

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular

**EFEITOS DO LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO (*E.coli* EH100)
SOBRE A REGULAÇÃO DO BALANÇO HIDROELETROLÍTICO EM
RATOS DESIDRATADOS**

Wanda Silva Costa

Belém
2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Wanda Silva Costa

**EFEITOS DO LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO (*E.coli* EH100)
SOBRE A REGULAÇÃO DO BALANÇO HIDROELETROLÍTICO EM
RATOS DESIDRATADOS**

**Dissertação de mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Neurociências
e Biologia Celular, Área de concentração
Neurociências, como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre.**

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz W. P. Diniz

Belém

2008

Wanda Silva Costa

Efeitos do Lipopolissacarídeo Bacteriano (*E.coli* EH100) Sobre a Regulação do Balanço Hidroeletrólítico em Ratos Desidratados.

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Área de concentração Neurociências, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Belém, 2008.

Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz (Orientador)
Departamento de Fisiologia, UFPA

Banca examinadora:

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por iluminar os meus caminhos, não permitindo que eu desistisse diante dos desafios e insucessos.

A minha mãe, Alice, meu orgulho e exemplo de vida. Obrigada pelo amor incondicional e incentivo ao estudo. Às minhas seis irmãs, por sempre torcerem pelo meu sucesso e por encherem minha vida de alegrias. Vocês são as mulheres da minha vida. Amo todas vocês!

Ao meu pai, Eisenhower (*in memoriam*), pelo amor incondicional.

Ao meu marido e amigo de todas as horas, Artur, que junto com minha mãe vibram pelas minhas conquistas. Obrigada pelo incentivo constante, apoio incondicional, pelo amor, pela paciência e compreensão em todos os momentos. Você é muito importante na minha vida!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz, por ter me aceitado no seu grupo de pesquisa e pelos incentivos e ensinamentos a mim repassados. Obrigada pela confiança e por acreditar na minha capacidade.

Aos meus amigos do Laboratório de Neuroendocrinologia (Alan, Ellen, Márcia, Daisy, Andréa, Valéria, Waldiney, Lúcia, Siany, Mara, Luiz Antônio, Herculano, Osvaldo), agradeço pela amizade e ajuda sempre disponível e indispensável durante toda a realização desse trabalho. Essa vitória também é de vocês.

Ao Professor Dr. Cláudio Salgado por ter contribuído com esse trabalho através do fornecimento de LPS, indispensável para a execução dos experimentos.

Ao Laboratório de Neuroquímica da UFPA e Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP e ao Professor Dr. José Antunes Rodrigues pela disponibilidade de seu laboratório.

RESUMO

O LPS, um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, induz uma série de mudanças fisiológicas e patológicas que alteram a homeostase do organismo. Esse trabalho mostra os efeitos inibidores da administração de doses subsépticas de uma endotoxina bacteriana (25, 50, 100 e 300 µg/Kg de p.c.) sobre a ingestão preferencial de sódio em teste de privação de água e alimento por 36 horas e aumento na concentração plasmática de ocitocina (OT) e nitrato (NO₃⁻), um dos metabólitos exclusivos de óxido nítrico (NO). Além de teste associado de ingestão de água foram também avaliadas a osmolalidade plasmática e os níveis circulantes de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) sem, no entanto, apresentarem alterações significativas. Ratos machos Wistar (270–300g) foram submetidos ao protocolo de privação de água e alimento por 36 h, sendo que 30 min antes do final deste período receberam (via i.p.) doses subsépticas de LPS (25, 50, 100 ou 300 µg/Kg; *Escherichia coli* EH100). Após um período (2 h) de re-hidratação parcial foi oferecido por mais 1 hora água e NaCl 1,8%. Os animais foram sacrificados e amostras de sangue foram coletadas para posterior análise de NO, OT, Na⁺, K⁺ e osmolalidade plasmática através das técnicas de Quimiluminescência NO/Ozônio, RIE, fotometria de chama e osmômetro respectivamente. Os resultados são expressos como média ± EPM e as diferenças estatisticamente significantes (*p<0,05, ***p<0,001) foram avaliadas por Teste *t* e ANOVA. Da dose mínima (25 µg/Kg) à máxima (300 µg/Kg) ocorreu inibição de 71,6% a 92,6% do apetite ao sódio, respectivamente. Em contraste, observamos que a endotoxina estimulou de maneira dose-dependente a produção periférica de nitrato (mínimo de 52,28% e máximo de 244%) e OT (mínimo 196,04% a máximo 1063,40%). O aumento de nitrato mostrou a eficácia do LPS em estimular a produção sistêmica de NO, independente das concentrações utilizadas serem consideradas subsépticas, e, portanto, não devem ter induzido alterações hemodinâmicas substanciais. Estes efeitos não foram seguidos de variações na ingestão de água, nos níveis de Na⁺, K⁺ e osmolalidade plasmática, sugerindo que a elevação da concentração plasmática de OT não estaria relacionada a um estímulo osmótico. Em contrapartida, a inibição na ingestão preferencial de sódio poderia estar relacionada à estimulação da secreção de OT, um neurohormônio reconhecidamente inibidor da ingestão de sal. Finalmente, este estudo mostrou que doses subsépticas de LPS podem induzir déficit na reposição de sódio (após re-hidratação parcial) relacionado ao aumento na secreção de OT de forma independente de variações nos níveis plasmáticos de Na⁺, K⁺ e osmolalidade.

Palavras-chave: Lipopolissacarídeo, Ocitocina, Óxido Nítrico, Ingestão de Água e Sódio.

ABSTRACT

LPS, a cell wall component of gram-negative bacteria, induces series of physiology and pathology changes that alter the organism's homeostasis. This work shows inhibitory effects on the administration of subseptic doses of a bacterial endotoxin (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ of body weight) on the preferential intake of sodium in water and food's deprivation test for 36 hours and increase in plasma concentration of oxytocin (OT) and nitrate (NO_3^-), one of the exclusive metabolic of nitric oxide (NO). Beyond water intake related tests, plasma osmolality and levels of sodium (Na^+) and potassium (K^+) were evaluated and did not show significant alterations. Male Wistar rats (270–300 g) were submitted to water and salt deprivation protocol for 36 hours, and 30 minutes before the end of this period rats received (intraperitoneal) subseptic doses of LPS (25, 50, 100 ou 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; *E. coli* EH100). After a period (2 h) of partial re-hydration, water and NaCl 1,8% were offered for another hour. The animals were sacrificed and blood samples were collected for posterior analysis of NO, OT, Na^+ , K^+ and plasma osmolality through the Chemiluminescence NO/Ozônio, Radioimmunoassay, flame photometry and osmometer techniques, respectively. The results are expressed as mean \pm SEM and statistically significant differences (* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$) were evaluated through *t* Test and ANOVA. From minimum (25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) to maximum (300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) doses, sodium intake inhibition of 71,6% to 92,6% were observed, respectively. On the other hand, we observed that endotoxin has stimulated peripheral production of nitrate in a dose-dependent manner (minimum of 52,28% and maximum of 244%) and OT (minimum 196,04% to maximum 1063,40%). This nitrate's increase showed the efficacy of LPS on stimulating systemic production of NO, even with subseptics concentrations that should not have induced substantial hemodynamics alterations. These effects were not followed by variations in the water intake, in the levels of plasma of Na^+ , K^+ and osmolality, suggesting that elevation of plasma concentration of OT would not be related with an osmotic stimulus. Otherwise, the inhibition in the preferential intake of sodium could be related to stimulation of OT secretion, a neurohormone that inhibits salt intake. Finally, this work has shown that subseptics doses of LPS can induce salt reposition deficit (after partial re-hydration) related to the increase of OT secretion, independent on different levels of Na^+ , K^+ and osmolality plasma.

Key-words: Lipopolysaccharide, Oxytocin, Nitric Oxide, Water and Sodium Intake.

LISTA DE BREVIATURAS

ACTH: Hormônio Adrenocorticotrófico
ANG II: Angiotensina II
ANP: Peptídeo Natriurético Atrial
AV3V: Região Anterior do Terceiro Ventrículo
AVP: Arginina Vasopressina
BHE: Barreira Hematoencefálica
BVE: Expansão do Volume Sanguíneo
CO: Monóxido de Carbono
COX: Ciclooxigenase
E. coli: *Escherichia coli*
IL-1: Interleucina 1
IL-6: Interleucina 6
IL-1 β : Interleucina 1 Beta
i.c.v.: Intracerebroventricular
i.v.: Intravenoso
i.p.: Intraperitoneal
K⁺: Potássio
L-NAME: N-nitro-L-arginina metiléster
LPS: Lipopolissacarídeo
MnPO: Núcleo Pré-optico Mediano
Na⁺: Sódio
NaCl 1,8%: Cloreto de Sódio Hipertônico
NADPH: Dicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida
NO: Óxido Nítrico
NOS: Óxido Nítrico Sintase
NOS-I: Óxido Nítrico Sintase I ou Neuronal
NOS-II: Óxido Nítrico Sintase II ou Induzida
NOS-III: Óxido Nítrico Sintase III ou Endotelial
NO₃⁻: Nitrato
OCVs: Órgãos Circuventriculares
OT: Ocitocina

OVLT: Órgão Vascular da Lâmina Terminal

PGs: Prostaglandinas

PRL: Prolactina

PVN: Núcleo Paraventricular

ROS: Espécies Reativas de Oxigênio

SFO: Órgão Subfornicial

SNC: Sistema Nervoso Central

SON: Núcleo Supra-óptico

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. Regulação do Balanço de Sódio e Água no Organismo.....	10
1.2. Integração Neuroimunoendócrina na Toxemia Induzida por LPS.....	15
1.3. Objetivos.....	21
1.3.1. <i>Geral</i>	21
1.3.2. <i>Objetivos Específico</i>	21
2. MATERIAL E MÉTODOS	22
2.1. Animais.....	22
2.2. Determinação Indireta do NO Plasmático pela Dosagem de Nitrato	22
2.3. Determinação dos Eletrólitos (Na ⁺ e K ⁺) no Plasma	23
2.4. Determinação da Osmolalidade Plasmática	23
2.5. Determinação da Concentração Plasmática de Ocitocina pela Técnica de Radioimunoensaio.....	24
2.6. Protocolo Experimental	25
2.7. Análise Estatística dos Dados.....	26
3. RESULTADOS	27
3.1. Efeito da Administração de Doses Subsépticas de LPS Sobre os Níveis Plasmáticos de Nitrato em Ratos Privados por 36 horas	27
3.2. Efeitos da Administração de Doses subsépticas de LPS Sobre os Níveis Plasmáticos de Na ⁺ e K ⁺ em Ratos Privados por 36 horas.....	28
3.3. Efeitos da Administração de Doses Subsépticas de LPS Sobre a Osmolalidade Plasmática em Ratos Privados por 36 horas.....	28
3.4. Efeitos da Administração de Doses Subsépticas de LPS Sobre o Comportamento de Ingestão Hídrica em Ratos Privados por 36 horas.....	29
3.5. Efeitos da Administração de Doses Subsépticas de LPS Sobre o Comportamento de Ingestão de NaCl 1,8% em Ratos Privados por 36 horas	30
3.6. Efeitos da Administração da Dose subséptica de 300 µg/Kg de LPS Sobre a Concentração Plasmática de Ocitocina	31
4. DISCUSSÃO	32
5. CONCLUSÃO.....	37
6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	38

