

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Fisiologia

Efeito da exposição neonatal ao  
lipopolissacarídeo sobre a hipotensão, síntese de  
óxido nítrico e vasopressina plasmática durante o  
choque endotoxêmico experimental

Dalize Maria Squebola

Ribeirão Preto  
2008

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Fisiologia

**Efeito da exposição neonatal ao lipopolissacarídeo  
sobre a hipotensão, síntese de óxido nítrico e  
vasopressina plasmática durante o choque  
endotoxêmico**

Dalize Maria Squebola

**Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Departamento de Fisiologia da Faculdade  
de Medicina de Ribeirão Preto da  
Universidade de São Paulo para obtenção  
do título de mestre em Fisiologia**

Orientadora: Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio

Ribeirão Preto

2008

## Ficha Catalográfica

Squebola, Dalize Maria

Efeito da exposição neonatal ao lipopolissacarídeo sobre a hipotensão, síntese de óxido nítrico e vasopressina plasmática durante o choque endotoxêmico. Ribeirão Preto, 2008. 75p.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de concentração : Fisiologia

Orientadora: Profa. Dra Cárnio, Evelin Capellari.

1. LPS; 2. Exposição Neonatal; 3. Óxido Nítrico; 4. Pressão Arterial Média; 5. Vasopressina

## **Dedicatória**

Aos meus pais **Júlio e Dalva**, obrigada pelo apoio e amor incondicional.

Ao meu amor **Marcos**, pelo companheirismo, pelo amor e por ser tão presente na minha vida.

## **Agradecimento Especial**

Á minha querida orientadora **Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio** pela oportunidade de aprender ao seu lado, pela formação profissional, pela dedicação, pelos ensinamentos éticos, sérios e encantadores da ciência desde a iniciação científica e que permanecerão comigo durante toda a minha carreira e pela amizade que levarei por toda a minha vida.

## **Agradecimentos**

Aos meus pais, **Dalva e Júlio**, que por toda minha vida me deram apoio e incentivo para lutar na busca dos meus ideais.

Ao meu noivo **Marcos** por todo amor, apoio, dedicação e incentivo por sempre estar ao meu lado tanto nos momentos bons quanto ruins. Meu eterno amor e agradecimento.

As minhas irmãs **Bruna e Thainá** pela presença constante em todos os momentos da minha vida. Muito obrigada!

Aos meus avós **Ilídio, Elza e Joana** por fazerem parte da minha vida.

As minhas tias **Maria Lúcia (Gú) e Darci** pelas palavras de apoio sempre.

Ao meu “primo-sobrinho” **Vinícius** pela grande alegria que trouxe as nossas vidas.

Aos meus amigos do laboratório **Angelita, Marcelo, Rafael, Juliana e Viviana** que durante esses cinco anos foram muito mais que simples colegas de trabalho, mas sim grandes amigos. Em especial a **Vi** pelo apoio e companheirismo quando eu mais precisei.

A **Juliana Zanetti** pela grande ajuda com os animais neonatos, e também com os experimentos, pelas excelentes habilidades técnicas, e, por sempre me acompanhar na busca de ratas prenhas no biotério. E, ao **Marcelo Batalhão** pela amizade e também por suas excelentes habilidades técnicas. Muito obrigada por tudo.

Ao **Prof. Dr. Celso Rodrigues Franci** e **Profa. Dra. Glória Emília Petto de Souza** pelas sugestões e julgamento desse trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Antunes Rodrigues**, pelas dosagens hormonais realizadas em seu laboratório.

A **Marina** e **Valci** pelo auxílio na realização do radioimunoensaio.

Ao pessoal da secretaria do departamento de Fisiologia da FMRP/USP, **Elisa, Claudia, Fernando e Carlos** pelo apoio administrativo e amizade.

A CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos animais de experimentação.

A todos aqueles que me ajudaram e que por falha esqueci de citar. Obrigada.

## **Sumário**

<b>Resumo</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	3
<b>Introdução</b>	
1. Endotoxemia e Choque Endotoxêmico .....	5
2. Lipopolissacarídeo .....	8
3. Estresse Neonatal e resposta imune em adultos .....	13
4. Vasopressina.....	15
5. AVP e LPS .....	19
6. Óxido Nítrico.....	20
<b>Objetivos</b> .....	25
<b>Materiais e Métodos</b>	
1. Animais.....	26
2. Drogas utilizadas.....	26
3. Anestesia Geral.....	26
4. Dosagem hormonal .....	27
5. Determinação indireta de NO plasmático pela de dosagem de nitrato.....	28
6. Determinação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca .....	29
7. Determinação da Temperatura Corporal.....	30
8. Análise Estatística .....	30
9. Protocolos Experimentais.....	32
<b>Resultados</b>	
A- Efeitos da administração de LPS na fase adulta .....	36
B- Efeito da administração de LPS na fase neonatal durante o choque endotoxêmico.....	40

## **Discussão**

1. AVP e choque endotoxêmico .....	48
2. NO e Hipotensão durante o choque endotoxêmico experimental .....	53
3. Temperatura corporal e choque endotoxêmico .....	56
<b>Conclusões</b> .....	61
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	62

**Resumo**

Sepse e sua complicação mais comum o choque séptico é um fenômeno geralmente induzido pela ação de endotoxinas. A presença de microorganismos patogênicos e de suas toxinas na circulação sanguínea provoca uma produção excessiva de mediadores, como citocinas e o óxido nítrico (NO). Estudos recentes têm verificado que a administração única de lipopolissacarídeo (LPS), um componente da membrana externa de bactérias gram-negativas durante o período neonatal, levam a ativação do sistema endócrino, principalmente do eixo hipotálamo-hipófise.

Este estímulo com LPS, durante o período neonatal, leva a uma espécie de mudança “programada” nas concentrações de fatores pró-inflamatórios quando esses animais entram novamente em contato com produtos bacterianos.

O presente estudo teve como objetivo avaliar se a exposição neonatal ao LPS leva a alterações nas concentrações plasmáticas de AVP durante o choque endotoxêmico experimental.

Ratos *Wistar* foram expostos ao LPS (100 µg/kg) com 14 dias de vida (período neonatal) e após 60 a 75 dias de vida sofreram uma outra administração de LPS (10 mg/kg). A administração intraperitoneal de LPS provocou uma queda significativa da pressão arterial, aumento da frequência cardíaca, aumento das concentrações de nitrato plasmático e diminuição da temperatura corporal nas primeiras duas horas após a administração de LPS, seguido de um aumento desta, a partir da terceira hora após a administração de LPS. Nos animais endotoxêmicos observamos um aumento da concentração plasmática de AVP na segunda hora após a administração de LPS. Após esse período as concentrações de AVP diminuem, retornando a valores basais na sexta hora após a administração de LPS. A exposição neonatal ao LPS atenuou a hipotensão e a

febre induzida pelo LPS. Ao mesmo tempo elevou as concentrações plasmáticas de AVP e atenuou a síntese exacerbada de NO.

Esses resultados sugerem que a exposição ao LPS no período neonatal pode alterar o desenvolvimento de sistemas neurais modulando a liberação de AVP e síntese de NO, que conseqüentemente atenuou a hipotensão e a febre induzida pelo choque endotoxêmico.

## **Abstract**

---

Administration of the bacterial cell wall component, lipopolysaccharide (LPS), stimulates the immune and endocrine systems inducing an acute phase of sickness and stress responses in adult and neonatal rats. Neonatal LPS exposure has been shown to alter many aspects of adult physiology, including neuroendocrine, neurochemical and febrile responses, controlling the inflammatory mechanisms.

The aim of this study is to evaluate the effects of immune system activation at postnatal period to either a saline or lipopolysaccharide (LPS, 100 microg/kg ip) on plasma vasopressin (AVP) and nitrate concentration, mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and body temperature (BT) and examined them in adulthood during vasodilatory shock-like conditions induced by administration of high doses of lipopolysaccharide (LPS, 10 mg/kg ip).

After the adult animals have been neonatally exposed to low doses of LPS (100µg/kg i.p), polyethylene catheters were surgically implanted into the femoral vein and endotoxemic shock was induced by intraperitoneal (i.p.) injection of 10 mg/kg of LPS.

LPS administration induced a significant decrease in MAP with a concomitant increase in heart rate, a significant increase in nitrate and a transitory increase in AVP plasma concentration in animals that were not exposed neonatally to LPS. When animals were submitted to the neonatal immune challenge with LPS, we observed a sustained increase in plasma AVP concentration, attenuation in the drop of MAP and a decrease in nitrate plasma concentration.

In conclusion, neonatal, but not later, exposure to LPS produces attenuation in hypotension induced by the endotoxemic shock-like conditions and this response may involve the nitric oxide synthesis and AVP release.

# **Introdução**

## 1. Endotoxemia e Choque Endotoxêmico

Em 1879-80, Louis Pasteur mostrou pela primeira vez que bactérias estavam presentes no sangue de pacientes com endotoxemia puerperal. Uma mulher sobreviveu, e, surgiu deste o primeiro relato de que endotoxemia seria uma resposta sistêmica na luta contra patógenos (Annane e cols, 2005).

Mas somente em 1991 em uma conferência de consenso realizada pelo *American College of Chest Physicians e a Society of Critical Care Medicine* definiu endotoxemia como sendo uma resposta inflamatória sistêmica à infecção e choque endotoxêmico como sendo o quadro de endotoxemia acompanhado por hipotensão (Conference American College of Chest Physicians, 1992).

Nos Estados Unidos a incidência de endotoxemia vem aumentando a cada ano. Estimam-se proporções de 50-95 casos por 100.000 habitantes com aumento em 9% a cada ano. Esta doença acomete 2% das admissões hospitalares, destas, 9% dos pacientes progridem para endotoxemia severa e 3% dos pacientes com endotoxemia severa progridem para o choque endotoxêmico. Nas unidades de terapia intensiva esses dados são ainda maiores, 10% de todas as admissões hospitalares (Annane e cols, 2005). No Brasil a endotoxemia é considerada o maior problema de saúde pública em unidades de terapia intensiva. Os principais fatores para a incidência alta da endotoxemia são o número grande de procedimentos invasivos realizados nestas unidades, tais como cateteres venosos centrais, ventilação mecânica e cateteres urinários (Silva e cols, 2004).

A presença de microorganismos patogênicos e de suas toxinas na circulação sanguínea provoca uma produção excessiva de mediadores inflamatórios tais como citocinas e ativação de mecanismos que podem em casos

extremos, levar a um descontrole sistêmico, o choque endotoxêmico. Este constitui um paradigma da inflamação corporal aguda, levando a um grande prejuízo no endotélio capilar, um suprimento inadequado de oxigênio nos tecidos e uma queda grande da pressão arterial. Essa hipotensão leva a óbito aproximadamente 50% dos casos, com evolução para falência múltipla de órgãos (Karima e cols, 1999).

Durante o choque endotoxêmico observa-se taquicardia, bem como, hipermetabolismo sistêmico, consumo elevado de oxigênio, coagulação vascular disseminada, hipoperfusão sistêmica, fraqueza, letargia e outros (Boné, 1991; Tliteradge, 1999; Perotti e cols, 1999; Dantzer, 2001; Shan e cols, 2000; Thijs, 1995).

É sabido, que a febre é o sinal termorregulatório mais comum na endotoxemia, mas a hipotermia pode também ocorrer (Giusti-Paiva e cols, 2003).

Romanovsky e colaboradores demonstraram os mecanismos da hipotermia durante o choque endotoxêmico experimental. Eles concluíram que a hipotermia associada ao choque pode resultar de uma diminuição da produção de calor, juntamente com a procura por ambientes mais frios, sugerindo que durante o choque endotoxêmico a hipotermia constitui uma resposta adaptativa (Romanovsky e cols, 1996). Além disso, durante esta fase observa-se uma diminuição do consumo de oxigênio havendo um deslocamento da curva de oxihemoglobina com melhora no transporte de oxigênio para o pulmão, e, diminuição da ventilação pulmonar. Entretanto, tem-se observado que a hipotermia ocorre no estado crítico do choque e pode agravar o prognóstico do paciente, pois essa temperatura pode oferecer condições favoráveis ao crescimento e multiplicação de microorganismos. Tal fato justifica-se, porque em altas temperaturas, como no

caso da febre, ocorre aumento da proliferação de células do sistema imune, prejudicando o crescimento e proliferação de muitos microorganismos patogênicos, bem como uma redução das concentrações de ferro e zinco do plasma, diminuindo a disponibilidade desses elementos que são vitais para o crescimento e multiplicação de microorganismos (Dantzer, 2001).

Pacientes com choque endotoxêmico desenvolvem intensa vasodilatação periférica arteriolar (hipotensão), a qual é resistente a agentes vasoconstritores (vasoplegia). Essa queda da resistência vascular periférica pode estar associada à disfunção cardíaca caracterizada por depressão sistólica, taquicardia, índice cardíaco normal ou aumentado, aumento da complacência ventricular e prejuízo da contratilidade do miocárdio (Ognibene e cols, 1988).

Qualquer microorganismo pode causar endotoxemia ou choque endotoxêmico tais como bactérias, vírus, fungos, protozoários, porém as bactérias são os agentes etiológicos mais comuns. Metade de todos os casos de endotoxemia é causada por bactérias Gram-negativas e metade é associada a bactérias Gram-positivas. Cerca de 50 a 60% dos casos de choque endotoxêmico são causados por bactérias gram-negativas, 5 a 10% por bactérias gram-positivas e infecções por fungos (Thiermermann, 1999; Rangel-Frausto, 2005).

Quando a infecção ocorre, a primeira linha de defesa do hospedeiro é realizada por células fagocitárias (macrófagos, monócitos e granulócitos polimorfonucleares) agindo de maneira não específica (Thiermamann, 1999).

Os componentes da parede bacteriana são os principais ativadores da resposta do hospedeiro frente as endotoxinas. O lipopolissacarídeo (LPS), um componente da parede externa da bactéria Gram-negativa e o ácido teicóico das bactérias Gram-positivas, ativam uma intensa cascata inflamatória, onde há

liberação de citocinas como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ), liberação de mediadores gasosos, quimiotaxia e ativação de granulócitos (Thiermaman, 1999 e Thijs, 1995).

Atualmente para mimetizar os sintomas clínicos da endotoxemia e choque endotoxêmico tem-se utilizado experimentalmente o lipopolissacarídeo (LPS) (Boné, 1994; Giusti-Paiva e cols, 2002).

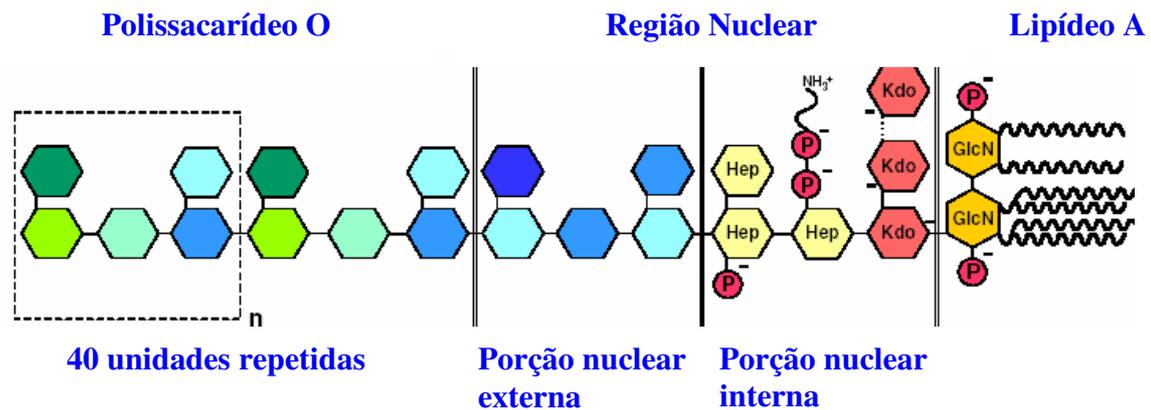
## 2. Lipopolissacarídeo

Há mais de um século atrás, Richard Pfeiffer (1858- 1910) descobriu que a lise bacteriana do agente infeccioso que causava cólera provocava choque tóxico em porcos. Ele postulou que a porção que desencadeava toxicidade estava localizada na porção interna (endo) da célula bacteriana e nomeou de endotoxina, distinguindo-a das várias exotoxinas conhecidas da bactéria *Vibrio Cholerae*. Depois disso, um médico americano William B. Coley (1862-1936), trabalhando em um hospital em Nova York, iniciou o tratamento de pacientes que sofriam de câncer com injeções de toxinas de bactérias gram-negativas (*Serratia marcescens*) e gram-positivas (*Streptococcus*), e se tornou a conhecida toxina Coley durante as seguintes três décadas. Esta terapia de vacinas liderou para a completa remissão de tumores sem recidiva por um período de mais ou menos cinco anos. Para os pacientes, entretanto, ocorreram vários efeitos em virtude das injeções dessas toxinas, como febre e reações de choque tóxico (Alexander e cols, 2001).

