleukin-6 fever. **Life Sci**, v.70, n.18, Mar 22, p.2139-45. 2002.

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

BOISSEL, J. P., P. M. SCHWARZ ;U. FORSTERMANN. Neuronal-type NO synthase: transcript diversity and expressional regulation. **Nitric Oxide**, v.2, n.5, p.337-49. 1998.

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

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

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

BOURQUE, C. W., S. H. OLIET ;D. RICHARD. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. **Front Neuroendocrinol**, v.15, n.3, Sep, p.231-74. 1994.

BREDT, D. S. ;S. H. SNYDER. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.87, n.2, Jan, p.682-5. 1990.

BRUHN, F. H., P. B. CORREA, G. R. OLIVEIRA-PELEGRIN ;M. J. ROCHA. Blocking systemic nitric oxide production alters neuronal activation in brain structures involved in cardiovascular regulation during polymicrobial sepsis. **Neurosci Lett**, v.453, n.3, Apr 10, p.141-6. 2009.

BRUN-BUISSON, C., F. DOYON, J. CARLET, P. DELLAMONICA, F. GOUIN, A. LEPOUTRE, J. C. MERCIER, *et al.* Incidence, risk factors, and outcome of severe sepsis and septic shock in adults. A multicenter prospective study in intensive care units. French ICU Group for Severe Sepsis. **Jama**, v.274, n.12, Sep 27, p.968-74. 1995.

BURCHARDI, H. ;H. SCHNEIDER. Economic aspects of severe sepsis: a review of intensive care unit costs, cost of illness and cost effectiveness of therapy. **Pharmacoeconomics**, v.22, n.12, p.793-813. 2004.

BUSH, M. A. ;G. M. POLLACK. Pharmacokinetics and protein binding of the selective neuronal nitric oxide synthase inhibitor 7-nitroindazole. **Biopharm Drug Dispos**, v.21, n.6, Sep, p.221-8. 2000.

BYL, B., I. ROUCLOUX, A. CRUSIAUX, E. DUPONT ;J. DEVIERE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 plasma levels in infected cirrhotic patients. **Gastroenterology**, v.104, n.5, May, p.1492-7. 1993.

CACANYIOVA, S., F. KRISTEK, M. GEROVA, P. KRENEK ;J. KLIMAS. Effect of chronic nNOS inhibition on blood pressure, vasoactivity, and arterial wall structure in Wistar rats. **Nitric Oxide**, v.20, n.4, Jun, p.304-10. 2009.

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

CECCATELLI, S. Expression and plasticity of NO synthase in the neuroendocrine system. **Brain Res Bull**, v.44, n.4, p.533-8. 1997.

CHAKRABARTI, A., S. S. CHATTERJEE, K. L. RAO, M. M. ZAMEER, M. R. SHIVAPRAKASH, S. SINGHI, R. SINGH, *et al.* Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. **Scand J Infect Dis**, v.41, n.4, p.275-84. 2009.

CLEMENTI, E. The contribution of Salvador Moncada to our understanding of the biology of nitric oxide. **IUBMB Life**, v.55, n.10-11, Oct-Nov, p.563-5. 2003.

COERT, B. A., R. E. ANDERSON ;F. B. MEYER. Is neuroprotective efficacy of nNOS inhibitor 7-NI dependent on ischemic intracellular pH? **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.284, n.1, Jan, p.H151-9. 2003.

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

CUI, X., V. BESCH, A. KHAIBULLINA, A. HERGEN, M. QUEZADO, P. EICHACKER ;Z. M. QUEZADO. Neuronal nitric oxide synthase deficiency decreases survival in bacterial peritonitis and sepsis. **Intensive Care Med**, v.33, n.11, Nov, p.1993-2003. 2007.

DADOUN, F., V. GUILLAUME, N. SAUZE, J. FARISSE, J. G. VELUT, J. C. ORSONI, R. GAILLARD, *et al.* Effect of endotoxin on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in sheep. **Eur J Endocrinol**, v.138, n.2, Feb, p.193-7. 1998.

DEITCH, E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. **Shock**, v.9, n.1, Jan, p.1-11. 1998.