1. INTRODUÇÃO

1.1. Regulação do Balanço de Sódio e Água no Organismo

A manutenção da osmolalidade plasmática e a regulação de volume dos vários compartimentos do organismo são fundamentais para manter os animais em condições fisiológicas. A constância do meio interno é mantida basicamente pelo controle da ingestão e excreção renal de sal e água. As alterações do volume do líquido extracelular, volemia e pressão sanguínea também constituem um estímulo importante para a ingestão de água, porém com menor eficiência (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Em condições de hiperosmolalidade são ativados mecanismos de indução da sede mediados por angiotensina II (ANG II) e redução da excreção urinária de água mediada por vasopressina (AVP), por outro lado mecanismos que inibem o consumo adicional de soluto e mecanismos que induzem a excreção de sódio (Na^+) são mediados, principalmente, pela ocitocina (OT) e peptídeo natriurético atrial (ANP) (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Estudos sugerem que o hipotálamo funciona como uma balança equilibrada por forças estimulatórias ou inibitórias provenientes de estruturas extra-hipotalâmicas preponderantemente límbicas, sendo que o hipotálamo ântero-medial atuaria estimulando a reposição de sal, enquanto que o hipotálamo ântero-lateral atuaria inibindo essa reposição a partir de perdas ou ganhos de sódio circulante. A área septal e o bulbo olfatório atuariam estimulando áreas inibidoras da amígdala e do hipotálamo, reforçando uma ação inibitória na reposição de sal ativada por essas áreas (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

No hipotálamo, os sensores que detectam variações de osmolalidade e concentração de sódio estão localizados, principalmente, em órgãos circunventriculares (OCVs). Estes neurônios especializados estão conectados ao sistema Renina-Angiotensina central e podem ser modulados pelo sistema Renina-Angiotensina sistêmico. A sede pode ser eliciada por ativação destes neurônios ou por ativação dos neurônios angiotensinérgicos diretamente (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

O aumento da concentração de sódio ou de outro soluto osmoticamente ativo pode ativar o sistema Hipotálamo-Neurohipófise a uma resposta neuroendócrina que resulta em correções da osmolalidade plasmática pela perda renal de sódio estimulada por ocitocina,

peptídeo natriurético atrial e vasopressina ou retenção renal de água induzida por AVP (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

O sistema Hipotálamo-Neurohipofisário está localizado na parte medial do hipotálamo anterior e compreende o núcleo paraventricular (PVN) em par, um de cada lado da parede dorso-lateral do terceiro ventrículo e o núcleo supra-óptico (SON), também pareado. Os pericários dos neurônios magnocelulares responsáveis pela síntese e liberação de OT e AVP estão localizados em ambos os núcleos PVN e SON. O PVN contém neurônios preponderantemente ocitocinérgicos e o SON, vasopressinérgicos. Os axônios desses neurônios formam o trato hipotálamo-hipofisário, os quais se encerram na neurohipófise. Alguns desses axônios terminam na eminência mediana em justaposição aos capilares das veias portais, mas, a maior parte projeta-se para o lobo neural (BROWNEIN *et al.*, 1980; RENAUD & BOURQUE, 1991; ARMSTRONG, 1995; HATTON, 1997). A AVP e OT liberadas na eminência mediana são transportadas pelos vasos portais ao lobo anterior da glândula pituitária onde eles atuam estimulando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e prolactina (PRL), respectivamente (MCCANN *et al.*, 1959; MCCANN, 1999). A OT e AVP liberadas pelo lobo neural são transportadas, em parte, pelos vasos portais curtos ao lobo anterior, e conduzidas no sangue que parte de ambos os lobos pelas veias hipofisárias que retornam ao coração (PORTER *et al.*, 1983).

A OT e AVP são sintetizadas e liberadas por neurônios magnocelulares neurosecretores classificados em subtipos produtores de AVP e OT. Recentes evidências para experimentos qualitativos de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) em unidades celulares confirmaram o fato da maioria dos neurônios magnocelulares co-expressarem mRNAs para ambos os peptídeos. Além disso, essas expressões foram encontradas virtualmente em todos os neurônios magnocelulares no SON do hipotálamo. Mudanças no padrão de descarga e frequência de neurônios magnocelulares em resposta a significativos estímulos fisiológicos regularam os níveis circulantes de seus hormônios secretados (RENAULD & BOURQUE, 1991; GRINDSTAFF *et al.*, 2000).

O papel da OT na natriurese e a liberação de ANP estimulada por expansão de volume foram cuidadosamente investigados (HAANWINCKEL *et al.*, 1995). Em ratos submetidos à sobrecarga hídrica e diurese contínua, a OT induziu significativo aumento proporcional à dose na excreção de sódio e potássio, na osmolalidade urinária e diminuição no volume urinário. A concentração de ANP plasmático aumentou significativamente após a injeção intraperitoneal (i.p.) ou intravenosa (i.v.) de OT, a qual gerou uma intensa resposta natriurética. A expansão do volume sanguíneo (BVE) provocada por injeções intra-atriais de solução salina induziu um

rápido aumento da concentração de OT e ANP no plasma e concomitante diminuição nos níveis de AVP plasmática (HAANWINCKEL *et al.*, 1995). Quando uma expansão de volume hipertônico foi induzida com a injeção de cloreto de sódio (NaCl 1,8%), a qual provavelmente estimula osmorreceptores ou receptores de sódio, somando-se aos barorreceptores, resultou em aumento da liberação de ANP e OT semelhante àquele produzido por BVE isotônica. Entretanto, ao contrário da BVE isotônica, a BVE hipertônica induziu um significativo, mas transitório (5 min) aumento nos níveis de AVP plasmático. A magnitude da resposta secretória de OT foi tão intensa quanto o estímulo de sucção, um clássico estímulo para a liberação de OT. No entanto, a liberação de OT por sucção foi associada com um aumento do ANP plasmático que foi prevenido pela injeção i.v. prévia de um antagonista de OT, reforçando a hipótese de que a ação secretora de ANP pela OT é fisiologicamente significativa (CHRIGUER *et al.*, 2001).

Por outro lado, injeções de um anticorpo anti-ANP não alteraram os níveis basais de OT, mas bloquearam a secreção de OT estimulada por aumento de osmolalidade, sugerindo que o ANP hipotalâmico é necessário para estimular a liberação de OT na condição de hiperosmolalidade. Estes resultados reunidos reforçam a hipótese de que a expansão de volume isotônico via atividade barorreceptora aferente para o tronco cerebral estimula a liberação intra-hipotalâmica de ANP, a qual provoca a liberação de OT pela neurohipófise, esta OT circula até o coração e induz a liberação de ANP (CHRIGUER *et al.*, 2001).

De uma maneira resumida temos que os hormônios ANG II, AVP, OT e ANP participam diretamente no controle da sede e apetite ao Na^+ como resposta homeostática a desidratação. Este estado pode ser causado por substâncias diuréticas, idade, sabor da bebida, privação hídrica, atividades que provocam sudorese, vômito, diarreia, hipodipsia. Durante a privação hídrica ocorre simultaneamente à sede intra e extracelular. A sede intracelular deve-se a redução no volume do líquido intracelular causado por um aumento na pressão osmótica efetiva no compartimento extracelular. A elevação da pressão é resultante do aumento da concentração de solutos osmoticamente ativos. Este tipo de desidratação pode ser induzido experimentalmente através de dietas com alto conteúdo de Na^+ ou através de infusão de salina hipertônica. Já a sede extracelular ocorre devido a uma diminuição exclusiva no volume extracelular, como por exemplo, em situações de hemorragias, vômito, diarreia, depleção de Na^+ através do uso de substâncias diuréticas como a furosemida e privação hídrica. Neste tipo de desidratação ocorre perda tanto de água como de Na^+ , por isso se observa um comportamento de apetite ao Na^+ (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Durante a privação ocorre diurese e natriurese, podendo levar ao estado de desidratação, tanto do compartimento intracelular como do extracelular, com isto ocorre hipovolemia, aumento da atividade da renina plasmática, da osmolalidade e conseqüentemente elevação nos níveis circulantes de ANG II. Animais submetidos à privação hídrica apresentam claramente um comportamento de ingestão de água, porém após a re-hidratação, observa-se um comportamento preferencial de apetite ao Na⁺ (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005). De Luca *et al.* (2002) observou que além destes comportamentos, a privação também está associada à elevação da expressão de Fos no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e órgão subfornicial (SFO).

O apetite ao sal é um comportamento homeostático vital em muitas espécies. Este comportamento ocorre em resposta ao déficit de Na⁺ corporal, sendo análogo à ingestão de água em animais desidratados. Ambos os comportamentos promovem a manutenção do fluído corporal e balanço eletrolítico. A partir de manipulações experimentais é possível induzir a ingestão de soluções concentradas de NaCl em ratos, porém essa ingestão é mais proeminente quando a OT liberada da pituitária estiver reduzida ou em níveis basais. Por outro lado, a ingestão de NaCl hipertônica é quase sempre inibida quando a liberação deste hormônio for estimulada ou através da sua administração central (BLACKBURN *et al.*, 1993).

Sinais neurais de barorreceptores cardiovasculares e a elevação nos níveis circulantes de ANG II estimulam a sede. Ambos os sinais também apresentam um estímulo excitatório sobre o apetite ao sódio, esse comportamento pode ser observado através de vários tratamentos, tais como: adrenalectomia bilateral, tratamento subcutâneo com colóides e dieta privada de NaCl. O apetite ao sódio induzido por esses tratamentos tem sido associado com uma redução ou por uma secreção não estimulada do hormônio OT. Em casos de hiperosmolalidade, observa-se uma inibição do apetite ao sódio causada pela elevação da secreção de OT. A partir desses estudos foi proposto que a inibição da ingestão de NaCl em ratos é mediada por OT e que o apetite ao sódio é estimulado em parte pela redução na secreção de OT central e que os níveis plasmáticos desse hormônio é um marcador periférico desta relação, porém estudos posteriores questionaram essa hipótese, pois a administração intracerebroventricular de ANG II estimula tanto a secreção de OT como a ingestão de NaCl, sugerindo que existe uma mistura de sinais contendo componentes excitatórios (níveis elevados de ANG II e sinais neurais provenientes de barorreceptores) e componentes inibitórios (secreção central de OT). Postulando, então, que o apetite ao sal é estimulado quando o componente inibitório desse tratamento estiver relativamente suprimido pelo componente excitatório (STRICKER & VERBALIS, 1996).

Baixos níveis de sal na dieta podem levar a um quadro de hipovolemia, esta por sua vez estimula o apetite ao Na^+ . Sabe-se que esse efeito é produzido pela ANG II cerebral. A resposta de ingestão de sal induzido pela ANG II é bem menor comparada a da ingestão de água. Infusões periféricas de ANG II só conseguem induzir o comportamento de ingestão de sal quando forem suficientemente elevadas para estimular a produção de aldosterona, pois esta melhora consideravelmente o apetite ao sódio induzido pela ANG II central ao atravessar a BHE e aumentar o número de receptores angiotensinérgicos centrais (PHILLIPS, 1987).

Sato *et al.* (1996) mostraram que a administração de antagonistas do sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona (captopril e losartan) inibia a ingestão de salina hipertônica induzida por privação hídrica, sugerindo que o peptídeo ANG II é importante para o controle da ingestão de sal nesse estado de desidratação.

Além disso, estudos demonstraram que o óxido nítrico (NO) pode modular a secreção de vários hormônios como AVP, OT, ACTH, PRL, hormônio luteinizante e hormônio crescimento, atuando tanto a nível hipotalâmico como hipofisário. O NO é uma molécula gasosa ubiqüitária sintetizada a partir da L-arginina através de uma reação catalisada pela óxido nítrico sintase (NOS). Existem três formas conhecidas dessa enzima: Óxido Nítrico Sintase I (neuronal), Óxido Nítrico Sintase II (induzida) e Óxido Nítrico Sintase III (endotelial) (CARNIO *et al.*, 2006).