Uma combinação similar de efeitos pirogênicos e tóxicos, mas também de estimulação da resistência do sistema imune foi observado em Munique na Alemanha por Hans Buchner durante a administração de extratos bacterianos, em modelos de animais de experimentação, no qual desenvolveram febre, alterações na contagem de leucócitos e uma elevada e não específica resistência a infecções bacterianas (Alexander e cols, 2001).

Hoje, sabe-se que os efeitos biológicos de preparados bacterianos usados nesses estudos foram devidos preferencialmente à classe de substâncias que é denominada lipopolissacarídeo (LPS) baseado na sua constituição química (Alexander e cols, 2001).

O LPS possui três porções: o lipídio A, considerado a parte inicial da molécula e a sua porção tóxica, sendo a principal porção responsável pelas propriedades pró-inflamatórias do LPS, formado principalmente de açúcares (glicosamina) ligado a fosfatos e longas cadeias de ácidos graxos cada uma com cerca de 14 átomos de carbono; o polissacarídeo O, uma cadeia variável situada na superfície externa da molécula, que é o responsável por mudanças conformacionais da bactéria gram-negativas; e a terceira porção também conhecida como região nuclear que liga as porções interna e externa da molécula, sendo a porção de LPS reconhecida pelos anticorpos (Raetz, 1991) (Fig. 1).



**Figura 1:** Estrutura química do LPS. (Adaptado de Alexander e cols, 2001).

Devido a sua natureza anfipática, existe uma tendência para esta molécula formar micelas na corrente sanguínea (Chaby, 1999; Yu, 1997). Liga-se inicialmente às lipoproteínas de alta densidade (HDL), até que ocorra aumento da produção de proteínas ligadoras de LPS (LBP-“LPS binding protein”) pelo fígado (Wurfell e cols, 1995; Kitchens e cols, 1999; Mathison JC, 1992) quando ocorre a transferência do LPS da lipoproteína para a LBP ou para a superfície das células imunológicas (Kitchens e cols, 1999). A LBP apresenta alta afinidade para ligar-se ao LPS, dissociando o agregado de LPS, o que resulta na formação do complexo LPS-LBP (Schumann e cols, 1990; Heumann e cols, 1990). Este complexo é reconhecido pelo receptor CD14, uma glicoproteína presente na membrana de células mielóides, que se acreditava ser o mais importante receptor para o início da cascata de sinalização em resposta ao LPS. Porém, o CD14 não possui uma porção intracelular, e também concentrações altas de LPS são capazes de estimular células que não expressam o receptor CD14 (Andersson e cols, 1992).

Sugere-se então, que receptores da família *Toll- like* (TLR) participem da resposta ao LPS. *Toll- like* é um receptor transmembrana com homologia na porção intracelular com o receptor para IL-1, que tem um papel fundamental no

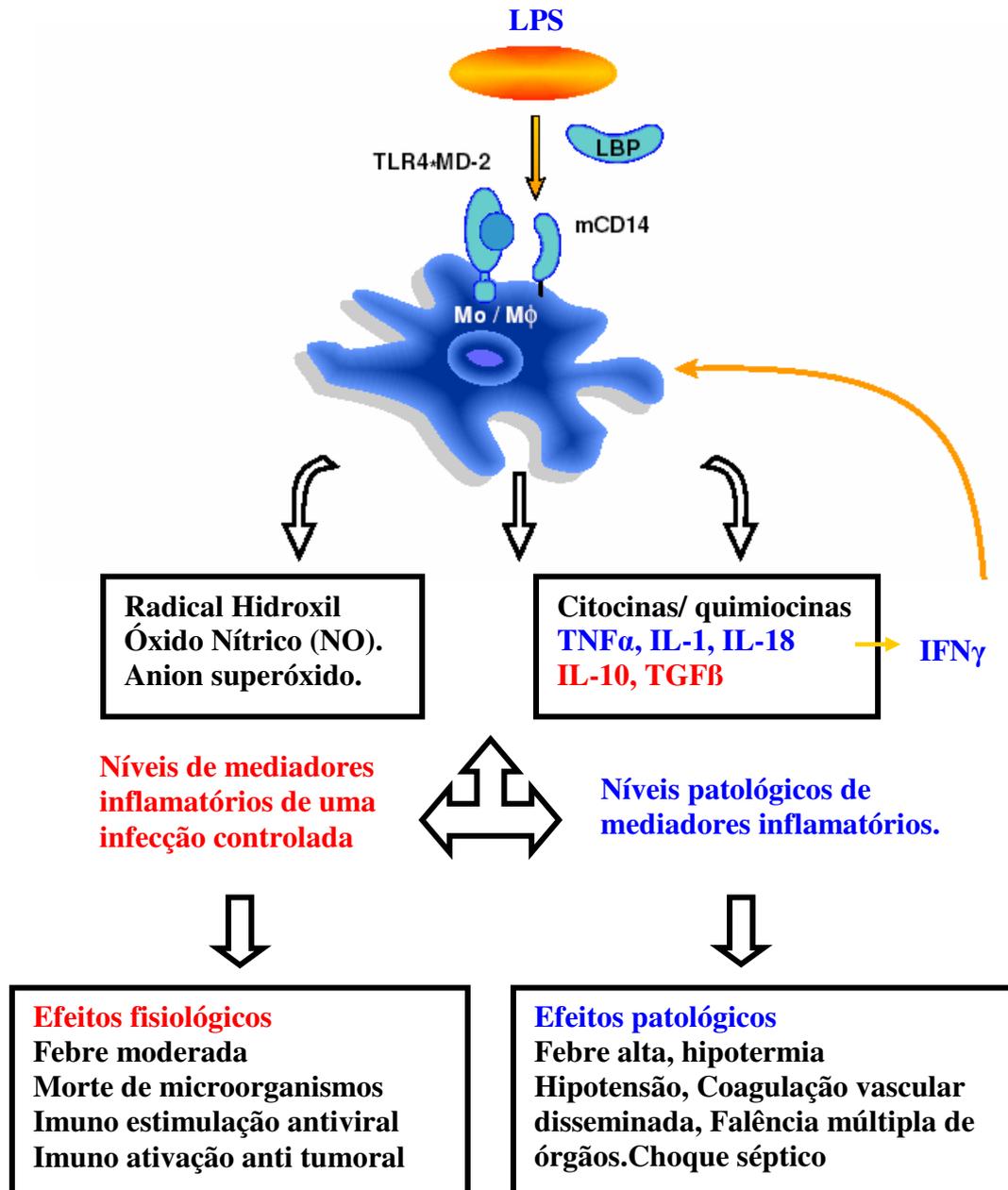
reconhecimento seletivo de antígenos patogênicos, tanto de bactérias gram-positivas como bactérias gram-negativas (Means e cols, 2000; Anderson, 2000; Beutler, 2001). Em genoma humano foram identificados dez tipos diferentes de receptores TLRs (Jean- Baptiste, 2007).

O TLR tipo 4 (TLR4) é o responsável pelo reconhecimento da maioria das bactérias gram-negativas. A ligação do TLR4 ao LPS é aumentada por uma proteína acessória MD2, mas o exato mecanismo da MD2 é ainda não entendido (Jean- Baptiste, 2007).

O LPS de outras bactérias gram-negativas, como *Neisseria meningitides*, *Leptospira interrogans* e *Porphyromonas gingivalis* liga-se preferencialmente ao TLR2 (Jean Baptiste, 2007).

A ligação do LPS ao complexo CD14 / TLR ativa o fator nuclear  $\kappa$  B (NF- $\kappa$ B) em meio a uma série de cascatas de fosforilações iniciada por uma proteína ativadora de mitose da família MAPK. Há três importantes proteínas que constituem esta família: a quinase regulatória do sinal extracelular, a p38 e a quinase c-jun N-terminal (JNK). Cada uma dessas proteínas pode ser ativada pelo LPS por meio de fosforilações de resíduos de tirosina e treonina. A seqüência de ações a essas várias quinases estendem da matriz extracelular para NF-  $\kappa$ B. Sob condições normais NF-  $\kappa$ B está em sua forma inativa no citoplasma celular , ligado a uma proteína inibitória  $\kappa$ B (IK-B) A liberação de NF-  $\kappa$ B é induzida por fosforilação da proteína IK-B pela IK-B quinase. A translocação do NF-  $\kappa$ B para o núcleo promove a produção de citocinas como IL 1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12, IFN $\gamma$  com ativação de uma intensa resposta celular com liberação de mediadores secundários, como o monóxido de carbono (CO) e óxido nítrico (NO). MAPK,

especialmente a proteína p38 é crucial na liberação de citocinas específicas e apoptose (Jean- Baptiste, 2007, Ingalls e cols, 1995) (Fig. 2).



**Figura 2:** Ativação de macrófagos da resposta imune inata frente à exposição ao LPS. (Adaptado de Alexander e cols, 2001).

---

Recentemente tem-se verificado que a exposição neonatal e perinatal a produtos bacterianos como o LPS em ratos influencia a reatividade ao estresse, a regulação imune e a susceptibilidade para doenças em animais adultos (Bilbo e cols, 2005).

### **3. Estresse neonatal e resposta imune em adultos**

A fase neonatal é um período de novas exposições a agentes externos, na qual acontecem numerosos estímulos, sejam eles estímulos imunes ou não. Essa exposição pode significar conseqüências para o desenvolvimento funcional do organismo, influenciando em modificações na regulação imune, reatividade ao estresse e susceptibilidade para doenças. Assim, tem-se sugerido uma nova forma de plasticidade imunológica e neural associada com eventos na vida neonatal causando alterações de resposta ao estresse na vida adulta. Eventos nessa fase podem influenciar o desenvolvimento do sistema nervoso central em relação ao comportamento/ emoção, sistema autônomo, sistema endócrino e sistema imune em resposta ao estresse (Bilbo e cols, 2005; Ellis e cols, 2005).

Em roedores, a privação maternal no período neonatal é associada com aumento neural da expressão gênica do hormônio liberador de corticotrofina (CRH), aumentando a reatividade ao estresse. Quando adultos esses animais mostram uma grande ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, do sistema simpato-adrenomedular e sistema monoaminérgico, e uma grande vulnerabilidade para doenças induzidas pelo estresse (Francis e cols, 1999).

Em contrapartida, a manipulação no período neonatal diminui a resposta comportamental e endócrina para o estresse em adultos. Experimentos com

esses animais mostraram uma diminuição da expressão gênica de CRH no núcleo paraventricular do hipotálamo e uma diminuição do conteúdo de CRH no locus coeruleus comparados com os animais não manipulados. Além disso, esses animais, mostraram um aumento da sensibilidade de glicocorticóides para “*feedback*” negativo. Esses efeitos estão relacionados com um aumento da expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo e córtex frontal, regiões, na qual sabe-se que glicocorticóides medeiam efeitos inibitórios sobre a síntese de CRH em neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (Meaney e cols, 1985, O Donnell e cols, 1994; Sarrieau e cols, 1998; Viau e cols, 1993).

A exposição neonatal a produtos bacterianos, como o LPS, influencia também a reatividade ao estresse em adultos. Estudos sugerem que eventos perinatais envolvidos com o sistema imune podem contribuir para desordens comportamentais e neuropsiquiátricas, incluindo esquizofrenia, autismo e paralisia cerebral (Bilbo e cols, 2005).

Há uma forte evidência em roedores que citocinas pró-inflamatórias, como IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , geradas pelo estímulo de LPS na fase neonatal podem ser importantes mediadores para o desenvolvimento anormal do cérebro. Estudos têm demonstrado, que a exposição neonatal à bactéria (*Escherichia coli*) está associada com prejuízo de memória em adultos. Eles verificaram que animais adultos, que foram submetidos a uma pré-exposição à bactéria têm um aumento na expressão gênica de IL-1  $\beta$  no hipocampo e acreditam que essa citocina possa influenciar em processos cognitivos, como a memória (Bilbo e cols, 2005).

Além disso, a exposição neonatal ao LPS pode aumentar a reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ao estresse em adultos. Estudos recentes têm mostrado um aumento nas concentrações plasmáticas de glicocorticóides 1 hora

após a administração de LPS em animais adultos que foram previamente tratados com LPS, em relação aos animais controles (Ellis e cols, 2005).

Boisse e colaboradores também demonstraram que em animais neonatos, submetidos à administração de LPS, reagem diferentemente frente a uma outra administração de LPS na fase adulta, quando comparados aos animais que receberam salina. Estes pesquisadores notaram que a exposição à endotoxina na fase neonatal, diminui a expressão da ciclooxygenase 2 no hipotálamo destes animais, bem como há uma atenuação da resposta febril quando comparados aos seus respectivos controles (Boisse e cols 2004).

Shanks e colaboradores verificaram modificações no conteúdo de vasopressina (AVP) e CRH na eminência mediana em ratos que foram submetidos a uma pré-exposição ao LPS na fase neonatal e após quatro a cinco meses de idade foram restringidos por um período de vinte minutos. Eles observaram que na eminência mediana o conteúdo de AVP e CRH desses animais estava aumentado em relação aos animais controles (Shanks e cols, 1995).

#### **4. Vasopressina**

Vasopressina (AVP) é um nonapeptídeo que possui uma ponte dissulfeto ligado a dois aminoácidos de cisteína (Holmes e cols, 2001). É sintetizada em neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico e paraventricular do hipotálamo (Holmes e cols, 2001). Esta produção depende da transcrição do gene da AVP situado no cromossomo 20p13, e é aumentada em condições de hipertonicidade,

---

hipotensão e ou hipovolemia. Após sua transcrição, ela é transportada para a neuro-hipófise, onde é estocada (Ouden e cols, 2005).

A tradução da pré-pro-vasopressina ocorre em ribossomos do retículo endoplasmático. Após a tradução, a pré-pro-vasopressina move-se para o espaço luminal do retículo endoplasmático onde ocorre a glicosilação do peptídeo N-terminal transformando-se em pro-vasopressina. As vesículas contendo a pro-vasopressina são transportadas até a terminação do axônio na neuro-hipófise, onde a pro-vasopressina é processada gerando AVP, neurofisina e um glicopeptídeo de 39 aminoácidos (North, 1987). A liberação de AVP ocorre em resposta a potenciais de ação gerados no corpo celular dos neurônios magnocelulares e se propagam até a terminação nervosa na neuro-hipófise, onde a AVP é secretada, alcançando a circulação geral através de vasos fenestrados presentes na glândula.

A regulação da liberação de AVP é complexa e é exercida por estímulos osmóticos e não osmóticos. A AVP liberada é influenciada por potenciais gerados pelo hipotálamo e por mediadores e hormônios da circulação. Aumento da osmolalidade plasmática e severa hipovolemia e hipotensão são os estímulos mais potentes para a liberação de AVP. Dor, náusea, hipóxia, também aumentam a liberação de AVP (Holmes e cols, 2001).

No caso de modificações da osmolalidade plasmática a produção e liberação de AVP são controladas por osmorreceptores localizados periféricamente e centralmente. Osmorreceptores periféricos são localizados na região da veia portal hepática que detectam o impacto osmótico da ingestão de alimentos e líquidos. Modificações da osmolalidade sistêmica são detectadas centralmente em regiões cerebrais. Os neurônios magnocelulares do hipotálamo

---

são diretamente despolarizados em condições hipertônicas (aumentando a liberação de AVP), e são hiperpolarizados em condições hipotônicas (diminuindo a liberação de AVP). A AVP circulante atua sobre os receptores presentes no túbulo distal e ductos coletores dos rins promovendo reabsorção de água que associada à sensação de sede e o conseqüente aumento da ingestão hídrica, tende a restaurar a tonicidade plasmática (Holmes e cols, 2001).

Hipotensão e diminuição do volume intravascular são estímulos potentes para aumentar as concentrações plasmáticas de AVP. A queda da pressão arterial inicia um arco reflexo através dos barorreceptores do seio carotídeo que resulta em liberação de AVP na circulação. A AVP produz potente vasoconstrição contribuindo para manutenção da pressão arterial durante estímulos hipotensores (Ouden e cols, 2005).

A diminuição do volume plasmático é detectada por receptores atriais, o do arco aórtico e do seio carotídeo que, por mecanismos reflexos, estimulam a liberação de AVP restaurando o volume plasmático para níveis normais.

Já, náusea, dor, hipoglicemia, são estímulos em que há liberação de AVP por mecanismos não totalmente conhecidos.

