

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

**Ação dos sub-produtos da via da heme-oxigenase na liberação de
vasopressina durante o choque endotoxêmico**

Dissertação apresentada ao
Departamento de Fisiologia da
Faculdade de Medicina de Ribeirão
Preto da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências Fisiológicas

Viviana Moreto

Orientadora: Profa Dra Evelin Capellari Cárnio

Ribeirão Preto

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Resumo

O choque endotoxêmico é um quadro clínico caracterizado por queda acentuada na pressão arterial, a qual não responde a agentes vasopressores. O choque endotoxêmico é geralmente induzido pela administração de endotoxinas como o lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas. A indução de choque endotoxêmico em animais, pela administração sistêmica de LPS, leva a uma resposta bifásica na liberação de vasopressina (AVP), um hormônio peptídico, com ação vasoconstrictora. Observa-se um aumento transitório na concentração plasmática deste hormônio durante as duas primeiras horas, seguido por um retorno à concentração basal durante a quarta e sexta hora após a administração de LPS. A enzima heme-oxigenase (HO), cataliza a degradação da molécula de heme em 3 sub-produtos, CO, Ferro e BV. Muitos trabalhos tem demonstrado que a HO tem ações protetoras durante o choque endotoxêmico. Sendo assim o presente estudo teve como objetivo avaliar a participação dos subprodutos da via HO sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico.

O choque endotoxêmico foi induzido em ratos machos *Wistar* pela da administração intravenosa de LPS, que provocou um aumento da concentração plasmática de AVP, queda da temperatura corpórea, queda da pressão arterial média (PAM) e aumento da frequência cardíaca (FC). Após duas horas da administração de LPS houve um retorno aos valores basais da concentração plasmática de AVP, aumento da temperatura corpórea, e um aumento do volume urinário, porém a PAM continuou em queda e a FC continuou aumentada. Ao administrarmos centralmente os subprodutos da via HO juntamente com o LPS observamos que a BV promoveu um aumento da

concentração plasmática de AVP, a queda da PAM foi amenizada e o aumento da FC foi acentuado. O CO apenas promoveu uma queda inicial da PAM. O Ferro apenas acentuou o aumento da FC induzida por LPS.

Sendo assim, nossos resultados sugerem a que a BV pode agir positivamente no controle da liberação de AVP durante a endotoxemia experimental, com conseqüente recuperação dos valores de pressão arterial.

Abstract

Endotoxemic shock is the most common cause of death in intensive care units. It is characterized by peripheral arteriolar vasodilatation, resulting in a decrease in systemic vascular resistance, high cardiac output, hypotension and inadequate tissue perfusion in response to bacterial products. The endotoxemic shock is generally induced by action of endotoxin or lipopolysaccharide (LPS), a component of the cell wall of Gram-negative bacteria. During the endotoxemic shock it is observed a biphasic response in vasopressin (AVP) release. It is observed a transitory increase in plasma AVP during the two first hours, followed by a return close to basal levels during the fourth and sixth hour after LPS administration. The heme-oxygenase (HO), catalyses the heme degradation in 3 sub-products, CO, iron and BV. Many researchers talk about the good effects of HO during the endotoxemic shock. This present study was designed to access the hypothesis that the sub-products of HO pathway participates of the AVP release during the endotoxemic shock.

The endotoxemic shock was induced in *Wistar* male rats by LPS intravenous injection, which caused a transitory decrease in body temperature, decrease in median arterial pressure (MAP), increase in heart rate (HR) and decrease in urinary flow. It was also observed an increase in plasma AVP occurred in these animals, which was present for two hours after LPS administration, returning then to basal levels thereafter. When LPS was combined with intracerebroventricular administration of sub-products of HO pathwa, we observed that BV promote a sustained increase in plasma AVP and maintenance of the blood pressure at four and six hours after LPS treatment

when compared to rats treated with LPS alone. Co only change the initial fall in MAP and iron just promote a accentuated increase in FC induced by LPS.

These data indicate that the BV is the sub-product form HO pathway that play an important role in AVP release during experimental septic shock and during the hypotension induced by endotoxemic shock.

1. Introdução

1.1. Endotoxemia e Choque endotoxêmico

Louis Pasteur mostrou pela primeira vez, em 1879-1880 que bactérias estavam presentes no sangue de pacientes com septicemia puerperal. Uma mulher sobreviveu, surgindo assim o primeiro relato de que a sepse seria uma resposta sistêmica na luta contra patógenos (Annane e cols, 2005).

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 a infecção e choque endotoxêmico como sendo o quadro de endotoxemia acompanhado por hipotensão (American College of Chest Physicians, 1992).

A incidência de casos de endotoxemia vem aumentando, apesar do aumento de estudos para sua cura. Nos Estados Unidos estimam-se proporções de 50-95 casos por 100.000 habitantes com aumento de 9% a cada ano. Os casos de pacientes com endotoxemia representam 2% das admissões hospitalares, destas, 9% dos pacientes progridem para endotoxemia severa e 3% para o choque endotoxêmico. Em unidades de terapia intensiva estes dados são ainda maiores, representam 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 casos de endotoxemia representam 46,9%, destes pacientes 52,2% progridem para o choque endotoxêmico (Silva e cols, 2004). Os principais fatores para a incidência alta da endotoxemia são o grande número de procedimentos invasivos realizados

nestas unidades, tais como catéteres venosos centrais, ventilação mecânica e catéteres urinários (Silva e cols, 2004).

A endotoxemia é caracterizada por uma produção excessiva de mediadores inflamatórios e ativação de células inflamatórias, tais como citocinas. Esta resposta inflamatória leva ao comprometimento e disfunção de vários órgãos, tendo como consequência uma taxa alta de mortalidade. A ativação inflamatória pode ainda levar ao aparecimento de febre ou hipotermia, taquicardia, hipermetabolismo sistêmico, consumo elevado de oxigênio e hipoperfusão sistêmica. (Parker e Parrillo, 1983; Bone, 1991; Titleradge, 1999).

Pacientes com choque endotoxêmico desenvolvem profunda vasodilatação periférica arteriolar (hipotensão), a qual é resistente a agentes vasopressores (vasoplegia). Essa queda da resistência vascular periférica pode estar associada à disfunção cardíaca caracterizada por taquicardia, depressão sistólica, aumento da complacência ventricular e um normal ou aumentado índice cardíaco (Ognibene e cols, 1988). A hipotensão leva ao óbito aproximadamente 50% dos casos, devido a evolução para falência múltipla dos órgãos (Karima e cols, 1999).

Qualquer microorganismo pode causar endotoxemia ou choque endotoxêmico (bactérias, vírus, fungos e protozoários), porém são as bactérias os agentes etiológicos mais comuns. As bactérias Gram-negativas (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter sp*, *Pseudomonas aeruginosa* e outras) são as responsáveis pela maioria dos casos de sepse (Thiermermann, 1999).

Os componentes da parede bacteriana são os principais desencadeadores da resposta do hospedeiro frente à endotoxina. O lipopolissacarídeo (LPS), maior constituinte da membrana externa de bactérias

Gram-negativas e o ácido teicóico das bactérias Gram-positivas desencadeiam uma cascata de respostas inflamatórias, por meio da produção das citocinas pró-inflamatórias (Raetz, 1991).

1.2. Lipopolissacarídeo (LPS)

A história da endotoxina teve início em meados de 1870, pesquisadores demonstraram que bactérias desencadeiam doenças através de produção de toxinas. As exotoxinas foram as primeiras toxinas identificadas, estas são substâncias secretadas ativamente por muitos tipos bacterianos, como aqueles responsáveis por doenças como tétano, difteria e botulismo. Na época as exotoxinas eram caracterizadas pela susceptibilidade à inativação pelo calor, porém hoje se sabe que as exotoxinas são geralmente proteínas (Rietschel e Brade, 1992).

Em 1892, pesquisadores descreveram toxinas que não se ajustavam ao perfil das exotoxinas. Richard Pfeiffer descobriu que a lise bacteriana do agente infeccioso que causava cólera provocava choque endotoxêmico em porcos. Ele verificou que havia neste processo uma substância resistente ao calor, que parecia ser liberada por bactérias desintegradas. Ele sugeriu, então, que a porção que desencadeava toxicidade estava localizada na porção interna da célula bacteriana, por esta razão Pfeiffer a nomeou de endotoxina (do grego, endo, dentro). Outros trabalhos demonstraram que as endotoxinas, na verdade, residiam na superfície das bactérias gram-negativas e não em seu interior, porém esta terminologia permanece até hoje (Rietschel e Brade, 1992).

William B. Coley, um médico americano que trabalhava em um hospital em Nova York, iniciou o tratamento de pacientes que sofriam de câncer com

injeções de toxinas de bactéria gram-negativa (*Serratia marcescens*) e gram-positivas (*Streptococcus*), este tratamento se tornou conhecido como a toxina Coley. Esta terapia de vacinas promovia a remissão completa de tumores sem recidiva por um período de aproximadamente cinco anos. Os pacientes submetidos a este tratamento apresentaram alguns sintomas como febre e reações de choque tóxico (Alexander e cols, 2001). Hans Buchner obteve resultados semelhantes os apresentados por pacientes submetidos ao tratamento com a vacina Coley ao administrar extratos bacterianos em animais. Ele observou que os animais apresentaram febre, alterações na contagem de linfócitos e elevada, mas não específica resistência a infecções bacterianas (Alexander e cols, 2001).

Hoje se sabe que os efeitos biológicos de preparados bacterianos utilizados nestes estudos foram desenvolvidos devido a uma classe de substâncias denominadas lipopolissacarídeo (LPS) baseado em sua constituição química (Giusti-Paiva e cols, 2002). A estrutura das endotoxinas começou a ser conhecida nas décadas de trinta e quarenta, foi observado que elas são constituídas por lipídeo, polissacarídeo e proteína, sendo o material tóxico representado pela porção lipídica e polissacarídica. Por isso as endotoxinas passaram a receber a denominação de lipopolissacarídeos (Rietschel e Brade, 1992).

As bactérias gram-negativas são formadas por dupla membrana: externa e interna (Glauert e Thornley, 1969). Entre as membranas está o espaço periplasmático, o qual contém os peptídeoglicanos e proteínas periplasmáticas. Os peptídeoglicanos são os responsáveis pela forma das células, proteção do citoplasma frente às diferenças de pressão osmótica entre os meios externo e

interno, além de conferir rigidez ao corpo bacteriano. A membrana externa é dupla e contém fosfolipídios e proteína (Nikadido e Vaara, 1985). A camada interna da membrana externa são lipoproteínas que estão ligadas aos peptídeoglicanos. A camada externa contém os lipopolissacarídeos (Fig:1) Uma célula bacteriana contém aproximadamente $3,5 \mu\text{m}^2$. Isso significa que três quartos da superfície celular bacteriana consiste de LPS (Rietschel e cols, 1994).

O LPS possui três porções: o lipídeo A e uma porção polissacarídea, a qual se divide em duas regiões: o oligossacarídeo central e o antígeno O. O lipídeo A é formado principalmente de açúcares (glicosamina) ligados a fosfato e longas cadeias de ácidos graxos, cada um com cerca de 14 átomos de carbono. O lipídeo A é a porção que origina a toxicidade e os efeitos pirogênica do LPS. O oligossacarídeo central consiste em uma cadeia pequena de açúcares, ligado em sua porção interna ao lipídeo A, e em sua porção externa ao antígeno O. O antígeno O é uma cadeia longa de açúcares na superfície externa da molécula, ele é o responsável por mudanças conformacionais das bactérias gram-negativas, sendo esta a porção de LPS reconhecida pelos anticorpos (Raetz, 1991, Raetz e Whitfield, 2002). (Fig:1).

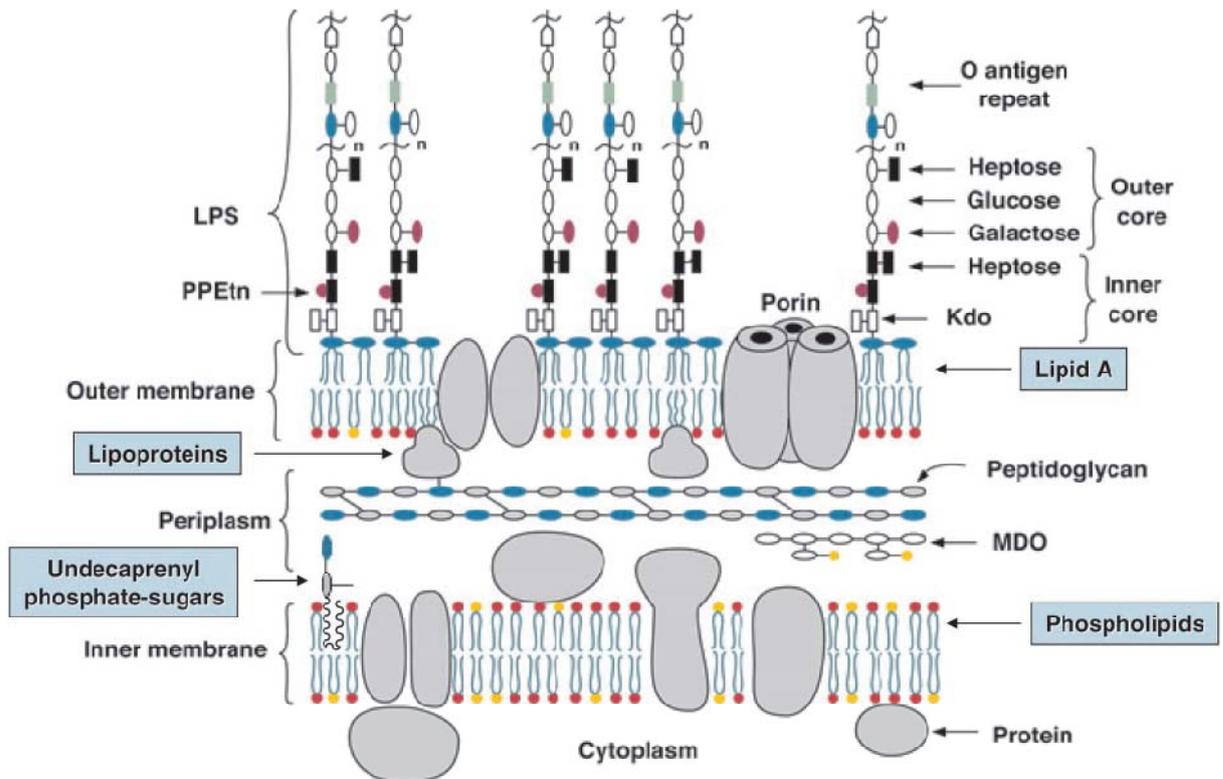


Figura 1: Modelo da membrana celular externa e interna de *Escherichia coli*. O LPS está ancorado na membrana externa e divide-se estruturalmente em lipídeo A, oligossacarídeo central e antígeno O. (adaptado de Raetz e Whitfield, 2002).

