

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Participação dos leucotrienos na secreção de vasopressina durante  
sepsis experimental**

**Letícia Antunes Athayde**

**Ribeirão Preto**  
**2007**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Participação dos leucotrienos na secreção de vasopressina durante  
sepsis experimental**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia aplicada à Farmácia para  
obtenção do Título de Mestre em  
Biotecnologia aplicada à Farmácia**

**Área de concentração: Biotecnologia  
aplicada à Farmácia**

**Orientada: Letícia Antunes Athayde**

**Orientadora: Profa. Dra. Maria José Alves  
da Rocha**

**Ribeirão Preto**

**2007**

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.



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autora:** Letícia Antunes Athayde

**Título:** Participação dos leucotrienos na secreção 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 Biociências aplicadas à Farmácia

Área de concentração: Biociências aplicadas à Farmácia

Orientadora: Profa. Dra. Maria José Alves da Rocha

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## SUMÁRIO

<b>ABREVIATURAS</b> .....	i
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	iii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	iv
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Seps e Choque Séptico .....	2
1.2. Fisiopatologia da Seps .....	4
1.3. Modelos de Seps Experimental .....	5
1.4. Vasopressina .....	7
1.5. Vasopressina na Seps .....	9
1.6. Leucotrienos .....	12
1.7. Leucotrienos na Seps .....	15
1.8. Leucotrienos no Cérebro .....	16
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	18
2.1. Objetivo geral .....	19
2.2. Objetivos específicos .....	19
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	20
3.1. Animais .....	21
3.2. Anestesia .....	21
3.3. Extereotaxia – Colocação de cânulas no ventrículo lateral .....	21
3.4. Cirurgia .....	22
3.4.1. Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) .....	22
3.5. Determinação da curva de sobrevida .....	23
3.6. Determinação do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas e nitrato sérico .....	23
3.6.1. Hematócrito .....	23
3.6.2. Separação do plasma e do soro .....	23
3.6.3. Sódio sérico .....	24

3.6.4. Osmolalidade plasmática .....	24
3.6.5. Proteínas plasmáticas .....	25
3.6.6. Nitrato sérico .....	25
3.7. Dosagem Hormonal .....	26
3.7.1. Radioimunoensaio da vasopressina .....	26
3.8. Dosagem de proteína total da neurohipófise .....	27
3.9. “Western blotting” para quantificação do conteúdo de LTC <sub>4</sub> sintase no hipotálamo .....	28
3.9.1. Preparação dos homogeneizados .....	28
3.9.2. Dosagem de proteína total no hipotálamo .....	29
3.9.3. SDS-PAGE Eletroforese .....	29
3.10. Droga utilizada .....	31
3.11. Análise estatística .....	32
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....</b>	<b>33</b>
4.1. Padronização da dose de MK-886 a ser utilizada na injeção intracerebroventricular e intraperitoneal .....	34
4.2. Participação dos leucotrienos centrais sobre o nitrato sérico .....	34
4.3. Efeito do MK-886 na sobrevivência dos animais após CLP .....	35
4.4. Efeito do MK-886 nas determinações do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas e nitrato sérico .....	35
4.5. Efeito do MK-886 sobre a concentração plasmática e neurohipofisária de vasopressina .....	36
4.6. Efeito do MK-886 sobre o conteúdo de LTC <sub>4</sub> sintase no hipotálamo basal ..	36
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
5.1. Padronização da dose de MK-886 a ser utilizada na injeção intracerebroventricular .....	38
5.2. Participação dos leucotrienos centrais sobre o nitrato sérico .....	40
5.3. Efeito do MK-886 na sobrevivência dos animais após CLP .....	41

5.4. Efeito do MK-886 nas determinações do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas e nitrato sérico .....	43
5.5. Efeito do MK-886 sobre a concentração plasmática e neurohipofisária de vasopressina .....	50
5.6. Efeito do MK-886 sobre o conteúdo de LTC <sub>4</sub> sintase no hipotálamo basal .....	53
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>69</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>ANEXO I – Tabelas de Valores .....</b>	<b>84</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HPETE - 5-hidroperoxieicosatetraenóico	eNOS - Sintase de óxido nítrico endotelial
5-LO - 5-lipoxigenase	EPM - Erro padrão da média
5-LO <sup>-/-</sup> - Depleção do gene da enzima 5-LO	e.v. - endovenosa
15-HPETE - 15-hidroperoxieicosatetraenóico	FLAP - Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase
AA - Ácido araquidônico	HDL - Lipoproteína de alta densidade
ACCP/SCCM - <i>American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine</i>	HPR - <i>Horseradish peroxidase</i>
ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico	i.c.v. - Intracerebroventricular
AP - Área postrema	IFN- $\gamma$ - Interferon-gama
AVP - Arginina vasopressina	IL - Interleucina
BCA - Ácido bicinconínico	iNOS - Sintase de óxido nítrico induzida
BSA - Soro albumina bovina	iNOS <sup>-/-</sup> - Depleção do gene da enzima iNOS
CD - Conjuntos de diferenciação	i.p. - Intraperitoneal
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais	KDa - Kilodalton
Cis-leucotrienos - Cisteinil leucotrienos	LBP - Proteína ligadora de LPS
CLP - <i>Cecal ligation and puncture</i> ou ligadura e perfuração cecal	LH - Hormônio luteinizante
cPLA <sub>2</sub> - Fosfolipase A <sub>2</sub> citosólica	LHRH - Hormônio liberador de LH
DMSO - <i>Dimethyl sulfoxide</i>	LOX - Lipoxigenase
	L-NAME - N <sup>G</sup> -nitro-L-arginina metil éter
	LPS - Lipopolissacarídeo

LTA - Ácido lipoteicóico	PVN - Núcleo paraventricular
LTA <sub>4</sub> - Leucotrieno A <sub>4</sub>	qRT-PCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real
LTB <sub>4</sub> - Leucotrieno B <sub>4</sub>	q.s.p. - Quanto serve para
LTC <sub>4</sub> - Leucotrieno C <sub>4</sub>	RNA <sub>m</sub> - RNA mensageiro
LTD <sub>4</sub> - Leucotrieno D <sub>4</sub>	RP-HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Performance em Fase Reversa
LTE <sub>4</sub> - Leucotrieno E <sub>4</sub>	SDS - Sódio dodecilsulfato
LTs - Leucotrienos	SFO - Órgão subfornical
M - Média	SIRS - Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
mA - Miliâmpere	SON - Núcleo supraóptico
MK-571 - Antagonista do receptor 1 dos cis-leucotrienos	TBE - Tribromoetanol
MK-886 - Inibidor da síntese de leucotrienos	TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral-alfa
mM - Milimolar	UTIs - Unidades de Terapia Intensiva
mRNA - RNA mensageiro	VLM - Bulbo ventrolateral medial
MODS - Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas	
n - Número de animais	
NO - Óxido nítrico	
NTS - Núcleo do trato solitário	
OF - Operação fictícia	
OVL <sub>T</sub> - Órgão vascular da lâmina terminal	
PAF - Fator ativador de plaquetas	
PBS - Fosfato monobásico	
PGs - Prostaglandinas	

**LISTA DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 µg/kg sobre a concentração plasmática de vasopressina .....	39
<b>Figura 2.</b> Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 µg/kg sobre a concentração neurohipofisária de vasopressina .....	39
<b>Figura 3.</b> Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 µg/kg sobre o nitrato sérico .....	40
<b>Figura 4.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a sobrevivência dos animais após CLP .....	42
<b>Figura 5.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o hematócrito .....	45
<b>Figura 6.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o sódio sérico .....	46
<b>Figura 7.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a osmolalidade plasmática .....	47
<b>Figura 8.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre as proteínas plasmáticas .....	48
<b>Figura 9.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o nitrato sérico .....	49
<b>Figura 10.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina .....	51
<b>Figura 11.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a concentração neurohipofisária de vasopressina .....	52
<b>Figura 12.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o conteúdo de LTC <sub>4</sub> sintase .....	54

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela 1.</b> Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 µg/kg sobre a concentração plasmática de vasopressina .....	83
<b>Tabela 2.</b> Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 µg/kg sobre a concentração neurohipofisária de vasopressina .....	83
<b>Tabela 3.</b> Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 µg/kg sobre o nitrato sérico .....	84
<b>Tabela 4.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o hematócrito .....	85
<b>Tabela 5.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o sódio sérico .....	86
<b>Tabela 6.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a osmolalidade plasmática .....	87
<b>Tabela 7.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre as proteínas plasmáticas .....	88
<b>Tabela 8.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o nitrato sérico .....	89
<b>Tabela 9.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina .....	90
<b>Tabela 10.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a concentração neurohipofisária de vasopressina .....	91
<b>Tabela 11.</b> Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o conteúdo de LTC <sub>4</sub> sintase .....	92

*Resumo*

ATHAYDE, L. A. **Participação dos leucotrienos na secreção de vasopressina durante sepse experimental.** 2007. 92f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

Durante a sepse ocorre aumento da produção de mediadores inflamatórios, dentro os quais leucotrienos (LTs), além de hipotensão seguida de aumento da secreção de vasopressina (AVP) na fase inicial e diminuição na fase tardia, a despeito da progressão da hipotensão. Estudos recentes revelam que neurônios vasopressinérgicos contêm alto conteúdo da enzima LTC<sub>4</sub> sintase, e também há relatos de que estruturas neurais que se conectam a esses neurônios possuem receptores para LTs, sugerindo que os mesmos podem ter uma tarefa na secreção de AVP. Este estudo avaliou a participação dos LTs centrais e periféricos sobre a secreção temporal de AVP durante a sepse experimental. Ratos Wistar receberam injeção i.c.v. de MK-886 (1.0µg/kg) e i.p. (1.0mg/kg), um inibidor da síntese de leucotrienos, ou DMSO 5% (veículo) e foram submetidos ao estímulo séptico por ligadura e perfuração cecal (CLP) ou à operação fictícia. Em um grupo de animais, a sobrevivência foi avaliada durante 5 dias. Em outro grupo, os animais foram decapitados 0, 4, 6, 18 e 24h após a cirurgia e o sangue processado para determinação do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas, nitrato sérico e AVP plasmática. A neurohipófise foi coletada para a determinação do conteúdo de AVP, e o hipotálamo dissecado para a quantificação (Western blot) da LTC<sub>4</sub> sintase nos tempos 0, 4 e 6h. A CLP aumentou a concentração de AVP plasmática na fase inicial da sepse, que foi bloqueada pela administração central e reduzida pela periférica de MK-886. A diminuição do conteúdo neurohipofisário de AVP foi revertido parcialmente pelas duas vias de administração. Os aumentos temporais de NO sérico, de hematócrito e de LTC<sub>4</sub> sintase hipotalâmica foram reduzidos, não alterados e bloqueados, respectivamente, pela administração central de MK-886. Por outro lado, a administração periférica não alterou o NO sérico e LTC<sub>4</sub> sintase, mas aboliu o aumento do hematócrito. A CLP também reduziu temporalmente as proteínas plasmáticas e a administração central de MK-886 não alterou, enquanto a periférica reverteu esta redução. A alta mortalidade observada após CLP foi reduzida pela administração central e não modificada pela periférica. Na fase tardia da sepse, a AVP plasmática se manteve em concentrações basais e o bloqueador de LTs administrado pelas duas vias não alterou essas concentrações. Os resultados sugerem que os LTs centrais e periféricos estão envolvidos na regulação da secreção de AVP durante sepse experimental.

Palavras-chave: Sepse polimicrobiana, vasopressina, leucotrienos, CLP, NO.

*Abstract*

ATHAYDE, L. A. **Participation of leukotrienes in vasopressin secretion during experimental sepsis.** 2007. 92f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

During sepsis occurs an increase in the production of inflammatory mediators, including leukotrienes (LTs), which is accompanied by hypotension and a consequent increase in vasopressin (AVP) secretion. This picture characterizes the initial phase of sepsis and contrasts with the late phase, when AVP secretion declines, despite the progressive hypotension. Recent studies revealed that vasopressinergic neurons have a high content of LTC<sub>4</sub> synthase, a critical enzyme in LT synthesis, and that neural structures with input to these neurons contain receptors for LTs, suggesting that they may play a role in regulating AVP secretion. This study evaluated the role of central and peripheral LTs in the time course of AVP secretion during experimentally induced. Male wistar rats received an i.c.v. or i.p. injection of MK-886 (1.0µg/kg or 1.0mg/kg), a LTs biosynthesis inhibitor, or vehicle 1h before cecal ligation and puncture (CLP) or sham operation. In one group of animals, the survival rate was monitored for 5 days. Another group, the animals was decapitated at 0, 4, 6, 18 and 24h after CLP or sham operation, and blood was collected for hematocrit, serum sodium, plasma osmolality, plasma protein, serum nitrate and plasma AVP levels measurement. The neurohypophysis was removed for AVP content measurement, and the hypothalamus dissected for quantification (Western blot) of the LTC<sub>4</sub> synthase at 0, 4 and 6h. The CLP increased plasma AVP levels in the initial phase of sepsis, which was blocked by the central and reduced by the peripheral administration of MK-886. The decrease in the neurohypophyseal AVP content was partially reversed by the both via of administration. The time-course increase of serum NO, hematocrit and hypothalamus LTC<sub>4</sub> synthase was reduced, not modified and blocked respectively by the central administration of MK-886. By other way, the peripheral administration of the LTs blocker did not alter the serum NO and hypothalamus LTC<sub>4</sub> synthase, but abolished the increase of hematocrit. The CLP also reduced temporally the plasma protein and the central administration of MK-886 did not modify whereas the peripheral administration reversed this effect. The high mortality observed after CLP was reduced by central but did not modify by peripheral administration of MK-886. In the final phase of sepsis the plasma AVP remained in the basal levels and the administration of LTs blocker by both via did not alter these hormone levels. The results suggest that the central and peripheral LTs are involved in the AVP secretion regulation during experimental sepsis.

Keywords: Polymicrobial sepsis, vasopressin, leukotrienes, CLP, NO.

## *1. Introdução*

### 1.1. Seps e Choque Séptico

Seps é uma complicação de um processo infeccioso, freqüentemente de origem bacteriana, que é caracterizada pelo desenvolvimento de uma resposta inflamatória sistêmica (HIRAMATSU, HOTCHKISS *et al.*, 1997; RIEDEMANN, GUO *et al.*, 2003).

Em 1991, a *American College of Chest Physicians* e a *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) (American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis, 1992) realizaram uma conferência com o objetivo de oferecer uma definição prática da resposta inflamatória à infecção, para melhorar a capacidade de reconhecer a doença e assim poder intervir com a terapêutica precocemente.

De acordo com a ACCP/SCCM, o termo *Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica* (SIRS) foi proposto para descrever a reação inflamatória sistêmica desencadeada pelo organismo frente a qualquer agressão infecciosa (causada por bactérias, fungos ou vírus) ou não-infecciosa (como trauma, isquemia, queimadura e pancreatite). SIRS foi clinicamente definida quando o paciente apresenta duas ou mais das seguintes condições: 1) febre (temperatura maior que 38°C) ou hipotermia (temperatura menor que 36°C); 2) taquicardia (freqüência cardíaca maior que 90 batimentos/min); 3) taquipnéia (freqüência respiratória maior que 20 respirações/min ou PaCO<sub>2</sub> menor que 32 mmHg) e 4) contagem dos leucócitos totais no sangue maior que 12.000/mm<sup>3</sup> ou mais de 10% de formas imaturas (BONE, SIBBALD *et al.*, 1992).

*Sepse* foi definida como uma resposta inflamatória sistêmica (SIRS) frente a um estímulo infeccioso e *Sepse grave* quando associada à disfunção orgânica, hipotensão ou hipoperfusão. *Choque séptico* foi caracterizado por *sepsis* com hipotensão arterial persistente refratária ao tratamento com drogas vasopressoras associado com a redução da perfusão tecidual, acidose láctica, oligúria e alteração do estado mental mesmo depois de adequada reposição volêmica. Além disso, foi criado o termo *Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas* (MODS), que se refere à presença de função orgânica alterada em pacientes gravemente doentes na qual a homeostase não pode ser mantida sem intervenção (BONE, SIBBALD *et al.*, 1992).

O choque séptico representa a causa mais comum de mortalidade em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) em todo o mundo (ANGUS e WAX, 2001; DELLINGER, 2003). Apesar dos avanços no tratamento, a mortalidade no choque séptico é alta e vem crescendo nas últimas décadas possivelmente devido ao envelhecimento da população, aumento no emprego de técnicas invasivas e possíveis alterações nos agentes microbianos tornando-os multiresistentes (BONE, 1991; ANGUS e WAX, 2001; HANNA, 2003).

Um recente estudo epidemiológico multicêntrico brasileiro revelou que a incidência de *sepsis* no Brasil é de 57 para cada 1000 pacientes-dia admitidos nas UTIs, sendo comparável aos índices mundiais. Além disso, o índice de mortalidade é cerca de 34,7%, podendo chegar a 52,2% no caso de pacientes que evoluem para choque séptico, uma das principais complicações observadas nessa patologia (GARRIDO, 2004). Embora não existam dados a respeito dos gastos com esses pacientes no Brasil, sabe-se que nos Estados Unidos os custos para o tratamento são calculados em torno de 15 bilhões de dólares para os mais de 750.000

pacientes que desenvolvem sepse anualmente (ANGUS e WAX, 2001; RIEDEMANN, GUO *et al.*, 2003).

## 1.2. Fisiopatologia da Sepse

A sepse é caracterizada pela produção excessiva de mediadores inflamatórios e pela intensa ativação de células inflamatórias resultando em um quadro de desequilíbrio, onde o próprio organismo não é capaz de controlar esta situação para retornar às condições fisiológicas normais (BONE, 1991; BRUN-BUISSON, DOYON *et al.*, 1996; BONE, GRODZIN *et al.*, 1997; SANDS, BATES *et al.*, 1997; LANDRY e OLIVER, 2001; DELLINGER, 2003; KUMAR, WOOD *et al.*, 2003).

A resposta inflamatória é, geralmente, causada pela ação de componentes da parede de bactérias, como o lipopolissacarídeo (LPS) das gram-negativas, ou o ácido lipoteicóico (LTA) das gram-positivas, embora também possa ser causada por fungos, vírus e parasitas (GLAUSER, ZANETTI *et al.*, 1991; SANDS, BATES *et al.*, 1997; KUMAR, WOOD *et al.*, 2003). Em 85% dos casos de choque séptico há infecção por bactérias gram-negativas e gram-positivas (HANNA, 2003).

A resposta desencadeada pelas bactérias gram-negativas é iniciada quando estas são rompidas ocorrendo assim a liberação do LPS (endotoxina que compõe a parede celular dessas bactérias) (GLAUSER, ZANETTI *et al.*, 1991). O LPS liga-se primeiramente à lipoproteína de alta densidade (HDL), e posteriormente, a proteína ligadora do LPS (LBP), sintetizada e liberada pelo fígado, forma um complexo LPS-LBP e transfere o LPS do HDL para o CD14 e outros receptores

como o *Toll-like*, presentes principalmente na superfície de macrófagos/monócitos e neutrófilos (KARIMA, MATSUMOTO *et al.*, 1999).

Durante esse processo, vários mediadores são liberados amplificando a resposta inflamatória como fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL)-1, IL-6, IL-8, IL-12, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator ativador de plaquetas (PAF), prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs) e óxido nítrico (NO) (BONE, 1991; MORASSUTTI, STAINES *et al.*, 1994; KARIMA, MATSUMOTO *et al.*, 1999; BENJAMIM, FERREIRA *et al.*, 2000; RIOS-SANTOS, BENJAMIM *et al.*, 2003; BENJAMIM, CANETTI *et al.*, 2005). Esses mediadores favorecem o comprometimento endotelial, provocam vasodilatação periférica, hipovolemia, danos teciduais, ativação do sistema complemento e a evolução do quadro séptico que pode levar à morte (BONE, 1991; HANNA, 2003).

Os mediadores inflamatórios excessivamente liberados durante a sepse podem direta ou indiretamente chegar ao sistema nervoso central ativando neurônios envolvidos em diferentes funções orgânicas, como autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais (MCCANN, KIMURA *et al.*, 2000; ENGBLOM, EK *et al.*, 2002; KOVACS, 2002).