A NOS foi detectada em várias áreas cerebrais, incluindo estruturas importantes envolvidas na regulação do fluido corporal (neurônios magnocelulares do NPV e NOS, neurohipófise, SFO, MnPO e OVLT) e homeostase da pressão sanguínea (núcleo do trato solitário, medula lateral ventro rostral e caudal) (LIU *et al.*, 1997).

Liu *et al.* (1997) observaram que a administração intracerebroventricular (i.c.v.) de N-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME), um inibidor da NOS atenuava a resposta de ingestão em ratos privados por 24 horas, sugerindo que o NO produzido centralmente atua não só inibindo a liberação de AVP e OT do sistema magnocelular, como também facilitando o comportamento de ingestão em resposta a desidratação. Após 120 minutos da administração do inibidor da NOS, os níveis dos hormônios neurohipofisários ainda permaneciam elevados, porém este efeito prolongado do L-NAME sobre ambos os hormônios não foi observado em animais desidratados seguidos por re-hidratação.

1.2. Integração Neuroimunoendócrina na Toxemia Induzida por LPS

A septicemia é uma doença sistêmica associada com a presença e persistência de microorganismos patogênicos ou de suas toxinas no sangue, além de ser a causa de uma alta taxa de mortalidade e gastos com a saúde. O uso de equipamentos invasivos como cateter, implantação de próteses, administração de quimioterápicos em pacientes com câncer ou de glicocorticóides em pacientes transplantados ou com doenças inflamatórias são fatores de risco para o desenvolvimento da sepse (ROGER & BONE, 1991). Estima-se que cerca de 650-750.000 pacientes desenvolvam sepse anualmente nos Estados Unidos, essa incidência é similar na Europa e em volta do mundo (OPAL, 2007).

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) é uma endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas que ativa o sistema imune e que tem sido utilizada experimentalmente para mimetizar uma situação de choque séptico (WANG *et al.*, 1993). Sendo que as doses de LPS utilizadas nos experimentos variam entre doses subsépticas (< 500 µg/Kg) e sépticas (> 500 µg/Kg) (QUAN *et al.*, 1999).

O LPS é composto por três domínios ligados de maneira covalente, os quais se diferenciam por sua organização gênica, vias biossintéticas, estrutura química e propriedades biológicas. Esses domínios são: o antígeno O, o núcleo e o lipídio A. O antígeno O é uma cadeia variável de unidades repetidas de oligossacarídeos que se estendem ao meio externo e é específica para cada LPS, dependendo do sorotipo bacteriano. O núcleo é um heterooligossacarídeo estruturalmente menos variável. O lipídeo A, componente que constitui a porção mais uniforme do LPS, é um glicolipídeo que atua como ancoragem à membrana externa da bactéria e é responsável pelo princípio endotóxico do LPS (RIETSCHEL *et al.*, 1996 apud ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Quando uma bactéria Gram-negativa se divide ou morre dentro do organismo do hospedeiro, a endotoxina é liberada em forma de LPS livre ou associada à proteína A da parede externa bacteriana. O LPS logo se associa a fatores presentes no soro (albumina, transferrina, hemoglobina, proteína de ligação ao LPS e lisozima) e interage com receptores expressos nos leucócitos. Essas células secretam mediadores endógenos, os quais induzem a resposta imune típica (RIETSCHEL *et al.*, 1996 apud ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Este componente bacteriano estimula uma série de mudanças fisiológicas e patológicas associadas com infecções bacterianas. A febre, a sudorese e a diarreia são

algumas dessas mudanças, podendo levar a um quadro de desidratação, logo a estimulação da sede poderia ser esperada e apropriada (WANG *et al.*, 1993).

CARNIO *et al.* (2006) cita que a presença de microorganismos patogênicos ou de suas toxinas nos tecidos ou sangue induz uma cascata de eventos chamada de resposta de fase aguda, esta é mediada em parte por citocinas. A resposta de fase aguda é caracterizada por vasodilatação arteriolar periférica, que causa uma diminuição na resistência vascular, hipotensão e uma perfusão inadequada dos tecidos em resposta a produtos bacterianos.

Além de mudanças hemodinâmicas causadas pela endotoxina, existe a liberação de hormônios como ACTH, AVP e OT. Esses hormônios são importantes para manutenção do equilíbrio hemodinâmico, temperatura corporal e modulação da resposta inflamatória. Além disso, a AVP e os glicocorticóides são utilizados no tratamento da sepse (BORGES *et al.*, 2006). A interação entre o sistema imune e o sistema nervoso central (SNC) é uma característica importante da resposta do hospedeiro contra lesão ou infecção. As citocinas: interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são alguns dos mediadores que participam dessa resposta e estão associadas principalmente com o sistema imune periférico (GALVANI *et al.*, 1999).

As citocinas são compostos protéicos que desempenham papel importante em vários processos biológicos como a inflamação, a imunidade e a hematopoiese. São consideradas como hormônios-símile, pois podem atuar localmente ou sistemicamente em resposta à invasão por patógenos após serem produzidas por vários tipos de células do hospedeiro como linfócitos, macrófagos, monócitos, fibroblasto e células endoteliais (GALVANI *et al.*, 1999).

Sabe-se que a IL-1 está envolvida no desenvolvimento da resposta febril em resposta a pirógenos exógenos, pois a administração de antagonistas ou anticorpo dessa interleucina inibiu a febre causada por estímulos infecciosos e inflamatórios em animais experimentais. A IL-6 e TNF- α atuam sinergicamente com a IL-1 durante a febre (LUHESHI, 1998).

Estudos realizados por Fong & Lowry (1990) mostraram a cinética da liberação de citocinas durante oito horas em animais que receberam infusão de *Escherichia coli*. (*E. coli*). Os níveis de TNF- α atingiram concentrações máximas após 90 minutos da inoculação da bactéria e os de IL-1 após quatro horas. Com relação a IL-6, os autores observaram que os níveis dessa citocina continuavam elevados oito horas após a inoculação. Observou-se também que a administração de anticorpos anti-TNF, duas horas antes do contato com a bactéria, diminuía de forma significativa a liberação de IL-1 e IL-6 (FONG & LOWRY, 1990).

A interação dessas citocinas na periferia e suas ações no cérebro tem sido objeto de estudo de várias pesquisas. O LPS é um poderoso estímulo para a produção de citocinas tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Várias hipóteses têm sido propostas para explicar como as citocinas circulantes podem influenciar o cérebro. Uma delas sugere que esses polipeptídeos se comunicam com o cérebro através de áreas desprovidas de barreira hematoencefálica, como os órgãos circunventriculares. Outra hipótese, porém, sugere que ocorre ativação de receptores de citocinas presentes nas células endoteliais que transmitem sinais para o cérebro via outros mediadores (LUHESHI, 1998).

Xia & Krukoff (2001) estudaram a contribuição das respostas cardiovasculares na ativação neuronal frente a doses subsépticas de LPS (L-4005) e observaram que a dose de 12,5 µg/Kg aumentava a frequência cardíaca, porém não alterava a pressão arterial, esta concentração também foi capaz de induzir a expressão do gene da interleucina 1β (IL-1β) nos órgãos circunventriculares, plexo coróide, meninges, vasos sanguíneos e glândula pituitária uma hora após a administração da endotoxina bacteriana. Já a dose de 50 µg/Kg causava uma mudança bifásica na pressão arterial, induzindo inicialmente um aumento seguido de diminuição na pressão, além de aumentar a frequência cardíaca, a expressão do gene da IL-1β no núcleo do trato solitário e os níveis de RNA heteronuclear de vasopressina no hipotálamo. Os autores demonstraram que as áreas cerebrais ativadas por ambas as doses de LPS foram: área postrema, órgão vasculoso da lâmina terminal, núcleo do trato solitário, área préóptica, núcleo supraóptico e paraventricular.

Além disso, Xia & Krukoff (2001) revelaram que a administração sistêmica de LPS induzia ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, liberação de citocinas pró-inflamatórias e expressão de gene *c-fos* em várias regiões cerebrais, sugerindo dessa maneira, o envolvimento de múltiplos circuitos neurais no SNC. A ativação deste sistema é importante para a resposta de defesa contra a inflamação, incluindo regulação da circulação, temperatura corporal, homeostase e comportamento.

Elmqvist & Saper (1996) mostraram que quando a endotoxina bacteriana era administrada sistemicamente ocorria uma ativação dose-dependente em várias regiões do SNC (córtex visceromotor, núcleo préoptico mediano, área préoptica ventromedial, núcleo da base da estria terminal, núcleo parabraquial, medula ventrolateral e núcleo do trato solitário) que estão envolvidas na regulação da homeostase autonômica e endócrina, indicando que o NPV tem um papel chave na integração de vários sinais fisiológicos.

Borges *et al.* (2006), demonstrou que ratos expostos ao LPS (*E. coli*, 026:B6) por via endovenosa apresentavam elevação nos níveis plasmáticos de AVP, OT, ACTH e

corticosterona, além de verificar um aumento no número de células imunorreativas para Fos no núcleo paraventricular e supra óptico do hipotálamo, porém quando esses animais sofriam uma lesão eletrolítica na região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V), eles apresentavam uma redução significativa na imunorreatividade para Fos induzida pelo LPS e uma diminuição na secreção de OT e AVP, demonstrando que a expressão da proteína Fos induzida por LPS nos núcleos hipotalâmicos e a secreção de hormônios hipofisários são dependentes da integridade do AV3V.

Os mecanismos envolvidos no controle da liberação dos hormônios hipotalâmicos durante o choque séptico ainda não estão claros. Sabe-se que o óxido nítrico e o monóxido de carbono (CO) atuam como neurotransmissores, influenciando processos biológicos e patológicos tanto no SNC quanto no periférico. Esses compostos são sintetizados a partir de enzimas presentes no NPV e NSO e parecem modular a liberação de AVP e OT durante a endotoxemia (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2005).

Vários trabalhos têm demonstrado que NO tem uma ampla ação nos sistemas biológicos, participando, por exemplo, da regulação cardiovascular através do seu efeito vasodilatador. A NOS está presente em neurônios magnocelulares do NPV e NSO no hipotálamo de ratos. Estes neurônios são responsáveis pela secreção de AVP e OT (CARNIO *et al.*, 2006). Wong *et al.* (1996) ao avaliarem se ocorria a expressão da NOS-II no cérebro de ratos após a administração de LPS observaram que o RNAm desta enzima estava presente em várias regiões cerebrais, sendo que a sua expressão era acompanhada por uma elevação nos níveis de nitrito no líquido cefalorraquidiano. A expressão da enzima ocorria duas horas após a administração sistêmica de LPS. Harada *et al.* (1999) também observaram a expressão dessa enzima no hipotálamo (NPV) três horas após administração intraperitoneal de LPS, sugerindo que a inflamação sistêmica pode induzir a expressão da enzima NOS-II em áreas específicas do SNC (CARNIO *et al.*, 2006). O aumento da expressão ou/e atividade da NOS e a ativação concomitante do eixo Hipotálamo-Hipóse-Adrenal em resposta à infecção, estresse e ao tratamento com citocinas sugerem que o NO poderia modular a secreção hormonal durante esses processos (CARNIO *et al.*, 2006).