DELLINGER, R. P. Cardiovascular management of septic shock. **Crit Care Med**, v.31, n.3, Mar, p.946-55. 2003.

DELLINGER, R. P., M. M. LEVY, J. M. CARLET, J. BION, M. M. PARKER, R. JAESCHKE, K. REINHART, *et al.* Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Intensive Care Med**, v.34, n.1, Jan, p.17-60. 2008.

DENG, A. Y., J. P. RAPP, H. KATO ;M. T. BIHOREAU. Linkage mapping of the neuronal nitric oxide synthase gene (Nos1) to rat chromosome 12. **Mamm Genome**, v.6, n.11, Nov, p.824. 1995.

DENG, H. P. ;J. K. CHAI. The effects and mechanisms of insulin on systemic inflammatory response and immune cells in severe trauma, burn injury, and sepsis. **Int Immunopharmacol**, Jul 30. 2009.

DIMMELER, S. ;A. M. ZEHER. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. **Nitric Oxide**, v.1, n.4, Aug, p.275-81. 1997.

DYSON, A. ;M. SINGER. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? **Crit Care Med**, v.37, n.1 Suppl, Jan, p.S30-7. 2009.

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

ELAHI, D., D. C. MULLER, D. K. ANDERSEN, J. D. TOBIN ;R. ANDRES. The effect of age and glucose concentration on insulin secretion by the isolated perfused rat pancreas. **Endocrinology**, v.116, n.1, Jan, p.11-6. 1985.

ENKHBAATAR, P., R. CONNELLY, J. WANG, Y. NAKANO, M. LANGE, A. HAMAHATA, E. HORVATH, *et al.* Inhibition of neuronal nitric oxide synthase in ovine model of acute lung injury. **Crit Care Med**, v.37, n.1, Jan, p.208-14. 2009.

ENKHBAATAR, P., K. MURAKAMI, K. SHIMODA, A. MIZUTANI, R. MCGUIRE, F. SCHMALSTIEG, R. COX, *et al.* Inhibition of neuronal nitric oxide synthase by 7-nitroindazole attenuates acute lung injury in an ovine model. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.285, n.2, Aug, p.R366-72. 2003.

ESMON, C. T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? **Crit Care Med**, v.32, n.5 Suppl, May, p.S219-22. 2004.

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

FORSTERMANN, U., J. P. BOISSEL ;H. KLEINERT. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **Faseb J**, v.12, n.10, Jul, p.773-90. 1998.

FURCHGOTT, R. F. ;J. V. ZAWADZKI. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature**, v.288, n.5789, Nov 27, p.373-6. 1980.

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

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

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

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

GRINEVICH, V., X. M. MA, G. JIRIKOWSKI, J. VERBALIS ;G. AGUILERA. Lipopolysaccharide endotoxin potentiates the effect of osmotic stimulation on vasopressin synthesis and secretion in the rat hypothalamus. **J Neuroendocrinol**, v.15, n.2, Feb, p.141-9. 2003.

HALL, A. V., H. ANTONIOU, Y. WANG, A. H. CHEUNG, A. M. ARBUS, S. L. OLSON, W. C. LU, *et al.* Structural organization of the human neuronal nitric oxide synthase gene (NOS1). **J Biol Chem**, v.269, n.52, Dec 30, p.33082-90. 1994.

HANDA, O., J. STEPHEN ;G. CEPINSKAS. Role of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide in activation and dysfunction of cerebrovascular endothelial cells during early onsets of sepsis. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.295, n.4, Oct, p.H1712-9. 2008.

HANDY, R. L. ;P. K. MOORE. Effects of selective inhibitors of neuronal nitric oxide synthase on carrageenan-induced mechanical and thermal hyperalgesia. **Neuropharmacology**, v.37, n.1, p.37-43. 1998.

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

HIBBS, J. B., JR., R. R. TAINTOR ;Z. VAVRIN. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. **Science**, v.235, n.4787, Jan 23, p.473-6. 1987.

HOFER, S., T. BRENNER, C. BOPP, J. STEPPAN, C. LICHTENSTERN, J. WEITZ, T. BRUCKNER, *et al.* Cell death serum biomarkers are early predictors for survival in severe septic patients with hepatic dysfunction. **Crit Care**, v.13, n.3, Jun 18, p.R93. 2009.