Para que as endotoxinas sejam efetivas é preciso que estas sejam liberadas da superfície da bactéria gram-negativa, isto ocorre com a morte ou multiplicação das bactérias. Uma vez livres elas não produzem seus efeitos diretamente, mas ligam-se a células particulares induzindo-as a secretarem moléculas mediadoras, sendo os macrófagos o principal alvo. Devido a sua natureza anfipática, existe uma tendência para esta molécula formar micelas na corrente sanguínea (Chaby, 1999; Yu e cols, 1997).

Inicialmente, o LPS se liga a proteínas de alta densidade (HDL), até que ocorra um aumento da produção de proteínas ligadoras de LPS (LBP- LPS binding protein) pelo fígado(Wurfell e cols, 1995; Kitchens e cols, 1999; Mathison, 1992). O LPS se liga então a LBP principalmente na porção do lipídeo A (Tobias e cols, 1989). O complexo LPS-LBP interage com um receptor conhecido com 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 (Fig:2). Porém este receptor não tem capacidade de gerar sinalização transmembrana, pois está associado a uma proteína G inibitória, no entanto, interage com outro receptor, o Toll-Like 4 (TRL-4) (Hoshino e cols, 1999; Chow e cols, 1999). O TLR-4 ativado recruta uma proteína adaptadora (MyD88) que interage com uma proteína quinase serina-treonina, IRAK (Wesche e cols, 1997; Medzhitov e cols, 1988). A IRAK é, então, auto-fosforilada, associa-se com outra proteína adaptadora, a TRAF6, que por sua vez ativa a MAP quinase (TAK1). Via diversos passos intermediários, a ativação da TAK1 leva a ativação e fosforilação da I κ B-quinase (IKK). A IKK fosforila o I κ B (inibidor do NF- κ B), induzindo a liberação do NF- κ B. Através das MAP quinases adicionais (ERK e JNK), a TAK1 também ativa a transcrição de membros da família Jun e Fos, os quais, juntamente com o NF- κ B , translocam para o núcleo e ativam a transcrição de genes de citocinas (Barnes e Karin, 1997, Karin e Bem-Neriah, 2000).

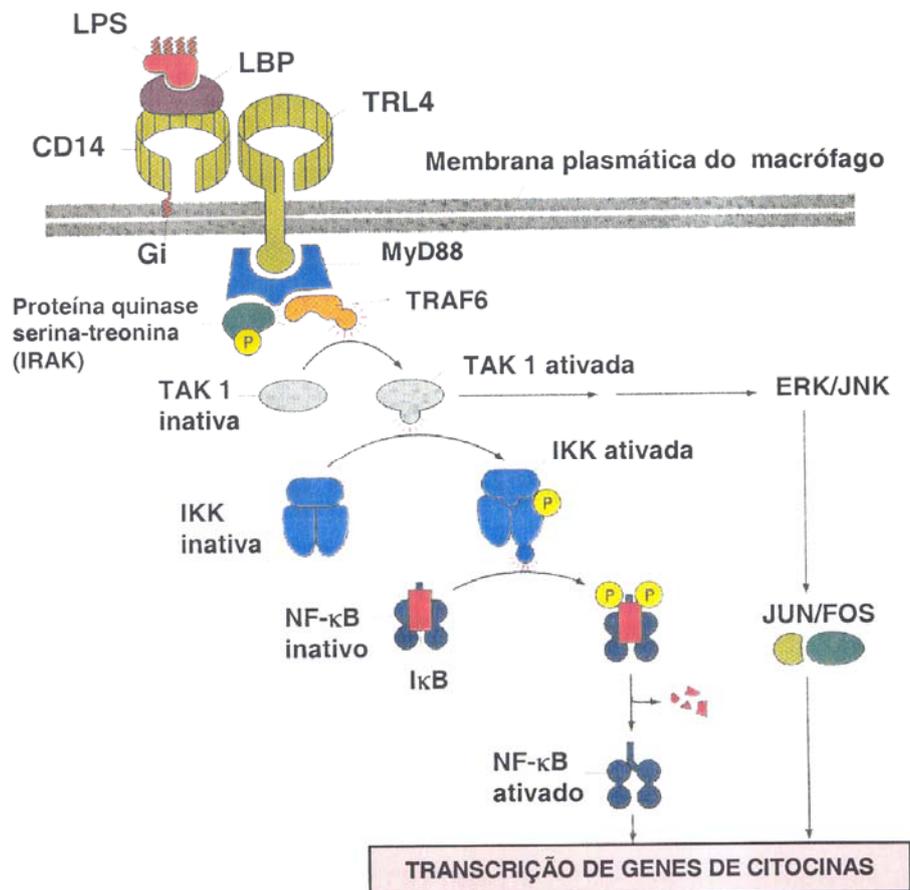


Figura 2: Representação esquemática da via de sinalização intracelular ativada pelo LPS (adaptado de Robert e cols, 2002).

1.3. Heme-oxigenase (HO)

Joseph Black (1728-1799) foi o primeiro a isolar o Monóxido de Carbono (CO) em 1757, desde então o CO foi descrito como um composto gasoso nocivo e prejudicial. Entretanto, essa noção de que o CO seja somente uma substância nociva tem sido mudada desde 1949, quando Sjostrand (Sjostrand, 1949) relatou que o CO podia ser sintetizado endogenamente. Foi então descoberta a heme-oxigenase (HO), a enzima que é a maior fonte celular de CO. A HO cataliza a degradação da molécula heme em biliverdina (BV), ferro livre (Fé) e CO (Abraham e cols, 1988). A molécula heme é sintetizada por meio de uma série de passos enzimáticos, que começam com a δ-aminolevuminate sintase (ALAS) e terminam com a ferroquelatase (Maines,

1997). A heme pertence ao grupo das metaloporfirinas, tem a estrutura de um quadrado plano tetrapirrólico, sendo composta por quatro anéis pirrólicos (1, 2, 3 e 4 na Fig 3) ligados por pontes de Carbono (α , β , γ e δ); esta conjugação macropirrólica dá cor, planaridade e fluorescência característica dos porfirins (Maines, 1997). Alguns metais como Fe, Mg, Cu, Zn, Sn, Cd, Co e Ag podem formar um complexo com os anéis porfirínicos (Maines, 1997).

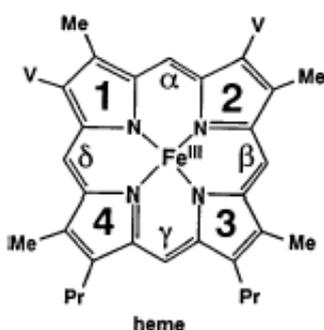


Figura 3: Estrutura da molécula heme. Os números 1, 2, 3 e 4 representam os anéis pirrólicos, as letras α , β , γ e δ representam as pontes de Carbono. (adaptado de Maines, 1997).

O processo de degradação da heme tem início com o NADPH doando um elétron para o Fe^{3+} que é mantido no estado de Fe^{2+} livre que ativa o O_2 , levando a um processo de clivagem oxidativa das pontes de carbono metilênicas α , β , γ e δ . A clivagem oxidativa desta ponte de carbono leva à formação do CO, e os anéis pirrólicos levam à formação de 4 isômeros de biliverdina; a enzima HO catalisa esta reação, onde a fonte de redução equivalente é o NADPH (Maines, 1997).

Três isoformas de HO foram descritas: HO-1, HO-2 e HO-3, sendo as isoformas 1 e 2 as mais conhecidas (Ewing e Maines, 1992; Maines, 1997). Estas duas isoformas apresentam poucas semelhanças na seqüência de aminoácidos ou nucleotídeos, composição de aminoácidos, número de transcrições ou tamanho, e são diferentes produtos genéticos. A HO-1 é a

isoforma induzida e também conhecida como proteína heat-schock 32 (HSP-32); é altamente sensível, não somente a metais, mas a todos os tipos de estímulos e agentes que causam estresse oxidativo e condições fisiopatológicas, como choque ao calor (Raju & Maines, 1994), reperfusão isquêmica (Raju & Maines, 1996), hipóxia (Morita e cols,1995) e endotoxinas (Rizzardini e cols, 1994; Willis, 1999). Não há descrição de outra enzima que seja afetada por tantos estímulos de diversas naturezas (Maines, 1997). A HO-2 é a isoforma constitutiva, e não é induzida pelos fatores que induzem a HO-1. Seus indutores químicos são os glicocorticóides sintetizados pelas adrenais. Ambas isoenzimas são encontradas em vários tecidos, incluindo o tecido neural, célula endotelial e músculo liso (Dawson & Snyder, 1994; Maines, 1997; Jhonson e cols, 1999), e estão presentes em níveis altos no cérebro e nos testículos. A HO-1 também é encontrada em células da glia (Dwyer e cols, 1995) e no tecido neural é encontrada em alguns grupos celulares, como no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Ewing e Maines, 1992 e Maines, 1997).

Todos os produtos da HO parecem ter uma ação biológica ativa: o CO é um sinalizador molecular, o Fe liberado age como regulador de genes, incluindo o gene da NO sintase, e a biliverdina é um potente antioxidante. Entretanto, foi apenas em 1991 que Marks (Marks e cols, 1991) sugeriu que o CO poderia ter uma função fisiológica devido às suas semelhanças com o NO, como a inibição da agregação plaquetária, relaxamento de preparações arteriais de carótida, coronária e femural.

O CO estimula a atividade da guanilato ciclase solúvel (sGC), promovendo elevação do cGMP dos tecidos neural e cardiovascular (Morita e

cols, 1995), sendo um sinalizador molecular importante do sistema cardiovascular, agindo como um vasodilatador potente (Dawson & Snyder, 1994; Jhonson e cols. 1999), capaz de reduzir a expressão das endotelinas-1 em células endoteliais (Morita e cols, 1995). Além disso, tem sido demonstrada a participação do CO na termorregulação, como sendo um mediador da febre induzida por endotoxina no sistema nervoso central (SNC) (Steiner e cols, 1999; Steiner & Branco, 2000). Há ainda estudos que descrevem o CO como neurotransmissor ou neuromodulador atípico do sistema nervoso, onde pode agir inibindo a liberação da IL-1 β em hipotálamo de ratos *in vitro* (Mancuso e cols. 1998), assim como a liberação de alguns hormônios, como hormônio liberador da corticotrofina (CRH) (Parkes e cols, 1994; Pozzoli e cols, 1994; Kostoglou-Athanassiou e cols, 1996), ocitocina (Kostoglou-Athanassiou e cols, 1996) e AVP (Mancuso e cols, 1997; Kostoglou-Athanassiou e cols, 1996).

Muitos pesquisadores têm sugerido que a BV produzida endogenamente tem efeitos antioxidantes (Neuzil e cols, 1994; Otterbein e cols, 2003). O produto da degradação da BV, a bilirrubina (BR) promove efeitos cito-protetivos contra os danos causados pelo aumento de peróxido de hidrogênio em células endoteliais aórticas (Motterlini e cols, 1996). A administração intraperitoneal (ip) de BV leva ao aumento de IL-10, diminuição de mediadores inflamatórios como IL-6 e MCP-1 e subsequente redução no recrutamento de leucócitos (Overhaus e cols, 2006). A administração de BV também tem sido eficaz no tratamento de doenças pulmonares em ratos através da modulação da resposta inflamatória e supressão em mudanças pato-fisiológicas no pulmão (Andrews e cols, 2005). Também tem sido demonstrado que a BV tem se mostrado importante por reduzir os danos de inúmeros modelos inflamatórios como inflamação

intestinal, perfusão intestinal isquêmica, transplante de órgãos e hepatotoxicidade (Otterbein e cols, 2003; Ceran e cols, 2001; Chiu e cols, 2002; Hammerman e cols, 2002).

1.4. Vasopressina

A vasopressina (AVP) ou hormônio antidiurético (ADH) é um nonapeptídeo ligado a dois aminoácidos de cisteína (Fig. 4) sintetizado em neurônios magnocelulares e parvocelulares do núcleo supraótico e paraventricular do hipotálamo (Holmes e cols, 2001). Esta produção depende da transcrição do gene da AVP situado no cromossomo 20p13, a transcrição da AVP é aumentada em condições de hipertonicidade, hipotensão e ou hipovolemia. Após sua transcrição, a AVP é transportada para a neuro-hipófise onde é estocada (Ouden e cols, 2005).

Inicialmente a AVP é transcrita como um pré-pro-hormônio, a pre-pro-vasopressina. A preprovasopressina é traduzida em pro-vasopressina por ribossomos do retículo endoplasmático pela glicosilação do peptídeo N-terminal. As vesículas contendo a pro-vasopressina são transportadas até a terminação do axônio na neuro-hipófise (NH) a pro-vasopressina é processada gerando AVP, neurofisina e um glicopeptídeo de 39 aminoácidos (North, 1987). A AVP é armazenada na neuro-hipófise até que ocorra um estímulo adequado para sua liberação. 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 capilares fenestrados presente na glândula.

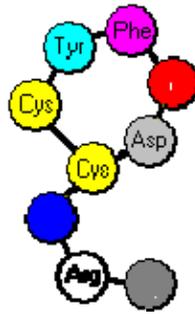


Figura 4: Estrutura da vasopressina.

A regulação para liberação de AVP é complexa. Sob condições normais, a secreção de AVP é primeiramente regulada por mudanças na osmolalidade plasmática (osmorregulação). Este sistema é altamente sensível, sendo que mudanças pequenas na osmolalidade (1-2%) resultam na secreção de AVP, que agirá nos rins promovendo diuresi (Holmes e cols, 2003). Os principais osmorreceptores estão localizados no encéfalo em regiões que não possuem barreira hemato-encefálica, como a região antero ventral do terceiro ventrículo, órgão vasculoso da lâmina terminal e órgão subfornical. Assim o aumento da concentração de solutos como íons sódio e açúcares não metabolizados no plasma, estimulam a liberação de AVP, que agirá no rim promovendo a antidiurese (Conn e Freeman, 2000).

A barorregulação da secreção de AVP possui um papel mínimo em um indivíduo saudável, porém uma queda da pressão sanguínea de por volta de 10% é capaz de promover a elevação deste hormônio (Mutlu e Factor, 2004).

Os receptores envolvidos na barorregulação da secreção de AVP são classificados em arteriais, ou de alta pressão e cardiopulmonares, ou de baixa pressão. Os receptores arteriais são subdivididos em dois grupos: receptores do seio carotídeo, innervados pelo nervo vago. Quando a pressão arterial está em valores normais, os barorreceptores arteriais estão constantemente inibindo

a secreção de AVP, porém quando ocorre queda da pressão arterial ocorre um aumento da secreção de AVP pela neurohipófise (Conn e Freeman, 2000).

A função dos receptores cardiopulmonares ainda é controverso. Há evidências que a distensão destes receptores no átrio esquerdo de cachorros inibe a secreção de AVP. Porém ainda não está claro se estes receptores possuem uma inibição tônica da secreção de AVP (Conn e Freeman, 2000).