Sabe-se que o aumento da temperatura corporal promove a liberação de AVP em ratos, provavelmente por uma supressão do barorreflexo e uma redução interescapular da termogênese do tecido adiposo marrom, mas esses mecanismos ainda são pouco entendidos (Itoh, 1980; Okuno e cols, 1965).

Os efeitos biológicos da AVP são mediados por basicamente três subtipos de receptores. Os subtipos de receptores da AVP são receptores acoplados à proteína G, que possuem sete domínios transmembrânicos (Holmes e cols, 2006).

Os receptores V1a (receptores conhecidos como receptores V1 vascular) são localizados na musculatura vascular lisa e medeiam vasoconstrição. Adicionalmente também são encontrados nos rins, miométrio, adipócitos, hepatócitos, plaquetas e testículos (Holmes e cols, 2001). Quando a AVP liga-se a esse subtipo de receptores, ocorre uma dissociação da proteína  $G_q$ -GTP e a subunidade  $\alpha_q$  estimula a fosfolipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ) que hidrolisa a fosfatidilinositol-bifosfato (PIP $_2$ ), aumentando os conteúdos intracelulares de diacilglicerol (DAG) e fosfatidilinositol-trifosfato (IP $_3$ ). O IP $_3$  estimula os receptores de IP $_3$  (IP $_3$ R) presentes na membrana do retículo endoplasmático liberando os estoques de cálcio para o meio intracelular (Birnhaumer, 2000).

Os receptores V1b (chamados receptores pituitário) provocam aumento da produção do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), ativação de diferentes proteínas G, aumento intracelular de AMP cíclico, liberação de insulina e glucagon (Holmes e cols, 2001).

Os receptores V2 (também conhecidos como receptores renais), causam o efeito antidiurético da AVP. Estão presentes no ducto coletor, néfron distal e em células endoteliais do rim. Quando há ligação da AVP a esses receptores, há uma dissociação da proteína  $G_s$ -GTP nas subunidades  $\alpha$  e  $\beta\gamma$ . A subunidade  $\alpha$  estimula a atividade da adenil-ciclase (AC) e conseqüentemente aumenta o AMPc (PKA) promovendo a inserção de canais de água (aquaporina 2-AQP-2) na superfície luminal destas células (Birnhaumer, 2000, Hirata e cols, 1997).

A termorregulação também é regulada pela AVP ligada ao receptor V1, porém o subtipo específico ainda não foi identificado (Steiner e cols, 1998; Derijk, 1994).

## 5. AVP e LPS

Durante a endotoxemia experimental ou choque endotoxêmico ocorre um aumento das concentrações plasmáticas de AVP.

Em cães, a elevação das concentrações plasmáticas de AVP ocorre 15 minutos após a infusão de LPS (Wilson e cols, 1981). Em ratos a AVP é aumentada entre 15 a 240 minutos após a injeção de endotoxina (Brackett e cols, 1985).

Durante o choque endotoxêmico experimental, o LPS promove uma resposta bifásica na liberação de AVP, levando a um aumento que permanece até a segunda hora após a administração de LPS e, a partir daí, retornando então às concentrações basais. Este retorno às concentrações basais ocorre no período em que a pressão arterial atinge seus valores mais baixos (Reid, 1997).

Landry e colaboradores verificaram as concentrações plasmáticas de AVP tanto em pacientes que estavam com choque endotoxêmico, quanto em pacientes com choque cardiogênico. Eles observaram que nos pacientes com choque endotoxêmico as concentrações plasmáticas de AVP estavam inapropriadamente baixas. Em seu trabalho foram estudados 19 pacientes com choque endotoxêmico que comparou com 12 pacientes com choque cardiogênico. A concentração plasmática de AVP nos pacientes com choque endotoxêmico foi de 3,1 pg/ml, acompanhada de hipotensão (pressão sistólica de 92 mmHg) que normalmente estimularia a liberação de AVP. Nos pacientes com choque cardiogênico a concentração plasmática de AVP estava alta (22,7 pg/ml) com o grau de hipotensão similar. (Landry e cols, 1997).

Uma possível explicação para diminuição das concentrações plasmáticas de AVP poderia ser depleção de seus estoques na neuro-hipófise. Sharshar e colaboradores demonstraram que há depleção de AVP na neuro-hipófise em indivíduos com choque endotoxêmico, em uma unidade de terapia intensiva. Eles observaram em um exame de ressonância magnética que a proporção da intensidade do sinal entre o lobo posterior e o anterior da hipófise estava significativamente diminuído em pacientes com quadro de choque endotoxêmico (Sharshar e cols, 2002). No entanto, em animais de experimentação o conteúdo de AVP em animais com choque não eram diferentes dos animais controle (Giusti-Paiva e cols, 2002).

Uma outra possibilidade seria o prejuízo da secreção de AVP mediada pelo barorreflexo devido à falência autonômica, pois parece que a função simpática é prejudicada durante o choque endotoxêmico (McCann, 1994; Garrard, 1993).

Entretanto, tem-se sugerido a ação de alguns moduladores gasosos na regulação de AVP durante o choque endotoxêmico como o monóxido de carbono e o óxido nítrico (NO) (Giusti-Paiva e cols, 2002, Moreto e cols, 2006).

## **6. Óxido Nítrico**

Até meados da década de 1980, o Óxido Nítrico (NO) era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (James, 1995). Mas, em 1980 Furchgott e Zawadzki observaram que a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, era inteiramente dependente da presença de um endotélio intacto e envolvia a

liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, o qual chamaram de *endothelial-derived relaxing factor* (EDRF) (Furchgott e cols, 1980).

Inicialmente foi sugerido que o EDRF fosse um radical livre derivado do metabolismo do ácido araquidônico (Yu e cols, 1997; Kitchens e cols, 1995). Posteriormente verificou-se tratar do gás NO (Mathinson, 1992).

Além de suas ações como um vasodilatador potente, o NO tem sido descrito por suas ações bactericida e tumoricida quando sintetizado em grandes concentrações por macrófagos. Pertence ainda a uma nova classe de neurotransmissores, o qual de forma atípica, não é armazenado em vesículas e não requer receptores de membrana para mediar suas ações, além de possuir capacidade de agir retrogradamente, do terminal pós-sináptico para o terminal pré-sináptico (Mathinson e cols, 1992).

É sintetizado a partir de L-arginina e oxigênio por um processo enzimático que utiliza elétrons doadores de NADPH. A enzima que converte L-arginina em NO é chamada óxido nítrico sintase (NOS) (Coleman, 2001). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos e muitas já tiveram seus genes clonados. Estudos bioquímicos e análise seqüencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas apresentam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (cNOS), dependente de íons cálcio e de calmodulina e a NOS induzível (iNOS) independentes de cálcio e produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (Marletta, 1994; Moncada, 1991).

A cNOS e a iNOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (Marletta, 1994). A cNOS produz quantidades

pequenas de NO na ordem de nano ou picomols. Já a iNOS libera quantidades maiores de NO e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra morte celular (Dustin e cols, 1995) (Fig 3).

O NO gerado pela NOS age principalmente de forma parácrina. Difundindo-se através das membranas ele pode atingir a guanilato- ciclase (GC) solúvel. A ativação da GCs pelo NO promove aumento do conteúdo citoplasmático de GMPc.

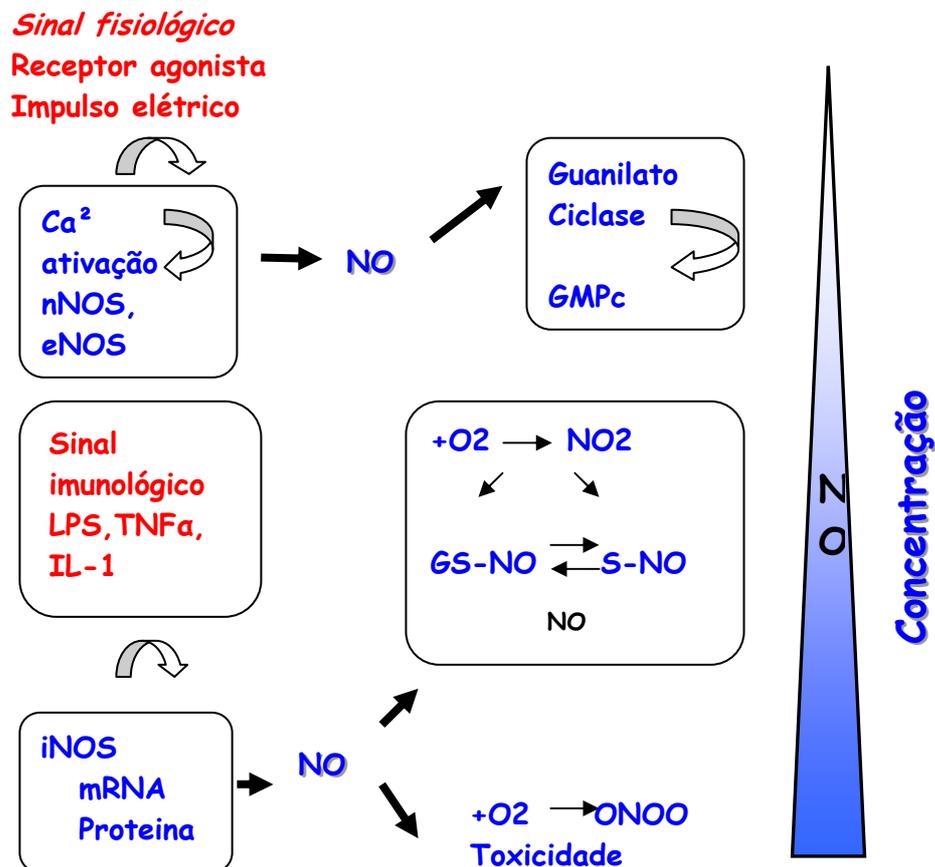
Existem dois tipos de NOS constitutiva: uma delas detectada inicialmente em células endoteliais vasculares e denominada NOS endotelial (eNOS); a outra está presente principalmente no sistema nervoso central e periférico e chamada então de NOS neuronal (nNOS) (Heumann e cols, 1998; Karima e cols, 1999).

A eNOS é expressa mais comumente no endotélio, mas também é encontrada em outros tipos de células como células neuronais humanas, célula T humana, miócitos cardíacos de ratos, plaquetas e outros (Guix e cols, 2005). O NO derivado do endotélio está envolvido na regulação fisiológica do tônus vascular (Kirkeboen e cols, 1999).

A nNOS é expressa no cérebro (Heumann e cols, 1998), nervos espinhais (Ingalls, 1995), gânglios simpáticos (Yang e cols, 1998), nervos periféricos (Chow e cols, 1999), glândula adrenal (Yang e cols, 1998), em células epiteliais uterinas, do estômago e pulmonares (Akashi e cols, 2000), plaquetas (Ulevitch, 1999) e células pancreáticas (Means e cols, 2000). O NO proveniente da isoforma neuronal pode agir como um neurotransmissor e/ou neuromodulador.

A iNOS pode ser induzida por LPS e citocinas em macrófagos (Anderson, 2000; Beulter, 2001; Beulter, 2000) células endoteliais (Aderem, 2001);

hepatócitos (Weinstein e cols, 1993), neutrófilos (Meng e cols, 1997). O LPS e as citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a sepse promovem um aumento da expressão da iNOS em várias células causando síntese elevada de NO (Parrilo, 1993; Robbins e cols, 1997, James e cols, 1995).



**Figura 3:** Produção de NO e sinalização. (modificado de Coleman e cols, 2001).

Esta produção excessiva de NO aumenta a permeabilidade das células endoteliais vasculares, provoca depressão da contratilidade miocárdica (Finkel e cols, 1992), hipotensão por relaxamento do músculo liso vascular e prejudica o fluxo na microcirculação (Parrilo, 1993; Stoclet e cols, 1999).

Alguns pesquisadores têm demonstrado que a produção de NO pela indução da iNOS pode ser inibida por bloqueadores da NOS restaurando a

---

pressão sanguínea e a responsividade vascular (Simmons e cols, 1996; Cob e cols, 1996; Rosselet e cols, 1998).

Além disso, trabalhos têm mostrado a relação entre o NO e liberação de hormônios. Experimentos em ratos, coelhos e em humanos indicam que o NO inibe a liberação de AVP. No entanto também existe estudo mostrando que o NO pode promover a liberação de AVP em ratos intactos. A liberação de AVP estimulada por IL-1 $\beta$  in vitro pode ser diminuída pela administração de L-arginina (substrato da NOS), sugerindo que o NO pode diminuir a liberação de AVP estimulada por processos inflamatórios (Bains e cols, 1994, Kadecaro e cols, 1994, Ota e cols, 1993).

Giusti-Paiva e colaboradores mostraram que a administração intracerebroventricular (icv) de um bloqueador das três isoformas da NOS potencia a liberação de AVP induzida por LPS uma hora após a administração de LPS, sugerindo uma regulação inibitória do NO sobre a liberação de AVP nesta situação (Giusti-Paiva e cols, 2002).

Sendo assim, o NO parece ser uma molécula sinalizadora do sistema imune em resposta ao LPS podendo interagir com o sistema endócrino modulando a liberação hormonal, e, por sua vez o sistema endócrino pode participar da liberação de produtos de células do sistema imune (Giusti-Paiva e cols, 2002; Yamoto e cols, 1997).

A exposição neonatal ao LPS vem sendo utilizada como um modelo de estudo para verificar as interações dos sistemas, imune, endócrino e nervoso central, o qual uma única exposição ao LPS no período neonatal pode mudar o padrão de resposta neuro-imune-endócrino ao estresse em animais adultos (Boissé e cols, 2004, Ellis e cols, 2005, Bilbo e cols, 2005; Walker e cols, 2006).

**Objetivo**

- Avaliar o efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre as concentrações plasmáticas de AVP durante o choque endotoxêmico experimental.
- Avaliar o efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre as concentrações plasmáticas de nitrato em ratos submetidos ao choque endotoxêmico experimental.
- Avaliar o efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a hipotensão em ratos submetidos ao choque endotoxêmico experimental.
- Avaliar o efeito da administração de LPS na fase neonatal na temperatura corporal durante o choque endotoxêmico experimental.

## **Materiais e Métodos**

## 1. Animais

O estudo foi realizado com ratas em período gravídico mantidas à temperatura de  $25\pm 2^{\circ}$  C em ciclo de claro e escuro, em gaiolas individuais com acesso livre a água e ração. Ao nascimento dos filhotes, considerado dia 0, foram selecionados 12 ratos machos ao acaso e distribuídos conforme os grupos experimentais. Para o experimento todos os animais foram desmamados com 21 dias. Os ratos foram agrupados de 4 a 6 animais por gaiola até atingiram 8 a 12 semanas de idade, quando foram transferidos para gaiolas individuais no dia anterior ao experimento.

Todos os experimentos foram iniciados entre 7:00 e 9:00h. Cada animal foi utilizado em apenas uma sessão experimental.

## 2. Drogas Utilizadas

A droga utilizada em animais no período neonatal e em animais adultos foi o lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) em concentrações 100  $\mu$ g/kg e 10 mg/kg respectivamente administrado por via intraperitoneal (i.p.).

## 3. Anestesia Geral

Os animais submetidos à manipulação cirúrgica foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de 2,2,2-tribroetanol (TBE, Aldrich) 2,5 % em solução salina NaCl 0,15 M, na dose de 25 mg/100g de peso corporal.

#### 4. Dosagem Hormonal

No 14<sup>o</sup> dia de idade deis ratos selecionados ao acaso receberam a administração intraperitoneal de LPS na dose de 100 µg/kg e seis ratos controles da mesma mãe foram administrados com o equivalente volume de salina, livre de pirógenos endógenos. Dois a três meses após receberam uma nova injeção de salina ou LPS na dose de 10 mg/kg (i.p.) e após 2, 4 e 6 horas após a administração foram decapitados e amostras de sangue foram coletadas. O sangue foi centrifugado (1200 g, 4°C, 20 min) para separação do plasma, que foi armazenado a -70° C para radioimunoensaio de AVP após extração com éter de petróleo, segundo a técnica descrita por Moreira e colaboradores (Moreira e cols, 1995).

Para extração da AVP plasmática as amostras foram processadas da seguinte maneira:

- Disposição de 1000µl de plasma em um tubo de polipropileno;
- Adição de 2 ml de acetona gelada;
- Agitação por 5 segundos;
- Centrifugação por 20 minutos a 1.200 g;
- Decantação do sobrenadante em outro tubo (descarte do precipitado);
- Adição de 2 ml de éter de petróleo gelado;
- Agitação por 5 segundos;
- Repouso por 5 minutos para separação das camadas;
- Aspiração do sobrenadante;
- Liofilização (aproximadamente 5 horas);

- Armazenamento das amostras liofilizadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

No dia da realização do radioimunoensaio, as amostras foram ressuspensas em 250 $\mu\text{l}$  de tampão de AVP, sendo 100 $\mu\text{l}$  utilizados para dosagem. Todas as amostras de um mesmo experimento foram dosadas em um mesmo ensaio. A dose mínima detectável foi de 0,4 pg/ml, o erro intra-ensaio foi de 2,7% e o erro entre-ensaios foi de 17%.