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

HUTTUNEN, R., M. HURME, J. LAINE, C. EKLUND, R. VUENTO, J. AITTONIEMI, H. HUHTALA, *et al.* Endothelial nitric oxide synthase G894T (GLU298ASP) polymorphism is associated with hypotension in patients with E. coli bacteremia but not in bacteremia caused by a gram-positive organism. **Shock**, v.31, n.5, May, p.448-53. 2009.

KALISCH, B. E., B. P. CONNOP, K. JHAMANDAS, R. J. BENINGER ;R. J. BOEGMAN. Differential action of 7-nitro indazole on rat brain nitric oxide synthase. **Neurosci Lett**, v.219, n.2, Nov 22, p.75-8. 1996.

KANWAR, J. R., R. K. KANWAR, H. BURROW ;S. BARATCHI. Recent Advances on the Roles of NO in Cancer and Chronic Inflammatory Disorders. **Curr Med Chem**, v.16, n.19, p.2373-2394. 2009.

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

KELLOGG, D. L., JR., J. L. ZHAO ;Y. WU. Neuronal nitric oxide synthase control mechanisms in the cutaneous vasculature of humans in vivo. **J Physiol**, v.586, n.3, Feb 1, p.847-57. 2008.

KISHIMOTO, J., N. SPURR, M. LIAO, L. LIZHI, P. EMSON ;W. XU. Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. **Genomics**, v.14, n.3, Nov, p.802-4. 1992.

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

KOO, D. J., M. ZHOU, D. JACKMAN, W. G. CIOFFI, K. I. BLAND, I. H. CHAUDRY ;P. WANG. Is gut the major source of proinflammatory cytokine release during polymicrobial sepsis? **Biochim Biophys Acta**, v.1454, n.3, Aug 30, p.289-95. 1999.

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

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

LANG, J. D. ;G. MATUTE-BELLO. Lymphocytes, apoptosis and sepsis: making the jump from mice to humans. **Crit Care**, v.13, n.1, p.109. 2009.

LI, H., M. L. FLINSPACH, J. IGARASHI, J. JAMAL, W. YANG, J. A. GOMEZ-VIDAL, E. A. LITZINGER, *et al.* Exploring the binding conformations of bulkier dipeptide amide inhibitors in constitutive nitric oxide synthases. **Biochemistry**, v.44, n.46, Nov 22, p.15222-9. 2005.

LIAW, W. J., T. H. CHEN, Z. Z. LAI, S. J. CHEN, A. CHEN, C. TZAO, J. Y. WU, *et al.* Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on intraperitoneal sepsis-induced organ injury in rats. **Shock**, v.23, n.1, Jan, p.88-96. 2005.

LISKINA, E. B., V. V. GRINEVICH, O. V. VOLKOVA ;I. G. AKMAEV. Effect of bacterial endotoxin on secretion and synthesis of vasopressin during saline load in rats. **Bull Exp Biol Med**, v.136, n.2, Aug, p.129-31. 2003.

MADHUSOODANAN, K. S. ;F. MURAD. NO-cGMP signaling and regenerative medicine involving stem cells. **Neurochem Res**, v.32, n.4-5, Apr-May, p.681-94. 2007.

MARIK, P. E. ;M. RAGHAVAN. Stress-hyperglycemia, insulin and immunomodulation in sepsis. **Intensive Care Med**, v.30, n.5, May, p.748-56. 2004.

MARR, K. A. Invasive Candida infections: the changing epidemiology. **Oncology (Williston Park)**, v.18, n.14 Suppl 13, Dec, p.9-14. 2004.

MARSHALL, J. C., E. DEITCH, L. L. MOLDAWER, S. OPAL, H. REDL ;T. VAN DER POLL. Preclinical models of shock and sepsis: what can they tell us? **Shock**, v.24 Suppl 1, Dec, p.1-6. 2005.

MCCANN, S. M., M. KIMURA, S. KARANTH, W. H. YU ;V. RETTORI. Role of nitric oxide in the neuroendocrine responses to cytokines. **Ann N Y Acad Sci**, v.840, May 1, p.174-84. 1998.