Experimentos anteriores mostraram que os sítios de síntese de AVP e OT estavam marcados positivamente para Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzida diaforase (NADPH diaforase) e que existia uma colocalização da NOS com a NADPH diaforase no cérebro. Além disso, outras pesquisas observaram a co-localização de AVP e OT com NADPH, porém a co-localização desta com OT ocorria mais frequentemente, indicando mais uma vez que o NO tem um papel importante no controle da secreção de OT. Vários

estudos têm sugerido que o NO atua inibindo os neurônios Ocitocinérgicos no NPV e NOS a secretarem OT (CARNIO *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Giusti-Paiva *et al.* (2005) mostraram que o NO e o CO podem atuar como reguladores inibitórios da secreção de AVP e OT, pois ao investigarem a interação entre a geração do NO e CO na liberação de AVP e OT induzido por LPS observaram que a administração de inibidores da síntese das moléculas gasosas em ratos que haviam recebido LPS apresentavam aumento nas concentrações dos hormônios hipotalâmicos, porém quando os animais eram previamente tratados com doares de NO e CO tinham os níveis de hormônios reduzidos. Carnio *et al.* (2006) mostraram que ocorria um aumento significativo de AVP e OT quando se administrava LPS em ratos pré-tratados com L-NAME, um inibidor da NOS.

A elevação nos níveis de AVP e OT durante o choque séptico também pode ser inibida através do uso de inibidores da ciclooxigenase (COX). Estudos sugerem que a COX e a produção de prostaglandinas (PGs) podem está envolvidas no papel inibitório do NO sobre a liberação dos hormônios neurohipofisários. Este composto pode ativar ou inibir a COX induzindo ao aumento ou diminuição nos níveis teciduais de prostaglandinas. Evidências indicam que o NO ativa a COX-1 e inibe a COX-2 (SUMMY-LONG, J.Y., *et al.*, 2002). Swierkosz *et al.* (1995) propuseram que quando a NOS e a COX-2 são co-induzidas *in vivo*, o NO atua limitando a expressão e atividade da COX-2.

Clancy *et al.* (2000) também sugere que o NO inibe a COX-2 e conseqüentemente a produção de prostaglandinas, esta além de participar do processo inflamatório, atua estimulando a secreção de OT. Sabe-se que existem receptores de prostaglandinas, mais especificamente o subtipo PGE₂, no NPV e NSO no hipotálamo e na neurohipófise (SUMMY-LONG, J.Y *et al.*, 2002).

Summy-Long *et al.* (2002) demonstraram que ocorre elevação nos níveis plasmáticos de OT quando se administra L-NAME i.c.v. e que este aumento pode ser impedido pela indometacina, um inibidor da COX, sugerindo que o NO inibe a liberação de OT estimulada por mecanismos dependente da COX e da IL-1 β .

Ainda existem divergências sobre o papel do NO em relação à ciclooxigenase, alguns estudos mostram que o NO inibe essa enzima, enquanto que outros relatam que ele estimula (SALVEMINI *et al.*, 1993; AKTAN, 2004). Já foi demonstrado que a administração periférica de LPS ativa tanto COX quanto NOS, porém verificou-se que a expressão e atividade de COX ocorriam primeiramente e que a conseqüente produção de PGs inibia a atividade de NOS, pois quando foi administrado um inibidor seletivo de COX-2 observou-se um aumento nos níveis de NO (CELLA *et al.*, 2006). Outros estudos também conseguiram

mostrar que as PGs podem atuar regulando a síntese NO em processos inflamatórios (KATHLEEN *et al.*, 2003).

Além disso, existem evidências de que a elevação de OT em processos infecciosos induzidos por LPS poderia estar relacionada com a proteção do organismo contra danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio produzidas de forma excessiva durante a sepse, esses trabalhos sugerem que a OT poderia estar atuando de maneira inibitória sobre os neutrófilos, os quais seriam os responsáveis pela produção desses radicais livres (ISERI *et al.*, 2005; BIYIKLI *et al.*, 2006)

O aumento de OT durante a toxemia induzida por LPS poderia estar relacionado com a inibição da ingestão de salina hipertônica observada por Almeida *et al.* (2005), pois ao investigarem o efeito do LPS sobre o apetite ao Na⁺ e comportamento de ingestão de água através do modelo furocap (SATO *et al.*, 1995), observaram que a endotoxina inibia não só a ingestão de salina hipertônica como também de água, sendo que a ingestão de Na⁺ foi mais sensível ao efeito inibitório.

Wang *et al.* (1993) também investigaram o efeito do LPS sobre o balanço e ingestão hídrica e observaram que a administração endovenosa de diferentes doses e tipos de extratos de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, 026:B6 e *Salmonella minnesota*) em ratos normohidratados causavam estimulação da ingestão de água, além de apresentarem efeito antidiurético. O efeito dipsogênico combinado com a retenção urinária induzida pela endotoxina era suficiente para diluir o fluido corporal e conseqüentemente a osmolalidade plasmática e concentração de sódio (Na⁺). Os autores sugerem que o efeito antidiurético pode ter sido causado pelo aumento da secreção de vasopressina e pela redução do fluxo plasmático e filtração glomerular. Além disso, eles discutem que a ingestão de água não pode ser atribuída à febre, pois este comportamento ocorreu durante o período de hipotermia e que, portanto, o comportamento de ingestão pode envolver outros mecanismos, diferentes daqueles causados pela desidratação.

Outros trabalhos, porém, mostraram resultados opostos ao de Wang *et al.* (1993). Nicoletta *et al.* (1983) demonstraram que o LPS nas doses de 640-1280 µg/Kg inibia o comportamento de ingestão estimulado por privação hídrica (48 h). Resultados semelhantes foram relatados por Calapai *et al.* (1994), porém em ratos privados por 24 h. Constancio *et al.* (2005) mostraram que o efeito antidipsogênico do LPS pode ocorrer tanto na sede intracelular quanto na extracelular, sendo mais intenso, no entanto, na desidratação intracelular. Esses autores observaram também que o LPS inibe a diurese e natriurese induzida por sobrecarga de salina hipertônica.

1.3. Objetivos

1.3.1. Geral

Esse estudo tem por objetivo avaliar efeitos de concentrações subsépticas (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g/Kg}$) de Lipopolissacarídeo Bacteriano (*E.coli* EH100) sobre a regulação do balanço hidroeletrolítico em ratos desidratados.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Estudar efeitos da administração intraperitoneal de doses subsépticas de LPS (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g/Kg}$) sobre a concentração plasmática de nitrato (metabólito exclusivo de NO).
- Estudar efeitos da administração intraperitoneal de doses subsépticas de LPS (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g/Kg}$) sobre a concentração de Na^+ e K^+ relacionados à osmolalidade do plasma.
- Estudar efeitos da administração intraperitoneal de doses subsépticas de LPS (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g/Kg}$) sobre ingestão de água e solução hipertônica de NaCl (1,8%).
- Estudar os efeitos da administração intraperitoneal de doses subsépticas de LPS (25, 100 e 300 $\mu\text{g/Kg}$) sobre a concentração plasmática de Ocitocina.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Em todos os experimento foram utilizados ratos machos Wistar provenientes do Biotério do Laboratório de Neuroendocrinologia da Universidade Federal do Pará (Departamento de Fisiologia, CCB, UFPa), com peso corporal (p.c.) entre 270 e 300 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob condições ambientais controladas de temperatura (25 ± 2 °C) e luminosidade (12 horas de claro/12 horas de escuro), com livre acesso à água e ração *ad libitum*.

2.2. Determinação Indireta do NO Plasmático pela Dosagem de Nitrato

A dosagem das amostras foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Para avaliar a eficácia do LPS utilizado nesse trabalho foi realizada a dosagem de nitrato plasmático através da técnica de Quimiluminescência NO/Ozônio, utilizando-se para isso um analisador de NO (Sievers 280 NO Analyser, Boulder CO. USA). O nitrato é um dos produtos da reação que ocorre entre o NO e O₂, por isso a dosagem desse composto é considerada uma maneira indireta de avaliar a produção de NO.

Alíquotas de 25 µl foram retiradas de cada amostra para desproteíntização com 50 µl de etanol absoluto a 4°C e mantidas por 30 min em freezer (-20°C). Após este período, as amostras foram submetidas ao processo de centrifugação (10000 rpm, 5 min). Em seguida, 5 µl do sobrenadante foi coletado e colocado na câmara de reação do analisador contendo um agente redutor (0,8% de cloreto de vanádio em HCl 1N à 95°C) que converte nitrato em NO, em quantidades equimolares. O NO é dragado para a câmara de quimiluminescência do analisador, que por sua vez, reage com o ozônio (O₃), formando dióxido de nitrogênio (NO₂⁻). O NO₂⁻ apresenta-se numa forma instável e tem a capacidade de emitir fótons que se chocam contra uma superfície foto-sensível de uma célula fotomultiplicadora. O fóton emitido pela

reação é detectado e convertido em sinal elétrico. Essa corrente de elétrons é captada, amplificada e processada por um transdutor analógico-digital, dando origem a um traçado gráfico, em que a área sob a curva gerada corresponde à concentração de nitrato na amostra. A curva padrão foi preparada com nitrato de sódio nas concentrações 5, 10, 15, 25, 50 e 100 μM . Os valores de nitrato foram expressos em μM .

2.3. Determinação dos Eletrólitos (Na^+ e K^+) no Plasma

Para a determinação da concentração de Na^+ e K^+ plasmático foi realizada uma dosagem fotométrica de sódio e potássio através de um fotômetro de chama (CELM, modelo FC-280). O aparelho foi calibrado com uma solução padrão contendo 140 mEq/l de sódio e 5 mEq/l de potássio, diluída em água deionizada na proporção de 1:100. Cada amostra foi diluída igual à solução padrão (100 μl de amostra adicionado em 10 ml de água deionizada).

2.4. Determinação da Osmolalidade Plasmática

A osmolalidade plasmática foi determinada a partir da pressão de vapor (BAKKER *et al.*, 1975) através do aparelho osmômetro (VAPRO VAPOR Pressure Osmometer 5520). Para isso as amostras foram descongeladas e com auxílio de uma micropipeta foram retirados de cada frasco 10 μl de plasma. O material foi inoculado em um disco de papel que havia sido colocado previamente no aparelho e em seguida foi realizada a leitura das amostras. O fechamento da câmara onde estava à amostra iniciou a seqüência de medição automática. As amostras foram dosadas individualmente em triplicata para melhor confiabilidade dos dados.

2.5. Determinação da Concentração Plasmática de Ocitocina pela Técnica de Radioimunoensaio

A dosagem das amostras foi realizada no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP com a orientação do Professor Dr. José Antunes Rodrigues.

O plasma armazenado a -70°C foi utilizado para as dosagens de OT plasmática (após as extrações desse hormônio) através da técnica de radioimunoensaio (RIE), segundo métodos descritos por Haanwinckel *et al.* (1995).

A extração de OT foi realizada utilizando-se 1 ml de plasma adicionados de 2 ml de acetona gelada seguida de agitação contínua (20 segundos) e centrifugação (3000 rpm por 25 min a 4°C), sendo o sobrenadante decantado em um tubo contendo 2 ml de éter de petróleo e em seguida agitado e mantido em repouso por 5 minutos para a separação das camadas. A camada superior foi aspirada com o auxílio de uma bomba de vácuo e a camada inferior foi liofilizada num Speed Vac sendo as amostras estocadas a -20°C para posterior dosagem por RIE.

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

No RIE, foram utilizados peptídeos marcados com ^{125}I , tendo sido utilizadas 4000 cpm/100 μl para a OT, o volume final de incubação foi de 500 μl durante quatro dias a 4°C . O anti-soro utilizado (primeiro anticorpo de coelho anti-OT) foi específico para o hormônio analisado sem reação cruzada com outros peptídeos. Foram adicionados 100 μl do primeiro anticorpo nas amostras desconhecidas e os tubos foram agitados e incubados a 4°C durante 24 horas. O hormônio marcado (100 μl) foi adicionado aos tubos e estes foram agitados e reincubados novamente por 24 h a 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) específicos para cada hormônio analisado. Após a adição de 100 μl do segundo anticorpo estes foram reincubados por 24 h a 4°C , e no dia seguinte, após incubação de 4 a 6 horas pela adição de 1 ml de polietilenoglicol (PEG 6,25%), as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 25 minutos a 4°C e o sobrenadante foi aspirado. A radioatividade no precipitado foi determinada com o auxílio de um contador gama (Packard).