## 5. Determinação indireta de NO plasmático pela dosagem de nitrato

Após a decapitação e amostras de sangue foram coletadas e centrifugadas (1.200 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 20 min) para separação do plasma. O plasma foi armazenado à  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem de nitrato.

O plasma foi desproteinizado por incubação com etanol absoluto a  $4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos em freezer ( $-20^{\circ}\text{C}$ ). As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 4.000 g.

Para a medida de NO plasmático, foi utilizada a técnica de quimioluminescência NO/ozônio. A concentração de nitrato no plasma foi medida utilizando 5 $\mu\text{l}$  da amostra que foi injetada num vaso de reação contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio à  $95^{\circ}\text{C}$ ) 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 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 análogo-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 (5;10;25;50 e 100  $\mu\text{mol}$ ) de nitrato de sódio.

## **6. Determinação da Pressão Arterial e Freqüência Cardíaca**

### Tratamento Neonatal para estudo da Pressão Arterial e Freqüência Cardíaca a longo prazo

No 14<sup>o</sup> dia de idade seis ratos selecionados ao acaso receberam a administração intraperitoneal de LPS (100  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) e seis ratos controles da mesma mãe foram administrados com o equivalente volume de salina, livre de pirógenos exógenos. As mães tiveram seus filhotes novamente nas caixas. No mínimo 10 ninhadas diferentes foram utilizadas neste experimento, em no mínimo 4 ocasiões separadas.

### Pressão Arterial e Freqüência Cardíaca mensurada em adultos

Dois a três meses após o nascimento, no dia anterior ao experimento, os animais tiveram cânulas implantadas na artéria femoral, de acordo com o método descrito por Krieger (1964). Após a administração de anestesia geral com tribroethanol (25 mg/100g de peso corporal) por via i.p, uma incisão de 1 cm foi feita na região inguinal direita para a exposição da artéria femoral. Um cateter de polietileno constituído por um segmento PE 10 de 4,5 cm de comprimento, ligado

a um cateter PE 50 de 15 cm foi colocado na artéria femoral, atingindo a aorta abdominal. A extremidade livre do cateter foi exteriorizada e fixada na área interescapular do animal. A cânula foi imediatamente heparinizada (125 U.I/ml). A medida da pressão arterial média (PAM) foi realizada utilizando-se um transdutor de pressão (*Grass P23XL-1*) e um polígrafo (*Grass P122*, EUA), acoplado a um microcomputador. Para este registro, foi utilizado o programa Polyview (*Astro-Med Inc*, EUA).

## **7. Determinação da Temperatura Corporal**

### Tratamento Neonatal para estudo da Temperatura Corporal a longo prazo

No 14<sup>o</sup> dia de idade seis animais selecionados ao acaso receberam a administração intraperitoneal de LPS (100µg/ kg) e seis animais controles da mesma mãe foram administrados com o equivalente volume de salina, livre de pirógenos exógenos. As mães tiveram seus filhotes novamente nas caixas. No mínimo 10 ninhadas diferentes foram utilizadas neste experimento, em no mínimo 4 ocasiões separadas.

### Temperatura Corporal mensurada em adultos

Dois a três meses após o nascimento dos filhotes, 4 a 6 dias antes do experimento, os animais foram anestesiados com 2-2-2 tribromoethanol (*Aldrich; MilwauKee, WI, USA, 250 mg/kg*) i.p e foi realizada uma laparotomia para inserção de uma cápsula de biotelemetria (modelo ER-3000 temperatura e

atividade física; Mini Mitter, Sunriver, OR, USA) na cavidade peritoneal. A incisão foi fechada com sutura e a cápsula foi implantada para determinação da temperatura corporal. Após a cirurgia os animais foram tratados com benzynpenicillin (100.000 U i.m) permanecendo em recuperação 4 a 6 dias. Os animais conscientes, com cápsulas de biotelemetria implantados previamente foram alojados individualmente em gaiolas por pelo menos 24 horas anteriores ao experimento. No dia anterior a temperatura foi controlada por um período de 24 horas. As caixas foram colocadas na placa de telemetria (modelo ER-3000; Mini Mitter) conectadas a um microcomputador. Os gráficos foram apresentados e adquiridos graficamente no monitor, fazendo uso de software apropriado (Vital View, Mini Mitter). No dia do experimento, os animais foram submetidos a uma outra injeção de LPS na dose de 10 mg/ kg intraperitoneal à temperatura ambiente de 25° C. A temperatura corporal foi mensurada por um período de 6 horas após a injeção.

## **8. Análise Estatística**

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. As variações nos valores foram analisadas por um teste de variância e a diferença entre as médias por um teste de Tuckey. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes.

## 9. Protocolos Experimentais

### A- Efeito da administração de LPS na fase adulta

#### 1. Efeito da administração de LPS na fase adulta sobre a concentração plasmática de AVP.

Para avaliar o efeito da administração de LPS sobre a secreção de AVP, ratos foram submetidos à injeção de salina (100µg/kg) no período neonatal (14º dia após o nascimento). O início do experimento na fase adulta, foi marcado pela injeção por via intraperitoneal (i.p) de salina ou LPS (10mg/kg). Os animais foram decapitados 2,4,6 horas após a injeção de LPS. O sangue do tronco foi coletado em tubos contendo heparina e mantidos em gelo. O plasma foi separado por centrifugação (1200 g, 4°C, 20 min) e estocado a -70° C até a dosagem de AVP por RIE.

#### 2. Efeito da administração de LPS na fase adulta sobre a concentração plasmática de nitrato

Para avaliar o efeito da injeção de LPS sobre a concentração de nitrato no plasma, ratos foram submetidos à injeção de salina (100µg/kg) no período neonatal (14º dia após o nascimento). O início do experimento foi marcado pela injeção por via i.p de salina ou LPS (10 mg/kg). O sangue foi centrifugado (1200 g, 4°C, 20 min) e o plasma foi utilizado para dosagem de nitrato.

### 3. Efeito da administração de LPS na fase adulta sobre a pressão arterial e frequência cardíaca.

Para avaliar o efeito da administração de LPS sobre a pressão arterial e frequência cardíaca, foram utilizados ratos que tiveram a injeção de salina (100 µg/kg) no período neonatal (14<sup>o</sup> dia após o nascimento) e canulação da artéria femoral previamente. O início do experimento na fase adulta foi marcado pela injeção por via i.p de salina ou LPS (10mg/kg). A pressão arterial e frequência cardíaca foram verificadas a cada 15 minutos, com início de 1 hora antes, até a sexta hora após a injeção de LPS.

### 4. Efeito da administração de LPS na fase adulta sobre a temperatura corpórea

Para avaliar o efeito da administração de LPS sobre a temperatura corpórea, foram utilizados animais que tiveram a injeção de salina (100µg/kg) no período neonatal (14<sup>o</sup> dia após o nascimento) e inserção de uma cápsula de biotelemetria previamente. O início do experimento na fase adulta ocorreu com a administração de salina ou LPS i.p (10 mg/kg). A temperatura foi registrada a cada 15 minutos, tendo início 2 horas antes do início do experimento e por um período de 6 horas.

## **B- Efeito da administração de LPS na fase neonatal durante o choque endotoxêmico**

### 5. Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico.

Para verificar se a administração de LPS no período neonatal tem efeito sobre a liberação de vasopressina durante o choque endotoxêmico, foi administrado LPS por via i.p (100µg/kg) na fase neonatal (14<sup>o</sup> dia após o nascimento) e após 2 a 3 meses esses animais receberam uma nova administração de LPS (10 mg/kg) i.p. Os animais foram decapitados 2, 4 e 6 horas após a administração de LPS. O sangue do tronco foi coletado em tubos contendo heparina e mantidos em gelo. O plasma foi separado por centrifugação (1200 g, 4<sup>o</sup>C, 20 min) e estocado a -70<sup>o</sup> C até a dosagem de AVP por RIE.

### 6. Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a concentração de nitrato plasmático durante o choque endotoxêmico

Para verificar se a administração de LPS no período neonatal tem efeito sobre a concentração de nitrato plasmático durante o choque endotoxêmico, foi administrado LPS i.p (100µg/kg) na fase neonatal (14<sup>o</sup> dia após o nascimento) e após 2 a 3 meses esses animais receberam uma nova administração de LPS (10 mg/kg) i.p. Os animais foram decapitados 2, 4 e 6 horas após a administração de LPS. O sangue do tronco foi coletado em tubos contendo heparina e mantidos em

gelo. O plasma foi separado por centrifugação (1200 g, 4°C, 20 min) e utilizado para dosagem de nitrato.

7. Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico.

Para verificar se a administração de LPS no período neonatal tem efeito sobre a pressão arterial e frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico, foi administrado LPS por via i.p (100µg/kg) na fase neonatal (14<sup>o</sup> dia após o nascimento) e após 2 a 3 meses esses animais receberam uma nova administração de LPS (10 mg/kg) i.p. A pressão arterial foi verificada a cada 15 minutos, com início 1 hora antes da injeção de LPS.

8. Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico

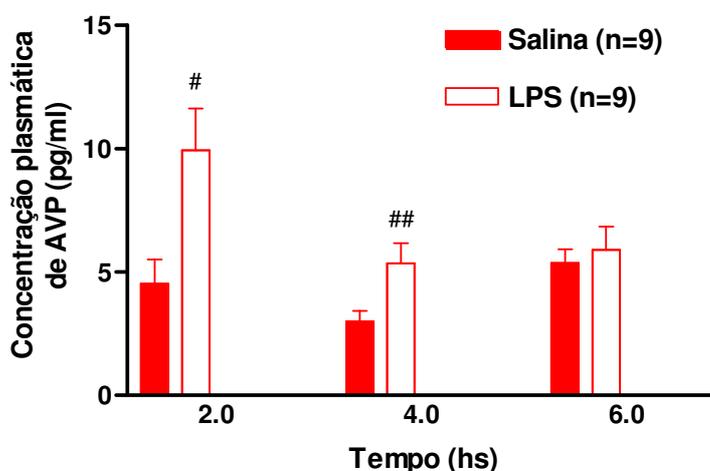
Para verificar se a administração de LPS no período neonatal tem efeito sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico, foi administrado LPS i.p (100µg/kg) na fase neonatal (14<sup>o</sup> dia após o nascimento) e após 2 a 3 meses esses animais tiveram uma cápsula de biotelemetria implantada na cavidade peritoneal para medida da temperatura corporal. 4 a 6 dias após a implantação, os animais foram submetidos a uma outra administração de LPS (10mg/kg) i.p e a temperatura corporal foi verificada a cada 15 minutos, com início de 2 horas antes, até a sexta hora após a injeção de LPS.

## **Resultados**

## A- Efeitos da administração de LPS na fase adulta

### 1. Efeito da administração de LPS na fase adulta sobre a concentração plasmática de vasopressina.

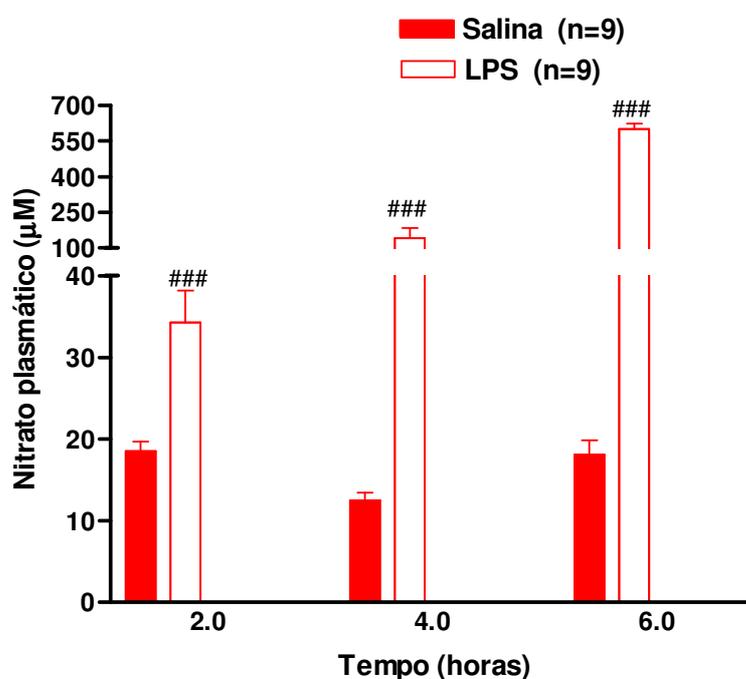
Na figura 4 observa-se o efeito da administração de LPS sobre a secreção de AVP. Verificamos que o LPS aumentou significativamente ( $p < 0,05$ ) da concentração de AVP durante a segunda hora, quando comparada ao grupo controle (de  $4,25 \pm 0,94$  pg/ml para  $11,1 \pm 5,45$  pg/ml). A partir da quarta hora houve uma queda na concentração de AVP, mantendo até a sexta hora de experimento.



**Figura 4:** Efeito da administração de LPS (10mg/kg i.p) sobre as concentrações plasmáticas de AVP. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n= número de animais por grupo. Diferença de  $p < 0,05$  para # e ## para  $p < 0,01$ .

## 2. Efeito da administração de LPS na fase adulta sobre a concentração plasmática de nitrato.

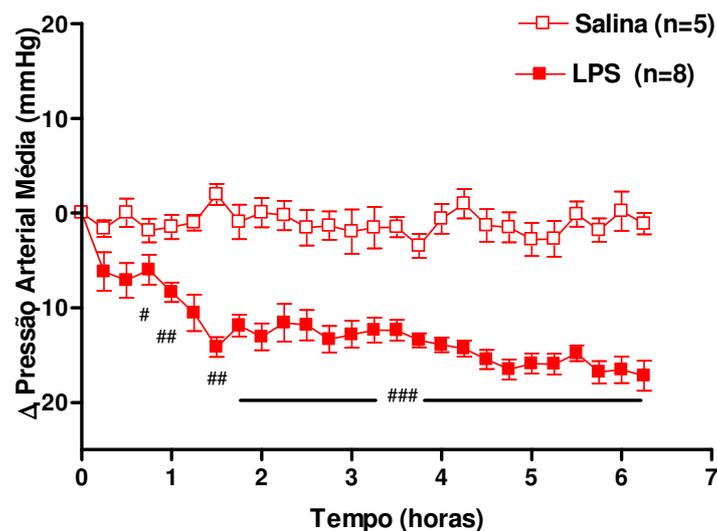
Na figura 5, podemos observar que a administração de LPS provocou aumento progressivo ( $p < 0,001$ ) na concentração de nitrato a partir da segunda hora ( $38,8 \pm 16,5 \mu\text{M}$ ), comparado ao grupo controle. Ao final do experimento o nitrato plasmático atingiu a concentração de  $680,5 \pm 18,8 \mu\text{M}$  enquanto a concentração de nitrato no grupo salina foi  $19,2 \pm 5,64 \mu\text{M}$  ( $p < 0,001$ ).



**Figura 5:** Efeito da administração de LPS (10mg/kg i.p) sobre a concentração de nitrato plasmático. Valores expressos como média  $\pm$ EPM. n= número de animais por grupo. Diferença de  $p < 0,001$  para ###.

### 3. Efeito da administração de LPS na fase adulta sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca

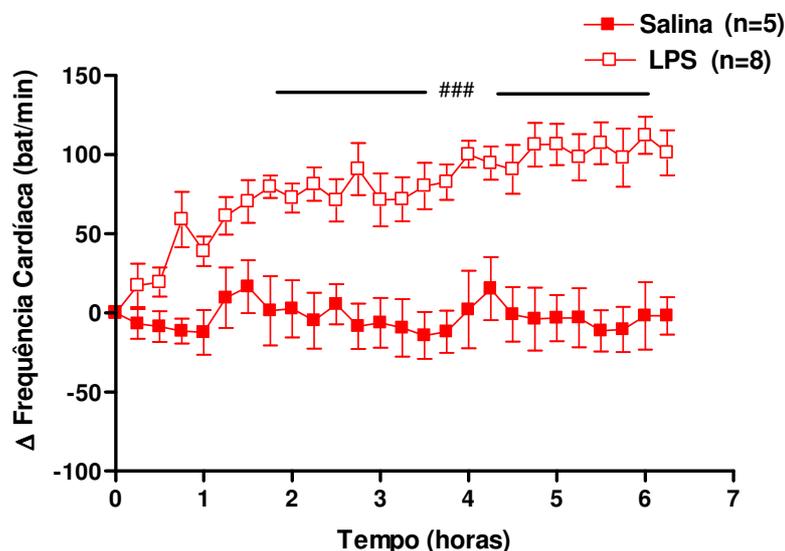
Na figura 6 observamos que a administração de LPS promoveu uma queda progressiva da pressão arterial média nos animais tratados com LPS, quando comparados aos do grupo controle. Esta queda foi caracterizada por uma diminuição (de  $12,75 \pm 1,25$  mmHg) nas duas primeiras horas após o início do experimento ( $p < 0,01$ ), ( $-13,45 \pm 1,3$  mmHg) após a quarta hora ( $p < 0,001$ ) e ( $-18,9 \pm 1,5$  mmHg) após seis horas ( $p < 0,001$ ).