### **1.3. Modelos de Sepse Experimental**

Vários modelos experimentais, como infusão intravascular de endotoxinas ou bactéria viva, peritonite bacteriana, ligadura e perfuração cecal (CLP), infecção tecidual leve e modelos de pneumonia e meningite, têm sido desenvolvidos para estudar os aspectos fisiopatológicos da sepse (GARRIDO, 2004). Os modelos mais usados são o de injeção intraperitoneal (i.p.) ou endovenosa (e.v.) de LPS (AIURA,

UEDA *et al.*, 1995; VILLA, SARTOR *et al.*, 1995; MATSUNAGA, MIYATA *et al.*, 2000; XIA e KRUKOFF, 2001; GRINEVICH, MA *et al.*, 2003; LISKINA, GRINEVICH *et al.*, 2003) e o de lesão intestinal com liberação consecutiva da flora microbiana endógena realizado por ligadura parcial do ceco para diminuição do lúmen e perfurações nas bordas mesentéricas sendo denominado CLP (*Cecal ligation and puncture*) (WICHTERMAN, BAUE *et al.*, 1980; BAKER, CHAUDRY *et al.*, 1983; WALLEY, LUKACS *et al.*, 1996; SALKOWSKI, DETORE *et al.*, 1998; KOO, ZHOU *et al.*, 1999; BENJAMIM, FERREIRA *et al.*, 2000).

A endotoxemia por injeção de LPS tem contribuído muito para a elucidação das vias de ativação envolvidas na patogênese da sepse, mas não representa completamente o episódio típico de sepse clínica em humanos.

O modelo CLP resulta numa peritonite bacteriana que expõe o hospedeiro a todo tipo de bactérias da flora intestinal, incluindo bactérias gram-negativas. Este modelo promove, portanto, uma resposta mais complexa que a do modelo de endotoxemia por injeção de LPS, pois no CLP, os componentes da parede bacteriana que iniciam a resposta imune são provenientes tanto de bactérias gram-positivas quanto de gram-negativas. Além disso, o estímulo por CLP é constante por existir um foco infeccioso que está constantemente liberando agentes microbianos (BAKER, CHAUDRY *et al.*, 1983; SALKOWSKI, DETORE *et al.*, 1998; KOO, ZHOU *et al.*, 1999; BENJAMIM, FERREIRA *et al.*, 2000; ECHTENACHER, FREUDENBERG *et al.*, 2001).

#### 1.4. Vasopressina

A vasopressina (AVP) é um peptídeo de nove aminoácidos com uma ponte dissulfeto entre duas cisteínas. Ela é sintetizada como um grande pré-pro-hormônio formado pela AVP propriamente dita mais as proteínas carreadoras axonais (neurofisinas) nos neurônios magnocelulares localizados nos núcleos supraóptico (SON) e paraventricular (PVN) do hipotálamo. Este pré-pro-hormônio é clivado por proteólise e a AVP torna-se o peptídeo funcionalmente ativo. Ela migra para os terminais axonais dos neurônios magnocelulares localizados na neurohipófise, onde é armazenada em grânulos para ser secretada para a circulação após estímulos adequados (BAERTSCHI, VALLET *et al.*, 1980; SKLAR e SCHRIER, 1983; CUNNINGHAM e SAWCHENKO, 1991; LENG, BROWN *et al.*, 1999).

Apenas 10 a 20% do conteúdo hormonal dentro da neurohipófise podem ser liberados de uma vez só, e à medida que o conteúdo é descarregado na circulação, a AVP continua a ser secretada em resposta a estímulos apropriados, porém em uma velocidade reduzida. Todo o processo de síntese, transporte e estoque na neurohipófise leva de 1 a 2 horas (SKLAR e SCHRIER, 1983; CUNNINGHAM e SAWCHENKO, 1991; HOLMES, PATEL *et al.*, 2001).

Uma vez lançada na circulação, a AVP é transportada na forma livre sendo rapidamente degradada pelas endopeptidases o que resulta em vida média curta. Desta forma, a concentração plasmática constitui um bom indicador da capacidade de secreção hormonal pelo sistema hipotálamo neurohipofisário.

A ação fisiológica da AVP é mediada por três tipos de receptores:  $V_{1a}$ ,  $V_{1b}$  e  $V_2$  (BARBERIS, MOUILLAC *et al.*, 1998; BIRNBAUMER, 2000). Os receptores  $V_{1a}$  localizam-se principalmente no músculo liso vascular e participam da vasoconstrição

(FOX, FRIEDMAN *et al.*, 1987; THIBONNIER, CONARTY *et al.*, 1999). Os receptores  $V_{1b}$  participam do aumento da secreção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e são expressos na maioria das células corticotróficas da adenohipófise. Os receptores  $V_2$  localizam-se principalmente nos ductos coletores renais e em células endoteliais e participam da antidiurese pela interação com a AVP (JARD, 1983).

A regulação da liberação de AVP é um processo complexo que envolve estímulos osmóticos e não-osmóticos. Como estímulo osmótico importante tem-se o aumento da osmolalidade plasmática e como estímulo não-osmótico tem-se a hipovolemia severa e hipotensão (DUNN, BRENNAN *et al.*, 1973). Outros estímulos também podem aumentar a secreção de AVP, como dor, náusea, hipoglicemia, hipóxia, febre, acidose e ação de hormônios e mediadores (angiotensina II, PGs, IL-1, histamina, nicotina, acetilcolina, dopamina e outras catecolaminas) (ROWE, SHELTON *et al.*, 1979; BAYLIS e ROBERTSON, 1980; KASTING, VEALE *et al.*, 1981; SKLAR e SCHRIER, 1983; KASTING, MAZUREK *et al.*, 1985; CUNNINGHAM e SAWCHENKO, 1991; KADEKARO, SUMMY-LONG *et al.*, 1992; HOLMES, PATEL *et al.*, 2001).

Alguns desses estímulos atuam via osmo- ou barorreceptores. Quando há aumento na osmolalidade plasmática, a secreção de AVP é aumentada pela ativação dos osmorreceptores hipotalâmicos. Os principais osmorreceptores conhecidos estão localizados em regiões hipotalâmicas desprovidas de barreira hemato-encefálica dos órgãos circunventriculares, principalmente o Órgão Subfornical (SFO) e o Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT). Quando há queda na pressão arterial, os barorreceptores localizados no seio carotídeo e arco aórtico iniciam um arco reflexo através dos nervos vago e glossofaríngeo até o Sistema Nervoso Central, principalmente pelo Núcleo do Trato Solitário (NTS) que

possui conexões com o PVN e SON, resultando no aumento da secreção de AVP. Quando há diminuição do volume plasmático, essa informação é detectada pelos barorreceptores atriais que, por mecanismos reflexos, estimulam a liberação de AVP que vai restaurar o volume plasmático a níveis normais (DUNN, BRENNAN *et al.*, 1973; CUNNINGHAM e SAWCHENKO, 1988; MCKINLEY, MATHAI *et al.*, 2004).

### **1.5. Vasopressina na Sepsé**

Nas fases iniciais da sepsé, há um aumento acentuado nas concentrações plasmáticas de AVP. Com a progressão do quadro, por razões ainda não esclarecidas, esses níveis reduzem a concentrações próximas às basais mesmo permanecendo os sinais clínicos e laboratoriais de sepsé (MONTANI, LIARD *et al.*, 1980; BRACKETT, SCHAEFER *et al.*, 1985; LANDRY, LEVIN *et al.*, 1997; SHARSHAR, BLANCHARD *et al.*, 2003).

Em ratos, as concentrações plasmáticas de AVP aumentam nas 2 primeiras horas após a administração de LPS seguido de diminuição nas próximas 6 horas até sua queda em 24 horas (GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002; GIUSTI-PAIVA, BRANCO *et al.*, 2003). O mesmo padrão de aumento inicial das concentrações plasmáticas de AVP seguido de queda pôde ser observado em cães e macacos (WILSON, BRACKETT *et al.*, 1981) e em carneiros (DADOUN, GUILLAUME *et al.*, 1998). Em humanos, Landry e colaboradores (1997) demonstraram que as concentrações plasmáticas de AVP em pacientes com choque séptico são bem menores que a de pacientes com choque cardiogênico com o mesmo grau de hipotensão sugerindo que a concentração de AVP estaria inadequadamente baixa nessa situação. O mesmo padrão foi observado por

Sharshar e cols. (2003) onde os pacientes sépticos apresentaram inicialmente um aumento na secreção de AVP com queda nas 36 horas após o início do choque. Westphal e colaboradores (WESTPHAL, FREISE *et al.*, 2004) também descreveram secreção inapropriadamente reduzida de AVP 24 horas após CLP, quando a pressão arterial média era significativamente diminuída em relação ao nível basal do mesmo animal.

As razões para a relativa deficiência da secreção de AVP no choque séptico ainda não foram totalmente esclarecidas. No entanto, essa deficiência contribui para a hipotensão refratária nos estágios tardios do choque séptico. Alguns mecanismos para essa deficiência têm sido sugeridos tais como: a excessiva produção de NO durante o choque séptico que inibiria a síntese e/ou liberação de AVP (GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002; GIUSTI-PAIVA, RUGINSK *et al.*, 2003), a depleção dos estoques de AVP na neurohipófise devido ao excessivo disparo dos barorreceptores na situação de queda da pressão arterial durante o choque (SKLAR e SCHRIER, 1983; SHARSHAR, BLANCHARD *et al.*, 2003) e a insuficiência autonômica indicada pela diminuição da frequência cardíaca e ausência de bradicardia reflexa durante a infusão de AVP em pacientes em choque séptico (LANDRY, LEVIN *et al.*, 1997).

Tem sido sugerido que o NO parece ter um efeito modulador na secreção de AVP (OTA, CROFTON *et al.*, 1993; YASIN, COSTA *et al.*, 1993; GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002; GIUSTI-PAIVA, BRANCO *et al.*, 2003). Ota e colaboradores (1993) observaram que a administração i.c.v. de um doador de NO, promoveu um aumento das concentrações plasmáticas de AVP, mostrando o papel estimulatório do NO na secreção de AVP. Entretanto, em condições patológicas, como na sepse, a produção exagerada de NO parece exercer um

efeito inibitório na secreção de AVP (GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002; GIUSTI-PAIVA, BRANCO *et al.*, 2003).

Os níveis plasmáticos de AVP se elevam com a administração i.c.v. de L-NAME (inibidor não seletivo da NO sintase) ou aminoguanidina (inibidor seletivo da NO sintase induzida), indicando que o NO em altas concentrações pode agir centralmente, inibindo a secreção deste hormônio (KADEKARO e SUMMY-LONG, 2000; GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002). Entretanto, a administração periférica de inibidores da NO sintase não é capaz de promover um aumento das concentrações plasmáticas de AVP nas fases tardias do choque séptico induzido por LPS ou CLP. É interessante que enquanto nas fases iniciais do choque séptico induzido por LPS o pré-tratamento periférico com aminoguanidina aumenta a secreção de AVP, no modelo de CLP ocorre diminuição (GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002; CORREA, PANCOTO *et al.*, 2007).

Outra hipótese para a relativa deficiência da secreção de AVP no choque séptico seria, conforme já relatado, a depleção dos estoques de AVP na neurohipófise. Sharshar e cols. (SHARSHAR, CARLIER *et al.*, 2002) analisaram o conteúdo neurohipofisário de AVP por ressonância magnética nuclear em pacientes normais e sépticos e encontraram depleção no conteúdo desse hormônio em 24 horas após o início do choque séptico. Entretanto, em outro estudo as concentrações neurohipofisárias de AVP foram analisadas em animais com choque induzido por LPS e não foram detectadas alterações das concentrações do hormônio (GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002). Assim, são necessários mais estudos experimentais para a comprovação ou não destas alterações de concentrações neurohipofisárias de AVP.

Em estudos do nosso laboratório usando o modelo de CLP, apesar do perfil de secreção hormonal ter sido diferente do modelo com LPS, também verificamos aumento na liberação de AVP na fase inicial e deficiência 24h após a injúria. 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 sugerindo que esses animais não são capazes de repor os estoques hipofisários a tempo de suprir as necessidades do organismo durante estímulo séptico contínuo (ROCHA, CHEN *et al.*, 2005).

### **1.6. Leucotrienos**

Leucotrienos (LTs) são mediadores lipídicos derivados dos metabólitos do ácido araquidônico (AA) pela via da 5-lipoxigenase (5-LO). Estes são potentes quimioatraentes para neutrófilos e eosinófilos (MARSHALL, HALL *et al.*, 1995) e são liberados após ativação celular por patógenos ou mediadores solúveis.

Estes fatores produzem um distúrbio da membrana celular e levam ao aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação de fosfolipase  $A_2$  citosólica (cPLA<sub>2</sub>) para as membranas nuclear e plasmática. Este processo culmina na liberação do AA dos fosfolipídios de membrana. O AA liberado pode ser metabolizado por diversas vias dando origem as prostaglandinas, tromboxanos, lipoxinas, 15- hidroperoxieicosatetraenóico (15-HPETE) e aos leucotrienos, substâncias chamadas coletivamente de eicosanóides. Para que ocorra a síntese de leucotrienos, o AA liberado é transformado no núcleo em ácido 5- hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE) que, por ser instável, é rapidamente convertido em leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>) pela ação da 5-LO. Essa enzima é deslocada

do citosol para a membrana nuclear e ativada pela Proteína Ativadora da 5-lipoxigenase (FLAP). Ao final da via da 5-LO, o  $LTA_4$  é enzimaticamente hidrolizado e transformado em  $LTB_4$ , pela ação da  $LTA_4$  hidrolase, ou em  $LTC_4$  intracelular pela ação da enzima  $LTC_4$  sintase, que catalisa a conjugação de  $LTA_4$  com glutathiona reduzida.  $LTC_4$  intracelular é transportado através da membrana e convertido, pela ação da gama-glutamil transferase em  $LTD_4$  e  $LTE_4$  (MILLER, GILLARD *et al.*, 1990). O  $LTC_4$  e seus metabólitos,  $LTD_4$  e  $LTE_4$ , são coletivamente chamados de cisteinil leucotrienos (cis-leucotrienos) (MORLION, TORWESTEN *et al.*, 2000; KAMOHARA, TAKASAKI *et al.*, 2001; HUI e FUNK, 2002; BENJAMIM, CANETTI *et al.*, 2005).

Para que ocorram as ações biológicas do  $LTB_4$ , é necessária a sua ligação a receptores de membranas,  $BTL_1$  e  $BTL_2$ , acoplados à proteína G. O  $BTL_1$  é o receptor de alta afinidade ( $K_d = 0.4nM$ ) que parece ser responsável pela atividade quimiotática e quimiocinética, enquanto que o  $BTL_2$  é um receptor de baixa afinidade que parece mediar a liberação de enzimas lisossomais e o aumento do metabolismo oxidativo, apesar de também promover quimiotaxia (GOLDMAN, GIFFORD *et al.*, 1987; CROOKS e STOCKLEY, 1998; YOKOMIZO, IZUMI *et al.*, 2001).

As ações biológicas dos cis-leucotrienos ocorrem através de dois receptores acoplados à proteína G, nomeados de  $CisLT_1$  e  $CisLT_2$  (KAMOHARA, TAKASAKI *et al.*, 2001). O  $CisLT_1$  tem afinidade maior pelo  $LTD_4$  do que pelo  $LTC_4$  e  $LTE_4$ , enquanto o  $CisLT_2$  tem alta afinidade pelo  $LTC_4$  e  $LTD_4$  e baixa afinidade pelo  $LTE_4$  (MARSHALL, HALL *et al.*, 1995; MELLOR, MAEKAWA *et al.*, 2001). O  $CisLT_1$  é encontrado em células musculares lisas das vias aéreas (LYNCH, O'NEILL *et al.*, 1999) e em células endoteliais vasculares que promovem

broncoconstrição e regulação de adesão de células, respectivamente (MELLOR, MAEKAWA *et al.*, 2001). O CisLT<sub>2</sub>, originalmente encontrado em preparações de veias pulmonares por ensaios farmacológicos, é detectado em baço, fibras de Purkinje do coração, e em discretas regiões da adrenal por métodos moleculares (HUI e FUNK, 2002).

LTB<sub>4</sub> é o mais potente quimoatraente natural de neutrófilos, eosinófilos e monócitos (GOETZL e PICKETT, 1980; PETTIPHER, SALTER *et al.*, 1993; GOULET, BYRUM *et al.*, 2000). Adicionalmente, tem sido demonstrado que o LTB<sub>4</sub> estimula a adesão de leucócitos no endotélio vascular (DAHLEN, BJORK *et al.*, 1981; HENDERSON, KEAY *et al.*, 1998; GOULET, BYRUM *et al.*, 2000) e a migração dos neutrófilos através da parede endotelial (DAHLEN, BJORK *et al.*, 1981; CANETTI, LEUNG *et al.*, 2003). LTB<sub>4</sub> também inicia a agregação e degranulação dos neutrófilos (HENDERSON, KEAY *et al.*, 1998; GOULET, BYRUM *et al.*, 2000) e aumenta a permeabilidade capilar (ANDERSON, BRUNI *et al.*, 1990; HELLER, KOCH *et al.*, 1998). Embora os cis-leucotrienos não estimulem diretamente a migração de leucócitos para o local da inflamação, eles exercem um papel importante na formação do edema durante a resposta inflamatória. Eles são secretados *in vivo* por eosinófilos, mastócitos e macrófagos (SPRINGER, ROBBINS *et al.*, 1990; HENDERSON, KEAY *et al.*, 1998; GOULET, BYRUM *et al.*, 2000), mas também podem ser sintetizados pelo músculo vascular liso e células endoteliais (FEINMARK, 1988; ANDERSON, BRUNI *et al.*, 1990). Esses mediadores atuam diretamente na microcirculação promovendo vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular (DAHLEN, BJORK *et al.*, 1981; SPRINGER, ROBBINS *et al.*, 1990; HENDERSON, KEAY *et al.*, 1998; GOULET, BYRUM *et al.*, 2000) e

hipotensão sistêmica (SMEDEGARD, HEDQVIST *et al.*, 1982; ANDERSON, BRUNI *et al.*, 1990).

### **1.7. Leucotrienos na Sepses**

Um conjunto de evidências relata que novos mediadores endógenos, como os leucotrienos, também exercem um papel importante na sepses (LEFER, 1989; SPRAGUE, STEPHENSON *et al.*, 1989; MORLION, TORWESTEN *et al.*, 2000) sendo relatados como mediadores de isquemia e choque (LEFER, 1986).

A idéia que o LTC<sub>4</sub> seria um mediador envolvido na sepses e na síndrome de resposta inflamatória sistêmica tem originado estudos em animais e humanos (ANDERSON, BRUNI *et al.*, 1990).

Em um modelo de sepses por LPS, Quinn e Slotman (1999) (TRAN, QUINN *et al.*, 2000) mostraram que concentrações dos LTs estavam aumentadas na sepses e que o bloqueio da síntese dos LTs resultava em diminuição do TNF e da síntese dos eicosanóides. No mesmo modelo de choque, o bloqueio da síntese dos eicosanóides pela inibição da fosfolipase A<sub>2</sub> resultou em diminuição dos níveis de LTC<sub>4</sub> e melhorou a sobrevivência (MORASSUTTI, STAINES *et al.*, 1994). Em outro estudo em coelho, o tratamento com MK-886 (inibidor da FLAP) amenizou o efeito hipotensivo do LPS (CANETTI, LEUNG *et al.*, 2003).

Rios-Santos e colaboradores (RIOS-SANTOS, BENJAMIM *et al.*, 2003) demonstraram que camundongos submetidos à CLP com 2 perfurações apresentaram um aumento na migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal, enquanto que em animais submetidos a 14 perfurações ocorreu falência da migração dos neutrófilos, aumento do NO e sepses letal. A administração de

inibidores da síntese dos LTs como os compostos MK-866 (inibidor da FLAP) e CP-105,696 (antagonista seletivo do receptor do LTB<sub>4</sub>) não alteraram a falência da migração dos neutrófilos. Isso sugere que o LTB<sub>4</sub> não está envolvido nesta falência e nem na indução da liberação do NO (BENJAMIM, FERREIRA *et al.*, 2000; CROSARA-ALBERTO, DARINI *et al.*, 2002).

### **1.8. Leucotrienos no Cérebro**

A produção de metabólitos do AA é amplamente distribuída em vários órgãos, incluindo o sistema nervoso central (WOLFE, 1982; HULTING, LINDGREN *et al.*, 1985). A produção de leucotrienos no cérebro está associada com a expressão da 5-LO em neurônios de várias partes do cérebro, como no hipocampo, cerebelo, tálamo, hipotálamo e tronco cerebral (LAMMERS, SCHWEITZER *et al.*, 1996). A produção de LTB<sub>4</sub> foi vista estar distribuída uniformemente por todo o cérebro do rato, enquanto que altos níveis de LTC<sub>4</sub>, determinados por cromatografia líquida de alta performance em fase reversa (RP-HPLC) e radioimunoensaio, foram encontrados no hipotálamo (HULTING, LINDGREN *et al.*, 1985; MIYAMOTO, LINDGREN *et al.*, 1987).