Em situações patológicas também há outros fatores importantes no controle da liberação de AVP. A hipóxia e a acidose estimulam os corpos carotídeos e conseqüentemente aumentam a liberação de AVP (Holmes e cols, 2004). Toxinas e citocinas também promovem aumento secreção de AVP (Mutlu e Factor, 2004).

Os efeitos biológicos da AVP são mediados por basicamente três tipos de receptores. O receptor V_1 possui dois subtipos: receptor V_{1a} e V_{1b} . Uma grande variedade de vias sinalizadoras está associada com a ativação do receptor V_{1a} , estas vias incluem ativação do influxo de cálcio e das fosfolipases A, C e D (Briley e cols, 1994). Os receptores V_{1a} são encontrados em grande quantidade na musculatura vascular lisa, onde promovem vasoconstrição. O receptor ativo estimula a proteína G, que ativa a fosfolipase C, que por sua vez hidrolisa o fosfatidil inositol difosfato (PIP_2) em inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG), sendo que o DAG ativa a proteínquinase C (PKC) (Phillips e cols, 1990). A PKC quando ativada, fosforila resíduos de serina ou treonina específicos nas proteínas alvo (Thibonnier, 2002).

Na musculatura vascular lisa, o IP_3 age no retículo sarcoplasmático aumentando a liberação de Ca^{2+} dos estoques intracelulares, e estimulando o influxo de Ca^{2+} extracelular. O efeito de Ca^{2+} é mediado pela sua ligação com a

calmodulina e ativação da miosina quinase de cadeia leve, levando a contração muscular (Ruegg e cols, 1989).

O receptor V_{1a} é também encontrado no encéfalo, testículo, fígado, rim e plaquetas (Phillips e cols, 1990). O receptor V_{1b} está localizado na hipófise e, devido a sua escassez, foi caracterizado recentemente (Rousseau-Merck e cols, 1995). O AVP ao se ligar ao receptor V_{1b} causa secreção de ACTH através da ativação da PKC (Liu e cols, 1994).

Quando a AVP se liga aos receptores do subtipo V_2 presentes em células do ducto coletor e néfron distal, leva à diurese devido ao aumentando da permeabilidade a água nestes locais (Birnbaumer, 2000). Os receptores V_2 se ligam a proteína G, que por sua vez leva ao aumento do conteúdo intracelular de AMP cíclico (AMPC) e ativação da proteína quinase A (PKA) nas células dos ductos coletores (Birnbaumer, 2000). A estimulação desta via nos rins leva a inserção de canais de água (aquaporinas-2) na membrana luminal das células dos ductos coletores aumentando assim a reabsorção de água pelos rins (Harris e cols, 1994). O receptor V_2 foi identificado apenas nos rins através de estudos com radioligantes específicos para este receptor (Phillips e cols, 1990).

Outros estímulos para liberação de AVP podem ser: hipoglicemia (Baylis e Robertson, 1980), náusea (Rowe e cols, 1979), dor (Kasting e cols, 1985) e aumento da temperatura corporal (Kasting e cols, 1981). Mas os mecanismos não são totalmente conhecidos. Sabe-se que o aumento da temperatura corporal promove a liberação de AVP em ratos e o aquecimento hipotalâmico promove aumento da concentração plasmática em porcos (Forsling e cols, 1976 e Szczepanka-Sadowska, 1974).

1.5. Relação entre HO, endotoxemia e AVP

Vários trabalhos têm demonstrado que o LPS promove aumento da expressão da HO-1 em células do músculo vascular esquelético e em vários órgãos de ratos endotoxêmicos (Yet e cols, 1997, Pellacani e cols, 1998 e Wiesel e cols, 2000). Ejima e cols sugerem que o aumento da expressão da HO-1 ocorre pela ativação da via da cicloxigenase 2 (COX-2), e camundongos que não expressam a COX-2 apresentam uma baixa expressão da HO-1 e são mais resistentes à inflamação e morte induzidos por LPS (Ejima e cols, 2003). Além disso, pacientes em estado crítico de sepse apresentam aumento nas concentrações de carboxihemoglobina, o que sugere aumento na produção de CO endógeno (Zegdi e cols, 2002).

Durante o choque endotoxêmico experimental, o LPS promove uma resposta bifásica na liberação de AVP, levando a um aumento em sua liberação até a segunda hora após a administração da endotoxina (Giusti-Paiva, 2002 e Kasting e cols, 1985; Kasting, 1986 e Schaller e cols, 1985) e, a partir daí, a liberação de AVP retorna à condição basal. Estranho notar que o retorno da liberação de AVP para a condição basal ocorre no momento em que o valor de pressão arterial atinge suas cifras mais baixas.

Landry e colaboradores demonstraram que, em pacientes com choque séptico avançado a concentração plasmática de AVP é mais baixa que em pacientes com choque cardiogênico, com valores pressóricos semelhantes. Esses autores sugerem existir uma deficiência de AVP nestes pacientes, o que deve agravar a hipotensão característica do quadro clínico (Landry e cols 1997). Além disso, tem-se verificado que pacientes com choque séptico são muito sensíveis à ação pressora da infusão endovenosa de AVP, a qual vem

sendo recentemente recomendada no tratamento da hipotensão refratária do choque séptico (Landry e cols 1997; Malay e cols, 1999; Patel e cols, 2002).

Yet e cols verificaram que a administração de ZnPP (inibidor não seletivo da HO) em quantidade que não inibe completamente a atividade da HO, ameniza a hipotensão gerada pelo LPS em ratos anestesiados.(Yet e cols, 1997 e Wiesel e cols, 2000).

Moreto e cols demonstraram que a administração central de ZnDPBG (inibidor não específico da HO) heme oxygenase atenua muito dos efeitos da endotoxemia induzida por LPS (Moreto e cols, 200). Porém não se sabe ao certo qual subprodutos específico da via da HO (biliverdina, monóxido de carbono e ferro) é o responsável por estes resultados. Assim, nos propusemos a estudar o efeito dos subprodutos da via HO sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), temperatura corporal (Tc) e concentração plasmática de AVP durante o choque endotoxêmico.

2. Materiais e Métodos

2.1. Animais

Neste estudo, foram utilizados ratos *Wistar* machos, pesando entre 230-300g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em caixas plásticas com tampa aramada, com dimensões de 180mm de altura x 410mm de comprimento x 330mm de largura. Cada caixa foi acondicionada em uma estante ventilada (Alesco Ind. E Com. Ltda., Monte Mor, SP, Brasil), que permite controle de temperatura $25 \pm 2^\circ\text{C}$ e iluminação com ciclo claro-escuro de 12h. Foi permitido o acesso livre à água e à dieta comercial balanceada. Os animais foram mantidos em gaiolas

conjuntas (5 animais por gaiola) até a transferência para gaiolas individuais no dia anterior ao experimento.

Os procedimentos com animais, bem como os protocolos experimentais deste estudo, foram aprovados pelo comitê de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (protocolo 247/2005) estando, portanto, de acordo com os princípios éticos para uso de animais de laboratório.

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

2.2. Cirurgias

2.2.1. Canulação do ventrículo lateral

Para possibilitar a injeção de drogas no sistema nervoso central, os animais receberam, através de cirurgia estereotáxica, implante de cânula guia, confeccionada a partir de agulhas hipodérmicas, sob anestesia geral uma mistura de 0,8 ml de ketamina adicionada de 0,7 ml de xilazina (0,1 ml/100 g de peso corporal intraperitoneal). Após incisão da pele com auxílio de bisturi, o tecido cerebral foi afastado e a calota craniana exposta, cânulas de aço inoxidável de 0,7mm de diâmetro externo e 14mm de comprimento foram então inseridas no ventrículo lateral direito. Com base no atlas de Paxinos e Watson (Paxinos e Watson, 1983) as cânulas intracerebroventriculares foram posicionadas utilizando-se as seguintes coordenadas:

Lateral: -1,5 mm;

Vertical: 3,6mm, a partir da superfície da calota craniana;

Antero-Posterior: -0,8 mm, posterior ao bregma.

As cânulas foram fixadas na calota craniana com o auxílio de parafusos e acrílico autopolimerizável (Simplex®), e o tecido foi fechado com pontos simples.

Após este procedimento os animais receberam a injeção subcutânea de 0,1ml de Benamine Injetável Pet (antipirético, analgésico w antiinflamatório) e a injeção intramuscular de 0,3ml de Pentabiótico Veterinário pequeno porte.

2.2.2. Canulação da veia jugular

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI, EUA), diluído em salina isotônica livre de pirógenos, na dose de 25mg/100g de peso corporal.

No dia anterior ao experimento, os animais tiveram a veia jugular externa direita canulada através da técnica descrita por Harms e Ojeda [129], sob anestesia geral com tribromoetanol (25 mg/100 g de peso corporal). Foram utilizadas cânulas de silástico com comprimento total de 10 cm, confeccionadas com suporte para a fixação no músculo peitoral, permitindo que apenas 1,7 cm de cânula fosse inserido em direção ao átrio direito. Após tricotomia da região supraclavicular direita, o trajeto da veia jugular externa podia ser identificado por transparência, aplicando-se pressão leve acima da clavícula de modo a obstruir o retorno venoso. Com incisão pequena na pele, paralela ao trajeto venoso, obtinha-se o acesso para a dissecação venosa. A cânula foi introduzida na luz vascular com a utilização de agulha especialmente confeccionada para adaptação da cânula de silástico à sua extremidade distal. Após a transfixação venosa, o conjunto agulha-cânula foi exposto através do músculo peitoral.

Neste momento, a agulha foi desconectada, e, com tração leve, a cânula foi reposicionada dentro da luz vascular, sendo então fixada com fios de algodão ao músculo peitoral, após a verificação do retorno venoso fácil através da cânula. Com o auxílio de um trocater, a extremidade distal da cânula foi exteriorizada na região cervical dorsal através de um trajeto subcutâneo. No local da incisão cirúrgica, os planos foram fechados em bloco com pontos simples, utilizando-se fios de algodão. Após este procedimento, a cânula foi lavada e preenchida com solução salina heparinizada (125 UI/ml) para evitar obstrução da mesma por sangue coagulado. Antes de desconectar a extremidade distal da cânula da seringa contendo a solução com heparina, a oclusão da mesma foi realizada por meio de laço, feito com o auxílio de pinça cirúrgica. Esta manobra visava dificultar o refluxo de sangue para dentro da cânula. Na maioria dos animais houve apenas sangramento discreto com esta técnica cirúrgica. Os animais que sofreram perdas sangüíneas importantes, por dificuldade com esta técnica, foram descartados. Através desta via, foram realizadas as injeções endovenosas de drogas. Após a cirurgia, os ratos foram transferidos para a sala de experimentos e mantidos sem manipulação até o início da sessão experimental na manhã seguinte, com acesso livre a água e ração.

2.2.3. Canulação da artéria femoral

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de solução de 2,2,2-tribromoetanol (Aldrich Chemical Company, Inc., Milwaukee, WI, EUA), diluído em salina isotônica livre de pirógenos, na dose de 25mg/100g de peso corporal.

No dia anterior ao experimento, os animais tiveram a artéria femoral direita canulada para realização de medidas de pressão arterial e frequência cardíaca. Foram utilizadas cânulas confeccionadas de tubos de polietileno (Intramedic®, Becton Dickinson and Co., Sparks, MD, EUA), composto por um segmento de PE-10 de 4,5 cm de comprimento e diâmetros interno de 0,3 mm e externo de 0,6 mm, ligado a outro segmento de PE-50 de 18,0 cm de comprimento.

Após tricotomia das regiões inguinal direita e interescapular, o animal foi fixado em uma mesa cirúrgica. Uma incisão transversal de 1,0 cm foi feita na região inguinal direita, e após musculatura ser retraída, a artéria femoral direita foi exposta, separada e individualizada do tecido conjuntivo ao seu redor. Em seguida, foi realizada uma ligadura na parte distal e o tracionamento na parte proximal. Uma pequena incisão foi feita na parede superior da artéria, por onde a cânula foi introduzida, permitindo que 4,5 cm da cânula fosse progredindo em direção a aorta abdominal, e sua fixação no local foram feitas por ligaduras com fios de algodão. A extremidade distal da cânula foi exteriorizada na região interescapular através de um trajeto subcutâneo com o auxílio de um trocater. Após este procedimento, a cânula foi lavada e preenchida com solução de salina isotônica heparinizada (10U/mL) livre de pirógenos para evitar obstrução da cânula por sangue coagulado. A oclusão da cânula foi realizada por meio da introdução de um arame ortodôntico inoxidável de 1,5 cm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, visando dificultar o refluxo de sangue para dentro da cânula. No local da incisão cirúrgica, os planos foram suturados em bloco com pontos simples, utilizando-se fios de algodão. Após a cirurgia, os ratos foram transferidos para a estante ventilada e mantidos sem

manipulação até o início da sessão experimental na manhã seguinte, com livre acesso à água e à ração.

2.2.4. Implantação do Probe

Logo após a cirurgia para canulação do ventrículo lateral direito, os animais foram submetidos a uma laparotomia mediana para a inserção de sonda de biotelemetria (modelo ER-4000, Mini-Mitter Co. Inc., OR, USA) na cavidade peritoneal. A incisão foi fechada com sutura simples e a sonda implantada foi utilizada para a determinação da temperatura corporal.

2.3. Determinação da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

Para determinar a pressão arterial e frequência cardíaca foram utilizados ratos que tiveram o ventrículo lateral, a veia jugular e a artéria femoral canulados respectivamente para injeção de drogas e medida da pressão arterial e frequência cardíaca através de um transdutor de pressão (Grass P23XL-1) e um polígrafo (Grass P122, EUA) acoplado a um microcomputador, utilizando o programa Polyview (Astro-Med Inc, EUA).

2.4. Dosagem Hormonal

Ao término de cada experimento, os animais foram decapitados e amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo 0,5 mL de heparina (10U/mL) e mantidos em gelo. As amostras foram centrifugadas (1200 g, 4°C, 20 min) para a obtenção do plasma. O plasma foi estocado a -70°C até o momento das dosagens hormonais.

A extração do hormônio AVP foi realizada segundo técnica descrita por Moreira e colaboradores (1995), utilizando-se 1,0 mL de plasma adicionados de 2,0 mL de acetona gelada seguida de agitação contínua por 20 segundos e centrifugação (1200 g, 4°C, 25 min), sendo o sobrenadante decantado em um tubo contendo 2,0 mL de éter de petróleo e em seguida agitado por 10 segundos e mantido em repouso por 5 minutos à 25°C para a separação das camadas. A camada superior foi aspirada com o auxílio de ma bomba de vácuo (Modelo 131-¼ CV, Primatec, São Paulo, SP, Brasil), a camada inferior foi liofilizada num Speed Vac (RTV 4104, Termo Electron Co., Waltham, MA, USA) sendo as amostras estocadas à -20°C para posterior dosagem por radioimunoensaio (RIE).