**Figura 6:** Efeito da administração de LPS (10mg/kg ip) sobre a pressão arterial média. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n= número de animais por grupo. Diferença de  $p < 0,05$  para #,  $p < 0,01$  para ## e  $p < 0,001$  para ###.

Quanto à frequência cardíaca podemos observar na figura 7 que a administração de LPS provocou um aumento da frequência cardíaca (de  $70,45 \pm 25,76$ ) para  $p < 0,001$  1,5 hora após a administração de LPS, ( $100,12 \pm 24,56$ ) para

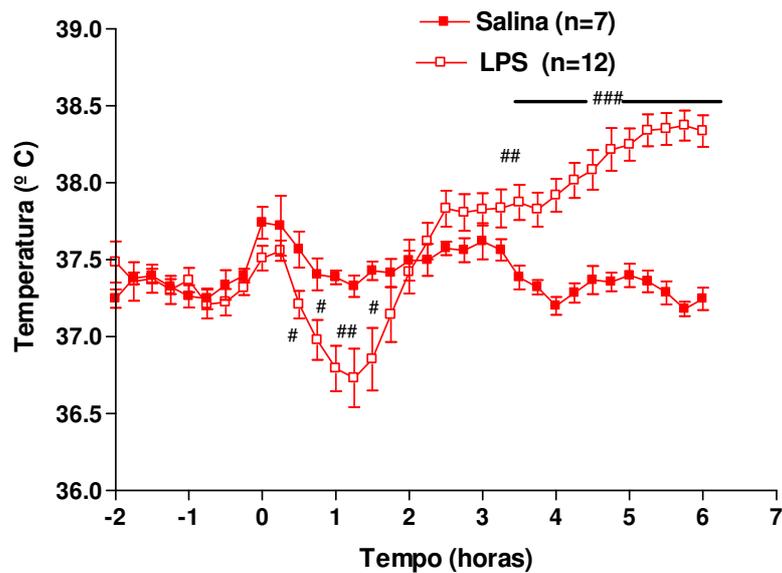
$p < 0,001$  após quatro horas e  $(100,32 \pm 1,4)$  para  $p < 0,001$  após seis horas quando comparados aos ratos tratados com salina.



**Figura 7:** Efeito da administração de LPS (10mg/kg ip) sobre a frequência cardíaca. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM. n= número de animais por grupo. Diferença de  $p < 0,001$  para ###.

#### 4. Efeito da administração de LPS na fase adulta sobre a temperatura corporal

Observamos na figura 8, que a administração de LPS promoveu um efeito bifásico na temperatura corporal. Após 15 minutos da administração de LPS, houve uma queda significativa ( $p < 0,05$ ) na temperatura corporal, a temperatura mais baixa foi verificada 1 hora e 15 minutos após a administração de LPS (de  $37,5 \pm 37,3$  para  $36,5 \pm 36,8$ ) quando comparado ao grupo controle. A partir da terceira hora houve um aumento significativo da mesma ( $p < 0,01$ ) que se manteve até o término do experimento ( $p < 0,001$ ), onde foi verificada a temperatura mais elevada (de  $37,3 \pm 37,5$  para  $38,3 \pm 38,5$ ).



**Figura 8:** Efeito da administração de LPS (10mg/kg i.p) sobre a temperatura corporal. Os valores estão expressos como média  $\pm$  EPM, n= número de animais por grupo. Diferença de  $p < 0,05$  para #,  $p < 0,01$  para ## e  $p < 0,001$  para ###.

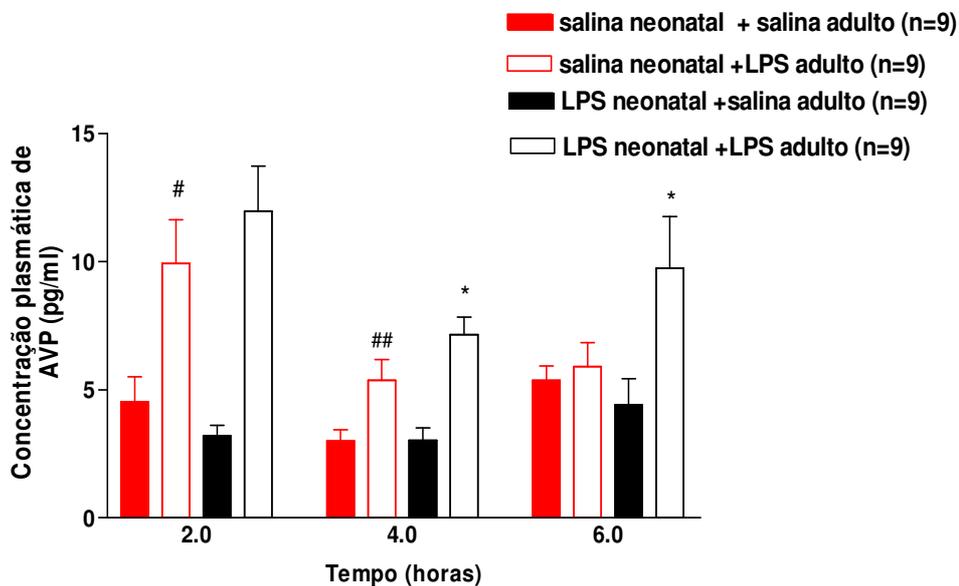
## B- Efeito da administração de LPS na fase neonatal durante o choque endotoxêmico.

### 5. Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a liberação de vasopressina durante o choque endotoxêmico.

Na figura 9, podemos observar o efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a concentração plasmática de AVP até a sexta hora após a indução do choque endotoxêmico. O grupo que recebeu a administração de salina no período neonatal e após 2 a 3 meses recebeu a administração de LPS apresenta um aumento significativo na concentração de AVP na segunda hora

após a injeção de LPS de  $10 \pm 5$  para  $p < 0,05$ , na quarta hora de  $5 \pm 3$  para  $p < 0,05$  retornando aos valores basais até o fim do experimento.

Já quando o animais receberam a administração de LPS na fase neonatal e após 2 a 3 meses uma nova administração de LPS, obtemos uma reversão parcial do efeito do LPS sobre a concentração plasmática de AVP, observando um aumento significativo nas concentrações plasmáticas de AVP a partir da quarta hora de  $7,5 \pm 2,5$  pg/ml ( $p < 0,05$ ) e de  $10,1 \pm 5$  pg/ml ( $p < 0,05$ ).

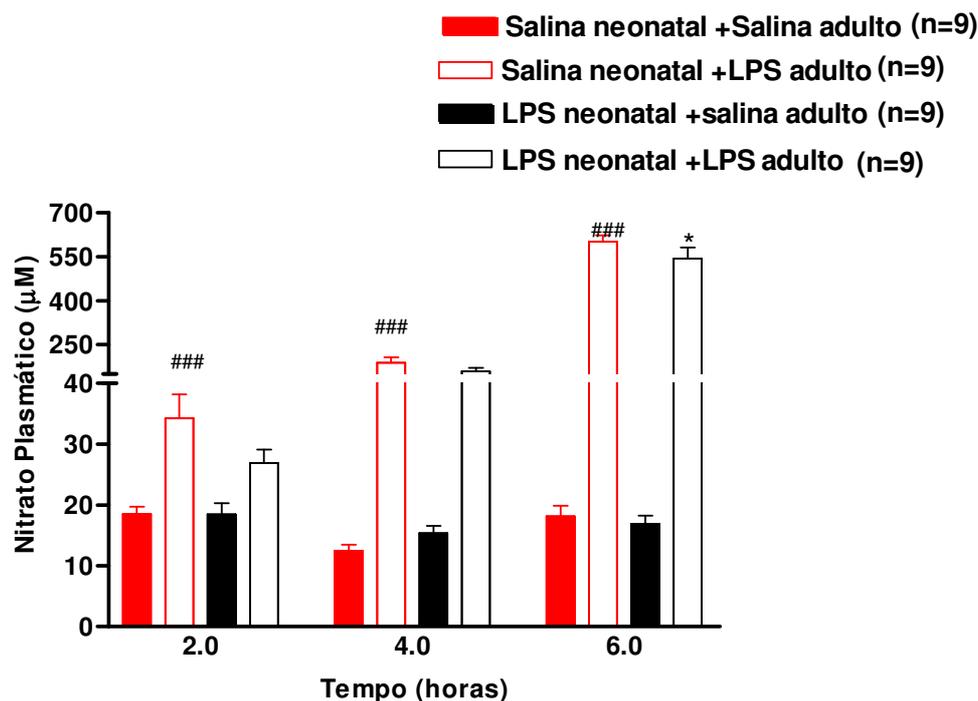


**Figura 9:** Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico. Valores expressos como média  $\pm$  EPM. n= número de animais por grupo. # para  $p < 0,05$  e ## para  $p < 0,01$ , quando os grupos salina neonatal + salina adulto e salina neonatal + LPS adulto são comparados, e \* para  $p < 0,05$  quando os grupos salina neonatal + LPS adulto e LPS neonatal + LPS adulto são comparados. Doses LPS: ( $100 \mu\text{g}/\text{kg}$  i.p. período neonatal;  $10 \text{ mg}/\text{kg}$  i.p fase adulta).

6. Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre as concentrações de nitrato plasmático durante o choque endotoxêmico.

Na figura 10 podemos observar o efeito da administração de LPS no período neonatal sobre a concentração plasmática de nitrato durante o choque endotoxêmico. Os animais que receberam salina neonatal e após 2 a 3 meses a administração de LPS tiveram um aumento significativo de nitrato a partir da quarta hora após a administração de LPS, e aumentou progressivamente até a sexta hora ( $p < 0,01$ ).

A administração de LPS no período neonatal não alterou o padrão de resposta na quarta hora após a administração de LPS, mas na sexta hora houve uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) da concentração de nitrato plasmático no grupo LPS neonatal + LPS adulto em comparação com o grupo salina neonatal + LPS adulto.

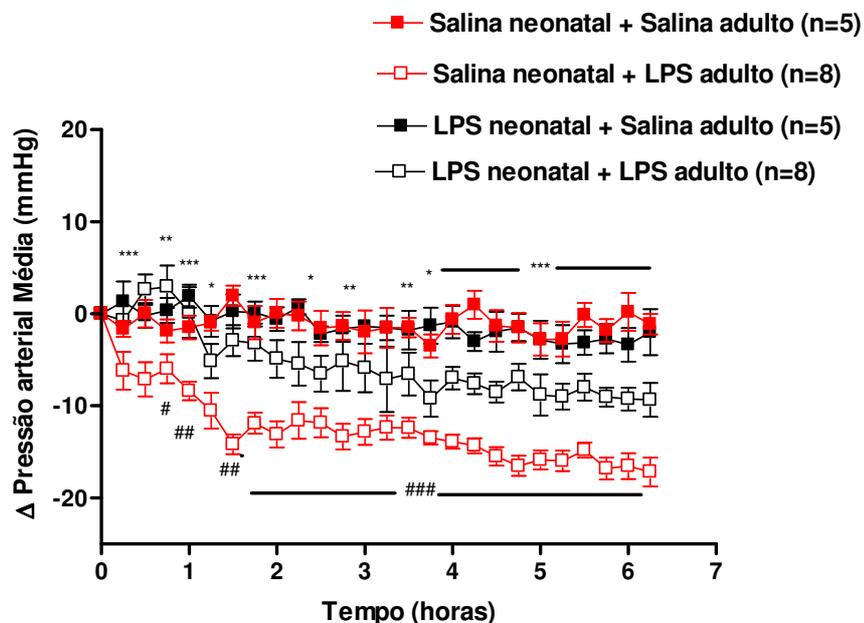


**Figura 10:** Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a concentração plasmática de nitrato durante o choque endotoxêmico. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n= número de animais por grupo. ### para  $p < 0,001$  quando os grupos salina neonatal + salina adulto e salina neonatal + LPS adulto são comparados, e \* para  $p < 0,05$  quando os grupos salina neonatal + LPS adulto e LPS neonatal + LPS adulto são comparados. Doses LPS: (100 $\mu$ g/kg i.p. período neonatal; 10 mg/kg i.p fase adulta).

### 7. Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a pressão arterial e frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico.

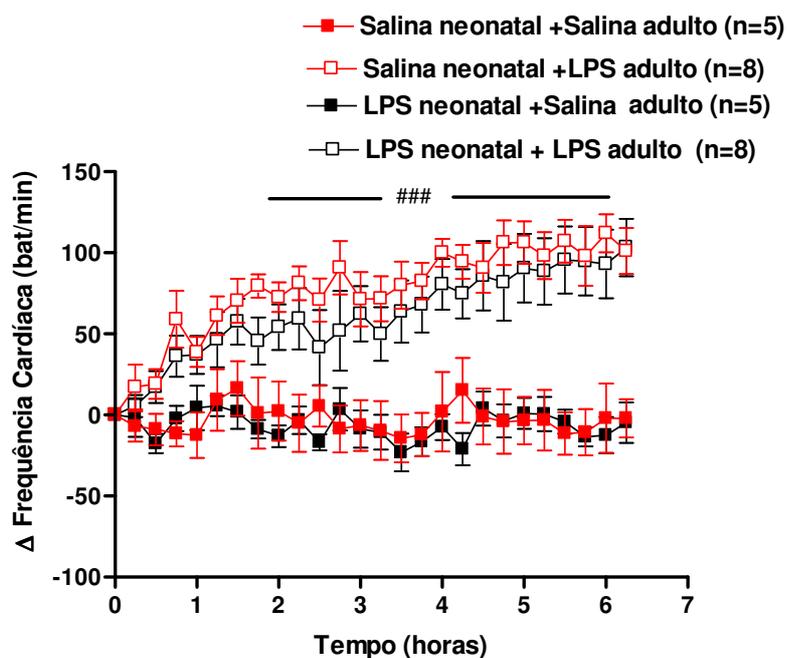
Conforme mostrado na figura 11, podemos observar o efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a variação da pressão arterial média até a sexta hora após a indução do choque endotoxêmico. Os animais que receberam salina neonatal e após 2 a 3 meses receberam a administração de

LPS tiveram uma queda de  $12,75 \pm 1,25$  mmHg em 2 horas após o início do experimento  $p < 0,05$ , ( $-13,45 \pm 1,3$  mmHg para  $p < 0,001$  e  $-18,9 \pm 1,5$  mmHg em 6 horas para  $p < 0,001$ ). A administração de LPS no período neonatal juntamente com outra administração na fase adulta provocou uma atenuação da PAM em 2 horas após o início do experimento ( $p < 0,05$ ), de  $-5,85 \pm 2,5$  mmHg,  $-7,4 \pm 2,2$  mmHg em quatro horas ( $p < 0,05$ ) e  $-10,1 \pm 9,32$  mmHg em seis horas ( $p < 0,001$ ) quando comparados ao grupo que recebeu salina neonatal e após 2 a 3 meses de vida a administração de LPS.



**Figura 11:** Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a pressão arterial média durante o choque endotóxico. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n= número de animais por grupo. Diferença de  $p < 0,05$  #, ## quando  $p < 0,01$  e ### quando  $p < 0,001$ , quando os grupo salina neonatal + salina adulto e salina neonatal + LPS adulto forem comparados. E diferença de  $p < 0,05$  \*, \*\* quando  $p < 0,01$  e \*\*\* quando  $p < 0,001$  quando os grupos salina neonatal + LPS adulto e LPS neonatal + LPS adulto forem comparados. Doses LPS: ( $100\mu\text{g}/\text{kg}$  i.p. período neonatal;  $10\text{ mg}/\text{kg}$  i.p fase adulta).

Na figura 12 podemos observar o efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a frequência cardíaca em ratos tratados como LPS. Os animais que receberam salina no período neonatal e após 2 a 3 meses uma injeção de LPS tiveram um aumento da frequência cardíaca quando comparado ao grupo controle. Este mesmo aumento foi observado no grupo de animais que receberam o pré-tratamento na fase neonatal com LPS ( $p < 0,001$ ). Os grupos salina neonatal + salina adulto e LPS neonatal + salina adulto não apresentaram diferença na frequência cardíaca. Os grupos salina neonatal + LPS adulto e LPS neonatal + LPS adulto também não apresentaram diferença.

