

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

Ellen Polyana da Costa Gurrão

PARTICIPAÇÃO DA ANGIOTENSINA II NA RESPOSTA
NEUROIMUNOENDÓCRINA INDUZIDA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO

Belém

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ellen Polyana da Costa Gurrão

**PARTICIPAÇÃO DA ANGIOTENSINA II NA RESPOSTA
NEUROIMUNOENDÓCRINA INDUZIDA POR
LIPOPOLISSACARÍDEO BACTERIANO**

**Dissertação de mestrado apresentado 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

Ellen Polyana da Costa Gurrão

Participação da Angiotensina II na Resposta Neuroimunoendócrina Induzida por Lipopolissacarídeo Bacteriano

Dissertação de mestrado apresentado 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.

Banca examinadora:

Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz (Orientador)

Departamento de Fisiologia, UFPA

Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Departamento de Fisiologia, FMRP/USP

Prof Dr. Lacy Cardoso de Brito Junior

Departamento de Fisiologia, UFPA

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

Departamento de Fisiologia, UFPA

*À Universidade Federal do Pará e à sociedade,
que estes conhecimentos científicos
possam estar a serviço
da humanidade.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e por ter-me iluminado ao longo dessa jornada, com sabedoria, entendimento e conhecimento;

Ao Prof^o Dr. Domingos Wanderley Picanço Diniz, por compartilhar o seu saber e experiências e por possibilitar-me outras vivências em outras realidades, através do intercâmbio científico na FMRP/USP;

Ao Prof^o Dr. José Antunes-Rodrigues do Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP/USP, pelo apoio científico, através da co-orientação durante os experimentos realizados em seu laboratório, o que possibilitou-me ampliar meus conhecimentos e experiências na área;

A Prof^a Lucila Leico Kagohara Elias, pelo apoio científico dispensado durante o intercâmbio científico;

Agradeço em especial a Márcia, Lisandra e Wagner por terem contribuído para a execução desta Dissertação;

Aos meus amigos e colegas do Mestrado, do Laboratório de Neuroendocrinologia - Wanda, Daisy, Andréa, Alan, Valéria, Waldiney, Lúcia, Siany, Mara, Herculano, Osvaldo, agradeço pela amizade, companheirismo, solidariedade e colaboração na troca de conhecimentos e experiências, importante contribuição para a realização deste trabalho;

As técnicas Maria Valci A. Silva e Marina Holanda, do Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP/USP, pela colaboração e apreço dispensado durante a minha estadia nessa Instituição de Ensino, na execução dos experimentos;

A CAPES, ao Projeto Casadinho e a UFPA, pelo suporte científico e financeiro dispensando para a realização desta formação;

Aos meus familiares, tesouros preciosos à minha vida: José e Elizabeth, aos meus irmãos Alinne e Peter, aos meus sobrinhos Matheus e Mirely e a minha cunhada Marcicléia, pelo amor, incentivo, paciência e companheirismo, na realização deste sonho, que se tornou realidade.

*“É preciso superar a compreensão mágica do mundo,
por uma compreensão científica do mundo”.*

(PAULO FREIRE, 1982).

*“Em todo processo de compreensão do mundo
há um processo de produção e compreensão do conhecimento.
Em todo processo de produção do conhecimento
está implícita a possibilidade de comunicar
o que foi compreendido...”.*

(PAULO FREIRE, 1996).

RESUMO

Concentrações de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS; *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4) que não causam choque endotóxico foram escolhidas para este estudo com o objetivo de avaliar a ocorrência de resposta inflamatória branda e suas conseqüências sobre o eixo hipotálamo-neurohipofisário-atrial e hipotálamo-hipófise-adrenal. A participação do sistema renina-angiotensina como um mediador dessa resposta neuroimunoendócrina foi avaliada pelo bloqueio de receptores AT₁ de angiotensina II (ANG II). Medidas da concentração plasmática de ocitocina (OT), vasopressina (AVP), peptídeo natriurético atrial (ANP) e corticosterona foram realizadas para testar a integridade funcional destes eixos. Ratos Wistar (250–300g) receberam injeções de LPS por via intraperitoneal (i.p.) nas doses de 0,1 e 0,3 mg/Kg de peso corporal (p.c.) e outro grupo foi previamente (10 min) tratado com losartan (10 mg/Kg p.c.), um antagonista de receptores AT₁ de ANG II. A secreção hormonal foi avaliada 30 min ou 120 min após a administração da menor ou maior dose de LPS, respectivamente. As dosagens de hormônios plasmáticos foram realizadas através da técnica de Radioimunoensaio específico. Os resultados são expressos como médias \pm EPM e as diferenças estatisticamente significantes foram avaliadas por Teste *t*. Este estudo mostrou que a administração sistêmica de LPS promoveu aumento na secreção de OT, corticosterona e diminuição na liberação de ANP, sem alterar a concentração de AVP no plasma. Os efeitos desta endotoxina foram mais evidentes aos 120 min sobre a secreção de OT e exclusivos para a secreção de corticosterona e ANP. Além disso, o bloqueio de receptores AT₁ potencializou o efeito estimulante do LPS sobre a secreção de OT (0,1 e 0,3 mg/Kg de LPS) e a inibição sobre a secreção de ANP (0,3 mg/Kg de LPS). Em contraste, esse bloqueio diminuiu a secreção de corticosterona estimulada por LPS (0,3 mg/Kg de LPS), sugerindo a participação efetiva da ANG II como um mediador da resposta neuroimunoendócrina conseqüente à endotoxemia bacteriana aqui simulada por administração de doses subendotóxicas de LPS.