No dia da realização do RIE, as amostras foram ressuspensas em 250 µL de tampão AVP (tampão TRIS 0,05M com albumina humana 0,25%), sendo que, 100 µL do ressuspensão foram utilizados para o ensaio, em duplicata.

No RIE, a AVP foi marcada com ¹²⁵I, tendo sido utilizadas 2000 cpm/100 µL, com um volume final de incubação foi de 500 µL durante quatro dias à temperatura de 4°C. O anti-soro utilizado (primeiro anticorpo de coelho anti-AVP) foi específico para o hormônio analisado sem reação cruzada com outros peptídeos. Foram adicionados 100,0 µL do primeiro anticorpo nas amostras desconhecidas e os tubos foram agitados e incubados a 4°C durante 24 horas. O hormônio marcado (100µL) foi adicionado aos tubos e estes foram agitados e incubados novamente por 24 h à 4°C. O hormônio marcado foi separado do não marcado com o auxílio da técnica de anticorpo secundário (anticorpo antigamaglobulina de coelho produzido em cabra) específico para AVP. Após a adição de 100 µL do segundo anticorpo, estes foram reincubados

por 24 h à 4°C, e no dia seguinte, após incubação de 4 a 6 horas pela adição de 1,0 mL de polietilenoglicol (PEG 6,25%), as amostras foram centrifugadas (1200 g, 4°C, 25 min) e o sobrenadante foi aspirado. A radioatividade no precipitado foi determinada com o auxílio de um contador gama (Cobra II Auto-Gamma, Packard Canberra Co., Meriden, CT, USA). 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 interensaios foi de 17%.

2.5. Temperatura Corporal

Em todos os protocolos experimentais a temperatura corporal foi monitorada por biotelemetria (Mini-Miter Co, Inc., Sunriver, OR). Os animais, previamente implantados com a sonda de telemetria, foram mantidos em caixas individuais nas condições experimentais no dia anterior ao experimento. As caixas contendo os animais foram colocadas sobre as placas receptoras de telemetria (antenas, modelo ER-4000, temperatura; Mini-miter, Sunriver, OR, EUA), as quais estavam conectadas a um microcomputador. Os dados foram adquiridos pelo computador e processados pelo programa Vital View (Mini-Miter Co. Inc., Sunriver, OR). Os registros foram feitos a intervalos de 15 minutos durante um período de 1 hora anterior, até 6 horas após o tratamento com LPS.

2.6. Drogas

As drogas utilizadas nestes experimentos foram: Lipopolissacarídeo de *E. coli* sorotipo 026:B6 (Sigma), 1,5 mg/kg (diluído em salina (0,9% de NaCl)

livre de pirógenos) administrado por via endovenosa (e.v.). As drogas administradas intracerebroventricular (icv) foram: Bileverdina (Porphyrin Produtos) dissolvida em 50 mmol/l de Na₂CO₃ e estocada em recipiente protegido da luz, Deferoxamine mesylate, Ferro Clorídrico (FeCl₃) dissolvida em 50 mmol/l de Na₂CO₃ e estocada em recipiente protegido da luz obtido da Sigma e salina saturada de CO, um tubo contendo 10ml da salina estéril mantido em gelo foi borbulhado com CO por 20 minutos.

Todas as drogas administradas icv foram administradas utilizando-se seringas Hamilton de 10 µl e o volume de droga administrado foi de 4µl.

2.7. Análise dos resultados

Todos os valores foram expressos como média ± 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. Foram considerados significativos valores de p<0,05.

2.8. Protocolos Experimentais

Protocolo 1: Determinação do efeito da administração de biliverdina sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos. O 1^o grupo recebeu administração intracerebroventricular (icv) de biliverdina 152nmol em um volume final de 4µl e intravenosa (iv) de LPS 1,5mg/kg de peso. O 2^o grupo recebeu administração icv de NA₂CO₃ 50nM em 4µl e iv de LPS 1,5mg/kg de peso. O 3^o grupo recebeu a administração icv de biliverdina 152nmol em um

volume final de 4 μ l e iv de salina isotônica estéril (SIE) 1ml, e o 4^o grupo recebeu administração icv de NA₂CO₃ 50nM em 4 μ l e iv de SIE 1ml.

Todas as drogas administradas icv foram administradas 30 minutos antes da administração de LPS.

Os animais foram decapitados 1, 2, 4 e 6 horas após a administração de LPS. Após a decapitação o sangue foi coletado para as posteriores dosagens .

A AVP do plasma dos animais decapitados foi extraída e as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20^oC para posterior dosagem de AVP por RIE.

Protocolo 2: Determinação do efeito da administração de ferro sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos. O 1^o grupo recebeu administração icv de cloreto de ferro 152 nmol em um volume final de 4 μ l e iv de LPS 1,5mg/kg de peso. O 2^o grupo recebeu administração icv de 4 μ l de SIE e iv de LPS 1,5mg/kg de peso. O 3^o grupo recebeu administração icv de cloreto de ferro 152 nmol em 4 μ l e iv de SIE 1ml, e o 4^o grupo recebeu administração icv de 4 μ l de SIE e iv de SIE 1ml.

Todas as drogas administradas icv foram administradas 30 minutos antes da administração de LPS.

Os animais foram decapitados 1, 2, 4 e 6 horas após a administração de LPS. Após a decapitação o sangue foi para as posteriores dosagens hormonais.

A AVP do plasma dos animais decapitados foi extraída e as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C para posterior dosagem de AVP por RIE.

Protocolo 3: Determinação do efeito da administração de salina saturada de CO sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos. O 1^o grupo recebeu administração icv de $4\mu\text{l}$ de salina saturada de CO e iv de LPS $1,5\text{mg/kg}$ de peso. O 2^o grupo recebeu administração icv de SIE $4\mu\text{l}$ e iv de LPS $1,5\text{mg/kg}$ de peso. O 3^o grupo recebeu administração icv de 4μ de salina saturada de CO e iv de SIE 1ml , e o 4^o grupo recebeu administração icv de SIE e iv de SIE 1ml .

Todas as drogas administradas icv foram administradas 30 minutos antes da administração de LPS.

Os animais foram decapitados 1, 2 e 3 horas após a administração de LPS. Após a decapitação o sangue foi coletado para as posteriores dosagens hormonais.

A AVP do plasma destes animais foi extraída e as amostras foram liofilizadas e armazenadas a -20°C para posterior dosagem de AVP por RIE.

Protocolo 4: Determinação do efeito da administração de biliverdina sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos e o tratamento de cada grupo será o mesmo tratamento utilizado no protocolo 1.

A pressão arterial média e a frequência cardíaca foram registradas a cada 15 minutos por um período de 6 horas após a administração de LPS.

Protocolo 5: Determinação do efeito da administração de ferro sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos e o tratamento de cada grupo será o mesmo tratamento utilizado no protocolo 2.

A pressão arterial média e a frequência cardíaca foram registradas a cada 15 minutos por um período de 6 horas após a administração de LPS.

Protocolo 6: Determinação do efeito da administração de salina saturada de CO sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos e o tratamento de cada grupo será o mesmo tratamento utilizado no protocolo 3.

A pressão arterial média e a frequência cardíaca foram registradas a cada 15 minutos por um período de 6 horas após a administração de LPS.

Protocolo 7: Determinação do efeito da administração de biliverdina sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos e o tratamento de cada grupo será o mesmo tratamento utilizado no protocolo 1.

A temperatura corporal foi registrada a cada 15 minutos por um período de 6 horas após a administração de LPS.

Protocolo 8: Determinação do efeito da administração de ferro sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos e o tratamento de cada grupo será o mesmo tratamento utilizado no protocolo 2.

A temperatura corporal foi registrada a cada 15 minutos por um período de 6 horas após a administração de LPS.

Protocolo 9: Determinação do efeito da administração de salina saturada de CO sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico.

Os animais foram divididos em 4 grupos e o tratamento de cada grupo será o mesmo tratamento utilizado no protocolo 3.

A temperatura corporal foi registrada a cada 15 minutos por um período de 6 horas após a administração de LPS.

3. Resultados

3.1. Determinação do efeito da administração de biliverdina sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico.

Na Figura 5 podemos observar que a administração endovenosa de LPS promoveu um aumento na liberação de AVP durante a primeira ($p < 0,05$) e segunda ($p < 0,001$) hora. Após a quarta hora da administração endovenosa de LPS podemos observar que a concentração plasmática de AVP se encontra próximas aos valores basais, permanecendo assim durante a sexta hora.

Quando a Biliverdina é administrada centralmente observamos que o aumento da concentração plasmática induzido por LPS é mantido durante a

primeira hora ($p < 0,001$). Porém a administração central de Biliverdina acentua o aumento da concentração plasmática de AVP induzido por LPS durante a segunda hora ($p < 0,001$) e este aumento é mantido durante a quarta hora após a administração de LPS ($p < 0,05$).

A administração central de Biliverdina não promoveu alteração na concentração plasmática de AVP quando comparada ao grupo controle.

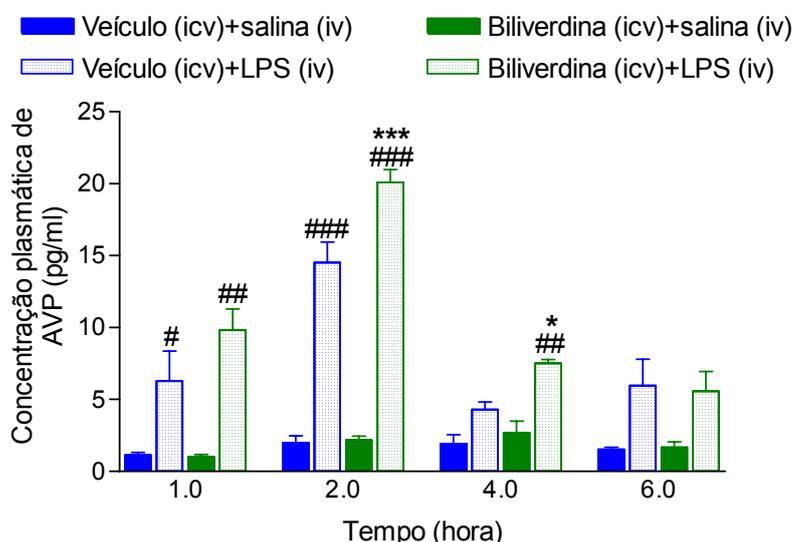


Figura 5: Efeito da administração central de Biliverdina sobre a liberação de AVP. Valores expressos como média \pm EPM, $n = 4$ a 6 por grupo. Diferença de # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparados com os grupos veículo + salina; diferença de * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com os grupos veículo + LPS.

3.2. Determinação do efeito da administração central de ferro sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico.

Podemos observar na Figura 6 que a administração endovenosa de LPS promoveu um aumento na concentração plasmática de AVP durante a segunda hora ($p < 0,001$). Na quarta e sexta hora após a administração de LPS a concentração plasmática de AVP retornou aos valores basais.

A administração central de ferro não promoveu diferença na concentração plasmática de AVP.

Observamos que os animais que receberam a administração central de ferro não apresentaram diferença na concentração plasmática de AVP quando comparados ao grupo controle (Veículo+salina).

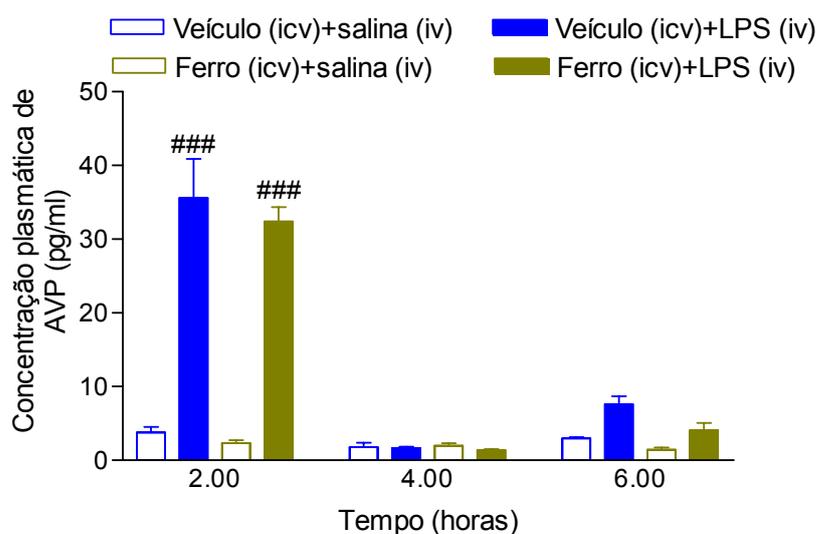


Figura 6: Efeito da administração central de ferro sobre a liberação de AVP. Valores expressos como média \pm EPM, n= 4 a 6 por grupo. Diferença ###p<0,001 quando comparados com os grupos veículo + salina.

3.3. Determinação do efeito da administração central de salina saturada de CO sobre a liberação de AVP durante o choque endotoxêmico

Na figura 7 podemos observar que a administração endovenosa de LPS promoveu um aumento na concentração plasmática de AVP durante a primeira ($p<0,05$), segunda ($p<0,001$) e terceira ($p<0,01$) hora após sua administração.

A administração central de salina saturada de CO não promoveu diferença na concentração plasmática de AVP induzida por LPS.

A administração central de salina saturada de CO não promoveu diferença na concentração plasmática de AVP quando comparada ao grupo controle.

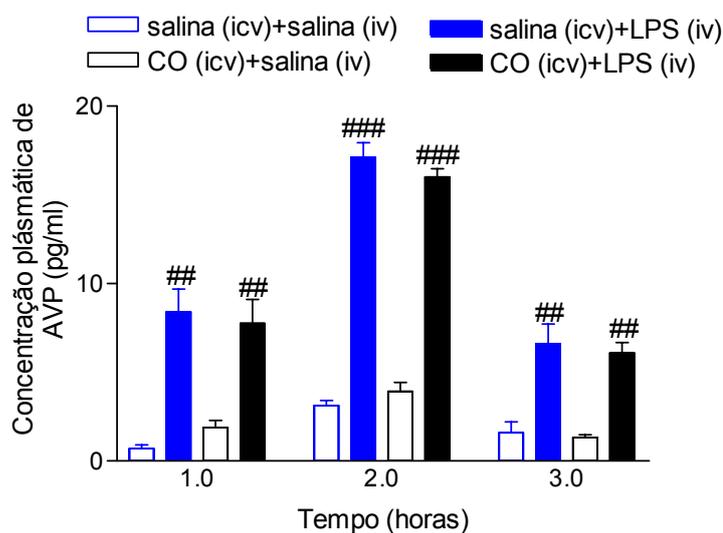


Figura 7: Efeito da administração central de salina saturada de CO sobre a liberação de AVP. Valores expressos como média \pm EPM, n= 4 a 6 por grupo. Diferença de $##p<0,01$ e $###p<0,001$ quando comparados com os grupos veículo + salina.