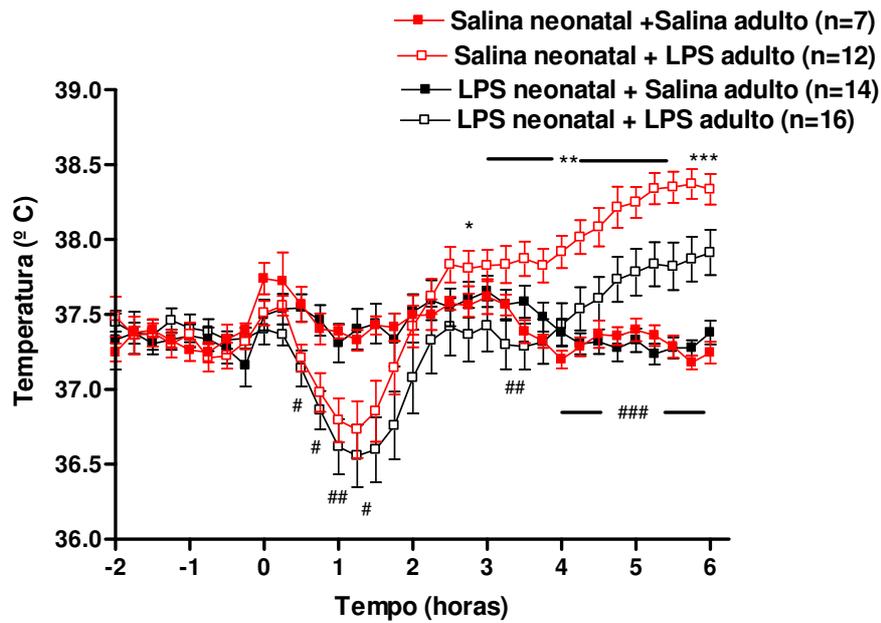


**Figura 12:** Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n= numero de animais por grupo. Diferença de  $p < 0,001$  para ###, quando os animais salina neonatal + salina adulto e salina neonatal + LPS adulto são comparados. Doses LPS: (100 $\mu$ g/kg i.p. período neonatal; 10 mg/kg i.p fase adulta).

8. Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico.

Na figura 13, mostra o efeito da administração de LPS no período neonatal sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico. A partir dos quinze minutos após a administração de LPS pode ser observada uma queda significativa da temperatura corporal ( $p < 0,05$ ), a temperatura mais baixa foi verificada 1 hora e 15 minutos após a administração de LPS no grupo salina neonatal+ LPS adulto comparada ao grupo salina neonatal + salina adulto.

Observamos também uma redução da febre nos animais que receberam a administração de LPS neonatal e após 2 a 3 meses uma nova administração de LPS em relação aos animais que receberam salina neonatal e após 2 a 3 meses uma administração de LPS, a partir de 2 horas e 45 minutos após a injeção de LPS ( $p < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $p < 0,001$ ).



**Figura 13:** Efeito da administração de LPS na fase neonatal sobre a temperatura corporal no choque endotoxêmico. Valores expressos como média  $\pm$  EPM, n= número de animais por grupo. #  $p < 0,05$ , ##  $p < 0,01$  e ###  $p < 0,001$  quando os grupos salina neonatal + salina adulto e salina neonatal + LPS adulto são comparados, e, \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  quando os grupos salina neonatal + LPS adulto e LPS neonatal + LPS adulto são comparados. Doses LPS: (100 $\mu$ g/kg i.p. período neonatal; 10 mg/kg i.p fase adulta).

**Discussão**

## 1. AVP e choque endotoxêmico

Durante o choque endotoxêmico experimental verificamos um aumento da concentração plasmática de AVP na segunda hora após a injeção de LPS. Após esse período a concentração plasmática de AVP caiu, retornando aos valores basais na sexta hora após a administração de LPS (fig.4).

Alguns autores têm observado este aumento transitório da concentração plasmática de AVP após a administração de doses pirogênicas (Kasting e cols, 1985) e doses mais elevadas de LPS que induzem choque em ratos (Giusti-Paiva e cols 2002, Moreto e cols 2006).

Aiura e colaboradores analisaram o padrão de liberação de AVP em macacos. Eles relataram que uma hora e meia após a administração de LPS ocorreu um pico de liberação de AVP. Após a terceira hora foi observado um retorno da concentração plasmática de AVP próxima dos valores basais (Aiura e cols, 1995).

Observamos em nossos experimentos que após a quarta hora da administração de LPS a AVP está mais baixa do que o pico de liberação em duas horas e na sexta hora após a administração de LPS não há diferença significativa entre animais tratados com salina e animais tratados com LPS (fig. 4).

Em contrapartida os níveis pressóricos, seis horas após o início do experimento estariam 20% abaixo da pressão observada durante o período controle (fig 6). Normalmente uma queda semelhante à observada neste modelo experimental seria suficiente para estimular a liberação de AVP (Schiltz e cols, 1997, Yamaguchi e cols, 1998) o que nos leva a acreditar em uma possível deficiência de AVP neste modelo de choque endotoxêmico experimental.

A deficiência de AVP durante o choque endotoxêmico em humanos foi demonstrado por Landry e colaboradores. Em seu trabalho foram estudados pacientes com choque endotoxêmico, que comparados a pacientes com choque cardiogênico, apresentavam concentrações plasmáticas de AVP baixas com o grau de hipotensão similar (Landry e cols, 1997).

Entretanto, neste modelo de choque endotoxêmico a hipotensão pode não ser um dos estímulos para liberação de AVP, pois verifica-se que 6 horas após o início da indução do choque, quando a queda da pressão arterial é mais pronunciada, a liberação de AVP manteve-se próxima a valores basais.

Kasting e colaboradores mostraram que a administração de LPS promoveu a liberação de AVP independente de estímulos fisiológicos conhecidos como aumento da osmolalidade plasmática, queda da pressão arterial sistêmica, diminuição do volume plasmático e aumento da temperatura corporal (Kasting e cols, 1985).

Tem-se observado que a administração de LPS pode estimular diretamente a liberação de AVP em hipotálamos *in vitro* sugerindo que a presença de LPS na circulação poderia estimular diretamente a liberação de AVP, já que em algumas estruturas hipotalâmicas estão presentes receptores para LPS (CD14 e TLR-4 em animais intactos) (Giusti-Paiva e cols, 2002).

Neste mesmo sentido, Matsunaga e colaboradores observaram um aumento da expressão de fos em neurônios vasopressinérgicos no hipotálamo de ratos duas horas após a administração de LPS, que coincide com o aumento da concentração plasmática de AVP observado por nós.

Além disso, várias substâncias do sistema imune produzidas em resposta ao LPS como prostaglandinas, IL-1 $\beta$ , CO e NO podem modular a liberação de

vasopressina (Giusti-Paiva e cols, 2002, Moreto e cols, 2006, Costa e cols, 1993, Hashimoto e cols, 1989).

Hashimoto e colaboradores sugeriram que as prostaglandinas poderiam mediar a liberação de AVP após a injeção de LPS. Tem-se verificado que o receptor para prostaglandina E<sub>2</sub> é expresso em núcleos PVN e SON (Hashimoto e cols, 1989; Matsumara e cols, 1992).

Trabalhos têm mostrado que a IL-1 $\beta$  tem efeito estimulante sobre a secreção de AVP em neuro-hipófises estimuladas eletricamente em preparações in vitro (Chirstensen, 1990). Portanto, a IL-1 $\beta$  poderia ser um mediador da secreção de AVP. Pow e colaboradores demonstraram a presença de microglia na neuro-hipófise de ratos, exibindo a possibilidade de o LPS estimular a secreção de IL-1 $\beta$  pela microglia que então, promoveria a secreção de AVP (Pow e cols, 1990).

Tem-se observado que doses altas de LPS aumentam a concentração plasmática de NO. Vários trabalhos têm mostrado que o aumento da produção de NO pela via iNOS causada em resposta ao LPS possui um papel inibitório importante sobre a liberação de AVP. Giusti-Paiva e colaboradores demonstraram que a injeção intracerebroventricular de aminoguanidina, um inibidor específico da isoforma iNOS da sintase do NO, provoca aumento nas concentrações plasmáticas de AVP na quarta e na sexta hora após a administração de LPS, justamente quando a AVP se encontra em valores basais neste modelo de choque endotoxêmico, sugerindo que o NO possa participar da resposta inibitória na liberação de AVP (Giusti-Paiva e cols, 2002)

Frente a esses achados observamos que o sistema imune através da produção de mediadores inflamatórios em resposta ao LPS pode ter ação

---

estimulatória ou inibitória sobre a atividade de células endócrinas na liberação de hormônios.

Nosso estudo mostra pela primeira vez que a exposição neonatal ao LPS induz aumento da concentração plasmática de AVP durante o choque endotoxêmico (fig 9).

Recentemente, vários estudos têm verificado mudanças na plasticidade imunológica associadas a eventos gestacionais e perinatais, na qual uma única modificação imune pode causar alterações nas respostas do sistema imune inato e endócrino ao longo de toda a vida adulta do animal (Boissé e cols, 2004, Ellis e cols, 2005).

O desenvolvimento programado das funções neuro–imune-endócrinas vem sendo estudado intensamente. O eixo-hipotalamo-hipófise-adrenal é totalmente sensível a influências neonatais e gestacionais e pode alterar a reatividade ao estresse nos animais adultos (Shanks e cols, 2002).

Têm-se mostrado que a exposição de ratas grávidas (período pré-natal) a um fator de estresse como o LPS provoca alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central dos filhotes, aumentando a resposta ao estresse desses animais. A prole dessas ratas exibem alterações permanentes das funções do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, bem como mudanças nas respostas comportamentais (Shanks e cols, 2002).

Nós observamos que o aumento da concentração plasmática de AVP em animais expostos ao LPS no período neonatal durante o choque endotoxêmico experimental ocorreu na quarta e na sexta hora após a administração de LPS. Shanks e colaboradores também mostraram um aumento do conteúdo de AVP, na eminência mediana em animais expostos ao LPS no período neonatal após

---

serem restringidos por 20 minutos quando adultos. Eles também observaram um aumento de CRH na eminência mediana. Sendo assim, parece que a exposição neonatal ao LPS altera o eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal, e também a liberação de AVP. (Shanks e cols, 1995)

Tem-se mostrado que a exposição neonatal à endotoxina diminua a ligação dos glicocorticóides a seus receptores em estruturas que medeiam a inibição do eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal pelos glicocorticóides. Essas alterações podem representar uma via de sinalização para citocinas “programando” a resposta do eixo-hipotálamo-hipófise-adrenal ao estresse. A diminuição dos sítios de receptores de glicocorticóides e assim a mudança de sua sensibilidade em regiões que participam da ativação do eixo hipotálamo-hipófise adrenal, pode reduzir a inibição tônica da síntese de AVP e CRH, resultando em aumento da liberação de ACTH em resposta ao estresse (Shanks e cols, 1995). Sendo assim, parece que a exposição a endotoxina na fase neonatal altera o eixo hipotálamo-hipófise–adrenal ao estresse por influenciar o desenvolvimento da expressão de receptores de glicocorticóides em populações neuronais que regulam a atividade do eixo-hipotálamo-hipófise adrenal.

Os mecanismos desta resposta não são claros, entretanto, é possível que a liberação de citocinas após a exposição à endotoxina pode alterar a ligação de glicocorticóides ao seu receptor. Tal fato justifica-se, pois numerosas citocinas como IL-1 e IL-6 são liberadas por vários tecidos após a exposição ao LPS e pode atravessar a barreira cerebral, alterando a ligação de glicocorticóides ao seu receptor em estruturas cerebrais em animais adultos. (Weidenfeld e cols, 1988; Banks e cols, 1993)

Interessante o fato em que a manipulação neonatal pode aumentar o contato entre a mãe e o filhote, resultando em diminuição da expressão de RNAm para o CRH e redução da ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em resposta ao estresse. Estes efeitos podem ser devidos ao aumento da expressão de receptores de glicocorticóides no hipocampo e no córtex frontal, um modelo exatamente oposto à exposição neonatal à endotoxina (Shanks e cols, 1995).

Sendo assim, a exposição neonatal a produtos bacterianos como o LPS, pode influenciar alterações de comportamentos modificando a resposta do sistema nervoso central, imune e endócrino frente a uma nova situação de estresse.

Os animais que tiveram contato prévio com o produto bacteriano reagem diferentemente a uma nova exposição a ele, comparados aos animais que nunca tiveram contato antes com o antígeno.

## **2. NO e hipotensão durante o choque endotoxêmico**

Durante o choque endotoxêmico experimental, observamos um aumento gradual nas concentrações plasmáticas de NO até a sexta hora de experimento (fig 5).

Paya e colaboradores mostraram a ativação da eNOS nos primeiros estágios do choque que poderia ser responsável pela queda inicial da PAM. Este aumento da eNOS poderia causar vasodilatação e conseqüentemente queda da resistência periférica, resultando assim em queda da PAM. Entretanto, Mitchell e colaboradores demonstraram que duas horas após a indução da endotoxemia ocorre um aumento da produção de NO devido à iNOS. Este aumento coincide

com a queda acentuada da PAM que ocorre duas horas após a injeção de LPS. Sendo o NO um vasodilatador potente, sugere-se a ação do NO na modulação da PAM durante o choque endotoxêmico (Paya e cols, 1993).

Além do aumento das concentrações plasmáticas de NO, a presença de LPS na circulação promove ainda elevação da concentração de TNF $\alpha$  (Forfia e cols, 1998; Meldrum e cols, 1998). Este aumento é transitório e a partir da sexta hora esta citocina não é mais detectada na circulação. O TNF $\alpha$  provoca diminuição da contratilidade miocárdica, redução da fração de ejeção cardíaca, hipotensão e diminuição da resistência vascular periférica (Ellrodt e cols, 1985).

Em nossos resultados, observamos que a exposição neonatal ao LPS reduziu a concentração de nitrato plasmático somente na sexta hora após a administração de LPS enquanto a hipotensão nesses animais foi atenuada durante todo o período de experimento (6 horas) (fig 11)

Os mecanismos pelos quais a exposição neonatal ao LPS atenuou a hipotensão em animais submetidos a uma outra dose de LPS não são bem entendidos.

Nós acreditamos que a atenuação da hipotensão nos animais expostos ao LPS na fase neonatal pode estar relacionada ao aumento da concentração plasmática de AVP. Além disso, como o NO é um vasodilatador potente, encontra-se em concentrações mais baixas na sexta hora após a injeção de LPS, nos animais que foram expostos ao LPS no período neonatal, sugere-se também uma relação entre a diminuição da concentração de NO e a atenuação da hipotensão observada na sexta hora.

Em relação à frequência cardíaca, observamos um aumento da FC uma hora e meia após a administração de LPS (fig 7). Nossos dados estão de acordo

---

com dados do laboratório que demonstraram aumento da FC após a injeção de LPS (Moreto e cols, 2006; Stabile e cols, 2007). O aumento da frequência cardíaca pode ser uma ação reflexa à queda da pressão arterial, podendo agir como um mecanismo compensatório à queda da pressão arterial. Os animais que foram expostos ao LPS neonatal não tiveram alterações na resposta induzida pelo LPS na fase adulta (fig.12)

Nenhum estudo anterior mostrou uma diminuição na concentração plasmática de NO em animais expostos ao LPS neonatal frente a uma outra exposição na fase adulta, conforme observada por nós (fig. 10)

Em humanos vários estudos têm mostrado que fenômenos ambientais, como níveis de poeira, contato com endotoxina e presença de cachorros e gatos na infância são fenômenos capazes de alterar o desenvolvimento imunológico de crianças durante toda a sua vida adulta (Mutius e cols, 2000). Em adição, tem –se demonstrado que animais de experimentação expostos à endotoxina durante as primeiras semanas de vida apresentam não só alterações no desenvolvimento do sistema endócrino e nervoso, mas também mudanças na predisposição para doenças inflamatórias (Shanks e cols, 1999).

Wang e colaboradores verificaram em animais expostos ao LPS no período neonatal, um aumento da citocina IL-10 responsável por proteger o desenvolvimento de asma alérgica regulando células T<sub>H</sub> 1 e T<sub>H</sub>2, diminuindo assim, alergias fenotípicas nesses animais quando adultos (Wang e cols, 2006).

Bilbo e colaboradores demonstraram um aumento na expressão gênica de IL-1 $\beta$  e IL-10 em animais expostos ao LPS no período neonatal frente a uma outra exposição na vida adulta (Bilbo e cols, 2005).