Todos os dados foram expressos em pg/ml de plasma. O controle de qualidade do ensaio teve por referência que a dose mínima detectável foi de 0,4 pg/ml e a ligação inespecífica de 2,6%.

2.6. Protocolo Experimental

O protocolo experimental desenvolvido nesse estudo foi baseado em trabalhos realizados por Sato *et al.* (1996).

Medidas de Ingestão de Água e Salina hipertônica (1,8%) em Ratos Privados por 36h e Expostos ao LPS:

Antes de iniciar os experimentos, os animais foram submetidos a um período de adaptação de três dias. Este procedimento teve por objetivo condicioná-los à metodologia do protocolo experimental e, com isso, diminuir o estresse dos animais frente às manipulações, além de permitir, a retirada de ratos hipernatriófilos. Durante esse período foram colocadas duas provetas, uma de 45 ml e outra de 25 ml, contendo água e salina hipertônica (1,8%) respectivamente e livre acesso a comida. A ingestão foi acompanhada diariamente, obtendo-se o volume dos líquidos ingerido por cada animal.

Após esse período, os animais foram divididos em dois grupos experimentais: Tratado (n=8) e Controle (n=8) e submetidos a um período de privação de água, salina hipertônica e alimentação por 36 horas. Sendo que meia hora antes de terminar o período de restrição, os ratos receberam uma única dose de LPS (*E.coli* EH100, Sigma, L9641) intraperitoneal (i.p.) nas concentrações de 25, 50, 100 ou 300 µg/Kg de peso corporal por experimento, exceto os animais do grupo controle que receberam solução salina isotônica (0,9%) estéril (Samtec Biotecnologia) como veículo. Meia hora após a administração da toxina bacteriana ou salina, bebedouros graduados contendo água foram oferecidos aos animais e o volume ingerido por animal foi registrado durante 2 horas, sendo que na primeira hora a avaliação ocorreu em intervalos de vinte minutos (20, 40, 60). Após o período de re-hidratação, foi ofertado simultaneamente bebedouros com água e salina hipertônica (1,8%) e novamente foi avaliada a

quantidade ingerida dos líquidos oferecidos durante uma hora em intervalos de vinte minutos. No final do experimento os animais foram sacrificados por decapitação e amostras de sangue foram coletadas em tubos de prolipropileno contendo 50 µl de heparina e centrifugadas por cinco minutos a 5000 r.p.m. para obtenção de plasma e posterior dosagem hormonal, avaliação de nitrato, sódio (Na⁺), potássio (K⁺) e osmolalidade plasmática.

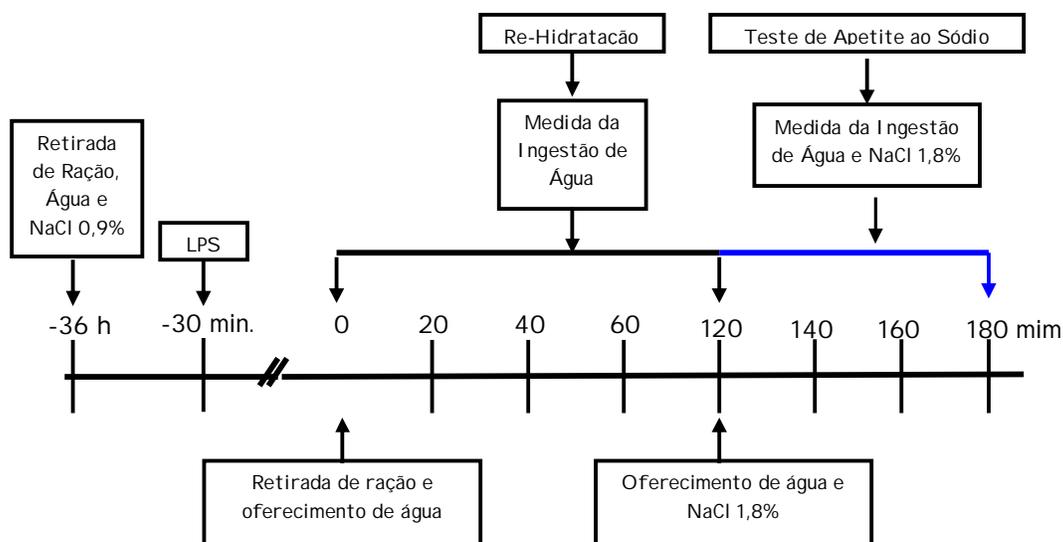


Figura 1: Esquema do protocolo Experimental

2.7. Análise Estatística dos Dados

Os resultados obtidos são expressos como a média \pm Erro Padrão da Média (EPM) e foram avaliados através da análise de variância ANOVA e pós-teste Newman-Keuls, além do Teste *t* de Student não pareado. A significância estatística foi definida como $*p < 0,05$, $***p < 0,001$. Todas as análises estatísticas foram executadas utilizando Graph Pad Prism 4.

3. RESULTADOS

3.1. Efeitos da Administração de Doses Subsépticas de LPS Sobre os Níveis Plasmáticos de Nitrato em Ratos Privados por 36 horas

A partir do gráfico (Figura 2) pode-se observar que o LPS induziu um efeito dose dependente sobre os níveis plasmáticos de nitrato, sendo que a menor dose administrada do componente bacteriano (25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) provocou uma elevação de 52,28% nos níveis plasmáticos de nitrato quando comparado ao controle. Os níveis desse composto foram crescendo à medida que as doses administradas de LPS foram aumentando, com efeito estimulador de 73,15%, 118% e 244% nas doses de 50, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ respectivamente.

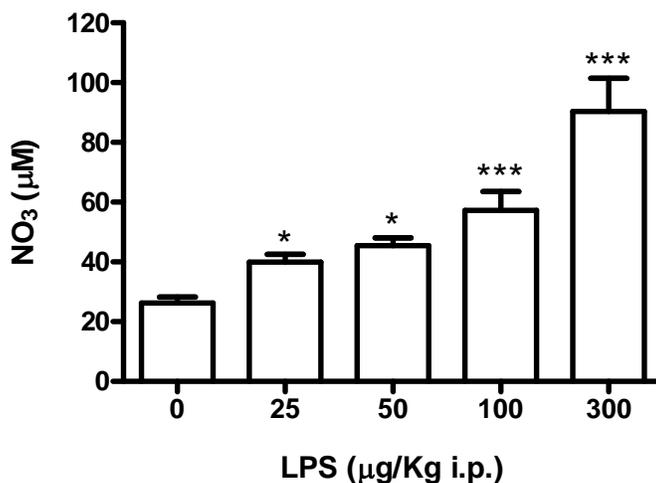


Figura 2: Dosagem de Nitrato plasmático induzido por doses subsépticas de LPS (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). Valores expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado com o grupo controle (salina i.p.).

3.2. Efeitos da Administração de Doses subsépticas de LPS Sobre os Níveis Plasmáticos de Na⁺ e K⁺ em Ratos Privados por 36 horas

A administração de doses subsépticas de LPS (25, 50, 100 e 300 µg/Kg) não alterou o conteúdo de Na⁺ e K⁺ em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica, de NaCl 1,8% e alimentação com re-hidratação por 120 minutos e oferta de salina hipertônica. A dosagem destes íons no plasma 3 horas após a administração de LPS mostrou que não houve diferenças significativas entre o grupo tratado quando comparado com o controle (Tabela 1).

Tabela 1: Efeitos da administração de LPS (25, 50, 100 e 300 µg/Kg p.c.) sobre a concentração plasmática de Na⁺ e K⁺ em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica por 36 h com re-hidratação parcial nos primeiros 120 minutos. Os resultados são expressos como média ± EPM. O número entre parêntese refere-se ao número de animais por grupo.

Grupos	Na⁺ (mEq/l)	K⁺ (mEq/l)
Controle (n=8)	139,75 ± 3,37	5,36 ± 0,16
LPS 25 µg/kg (n=8)	140,87 ± 0,93	5,87 ± 0,16
LPS 50 µg/kg (n=7)	139,86 ± 3,60	5,84 ± 0,18
LPS 100 µg/kg (n=7)	139,14 ± 4,37	5,73 ± 0,21
LPS 300 µg/kg (n=8)	145,25 ± 1,77	5,77 ± 0,11

3.3. Efeitos da Administração de Doses Subsépticas de LPS Sobre a Osmolalidade Plasmática em Ratos Privados por 36 horas

O LPS (25, 50, 100 e 300 µg/Kg) não causou alteração na osmolalidade plasmática em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica, de NaCl 1,8% e alimentação com re-hidratação parcial e oferta de salina hipertônica. A concentração de Na⁺ no plasma 3 horas após a administração da endotoxina não estava significativamente elevada quando comparada com o grupo controle (Tabela 2).

Tabela 2: Efeitos da administração de LPS (25, 50, 100 e 300 µg/Kg p.c.) sobre a osmolalidade plasmática em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica por 36 h com re-hidratação parcial nos primeiros 120 minutos. Os resultados são expressos como média ± EPM. O número entre parêntese refere-se ao número de animais por grupo.

Grupos	Osmolalidade mmol/Kg)
Controle (n=8)	292,62 ± 1,03
LPS 25 µg/kg (n=8)	288,62 ± 2,47
LPS 50 µg/kg (n=7)	288,00 ± 1,06
LPS 100 µg/kg (n=7)	283,14 ± 1,94
LPS 300 µg/kg (n=8)	288,00 ± 1,49

3.4. Efeitos da Administração de Doses Subsépticas de LPS Sobre o Comportamento de Ingestão Hídrica em Ratos Privados por 36 horas

O LPS administrado por via i.p. (25, 50, 100 e 300 µg/Kg) meia hora antes de terminar o período de privação não alterou o comportamento de ingestão hídrica. A avaliação do volume ingerido foi realizada durante 180 minutos após o período de restrição e após análise estatística dos dados não foram observadas diferenças significativas entre o grupo tratado e o grupo controle (Tabela 3).

Tabela 3: Efeitos da administração de LPS (25, 50, 100 e 300 µg/Kg p.c.) sobre o comportamento de ingestão hídrica cumulativa durante 3 h após o período de privação. Os resultados são expressos como média ± EPM. n=8, exceto para os grupos 50 e 100 µg/Kg (n=7).

Grupos	H₂O (20 min)	H₂O (40 min)	H₂O (60 min)	H₂O (120 min)	H₂O (180 min)
Controle	7,56 ± 1,69	10,44 ± 2,35	11,81 ± 2,65	14 ± 2,79	16,06 ± 2,89
LPS 25 µg/kg	6,31 ± 1,05	7,37 ± 1,31	8,19 ± 1,35	8,19 ± 1,35	9,94 ± 2,11
LPS 50 µg/kg	7,86 ± 1,58	8,93 ± 1,32	9,29 ± 1,51	10,71 ± 1,05	12,14 ± 1,01
LPS 100 µg/kg	12,86 ± 0,65	16,07 ± 1,11	17,79 ± 1,43	19,07 ± 1,97	21,5 ± 2,47
LPS 300 µg/kg	8,12 ± 0,47	8,81 ± 0,67	9,31 ± 0,89	10 ± 0,94	11,25 ± 1,06

3.5. Efeitos da Administração de Doses Subsépticas de LPS Sobre o Comportamento de Ingestão de NaCl 1,8% em Ratos Privados por 36 horas

Na Figura 3 observa-se que houve uma inibição do comportamento de ingestão de NaCl 1,8% induzida por todas as doses de LPS (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de p.c.). A administração de 25 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de LPS por via i.p. teve um efeito inibitório de 71,6% sobre o apetite ao Na^+ vinte minutos após a oferta de salina hipertônica em ratos privados por 36 horas, esse efeito persistiu nos tempos de 40 e 60 minutos com inibição de 76,6% e 74,2% respectivamente, quando comparado com o grupo controle. Quando se administraram doses crescentes de LPS (50, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de p.c.) observou-se uma resposta dose dependente de inibição do comportamento de ingestão de salina hipertônica, exceto a dose de 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ que, apesar de causar uma resposta significativa, foi menos eficaz em inibir esse comportamento quando comparada à dose de 50 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. A dose de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de LPS mostrou uma potente inibição da busca pelo Na^+ com efeito inibitório de 92,6%, 92,5% e 80,6% nos tempos 20, 40 e 60 minutos respectivamente, quando comparado com o controle. A média e o EPM dos grupos experimentais são apresentados na Tabela 4.