Palavras chave: LPS, Angiotensina II, Ocitocina, Vasopressina, Corticosterona e Peptídeo Natriurético Atrial.

ABSTRACT

Concentrations of bacteria's lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli* serotype 0111:B4) that can not cause septic shock were chosen for this work to evaluate the occurrence of a light inflammatory response and its consequences in the hypothalamic-neurohypophyseal-atrial and hypothalamic-pituitary-adrenal axis. The involvement of renin-angiotensin system as a mediator of neuroendocrinology responses was evaluated by the blocked angiotensin II (ANG II) receptor type 1. Measures of oxytocin (OT), vasopressin (AVP), atrial natriuretic peptide (ANP) and corticosterone's plasma concentration were made to evaluate the functional integrity of the axis. Male rats Wistar (250–300g) were administered with LPS by intraperitoneal via (i.p.) in doses of 0.1 and 0.3 mg/Kg of body weight (b.w.) or previously (10 min) treated with losartan (10 mg/Kg b.w.), an antagonist of the type-1 ANG II receptors. The hormonal secretion was evaluated 30 min or 120 min after the administration of the smaller or greater dose of LPS, respectively. The dosages of plasmatic hormones were carried out through Radioimmunoassay Technique. The results were expressed as mean \pm SEM and the statistically significant differences were evaluated by *t* test. This work showed that the systemic administration of LPS promoted increase in the OT, corticosterone's secretion and decrease of ANP release, without change AVP's concentration in plasma. The effects of this endotoxin were clearest in 120 min upon OT's secretion and exclusive for corticosterone and ANP's secretion. Moreover, the blocked of AT₁'s receptors potentialized the stimulated effect of LPS upon OT's secretion (0.1 and 0.3 mg/Kg of LPS) and the inhibition upon ANP's secretion (0.3 mg/Kg of LPS). In contrast, this blocked decreased corticosterone's secretion stimulated by LPS (0.3 mg/Kg of LPS), suggesting the participation of ANG II as a mediator of a neuroimmunoendocrine response in consequence of the bacteria endotoxemia here simulated by the administration of subseptic doses of LPS.

Keywords: LPS, Angiotensin II, Oxytocin, Vasopressin, Corticosterone, Atrial Natriuretic Peptide

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico
ANG II: Angiotensina II
ANP: Peptídeo Natriurético Atrial
AP: Área Postrema
AVP: Arginina Vasopressina
AV3V: Região Anterior do Terceiro Ventrículo
CA: Comissura Anterior
CO: Monóxido de Carbono
COX: Ciclooxigenase
CRH: Hormônio Liberador de Corticotropina
CVOs: Órgãos Circunventriculares
e.v.: endovenosa
HHA: Hipotálamo-Hipófise-Adrenal
i.c.v.: intracerebroventricular
IL-1 β : Interleucina 1-beta
IL-6: Interleucina - 6
i.p.: intraperitoneal
LCR: Líquido Cefalorraquidiano
LPS: Lipopolissacarídeo
MnPO: Núcleo Préptico Mediano
NO: Óxido Nítrico
NOS: Óxido Nítrico Sintase
NOS-II: Óxido Nítrico Sintase II ou Induzida
NTS: Núcleo do Trato Solitário
OT: Ocitocina
OVL: Órgão Vascular da Lâmina Terminal
p.c.: peso corporal
PGs: prostaglandinas
PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RIE: Radioimunoensaio
SFO: Órgão Subfornicial