Sendo assim a exposição neonatal ao LPS parece uma espécie de mudança "programada" nos níveis de fatores pró-inflamatórios quando esses animais ou humanos entram novamente em contato com produtos bacterianos. A ativação do sistema endócrino e do sistema imune durante o desenvolvimento neonatal poderia "programar" ou "recompôr" ambos os sistemas (Shanks e cols, 1999).

### **3. Temperatura Corporal e choque endotoxêmico**

Durante o choque endotoxêmico experimental, o LPS promoveu uma resposta bifásica na temperatura corporal. Trinta minutos após a administração de LPS ocorreu uma queda da temperatura corporal (hipotermia), permanecendo assim até a segunda hora após a indução do choque endotoxêmico. Entretanto, após a terceira hora ocorreu um aumento progressivo da temperatura corporal, que permaneceu elevada até o final do experimento (fig. 8).

Tem-se demonstrado que a injeção de LPS em roedores tem uma natureza heterogênea nas respostas termorregulatórias, na qual hipotermia e febre podem ocorrer. (Dogan e cols, 2002).

Recentes evidências experimentais têm mostrado que a hipotermia induzida pelo LPS é uma diminuição regulada da temperatura corporal, na qual vários mecanismos termorregulatórios estão envolvidos para mediar esta resposta (Dogan e cols, 2002).

Tollner e colaboradores demonstraram que o TNF $\alpha$  pode ser um dos mediadores desta resposta, na qual animais que receberam a administração de uma proteína que neutraliza os efeitos do TNF $\alpha$ , apresentaram uma rápida

---

recuperação da fase hipotérmica em resposta à injeção de doses altas de LPS, sugerindo que o TNF $\alpha$  possa participar preferencialmente na manutenção da hipotermia induzida pelo LPS (Tollner e cols, 2000).

Corroborando com esses achados, Leon e colaboradores demonstraram que camundongos nocautes para o receptor de TNF $\alpha$  apresentaram uma rápida recuperação da hipotermia e desenvolveram febre mais precocemente do que os seus respectivos controles, indicando que durante a endotoxemia o TNF $\alpha$  pode ser uma das substâncias envolvidas nesse processo (Leon e cols, 1998).

Tem-se demonstrado também, a participação da AVP na termorregulação.

Steiner e colaboradores administraram periféricamente um antagonista do receptor V1 e verificaram um aumento da temperatura corpórea e quando esse mesmo antagonista era administrado centralmente (icv) ele bloqueava a hipotermia induzida pelo LPS (Steiner e cols, 1998). Além disso, Giusti-Paiva e colaboradores verificaram supressão da hipotermia após a administração de um antagonista V1 antes da administração de LPS, sugerindo que a liberação periférica de AVP induzida pelo LPS participa da hipotermia observada durante o choque endotoxêmico experimental (Giusti-Paiva e cols, 2003).

A febre observada a partir da terceira hora após a administração de LPS é um dos sinais termorregulatórios mais comuns em resposta a uma inflamação sistêmica. (Giusti-Paiva e cols, 2003)

Tem-se demonstrado o efeito benéfico da febre durante a infecção, pois ocorre aumento da proliferação de células do sistema imune, prejudicando o crescimento e multiplicação de microorganismos, bem como redução nas

---

concentrações de zinco e ferro que são essenciais para o crescimento e multiplicação de microorganismos. (Kluger e cols, 1979)

Várias evidências têm apontado a prostaglandina E2 (PGE2) como um mediador essencial da resposta febril. É sabido que a PGE2 se liga ao receptor de prostaglandina Ep3, estimulando a síntese e liberação de AMPc, na qual age como um neurotransmissor, ativando neurônios termossensíveis e aumentando a temperatura corporal (Walker e cols, 2006). A prostaglandina é sintetizada pela ciclooxigenase 2 (COX 2) e inibidores seletivos dessa enzima reduzem a resposta febril induzida pelo LPS. Além disso, camundongos nocautes para o gene da COX2 são incapazes de desenvolverem febre em resposta à injeção de LPS intraperitoneal. (Li e cols, 2001).

Recentemente numerosos estudos têm apontado o NO como um importante modulador da resposta febril em situações de estresse (Steiner e cols, 2001; Giusti-Paiva e cols, 2003).

De Paula e colaboradores administraram um bloqueador inespecífico da NOS e verificaram que o bloqueio do NO sistêmico, provocou uma atenuação significativa da temperatura corporal em resposta à injeção de LPS quando se fez a comparação com seus respectivos controles. A administração deste mesmo bloqueador centralmente (icv) induziu um aumento da resposta febril nesses animais, indicando que o NO tem efeitos termorregulatórios diferentes, atuando como uma molécula pirética no sistema periférico e antipirética no sistema nervoso central. (de Paula e cols, 2000).

Assim, os mecanismos envolvidos na termorregulação durante o choque endotoxêmico não são bem entendidos. De um lado tem-se a via inflamatória, envolvendo a produção de citocinas, a síntese de NO pela enzima NOS. De outro,

tem-se uma outra via, o sistema endócrino e antipirético, envolvendo o eixo-hipotálamo-hipófise adrenal, a liberação de AVP e o hormônio melanócito estimulante  $\alpha$  induzindo a liberação de outros hormônios e talvez outras moléculas que limitam a extensão da febre (Giusti-Paiva e cols; 2003).

Em nosso trabalho, observamos que a febre induzida por LPS foi atenuada quando os animais foram pré-expostos à endotoxina na fase neonatal durante o choque endotoxêmico experimental. Vários autores têm mostrado resultados similares neste mesmo modelo (Fig. 13).

Boissé e colaboradores verificaram uma atenuação da resposta febril em animais pré-tratados com LPS no período neonatal. Além disso, eles observaram uma diminuição na expressão gênica da COX 2 no hipotálamo desses animais. (Boissé e cols, 2004).

Walker e colaboradores observaram o mesmo padrão de resposta, usando um outro protocolo experimental. Eles administraram LPS nos dias 3 e 5 após o nascimento dos filhotes (na dose de 0,05 mg/kg) e nos animais adultos (na dose 100  $\mu$ g/kg), e, verificaram uma atenuação da febre (Walker e cols, 2006).

Os mecanismos que levam a exposição neonatal ao LPS alterar a resposta febril frente a uma outra exposição ao LPS na fase adulta são pouco entendidos.

Estudos recentes têm mostrado um aumento nas concentrações de glicocorticóides em animais expostos ao LPS neonatal, uma hora após a injeção de LPS quando adultos. Esses animais também apresentaram uma diminuição das concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias como IL-6 e TNF $\alpha$  (Ellis e cols, 2005).

Um dos fatores que poderiam atenuar da febre em resposta ao LPS seria a diminuição de citocinas pró-inflamatórias devido a um aumento das concentrações plasmáticas de glicocorticóides. Sabe-se que os glicocorticóides podem agir como um antipirético endógeno, induzindo a síntese da proteína inibitória de NF- $\kappa$ B. A ativação desta proteína induz diminuição da transcrição de citocinas pró-inflamatórias, bem como redução da expressão da COX 2, diminuindo assim, a produção de prostaglandinas.(Ellis e cols, 2005).

Além disso, várias evidências experimentais têm apontado a AVP como um dos principais neuropeptídeos antipiréticos. A resposta febril causada por injeções de LPS, ou prostaglandina pode ser reduzida por microinjeções de AVP dentro de uma área circunscrita do cérebro, a área septal ventral. Em ratos, essa área é inervada por células AVP imunorreativas e ativada durante a febre. (Roth, 2006 *review*).

Em nossos resultados, a exposição neonatal ao LPS aumentou a concentração plasmática de AVP na quarta e sexta hora após a administração de LPS e é justamente nessas horas em que a resposta febril ao LPS está mais acentuada. Sendo assim, podemos especular que a atenuação desta resposta em parte seria provocada pelo aumento de AVP, que agindo como uma substância antipirética em resposta ao LPS, estaria controlando a temperatura corporal desses animais.

Além disso, sendo o NO uma molécula pirética no sistema periférico, a diminuição de sua concentração plasmática em animais expostos ao LPS na fase neonatal, pode ser também um dos fatores responsáveis pela atenuação da resposta febril na sexta hora após a administração de LPS.

**Conclusões**

1. O modelo experimental de choque endotoxêmico induzido pela administração de doses altas de LPS caracteriza-se por elevação transitória das concentrações de AVP, queda da pressão arterial média, aumento da frequência cardíaca, queda transitória da temperatura corporal durante as duas primeiras horas após a administração de LPS seguida por um aumento até o fim do experimento e um aumento nas concentrações de nitrato plasmático.

2. A exposição neonatal ao LPS eleva as concentrações plasmáticas de AVP e diminui as concentrações plasmáticas de NO. Essas alterações podem ser responsáveis pela atenuação da hipotensão e da febre durante o choque endotoxêmico.

## **Referências Bibliográficas**

- ADEREM, A. Role of toll-like receptors in inflammatory response in macrophages. **Crit Care Med.**, 29:S16-S18, 2001.
- AIURA, K.; UEDA, M.; ENDO, M.; KITAJINA, M. Circulating concentration and physiologic role of atrial natriuretic peptide during endotoxic shock in the rat. **Crit Care Med.**, 23:1898-1966,1995.
- AKASHI, S.; OGATA. H.; KIRIKAE. F.; KIRIKAE. T.; KAWASAKI. K.; NISHIJIMA, M.; SHIMAZU, R.; NAGAI, Y.; FUKUDOME, K.; KIMOTO, M.; MIYAKE, K. Regulatory roles for CD14 and phosphatidylinositol in the signaling via Toll-like receptor 4-MD-2. **Biochem Bioph Res Comm.**,268:172-177, 2000.
- ALEXANDER, C.; RIETSCHHEL, E.T. Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. **J Endotoxin Res.**, 7:167-203, 2002.
- AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/ SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS CONFERENCE: Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Chest.**, 101:1644-1655, 1992.
- ANDERSON, K.U. Toll signaling pathways in the innate response. **Curr Opin Immunol.**, 12:13-19, 2000.
- ANDERSSON, J.; NAGY, S.; BJORK, L.; ABRAMS, J.; HOLM, S.; ANDERSSON, U. Bacterial toxin-induced cytokine production studied at the single-cell level. **Immunol Rev.**, 127:69-96, 1992.
- ANNANE, D. ; BELLISSANT, E. ; CAVAILLON, J.M. Septic shock. **Lancet.**, 365:63-78, 2005.
- BAINS, J.R.; FERGUSON, A.V. Angiotensin II neurotransmitter action in paraventricular nucleus are potentiated by nitric oxide synthase inhibitor. **Regul Pept.**, 50:53-59, 1994.

- BANKS,W.A.; KASTIN, A.J.; GUTIERREZ, E.J. Interleukin 1 alpha in blood has access to cortical brain cells. **Neurosci Lett** 163:41-44, 1993.
- BATTAGLIA, D.F; BROWN, M.E.; KRASA, H.B, THRUN, L.A; VIGUIE, C., KARSCH, F.J. Systemic challenge with endotoxin stimulates corticotropin-releasing hormonal and arginine vasopressin secretion into hypophyseal portal blood:coincidence with gonadotropin-releasing hormonal suprecion. **Endocrinology.**, 139:4175-4181,1998.
- BEUTLER, B. Sepsis and evolution of the innate immune response. **Crit Care Med.**, 29:S2-S7, 2001.
- BEUTLER, B. TLR4; central component of the sole mammalian LPS sensor. **Curr Opin Immunol.**, 12:20-26, 2000.
- BILBO, S.D.; BIEDENKAPP, J.C.; DER-AVAKIAN. A.; WATKINS, L.R.; RUDY, J.W.; MAIER. S.F. Neonatal infection-induced memory impairment after lipopolysaccharide in adulthood is prevented via caspase-1 inhibition. **Neurosc.**, 25(35):8000-8009, 2005.
- BIRNHAUMER, M. Vasopressin receptor.**Trends Endocrinol Metab.**, 11:406-410, 2000.
- BOISSE, L. ; MOUIHATE. A.; ELLIS, S. ; PITTMAN, Q.J. Long term alteration in neuroimmune responses after neonatal exposure to lipopolysaccharide. **J Neurosci.**, 24(21):4928-4934, 2004.
- BONE, R.C. Gram positive organisms and sepsis. **Arch Intern Med.**, 154, 26-34, 1994.
- BONE, R.C. The pathogenesis of sepsis. **Ann Int Med.**, 115:457-469,1991.
- BRACKETT, D.J.; SCHAEFER, C.F.; TOMPKINS. P. Evaluation of cardiac output, total peripheral vascular resistance, and plasma concentrations of vasopressin

- in the conscious, unrestrained rat during endotoxemia. **Circ shock.**, 17:273-284, 1985.
- CÁRNIO, E.C.; MORETO, V.; GIUSTI-PAIVA, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. **Endocr Metab Imunne Disord Drug Targets.**, 6:137-142. 2006
- CHABY, R. Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders. **DDT.**, 4:209-221, 1999.
- CHOW, J.C.; YOUNG, D.W.; GOLENBOCK, D.T.; CHIRST, W.J.; GUSOVSKY, F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-nduced signal transduction. **J Biol Chem.**, 274:10689-10692, 1999.
- CHRISTENSEN, J.D; HANSEN, W.E.; FJALLAND, B. Influence of interleukin-1-beta on secretion of oxytocin and vasopressin from the isolated rat neurohypophysis. *Pharmacol and Toxicol*, 67:81-83,1990.
- COBB, J.P.; DANNER, R.L. Nitric oxide and septic shock. **JAMA.**, 275:1192-1196, 1996.
- COLEMAN, J.W. Nitric oxide in immunity and inflammation. **Int. Immunopharmacol.**, 8:1397-406, 2001.
- COSTA, A.; TRAINER, P.; BESSER, M.; GROSMAN, A. Nitric oxide modulates the release of corticotrophin-releasing hormone from the rat hypothalamus in vitro. **Brain Res.**, 605:187-192,1993.
- DADOUN, F.; GUILLAUME, V.; SAUZE, N.; FARISSE, J.; VELUT, J.G.; ORSONI, J.C.; GAILLARD, R; OLIVER, C. Effect on endotoxin on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in sheep. **Eur J Endocrinol.**, 138: 193-197,1998.

- DANTZER, R. Cytokine-Induced Sickness Behavior: Mechanism and Implication **.Ann N Y Acad Sci.**, 933: 222-234, 2001.
- DE PAULA, D.; STEINER, A.A.; BRANCO, L.G.S. The nitric oxide pathway is an important modulator of stress-induced fever in rats. **Physiol Behav.**, 70:505-511,2000.
- DERIJK, R.H.; BERKENBOSCH, F. Hypotermia to endotoxin involves the cytokine, tumor necrosis factor and neuropeptide vasopressin in rats. **Am J Physiol.**, 35:R9-R14, 1994.
- DOGAN, M.D.; ATAOGU, H.; AKARSU, E.S. Characterization of the hypothermic component of LPS-induced dual thermoregulatory response in rats. **Brain Res Bull.**, 57(2): 179-185. 2002.
- DUSTIN, G.J.; MAC DONALDS, P.S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. **Ann. Med.**, 27:395-406, 1995.
- ELLIS, S.; MOUIHATE, A. ; PITTMAN, Q.J. Early life immune challenge alters innate immune responses to lipopolysaccharide: implications for host defense as adults. **FASEB.**, 19(11):1519-1521, 2005.
- ELLROT, A.G.; RIEDINNER, M.S.; KINCHI, A.; BERMAN, D.S.; MADDAHI, J.; SWAN. H.J.C.; MURATA, G.H. Left ventricular performance in septic shock: reversible segmental and global abnormalities. **Am Heart J.**, 110:402-409, 1985.
- FINKEL, M.S.; ODDIS, C.V.; JACOB, T.D.; WATKINS, S.C.; HATTLES, B.G.; SIMMONS, R.L. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. **Science.**, 257:387-389, 1992.
- FORFIA, P.R.; ZHANG, X.; OCHOA, M.; XU,X.; BERNSTEIN, R.; SEHGAL, P.B.; FERRERI, N.R.; HINTZE, T.H. Relationship between plasma Nox and cardiac

- and vascular dysfunction after LPS infection in anesthetized dogs. **Am J Physiol.** 274:H193-H201, 1998.
- FRANCIS, D.; LIU, D.; BRAKE, W.; MEANEY, M.J. Maternal care, gene expression, and the development of individual differences in stress reactivity. **Ann NY Acad Sci.**, 896: 64-84, 1999.
- FURCHGOTT, R.T.; ZAWADZKI, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. **Nature.**, 288:373-376, 1980.
- GARRARD, C.S.; KOTOYANNIS, D.A.; PIEPOLI, M. Spectral analysis of heart rate variability in the sepsis syndrome. **Clin Auton Res.**, 3:5-13, 1993.
- GIUSTI-PAIVA, A.; BRANCO, L.G.S.; DE CASTRO, M.; ANTUNES RODRIGUES, J.; CÁRNIO, E.C. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflugers Arch.**, 447(2):175-180. 2003
- GIUSTI-PAIVA, A.; DE CASTRO, M.; ANTUNES- RODRIGUES, J.; CARNIO, E.C. Inducible nitric oxide synthase in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med.**, 30:1306-1309, 2002.
- GUIX, F.X.; URIBESALGO, F.; COMA, M., MUNOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in brain. **Prog Neurobiol.**, 76(2):126-152, 2005.
- HASHIMOTO, H; NOTO, T; NAKAJIMA, T. Prostaglandins leukotriene essent. **Fatty Acids**, 36:9-14, 1989
- HEUMANN, D.; GLAUSER, M.P.; CALANDRA, T. Molecular basis of host-pathogen interaction in septic shock. **Curr Opin Microbiol.**, 1:49-55, 1998.
- HIRATA, Y.; HAKAYKAWA, H.; KAKOKI, M.; TOJO, A.; SUZUKI, E.; NAGATA, D.; KIMURA, K.; GOTO, A.; KIKUCHI, K.; NAGANO, T.; HIROBI, M.; OMATA, M.