MCLAREN, A. T., C. D. MAZER, H. ZHANG, E. LIU, L. MOK ;G. M. HARE. A potential role for inducible nitric oxide synthase in the cerebral response to acute hemodilution. **Can J Anaesth**, v.56, n.7, Jul, p.502-9. 2009.

MELVILLE, R. J., M. L. FORSLING, H. I. FRIZIS ;L. P. LEQUESNE. Stimulus for vasopressin release during elective intra-abdominal operations. **Br J Surg**, v.72, n.12, Dec, p.979-82. 1985.

MELVILLE, R. J., H. I. FRIZIS, M. L. FORSLING ;L. P. LEQUESNE. The stimulus for vasopressin release during laparoscopy. **Surg Gynecol Obstet**, v.161, n.3, Sep, p.253-6. 1985.

MOERER, O. ;H. BURCHARDI. [The cost of sepsis]. **Anaesthesist**, v.55 Suppl 1, Jun, p.36-42. 2006.

MONCADA, S. ;E. A. HIGGS. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **Br J Pharmacol**, v.147 Suppl 1, Jan, p.S193-201. 2006.

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

NAVA, E., R. M. PALMER ;S. MONCADA. Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial? **Lancet**, v.338, n.8782-8783, Dec 21-28, p.1555-7. 1991.

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

OKAMOTO, I., M. ABE, K. SHIBATA, N. SHIMIZU, N. SAKATA, T. KATSURAGI ;K. TANAKA. Evaluating the role of inducible nitric oxide synthase using a novel and selective inducible nitric oxide synthase inhibitor in septic lung injury produced by cecal ligation and puncture. **Am J Respir Crit Care Med**, v.162, n.2 Pt 1, Aug, p.716-22. 2000.

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

ORLANDO, G. F., G. WOLF ;M. ENGELMANN. Role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of the neuroendocrine stress response in rodents: insights from mutant mice. **Amino Acids**, v.35, n.1, Jun, p.17-27. 2008.

PALMER, R. M. ;S. MONCADA. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.158, n.1, Jan 16, p.348-52. 1989.

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

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

PIETTE, A. ;G. VERSCHRAEGEN. Role of coagulase-negative staphylococci in human disease. **Vet Microbiol**, v.134, n.1-2, Feb 16, p.45-54. 2009.

PINHEIRO DA SILVA, F. ;V. NIZET. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. **Apoptosis**, v.14, n.4, Apr, p.509-21. 2009.

PONTING, C. P., C. PHILLIPS, K. E. DAVIES ;D. J. BLAKE. PDZ domains: targeting signalling molecules to sub-membranous sites. **Bioessays**, v.19, n.6, Jun, p.469-79. 1997.

PYTEL, P. ;J. J. ALEXANDER. Pathogenesis of septic encephalopathy. **Curr Opin Neurol**, v.22, n.3, Jun, p.283-7. 2009.

REMICK, D. G. ;P. A. WARD. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. **Shock**, v.24 Suppl 1, Dec, p.7-11. 2005.

REUSS, S., K. DECKER, L. ROSSELER, E. LAYES, A. SCHOLLMAYER ;R. SPESSERT. Nitric oxide synthase in the hypothalamic suprachiasmatic nucleus of rat: evidence from histochemistry, immunohistochemistry and western blot; and colocalization with VIP. **Brain Res**, v.695, n.2, Oct 16, p.257-62. 1995.

RODRIGO, J., V. RIVEROS-MORENO, M. L. BENTURA, L. O. UTTENTHAL, E. A. HIGGS, A. P. FERNANDEZ, J. M. POLAK, *et al.* 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, Feb 24, p.522-34. 1997.

ROTHER, F., K. LANGNAESE ;G. WOLF. New aspects of the location of neuronal nitric oxide synthase in the skeletal muscle: a light and electron microscopic study. **Nitric Oxide**, v.13, n.1, Aug, p.21-35. 2005.

SABROE, I., S. K. DOWER ;M. K. WHYTE. The role of Toll-like receptors in the regulation of neutrophil migration, activation, and apoptosis. **Clin Infect Dis**, v.41 Suppl 7, Nov 15, p.S421-6. 2005.