SNC: Sistema Nervoso Central

SON: Núcleo Supra-óptico do Hipotálamo

SRA: Sistema Renina-Angiotensina

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral-alfa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Sistema Renina-Angiotensina	13
<i>1.1.1 Sistema Renina-Angiotensina Sistêmico</i>	14
<i>1.1.2 Sistema Renina-Angiotensina Cerebral</i>	15
<i>1.1.3 Receptores de Angiotensina</i>	15
<i>1.1.4 Funções da Angiotensina na Sede e Apetite ao Sal</i>	16
1.2 Regulação Neuroimunoendócrina na Endotoxemia	19
1.3 Objetivo	26
<i>1.3.1 Objetivo Geral</i>	26
<i>1.3.2 Objetivo Específico</i>	26
2 MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1 Animais	27
2.2 Implante Cirúrgico de Cateter na Veia Jugular	27
2.3 Coleta de Sangue	28
2.4 Dosagem de Hormônios Plasmáticos	28
<i>2.4.1 Dosagem Plasmática de Vasopressina, Ocitocina e ANP por Radioimunoensaio (RIE)</i>	28
<i>2.4.2 Dosagem Plasmática de Corticosterona por RIE</i>	30
2.5 Drogas e Reagentes	31
<i>2.5.1 Lipopolissacarídeo (LPS) de Escherichia coli sorotipo 0111:B4 (Sigma)</i>	31
<i>2.5.2 Losartan (Sigma)</i>	31
<i>2.5.3 Veículo (Solução salina isotônica estéril - Samtec Biotecnologia)</i>	32
2.6 Análise Estatística	35
3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	32
4. RESULTADOS	36
4.1 Participação da angiotensina na resposta neuroendócrina induzida pela administração de LPS nas doses de 0,1 e 0,3 mg/Kg	36
<i>4.1.1 Efeito do LPS sobre a secreção de Ocitocina</i>	36
<i>4.1.2 Efeito do LPS sobre a secreção de Corticosterona</i>	38
<i>4.1.3 Efeito do LPS sobre a secreção de ANP</i>	40
<i>4.1.4 Efeito do LPS sobre a secreção de AVP</i>	42
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO	51
7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	52
ANEXO	60

1. INTRODUÇÃO

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 da composição do meio interno é mantida basicamente pelo controle da ingestão e excreção renal de água e sódio. O sódio é o principal soluto extracelular e o mais efetivo em criar um gradiente osmótico que permite o movimento de água entre os compartimentos intracelular e extracelular. Assim, o conteúdo total de sódio e dos ânions que o acompanham (Cl^- e HCO_3^-) determina, no nosso organismo, a osmolalidade plasmática e o volume do líquido extracelular (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

O volume e a osmolalidade dos fluidos corporais de mamíferos são regulados em resposta a estímulos provenientes tanto do meio intracelular como do meio extracelular. Esses estímulos são detectados por duas categorias de receptores: osmorreceptores e mecanorreceptores (receptores de volume e pressão). Essa informação é encaminhada para áreas específicas do Sistema Nervoso Central (SNC) responsáveis por uma resposta integrada, a qual é dependente da integridade da região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V) e órgão subfornicial (SFO). Além disso, o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), núcleo supra-óptico (SON), *locus ceruleus* e núcleo parabraquial lateral, dentre outros, também representam importantes estruturas envolvidas no balanço hidromineral (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

Osmorreceptor é um sensor de sódio localizado em regiões cerebrais desprovidas de barreira hematoencefálica, como os órgãos circumventriculares (CVOs), a região AV3V e a área postrema (AP), que podem estar envolvidas na regulação do apetite ao sódio e sua excreção em resposta a variações da concentração desse soluto no líquido cefalorraquidiano (LCR), bem como estão envolvidas na gênese da sede. A região AV3V inclui a parte ventral do núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT). A região AV3V, SFO e a AP contêm neurônios que são sensíveis às variações de osmolalidade do LCR e apresenta conexões com o PVN (Figura 01) (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005). Os receptores angiotensinérgicos são particularmente densos no hipotálamo anterior e tecido ao redor da região AV3V (incluindo o OVLT e o MnPO), bem como no SFO, SON e PVN (FITZSIMONS, 1998).