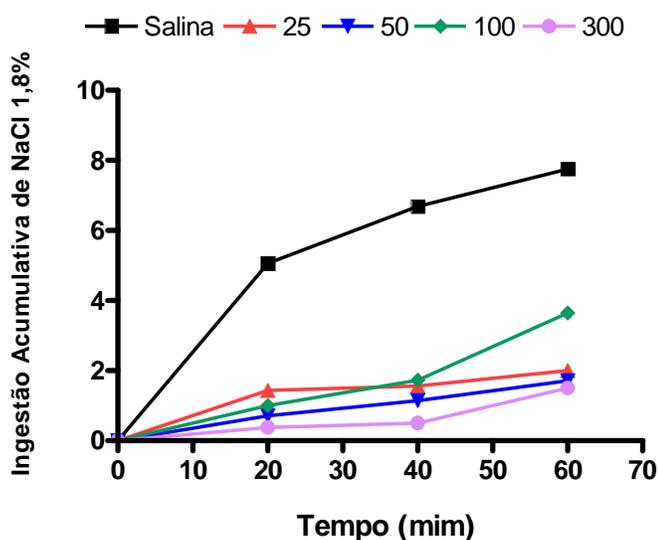


Figura 3: Efeitos da administração de doses subsépticas de LPS (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) sobre o comportamento de ingestão de NaCl 1,8%.

Tabela 4: Efeitos da administração de LPS (25, 50, 100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.c.) sobre o comportamento de ingestão de NaCl 1,8% cumulativa durante 3 h após o período de privação.

Os resultados são expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparados com o grupo controle (salina i.p.). O número de animais utilizado por grupo experimental é representando pelo n.

Grupos	20 (min)	40 (min)	60 (min)
Controle (n=8)	5,06 \pm 0,84	6,69 \pm 2,36	7,75 \pm 2,74
LPS25 μ g/kg (n=8)	1,44 \pm 0,73 ***	1,56 \pm 0,80 *	2,00 \pm 0,91 *
LPS50 μ g/kg (n=7)	0,71 \pm 0,47 ***	1,14 \pm 0,40 *	1,71 \pm 0,61 *
LPS100 μ g/kg (n=7)	1,00 \pm 0,72 ***	1,73 \pm 0,88 **	3,64 \pm 1,55
LPS300 μ g/kg (n=8)	0,37 \pm 0,26 ***	0,50 \pm 0,27 **	1,50 \pm 0,53 *

3.6. Efeitos da Administração da Dose subséptica de 300 μ g/Kg de LPS Sobre a Concentração Plasmática de Ocitocina

Foi observado que a administração de 25, 100 e 300 μ g/Kg de LPS meia hora antes de terminar o período de privação induziu um aumento na concentração plasmática de OT em 196,04%, 420,44% e 1063,4%, respectivamente, quando comparado a sua secreção basal. A elevação da concentração de OT foi observada 3 horas após os animais terem sido submetidos ao protocolo de privação com re-hidratação parcial por 120 minutos (Figura 4).

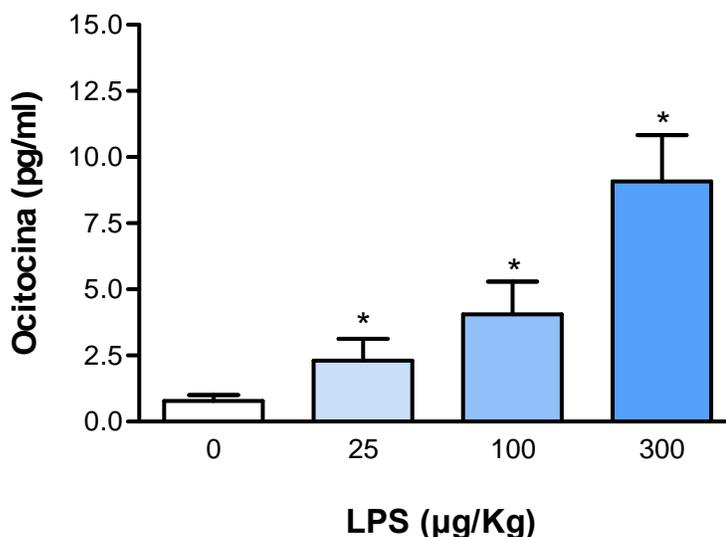


Figura 4: Dosagem de Ocitocina plasmática induzida por 25, 100 e 300 μ g/Kg de LPS. Valores expressos como média \pm EPM; n = 3 a 8; * $p < 0,05$ comparado com o grupo controle.

4. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que doses subsépticas de LPS podem promover distúrbios na regulação neuroendócrina do comportamento de ingestão, gerando déficits na reposição de sal em animais desidratados (36 h), não compensados por todo o período de observação, e que este déficit pode estar relacionado à participação de OT e/ou de NO, não acompanhado de alterações sistêmicas do balanço hidroeletrolítico como a concentração de eletrólitos (Na^+ , K^+) e de osmolalidade do plasma.

Variações positivas na concentração de nitrato plasmático confirmaram a resposta nitrérgica esperada para a ação preponderantemente sistêmica de LPS. A elevação plasmática desse composto, acima dos níveis basais, confirma também a participação do NO mediando um processo inflamatório ou infeccioso que, nesse caso, foi induzido pela administração (i.p.) da endotoxina bacteriana. Sabe-se que o LPS, a IL-1, o interferon gama e o TNF- α são potentes indutores da expressão de NOS-II em diferentes tipos celulares tais como: neurônios, astroglia, microglia, osteoclastos, células de Kupffer, macrófagos, células endoteliais e células musculares lisas. O aumento da expressão e produção dessa enzima induzido por LPS frequentemente foi acompanhado por uma elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no plasma (IL-1, IL-1 β , IL-6, INF- γ , TNF- α). Por outro lado, observou-se que sua expressão foi inibida por citocinas antiinflamatórias e glicocorticóides (HENEKA *et al.*, 2001 apud ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Vários trabalhos mostraram que patógenos bacterianos estimulam expressão de NOS-II gerando altas concentrações de NO. Em casos de doenças inflamatórias como artrite reumatóide, arteriosclerose, diabetes, rejeição de transplante e choque séptico, ocorre expressão da atividade de NOS-II em macrófagos. O NO gerado atua sobre várias proteínas como a catalase, citocromo c, lipoxigenase, hemoglobina e peroxidase, sendo também a COX um de seus alvos, pois através da ativação dessa enzima estimula a produção de prostaglandinas, que são produtos do metabolismo do ácido araquidônico (SALVEMINI *et al.*, 1993; AKTAN, 2004).

Outros estudos mostraram que neurônios magnocelulares podem expressar COX e IL-1 β , a qual atuaria em OCVs induzindo a liberação de outros mediadores como PGE₂, AVP e OT. A PGE₂ também estimulou a liberação desses hormônios, mas parece não intermediar a ação da IL-1 β sobre a secreção de OT (NAITO *et al.*, 1991). Tanto a IL-1 β como PGE₂ foram

efetivas em estimular a liberação de OT, mas não de AVP (SUMMY-LONG *et al.*, 2002), confirmando a presença de mecanismos seletivos para garantir a participação preferencial de OT em ações neuroimunoendócrinas. Recentes evidências obtidas em nossos laboratórios mostraram que doses subsépticas de LPS (100 e 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) estimularam a liberação de OT, mas não de AVP, um efeito amplificado por bloqueio de receptores AT1 de angiotensina, sugerindo participação inibidora adicional de ANG II sobre a secreção de OT induzida por LPS em ratos normohidratados (GURRÃO, 2008).

Em contraste, similar bloqueio inibiu a liberação de IL-1 β estimulada por LPS, significando que a ANG II pode atuar como um componente reforçador indireto da liberação de OT dependente de IL-1 β (MIYOSHI *et al.*, 2003). Acrescido o fato da IL-1 β inibir a ingestão de sódio quando administrada centralmente (De CASTRO E SILVA *et al.*, 2006), poderíamos inferir que a inibição por LPS da ingestão de sódio em nosso estudo possa ter ocorrido por mecanismo neuroimunoregulador dependente do aumento de IL-1 β em OCVs (QUAN *et al.*, 1999) e por consequência de OT.

Cella *et al.* (2006), ao avaliarem se o LPS (5 mg/Kg; i.p.) modulava diferencialmente o tempo de expressão de NOS e COX e a produção de NO e PGs no útero de fêmeas estroginizadas, observaram que a endotoxina bacteriana aumentava a expressão e a atividade da NOS, 2 e 3 horas, respectivamente, após tratamento com LPS. Tanto a expressão de COX-1 como de COX-2 aumentou 1 e 2 horas após tratamento com LPS, respectivamente, estimulando dessa maneira primeiramente a produção de PGE₂ depois de NO. Quando se administrou um inibidor seletivo da COX-2 (meloxicam) associado ao LPS verificou-se aumento da produção de NO, sugerindo que a produção de prostaglandina inibiu a atividade da NOS e que a interação entre NOS e COX poderia ser importante na regulação de processos fisiopatológicos durante a prenhez.

Kathleen *et al.* (2003), ao avaliarem a relação entre a produção de PGE₂ e NO durante inflamação das meninges induzida por LPS (200 μg ; *E. coli*, 0127:B8), observaram que a inibição da síntese de PGs promovia um aumento de NO nas meninges e que a inibição de COX-2 por nimesulida (i.v.) poderia levar a um quadro de toxicidade induzido por NO. Portanto, as PGs atuariam contribuindo para a retroalimentação negativa sobre a atividade da NOS-II em condições inflamatórias. Outros estudos observaram que o LPS, na dose de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, estimulava a produção de altos níveis de PGE₂ em cultura de macrófagos e que esse mediador inflamatório, por sua vez, reduzia a produção de NO. Além disso, verificou-se que PGE₂ exógena na dose de 1 e 10 ng/ml era capaz de estimular a liberação de NO, enquanto

que concentrações maiores (> 50 ng/mL) tinham efeito inibitório sobre a secreção de NO (MILANO *et al.*, 1995).

Experimentos realizados por Brian *et al.* (1995) também verificaram a ação inibitória de PGE₂ sobre a produção de NO induzido por LPS em cultura de células de Kupffer por 24 e 48 horas, sugerindo que PGE₂ pode agir como um importante regulador da síntese de NO.

As PGs podem atravessar a barreira hematoencefálica e atuar no SNC, aumentando a atividade secretória do PVN, núcleo esse responsável pela produção de OT. Além disso, em situações de infecção, inflamação e estresse o cérebro também é fonte de PGs. Estudos mostram que o LPS (*E. coli*, 026:B6) aumenta a concentração desses mediadores inflamatórios no OVLT, PVN e hipocampo, áreas que possuem ambas as isoformas de COX (PISTRITTO *et al.*, 1999).