3.4. Determinação do efeito da administração de biliverdina sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca durante o choque endotóxico.

Na Figura 8a podemos observar que 15 minutos após a administração do LPS inicia-se queda progressiva da PAM que se mantém até o final do experimento (horas).

Quando os animais foram pré tratados com administração central de Biliverdina a queda da PAM induzida por LPS foi atenuada durante todo o período de experimento.

Na Figura 8b observamos que a administração de LPS leva ao aumento da FC uma hora e quinze minutos após sua administração e se mantém aumentada até o final do experimento (horas). Quando os animais receberam a administração central de Biliverdina o aumento da FC induzido por LPS foi acentuado.

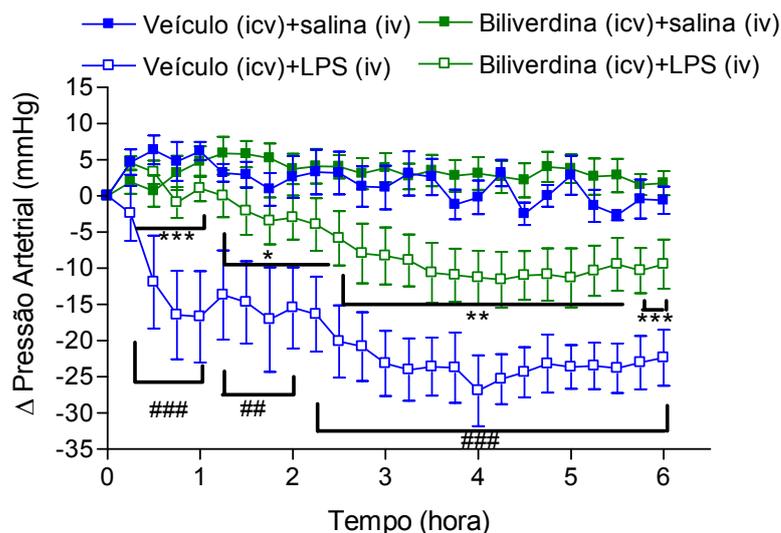


Figura 8a: Efeito da administração central de Biliverdina sobre a PAM. Valores expressos como média \pm EPM, n= 4 a 8 por grupo. Diferença de ## p <0,01 e ### p <0,001 quando comparados com os grupos veículo + salina; diferença de * p <0,05 ** p <0,01 e *** p <0,001 quando comparados com os grupos veículo + LPS.

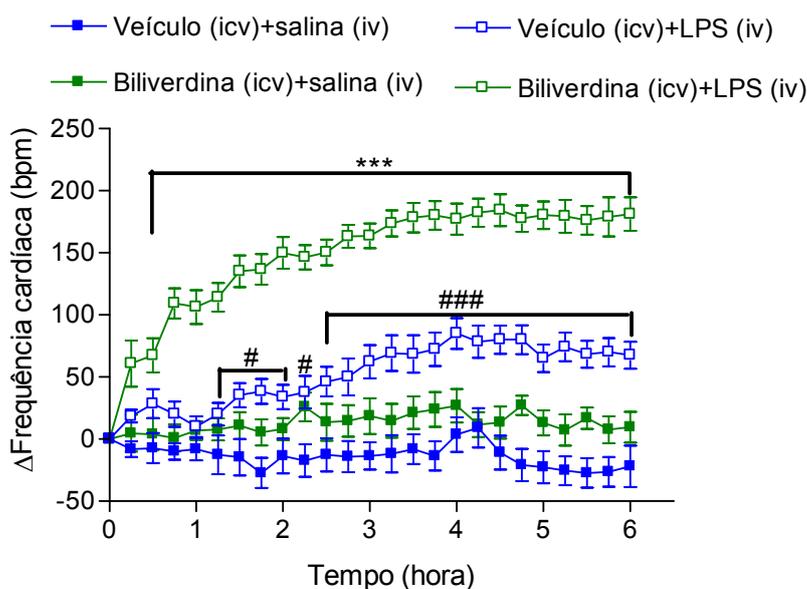


Figura 8b: Efeito da administração central de Biliverdina sobre a FC. Valores expressos como média \pm EPM, n= 4 a 8 por grupo. Diferença de # p <0,05 e

###p<0,001 quando comparados com os grupos veículo + salina; diferença de ***p<0,001 quando comparados com os grupos veículo + LPS.

3.5. Determinação do efeito da administração central de ferro sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico.

Como podemos observar na Figura 9a quinze minutos após a administração de LPS ocorre uma queda na PAM que se mantém até o final do experimento. O pré tratamento com a administração central de ferro não promoveu diferença na queda da PAM induzida por LPS.

Na Figura 9b podemos observar que administração de LPS promoveu um aumento da FC uma hora e quinze minutos após sua administração. A administração central de ferro promoveu acentuação do aumento da FC induzido pelo LPS.

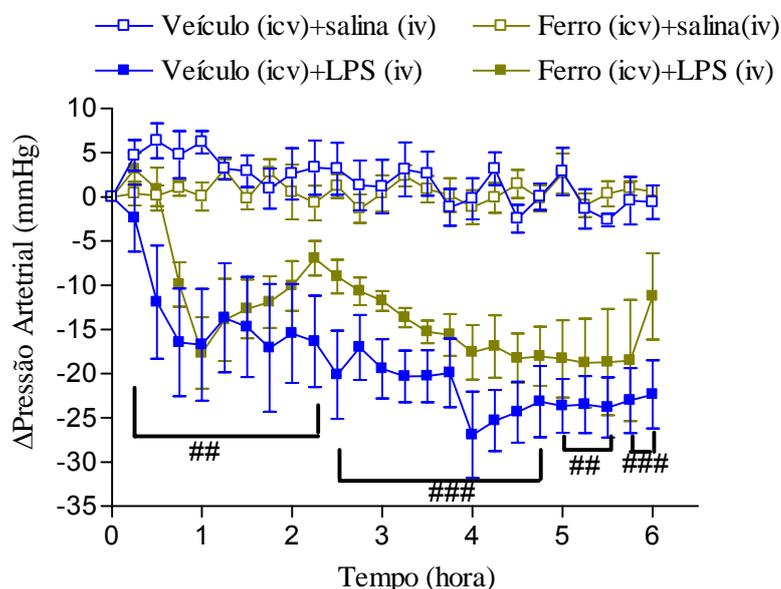


Figura 9a: Efeito da administração central de Ferro sobre a PAM. Valores expressos como média \pm EPM, n= 4 a 8 por grupo. Diferença de ##p<0,01 e ###p<0,001 quando comparados com os grupos veículo + salina.

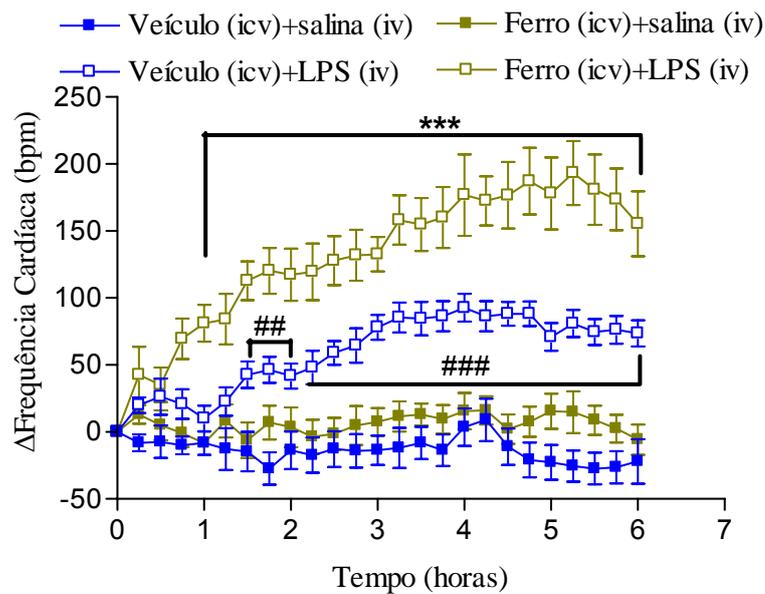


Figura 9b: Efeito da administração central de Ferro sobre a FC. Valores expressos como média \pm EPM, $n= 4$ a 8 por grupo. Diferença de ## $p<0,01$ e ### $p<0,001$ quando comparados com os grupos veículo + salina; diferença de *** $p<0,001$ quando comparados com os grupos veículo + LPS.

3.6. Determinação do efeito da administração central de salina saturada de CO sobre a pressão arterial média e frequência cardíaca durante o choque endotoxêmico.

A administração endovenosa de LPS promoveu queda progressiva da PAM uma hora e trinta minutos após sua administração, esta queda da PAM observada na Figura 10a se manteve até o final do experimento. A administração central de salina saturada de CO promoveu queda da PAM durante o período de quarenta e cinco minutos à uma hora e quinze minutos após a administração de LPS, após este período a queda da PAM foi igual a do grupo que recebeu veículo+LPS.

Na Figura 10b podemos observar que a administração de LPS promoveu aumento da FC após quarenta e cinco minutos de sua administração. O grupo de animais tratados com salina satura de CO não promoveu diferença no aumento da FC induzido por LPS.

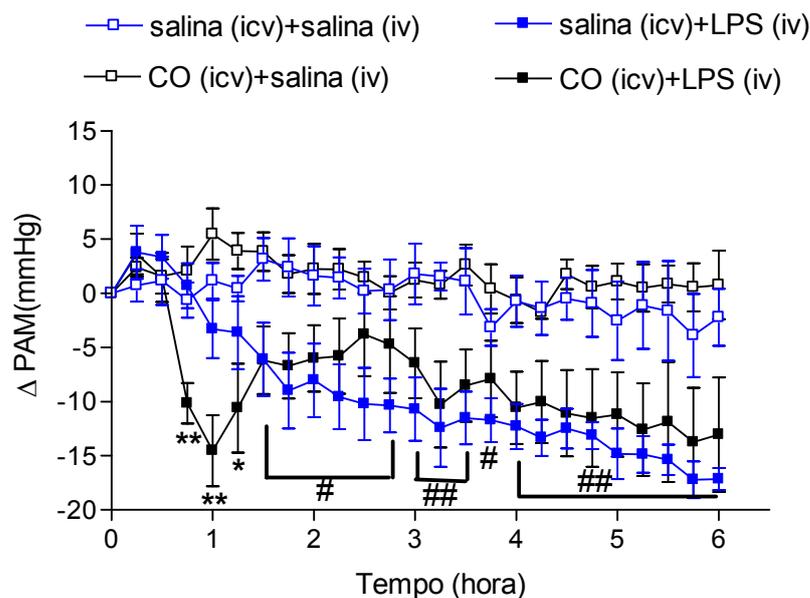


Figura 10a: Efeito da administração central de salina saturada de CO sobre a PAM. Valores expressos como média \pm EPM, n= 4 a 6 por grupo. Diferença de ### p <0,05 e ## p <0,01 quando comparados com os grupos veículo + salina, diferença de * p <0,05 e ** p <0,01 quando comparados com os grupos veículo + LPS.

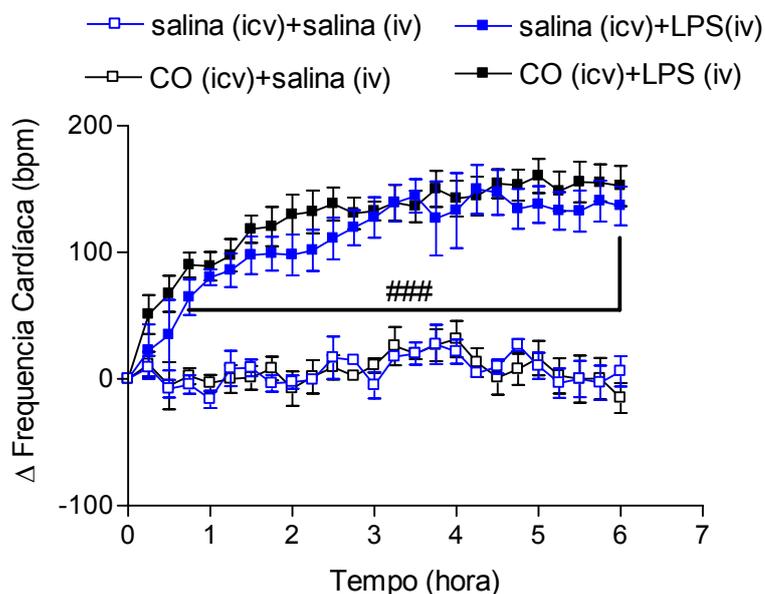


Figura 10b: Efeito da administração central de salina saturada de CO sobre a FC. Valores expressos como média \pm EPM, n= 4 a 8 por grupo. Diferença de ### p <0,001 quando comparados com os grupos veículo + salina.

3.7. Determinação do efeito da administração central de biliverdina sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico

Podemos observar na Figura 11, que a administração de LPS promoveu uma ligeira queda na TC (quarenta e cinco minutos e uma hora após sua administração), após duas horas e trinta minutos da administração de LPS ocorreu um aumento progressivo da Temperatura corporal, que se manteve até o final do experimento.

O grupo de animais pré tratados com a injeção central de biliverdina não apresentou diferença na resposta da TC induzida por LPS.

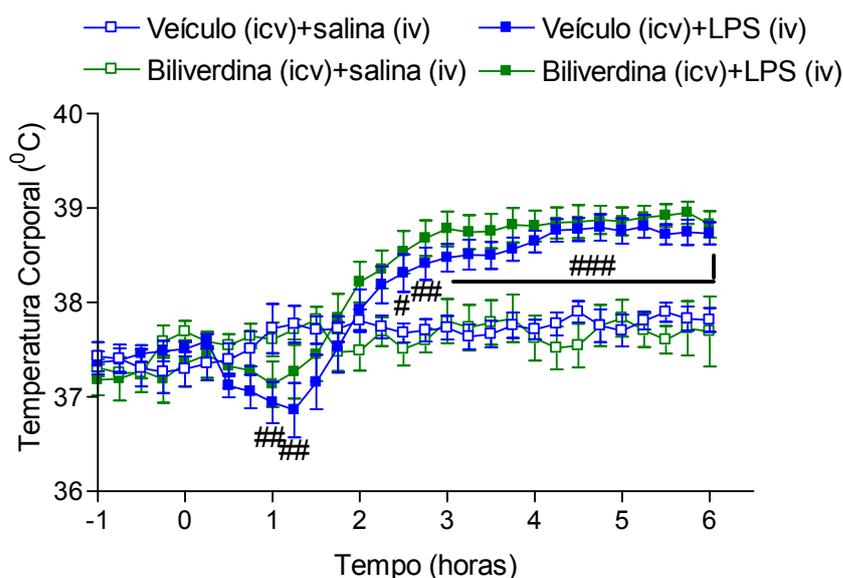


Figura 11: Efeito da administração central de Biliverdina sobre a TC. Valores expressos como média \pm EPM, n= 6 a 11 por grupo. Diferença de ## $p < 0,05$, ### $p < 0,01$ #### $p < 0,001$ quando comparados com os grupos veículo + salina.