No cérebro, os leucotrienos parecem ter funções neuroendócrinas. Esse papel foi primeiramente sugerido por Lindgren *et al.* (HULTING, LINDGREN *et al.*, 1985) e Hulting *et al.* (HULTING, LINDGREN *et al.*, 1985) que utilizando cultura de células de adenohipófise de ratos observaram que o LTC<sub>4</sub> estimulava a liberação do hormônio luteinizante (LH), enquanto o LTB<sub>4</sub> não provocava alteração no hormônio. Os autores demonstraram ainda que havia colocalização de LTC<sub>4</sub> e do hormônio liberador de LH (LHRH) nos neurônios na área pré-optica. Shimada e

colaboradores (SHIMADA, SATOH *et al.*, 2005) observaram que a LTC<sub>4</sub> sintase é seletivamente localizada nos neurônios vasopressinérgicos dos núcleos paraventricular e supra-óptico do hipotálamo, e no núcleo supraquiasmático e área retroquiasmática de camundongos. Além disso, não há expressão de LTC<sub>4</sub> sintase nos neurônios ocitocinérgicos do hipotálamo, mostrando assim que essa expressão é seletiva para vasopressina. O trabalho mostrou ainda que os neurônios parvocelulares não expressam LTC<sub>4</sub> sintase ao menos em condições fisiológicas. Isso sugere que a LTC<sub>4</sub> sintase estaria envolvida no sistema neuroendócrino apenas nas funções neurais vasopressinérgicas.

Sumarizando, na sepse e choque séptico há produção excessiva de vários mediadores como citocinas, NO e LTs. Tem sido sugerido que os LTs exercem um papel importante e poderia estar envolvido na regulação da secreção de AVP. Nas fases iniciais da sepse, há um aumento acentuado nas concentrações plasmáticas de AVP nestas situações. Entretanto, na fase tardia, por razões ainda não esclarecidas, esses níveis reduzem a concentrações próximas às basais. No contexto exposto, a proposta deste trabalho é verificar qual o possível papel dos LTs centrais e periféricos na secreção de AVP durante sepse experimental.

## 2. *Objetivos*

## **2.1. Objetivo geral**

Avaliar a participação dos leucotrienos centrais e periféricos sobre a secreção temporal de vasopressina durante sepse experimental.

## **2.2. Objetivos específicos**

2.2.1. Avaliar a participação dos leucotrienos sobre a sobrevivência dos animais após sepse experimental

2.2.2. Avaliar se os leucotrienos alteram o hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas e nitrato sérico.

2.2.3. Avaliar a participação dos leucotrienos na secreção de vasopressina e no conteúdo neurohipofisário de vasopressina durante sepse experimental

### *3. Materiais e Métodos*

### **3.1. Animais**

Foram utilizados 300 ratos Wistar machos pesando entre 200 a 300g provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo do Campus de Ribeirão Preto. Eles foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração *ad libitum* a uma temperatura aproximada de  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  e em ciclo claro-escuro de 12 horas. Os experimentos foram realizados no horário da manhã entre 8:00 - 11:00h. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais experimentais do Campus de Ribeirão Preto-SP (CEUA). Os critérios de “Humane endpoints in shock research” foram utilizados para sacrificar os animais submetidos à CLP em sofrimento intenso antes ou logo depois dos tempos analisados (NEMZEK, XIAO *et al.*, 2004).

### **3.2. Anestesia**

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

### **3.3. Extereotaxia – Colocação de cânulas no ventrículo lateral**

Os ratos foram anestesiados, colocados no aparelho extereotáxico, e a seguir, foi feita uma incisão na pele e tecido subcutâneo de 1 cm de extensão ao longo da sutura sagital dos animais. O tecido subcutâneo e o perióstio foram removidos para a perfuração do osso parietal direito, e uma cânula (28G, 14 mm) foi introduzida visando atingir o ventrículo lateral (coordenadas: anterior -1,0 mm; lateral

-1,6 mm e dorsal 3,2-3,6 mm), utilizando como referência o bregma. A cânula foi fixada ao osso utilizando acrílico dentário, após a fixação de 2 parafusos “de escora” no osso. Os animais foram deixados em recuperação por 5 a 7 dias antes de serem utilizados para os experimentos.

### **3.4. Cirurgia**

#### **3.4.1. Cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP)**

Animais devidamente anestesiados foram submetidos à incisão central de aproximadamente 2 cm no abdômen do animal seguido de exposição do ceco e obstrução (ligadura parcial) no segmento distal da válvula íleo-cecal. Posteriormente, o ceco foi perfurado (10 perfurações) com agulha 16G na borda antimesentérica. Após verificação da saída de fezes do ceco, este foi novamente introduzido na cavidade abdominal. O fechamento da cavidade abdominal foi realizado em dois planos de sutura fácia e músculos abdominais com poliéster 4 (0) em pontos contínuos. Solução salina normal foi aplicada via subcutânea como líquido de reanimação (aproximadamente 5mL). O grupo controle foi submetido à cirurgia fictícia, sem ligadura nem perfuração cecal. O procedimento cirúrgico incluiu, somente, laparotomia mediana, manipulação do ceco e fechamento da cavidade abdominal.

### **3.5. Determinação da curva de sobrevida**

Sessenta animais foram utilizados para determinação da curva de sobrevivência. 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.

### **3.6. Determinação do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas e nitrato sérico**

#### **3.6.1. Hematócrito**

Após a decapitação parte do sangue foi coletada do tronco para a determinação do hematócrito diretamente em tubos de microcapilaridade heparinizados (Fisher), que foram selados na extremidade contrária à entrada de sangue com auxílio de uma lamparina e centrifugados por 3 minutos em centrífuga própria para determinação de hematócrito (Centrimicro Mod. 211, FANEN). A leitura do hematócrito foi feita com auxílio de um cartão próprio de leitura.

#### **3.6.2. Separação do plasma e do soro**

Após a decapitação dos animais, uma parte do sangue foi coletada do tronco, em tubos plásticos, mantidos sob gelo, contendo heparina e centrifugada a 3000 rpm por 15 minutos para a separação do plasma, o qual foi dividido em 2 microtubos plásticos: um contendo 1.0 mL para posterior dosagem hormonal e outro

com aproximadamente 0.5 mL que foram utilizados para determinação da osmolalidade e proteínas plasmáticas.

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

### **3.6.3. Sódio sérico**

O sódio sérico foi determinado em fotômetro de chama (Micronal), devidamente calibrado com solução padrão Micronal contendo 140mEqg/L de sódio e 5mEqg/L de potássio, diluída em água destilada na proporção de 1:100. Cada amostra foi diluída igualmente à solução padrão (30 µL do soro em 2,97 mL de água destilada), homogeneizada e aspirada no fotômetro de chama para a leitura da concentração do sódio sérico.

### **3.6.4. Osmolalidade plasmática**

Cinquenta µL do plasma foram utilizados para a determinação da osmolalidade plasmática pelo método de abaixamento do ponto de congelação da água em micro-osmômetro (Precision System, INC.).

### 3.6.5. Proteínas plasmáticas

Alíquotas do plasma foram utilizadas para dosagem de proteína pelo método colorimétrico de Bradford (BRADFORD, 1976). 10  $\mu$ L do plasma foram diluídos na proporção de 1:200. Dessa diluição, 10  $\mu$ L foram dispostos em placas com 96 poços, posteriormente, 200  $\mu$ L de Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad Laboratories, Inc.) diluído na proporção de 1:5 com água milli-Q também foram adicionados. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão de concentrações conhecidas de albumina (15,625; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000  $\mu$ g/mL). A leitura da curva padrão e das amostras foi realizada em Microplate Manager (Bio-Rad Laboratories, Inc.) a 595 nm e temperatura de 36°C. Os resultados foram expressos em g/dL.

### 3.6.6. Nitrato sérico

Vinte  $\mu$ L de soro foram desproteinizados por incubação com 40  $\mu$ L de etanol 95% a 4°C por 30 minutos. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 10000 rpm.

Para a medida do NO sérico, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio [132]. A concentração de nitrato no soro foi medida utilizando 5  $\mu$ L da amostra que foi injetada num vaso de reação contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em 1N de HCl à 95°C) que converte o nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é dragado, usando gás hélio, para a

câmara de quimioluminescência do Sievers NOAnalyzer (Sievers 280 NOA, Sievers, Boulder, CO, EUA).

A detecção do NO decorre de sua reação com o ozônio, emitindo luz vermelha ( $\text{NO} + \text{O}_3 \rightarrow \text{NO}_2 + \text{O}_2$ ;  $\text{NO}_2 \rightarrow \text{NO}_2 + h\nu$ ). O fóton emitido pela reação é detectado e convertido em sinal elétrico. A corrente gerada é convertida por um conversor analógico-digital e analisada num computador. A área sob a curva gerada pela corrente elétrica corresponde à concentração de nitrato da amostra.

A concentração de nitrato foi calculada por comparação com uma curva padrão usando concentrações conhecidas (0; 7,5; 15; 30; 60; 120; 240  $\mu\text{mol}$ ) de nitrato de sódio.

### **3.7. Dosagem Hormonal**

O plasma armazenado a  $-20^\circ\text{C}$  foi utilizado para realização do radioimunoensaio para AVP. A neurohipófise foi dissecada no momento da decapitação, colocadas em microtubos plásticos contendo 200  $\mu\text{L}$  de HCl 0,1N e estocada a  $-70^\circ\text{C}$  para quantificação de AVP.

#### **3.7.1. Radioimunoensaio da vasopressina**

O radioimunoensaio da vasopressina foi realizado após extração prévia do plasma com acetona e éter de petróleo, utilizando 1 mL de plasma e acrescentando 2 mL de acetona. As amostras foram agitadas e centrifugadas (3000 rpm, 20 min,  $4^\circ\text{C}$ ). A seguir, o sobrenadante foi decantado em um tubo contendo 2 mL de éter de petróleo e agitado. Após a separação das duas fases líquidas (~5 minutos), a fase

superior foi aspirada e o restante liofilizado e estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a análise. No momento do ensaio, as amostras plasmáticas foram ressuspensas com  $250\ \mu\text{L}$  de tampão do ensaio para vasopressina. As neurohipófises foram homogeneizadas em HCl  $0,1\text{N}$  e  $50\ \mu\text{L}$  do homogenato foi utilizado para dosagem de proteínas totais e o restante foi utilizado para quantificação de vasopressina. No momento do ensaio, o homogenato foi diluído a  $1:40000$  com tampão do ensaio para vasopressina. Reagentes e protocolos de incubação comuns foram utilizados para os ensaios peptidérgicos. Os tampões foram  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ( $0,062\text{M}$ ) e  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  ( $0,013\text{M}$ ) com  $0,5\%$  BSA em pH  $7,5$ . O peptídeo marcado com  $^{125}\text{I}$  foi de fonte comercial (Dupont Co., Boston, MA, USA). Um ensaio não-equilibrado foi realizado com volume de incubação de  $500\ \mu\text{L}$  e tempo de incubação foi de 4 dias a  $4^{\circ}\text{C}$ . O hormônio marcado foi separado do não marcado por um anticorpo secundário. O hormônio AVP foi medido com antisoro de diluição final  $1:20.000$ . O antisoro é específico para o peptídeo analisado sem reação cruzada com outros peptídeos conhecidos.

### **3.8. Dosagem de proteína total da neurohipófise**

Alíquotas de  $10\ \mu\text{L}$  dos homogenatos da neurohipófise foram utilizadas para dosagem de proteína pelo método colorimétrico de Bradford (1976). Todas as leituras foram realizadas utilizando-se o fotolorímetro (Microplater reader, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) utilizando comprimento de onda de  $595\ \text{nm}$ . O conteúdo da proteína tissular foi expresso em  $\mu\text{g}$ .

### 3.9. “Western blotting” para quantificação do conteúdo de LTC<sub>4</sub>

#### sintase no hipotálamo

Após a decapitação dos ratos e remoção dos cérebros, o hipotálamo basal foi rapidamente dissecado, congelado em gelo seco e armazenado a -70°C para a quantificação do conteúdo de LTC<sub>4</sub> sintase por “Western blotting”. A preparação engloba a porção anterior e médio-basal do hipotálamo, indo, rostralmente, da porção anterior do quiasma óptico até à porção anterior dos núcleos mamilares, incluindo o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), núcleo supra-óptico (SON), núcleo supra-quiasmático, núcleo paraventricular (PVN), núcleo arqueado, núcleo ventromedial e áreas periventriculares. Duas secções longitudinais foram realizadas, bilateralmente, 1 mm da linha mediana, delimitando a área do bloco de tecido. A profundidade do fragmento foi de aproximadamente 2,0 mm de espessura (altura).

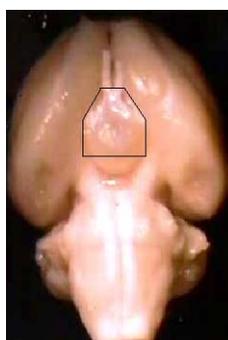


Foto 1. Foto da superfície ventral do cérebro do rato. A linha preta demarca a área do hipotálamo basal retirado para ser utilizado na quantificação do conteúdo de LTC<sub>4</sub> sintase por *Western blotting*.

#### 3.9.1. Preparação dos homogeneizados

O hipotálamo dissecado foi homogeneizado individualmente em 500 µL de Tris-HCl 0,25M (pH 6,8) contendo SDS (sódio dodecilsulfato) 2%. Após 3 horas de

incubação a 25°C, as amostras foram centrifugadas a 4°C, 12000g por 5 minutos e o sobrenadante foi retirado. Posteriormente, o precipitado foi homogeneizado com 100 µL de Tris-HCl 0,25M (pH 6,8) contendo SDS 2% e estocado a -70°C para as dosagens de proteínas totais e LTC<sub>4</sub> sintase.

### **3.9.2. Dosagem de proteína total no hipotálamo**

A quantidade de proteínas de cada amostra foi dosada para que quantidades iguais de proteínas fossem aplicadas no gel de eletroforese. Alíquotas de 1 µL do precipitado do hipotálamo foram utilizadas para dosagem de proteína por meio da técnica colorimétrica do Ácido bicinconínico (BCA). Todas as leituras foram realizadas utilizando-se o fluoroespectrofotômetro (Nanodrop, USA) utilizando comprimento de onda de 592 nm. O conteúdo da proteína tissular foi expresso em µg/µL.

### **3.9.3. SDS-PAGE Eletroforese**

Tanto o gel de separação (de gradiente linear de concentração de 12%), quanto o gel empacotador foram feitos de acordo com descrição prévia (LAEMMLI, BEGUIN *et al.*, 1970).

Em cada amostra aplicada foi adicionado um tampão (q.s.p. 20 µL) constituído por Tris-HCl 0,5M (pH 6,8), SDS 2%, glicerol 10%, β-mercaptoetanol 5% e azul de bromofenol 0,01%. Essas amostras foram colocadas em banho a 100°C

por 3 minutos e imediatamente transferidas para o gelo antes de serem aplicadas no gel. Marcador de peso molecular de 10KDa a 250KDa (Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, Amersham, USA) foi aplicado na lateral do gel.

A eletroforese foi conduzida à temperatura ambiente, sob corrente constante de 20 mA por 1 hora e 40 minutos, sendo posteriormente realizado o procedimento de eletrotransferência.

As proteínas do gel foram transferidas, em temperatura ambiente e em condições úmidas, para uma membrana de nitrocelulose de 0,45  $\mu\text{m}$  (Amersham, USA), pela passagem de uma corrente de 350 mA durante 1 hora e 30 minutos em tampão de transferência contendo glicina 400 mM, Tris 25 mM e etanol em água na proporção de 1:5 (volume:volume).

Após o bloqueio da membrana de nitrocelulose com PBS 0,1M contendo 5% de leite desnatado (Molico, Nestlé) e 0,2% de Tween por 1 hora sob agitação leve, a mesma foi lavada em PBS por 2 vezes consecutivas. Em seguida foi feita a incubação em um recipiente estéril onde o anticorpo primário anti-LTC<sub>4</sub> sintase foi diluído na proporção de 1:1000 em tampão PBS contendo 0,05% de Tween, 1% de soro de cabra normal e 1% de leite desnatado (Molico, Nestlé). Essa membrana permaneceu incubada por 16 horas a 4°C.

A membrana foi em seguida lavada e incubada com o anticorpo secundário HPR (Dako) diluído em PBS com 1% de leite desnatado na proporção de 1:4000. Essa incubação permaneceu por 1 hora à temperatura ambiente sob leve agitação.

A membrana foi novamente lavada em PBS com 0,05% de Tween e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente sob leve agitação no Kit ECL de

revelação por quimioluminescência (Amersham, USA). Em seguida a membrana foi colocada em um cassete e revelada em um filme fotográfico (Amersham, USA).

As bandas relativas à LTC<sub>4</sub> sintase encontradas no *Western blotting* foram quantificadas por meio de unidades arbitrárias. As comparações foram feitas pela relação entre os animais tratados e seus respectivos controles (Programa de análises Image J).

### **3.10. Droga utilizada**

A droga utilizada no experimento foi o composto MK-886 (3 [1-(4-clorobenil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-y1]-2,2-ácidodimetilpropanóico), um inibidor da síntese de leucotrienos. O solvente utilizado foi o DMSO (*dimethyl sulfoxide*) (Amresco, Sólon, Ohio, USA) 5% e as doses utilizadas na injeção intracerebroventricular foram 0.5, 1.0 e 2.0µg/kg em um volume de 2 µL, e a dose utilizada na injeção intraperitoneal foi 1.0 mg/kg em um volume de 1.0 mL. A via de administração da droga foi intracerebroventricular (i.c.v.) e intraperitoneal (i.p.). Esse composto foi doado pela Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatólogicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP.

### 3.11. Análise estatística

Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Dados referentes ao hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas, nitrato sérico e vasopressina plasmática e neurohipofisária foram analisados utilizando ANOVA TWO-WAY seguido pelo pós-teste Student-Newman-Keuls. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ). Para a análise estatística da curva de sobrevida foi utilizado o teste de Kaplan-Meier.

#### 4. *Protocolos Experimentais*

#### **4.1. Padronização da dose de MK-886 a ser utilizada na injeção intracerebroventricular e intraperitoneal**

A padronização da dose de MK-886 a ser utilizada na injeção i.c.v. consiste na avaliação da concentração plasmática e neurohipofisária de AVP. Tendo em vista que o aumento de vasopressina plasmática ocorreu entre 4 e 6 horas após CLP, escolhemos esse período para a padronização da dose de MK-886.

Para a realização deste experimento foram utilizados ratos que tiveram o ventrículo lateral canulado 5-7 dias antes da cirurgia. No dia do experimento, os ratos foram pré-tratados com DMSO 5% ou MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 $\mu$ g/kg, administrados por via intracerebroventricular (i.c.v.), 1 hora antes da cirurgia. Após 4 ou 6 horas da sepse induzida por CLP ou após operação fictícia (OF), eles foram decapitados sem anestesia e o sangue e a neurohipófise coletados para as dosagens de vasopressina. Tendo em vista que as doses de 1.0 e 2.0 $\mu$ g/kg bloquearam a concentração de AVP, escolhemos a dose de 1.0 $\mu$ g/kg.

A dose de 1.0mg/kg da administração intraperitoneal (i.p.) foi baseada na literatura, no qual esta dose é suficiente para inibir a síntese de leucotrienos (PAUL, FRAIFELD *et al.*, 1999; CANETTI, LEUNG *et al.*, 2003).

#### **4.2. Participação dos leucotrienos centrais sobre o nitrato sérico**

Os ratos foram pré-tratados com DMSO 5% ou MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 $\mu$ g/kg, administrados por via intracerebroventricular (i.c.v.), 1 hora antes da

cirurgia. Após 4 ou 6 horas da sepse induzida por CLP ou após operação fictícia (OF), eles foram decapitados sem anestesia e o sangue coletado para a dosagem de nitrato sérico.

#### **4.3. Efeito do MK-886 na sobrevida dos animais após CLP**

Os ratos foram pré-tratados com DMSO 5% ou MK-886 (1.0 $\mu$ g/kg ou 1.0mg/kg), administrados por via i.c.v. ou i.p., 1 hora antes do CLP ou operação fictícia (OF). A sobrevida dos animais após o CLP foi avaliada observando-se o número de animais vivos por um período total de 5 dias.