Knigge *et al.* (2003) mostrou que a infusão (1 a 5µg/Kg) de prostaglandinas, principalmente a PGE₂, no ventrículo lateral estimulou de maneira dose-dependente a secreção de OT e que a administração sistêmica de indometacina, um inibidor da síntese de prostaglandinas, reduziu a resposta de OT ao LPS (*E. coli*, 026:B6), sugerindo que as prostaglandinas podem auxiliar como um componente estimulador da secreção de OT em resposta ao estresse induzido por toxemia bacteriana.

A ação imunorreguladora destes mediadores inflamatórios parece ocorrer a partir de estruturas ligadas ao sistema magnocelular. Matsunaga *et al.* (2000) avaliaram o envolvimento de neurônios ocitocinérgicos na resposta de fase aguda por estudos de expressão para Fos. Esses autores observaram que doses de 5 e 125 µg/Kg de LPS (*E. coli*, 055:B5) induziram intensa imunorreatividade nuclear para Fos, confirmando que a liberação periférica de OT induzida por LPS pode ocorrer devido à ativação de neurônios magnocelulares localizados tanto no PVN como no SON.

A lesão eletrolítica do AV3V reduziu significativamente não só a imunorreatividade para *fos* no PVN e SON, mas também a secreção de OT e AVP induzida por LPS (*E. coli*, 026:B6), sugerindo que essas respostas dependem da integridade do AV3V e que a secreção desses hormônios durante a endotoxemia não depende exclusivamente da queda do volume e da pressão sanguínea (BORGES *et al.*, 2006). Essas evidências reforçam a hipótese de que o sistema magnocelular pode sofrer influência direta de mediadores neuroimunogênicos secretados em resposta a LPS ou a citocinas circulantes via áreas desprovidas de barreira-hematoencefálica.

Nossos resultados mostram evidências que a inibição do apetite ao Na^+ induzido por privação hídrica pode ter ocorrido em consequência da ação inibidora da OT secretada em resposta a administração de LPS.

Sabe-se que um dos estímulos para a secreção de OT é o aumento da osmolalidade plasmática. Nessa situação, esse hormônio é responsável pela inibição da ingestão de sal e pela estimulação da natriurese. Porém, verificamos que nenhuma alteração de osmolalidade ou de concentração de Na^+ e K^+ plasmáticos ocorreu que pudesse justificar o aumento da concentração de OT circulante, significando que a resposta secretora de OT pode ser resultante de mecanismos reguladores dependentes da resposta imune à toxemia bacteriana. Nossos dados confirmam resultados anteriores (RAYMOND *et al.*, 1979; BORGES *et al.*, 2006) obtidos por doses sépticas de LPS (2 e 5 mg/Kg de LPS de *E. coli*; 1,5 mg/Kg, (*E. coli*, 026:B6, respectivamente) que mostraram ausência de variações da osmolalidade e da concentração plasmática de sódio e potássio.

O envolvimento da OT na ação inibidora da ingestão de sódio por LPS é sugestiva e pode ter ocorrido por consequência de sua elevação no plasma, independente do fato dos animais terem repostado volume hídrico, o que explicaria o restabelecimento da osmolalidade e concentração plasmática de sódio e potássio. No entanto, a inibição de ingestão de sódio pode ter impedido a regularização da massa total de sódio perdida durante o período de privação. Esse aparente desequilíbrio do balanço de sódio pode ter ocorrido como detrimento em prol de ações imunogênicas da OT, que nesta condição recebe regulação preponderante de citocinas liberadas centralmente.

De fato, Iseri *et al.* (2005) sugeriram que a OT poderia estar envolvida na modulação de processos inflamatórios e imunes, protegendo o organismo contra danos oxidativos causados por radicais livres. Sabe-se que durante a sepse, ocorre um aumento excessivo da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que podem em parte levar a falha múltipla dos órgãos. Esses autores sugeriram que a OT pode ter um valor terapêutico limitando a falha múltipla dos órgãos induzida por LPS e que seu efeito está relacionado à inibição da infiltração tecidual de neutrófilos, que seriam os responsáveis pela síntese de ROS e NO. Outros estudos também mostraram que o efeito terapêutico da OT deve-se ao fato desse hormônio atuar como agente antioxidante, facilitando a cura de infecções do trato urinário induzido por LPS (BIYIKLI *et al.*, 2006).

Outros estudos demonstraram a existência de OT e de seus receptores no timo, sugerindo que esse hormônio poderia apresentar efeitos antiinflamatórios e imuno-moduladores. Petersson *et al.* (2001) observaram que a administração subcutânea de OT

diminuía a inflamação induzida por carragenina em ratos, porém esse efeito não foi observado quando a administração de OT era i.c.v., além disso, a quantidade de mieloperoxidase na pata dos animais, um marcador de recrutamento de neutrófilos, estava reduzida. Logo, é possível que a ação da OT seja de natureza sistêmica e possa ocorrer via inibição do recrutamento dessas células imunocompetentes.

Observou-se também que doses subsépticas de LPS não alteraram o comportamento de ingestão de água em ratos submetidos ao protocolo de privação descrito anteriormente. O modelo de privação hídrica é uma forma de induzir estado de desidratação. Este estado faz com que vários mecanismos sejam ativados (sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona, ativação de osmorreceptores, liberação de AVP, OT e ANP) culminando na busca pela água e apetite ao sódio. Fitzsimons (1998) mostra a importância da ANG II para a sede através do antagonismo do Sistema Renina-Angiotensina em ratos submetidos à privação hídrica. O antagonismo farmacológico desse sistema impede não só a ingestão de água como também o apetite ao Na⁺ em animais submetidos à privação hídrica ou desidratação extracelular pura, sugerindo a participação e a importância da ANG II na ativação da ingestão regulatória de Na⁺.

Estudos realizados por De Luca *et al.* (2007) mostraram que a ingestão de salina 1,8% durante um teste de apetite ao sódio aumentava em função do período de privação hídrica e que ratos que não foram submetidos à privação ingeriram um volume significativamente menor de salina durante o teste. Esses autores também observaram que a inibição da enzima conversora de Angiotensina ou dos receptores de ANG II inibiram fortemente a ingestão de NaCl 1,8%, sugerindo que a ANG II central medeia o apetite ao Na⁺ induzido por privação hídrica.

Nossos resultados mostraram que o volume ingerido durante o período de oferta de água não foi significativamente diferente quando comparado ao controle, sugerindo que as doses e a cepa de LPS utilizada nesse trabalho não foi capaz de alterar os mecanismos periféricos e centrais ativados durante a privação, com o objetivo de restabelecer o equilíbrio hidroeletrolítico.

Esses resultados diferem de estudos anteriores que mostraram que o LPS inibiu a busca pela água em ratos privados por 24 e 48 horas (NICOLETTA *et al.*, 1983; CALAPAI *et al.*, 1994), porém esses estudos trabalharam com doses maiores e cepas bacterianas diferentes das utilizadas nesse estudo.

5. CONCLUSÃO

A administração de doses subsépticas de LPS (25, 50, 100 e 300 µg/Kg) em ratos submetidos à privação por 36 h causou aumento nos níveis plasmáticos de NO e OT, inibição seletiva da reposição de NaCl, sem acarretar alterações na concentração de Na⁺ e K⁺ e osmolalidade plasmática.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANTUNES-RODRIGUES, J., MOREIRA, A.C., ELIAS, L.L.K., DE CASTRO, M. Controle Neuroendócrino da Ingestão de Água e Sal. In: De Luca, A. Jr. *et al.* **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 116-135.

ANTUNES-RODRIGUES, J., MOREIRA, A.C., ELIAS, L.L.K., DE CASTRO, M. Controle Neuroendócrino da Homeostase dos Fluidos Corporais. In: Antunes-Rodrigues, J. *et al.* **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.81-116.

ANTUNES-RODRIGUES, J., MOREIRA, A.C., ELIAS, L.L.K., DE CASTRO, M. Neuroimunoendocrinologia Básica: In: De Laurentiis, A *et al.* **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p. 563 - 579.

ALMEIDA, R.L., FRACASSO, J.F., MENANI, J.V., DE LUCA Jr., L.A. Efeito de Endotoxina sobre o Apetite ao Sódio e Sede no Modelo Furo/Cap. 2005.

AKTAN, F., 2004. iNOS-mediated Nitric Oxide Production and its Regulation. **Life Sciences**. v. 75, p. 639-653, 2004.

ARMSTRONG, W.E. Morphological and Electrophysiological Classification of Hypothalamic Supraoptic Neurons. **Prog. Neurobiol.** v. 47, p. 291-339, 1995.

BAKKER, H.R., DYBALL, R.E. Reduced Depletion of Neurohypophysial Hormone Stores by Vasopressin Administration in Rats Drinking 2% NaCl. **Neuroendocrinology**. v. 18 (1), p. 92-103, 1975

BIYKLI, N.K., TUGTEPE, H., SENER, G., VELIOGLU-OGUNÇ, A., CETINEL, S., MIDILLIOGLU, S., GEDIK, N., YEGEN, B. Oxytocin Alleviates Oxidative Renal Injury in Pyelonephritic Rats via a Neutrophil-Dependent Mechanism. **Peptides**. v. 27, p. 2249-2257, 2006.

BORGES, B.C., CARNIO, E.V., ELIAS, L.L.K., ANTUNES-RODRIGUES, J., BRANCO, L.G.S., ROCHA, M.J.A. Lesion of the Anteroventral Third Ventricle (AV3V) Reduces Hypothalamic Activation and Hypophyseal Hormone Secretion Induced by Lipopolysaccharide in Rats. **Brain Research**. p. 83-91, 2006.

BLACKBURN, R.E., SAMSON, W.K.R., FULTON, J., STRICKER, E.M., VERBALIS, J.G. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: Evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. **Neurobiology**. v. 90, p. 10380-10384, 1993.

BROWNSTEIN, M.J., RUSSELL, J.T., GAINER, H. Synthesis, Transport, and Release of Posterior Pituitary Hormones. **Scien**. v. 207, p. 373-378, 1980.

CALAPAI, G., MAZZAGLIA, G., CILIA, M., ZINGARELLI, B., SQUADRITO, F., CAPUTI, A.P. Mediation by Nitric Oxide Formation in the Preoptic Área of Endotoxin and Tumor Necrosis Factor-Induced Inhibition of Water Intake in the Rat. **Br J Pharmacol**. v. 111 (4), p. 1328-32, 1994.

CARNIO, E.C., MORETO, A., GIUSTI-PAIVA, A., ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuro-Immune-Endocrine Mechanisms During Septic Shock: Role for Nitric Oxide in Vasopressin Oxytocin Release. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets**. v. 6, p. 7-16, 2006.

CELLA, M., AISEMBERG, J., SORDELLI, M.S., BILLI, S., FARINA, M., FRANCHI, A.M., RIBEIRO, M.L. Prostaglandins Modulate Nitric Oxide Synthase Activity Early in Time in the Uterus of Estrogenized Rat Challenged with Lipopolysaccharide. **European Journal of Pharmacology**. v. 534, p. 218-226, 2006.

CHRIGUER, R.S., ROCHA, M.J., ANTUNES-RODRIGUES, J., FRANCHI, C.R. Hypothalamic ANP and Secretion of OT. **Brain Res**. v. 889, p. 239-242, 2001.

CLANCY, R., VARENIKA, B., HUANG, W., BALLOU, L., ATTUR, M., AMIM, A.R., ABRAMSON, S.B. Nitric Oxide Synthase/COX Cross-Talk: Nitric Oxide Activates COX-1

but Inhibits COX-2 Derived Prostaglandin Production. **J. Immunol.** v. 165, p. 1582-1587, 2000.