- Receptor subtype for-vasopressin induced release of nitric oxide from rat kidney. **Hypertension.**, 29:58-64,1997.
- HOLMES, C.L.; PATEL, B.M.; RUSSEL, J.A.; WALLEY, K.R. Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. **Chest.**, 120:989-1002, 2001.
- INGALLS, R.R.; GOLENBOCK, D.T. CD11c/CD18,a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide. **J Exp Med.**, 181:1473-1479, 1995.
- ITOH, S. Effect of vasopressin on lipid metabolis. In: Integrative mechanism of neuroendocrine system. **Sapporo.**, *Japan* 175-197, 1980.
- JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiol Rev.**, 59 (4): 533-547, 1995.
- JEAN-BAPTISTE, E. Cellular mechanisms in sepsis. **J Intensive Care Med.**, 22:63-72, 2007.
- KADECARO, M.; TENELL, M.L.; HARMAM, P.; SUMMY, L.J.Y. Central inhibition of nitric oxide synthase attenuates water intake but does not alter enhanced glucose utilization in the hypothalamo-neurohypophysial system of dehydrated rats. **Neurosci Lett.**, 173:115-118, 1994.
- KARIMA, R.; MATSUMOTO, S.; HIGASHI, H.; MATSUSHIMA, K. The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. **Mol Med Today.**, 5:123-132, 1999.
- KASTING, N.W.; MAZUREK, M.F.; MARTIN, J.B. Endotoxin increase vasopressin release independently of know physiological stimuli. **Am J Physiol.**, 248:E420-E424, 1985.

- KIRKEBOEN, K.A.; NAESS, P.A.; OFFSTAD, J.; ILEBEKK, A. Effects of regional inhibition of nitric oxide synthesis in intact porcine hearts. **Am J Physiol.**, 262:F939-F942, 1994.
- KITCHENS, R.L.; WOLFBAUER, G.; ALBERS, J.J.; MUNFORD, R.S. Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. **J Biol Chem.**,274:34116-34122, 1999.
- KLUGER, M.J.; ROTHENBURG, B.A. Fever and reduced iron: their enteraction as a host defense response to bacterial infection. **Science.**, 203:374-376, 1979.
- LANDRY, D.W.; LEVIN, H.R.; GALLANT, E.M. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilatation of septic shock. **Circ.**, 95:1122-1125, 1997.
- LEON, L.R.; WHITE, A.A.; KLUGER, M.J. Role of IL-6 and TNF in thermoregulation and survival during sepsis in mice. **Am J Physiol.**, 275 (1):R269-277,1998.
- LI, S.; BALLOW, L.R.; MORHAM, S.G.; BLATTEIS, C.M. Cyclooxygenase-2 mediates the febrile response of mice to interleukin-1 $\beta$ . **Brain Res.**, 910:163-173, 2001.
- MARLETTA, M.A. Nitric oxise synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell.**, 78:927-930,1994
- MATHISON, J.C.; TOBIAS, P.S.; WOLFSON, E.; ULEVITCH, R.J. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein: A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. **J Immunol.**, 149:200-206, 1992.
- MATSUMARA, K.; WATANABE, K.; IMAI-MATSUMARA, K.; CONNOLLY, M.; KOYAMA, Y.; ONOE, H.; WATANABE, Y. Mapping of prostaglandin E2 binding sites in the rat brain using quantitative autoradiography. **Brain Res**, 858:9-18, 2000.

- MATSUNAGA, W.; MIYATA, S.; TAKAMATA, A.; BUN, H.; NAKASHIMA, T.; KIYOHARA, T. LPS-induced Fos expression in oxytocin and vasopressin neurons of the rat hypothalamus. **Brain Res.**, 858:9-18,2000.
- MC CANN, S.M.; KARANTH, S.; KAMAT, A.; LES DEES, W.; LYSON, K.; GIMENO, M.; RETTORI, V. Induction by cytokines of the pattern of pituitary hormone secretion in infection. **Neuroimmunol.**, 1(1)2-13, 1994.
- MEANEY, M.J (in press): Early experience effects on HPA function-a basis for individual differences. In Mc Ewen BS and Stellar E, editors. **Handbook of physiology: Coping with the environment.** NY: Oxford University Press.
- MEANS, T.K.; GOLENBOCK, D.T.; FENTON, M.J. The biology of toll-like receptors. **Cytokine Grow Factor Rev.**, 11:219-232, 2000.
- MELDRUM, D.R. Tumor necrosis factor in the heart. **Am J Physiol**, 274:R557-R595, 1998.
- MENG, F.; LOWELL, C.A. Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. **J Exp Med.**, 185:1661-1670, 1997.
- MONCADA, S. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol., Reviews**, 43(2): 109-142, 1991.
- MOREIRA, A.C.; ELIAS, L.L.K.; LEAL, A.M.O.; BUENO, L.; ROSSI, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Radioimunoensaio da vasopressina: Montagem e padronização. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, 56:54, 1995
- MORETO, V.; STABILE, A.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CÁRNIO, E.C. Role of heme-oxygenase pathway on vasopressin deficiency during endotoxemic shock-like conditions. **Shock.**,26(5): 472-476. 2006.

- MUTIUS, E.V.; FAHRLANDER, B.C.; SCHIERL, R.; RIEDLER, J.; EHLERMANN, S.; MAISCH, S.; WASER, M. NOWAK, D. Exposure to endotoxin or other bacterial components might protect against the development of atopy. **Clin Exp Allergy**, 30:1230-1234, 2000.
- NORTH, W.G. Biosynthesis of vasopressin and neurophysin. In vasopressin: Principles and properties. **Plenus Press**, New York, 1997.
- O DONNELL, D.; LAROCQUE, S.; SECKL, J.R.; MEANEY, M.J. Postnatal handling alters glucocorticoid, but not mineralocorticoid mRNA expression in adult rats. **Mol Brain Res**, 26:242-248, 1994.
- OGNIBENE, E.P.; PARKER, M.M.; NATANSON, C.; SHELHAMER, J.H.; PARRILO, J.E. Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. **Chest**, 93:903-910, 1988.
- OKUNO, A.; YAMOMOTO, M.; ITOH, S. Lowering of the body temperature induced by vasopressin. **Jpn J Physiol**, 15:378-387, 1965.
- OTA, M.; CROFTON, J.T.; FSTAVAN, G.T.; SHARE, L. Evidence that nitric oxide can act centrally to stimulate vasopressin release. **Neuroendocrinology**, 57:955-959, 1993.
- OUDEN, D.T.D.; MEINDERS, A.E. Vasopressin: physiology and clinical use in patients with vasodilatory shock: a review. **Neth J Med**, 63: 4-12, 2005.
- PARRILO, J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, 328:1471-1477, 1993.
- PAYA, D.; GRAY, G.A.; FLEMING, I.; STOCLET, J.C. Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by E.coli lipopolysaccharide in rats. **Circ Shock**, 41 (2):103-112, 1993.

- PEROTTI, C.A.A.; NOGUEIRA, S.M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CÁRNIO, E.C. Effects of Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor on Lypopolysaccharide induced fever. **Braz J. Med Biol Res.**, 32(11):1381- 1387, 1999.
- RAETZ, C.R. Gram negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. **FASEB.**, J 5:2652-2660, 1991.
- RANGEL-FRAUSTO, M.S. Sepsis: still going strong. **Arch med Res.**, 36:672-681, 2005.
- REID, I.A: Role of vasopressin deficiency in vasodilatation of septic shock. **Circ.**, 95:1108-1110, 1997.
- ROBBINS, R.A.; GRISHAM, M.B. Nitric oxide. **Int J Biochem Cell Biol.**, 29:857-860,1997.
- ROMANOVSKY, A.A.; SHILDO, O.; SAKURADA, S.; SUGIMOTO, N.; NAGASAKA, T. Endotoxin shock: thermoregulatory mechanisms. **Am J Physiol.**, 270:R693-R703, 1996.
- ROSSELET, A.; FEIHL, F.; MARKET, M.; GNAEGI, A.; PERRET, G.; LIAUDET, L. Selective iNOS inhibitor is superior to norepinephrine in the treatment of rat endotoxic shock. **Am J Respir Crit Care Med.**, 157:162-170, 1998.
- ROTH, J. Endogenous antipyretics. **Clin Chim Acta.**, 371:13-24, 2006.
- SARRIEAU, A.; SHARMA, S.; MEANEY, M.J. Postnatal development and environmental regulation of hippocampal glucocorticoid and mineralocorticoid receptors in the rat. **Dev Brain Res.**, 43:158-162, 1988.
- SCHILTZ, J.C.; HOFFMAN, G.E.; STRICKER, E.M.; SUED, A.F. Decrease in arterial pressure activate oxytocin neuron in conscious rats. **Eur J Endocrinology.**, 138: 206-215, 1998.

- SHAN, Q.; BOURRELA, D.J. Cardiac and Vascular Effects of nitric oxide synthase inhibition in lipopolysaccharide treated rats. ***Eur J Pharmacol.***, 406(2): 257-264, 2000.
- SHANKS, N.; LAROCQUE, S.; MEANEY, M.J. Neonatal endotoxin exposure alters the development of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: Early illness and later responsivity to stress. ***J Neurosci.***, 15(1):376-384, 1995.
- SHANKS, N.; WINDLE, R.J.; PERKS, P.A.; HARBUZ, M.S.; JESSOP, D.S.; COLIN, I.D.; LIGHTMAN, S.L. Early-life exposure to endotoxin alters hypothalamic-pituitary-adrenal function and predisposition to inflammation. ***Proc. Natl. Acad. Sci.***, 97:5645-5650. 2000.
- SHANKS, N. Early life environment: does it have implications for predisposition to disease? ***Blackwell Munksgaard.***, 14:292-302.2002
- SHARSHAR, T.; CARLIER, R.; BLANCHARD, A.; FEYDY, A.; GRAY, F.; PAILLARD, M.; RAPHAEL, J.C.; GAJDOS, P.; ANNANE, D. Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. ***Crit Care Med.***, 30(3): 497-500, 2002.
- SHUMANN, R.R.; LEONG, S.R.; FLAGGS, G.W.; GRAY, P.W.; WRIGHT, S.D.; MATHISON, J.C.; TOBIAS, P.S.; ULEVITCH, R.J. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. ***Science.***, 1249-1429, 1990.
- SILVA, E.; PEDRO, M.A.; SOGAVAR, A.C.; MOHOVIC, T.; SILVA, C.L. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). ***Crit. Care Méd.***, 8:R251-R260, 2004.
- SIMMONS, W.W.; UNGUREANU-LONGROIS, D.; SMITH, G.K.; SMITH, T.W.; KELLY, R.A. Glucocorticoids regulate inducible nitric oxide synthase by

- inhibiting tetrahydrobiopterin synthesis and L-arginine transport. **J Biol Chem.**, 271:23928-23937, 1996.
- STEINER, A.A.; CARNIO, E.C.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; BRANCO, L.G.S. Role nitric oxide in systemic vasopressin-induced hypotermia. **Am J Physiol.**,44:R937-R941, 1998.
- STOCLET, J.C, MULLER, B.; GYORGY, K.; ANDRIANSIOTHAINA, R.; KLESCHOYOV, A.L. The inducible nitric oxide synthase in vascular and cardiaca tissue. **Eur J Pharmacol.**, 375:139-155, 1999.
- THIEMERMANN, C. Nitric oxide in septic shock. **Bioch Bioph Acta.**, 1411:437-455, 1999.
- THIJS, L.G. Time course cytokine levels in sepsis. **Intensive Care Med.**, 21:S258-S263, 1995.
- TITLERADGE, M.A. Nitric oxide in septic shock. **Bioch Bioph Acta.**, 1411:437-455, 1999.
- TOLLNER, B.; ROTH, J.; STORR, B.; MARTIN, D.; VOIGT, K.; ZEISBERGER, E. The role of tumor necrosis factor (TNF) in the febrile and metabolic responses of rats to intraperitoneal injection of a high dose of lipolysaccharide. **Pflugers Arch.**, 440(6):925-932, 2000.
- ULEVITCH, R.J.; TOBIAS, P.S. Recognition of Gram-negative bacteria and endotoxin by the innate immune system. **Curr Opin Immunol.**,11:19-22, 1999.
- UMINO, T.; KUSANO, E., MUTO, S.; AKIMOTO, T.; YANAGIBA, S.; ONO, S.; AMEMIYA, M.; ANDO, Y.; HOMMA, S.; IKEDA, U.; SHIMADA, K.; ASANO, Y.; AVP inhibits LPS-and IL-1 $\beta$ - stimulated NO and cGMP via V1 receptor in cultured rat mesangial cells. **Am J Physiol.**, 276:433-441, 1999.

- VIAU, V.; SHARMA, S.; PLOTSKY, P.M.; MEANEY, M.J. Increased plasma ACTH responses to stress in nonhandled compared with handled rats require basal levels of corticosterone and are associated with increased levels of ACTH secretagogues in the median eminence. **J Neurosci.**, 13:1097-1105, 1993.
- WALKER, F.R.; HODYL, N.A.; KRIVANEK, K.M.; HODGSON, D.M. Early-life host-bacteria relations and development: long term individual differences in neuroimmune function following neonatal endotoxin challenge. **Physiol Behav.**, (87 (1): 126-134, 2006.
- WANG, Y.; MCCUSKER, M.C. Neonatal exposure with LPS and/or allergen prevents experimental allergic airways disease: Development of tolerance environmental antigens. **J Allergy Clin Immunol.**, 118:143-151, 2006.
- WEIDENFELD, T.; ABRAMSKY, O.; OVADIA, H. Effect of interleukin 1 on ACTH and corticosterone secretion in dexamethasone and adrenalectomized pretreated male rats. **Neuroendocrinol.**, 50:650-654, 1989.
- WEISTEIN, S.L.; JUNE, C.H.; DE FRANCO, A.L. Lipopolysaccharide protein tyrosine phosphorylation in human macrophages is mediated by CD14. **J. Immunol.**, 151, 3829-3838, 1993.
- WILSON, M.F.; BRACKETT, D.J.; HINSHAW, L.B.; TOMPKINS, P.; ARCHER, L.T.; BENJAMIN, B.A. Vasopressin release during sepsis and septic shock in baboons and dogs. **Surg Gynecol Obstet.**, 153:869-872, 1981
- WURFELL, M.M.; HAILMAN, E.; WRIGHT, SD. Soluble CD14 acts as shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. **J Exp Med.**, 181:1743-1754, 1995.
- YAMAGUCHI, K.; HAMA, H.; WATANABE, K. Possible participation of prostaglandins generated in the arterioventral third ventricular region in the

- hypovolemia-induced vasopressin secretion of conscious rats. **Am J Physiol.**, 273: R1474-R1483, 1997.
- YAMOTO, K.; IKEDA, U.; OKADA, K.; SAITO, T.; KAWAHARA, Y.; OKUDA, M.; YOKOYAMA, M.; SHIMADA, K. Arginine vasopressin increases nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated rat cardiac myocytes. **Hypertension.**, 30:1112-1120, 1997.
- YANG, R.B.; MARK, M.R.; GRAY, A.; HUANG, A.; XIE, M.H.; ZHANG, M.; GODDARD, A.; WOOD, W.I.; GURNEY, A.L.; GODOWSKI, P.J. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signaling. **J Biol Chem.**, 274:10689-10692, 1998.
- YU, B.; HAILMAN, E.; WRIGHT, S.D. Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze of phospholipids. **J Clin Invest.**, 99:315-324, 1997.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)