3.8. Determinação do efeito da administração central de ferro sobre a temperatura corporal durante o choque endotoxêmico

A administração de LPS promoveu uma resposta bifásica na TC dos ratos, como podemos observar na Figura 12, uma hora após sua administração ocorre uma queda na TC que permanece até uma hora e trinta minutos. Porém a partir da terceira hora ocorre um aumento da TC que se mantém até o fim do experimento.

A administração central de ferro não alterou a resposta da TC gerada pela administração de LPS.

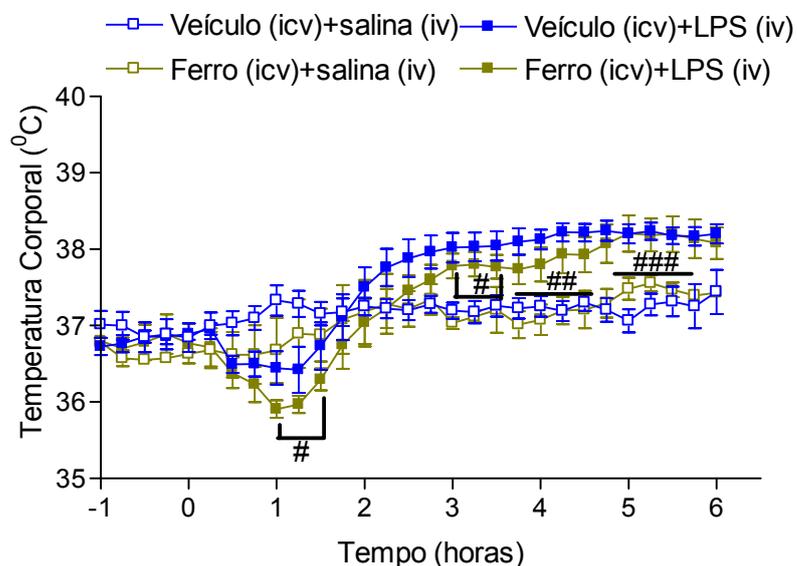


Figura 12: Efeito da administração central de Ferro sobre a TC. Valores expressos como média \pm EPM, n= 4 a 8 por grupo. Diferença de ## p <0,05, ### p <0,01 #### p <0,001 quando comparados com os grupos veículo + salina.

3.9. Determinação do efeito da administração central de salina saturada de CO sobre a temperatura corporal durante o choque endotóxico

Na Figura 12 podemos observar a resposta bifásica da TC gerada pela administração de LPS. Durante o período de quinze minutos até uma hora e quinze minutos ocorre uma queda da TC, duas horas e quinze minutos após a

administração de LPS podemos observar uma aumento progressivo da TC que se mantém até o fim do experimento.

Quando os animais foram pré tratados com injeção central de CO, não foi observada diferença em relação aos animais que receberam apenas salina+LPS.

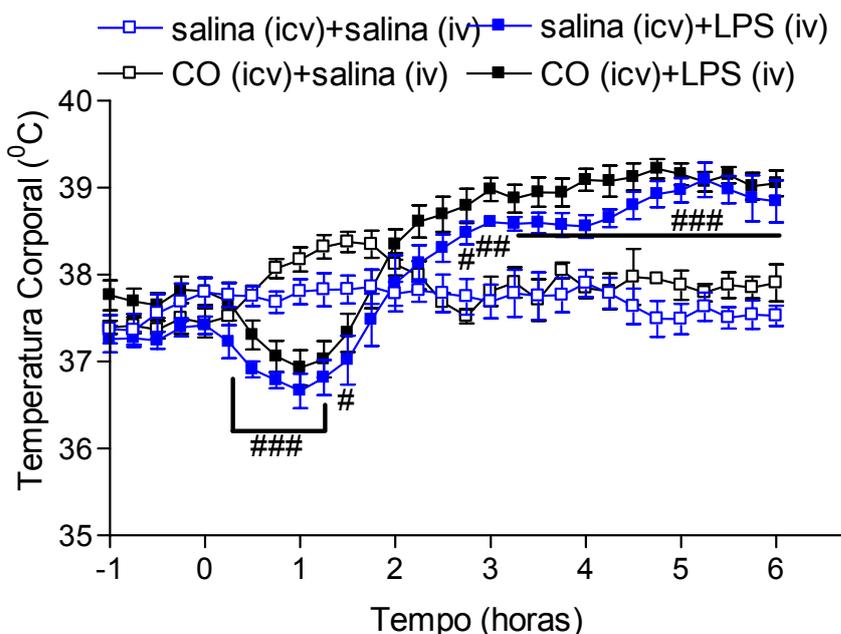


Figura 12: Efeito da administração central de salina saturada de CO sobre a TC. Valores expressos como média \pm EPM, n= 5 a 8 por grupo. Diferença de ###p<0,05, ##p<0,01 ####p<0,001 quando comparados com os grupos veículo + salina.

4. Discussão

Este estudo foi realizado para avaliar qual dos subprodutos da via da HO é responsável por suas ações na liberação de AVP, Tc, PAM e FC durante o choque endotoxêmico. Muitos trabalhos têm demonstrados os efeitos neuroprotetivos, antiinflamatórios, antiapoptóticos e antioxidantes da HO (Overhaus e cols, 2006; Otterbein e Choi, 2000 e Petrache e cols, 2000), porém não se sabe exatamente qual dos subprodutos desta via é responsável por suas ações. Alguns autores têm sugerido que o CO seja um dos responsáveis pelas ações da via da HO devido a semelhança entre suas ações

e as ações do óxido nítrico (NO) (Mancuso, 2004; Otterbein e cols, 2003). Entretanto alguns autores têm demonstrado a ação antioxidante e antiapoptótica da BV, sugerindo que esta também possa ser responsável pelas ações da via da HO (Neuzil e Stocker, 1994 e Ceran e cols, 2001).

A inibição da enzima HO em animais submetidos ao choque endotoxêmico promove a atenuação da queda da PAM induzida por LPS, porém aumenta a deterioração de órgãos internos (fígado, rins e pulmões), além de promover o aumento da mortalidade (Yu e Yao, 2008a). Estes autores sugerem que a HO auxilia na melhora dos sintomas de pacientes com choque séptico devido a suas ações antioxidantes, já que a atenuação da queda da PA induzida por LPS não melhorou a função dos órgãos danificados pela administração de LPS. A administração de hemina (substrato da HO) vinte e quatro horas antes da indução do choque endotoxêmico reduz a disfunção de órgãos vitais como rins, fígado e pulmões, além de diminuir o derrame vascular pulmonário e melhorar a disfunção diafragmática (Yu e Yao, 2008b).

Tamion e cols demonstraram que a administração de altas doses de LPS promove aumento da expressão da HO-1 no coração, intestino e pulmões. Ao administrar hemina vinte e quatro horas antes da administração de LPS houve acentuação do aumento da expressão de HO-1 induzida por LPS nestes órgãos. O pré-tratamento com hemina levou a uma melhora na disfunção destes órgãos e diminuiu a taxa de oxidantes. Os autores atribuem esta melhora devido a diminuição de TNF- α e aumento de IL-10, já que o TNF- α inicia uma cascata de mediadores endógenos levando a respostas inflamatórias e metabólicas culminando em disfunção dos órgãos e morte. Já a

IL-10 quando administrada exogenamente reduz a magnitude inflamatória e melhorar o suprimento dos órgãos (Tamion e cols, 2006).

Em nossos experimentos observamos que durante o choque endotoxêmico induzido pela administração de altas doses de LPS ocorreu queda inicial na TC dos animais, seguido de um aumento da Tc após aproximadamente a terceira hora de sua administração. A administração de LPS levou ainda a queda pronunciada da PAM, com conseqüente aumento da FC, estes resultados corroboram com resultados obtidos na literatura (Giusti-Paiva e cols, 2002 e Moreto e cols, 2004) Esta queda da PAM seria um estímulo significativo para o aumento da liberação da AVP, porém este aumento só é observado durante a segunda hora após a administração de LPS. Durante a quarta e sexta hora após a indução do choque endotoxêmico, justamente quando ocorre a queda mais pronunciada da PAM, as concentrações plasmáticas de AVP encontram-se em valores basais (Giusti-Paiva e cols, 2002 e Moreto e cols, 2004). Landry e cols compararam a concentração plasmática de AVP entre pacientes com choque septico e choque cardiogênico, eles observaram que o grau de hipotensão entre os dois grupos de pacientes era semelhante, porém o grupo de pacientes com choque cardiogênico apresentou concentração plasmática elevada, enquanto que os pacientes com choque septico apresentavam concentrações plasmáticas de AVP em valores basais (Landry e cols, 1997). Estes dados sugerem uma deficiência de AVP durante o choque endotoxêmico. Esta deficiência da concentração plasmática de AVP poderia ser devido a uma depleção dos estoques neuro-hipofisários de AVP, porém Giusti-Paiva e cols demonstraram que o conteúdo neurohipofisário de

AVP em ratos submetidos ao choque endotoxêmico é semelhante aos ratos controles (Giusti-Paiva e cols, 2002).

4.1.CO

O CO pode ativar um sistema de segundo mensageiro e assim mediar inúmeros processos fisiológicos como a ativação das proteino-kinases, canais iônicos e fosfodiesterases (Maines, 1997 e Wagener e cols, 2003). O CO endogenamente exerce seus efeitos através da ativação da Guanilato Ciclase solúvel (GCs) levando ao aumento intracelular de GMPc (Maines, 1997). Outra via de ação do CO pode ser através da ativação da enzima cicloxigenase (COX). Mancuso e cols ao administrar hemina em hipotálamos *in vitro* verificaram aumento de PGE₂, sugerindo o aumento da atividade da COX (Mancuso e cols, 1998). Podemos especular que este aumento de PGE₂ poderia agir no sistema nervoso central (SNC) promovendo febre. Steiner e cols administraram centralmente salina satura de CO em animais sem tratamento e verificaram um aumento da Tc destes animais durante 30 minutos e 1 hora após sua administração (Steiner e cols, 1999).

Porém como podemos observar na Figura 12, a administração central de salina saturada de CO não promoveu nenhuma alteração na Tc nem de animais controles assim como animais que receberam a administração de LPS. Essa resposta não esperada pode ser causada devido a baixa quantidade de CO liberado pelo cérebro ou pela rápida difusão do gás para fora do cérebro devido a alta afinidade do CO pela hemoglobina.

Alguns trabalhos demonstraram que a administração de inibidores não seletivos da via da HO promove inibição de hormônios como AVP e

corticotrofina (Kostoglou-Athanassiou e cols, 1998 e Mancuso e cols, 1999; Moreto e cols, 2004) tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Estes autores sugerem que o CO poderia ser o subproduto da via da HO responsável por essa ação inibitória sobre a liberação hormonal devido a suas ações neurotransmissoras e neuromoduladoras semelhantes ao NO (Marks e cols, 1991). Animais expostos a inalação de CO apresentaram queda na indução de interleucinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 durante inflamação pulmonar (Otterbein, 1999). Esta mesma resposta foi observada em culturas de macrófagos tratadas com LPS e expostas ao CO, a exposição ao CO levou a uma atenuação do aumento de TNF- α e IL-1 β induzido por LPS (Otterbein, 2000), esta via de sinalização do CO em macrófagos não envolve a via GCs-GMPc, mas sim através da ativação da via MAPK p38 (Otterbein, 2000).

A IL-1 β tem efeito estimulante sobre a secreção de AVP em neuro-hipófises estimuladas eletricamente em preparações *in vitro* (Chirstensen, 1990). Além disso, Pow e cols demonstraram a presença de microglia na neuro-hipófise de ratos, sugerindo a possibilidade do LPS estimular a secreção de IL-1 β pela microglia levando a secreção de AVP (Pow e cols, 1990). Estes dados sugerem que o CO através da diminuição da IL-1 β levaria uma atenuação da liberação de AVP induzida por LPS. Entretanto em nossos resultados (Fig: 7) não observamos nenhum efeito da administração central de salina saturada de CO sobre o aumento da concentração plasmática de AVP induzida por LPS.

Vários autores têm sugerido que o CO, produzido endogenamente pela ação da heme oxigenase (HO), tem participação na queda da PA induzida por LPS. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que inibidores da HO promovem

aumento da PA de ratos normais, e esse aumento é duas vezes maior em ratos geneticamente hipertensos (Seki e cols, 1997). Estes dados sugerem que o aumento da HO pode promover queda da PAM.

Durante a endotoxemia induzida por LPS ocorre um aumento do RNAm da HO-1 em células da musculatura vascular lisa e células endoteliais de vasos sanguíneos grandes e pequenos (Yet e cols, 1997). Este aumento também foi verificado em vários órgãos durante a endotoxemia (Pellacani e cols, 1998). Sendo assim, a queda da PAM durante a endotoxemia pode ocorrer devido a uma ação direta da HO. Em um trabalho desenvolvido por Yet e cols foi observado que, duas horas após a administração intraperitoneal de LPS, ocorre um aumento da atividade e do RNAm da HO no músculo vascular aórtico. Este aumento coincide com o período em que a PAM estava diminuída. Porém, quando o inibidor da HO foi administrado, esta queda da PAM foi abolida (Yet e cols 1997). Este aumento da atividade da HO poderia estar induzindo a queda do tônus vascular, promovendo assim a queda da PAM durante o choque endotóxico.

A administração exógena de CO promove uma queda na vasoconstrição induzida por fenilefrina (um vasoconstritor potente) em vasos arteriais renais (Kaide e cols, 2001). Sammut e cols observaram em seu experimento que a administração de inibidor da HO eleva o grau de constrição em anéis aórticos tratados com fenilefrina. Porém, a constrição induzida por fenilefrina é amenizada quando um doador da HO é adicionado (Sammut e cols, 1998).

Wiesel e cols verificaram que quatro e vinte e quatro horas após a administração de LPS o grupo de ratos knockout para a HO-1 apresentaram

um grau menor de hipotensão quando comparados a animais controles (Wiesel e cols, 2000).

Estes autores sugerem que a ação hipotensiva da HO ocorra através da ação do CO. O CO promove aumento da via GCs-GMPc, o que leva a queda do tônus vascular (Ryter e cols, 2002, Mancuso, 2004).

Em nossos experimentos a administração central de salina saturada de CO (Fig:10a) antecipou a queda da PAM induzida por LPS (durante o período de 45 minutos a uma hora e quinze minutos). Porém não houve diferença no aumento da FC induzida por LPS (Fig: 10b).