SALKOWSKI, C. A., G. DETORE, A. FRANKS, M. C. FALK ;S. N. VOGEL. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. **Infect Immun**, v.66, n.8, Aug, p.3569-78. 1998.

SALVO, I., W. DE CIAN, M. MUSICCO, M. LANGER, R. PIADENA, A. WOLFLER, C. MONTANI, *et al.* The Italian SEPSIS study: preliminary results on the incidence and evolution of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. **Intensive Care Med**, v.21 Suppl 2, Nov, p.S244-9. 1995.

SANDS, K. E., D. W. BATES, P. N. LANKEN, P. S. GRAMAN, P. L. HIBBERD, K. L. KAHN, J. PARSONNET, *et al.* Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. **Jama**, v.278, n.3, Jul 16, p.234-40. 1997.

SCHEPENS, J., E. CUPPEN, B. WIERINGA ;W. HENDRIKS. The neuronal nitric oxide synthase PDZ motif binds to -G(D,E)XV* carboxyterminal sequences. **FEBS Lett**, v.409, n.1, Jun 2, p.53-6. 1997.

SCHUSTER, J. M. ;P. S. NELSON. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. **J Leukoc Biol**, v.67, n.6, Jun, p.767-73. 2000.

SECHER, T., V. VASSEUR, D. M. POISSON, J. A. MITCHELL, F. Q. CUNHA, J. C. ALVES-FILHO ;B. RYFFEL. Crucial role of TNF receptors 1 and 2 in the control of polymicrobial sepsis. **J Immunol**, v.182, n.12, Jun 15, p.7855-64. 2009.

SEMMLER, A., C. FRISCH, T. DEBEIR, M. RAMANATHAN, T. OKULLA, T. KLOCKGETHER ;M. T. HENEKA. Long-term cognitive impairment, neuronal loss and reduced cortical cholinergic innervation after recovery from sepsis in a rodent model. **Exp Neurol**, v.204, n.2, Apr, p.733-40. 2007.

SHALHUB, S., C. E. JUNKER, S. D. IMAHARA, M. N. MINDRINOS, S. DISSANAIKE ;G. E. O'KEEFE. Variation in the TLR4 gene influences the risk of organ failure and shock posttrauma: a cohort study. **J Trauma**, v.66, n.1, Jan, p.115-22; discussion 122-3. 2009.

SHAPIRO, N. I., R. E. WOLFE, S. B. WRIGHT, R. MOORE ;D. W. BATES. Who needs a blood culture? A prospectively derived and validated prediction rule. **J Emerg Med**, v.35, n.3, Oct, p.255-64. 2008.

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

SILVA, E. **Sepsis: Manual**. São Paulo: Atheneu. 2008. 164 p.

SILVA, E., A. PEDRO MDE, A. C. SOGAYAR, T. MOHOVIC, C. L. SILVA, M. JANISZEWSKI, R. G. CAL, *et al*. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, v.8, n.4, Aug, p.R251-60. 2004.

SMITH, C., M. MERCHANT, A. FEKETE, H. L. NYUGEN, P. OH, Y. L. TAIN, J. B. KLEIN, *et al*. Splice variants of neuronal nitric oxide synthase are present in the rat kidney. **Nephrol Dial Transplant**, v.24, n.5, May, p.1422-8. 2009.

SOUTHAN, G. J. ;C. SZABO. Selective pharmacological inhibition of distinct nitric oxide synthase isoforms. **Biochem Pharmacol**, v.51, n.4, Feb 23, p.383-94. 1996.

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

TAKANISHI, D. M., M. YU, F. LURIE, E. BIUK-AGHAI, H. YAMAUCHI, H. C. HO ;A. D. CHAPITAL. Peripheral blood hematocrit in critically ill surgical patients: an imprecise surrogate of true red blood cell volume. **Anesth Analg**, v.106, n.6, Jun, p.1808-12. 2008.

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

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

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

TOWNSEND, S. R., C. SCHORR, M. M. LEVY ;R. P. DELLINGER. Reducing mortality in severe sepsis: the Surviving Sepsis Campaign. **Clin Chest Med**, v.29, n.4, Dec, p.721-33, x. 2008.