#### **4.4. Efeito do MK-886 nas determinações do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas e nitrato sérico**

Os animais foram pré-tratados com DMSO 5% ou MK-886 (1.0 $\mu$ g/kg ou 1.0mg/kg), administrados por via i.c.v. ou i.p., 1 hora antes da cirurgia. Após 0, 4, 6, 18 ou 24 horas da sepse induzida por CLP ou após operação fictícia (OF), eles foram decapitados sem anestesia e o sangue coletado para as determinações do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas e nitrato sérico.

#### **4.5. Efeito do MK-886 sobre a concentração plasmática e neurohipofisária de vasopressina**

Os ratos foram pré-tratados com DMSO 5% ou MK-886 (1.0 $\mu$ g/kg ou 1.0mg/kg), administrados por via i.c.v. ou i.p., 1 hora antes da cirurgia. Após 0, 4, 6, 18 ou 24 horas da sepse induzida por CLP ou após operação fictícia (OF), eles foram decapitados sem anestesia e o sangue e a neurohipófise coletados para as dosagens de vasopressina.

#### **4.6. Efeito do MK-886 sobre o conteúdo de LTC<sub>4</sub> sintase no hipotálamo basal**

Os ratos foram pré-tratados com DMSO 5% ou MK-886 (1.0 $\mu$ g/kg ou 1.0mg/kg), administrados por via i.c.v. ou i.p., 1 hora antes da cirurgia. Após 0, 4 ou 6 horas da sepse induzida por CLP ou após operação fictícia (OF), eles foram decapitados sem anestesia, o cérebro foi removido e o hipotálamo basal foi rapidamente dissecado para a determinação da LTC<sub>4</sub> sintase.

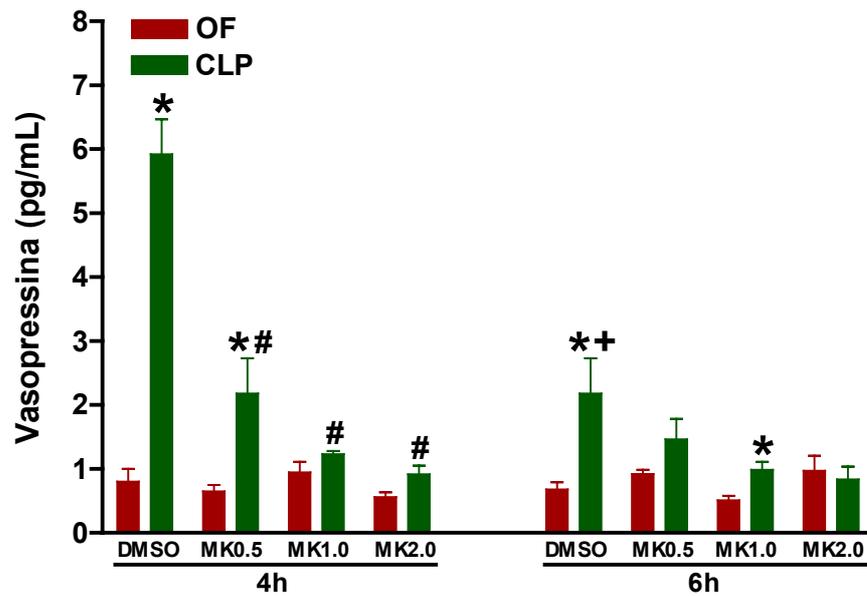
## 5. *Resultados*

### **5.1. Padronização da dose de MK-886 a ser utilizada na injeção intracerebroventricular**

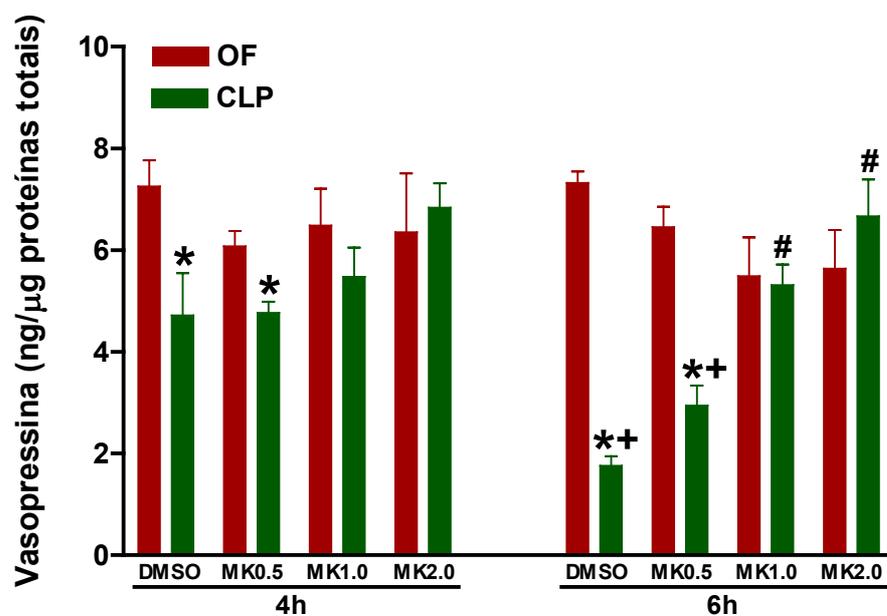
A administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 $\mu$ g/kg nos tempos 4 e 6 horas não provocou alteração nas concentrações plasmática e neurohipofisária de vasopressina após a operação fictícia quando comparamos com o grupo controle (OF+DMSO 5%) (Figuras 1 e 2).

A sepse induzida por CLP provocou um aumento na secreção de vasopressina às 4 horas e às 6 horas. O pré-tratamento com MK-886 na dose 0.5 $\mu$ g/kg reduziu e as doses 1.0 e 2.0 $\mu$ g/kg bloquearam o aumento da concentração de vasopressina no tempo 4 horas não havendo diferença entre as doses. Às 6 horas, embora aparentemente nas doses 1.0 e 2.0 $\mu$ g/kg tenha uma redução da AVP, não houve diferença estatística entres os grupos (Figura 1).

Em relação à vasopressina neurohipofisária, observamos que a sepse provocou uma redução da concentração de vasopressina nos tempos 4 e 6 horas e o pré-tratamento com MK-886 apenas nas doses 1.0 e 2.0 $\mu$ g/kg reverteu esta redução às 6 horas numa relação dose-dependente, mas não às 4 horas (Figura 2).



**Figura 1.** Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 µg/kg sobre a concentração plasmática de vasopressina. Valores expressos como média ± EPM. \*p<0,05 comparado aos grupos OF+DMSO e OF+MK 0.5 no tempo 4h e OF+DMSO e OF+MK 1.0 no tempo 6h; #p<0,05 comparado ao grupo CLP+DMSO no tempo 4h; +p<0,05 comparado ao grupo CLP+DMSO do tempo 4h; @p<0,05 comparado ao grupo CLP+MK 0.5 no tempo 4h. n = 6 em cada grupo.

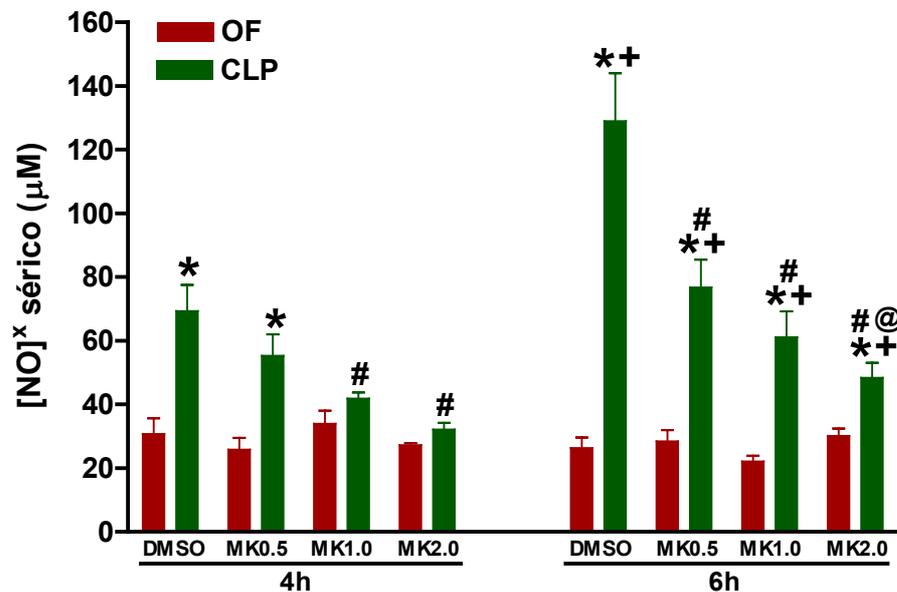


**Figura 2.** Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0 µg/kg sobre a concentração neurohipofisária de vasopressina. Valores expressos como média ± EPM. \*p<0,05 comparado aos grupos OF+DMSO e OF+MK 0.5 nos tempos 4 e 6h;

# $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+DMSO no tempo 6h; † $p < 0,05$  comparado aos grupos CLP+DMSO e CLP+MK 0.5 do tempo 4h.  $n = 6$  em cada grupo.

## 5.2. Participação dos leucotrienos centrais sobre o nitrato sérico

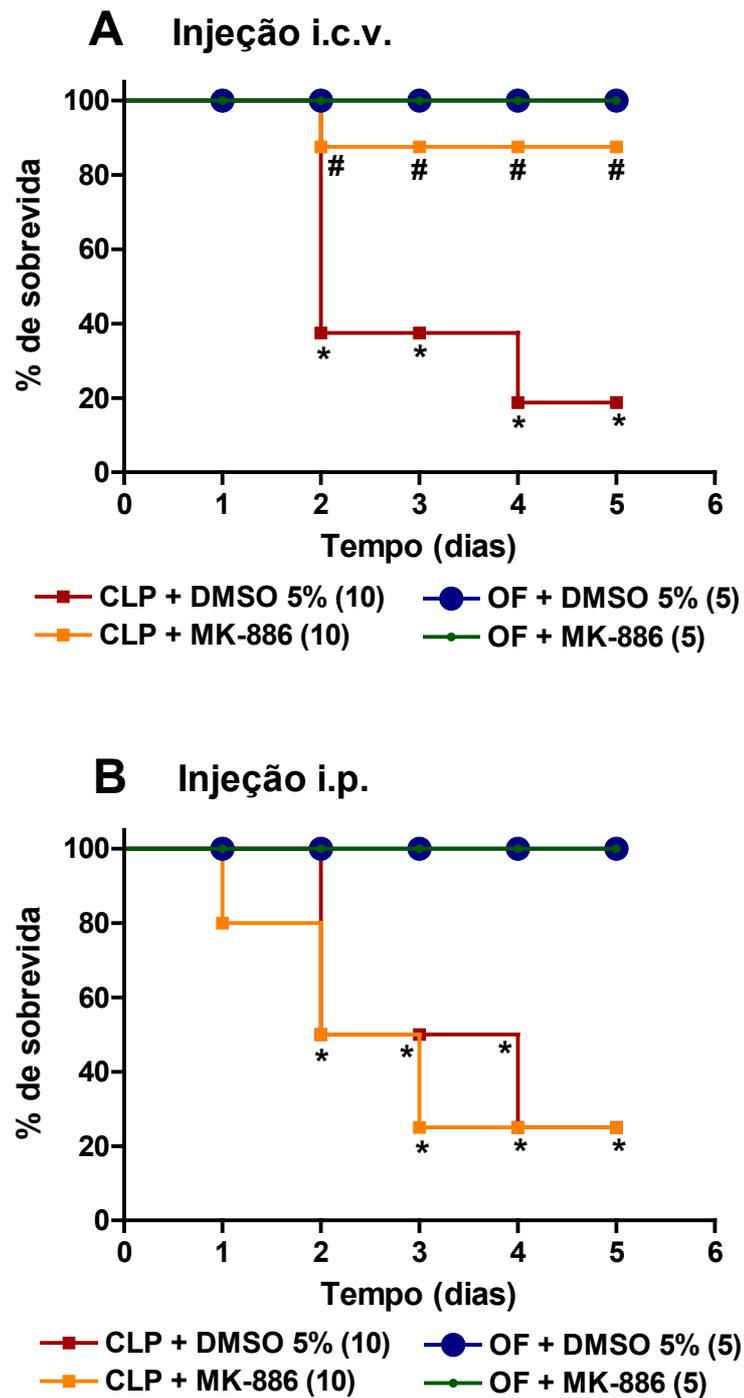
A sepse provocou um aumento do nitrato sérico nos tempos 4 e 6 horas após CLP. Por outro lado, o pré-tratamento com MK-886 nas doses 0.5, 1.0 e 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  reduziram o aumento do nitrato numa relação dose-dependente nos tempos 4 e 6 horas quando comparado ao pré-tratamento com veículo. Houve diferença significativa apenas entre as doses 0.5 e 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de MK-886 sobre a redução do nitrato sérico após CLP no tempo 6 horas (Figura 3).



**Figura 3.** Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sobre o nitrato sérico. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado aos grupos OF+DMSO e OF+MK 0.5 no tempo 4h e OF+DMSO, OF+MK 0.5, OF+MK 1.0 e OF+MK 2.0 no tempo 6h. # $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+DMSO no tempo 4 e 6h; † $p < 0,05$  comparado aos grupos CLP+DMSO, CLP+MK 0.5, CLP+MK 1.0 e CLP+MK 2.0 do tempo 4h; @ $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+MK 0.5 no tempo 6h.  $n = 5-6$  em cada grupo.

### 5.3. Efeito do MK-886 na sobrevida dos animais após CLP

Os animais submetidos à operação fictícia (OF+DMSO 5%) apresentaram sobrevida de 100% após 5 dias de observação e as administrações de MK-886 i.c.v. (1.0µg/kg) e i.p. (1.0mg/kg) não interferiram na sobrevida destes animais (Figura 4A e 4B). O grupo de animais submetidos ao estímulo séptico com administração do veículo i.c.v. (CLP+DMSO 5%) apresentou sobrevida de 50% após 2 dias e 40% após 4 dias do início do experimento (Figura 4A), e o grupo com a administração do veículo i.p. apresentou sobrevida de 20% após o primeiro dia, 40% após 2 dias e 30% após 4 dias (Figura 4B). Os animais que receberam injeção i.c.v. de MK-886 apresentou sobrevida de 90% a partir do segundo dia após CLP (Figura 4A), e não houve alteração da sobrevida do grupo que recebeu injeção i.p. de MK-886 quando comparado ao pré-tratamento com o veículo (CLP+DMSO 5%) (Figura 4B).



**Figura 4.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a sobrevivência dos animais após CLP. \* $p < 0,05$  comparado aos grupos OF+DMSO 5% e OF+MK-886. # $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+DMSO 5% na injeção i.c.v.; Número de animais entre parênteses.

#### **5.4. Efeito do MK-886 nas determinações do hematócrito, sódio sérico, osmolalidade, proteínas plasmáticas e nitrato sérico**

No grupo DMSO 5%, a sepse provocou um aumento do hematócrito a partir das 4 horas retornando progressivamente às condições basais, não havendo diferença entre os grupos em relação ao grupo OF nos tempos 0, 18 e 24 horas após o início do experimento (Figura 5A e 5B). A administração central de MK-886 não provocou alteração do hematócrito (Figura 5A), entretanto a administração sistêmica reverteu o aumento observado às 4 horas após CLP (Figura 5B).

A análise dos resultados do sódio sérico revelou que não há diferença estatística entre os grupos DMSO 5% e MK-886 em todos os tempos analisados tanto na administração central quanto na sistêmica (Figura 6A e 6B).

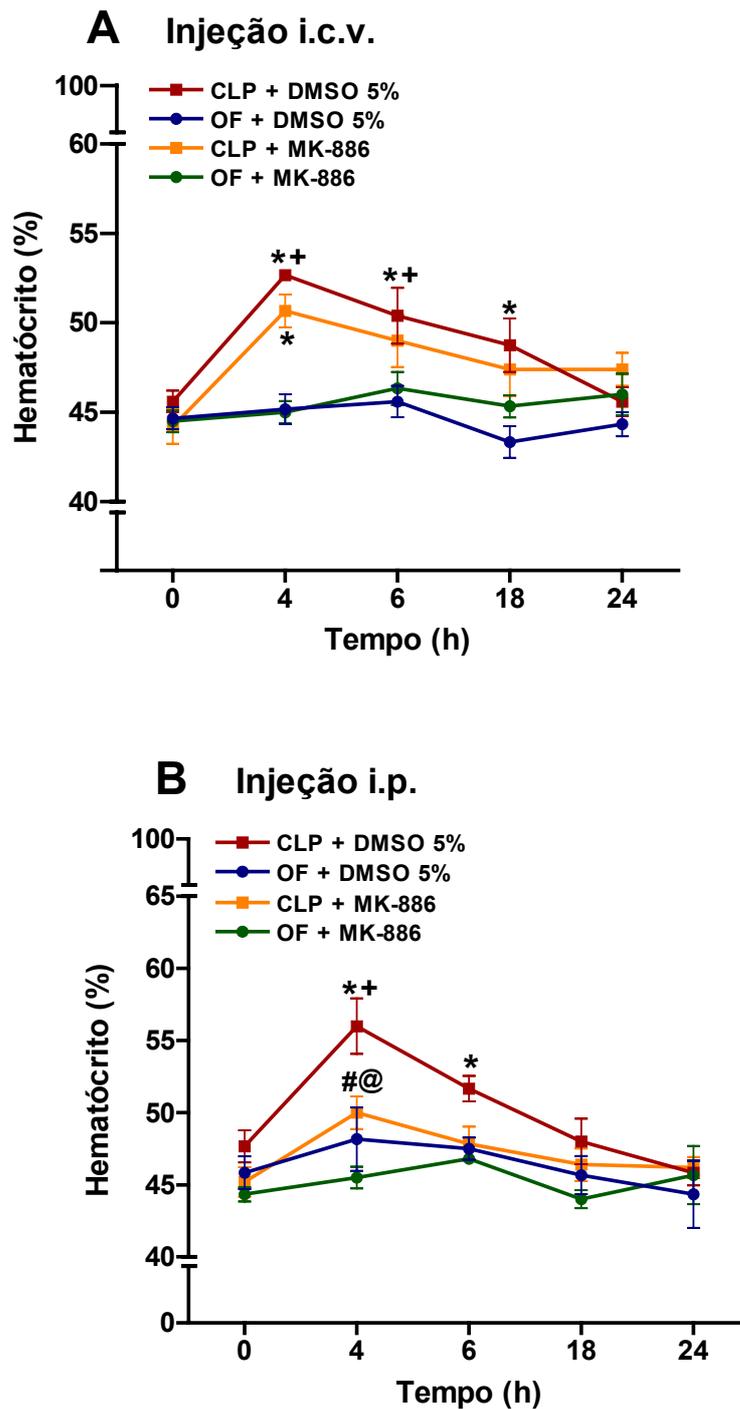
Quanto à determinação da osmolalidade plasmática, observamos que os grupos DMSO 5% e MK-886 após CLP tanto na injeção i.c.v. quanto na i.p. não provocaram alteração quando comparado com os grupos controles (OF+DMSO 5% e OF+MK-886). Porém, dentro dos grupos CLP+DMSO 5% e CLP+MK-886 nas duas injeções, houve uma redução significativa da osmolalidade nos períodos de 18 e 24 horas (Figura 7A e 7B).

Por outro lado, a sepse induzida pelo CLP provocou uma redução da concentração plasmática de proteínas a partir das 4 horas (Figura 8A e 8B), e que a administração i.c.v. de MK-886 não alterou esta concentração (Figura 8A). Entretanto a administração i.p. de MK-886 foi capaz de reverter esta redução apenas nos períodos de 4 e 6 horas após o CLP (Figura 8B).