O efeito vasodilatador do CO foi postulado em 1978, quando observaram que o CO promoveu vasodilatação em vasculatura pulmonar em condições de normoxia e durante a hipoxia o CO reduziu a vasoconstrição da vasculatura pulmonar (Sylvester e McGowan, 1978). McGrath e Smith demonstraram a ação do CO em outros vasos, como na vasculatura coronária (McGrath e Smith, 1984). Esta ação do CO pode ser através da ativação da via GCs-GMPc, os quais tem propriedades vasodilatadoras (Morita e cols, 1995; Ryter e cols, 2002, Mancuso, 2004), ou por um caminho independente desta via, a qual promove estimulação dos canais de K ativados por Ca (Wang e cols, 1997; Kaid e cols, 2001).

Morita e cols também demonstraram a ação inibidora do CO sobre a Endotelina -1 (E-1) um potente vasoconstritor, promovendo assim a modulação do tônus vascular e PAM (Morita e cols,1995).

Estes dados sugerem que a administração central de CO promove controle do tônus vascular, levando a queda da PAM. Porém devido a rápida difusão do CO para fora do cérebro devido a sua alta afinidade pela

hemoglobina, não podemos afirmar que o CO seja o responsável pela queda da PAM durante o choque endotoxêmico induzido por LPS. Os CORMS, são substâncias desenvolvidas recentemente, que promovem a liberação de CO, esta substância talvez seja mais efetiva na avaliação do CO nos próximos trabalhos.

4.2. Ferro (Fe^{2+})

O ferro quando em altas quantidades pode causar danos celulares devido a sua ação pré-oxidante (Wagener e cols, 2003). O ferro aumenta a taxa de radicais hidroxil reativos, desde que participe da reação com fenton, a qual envolve H_2O_2 e assim o ferro reage com uma variedade de moléculas orgânicas resultando em grande quantidade de radicais livres (Tyrrell, 1999; Alayash e cols, 2001). Porém o ferro gerado pela ação da HO parece ter justamente efeito anti-oxidante. A geração de ferro pela ação da HO, leva ao aumento da ferritina, que captura o excesso de ferro livre (Mancuso, 2004).

Durante a sepse tanto em adulto quanto em crianças é verificado um aumento de ferritina, indicando aumento do seqüestro do ferro (Garcia e cols, 2007; Bullen e cols, 2005). Durante a sepse ocorre aumento da via da HO e conseqüentemente aumento de ferro. O ferro em grandes quantidades promove aumento da ferritina e o LPS por promover o aumento de espécies de oxigênio ativo (ROS) leva ao aumento da ferritina (Mehlhase e cols, 2006). Estes dados sugrem que o aumento da via HO-ferro induzido por LPS promove efeito anti-oxidante durante o choque endotoxêmico.

Outra ação do excesso de ferro livre observado durante a sepsi, é o aumento da virulência e diminuição da ação antibactericida do soro sanguíneo.

Em nossos experimentos observamos que a administração central de ferro, não promoveu alterações nas respostas induzidas por LPS na concentração plasmática de AVP, Tc e PAM (Fig:6, 9^a,12, respectivamente). Porém observamos a acentuação do aumento da FC induzida por LPS (Fig:12). Podemos especular que este aumento da FC ocorre devido a sua ação citoprotetiva ao estimular o aumento da ferretina, aumentando assim o seqüestro de ferro livre no órgão, culminando em queda de produção de ROS, que são deletérias as células.

4.3. Biliverdina (BV)

Muitos trabalhos têm demonstrado a ação antioxidante, antiinflamatória e citoprotetiva tanto da BV, assim como o produto de sua degradação a BR (Neuzil e cols, 1994; Otterbein e cols, 2003; Overhaus e cols, 2006; Andrews e cols, 2005).

O excesso de BV (quando excede a concentração de 300 μ M) resulta em efeitos patológicos para vários tecidos, assim como no caso de doenças ictirícia (Minetti e cols, 1998). Porém na medicina chinesa cálculos biliares de vaca secos, conhecidos por Niu Huang, têm sido utilizados tradicionalmente contra inflamações agudas (Kadl e cols, 2007). Indivíduos com altos níveis de biliverdina ou com síndrome de Gilbert, uma desordem genética que resulta em hiperbilirrubinia, apresentam menos riscos em desenvolver doenças vasculares que indivíduos normais (Vitek e cols, 2006 e Vitek e cols, 2002). Estes dados juntos sugerem a ação protetora da BV em doenças.

Na Figura 5 podemos observar que a administração central de BV promoveu um aumento da concentração plasmática de AVP durante a segunda

e quarta hora após a administração de LPS, quando comparado ao grupo que recebeu apenas veículo+LPS. Podemos especular que esta ação da BV ocorra através da inibição da estimulação da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e conseqüente diminuição da produção de óxido nítrico (NO).

O NO tem uma ação inibitória sobre a liberação de AVP. Tem sido demonstrado que a administração central de inibidor da NOS promove um aumento na liberação de AVP em animais intactos (Kadekaro e cols, 1998). Durante o choque endotoxêmico o NO produzido pela iNOS leva à inibição da liberação de AVP. Esta hipótese é reforçada pelo fato de que a administração central de aminoguanidina (inibidor específico da iNOS) promove um aumento da concentração plasmática de AVP durante a quarta e sexta hora após a administração de LPS (Giust-Paiva, 2002), sugerindo assim uma ação inibitória do NO sobre a liberação de AVP. A BV inibe a expressão da iNOS (óxido nítrico sintase) e a liberação de NO tanto *in vivo* quanto *in vitro* (Wang e cols, 2004).

Estes dados sugerem que a BV poderia aumentar a liberação de AVP devido a inibição da liberação de NO.

Trabalhos antigos têm sugerido que durante a endotoxemia ocorre um déficit na atividade simpática levando a supressão do barorreflexo e conseqüente prejuízo na secreção de AVP (Garrad e cols, 1993; McCann e cols, 1994; Itoh, 1980 e Okuno e cols, 1965).

A administração central de BV promoveu atenuação da queda da PAM induzida por LPS (Fig: 8a) a partir de quinze minutos após a administração do LPS, mantendo-se assim até o fim do experimento. O pré-tratamento com a BV também acentuou o aumento da FC induzida por LPS (Fig:8b). Alguns

trabalhos demonstram que a administração de LPS promove aumento da liberação de TNF α (Forfia e cols, 1998; Meldrum, 1998). O TNF α promove diminuição da contratilidade miocárdica, redução da fração de ejeção cardíaca, hipotensão e diminuição da resistência vascular periférica (Ellrodt e cols, 1985 e Jha e cols 1993). Alguns autores demonstraram que a administração de BV leva a inibição da produção de TNF α (Kadl e cols, 2007 e Wang e cols, 2004). Baseados nestes trabalhos podemos sugerir que a BV promove atenuação da queda da PAM durante o choque endotoxêmico através da inibição da indução de TNF α induzida por LPS.

Porém a administração de biliverdina não alterou a Tc induzida por LPS, estes dados confirmam resultados obtidos por Steiner e cols em ratos que receberam baixas dose de LPS (Steiner e cols, 2000).

5. Bibliografia

- Abraham N.G., Lin J.H.C., Schwartzman M.L., Levere R.D. & Shibahara S. (1988). The physiological significance of heme oxygenase. *Int. J. Biochem.* 20, 543-558
- Alexander C., Rietschel E.T. (2001). Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J. Endot. Res.*7, 167-203.
- American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus conference. (1992). Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest.* 101, 1644-55.
- Barnes P.J., Karin M. (1997). Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med.* 336(15), 1066-71.

- Baylis P.H., Robertson G.L. (1980). Rat vasopressin response to insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology*. 107, 1975-1979.
- Birnbaumer M.(2000). Vasopressin receptors. *Trends Endocrinol Metab*. 11(10), 406-10.
- Bone, RC. (1991) The pathogenesis of sepsis. *Ann. Int. Med*. 115, 457-469
- Briley E.M., Lolait S.J., Axelrod J., Felder C.C. (1994). The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. *Neuropeptides*. 27(1), 63-74.
- Bullen J.J., Rogers H.J., Spalding P.B., Ward C.G. (2005). Iron and infection: the heart of the matter. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 1;43(3),325-30.
- Ceran C, Sönmez K, Türkyllmaz Z, Demirogullari B, Dursun A, Düzgün E, Başaklar AC, Kale N: Effect of bilirubin in ischemia/reperfusion injury on rat small intestine. *J. Pediatr Surg*. 36:1764-1767, 2001.
- Chaby R. (1999). Strategies for the control of LPS-mediated pathophysiological disorders. *Drug Discov Today*. 4(5), 209-221.
- Chiu H, Brittingham JA, Laskin DL: Differential induction of heme oxygenase-1 in macrophages and hepatocytes during acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat: effect of hemin and biliverdin. *Toxicol Appl Pharmacol*. 181:106-115, 2002.
- Chow J.C., Young D.W., Golenbock D.T., Christ W.J., Gusovsky F. (1999). Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem*. 274(16), 10689-92.
- Christensen J.D., Hansen E.W., Fjalland B. (1990). Influence of interleukin-1 beta on the secretion of oxytocin and vasopressin from the isolated rat neurohypophysis. *Pharmacol Toxicol*.67(1), 81-3
- Conn P.M., Freeman M.E. (2000). Neuroendocrinology in physiology and medicine. *Humana Press*. 241-57.

- Dawson T.M. and Snyder S.H. (1994). Gases biological messengers: nitric oxide and carbon monoxide in the brain. *J. Neurosci.* 14, 5147-5159.
- Derijk R.H., Berkenbosch F. (1994). Hypothermia to endotoxin involves the cytokine, tumor necrosis factor and the neuropeptide vasopressin in rats. *Am J Physiol.* 35, R9-R14.
- Ejima K., Layne M.D., Carvajal I.M., Kritek P.A., Baron R.M., Chen Y-S, Saal J.V., Levy S-F Yet and Perrella M.A. (2003). Cyclooxygenase-2-deficient mice are resistant to endotoxin-induced inflammation and death. *FASEB J.* 17, 1325-1327
- Ellrodt A.G., Riedinger M.S., Kimchi A., Berman D.S., Maddahi J., Swan H.J., Murata G.H. (1985). Left ventricular performance in septic shock: reversible segmental and global abnormalities. *Am Heart J.* 110(2), 402-9.
- Ewing J.F. & Maines M.D. (1992). In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain differential distribution of isozyme 1 and 2. *Mol. Cell. Neurosci.* 3, 559-570.
- Forfia P.R., Zhang X., Ochoa F., Ochoa M., Xu X., Bernstein R., Sehgal P.B., Ferreri N.R., Hintze T.H. (1998). Relationship between plasma NOx and cardiac and vascular dysfunction after LPS injection in anesthetized dogs. *Am J Physiol.* 274(1 Pt 2), H193-201.
- Forsling M.L., Ingram D.L., Stanier M.W. (1976). Effects of various ambient temperatures and of heating and cooling the hypothalamus and cervical spinal cord on antidiuretic hormone secretion and urinary osmolality in pigs. *J Physiol London.* 257, 673-686.
- Garcia P.C.R., Longhi F., Branco R.G. (2007). Ferritin levels in children with sepsis and septic shock. *Acta paediatrica.* 96, 1829-31.

- Giusti-Paiva A., Castro M., Antunes-Rodrigues J., Carnio E.C. (2002) Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release septic shock. *Crit Care Med.* 30, 1306-1310
- Glauert A.M., Thornley M.J. (1969). The topography of the bacterial cell wall. *Annu. Rev. Microbiol.* 23, 159-98.
- Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, Kaplan M, Bromiker R, Eidelman AI, Gartner LM, Hochman A: Protective effect of bilirubin in ischemia-reperfusion injury in the rat intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 35:344-349, 2002.
- Harris H.W. Jr., Zeidel M.L., Jo I., Hammond T.G. (1994). Characterization of purified endosomes containing the antidiuretic hormone-sensitive water channel from rat renal papilla. *J Biol Chem.* 269(16), 11993-2000.
- Holmes C.L., Landry D.W., Granton J.T. (2003). Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. *Crit Care.* 7(6), 427-34.
- Holmes C.L., Landry D.W., Granton J.T. (2004). Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2--receptor physiology. *Crit Care.* 8, 15-23.
- Holmes C.L., Patel B.M., Russell J.A., Walley K.R. (2001). Physiology of vasopressin relevant to management of septic shock. *Chest.* 120(3), 989-1002.
- Hoshino K., Takeuchi O., Kawai T., Sanjo H., Ogawa T., Takeda Y., Takeda K., Akira S. (1999). Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J Immunol.* 162(7):, 749-52.
- Jha P., Jacobs H., Bose D., Wang R., Yang J., Light R.B., Mink S. (1993). Effects of E. coli sepsis and myocardial depressant factor on interval-force relations in dog ventricle. *Am J Physiol.* 264(5 Pt 2), H1402-10.

- Johnson R.A., Kozma F. & Colombari E. (1999). Carbon monoxide from toxin to endogenous modulator of cardiovascular functions. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 32, 1-14.
- Kadl A., Pontiller J., Exner M., Leitinger N. (2007). Single Bolus injection of bilirubin improves the clinical outcome in a mouse model of endotoxemia. *Shock.* 28(5), 582-8.
- Kaide J.I., Zhang F., Wei Y., Jiang H., Yu C., Wang W.H., Balazy M., Abraham N.G., Nasjletti A. (2001). Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors. *J Clin Invest.* 107(9), 1163-71.
- Karima R., Matsumoto S., Higashi H., Matsushima K. (1999). The molecular pathogenesis of endotoxic shock and organ failure. *Mol Med Today.* 5, 123-32.
- Karin M., Ben-Neriah Y. (2000). Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF- κ B activity. *Annu Rev Immunol.* 18, 621-63.
- Kasting N.W. (1986). Characteristics of body temperature, vasopressin and oxytocin responses to endotoxin in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 64, 1575-1578.
- Kasting N.W., Mazurek M.F., Martin J.B. (1985). Endotoxin increases vasopressin release independently of known physiological stimuli. *Am. J. Physiol.* 248, E420-E424.
- Kasting N.W., Veale W.L., Cooper K.E., Lederis K. (1981). Vasopressin may mediate febrile convulsions. *Brain Res.* 213, 327-333.
- Kitchens R.L., Wolfbauer G., Albers J.J., Munford R.S. (1999). Plasma lipoproteins promote the release of bacterial lipopolysaccharide from the monocyte cell surface. *J Biol Chem.* 274(48), 34116-22.
- Kostoglou-Athanassiou I., Forsling M.L., Navarra P. & Grossman A.B. (1996). Oxytocin release is inhibited by the generation of carbon monoxide from

the rat hypothalamus-further evidence for carbon monoxide as a neuromodulator. *Mol. Brain Res.* 42, 301-306.

Landry D.W., Levin H.R., Gallant E.M., Ashton R.C., Seo S., D'Álessandro D., Oz M.C., Oliver I.A. (1997). Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation.* 95, 1122-1125.

Liu J.P., Engler D., Funder J.W., Robinson P.J. (1994). Arginine vasopressin (AVP) causes the reversible phosphorylation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) protein in the ovine anterior pituitary: evidence that MARCKS phosphorylation is associated with adrenocorticotropin (ACTH) secretion. *Mol Cell Endocrinol.* 105(2), 217-26.