CONSTÂNCIO, J., FRACASSO, J.F., MENANI, J.V., DE LUCA Jr., L.A. Efeito de Endotoxina sobre a Sede. 2005.

DE CASTRO E SILVA, E., LUZ, P.A., MAGRANI, J., ANDRADE, L., MIRANDA, N., PEREIRA, V., FREGONEZE, J.B. Role of the central opioid system in the inhibition of water and salt intake induced by central administration of IL-1 β in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior.** v. 83 (2), p. 285-95, 2006.

DE LUCA, L.A., XU, Z., SCHOORLEMMER, G.H.M., THUNHORST., R.L., BELTZ., T.G., MENANI., J.V., JOHNSON, A.K. Water Deprivation-Induced Sodium Appetite: Humoral and Cardiovascular Mediators and Immediate Early Genes. **Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Com. Physiol.** v. 282, p. 552-559, 2002.

DE LUCA, L.A., VENDRAMINI, R.C., PEREIRA, D.T.B., COLOMBARI, D.A.S., DAVID, R.B., DE PAULA, P.M., MENANI, J.V. Water deprivation and the doubledepletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v.40, p.707-712, 2007.

ELMQUIST, J.K., SAPER, C.B. Activation of Neurons Projecting to the Paraventricular Hypothalamic Nucleus by Intravenous Lipopolysaccharide. **The Journal of Comparative Neurology.** v. 374, p. 315-331, 1996.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, Thirst, and Sodium Appetite. **The American Physiological Societ.** v.78, p. 85-667, 1998.

FONG, Y; LOWRY, S. Tumor Necrosis Factor in the Pathophysiology of Infection and Sepsis. **Clin. Immunol. Immunopathol.** v.55, p. 157-70, 1990.

GALVANI, A.L.S., KREBS, V.L.J., VAZ, F.A.V. Características Bioquímicas e Propriedades dos Mediadores Humorais nas Infecções Bacterianas. **Revisões e Ensaios.** v. 21, p. 123-132, 1999.

GRINDSTAFF, R.R., GRINDSTAFF, R.J., CUNNINGHAM, J.T. Effects of Right Atrial Distension on the Activity of Magnocellular Neurons in the Supraoptic Nucleus. **Am. J. Physiol.** v. 278, p. 1605-1615, 2000.

GIUSTI-PAIVA, A., ELIAS, L.L.K., ANTUNES-RODRIGUES, J. Inhibitory Effect of Gaseous Neuromodulators in Vasopressin and Oxytocin Release Induced by Endotoxin in Rats. **Neuroscience Letters.** v. 381, p. 320-324, 2005.

GURRAO, E.P.C. **Participação da Angiotensina II na Resposta Neuroimunoendócrina Induzida Por Lipopolissacarídeo Bacteriano.** 2008. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular, Área de Concentração Neurociências) Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal do Pará, Belém.

HAANWINCKEL, M.A., ELIAS, L.K., FAVARETTO, A.L.V., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin Mediates Atrial Natriuretic Peptide Release and Natriuresis After Volume Expansion in the Rat. **Proc. Natl. Acad.** v. 92, p. 7902-7906, 1995.

HARADA, S., IMAKI, T., CHIKADA, N., NARUSE, M., DEMURA, H. Distinct Distribution and Time-Course Changes in Neuronal Nitric Oxide Synthase and Inducible NOS in the Paraventricular Nucleus Following Lipopolysaccharide Injection. **Brain Research.** v. 821 (2), p. 322-32, 1999.

HARBRECHT, B.G.M.D., MCCLURE, E.A.B.A., SIMMONS, R.L.M.D., BILLIAR, T.R.M.D. Prostanoids Inhibit Kupffer Cell Nitric Oxide Synthesis. **Journal of Surgical Research.** v. 58 (6), p. 625-629, 1995.

HATTON, G.I. Oxytocin and Vasopressin Neurones: Vive la Difference. **J. Physiol.** v. 500, p. 284, 1997.

ISERI, S.O., SENNER, G., SAGLAM, B., GEDIK, N., ERCAN, F., YEGEN, B.C. Oxytocin Protects a Against Sepsis-Induced Multiple Organ Damage: Role of Neutrophils. **The Journal of Surgical Research.** v. 126 (1), p. 73-81, 2005.

KATHLEEN, M.K.B, JAWOROWICZ, D., RAYBON, J. Neuroinflammatory Role of Prostaglandins During Experimental Meningitis: Evidence Suggestive of an *in Vivo* Relationship between Nitric Oxide and Prostaglandins. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 304 (1), p. 319-325, 2003.

KNIGGE, U., KJAER, K., KRISTOFFERSEN, U., MADSEN, K., TOFTEGAARD, C., JORGENSEN, H., WARBERG, J. Histamine Interaction in Regulation of Oxytocin and Vasopressin Secretion. **Journal of Neuroendocrinology**. v. 15, p. 940-945, 2003.

LIU, H., TERRELL, M.L., BUI, V., Y, J., SUMMY-LONG., KADEKARO, M. Nitric Oxide Control of Drinking, Vasopressin and Oxytocin Release and Blood Pressure in Dehydrated Rats. **Physiology & Behavior**. v. 63 (5), p. 763 - 769, 1997.

LUHESHI, G.N. Cytokines and Fever: Mechanisms and Sites of Action. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 29, p. 856-83-9, 1998.

MATSUNAGA, W., MIYATA, S., TAKAMATA, A., BUN, H., NAKASHIMA, T., KIYOHARA, T. LPS-Induced Fos Expression in Oxytocin and Vasopressin Neurons of the Rat Hypothalamus. **Brain Research**. v. 858, p. 9-18, 2000.

MCCANN, S.M. The ACTH-releasing Activity of Extracts of the Posterior Lobe of the Pituitary *in vivo*. **Endocrinol**. v. 60, p. 664-676, 1957.

MCCANN, S.M., MACK, R., GALE, C. The Possible Role of Oxytocin in Stimulating the Release of Prolactin. **Endocrinol**. v. 64, p. 870-889, 1959.

MCCANN, S.M. Hypothalamic Releasing and Inhibiting Hormone. **In: Elsevier's Encyclopedia of Neuroscience. G. Adelman and BH Smith**. p. 927-930, 1999.

MLANO, S., ARCOLEO, F., DIELI, M., DE NUCCI, G., CILLARI, E. Prostaglandin E2 Regulates Inducible Nitric Oxide Synthase in the Murine Macrophage Cell Line J774. **Prostaglandins**. v. 49 (2), p. 105-15, 1995.

MIYOSHI, M., NAGATA, K., IMOTO, T., GOTO, O., ISHIDA, A., WATANABE, T. ANG II is Involved in the LPS-Induced Production of Proinflammatory Cytokines in Dehydrated Rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr Comp. Physiol.* v. 284(4), p. R1092-7, 2003.

NAITO, Y., FUKATA, J., SHINDO, K., EBISUI, Q., MURAKAMI, N., TOMINAGA, T., NAKAI, Y., MORI, K., KASTING, N.W., IMURA, H. Effects of Interleukins on Plasma Arginine Vasopressin and Oxytocin Levels in Conscious, Freely Moving Rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 174, p. 1189-1195, 1991.

NICOLETTA, P., MATERA, G., MASTROENI, P., CAPUTI, AP. Antidipsogenic Effect of Endotoxin in the Rat. **Circ Shock.** v. 11 (4), p. 341-50, 1983.

OPAL, S.M. The Host Response to Endotoxin, Antilipopolysaccharide Strategies, and Management of Severe Sepsis. **International Journal of Medical Microbiology.** 2007.

PETERSSON, M., WIBERG, U., LUNDEBERG, T., UVNAS-MOBERG, K. Oxytocin Decreases Carrageenan Induced Inflammation in Rats. **Peptides.** v. 22 (9), p. 1479 – 84, 2001.

PISTRITTO, G., FRANZESE, O., POZZOLI, G., MANCUSO, C., TRINGALI, G., PREZIOSI, P., NAVARRA, P. Bacterial Lipopolysaccharide Increases Prostaglandin Production by Rat Astrocytes via Inducible Cyclo-oxygenase: Evidence for the Involvement of Nuclear Factor K β . **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 263, p. 570–574, 1999.

PHILLIPS, I.M. Functions of Angiotensin in the Central Nervous System. **Ann. Rev. Physiol.** v. 49, p.413-35, 1987.

PORTER, J.C., SISSOM, J.F., ARITA, J., REYMOND, M.J. Hypothalamic-hypophysial Vasculature and its Relationship to Secretory Cells of the Hypothalamus and Pituitary Gland. **Vitam. Horm.** v. 40, p. 145-174, 1983.

QUAN, N., STERN, E.L., WHITESIDE, M.B., HERKENHAM, M. Induction of Pro-inflammatory Cytokine mRNAs in the Brain after Peripheral Injection of Subseptic Doses of Lipopolysaccharide in the Rat. **Journal of Neuroimmunology.** v. 93, p. 72-80, 1999.

RAYMOND, R.M., HARKEMA, J.M., EMERSON, T.E. Cerebrospinal Fluid Composition During Endotoxin Shock in the Dog. **Adv Shock Res.** v. 2, p. 249-56, 1979.

RENAUD, L.P., BOURQUE, C.W. Neurophysiology and Neuropharmacology of Hypothalamic Magnocellular Neurons Secreting Vasopressin and Oxytocin. **Prog. Neurobiol.** v. 36, p. 131-169, 1991.

ROGER, C., BONE, M.D. The Pathogenesis of Sepsis. **Annals of Internal Medicine.** v. 115, p. 457-469, 1991.

SALVEMINI, D., MISKO, T.P., MASFERRER, J.L., SEIBERT, K., CURRIE, M.G., NEEDLEMAN, P. Nitric Oxide Activates Cyclooxygenase Enzymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 90, p. 7240-7244, 1993.
SATO, M.A., YADA, M.M., DE LUCA, JR. Antagonismo f the Renin-Angiotensin System and Water Deprivation-Induced NaCl Intake in Rats. **Physiology & Behavior.** v. 60, p. 1099-1104, 1996.

STRICKER, E.M.A., VERBALIS, J.G. Central Inhibition of Salt Appetite by Oxytocin in Rats. **Regulatory Peptides.** v. 66, p. 83-85, 1996.

SUMMY-LONG, J.Y., BUI, V., GESTL, S., KADEKARO, M. Nitric Oxide, Interleukin and Prostaglandin Interactions Affecting the Magnocellular System. **Brain Research.** v. 940, p. 10-20, 2002.

SWIERKOSZ, T.A., MITCHELL, J.A., WARNER, T.D., BOTTING, R.M., VANE, J.R. Co-Induction of Nitric Oxide Synthase and Cyclooxygenase: Interactions between Nitric Oxide and Prostanoids. **British Journal of Pharmacology.** v. 114, p. 1335-1342, 1995.

WANG, K., WASELENCHUK, L., EVERED, M.D. Stimulation of Drinking by Bacterial Endotoxins in the Rat. **Physiology & Behavior.** v. 54, p. 1005-1009, 1993.

WONG, M.L., RETTORI, V., AL-SHEKHLI, A., BONGIORNO, P.B., CANTEROS, G., MCCANN, S.M., GOLD, P.W., LICINIO, J. Inducible Nitric Oxide Synthase Gene

Expression in the Brain During Systemic Inflammation. **Nature Medicine**. v. 2 (5), p. 581-4, 1996.

XIA, Y., KRUKOFF, T.L. Cardiovascular Responses to Subseptic Doses of Endotoxin Contribute to Differential Neuronal Activation in Rat Brain. **Molecular Brain Research**. v. 89, p. 71-85, 2001.

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](#)