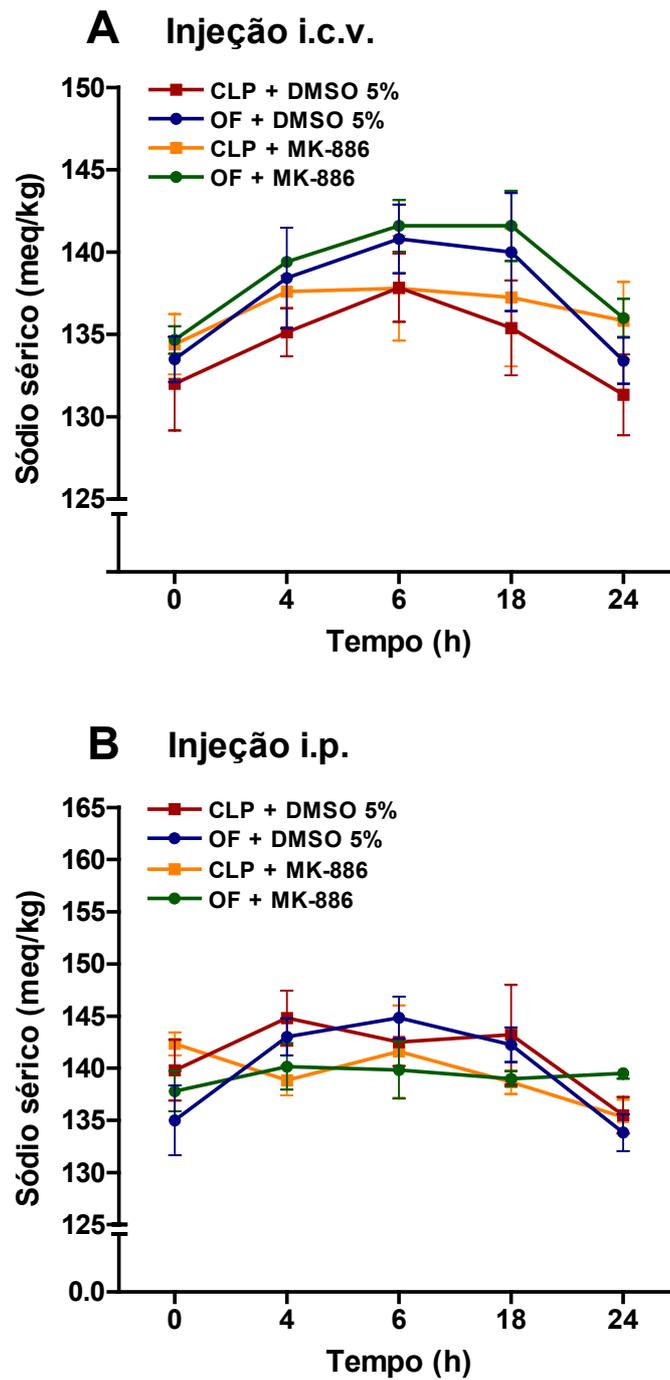
Quanto à determinação do nitrato sérico, observamos que o CLP provocou um aumento progressivo a partir da quarta hora (Figura 9A e 9B). A administração

i.c.v. de MK-886 causou uma redução deste aumento a partir da quarta hora (Figura 9A), enquanto a administração i.p. não alterou a concentração em nenhum dos tempos analisados (Figura 9B).

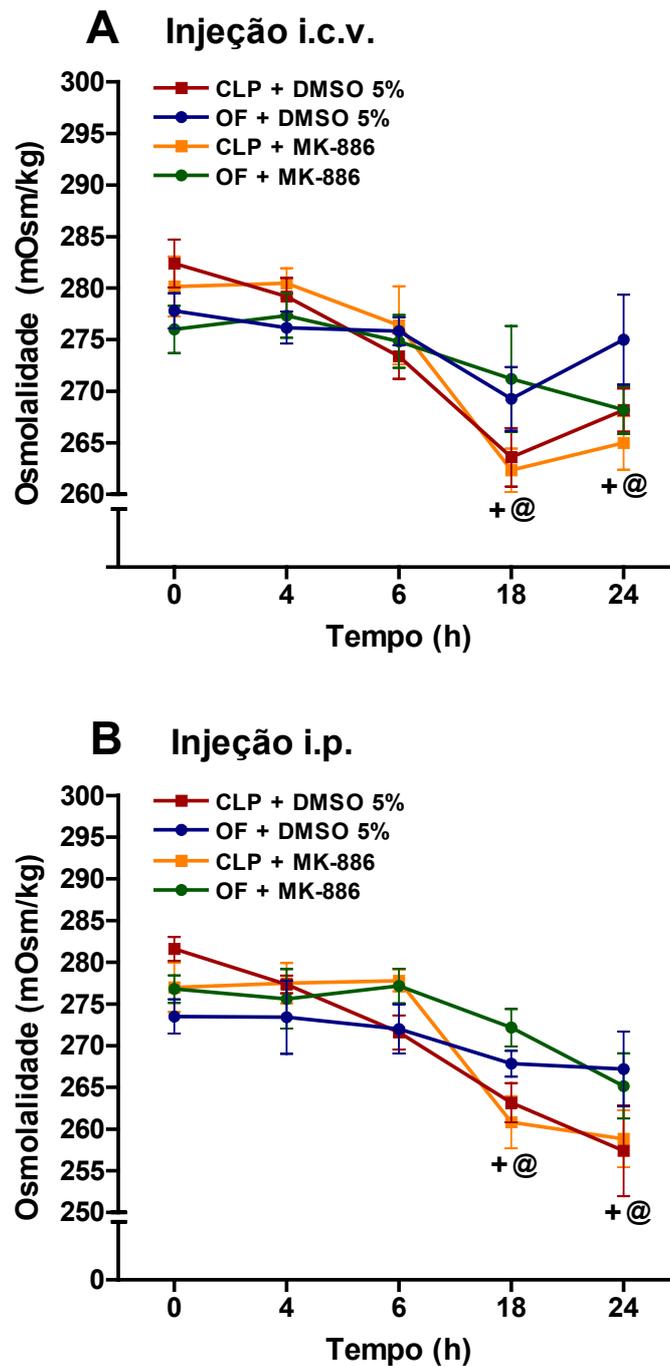
As administrações de DMSO 5% e MK-886 não causaram alteração no grupo OF ao longo de todo período experimental (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9).



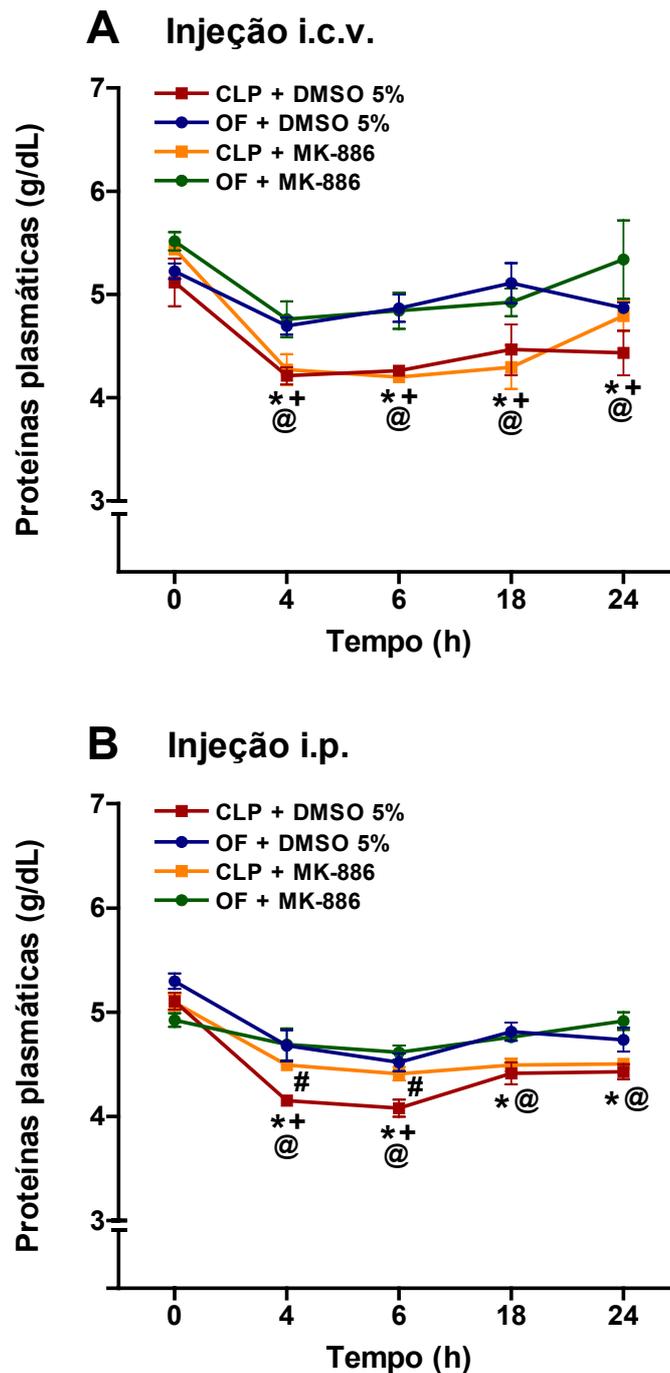
**Figura 5.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o hematócrito. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado aos grupos OF+DMSO 5% e OF+MK-886; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+DMSO 5% no tempo 4h; +  $p < 0,05$  comparado aos tempos 0 e 24h na injeção i.c.v., e aos tempos 0, 18 e 24h na injeção i.p. do grupo CLP+DMSO 5%; @  $p < 0,05$  comparado aos tempos 0, 18 e 24h do grupo CLP+MK-886.  $n = 5-6$  em cada grupo.



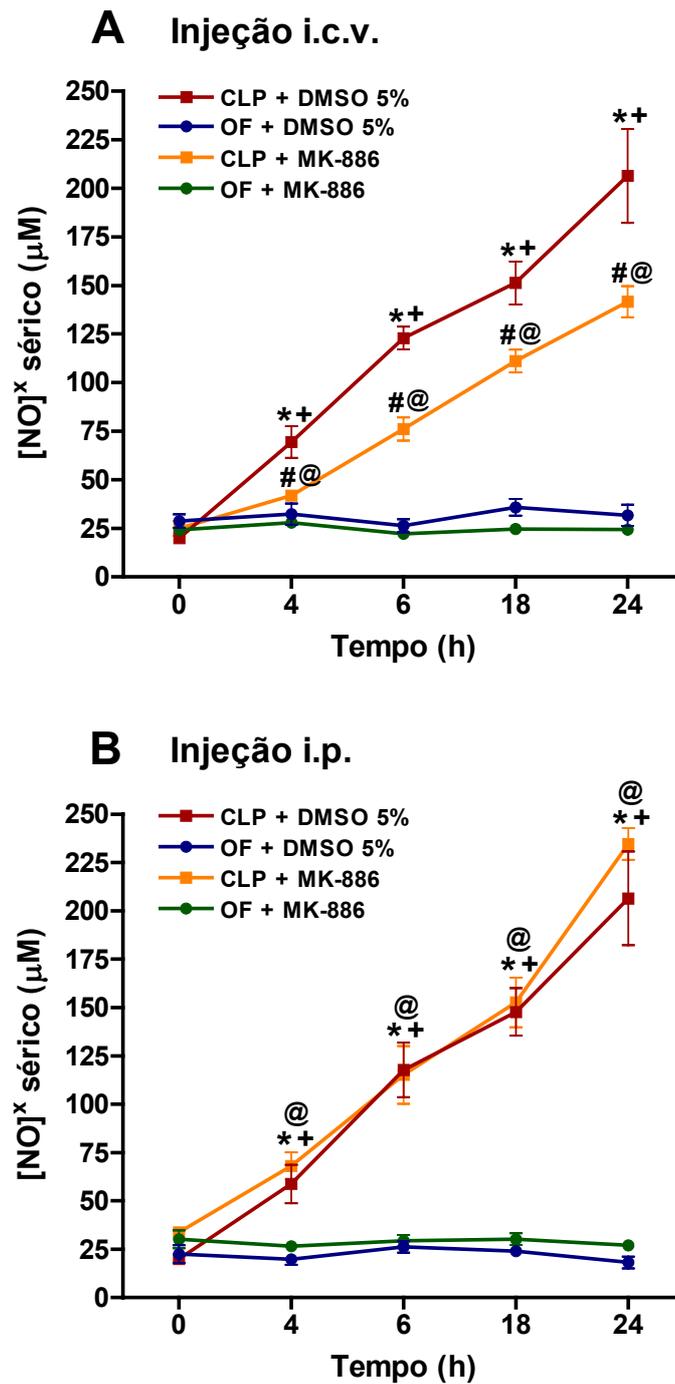
**Figura 6.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o sódio sérico. Valores expressos como média  $\pm$  EPM.  $n = 5-6$  em cada grupo.



**Figura 7.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a osmolalidade plasmática. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. <sup>+</sup>p<0,05 comparado aos tempos 0 e 4h no grupo CLP+DMSO 5%; <sup>@</sup>p<0,05 comparado aos tempos 0, 4 e 6h no grupo CLP+MK-886. n = 5-6 em cada grupo.



**Figura 8.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre as proteínas plasmáticas. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado aos grupos OF+DMSO 5% e OF+MK-886; # $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+DMSO 5% nos tempos 4 e 6h; + $p < 0,05$  comparado ao tempo 0h na injeção i.c.v., e aos tempos 0, 18 e 24h na injeção i.p. do grupo CLP+DMSO 5%; @ $p < 0,05$  comparado ao tempo 0h do grupo CLP+MK-886 nas injeções i.c.v. e i.p.  $n = 5-6$  em cada grupo.



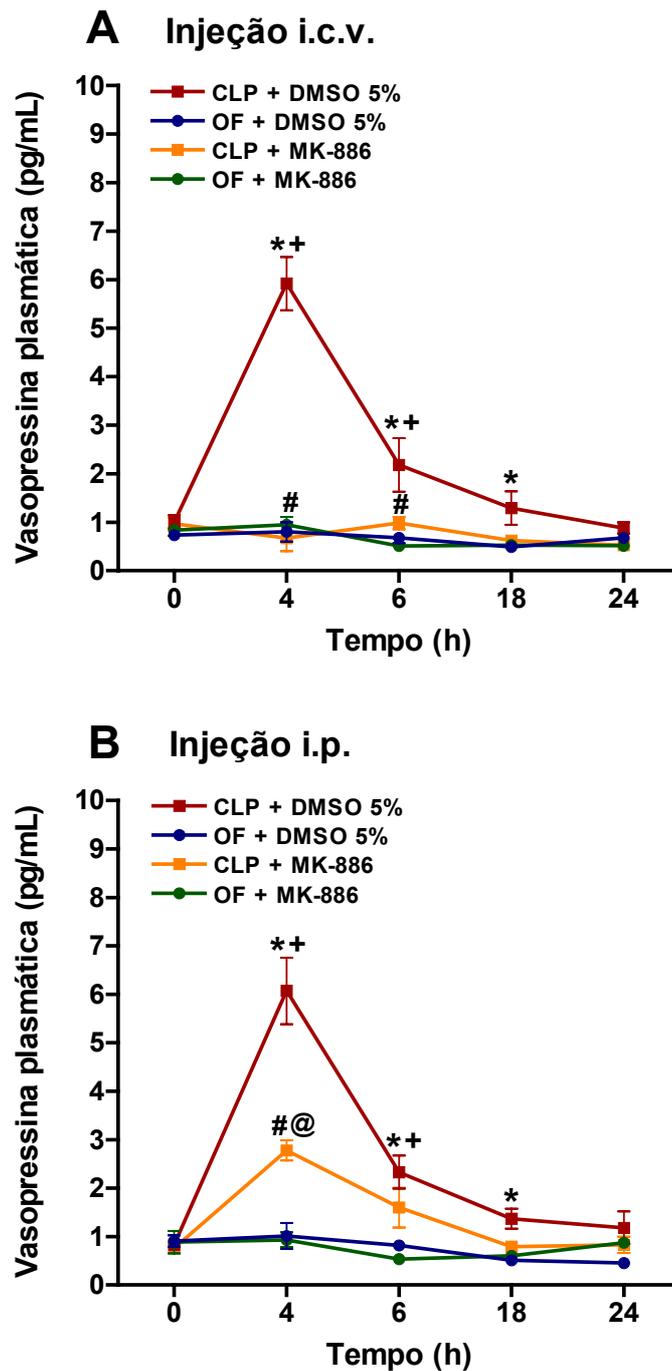
**Figura 9.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o nitrato sérico. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  comparado aos grupos OF+DMSO 5% e OF+MK-886; #  $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+DMSO 5% nos tempos 4, 6, 18 e 24h na injeção i.c.v.; +  $p < 0,05$  comparado ao tempo 0h nas injeções i.c.v. e i.p. do grupo CLP+DMSO 5%; @  $p < 0,05$  comparado ao tempo 0h nas injeções i.c.v. e i.p. do grupo CLP+MK-886. n = 6 em cada grupo.

### **5.5. Efeito do MK-886 sobre a concentração plasmática e neurohipofisária de vasopressina**

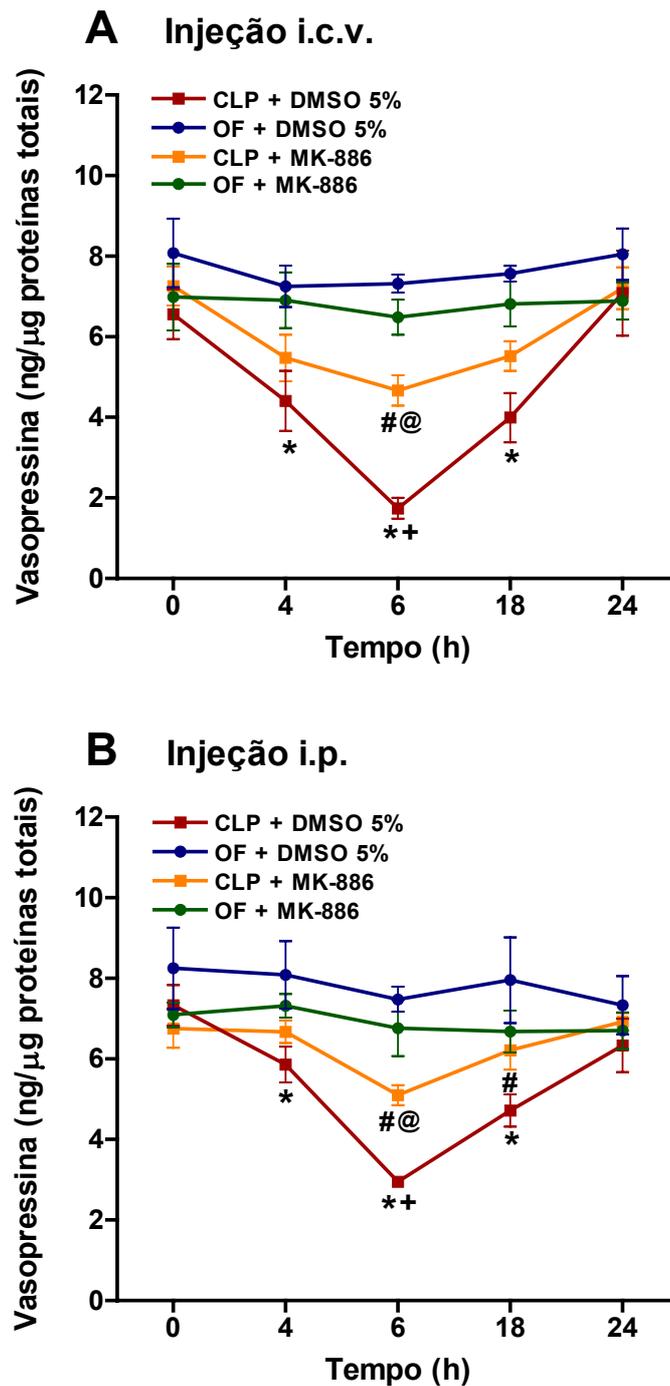
A sepse induzida por CLP provocou um aumento nas concentrações plasmáticas de vasopressina às 4 e 6 horas com pico em 4 horas, retornando progressivamente às concentrações basais às 18 e 24 horas (Figura 10A e 10B). A administração central de MK-886 bloqueou o aumento da secreção de vasopressina no tempo 4 horas e reduziu este aumento às 6 horas (Figura 10A). A administração sistêmica, por sua vez, apenas reduziu a secreção de vasopressina no tempo 4 horas (Figura 10B).

Na neurohipófise, observou-se que a concentração neurohipofisária de vasopressina encontra-se reduzida nos tempos 4, 6 e 18 horas com pico em 6 horas e em condições basais às 24 horas após CLP (Figura 11A e 11B). A administração central de MK-886 reverteu parcialmente esta redução no tempo 6 horas (Figura 11A), e a administração sistêmica nos tempos 6 e 18 horas (Figura 11B).

As administrações de DMSO 5% e MK-886 não causaram alteração no grupo OF ao longo de todo período experimental (Figuras 10 e 11).