Maines M.D. (1997). The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 37, 517-554.

Malay M.B., Ashton R.C. Jr, Landry D.W., Townsend R.N. (1999). Low-dose vasopressin in the treatment of vasodilatory septic shock. *J Trauma.* 47(4), 699-703.

Mancuso C., Tringali G., Grossman A., Preziosi P. & Navarra P.(1998). The generation of nitric oxide and carbon monoxide produces opposite effects on release of immunoreactive interleukin-1 β from the rat hypothalamus in vitro: evidence for the involvement of different signaling pathways. *Endocrinology.* 139, 1031-1037.

Marks G.S., Brien J.F., Nakatsu K. & Mclaughlin B.E. (1991). Does carbon monoxide have a physiological function? *Trends Pharmacol. Sci.* 12, 185-188.

Mathison J.C., Tobias P.S., Wolfson E., Ulevitch R.J. (1992). Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of gram-negative LPS. *J Immunol.*149(1), 200-6.

- McGrath J.J., Smith D.L. (1984). Response of rat coronary circulation to carbon monoxide and nitrogen hypoxia. *Proc Soc Exp Biol Med.* 177(1), 132-6.
- Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Kopp E., Stadlen A., Chen C., Ghosh S., Janeway C.A. Jr. (1998). MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol Cell.* 2(2), 253-8.
- Mehlhase J., Gieche J., Widmer R., Grune T. (2006). Ferritin levels in microglia depend upon activation: modulation by reactive oxygen species. *Biochim Biophys Acta.* 1763(8), 854-9.
- Meldrum D.R. (1998). Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol.* 274(3 Pt 2), R577-95.
- Minetti M., Mallozzi C., Di Stasi A.M., Pietraforte D. (1998). Bilirubin is an effective antioxidant of peroxynitrite-mediated protein oxidation in human blood plasma. *Arch Biochem Biophys.* 352(2), 165-74.
- Moreto V., Stabile A.M., Antunes-Rodrigues J., Carnio E.C. (2006). Role of heme-oxygenase pathway on vasopressin deficiency during endotoxemic shock-like conditions. *Shock.* 26(5), 472-476.
- Morita T., Kourembanas S. (1995). Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest.* 96(6):2676-82.
- Morita T., Perrella M.A., Lee M. E. & Kourembanas S. (1995). Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 1475-1479.
- Morita T., Perrella M.A., Lee M.E., Kourembanas S. (1995). Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(5), 1475-9.
- Motterlini R., Foresti R., Intaglietta M and Winslow R.M.: NO-mediated activation of heme oxygenase: endogenous cytoprotection against oxidative stress to endothelium. *Am. J. Physiol.* 2710: H107-14, 1996.

- Mutlu G.M., Factor P. (2004). Role of vasopressin in the management of septic shock. *Intensive Care Med.* 30(7), 1276-91.
- Neuzil J, Stocker R: Free and albumin-bound bilirubin are efficient co-oxidants for alpha-tocopherol, inhibiting plasma and low density lipoprotein lipid peroxidation. *J. Biol Chem.* 269:16712-16719, 1994.
- Nikadido H., Vaara M. (1985). Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 49(1), 1-32.
- North W.G. (1987). Biosyntheses of vasopressin and neurophysin. In *Vasopressin: Principales and properties.* Plineus Press. New York.
- Ognibene EP, Parker MM, Natanson C, Shelhamer JH, Parrillo JE. (1988). Depressed left ventricular performance. Response to volume infusion in patients with sepsis and septic shock. *Chest.* 93, 903-910.
- Otterbein L. E., Bach F. H., Alam J., Soares M., Tao Lu H., Wysk M., Davis R.J., Flavell R. A., Choi A. M. (2000). Carbon monoxide has anti-inflammatory effects involving the mitogen-activated protein kinase pathway. *Nat. Med.* 6, 422–428.
- Otterbein L.E., Mantell L.L., Choi A.M. (1999). Carbon monoxide provides protection against hyperoxic lung injury. *Am J Physiol.* 276(4), L688-94.
- Otterbein LE, Choi AM. (2000).Heme oxygenase: colors of defense against cellular stress. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Dec;279(6):L1029-37.
- Otterbein LE, Soares MP, Yamashita K, Bach FH. (2003).Heme oxygenase-1: unleashing the protective properties of heme. *Trends Immunol.* Aug;24(8):449-55.
- Ouden D.D.T., Meinders A.E. (2005). Vasopressin: physiology and clinical use in patients with vasodilatory shock: a review. *Neth J Med.* 63(1), 4-13.
- Overhaus M, Moore BA, Barbato JE, Behrendt FF, Doering JG, Bauer AJ. (2006). Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating

inflammatory mediators. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* Apr;290(4):G695-703

Parker MM, Parrillo JE. (1983). Hemodynamics and pathogenesis. *JAMA.* 250, 3324

Parkers D., Kaschow J. & Vale W. (1994). Carbon monoxide modulates secretion of corticotropin-releasing factor from rat hypothalamic cell cultures. *Brain Res.* 23, 315-318.

Patel B.M., Chittock D.R., Russell J.A., Walley K.R. (2002). Beneficial effects of short-term vasopressin infusion during severe septic shock. *Anesthesiology.* 96(3), 576-582.

Pellacani A., Wisel P., Sharma A., Foster L.C., Huggins G.S., Yet S.F., Perrella M.A. (1998). Induction of heme-oxygenase-1 during endotoxemia is down regulated by transforming growth factor-1 β 1. *Circ Res.* 83, 396-403.

Petrache I, Otterbein LE, Alam J, Wiegand GW, Choi AM. (2000). Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* Feb;278(2):L312-9.

Phillips P.A., Abrahams J.M., Kelly J.M., Mooser V., Trinder D., Johnston C.I. (1990). Localization of vasopressin binding sites in rat tissues using specific V1 and V2 selective ligands. *Endocrinology.* 126(3), 1478-84.

Pow P.W., Morris J.F., Perry V.H., Gordon S. (1990). Immunohistochemically identified microglia in the posterior pituitary of the rat model the architecture of the neurosecretory terminals. Proceedings of the fourth international conference on the neurohypophysis. *Oxford University Press.* 95-7.

Pozzoli G., Mancuso C., Mirtella A., Preziosi P., Grossman A., Navarra P. (1994). Carbon monoxide as a novel neuroendocrine modulator: inhibition of stimulated corticotropin-releasing hormone release from acute hypothalamic explants. *Endocrinology.* 135, 2314-2317.

- Raetz C.R. (1991). Gram-negative endotoxin: an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. *FASEB J.*, 5, 2652-2660.
- Raetz C.R., Whitfield C. (2002). Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem.* 71, 635-700.
- Raju V.S. & Maines M.D. (1994). Coordinated expression and mechanism of induction of HSP32 (heme oxygenase-1) mRNA by hypertemia in rat organs. *Biochem. Biophys. Acta.* 1217, 273-280.
- Raju V.S. & Maines M.D. (1996). Renal ischemia/reperfusion up-regulates heme oxygenase-1 (HSP32) expression and increases cGMP in rat heart. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 1814-1822.
- Rietschel E.T., Brade H. (1992). Bacterial endotoxins. *Sci. Am.*, 267 (2), 54-61.
- Rietschel E.T., Kirikae T., Schade F.U., Mamat U., Schmidt G., Loppnow H., Ulmer A.J., Zähringer U., Seydel U., Di Padova F., et al. (1994). Bacterial endotoxin: molecular relationships of structure to activity and function. *FSEB J.* 8(2), 217-25.
- Rizzardini M., Carelli M., Cabello, Porras M.R. & Cantoni L. (1994). Mechanisms of endotoxin-induced haem oxygenase mRNA accumulation in mouse liver: synergism by glutathione depletion and protein by N-acetylcysteine. *Biochem. J.* 304, 477-483.
- Rousseau-Merck M.F., René P., Derré J., Bienvenu T., Berger R., De Keyzer Y. (1995). Chromosomal localization of the human V3 pituitary vasopressin receptor gene (AVPR3) to 1q32. *Genomics.* 30(2), 405-6.
- Rowe J.W., Shelton R.L., Helderman J.H., Vestal R.E., Robertson G.L. (1979). Influence of the emetic reflex on vasopressin release in man. *Kidney Int.* 16, 729-735.

- Rüegg U.T., Wallnöfer A., Weir S., Cauvin C. (1989). Receptor-operated calcium-permeable channels in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol.* 6, S49-58.
- Ryter S. W., Morse D. and Choi A. M. K. (2004). Carbon Monoxide: To Boldly Go Where NO Has Gone Before. *Sci. STKE* 15, 1-10
- Ryter S.W., Otterbein L.E., Morse D., Choi A.M. (2002). Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. *Mol Cell Biochem.* 234-235(1-2), 249-63.
- Sarady-Andrews J.K., Liu F., Gallo D., Nakao A., Overhaus M., Ollinger R., Choi A.M., and Otterbein L.E.: Biliverdin administration protects against endotoxin-induced acute lung injury in rats. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 289(6): L1131-7, 2005)
- Schaller M.D., Waeber B., Nussberg J., Brunner H.R. (1985). Angiotensin II, vasopressin and sympatic activity in conscious rats with Endotoxemia. *Am J Physiol.* 249, H1086-H1092.
- Share L. and Levy M.N. (1966). Carotid sinus pulse pressure, a determinant of plasma antidiuretic hormone concentration. *Am J Physiol* 211, 721-724.
- Silva E, Pedro MA, Sogavar AC, Mohovic T, Silva CL, e colaboradores. Brazilian sepsis epidemiological study (BASES study). *Crit Care.* 8:R251-R260, 2004.
- Sjostrand T. (1949). Endogenous formation of carbon monoxide in man under normal and pathological condition. *J. Clin. Lab. Invest.* 1, 201-210.
- Steiner A.A. & Branco L.G.S. (2000). Central CO-heme oxygenase pathway raises Body temperature by a prostaglandin-independent way. *J. Appl. Physiol.* 88, 1607-1613.
- Steiner A.A., Colombari E., Branco L.G. (1999). Carbon monoxide as a novel mediator of the febrile response in the central nervous system. *Am. J. Physiol.* 277, R499-507.

- Sylvester J.T., McGowan C. (1978). The effects of agents that bind to cytochrome P-450 on hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Circ Res.*43(3), 429-37.
- Szczepanka-Sadowska E. (1974). Plasma ADH increase and thirst suppression elicited by preoptic heating in the dog. *Am J Physiol.* 226, 155-161.
- Tamion F., Richard V., Renet S., Thuillez C. (2006). Protective effects of hemoxygenase expression against endotoxic shock: inhibition of tumor necrosis factor-alpha and augmentation of interleukin-10. *J Trauma.* 61(5), 1078-84.
- Thibonnier M., Coles P., Thibonnier A., Shoham M. (2002). Molecular pharmacology and modeling of vasopressin receptors. *Prog Brain Res.*139, 179-96.
- Thiemermann C. (1999). Nitric oxide in septic shock. *Bioch Bioph Acta* 1411, 437-455.
- Titleradge, MA. (1999). Nitric oxide in septic shock. *Bioch Bioph Acta.* 1411, 437-455
- Tobias P.S., Soldau K., Ulevitch R.J. (1989). Identification of a lipid A binding site in the acute phase reactant lipopolysaccharide binding protein. *J Biol Chem.* 264(18), 10867-71.
- Vítek L., Jirsa M., Brodanová M., Kalab M., Marecek Z., Danzig V., Novotný L., Kotal P. (2002). Gilbert syndrome and ischemic heart disease: a protective effect of elevated bilirubin levels. *Atherosclerosis.* 160(2), 449-56.
- Vítek L., Novotný L., Sperl M., Holaj R., Spácil J. (2006). The inverse association of elevated serum bilirubin levels with subclinical carotid atherosclerosis. *Cerebrovasc Dis.* 21(5-6):408-14.
- Wagener Annane D., Belissante Bellissant E., Cavillon J.M. (2005). Septic shock. *Lancet.* 365, 63-78.

- Wagener F.A., Volk H.D., Willis D., Abraham N.G., Soares M.P., Adema G.J., Figdor C.G. (2003). Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacol Rev.* 55(3):551-71.
- Wang R., Wu L., Wang Z. (1997). The direct effect of carbon monoxide on KCa channels in vascular smooth muscle cells. *Pflugers Arch.* 434(3), 285-91.
- Wang W.W., Smith D.L.H., Zucker S.D. (2004). Bilirubin inhibits iNOS expression and NO production in response to endotoxina in rats. *Hepatology.* 40, 424-33.
- Weizheng W. Wang, Darcey L. H. Smith, and Stephen D. Zucker. (2004). Bilirubin Inhibits iNOS Expression and NO Production in Response to Endotoxin in Rats. *Hepatology*, 40 (2), 424-33.
- Wesche H., Henzel W.J., Shillinglaw W., Li S., Cao Z. (1997). MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity.* 7(6), 837-47.
- Wiesel P., Patel A.P., Difonzo N., Marria P.B., Sim C.U., Pellacani A., Maemura K., LeBlanc B.W., Marino K., Doerschuk C.M., Yet S.F., Lee M.E., Perrella M.A. (2000). Endotoxin-induced mortality is related to increase oxidative stress and end-organ dysfunction, not refractory hypotension, in heme oxygenase-1-deficiente mice. *Circulation.* 102, 3015-3022.
- Willis D. (1999). Overview of OH-1 in inflammatory pathologies. Inducible enzymes in the inflammatory response. ed. Wiloughby D.A. Tomlinson A. Birkhäuser Verlag Basel. Switzerland. 55-92.
- Wurfel M.M., Hailman E., Wright S.D. (1995). Soluble CD14 acts as a shuttle in the neutralization of lipopolysaccharide (LPS) by LPS-binding protein and reconstituted high density lipoprotein. *J Exp Med.* 181(5), 1743-54.
- Yet S. F., Pellacani A., Patterson C., Tan L., Folta S.C., Foster L., Lee W.S., Hsieh C.M., Perrella M.A. (1997). Induction of heme-oxygenase-1

expression in vascular muscle cells: a link to endotoxic shock. *J Biol Chem.* 272, 4295-4301.

Yu B., Hailman E., Wright S.D. (1997). Lipopolysaccharide binding protein and soluble CD14 catalyze exchange of phospholipids. *J Clin Invest.* 99(2), 315-24.

Yu J.B., Yao S.L. (2008a). Effect of heme oxygenase-endogenous carbon monoxide on mortality during septic shock in rats. *Ir J Med Sci.* 4

Yu J.B., Yao S.L. (2008b). Protective effects of hemin pretreatment combined with ulinastatin on septic shock in rats. *Chin Med J (Engl).* 121(1):49-55.

Zegdi R., Perrin D., Burdin M., Boiteau R., Tenailon A. (2002). Increased endogenous carbon monoxide production in severe sepsis. *Intensive Care Med.* 28, 793-796.

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](#)