TURINA, M., D. E. FRY ;H. C. POLK, JR. Acute hyperglycemia and the innate immune system: clinical, cellular, and molecular aspects. **Crit Care Med**, v.33, n.7, Jul, p.1624-33. 2005.

VALTSCHANOFF, J. G. ;R. J. WEINBERG. Laminar organization of the NMDA receptor complex within the postsynaptic density. **J Neurosci**, v.21, n.4, Feb 15, p.1211-7. 2001.

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

VILLA, P., G. SARTOR, M. ANGELINI, M. SIRONI, M. CONNI, P. GNOCCHI, A. M. ISETTA, *et al.* Pattern of cytokines and pharmacomodulation in sepsis induced by cecal ligation and puncture compared with that induced by endotoxin. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.2, n.5, Sep, p.549-53. 1995.

VINCENT, S. R. ;B. T. HOPE. Neurons that say NO. **Trends Neurosci**, v.15, n.3, Mar, p.108-13. 1992.

VON EIFF, C., R. A. PROCTOR ;G. PETERS. Coagulase-negative staphylococci. Pathogens have major role in nosocomial infections. **Postgrad Med**, v.110, n.4, Oct, p.63-4, 69-70, 73-6. 2001.

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

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

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

WARD, P. A. Sepsis, apoptosis and complement. **Biochem Pharmacol**, v.76, n.11, Dec 1, p.1383-8. 2008.

WESTPHAL, M., H. FREISE, B. E. KEHREL, H. G. BONE, H. VAN AKEN ;A. W. SIELENKAMPER. Arginine vasopressin compromises gut mucosal microcirculation in septic rats. **Crit Care Med**, v.32, n.1, Jan, p.194-200. 2004.

WICHTERMAN, K. A., A. E. BAUE ;I. H. CHAUDRY. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, v.29, n.2, Aug, p.189-201. 1980.

WILSON, M. F., D. J. BRACKETT, L. B. HINSHAW, P. TOMPKINS, L. T. ARCHER ;B. A. BENJAMIN. Vasopressin release during sepsis and septic shock in baboons and dogs. **Surg Gynecol Obstet**, v.153, n.6, Dec, p.869-72. 1981.

WOLFF, D. J. ;B. J. GRIBIN. The inhibition of the constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms by indazole agents. **Arch Biochem Biophys**, v.311, n.2, Jun, p.300-6. 1994.

WOLFF, D. J., A. LUBESKIE ;S. UMANSKY. The inhibition of the constitutive bovine endothelial nitric oxide synthase by imidazole and indazole agents. **Arch Biochem Biophys**, v.314, n.2, Nov 1, p.360-6. 1994.

WOLKOW, P. P. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. **Inflamm Res**, v.47, n.4, Apr, p.152-66. 1998.

XIA, Y. ;T. L. KRUKOFF. 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, Apr 18, p.71-85. 2001.

XU, L., E. P. CARTER, M. OHARA, P. Y. MARTIN, B. ROGACHEV, K. MORRIS, M. CADNAPAPHORNCHAI, *et al.* Neuronal nitric oxide synthase and systemic vasodilation in rats with cirrhosis. **Am J Physiol Renal Physiol**, v.279, n.6, Dec, p.F1110-5. 2000.

XU, L., T. MABUCHI, T. KATANO, S. MATSUMURA, E. OKUDA-ASHITAKA, K. SAKIMURA, M. MISHINA, *et al.* Nitric oxide (NO) serves as a retrograde messenger to activate neuronal NO synthase in the spinal cord via NMDA receptors. **Nitric Oxide**, v.17, n.1, Aug, p.18-24. 2007.

YUAN, Q., D. E. SCOTT, K. F. SO ;W. WU. Developmental changes of nitric oxide synthase expression in the rat hypothalamoneurohypophyseal system. **Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol**, v.288, n.1, Jan, p.36-45. 2006.

ZAIDI, A. K., D. THAVER, S. A. ALI ;T. A. KHAN. Pathogens associated with sepsis in newborns and young infants in developing countries. **Pediatr Infect Dis J**, v.28, n.1 Suppl, Jan, p.S10-8. 2009.

ZHOU, L. ;D. Y. ZHU. Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. **Nitric Oxide**, v.20, n.4, Jun, p.223-30. 2009.