**Figura 10.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado aos grupos OF+DMSO 5% e OF+MK-886; # $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+DMSO 5% nos tempos 4 e 6h na injeção i.c.v., e no tempo 4h na injeção i.p.; + $p < 0,05$  comparado aos tempos 0, 18 e 24h nas injeções i.c.v. e i.p. do grupo CLP+DMSO 5%; @ $p < 0,05$  comparado aos tempos 0, 6, 18 e 24h do grupo CLP+MK-886 na injeção i.p.  $n = 6$  em cada grupo.



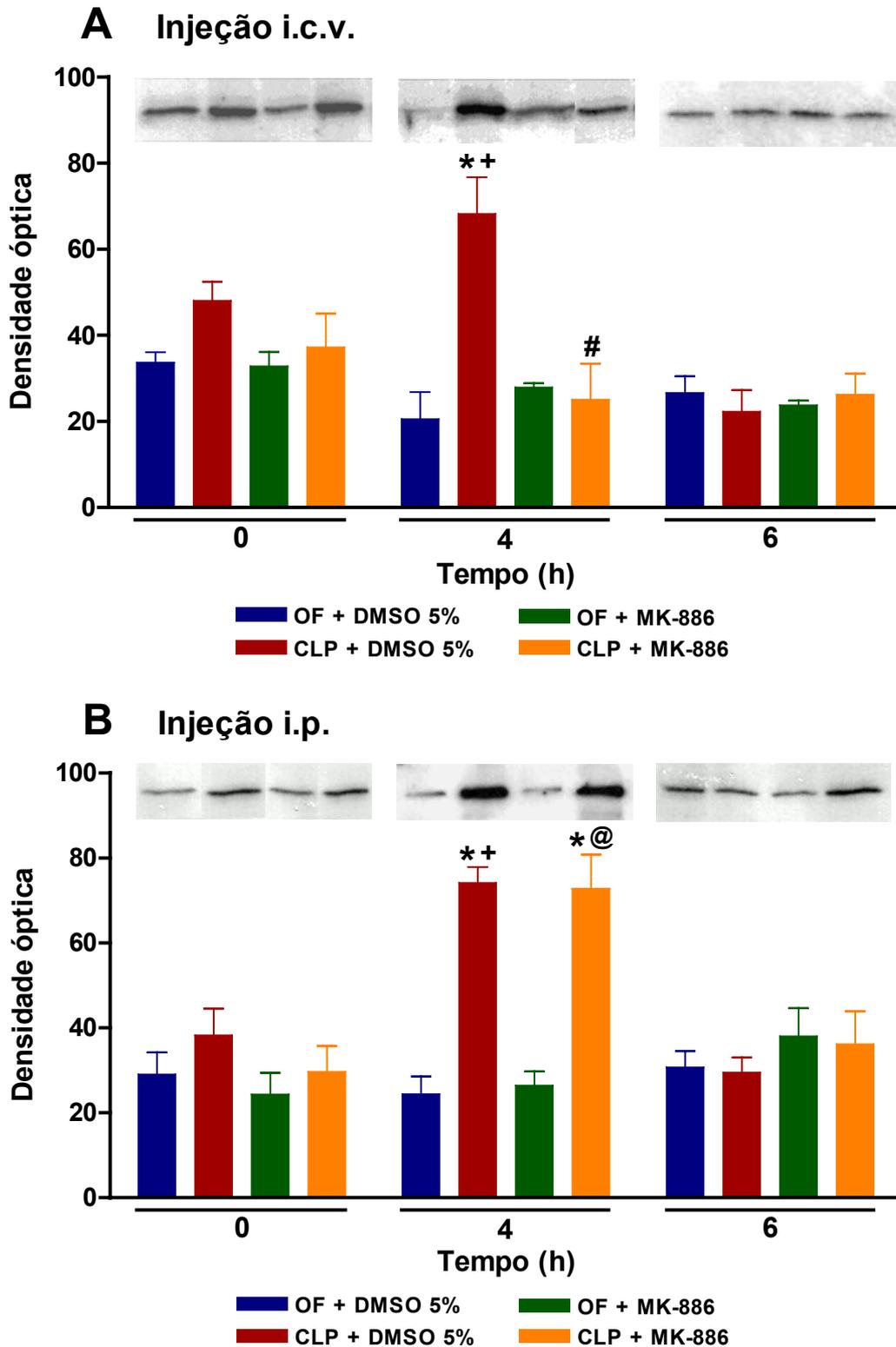
**Figura 11.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a concentração neurohipofisária de vasopressina. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. \* $p < 0,05$  comparado aos grupos OF+DMSO 5% e OF+MK-886; # $p < 0,05$  comparado ao grupo CLP+DMSO 5% no tempo 6h na injeção i.c.v., e nos tempos 6 e 18h na injeção i.p.; + $p < 0,05$  comparado aos tempos 0, 4, 18 e 24h nas injeções i.c.v. e i.p. do grupo CLP+DMSO 5%; @ $p < 0,05$  comparado aos tempos 0 e 24h do grupo CLP+MK-886 na injeção i.c.v., e aos tempos 0, 4 e 24h do grupo CLP+MK-886 na injeção i.p.  $n = 6$  em cada grupo.

## **5.6. Efeito do MK-886 sobre o conteúdo de LTC<sub>4</sub> sintase no hipotálamo basal**

Para esse experimento, foram analisados até o momento somente os tempos 0, 4 e 6 horas.

A sepse induzida por CLP provocou um aumento na expressão de LTC<sub>4</sub> sintase às 4 horas que foi bloqueado com a administração central de MK-886 (Figura 12A). Entretanto, a administração sistêmica não alterou esta expressão (Figura 12B).

As administrações de DMSO 5% e MK-886 não causaram alteração no grupo OF ao longo de todo período experimental (Figuras 12 e 13).



**Figura 12.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o conteúdo de LTC<sub>4</sub> sintase. Valores expressos como média ± EPM. \*p<0,05 comparado aos grupos OF+DMSO 5% e OF+MK-886; #p<0,05 comparado ao grupo CLP+DMSO 5% no tempo 4h na injeção i.c.v.; +p<0,05 comparado aos tempos 0 e 6h do grupo CLP+DMSO 5%; @p<0,05 comparado aos tempos 0 e 6h do grupo CLP+MK-886 na injeção i.p. . n = 4 em cada grupo.

## 6. *Discussão*

Os animais submetidos ao modelo experimental de peritonite séptica induzida por CLP apresentaram sinais característicos de sepse nas primeiras horas após a cirurgia, incluindo piloereção, letargia, exsudato ao longo dos olhos e do nariz e dilatação abdominal. Entretanto, os animais controles permaneceram ativos em suas caixas. Esses resultados são compatíveis com os vários relatos da literatura (SALKOWSKI, DETORE *et al.*, 1998; BENJAMIM, FERREIRA *et al.*, 2000; WESTPHAL, FREISE *et al.*, 2004).

O grupo de animais submetidos ao estímulo séptico apresentou uma redução da sobrevida. Entretanto, o grupo de animais que receberam injeção i.c.v. de MK-886 apresentou um aumento da sobrevida, e não houve alteração da sobrevida do grupo que recebeu injeção i.p. de MK-886. Portanto, somente o MK-886 administrado centralmente é capaz de melhorar a sobrevida dos animais submetidos à CLP, sugerindo uma participação dos LTs centrais na sepse.

No modelo de choque endotóxico, o bloqueio da síntese dos eicosanóides pela inibição sistêmica da fosfolipase A<sub>2</sub> resultou em diminuição dos níveis de LTC<sub>4</sub> e melhorou a sobrevida (MORASSUTTI, STAINES *et al.*, 1994). Da mesma maneira, no modelo de sepse por CLP, camundongos depletados do gene da enzima 5-LO ou camundongos tratados com MK-886 por gavagem apresentaram, respectivamente, 75 ou 100% de sobrevida. Apesar da inibição ou depleção da 5-LO ter reduzido o acúmulo de neutrófilos peritoneal e aumentado o número de bactérias na cavidade peritoneal, ainda houve uma melhora da sobrevida. Já o antagonista do receptor de LTB<sub>4</sub> não melhorou a sobrevida e o antagonista do receptor dos cis-leucotrienos promoveu uma proteção moderada (BENJAMIM, CANETTI *et al.*, 2005). Entretanto, em outro estudo também com camundongos, foi observado que a administração sistêmica de MK-886 em animais submetidos à CLP letal (14 perfurações) e à CLP

sub-letal (2 perfurações) não melhorou a sobrevivência desses animais (RIOS-SANTOS, BENJAMIM *et al.*, 2003). Esses resultados, portanto, são contraditórios e justificam mais estudos relacionados ao papel dos LTs na sepse.

Em nossos experimentos, houve um aumento na porcentagem de hematócrito no grupo CLP 4 e 6 horas após a cirurgia demonstrando que ocorreu hipovolemia. Esse fato já foi anteriormente observado em nosso laboratório no modelo de sepse por CLP com 20 perfurações (OLIVEIRA, ELIAS *et al.*, 2005). A hipovolemia é uma das alterações fisiológicas que acompanha o início da sepse (PARRILLO, 1993) e pode ser explicada pelo extravasamento de líquido intravascular para o interstício e cavidade peritoneal (ANDREW, DENG *et al.*, 2000). Esse extravasamento faz aumentar o fluxo linfático facilitando a resposta imune já que as células T ativadas são disseminadas por essa via (ANDREW, DENG *et al.*, 2000).

A administração central de MK-886 não provocou alteração do hematócrito após o CLP ao longo de todo período experimental. Entretanto, a administração sistêmica de MK-886 provocou uma redução do hematócrito 4 horas após CLP. Portanto, somente a administração sistêmica de MK-886 é capaz de reverter a hipovolemia provocada pela sepse.

Nesse estudo também observamos uma redução significativa da osmolalidade nos períodos de 18 e 24 horas. Apesar desta redução, não houve alteração na concentração de sódio sérico durante todo o período experimental. Isso está de acordo com Oliveira (2005) que também observou uma diminuição da osmolalidade plasmática em 24 horas após CLP e nenhuma alteração na concentração de sódio. Estes resultados são semelhantes aos do modelo de choque endotóxico, no qual foi observado também a redução da osmolalidade 2 horas após

a injeção de LPS. Entretanto, os autores do trabalho observaram uma diminuição do sódio (WANG e EVERED, 1993). A endotoxemia estimula a ingestão hídrica e diminui as perdas urinárias, conseqüentemente, levando ao ganho de água e diluição do fluido corporal, podendo levar à diminuição ou não alteração da osmolalidade plasmática (WANG e EVERED, 1993). Apesar de não termos verificado a ingestão hídrica nesse estudo, resultados de outros trabalhos do nosso laboratório utilizando CLP com 10 e 20 perfurações relatam um aumento da mesma, o que justificaria a presença de alteração osmótica que observamos. A administração de MK-886 tanto central quanto sistêmica não provocou alteração da osmolalidade plasmática e do sódio sérico. Além disso, apesar do sódio ser o fator mais relevante para as alterações osmóticas, o resultado sugere que as alterações na osmolalidade observadas na sepse também podem estar relacionadas à diminuição das proteínas plasmáticas.

De fato, a análise dos resultados das proteínas plasmáticas mostrou uma diminuição nas concentrações após 4 horas da cirurgia CLP, permanecendo reduzida até as 24 horas, demonstrando que houve aumento da permeabilidade vascular resultando no extravasamento de líquido intravascular para o interstício. Resultados semelhantes foram observados em nosso laboratório por Oliveira (2005) e Corrêa et al. (2007) (CORREA, PANCOTO *et al.*, 2007) no modelo de sepse por CLP com 20 perfurações cecais e também no modelo de choque endotóxico por LPS (WANG e EVERED, 1993). A administração i.c.v. de MK-886 não alterou a concentração de proteínas, entretanto a administração i.p. reverteu a redução nos períodos de 4 e 6 horas após o CLP. Benjamim et al. (2005) observaram que camundongos submetidos à CLP apresentaram um aumento do extravasamento de proteínas para o exsudato peritoneal, e camundongos depletados do gene da

enzima 5-LO (5-LO<sup>-/-</sup>) reduziram a permeabilidade vascular peritoneal após CLP. Similarmente, eles também observaram que camundongos 5-LO<sup>-/-</sup> demonstraram menor extravasamento de proteínas no rim e no coração. Nossos resultados da administração sistêmica de MK-886 são semelhantes aos achados de Benjamim et. al (2005), porém os resultados da administração central contradizem esses achados. Isso pode ser devido ao fato de que a administração i.c.v. não foi capaz de inibir os cis-leucotrienos sistêmicos e, portanto, estes estariam ainda exercendo seus efeitos, dentro os quais, aumentando a permeabilidade vascular.

O extravasamento vascular observado durante a sepse ocorre por ação de enzimas proteolíticas agindo sobre as células endoteliais, aumentando os espaços entre elas, e provocando a perda de plasma para o espaço extravascular. Algumas substâncias são responsáveis por esse processo como as citocinas, NO, prostaglandinas, leucotrienos entre outros (FISHEL, ARE *et al.*, 2003; BENJAMIM, CANETTI *et al.*, 2005). Essas alterações levam à diminuição da concentração de proteínas no plasma e hipovolemia que, associada à vasodilatação, promovem hipotensão arterial (LANDRY e OLIVER, 2001; BENJAMIM, CANETTI *et al.*, 2005).

De fato, observamos que o CLP provocou um aumento crescente do nitrato sérico a partir da quarta hora, como já foi visto em nosso laboratório por Oliveira (2005) e Corrêa (2007) (CORREA, PANCOTO *et al.*, 2007) no modelo de sepse por CLP com 20 perfurações cecais. A administração i.c.v. de MK-886 provocou uma redução do nitrato a partir da quarta hora, contudo a administração i.p. não alterou a concentração de nitrato durante todo o período experimental.

O NO apesar de ser um potente mediador inflamatório tem um efeito bastante paradoxal. No início do processo infeccioso quando produzido pela NOSe, as concentrações baixas de NO tem efeitos benéficos e muito importantes como:

aumentar a defesa do hospedeiro por sua atividade bactericida e tumoricida, promover vasodilatação, aumentar o fluxo sangüíneo na microcirculação e prevenir a adesão plaquetária e leucocitária ao endotélio (MONCADA, PALMER *et al.*, 1991; THIEMERMANN, 1997; FEIHL, WAEBER *et al.*, 2001). Em uma fase mais tardia, com a produção de NO descontroladamente aumentada devido à ativação da iNOS, o NO torna-se tóxico ao organismo, contribuindo para várias características fisiopatológicas do choque séptico, como hipotensão grave devido a vasodilatação periférica intensa, hiporresponsividade tecidual, culminando com a síndrome de disfunção múltipla de órgãos (MONCADA, PALMER *et al.*, 1991; THIEMERMANN, 1997; FEIHL, WAEBER *et al.*, 2001).

Benjamim *et al.* (BENJAMIM, FERREIRA *et al.*, 2000; BENJAMIM, SILVA *et al.*, 2002) e Crosara-Alberto *et al.* (CROSARA-ALBERTO, DARINI *et al.*, 2002) demonstraram que o NO produzido pela iNOS era responsável pela falência da migração de neutrófilos na sepse letal induzida por CLP ou pela injeção de *Staphylococcus aureus* culminando em aumento da mortalidade, uma vez que camundongos depletados do gene da enzima iNOS<sup>-/-</sup> não apresentaram esta falência, embora apresentassem aumento da mortalidade. Além disso, camundongos pré-tratados com aminoguanidina, um inibidor seletivo da iNOS, também não apresentaram esta falência, embora tivessem uma diminuição da mortalidade. Esses resultados mostram os efeitos contraditórios do NO. Posteriormente, Rios-Santos e colaboradores (2003) demonstraram que inibidores da síntese ou bloqueadores de receptores de prostaglandinas, PAF ou LTB<sub>4</sub> não alteraram a falência da migração dos neutrófilos na sepse letal sugerindo que estes eicosanóides não estão envolvidos na indução da liberação do NO periférico que medeia esta falência. Entretanto, nós observamos que a inibição central dos

leucotrienos reduziu a concentração de NO periférico na fase inicial da sepse, e provavelmente também estaria evitando a falência da migração de neutrófilos, diminuindo a quantidade de bactérias, aumentando assim a sobrevivência dos animais. Porém, provavelmente a redução sistêmica dos leucotrienos não alterou a concentração de NO na fase inicial da sepse, e o NO em excesso poderia ser o responsável pela diminuição da sobrevivência dos animais. Para comprovarmos esta redução sistêmica, teríamos que ter dosado os LTs plasmáticos que deverá, entretanto, ser objeto de futuro estudo.

Won et al. (WON, IM *et al.*, 2005) observaram que células gliais pré-incubadas com LPS promoviam aumento do conteúdo de RNA mensageiro (RNAm) e da enzima iNOS, e conseqüentemente aumento da produção de NO. Quando estas células foram incubadas com MK-886, os pesquisadores observaram que havia redução tanto do conteúdo de RNAm e da proteína iNOS quanto do NO, sugerindo que a 5-LO medeia a expressão do gene da iNOS. Hashimoto et al. (2003) (HASHIMOTO, KIHARA *et al.*, 2003) utilizando cultura de células de músculo vascular liso também observaram que a pré-incubação destas células com IL-1 estimulava a expressão da iNOS e a produção de NO, e que o NDGA, um inibidor da lipoxigenase (LOX), reduzia essa expressão, sugerindo que os produtos da LOX exercem um papel importante na regulação da produção de NO induzida por estímulos. De fato, pesquisadores têm observado que os LTs induzem a produção de NO periférico em infecções provocadas por *Trypanosoma cruzi* (TALVANI, MACHADO *et al.*, 2002), *Histoplasma capsulatum* (MEDEIROS, SA-NUNES *et al.*, 2004) e *Mycobacterium tuberculosis* (PERES, DE PAULA *et al.*, 2007).

Nossos resultados demonstraram que o estímulo séptico provocou um aumento significativo na secreção plasmática de vasopressina em 4 e 6 horas após

CLP. Pancoto (2006) (PANCOTO, 2006) também observou um pico de AVP 4 horas após CLP com 10 perfurações. Nós acreditamos que esse aumento da AVP pode ser atribuído em parte à hipovolemia e hipotensão promovida pela sepse.

Alterações na volemia e pressão arterial são detectadas por receptores localizados em regiões de baixa e alta pressão. Estes enviam sinais, através dos nervos vago e glossofaríngeo, às regiões do tronco cerebral como o núcleo do trato solitário (NTS), área postrema (AP) e bulbo ventrolateral medial (VLM), que, por sua vez, ativam o PVN e SON estimulando a secreção de AVP (JOHNSON e THUNHORST, 1997); (MCKINLEY, MATHAI *et al.*, 2004). Apesar de não termos analisado a pressão arterial dos animais nesse estudo, resultados anteriores do nosso laboratório demonstraram que animais submetidos à CLP com 10 e 20 perfurações apresentaram uma redução da pressão arterial 3 horas após o estímulo persistindo até as 5 horas estudadas. Portanto, a queda inicial da pressão arterial deve ter contribuído para aumentar as concentrações plasmáticas de AVP dos animais com 10 e 20 perfurações. Além disso, outro estudo utilizando o mesmo modelo que o nosso observou queda progressiva da pressão arterial pelo período de 72 horas (TORRES-DUENAS, BENJAMIM *et al.*, 2006). Entretanto não sabemos se o pré-tratamento com MK-886 tanto i.c.v. quanto i.p. alteraria a pressão arterial dos animais.

Entre os metabólitos da 5-LO, os cis-leucotrienos exercem efeitos diretos no tônus e na permeabilidade vascular, e, portanto, participam do comprometimento hemodinâmico da sepse (BURKA e EYRE, 1977; ELY, ANGUS *et al.*, 2003). Benjamim *et al.* (2005) demonstraram que camundongos submetidos à CLP e tratados com um antagonista do receptor 1 dos cis-leucotrienos (MK-571) exibiram somente leve hipotensão. Esses dados sugerem que os cis-leucotrienos são

importantes mediadores da hipotensão observada após CLP, e este efeito provavelmente decorre do aumento da permeabilidade vascular. Em outro estudo em coelho, o pré-tratamento com MK-886 por gavagem amenizou o efeito hipotensivo induzido pelo LPS (CAN, CINAR *et al.*, 1998). Portanto, não descartamos o envolvimento dos cis-leucotrienos na hipotensão observada após CLP e seria interessante analisar a pressão arterial dos animais neste trabalho, o que deverá ser objeto de estudo do mesmo.

Com a inibição da síntese de LTs, utilizando MK-886 centralmente e sistemicamente, nós observamos um bloqueio e redução da secreção de AVP na fase inicial da sepse. Esses resultados sugerem que este bloqueio e redução também podem ser devidos em parte à reversão da hipotensão, e que os LTs exercem um papel importante na secreção de AVP.

O fato da injeção periférica de MK-886 ter apenas reduzido a AVP, mas não bloqueado, sugere que outros mediadores, como NO, citocinas e prostaglandinas liberados durante a sepse podem ainda exercer influência direta no eixo hipotálamo-neurohipófise.

Vários estudos têm mostrado que o NO pode agir centralmente modulando a secreção de AVP (OTA, CROFTON *et al.*, 1993; YASIN, COSTA *et al.*, 1993; GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002; VENTURA, GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2005). Ota e colaboradores (1993) observaram que injeção i.c.v. de doador de NO promoveu aumento da concentração plasmática de AVP. Enquanto, Kadekaro (KADEKARO, 2004) demonstrou que administração i.c.v. de L-NAME (inibidor de NOS) em ratos conscientes também resultou no aumento da secreção hormonal. Esses estudos comprovam a função modulatória do NO, podendo exercer efeito estimulatório ou inibitório na secreção de AVP. Além disso, pesquisadores

observaram que, durante o choque endotóxico, a inibição central de NO por inibidor seletivo de iNOS (Aminoguanidina) e inibidor não seletivo de NOS (L-NAME) demonstrou ação inibitória do NO na secreção de AVP, enquanto doadores de NO promoveram diminuição na secreção hormonal (GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002; GIUSTI-PAIVA, BRANCO *et al.*, 2003; GIUSTI-PAIVA, ELIAS *et al.*, 2005). Em nosso laboratório no modelo de CLP, Corrêa *et al.* (2007) também observaram que a inibição sistêmica de NO pela aminoguanidina reduziu a concentração plasmática de AVP.

Em relação às citocinas e PGs, Naito e colaboradores (NAITO, FUKATA *et al.*, 1991) observaram que a administração intravenosa de IL-1 aumentava a secreção de AVP numa relação dose-dependente. Outros pesquisadores também observaram que a administração de IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  intensificam a secreção de AVP (ZELAZOWSKI, PATCHEV *et al.*, 1993; MASTORAKOS, WEBER *et al.*, 1994; CHIKANZA, PETROU *et al.*, 2000). Além disso, Carnio *et al.* (2006) (CARNIO, MORETO *et al.*, 2006) observaram que, durante o choque endotóxico, a inibição periférica da síntese de PGs pela administração de indometacina e nimesulide, inibidores das cicloxigenase, bloqueou a secreção de AVP, demonstrando o papel das PGs na regulação da secreção de AVP.

Além disso, também temos que considerar, já que não dosamos os LTs plasmáticos, que os cis-leucotrienos, que eventualmente não foram bloqueados pela injeção periférica do MK-886, podem estar da mesma maneira que as citocinas e NO ativando o eixo hipotálamo-neurohipófise, tendo em vista a existência de receptores cerebrais para os mesmos (HUI e FUNK, 2002).

Na fase tardia da sepse, nós observamos que a concentração plasmática de AVP encontrava-se em condições basais. Este fenômeno também foi observado

em estudos clínicos (LANDRY, LEVIN *et al.*, 1997; SHARSHAR, BLANCHARD *et al.*, 2003; WESTPHAL, FREISE *et al.*, 2004) e em nosso laboratório no modelo de CLP com 20 perfurações (SILVA, PEDRO MDE *et al.*, 2004; OLIVEIRA, ELIAS *et al.*, 2005). Vários estudos têm sido realizados para esclarecer os motivos pelos quais a concentração de AVP está em níveis basais na fase tardia a despeito da hipotensão. Entre as causas para esta redução, tem sido sugerida a possível diminuição dos estoques de AVP na neurohipófise (SKLAR e SCHRIER, 1983), a insuficiência autonômica, indicada pela diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (MORIEN, GARRARD *et al.*, 1999) e a excessiva produção de NO (GIUSTI-PAIVA, DE CASTRO *et al.*, 2002; GIUSTI-PAIVA, BRANCO *et al.*, 2003).

A depleção dos estoques neurohipofisários como uma das causas para a deficiência tardia da secreção de AVP tem sido relatada, por exemplo, para pacientes sépticos (HOLMES, PATEL *et al.*, 2001; SHARSHAR, CARLIER *et al.*, 2002; OLIVEIRA, ELIAS *et al.*, 2005). Sharshar e colaboradores (SHARSHAR, CARLIER *et al.*, 2002; SHARSHAR, BLANCHARD *et al.*, 2003), analisando a neurohipófise por ressonância magnética, observaram que esta exibia um sinal fraco em pacientes sépticos, sugerindo que os estoques estão depletados, e seriam a razão pelo qual a AVP está inapropriadamente reduzida na fase tardia do choque séptico.

Nós observamos uma redução significativa da concentração neurohipofisária de AVP 6 horas após CLP. Esses resultados sugerem que o aumento da concentração plasmática de AVP às 4 horas provocou uma depleção do conteúdo neurohipofisário a partir da quarta hora, reduzindo ainda mais na sexta hora, uma vez que a concentração plasmática de AVP ainda se encontra elevada na sexta hora após CLP.

A partir da sexta hora, observamos um aumento progressivo da concentração neurohipofisária de AVP, retornando às condições basais. Nossos resultados estão de acordo com os de Giusti-Paiva et al. (2002) que também não encontraram alteração neurohipofisária no conteúdo de AVP após injeção de LPS na fase tardia (6 horas após LPS).

Além disso, o pré-tratamento com MK-886 centralmente e sistemicamente provocou um aumento da concentração neurohipofisária de AVP 6 horas após CLP. Esses resultados devem estar relacionados com a redução da secreção plasmática de AVP promovida pelo MK-886, uma vez que a inibição da ação dos LTs com conseqüente inibição da secreção de AVP remove o estímulo que diminui os estoques neurohipofisários de AVP. Portanto, as alterações neurohipofisárias devem ser devido à secreção de AVP, e não à diminuição do estoque.

O MK-886 além de inibir a enzima 5-LO, também inibe todas as outras enzimas que promovem a síntese dos LTs, inclusive a LTC<sub>4</sub> sintase que é responsável pela síntese dos cis-leucotrienos (LAM, PENROSE *et al.*, 1994; LAM, 2003).

LTC<sub>4</sub> sintase é predominantemente expressa em células mielóides como monócitos/macrófagos, eosinófilos, basófilos e mastócitos (LAM e AUSTEN, 2002). Schröder et al. (SCHRODER, SJOSTROM *et al.*, 2005) observaram que o RNAm da LTC<sub>4</sub> sintase e que a expressão desta proteína eram também detectáveis no coração, cérebro, fígado e adrenal. Após a administração i.p. de LPS, o conteúdo de RNAm nestes órgãos aumentou após 1 hora da injeção e a de LTC<sub>4</sub> sintase após 6 horas. Entretanto na fase tardia da endotoxemia, o conteúdo de RNAm retornou a nível basal, enquanto a expressão da proteína aumentou ainda mais. Os pesquisadores sugeriram que a regulação da LTC<sub>4</sub> sintase pode ser influenciada

pela resposta inflamatória sistêmica. Além disso, a LTC<sub>4</sub> sintase e a produção de cis-leucotrienos podem diretamente, ou por vias secundárias, contribuir para os sintomas gerais da inflamação sistêmica como febre, taquicardia e hipotensão (SCHRODER, SJOSTROM *et al.*, 2005).

De fato, a sepse induzida por CLP provocou um aumento significativo na expressão de LTC<sub>4</sub> sintase com pico em 4 horas, retornando a níveis basais às 6 horas após o início do experimento. A administração central de MK-886 bloqueou a LTC<sub>4</sub> sintase 4 horas após CLP. Isto sugere que os cis-leucotrienos centrais também estão envolvidos na sepse. Por outro lado, a administração sistêmica não alterou a expressão de LTC<sub>4</sub> sintase, sugerindo que ou a dose de MK-886 administrada não foi suficiente para inibir esta enzima no hipotálamo, ou o MK-886 provavelmente não estaria ultrapassando a barreira hemato-encefálica. Entretanto, Paul *et al.* (PAUL, FRAIFELD *et al.*, 1999) demonstraram que, durante endotoxemia, a administração periférica de MK-886 foi capaz de bloquear o aumento dos LTs hipotalâmicos sugerindo que a droga ultrapassou a barreira hemato-encefálica.

Shimada e colaboradores (SHIMADA, SATOH *et al.*, 2005) sugeriram que a LTC<sub>4</sub> sintase estaria envolvida nas funções neurais vasopressinérgicas, uma vez que observaram que a LTC<sub>4</sub> sintase é seletivamente localizada nos neurônios vasopressinérgicos dos núcleos paraventricular e supra-ótico do hipotálamo. Portanto, correlacionando a redução da secreção de AVP com a redução da expressão de LTC<sub>4</sub> sintase no hipotálamo após a administração i.c.v. de MK-886, podemos sugerir que os leucotrienos centrais também são moduladores da secreção de AVP.

Em síntese, nossos resultados demonstraram que o modelo de CLP promove aumento da expressão de LTC<sub>4</sub> sintase hipotalâmica que deve estar

produzindo aumento de LTs. Isto associado com aumento de NO, citocinas e prostaglandinas leva a um extravasamento vascular promovendo hipovolemia, perda de proteínas plasmáticas na circulação, hipotensão e alta mortalidade. Além disso, a produção de LTs centrais pode estar afetando diretamente a secreção de AVP. Como resposta a esses efeitos, na fase inicial da sepse, há um aumento da concentração plasmática de AVP e diminuição da AVP neurohipofisária. O bloqueio da via central dos LTs não alterou a hipovolemia e o extravasamento de proteínas, mas reduziu o NO periférico e a expressão de LTC<sub>4</sub> sintase, abolindo a secreção de AVP e aumentando o conteúdo neurohipofisário na fase inicial, melhorando a sobrevida. Entretanto, o bloqueio da via sistêmica dos LTs reverteu a hipovolemia e a perda de proteínas, mas não alterou o NO e nem a sobrevida dos animais. Além disso, o mesmo tratamento reduziu a secreção de AVP aumentando o conteúdo neurohipofisário na fase inicial.

## *7. Conclusões*

- A sepse induzida por CLP promove baixo índice de sobrevivência que é melhorada com a administração i.c.v. de MK-886 sugerindo que os LTs centrais exercem um papel importante no agravamento do quadro clínico da doença.
- A sepse promove aumento da permeabilidade vascular caracterizado pela hipovolemia e diminuição de proteínas plasmáticas que são revertidas pela administração sistêmica de MK-886.
- A administração central de MK-886 reduziu o NO sugerindo que os LTs centrais induzem a produção de NO.
- A sepse promove um aumento de AVP plasmática e diminuição do conteúdo neurohipofisário de AVP que são revertidos tanto pela administração central de MK-886 quanto sistêmica sugerindo que a via dos LTs está envolvida na regulação da concentração plasmática de AVP durante a sepse.

## *8. Referências Bibliográficas*

AIURA, K., M. UEDA, *et al.* 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.

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Crit Care Med, v.20, n.6, Jun, p.864-74. 1992.

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

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

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

BAERTSCHI, A. J., P. VALLET, *et al.* Neural lobe of pituitary modulates corticotropin release in the rat. Endocrinology, v.106, n.3, Mar, p.878-82. 1980.

BAKER, C. C., I. H. CHAUDRY, *et al.* 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.

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

BAYLIS, P. H. e G. L. ROBERTSON. Rat vasopressin response to insulin-induced hypoglycemia. Endocrinology, v.107, n.6, Dec, p.1975-9. 1980.

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

BENJAMIM, C. F., J. S. SILVA, *et al.* Inhibition of leukocyte rolling by nitric oxide during sepsis leads to reduced migration of active microbicidal neutrophils. Infect Immun, v.70, n.7, Jul, p.3602-10. 2002.

BENJAMIM, C. F., C. CANETTI, *et al.* Opposing and hierarchical roles of leukotrienes in local innate immune versus vascular responses in a model of sepsis. J Immunol, v.174, n.3, Feb 1, p.1616-20. 2005.

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

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, *et al.* 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, *et al.* The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. Chest, v.101, n.6, Jun, p.1481-3. 1992.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, v.72, May 7, p.248-54. 1976.

BRACKETT, D. J., C. F. SCHAEFER, *et al.* Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. Circ Shock, v.17, n.4, p.273-84. 1985.

BRUN-BUISSON, C., F. DOYON, *et al.* Bacteremia and severe sepsis in adults: a multicenter prospective survey in ICUs and wards of 24 hospitals. French Bacteremia-Sepsis Study Group. Am J Respir Crit Care Med, v.154, n.3 Pt 1, Sep, p.617-24. 1996.

BURKA, J. F. e P. EYRE. A pharmacological study of SRS-A on the bovine cutaneous vasculature. Can J Physiol Pharmacol, v.55, n.4, Aug, p.904-8. 1977.

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

CANETTI, C. A., B. P. LEUNG, *et al.* IL-18 enhances collagen-induced arthritis by recruiting neutrophils via TNF-alpha and leukotriene B4. J Immunol, v.171, n.2, Jul 15, p.1009-15. 2003.

CARNIO, E. C., V. MORETO, *et al.* Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. Endocr Metab Immune Disord Drug Targets, v.6, n.2, Jun, p.137-42. 2006.

CHIKANZA, I. C., P. PETROU, *et al.* Perturbations of arginine vasopressin secretion during inflammatory stress. Pathophysiologic implications. Ann N Y Acad Sci, v.917, p.825-34. 2000.

CORREA, P. B., J. A. PANCOTO, *et al.* 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.

CROOKS, S. W. e R. A. STOCKLEY. Leukotriene B4. Int J Biochem Cell Biol, v.30, n.2, Feb, p.173-8. 1998.

CROSARA-ALBERTO, D. P., A. L. DARINI, *et al.* Involvement of NO in the failure of neutrophil migration in sepsis induced by *Staphylococcus aureus*. Br J Pharmacol, v.136, n.5, Jul, p.645-58. 2002.

CUNNINGHAM, E. T., JR. e P. E. SAWCHENKO. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. J Comp Neurol, v.274, n.1, Aug 1, p.60-76. 1988.

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

DADOUN, F., V. GUILLAUME, *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.

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

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

DUNN, F. L., T. J. BRENNAN, *et al.* The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. J Clin Invest, v.52, n.12, Dec, p.3212-9. 1973.

ECHTENACHER, B., M. A. FREUDENBERG, *et al.* Differences in innate defense mechanisms in endotoxemia and polymicrobial septic peritonitis. Infect Immun, v.69, n.12, Dec, p.7271-6. 2001.

ELY, E. W., D. C. ANGUS, *et al.* Drotrecogin alfa (activated) treatment of older patients with severe sepsis. Clin Infect Dis, v.37, n.2, Jul 15, p.187-95. 2003.

ENGBLOM, D., M. EK, *et al.* Prostaglandins as inflammatory messengers across the blood-brain barrier. J Mol Med, v.80, n.1, Jan, p.5-15. 2002.

FEIHL, F., B. WAEBER, *et al.* 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.

FEINMARK, S. J. Cooperative synthesis of leukotrienes by leukocytes and vascular cells. Ann N Y Acad Sci, v.524, p.122-32. 1988.

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

FOX, A. W., P. A. FRIEDMAN, *et al.* Vasopressin receptor mediated contraction and [3H]inositol metabolism in rat tail artery. Eur J Pharmacol, v.135, n.1, Mar 3, p.1-10. 1987.

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

GIUSTI-PAIVA, A., M. DE CASTRO, *et al.* 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, *et al.* 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.

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

GLAUSER, M. P., G. ZANETTI, *et al.* Septic shock: pathogenesis. Lancet, v.338, n.8769, Sep 21, p.732-6. 1991.

GOETZL, E. J. e W. C. PICKETT. The human PMN leukocyte chemotactic activity of complex hydroxy-eicosatetraenoic acids (HETEs). J Immunol, v.125, n.4, Oct, p.1789-91. 1980.

GOLDMAN, D. W., L. A. GIFFORD, *et al.* Molecular and cellular properties of human polymorphonuclear leukocyte receptors for leukotriene B4. Fed Proc, v.46, n.1, Jan, p.200-3. 1987.

GOULET, J. L., R. S. BYRUM, *et al.* Genetic factors determine the contribution of leukotrienes to acute inflammatory responses. J Immunol, v.164, n.9, May 1, p.4899-907. 2000.

GRINEVICH, V., X. M. MA, *et al.* 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.

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

HASHIMOTO, T., M. KIHARA, *et al.* Lipoxygenase products regulate nitric oxide and inducible nitric oxide synthase production in interleukin-1beta stimulated vascular smooth muscle cells. Hypertens Res, v.26, n.2, Feb, p.177-84. 2003.

HELLER, A., T. KOCH, *et al.* Lipid mediators in inflammatory disorders. Drugs, v.55, n.4, Apr, p.487-96. 1998.

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

HIRAMATSU, M., R. S. HOTCHKISS, *et al.* Cecal ligation and puncture (CLP) induces apoptosis in thymus, spleen, lung, and gut by an endotoxin and TNF-independent pathway. Shock, v.7, n.4, Apr, p.247-53. 1997.

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

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

HULTING, A. L., J. A. LINDGREN, *et al.* Leukotriene C4 as a mediator of luteinizing hormone release from rat anterior pituitary cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.82, n.11, Jun, p.3834-8. 1985.

JARD, S. Vasopressin: mechanisms of receptor activation. Prog Brain Res, v.60, p.383-94. 1983.

JOHNSON, A. K. e R. L. THUNHORST. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. Front Neuroendocrinol, v.18, n.3, Jul, p.292-353. 1997.

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

KADEKARO, M., J. Y. SUMMY-LONG, *et al.* Cerebral metabolic responses and vasopressin and oxytocin secretions during progressive water deprivation in rats. Am J Physiol, v.262, n.2 Pt 2, Feb, p.R310-7. 1992.

KAMOHARA, M., J. TAKASAKI, *et al.* Functional characterization of cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor on human coronary artery smooth muscle cells. Biochem Biophys Res Commun, v.287, n.5, Oct 12, p.1088-92. 2001.

KARIMA, R., S. MATSUMOTO, *et al.* The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. Mol Med Today, v.5, n.3, Mar, p.123-32. 1999.

KASTING, N. W., M. F. MAZUREK, *et al.* Endotoxin increases vasopressin release independently of known physiological stimuli. Am J Physiol, v.248, n.4 Pt 1, Apr, p.E420-4. 1985.

KASTING, N. W., W. L. VEALE, *et al.* Vasopressin may mediate febrile convulsions. Brain Res, v.213, n.2, Jun 1, p.327-33. 1981.

KOO, D. J., M. ZHOU, *et al.* 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.

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

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

LAEMMLI, U. K., F. BEGUIN, *et al.* A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. J Mol Biol, v.47, n.1, Jan 14, p.69-85. 1970.

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

LAM, B. K. e K. F. AUSTEN. Leukotriene C4 synthase: a pivotal enzyme in cellular biosynthesis of the cysteinyl leukotrienes. Prostaglandins Other Lipid Mediat, v.68-69, Aug, p.511-20. 2002.

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

LAMMERS, C. H., P. SCHWEITZER, *et al.* Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression and role in somatostatin signaling. J Neurochem, v.66, n.1, Jan, p.147-52. 1996.

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

LEFER, A. M. Leukotrienes as mediators of ischemia and shock. Biochem Pharmacol, v.35, n.2, Jan 15, p.123-7. 1986.

LEFER, A. M. Significance of lipid mediators in shock states. Circ Shock, v.27, n.1, Jan, p.3-12. 1989.

LENG, G., C. H. BROWN, *et al.* Physiological pathways regulating the activity of magnocellular neurosecretory cells. Prog Neurobiol, v.57, n.6, Apr, p.625-55. 1999.

LISKINA, E. B., V. V. GRINEVICH, *et al.* 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.

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

MARSHALL, L. A., R. H. HALL, *et al.* SB 203347, an inhibitor of 14 kDa phospholipase A2, alters human neutrophil arachidonic acid release and metabolism and prolongs survival in murine endotoxin shock. J Pharmacol Exp Ther, v.274, n.3, Sep, p.1254-62. 1995.

MASTORAKOS, G., J. S. WEBER, *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation and stimulation of systemic vasopressin secretion by recombinant interleukin-6 in humans: potential implications for the syndrome of inappropriate vasopressin secretion. J Clin Endocrinol Metab, v.79, n.4, Oct, p.934-9. 1994.

MATSUNAGA, W., S. MIYATA, *et al.* LPS-induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. Brain Res, v.858, n.1, Mar 6, p.9-18. 2000.

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

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

MEDEIROS, A. I., A. SA-NUNES, *et al.* Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. Infect Immun, v.72, n.3, Mar, p.1637-44. 2004.

MELLOR, E. A., A. MAEKAWA, *et al.* Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.14, Jul 3, p.7964-9. 2001.

MILLER, D. K., J. W. GILLARD, *et al.* Identification and isolation of a membrane protein necessary for leukotriene production. Nature, v.343, n.6255, Jan 18, p.278-81. 1990.

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

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

MONTANI, J. P., J. F. LIARD, *et al.* Hemodynamic effects of exogenous and endogenous vasopressin at low plasma concentrations in conscious dogs. Circ Res, v.47, n.3, Sep, p.346-55. 1980.

MORASSUTTI, D. J., W. A. STAINES, *et al.* Murine embryonal carcinoma-derived neurons survive and mature following transplantation into adult rat striatum. Neuroscience, v.58, n.4, Feb, p.753-63. 1994.

MORIEN, A., L. GARRARD, *et al.* Expression of Fos immunoreactivity in rat brain during dehydration: effect of duration and timing of water deprivation. Brain Res, v.816, n.1, Jan 16, p.1-7. 1999.

MORLION, B. J., E. TORWESTEN, *et al.* Cysteinyl-leukotriene generation as a biomarker for survival in the critically ill. Crit Care Med, v.28, n.11, Nov, p.3655-8. 2000.

NAITO, Y., J. FUKATA, *et al.* Effects of interleukins on plasma arginine vasopressin and oxytocin levels in conscious, freely moving rats. Biochem Biophys Res Commun, v.174, n.3, Feb 14, p.1189-95. 1991.

NEMZEK, J. A., H. Y. XIAO, *et al.* Humane endpoints in shock research. Shock, v.21, n.1, Jan, p.17-25. 2004.

OLIVEIRA, G. R., L. L. K. ELIAS, *et al.* Time course of nitric oxide formation and secretion of vasopressin and oxytocin in an experimental model of polymicrobial sepsis. The FASEB Journal, a multidisciplinary resource for the life sciences (Abstract), v.19, n.5, p.A1222. 2005.

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

PANCOTO, J. A. T. Estudo das alterações cardiovasculares e da secreção de vasopressina em sepse induzida por ligadura e perfuração cecal. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

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

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

PERES, C. M., L. DE PAULA, *et al.* Inhibition of leukotriene biosynthesis abrogates the host control of *Mycobacterium tuberculosis*. Microbes Infect, v.9, n.4, Apr, p.483-9. 2007.

PETTIPHER, E. R., E. D. SALTER, *et al.* Specific inhibition of leukotriene B4 (LTB4)-induced neutrophil emigration by 20-hydroxy LTB4: implications for the regulation of inflammatory responses. Br J Pharmacol, v.110, n.1, Sep, p.423-7. 1993.

RIEDEMANN, N. C., R. F. GUO, *et al.* The enigma of sepsis. J Clin Invest, v.112, n.4, Aug, p.460-7. 2003.

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

ROCHA, M. J., Y. CHEN, *et al.* Physiological regulation of brain angiotensin receptor mRNA in AT1a deficient mice. Exp Neurol, v.195, n.1, Sep, p.229-35. 2005.

ROWE, J. W., R. L. SHELTON, *et al.* Influence of the emetic reflex on vasopressin release in man. Kidney Int, v.16, n.6, Dec, p.729-35. 1979.

SALKOWSKI, C. A., G. DETORE, *et al.* 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.

SANDS, K. E., D. W. BATES, *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.

SCHRODER, O., M. SJOSTROM, *et al.* Microsomal glutathione S-transferases: selective up-regulation of leukotriene C4 synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis. Cell Mol Life Sci, v.62, n.1, Jan, p.87-94. 2005.

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

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

SHIMADA, A., M. SATOH, *et al.* Highly selective localization of leukotriene C4 synthase in hypothalamic and extrahypothalamic vasopressin systems of mouse brain. Neuroscience, v.131, n.3, p.683-9. 2005.

SILVA, E., A. PEDRO MDE, *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). Crit Care, v.8, n.4, Aug, p.R251-60. 2004.

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

SMEDEGARD, G., P. HEDQVIST, *et al.* Leukotriene C4 affects pulmonary and cardiovascular dynamics in monkey. Nature, v.295, n.5847, Jan 28, p.327-9. 1982.

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

SPRINGER, J. E., E. ROBBINS, *et al.* Localization of nerve growth factor receptor mRNA in the rat basal forebrain with in situ hybridization histochemistry. Cell Mol Neurobiol, v.10, n.1, Mar, p.33-9. 1990.

TALVANI, A., F. S. MACHADO, *et al.* Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. Infect Immun, v.70, n.8, Aug, p.4247-53. 2002.

THIBONNIER, M., D. M. CONARTY, *et al.* Human vascular endothelial cells express oxytocin receptors. Endocrinology, v.140, n.3, Mar, p.1301-9. 1999.

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

TORRES-DUENAS, D., C. F. BENJAMIM, *et al.* 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.

TRAN, H. S., J. V. QUINN, *et al.* The cardiovascular hemodynamics and leukotriene kinetics during prostacyclin and anti-prostacyclin antibody infusions in septic shock. Shock, v.13, n.6, Jun, p.478-84. 2000.

VENTURA, R. R., A. GIUSTI-PAIVA, *et al.* 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, *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.

WALLEY, K. R., N. W. LUKACS, *et al.* 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. e 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.

WESTPHAL, M., H. FREISE, *et al.* 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, *et al.* 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, *et al.* Vasopressin release during sepsis and septic shock in baboons and dogs. Surg Gynecol Obstet, v.153, n.6, Dec, p.869-72. 1981.

WOLFE, L. S. Eicosanoids: prostaglandins, thromboxanes, leukotrienes, and other derivatives of carbon-20 unsaturated fatty acids. J Neurochem, v.38, n.1, Jan, p.1-14. 1982.

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

XIA, Y. e 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.

YASIN, S., A. COSTA, *et al.* Nitric oxide modulates the release of vasopressin from rat hypothalamic explants. Endocrinology, v.133, n.3, Sep, p.1466-9. 1993.

YOKOMIZO, T., T. IZUMI, *et al.* Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. Arch Biochem Biophys, v.385, n.2, Jan 15, p.231-41. 2001.

ZELAZOWSKI, P., V. K. PATCHEV, *et al.* Release of hypothalamic corticotropin-releasing hormone and arginine-vasopressin by interleukin 1 beta and alpha MSH: studies in rats with different susceptibility to inflammatory disease. Brain Res, v.631, n.1, Dec 17, p.22-6. 1993.

*Anexo I – Tabelas de valores*

**Tabela 1.** Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sobre a concentração plasmática de vasopressina. Média (M), erro padrão da média (EPM) e  $n$  dos grupos representados na Figura 1.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO		MK-886 (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				MK-886 (1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				MK-886 (2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$
4	0,8 $\pm$ 0,2	6	5,9 $\pm$ 0,5	6	0,6 $\pm$ 0,1	6	2,2 $\pm$ 0,5	6	0,9 $\pm$ 0,2	6	1,2 $\pm$ 0,1	6	0,6 $\pm$ 0,1	6	0,9 $\pm$ 0,1	6
6	0,7 $\pm$ 0,1	6	2,2 $\pm$ 0,5	6	0,9 $\pm$ 0,1	6	1,5 $\pm$ 0,3	6	0,5 $\pm$ 0,1	6	1,0 $\pm$ 0,1	6	1,0 $\pm$ 0,2	6	0,8 $\pm$ 0,2	6

**Tabela 2.** Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sobre a concentração neurohipofisária de vasopressina. Média (M), erro padrão da média (EPM) e  $n$  dos grupos representados na Figura 2.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO		MK-886 (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				MK-886 (1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				MK-886 (2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )					
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$
4	7,3 $\pm$ 0,5	6	4,7 $\pm$ 0,8	6	6,1 $\pm$ 0,3	6	4,8 $\pm$ 0,2	6	6,5 $\pm$ 0,7	6	5,5 $\pm$ 0,6	6	6,3 $\pm$ 1,2	6	6,8 $\pm$ 0,5	6
6	7,3 $\pm$ 0,2	6	1,8 $\pm$ 0,2	6	6,5 $\pm$ 0,4	6	2,9 $\pm$ 0,4	6	5,5 $\pm$ 0,8	6	5,3 $\pm$ 0,4	6	5,6 $\pm$ 0,8	6	6,7 $\pm$ 0,7	6

**Tabela 3.** Efeito da administração i.c.v. de MK-886 nas doses 0.5, 1.0 ou 2.0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sobre o nitrato sérico. Média (M), erro padrão da média (EPM) e  $n$  dos grupos representados na Figura 3.

Tempo (h)	Grupos															
	DMSO				MK-886 (0,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				MK-886 (1,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )				MK-886 (2,0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ )			
	OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP		OF		CLP	
	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$	M $\pm$ EPM	$n$
<b>4</b>	30,7 $\pm$ 4,9	6	69,4 $\pm$ 8,1	5	25,8 $\pm$ 3,7	6	55,3 $\pm$ 6,7	6	34,0 $\pm$ 4,1	6	41,9 $\pm$ 1,9	6	27,2 $\pm$ 0,6	5	32,2 $\pm$ 2,0	6
<b>6</b>	26,3 $\pm$ 3,4	5	129,0 $\pm$ 15,1	5	28,4 $\pm$ 3,5	6	76,8 $\pm$ 8,6	6	22,1 $\pm$ 1,9	6	61,1 $\pm$ 8,1	5	30,1 $\pm$ 2,3	6	48,4 $\pm$ 4,7	6

**Tabela 4.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o hematócrito. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na Figura 5.

### A

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	44,7 ± 0,6	6	45,62 ± 0,6	5	44,5 ± 0,6	6	44,2 ± 1,0	5
4	45,2 ± 0,8	6	52,7 ± 0,2	6	45,0 ± 0,6	6	50,7 ± 0,9	6
6	45,6 ± 0,9	5	50,4 ± 1,6	5	46,3 ± 0,9	6	49,0 ± 1,5	5
18	43,3 ± 0,9	5	48,8 ± 1,5	5	45,3 ± 0,6	5	47,4 ± 1,5	5
24	44,3 ± 0,7	6	45,6 ± 0,8	6	46,0 ± 1,2	6	47,4 ± 0,9	6

### B

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	45,8 ± 1,1	6	47,7 ± 1,1	6	44,3 ± 0,5	6	45,2 ± 1,0	5
4	48,2 ± 2,2	6	56,0 ± 1,9	6	45,5 ± 0,8	6	50,0 ± 1,1	5
6	47,5 ± 0,8	6	51,7 ± 0,9	6	46,8 ± 0,2	5	47,8 ± 1,2	6
18	45,7 ± 1,3	6	48,0 ± 1,6	6	44,0 ± 0,6	6	46,4 ± 1,1	5
24	44,3 ± 2,3	6	45,8 ± 0,9	6	45,7 ± 2,0	5	46,2 ± 0,7	5

**Tabela 5.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o sódio sérico. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na Figura 6.

### A

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	133,5 ± 1,4	6	132,0 ± 2,8	6	134,7 ± 0,8	6	134,4 ± 1,8	6
4	138,4 ± 3,1	6	135,5 ± 1,5	6	139,4 ± 0,2	5	137,6 ± 1,0	5
6	140,8 ± 2,1	5	137,8 ± 2,1	6	141,6 ± 1,6	5	137,8 ± 3,2	5
18	140,0 ± 3,6	5	135,4 ± 2,9	5	141,6 ± 2,1	6	137,3 ± 4,2	5
24	133,4 ± 1,4	5	131,3 ± 2,5	5	136,0 ± 1,2	6	135,8 ± 2,4	6

### B

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	135,0 ± 3,4	5	139,8 ± 2,9	5	137,8 ± 1,9	5	142,3 ± 1,1	6
4	143,0 ± 1,8	5	144,8 ± 2,6	5	140,2 ± 2,2	6	138,8 ± 1,4	6
6	144,8 ± 2,0	6	142,5 ± 2,3	6	139,8 ± 2,7	6	141,6 ± 4,4	5
18	142,3 ± 1,7	5	143,2 ± 4,8	5	139,0 ± 0,7	6	138,7 ± 1,1	6
24	133,8 ± 1,8	6	135,5 ± 1,7	6	139,5 ± 0,5	6	135,3 ± 1,6	6

**Tabela 6.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a osmolalidade plasmática. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na Figura 7.

### A

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	277,8 ± 1,7	5	282,4 ± 2,3	5	276,0 ± 2,3	6	280,2 ± 2,9	6
4	276,2 ± 1,5	6	279,2 ± 1,8	5	277,3 ± 2,2	6	280,5 ± 1,4	5
6	275,8 ± 1,4	5	273,4 ± 2,2	6	274,8 ± 2,6	5	276,4 ± 3,8	6
18	269,3 ± 3,1	5	263,6 ± 2,8	5	271,2 ± 5,1	5	262,3 ± 2,1	6
24	275,0 ± 4,4	5	268,2 ± 2,1	6	268,2 ± 2,3	5	265,0 ± 2,6	5

### B

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	273,5 ± 2,1	6	281,6 ± 1,4	5	276,8 ± 1,7	5	277,0 ± 3,0	6
4	273,4 ± 4,4	5	277,3 ± 1,1	6	275,6 ± 3,6	5	277,5 ± 2,4	6
6	272,0 ± 3,0	6	271,6 ± 2,0	5	277,2 ± 2,1	6	277,8 ± 1,3	5
18	267,8 ± 1,5	6	263,2 ± 2,3	6	272,2 ± 2,2	6	260,8 ± 3,1	6
24	267,2 ± 4,5	5	257,4 ± 5,4	5	265,2 ± 3,9	6	258,8 ± 3,4	6

**Tabela 7.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre as proteínas plasmáticas. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na Figura 8.

### A

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	5,2 ± 0,1	5	5,1 ± 0,2	6	5,5 ± 0,1	6	5,4 ± 0,1	5
4	4,7 ± 0,1	5	4,2 ± 0,1	5	4,8 ± 0,2	6	4,3 ± 0,2	5
6	4,9 ± 0,1	5	4,3 ± 0,1	6	4,8 ± 0,2	6	4,2 ± 0,1	6
18	5,1 ± 0,2	5	4,5 ± 0,2	5	4,9 ± 0,1	6	4,3 ± 0,2	6
24	4,9 ± 0,1	5	4,4 ± 0,2	5	5,3 ± 0,4	6	4,8 ± 0,1	5

### B

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	5,3 ± 0,1	5	5,1 ± 0,1	5	4,9 ± 0,1	6	5,1 ± 0,1	5
4	4,7 ± 0,1	6	4,2 ± 0,1	6	4,7 ± 0,2	5	4,5 ± 0,1	6
6	4,5 ± 0,1	6	4,1 ± 0,1	6	4,6 ± 0,1	6	4,4 ± 0,1	5
18	4,8 ± 0,1	6	4,4 ± 0,1	6	4,8 ± 0,1	6	4,5 ± 0,1	5
24	4,7 ± 0,1	5	4,4 ± 0,1	5	4,9 ± 0,1	5	4,5 ± 0,1	5

**Tabela 8.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o nitrato sérico. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na Figura 9.

### A

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	28,7 ± 3,4	6	20,0 ± 1,8	6	24,2 ± 2,2	6	25,0 ± 3,8	6
4	32,3 ± 5,5	6	69,4 ± 8,1	5	27,9 ± 0,5	6	41,9 ± 1,9	6
6	26,3 ± 3,4	5	122,9 ± 5,9	5	22,1 ± 1,9	6	76,1 ± 6,0	5
18	35,8 ± 4,4	6	151,3 ± 11,0	6	24,6 ± 2,1	6	111,1 ± 5,8	6
24	31,7 ± 5,5	6	206,4 ± 24,2	5	24,4 ± 1,7	6	141,7 ± 8,0	6

### B

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	22,5 ± 4,6	5	20,0 ± 1,8	6	30,1 ± 4,6	5	33,8 ± 1,1	5
4	19,4 ± 2,8	6	58,8 ± 9,9	6	26,5 ± 1,9	6	68,0 ± 7,0	5
6	26,3 ± 2,9	6	117,7 ± 14,1	6	29,4 ± 3,0	6	115,1 ± 14,9	6
18	24,0 ± 2,2	6	147,7 ± 12,3	6	30,2 ± 3,1	6	152,6 ± 12,9	6
24	18,2 ± 3,0	6	206,4 ± 24,2	5	27,0 ± 0,9	6	234,6 ± 8,1	6

**Tabela 9.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a concentração plasmática de vasopressina. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na Figura 10.

### A

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	0,7 ± 0,1	6	1,0 ± 0,1	6	0,8 ± 0,1	6	1,0 ± 0,1	5
4	0,8 ± 0,2	6	5,9 ± 0,5	5	0,9 ± 0,2	6	0,7 ± 0,3	5
6	0,7 ± 0,1	6	2,2 ± 0,5	5	0,5 ± 0,1	6	1,0 ± 0,1	5
18	0,5 ± 0,1	6	1,3 ± 0,3	6	0,5 ± 0,1	6	0,6 ± 0,1	6
24	0,7 ± 0,1	6	0,9 ± 0,1	5	0,5 ± 0,1	6	0,5 ± 0,1	6

### B

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	0,9 ± 0,1	6	0,8 ± 0,1	6	0,9 ± 0,2	6	0,8 ± 0,1	6
4	1,0 ± 0,3	6	6,1 ± 0,7	6	0,9 ± 0,2	6	2,8 ± 0,2	6
6	0,8 ± 0,1	6	2,3 ± 0,3	6	0,5 ± 0,1	6	1,6 ± 0,4	6
18	0,5 ± 0,1	6	1,4 ± 0,2	6	0,6 ± 0,1	6	0,8 ± 0,1	6
24	0,5 ± 0,1	6	1,2 ± 0,3	6	0,9 ± 0,1	6	0,8 ± 0,2	6

**Tabela 10.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre a concentração neurohipofisária de vasopressina. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na Figura 11.

### A

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	8,1 ± 0,9	5	6,6 ± 0,6	5	7,0 ± 0,8	6	7,3 ± 0,5	5
4	7,3 ± 0,5	5	4,4 ± 0,7	6	6,9 ± 0,7	5	5,5 ± 0,6	5
6	7,3 ± 0,2	5	1,7 ± 0,3	5	6,5 ± 0,4	6	4,7 ± 0,4	5
18	7,6 ± 0,2	5	4,0 ± 0,6	6	6,8 ± 0,6	6	5,5 ± 0,4	6
24	8,0 ± 0,6	5	7,1 ± 1,1	5	6,9 ± 0,5	6	7,2 ± 0,5	6

### B

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	8,2 ± 1,0	6	7,3 ± 0,5	6	7,1 ± 0,3	6	6,8 ± 0,5	6
4	8,1 ± 0,8	6	5,9 ± 0,4	6	7,3 ± 0,3	6	6,7 ± 0,3	6
6	7,5 ± 0,3	6	2,9 ± 0,1	6	6,8 ± 0,7	6	5,1 ± 0,2	6
18	8,0 ± 1,1	6	4,7 ± 0,4	6	6,7 ± 0,5	6	6,2 ± 0,5	6
24	7,3 ± 0,7	6	6,3 ± 0,7	6	6,7 ± 0,5	6	6,9 ± 0,2	6

**Tabela 11.** Efeito da administração central (A) e sistêmica (B) de MK-886 sobre o conteúdo de LTC<sub>4</sub> sintase. Média (M), erro padrão da média (EPM) e *n* dos grupos representados na Figura 12.

### A

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	33,6 ± 2,5	4	48,0 ± 4,4	4	32,7 ± 3,4	4	37,2 ± 7,9	4
4	20,5 ± 6,3	4	68,2 ± 8,5	4	27,9 ± 1,0	4	25,1 ± 8,3	4
6	26,6 ± 3,9	4	22,3 ± 5,0	4	23,7 ± 1,1	4	26,2 ± 4,9	4

### B

Tempo (h)	Grupos							
	OF + DMSO 5%		CLP + DMSO 5%		OF + MK-886		CLP + MK-886	
	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>	M ± EPM	<i>n</i>
0	29,0 ± 5,2	4	38,2 ± 6,3	4	24,3 ± 5,1	4	29,6 ± 6,1	4
4	24,4 ± 4,1	4	74,1 ± 3,7	4	26,4 ± 3,4	4	75,2 ± 9,4	4
6	30,7 ± 3,8	4	29,5 ± 3,6	4	38,0 ± 6,7	4	36,1 ± 7,8	4