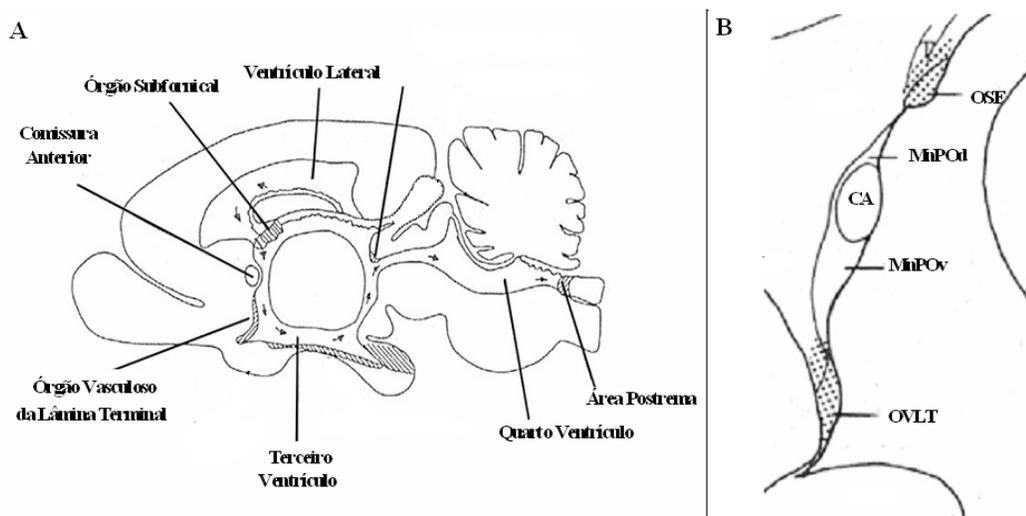


Figura 01: Secção sagital do cérebro de rato mostrando: A, localização dos órgãos circunventriculares (área sombreada); B, detalhe da parede anterior do terceiro ventrículo cerebral, indicando os órgãos circunventriculares pertencentes a lâmina terminal (área pontilhada). Órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), órgão subfornicial (SFO), núcleo pré-óptico mediano (MnPO) ventral (v) e dorsal (d), comissura anterior (CA). (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

1.1 Sistema Renina-Angiotensina

O hormônio circulante angiotensina II (ANGII) é um importante fator humoral na regulação cardiovascular, na homeostase dos líquidos corporais e eletrólitos. É um potente vasoconstritor, atua estimulando a retenção de sódio ao promover a secreção do hormônio aldosterona do córtex adrenal, envolvida na geração de sede e apetite ao sódio, liberação do hormônio arginina vasopressina (AVP), regulação intrarenal do balanço glomerular-tubular, e retroalimentação negativa da liberação de renina renal. O papel da ANGII na regulação da homeostase dos fluidos corporais ocorre não por ela atravessar a barreira hematoencefálica, mas por ser um neuropeptídeo produzido no SNC, onde pode atuar como um neurotransmissor ou modulador da função neural ao influenciar a sede, a secreção de AVP, liberação de renina, excreção de sódio e temperatura corporal (McKINLEY *et al.*, 2003).

1.1.1 Sistema Renina-Angiotensina Sistêmico

O sistema renina-angiotensina (SRA) periférico participa ativamente da manutenção da constância do sódio do líquido extracelular, bem como da homeostase dos líquidos orgânicos. A molécula precursora do SRA é o angiotensinogênio, produzido no fígado e secretado na circulação sistêmica, onde é clivado pela renina, enzima proteolítica produzida pelas células endoteliais da parede da arteríola aferente do glomérulo renal, dando origem ao decapeptídeo angiotensina I (ANG I). A ANG I é, por sua vez, convertida no octapeptídeo ANG II pela ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), essa enzima é produzida principalmente nos pulmões, sendo também encontrada nos rins e nas células endoteliais do sistema vascular sistêmico (DE LUCA *et al.*, 2000; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005; BOHLEN & ALBRECHT, 2006). A ANG II também é produzida no cérebro e, pode atuar independentemente da ANG II periférica. A ANG II não atravessa a barreira hematoencefálica, porém a ANG II circulante pode atuar em seus receptores localizados nos CVOs (DE LUCA *et al.*, 2000).

A renina é uma enzima proteolítica secretada pelo aparelho justaglomerular em resposta a diversos estímulos fisiológicos, incluindo declínio da concentração de sódio no túbulo distal e queda da pressão de perfusão renal. A atividade nervosa simpática renal, os agonistas dos receptores β -adrenérgicos e a prostaglandina I₂ (PGI₂) estimulam diretamente a secreção de renina (RANG *et al.*, 2004). Os principais inibidores da síntese e liberação de renina são: a ANG II, o peptídeo natriurético atrial (ANP) e a AVP (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

O estímulo mais importante para a liberação de renina é a diminuição da pressão de perfusão renal, o que pode ser devido à hemorragia, hipotensão ou redução do volume do líquido extracelular, normalmente observada após a depleção de sódio. Esses estímulos determinam aumento da produção de renina e ativação do SRA, secreção de aldosterona e conseqüente aumento da reabsorção de sódio, expansão do volume e aumento da pressão arterial. Como conseqüência, ocorre diminuição da produção de renina, estabelecendo assim o seu controle homeostático. Os rins participam da regulação da homeostase cardiovascular e do equilíbrio hidrossalino através de três mecanismos principais: controlando a excreção de sódio e água e a secreção de renina (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

A ANG II circulante é um potente vasoconstritor, induzindo a elevação da pressão arterial, estimulando também a secreção de aldosterona, que aumenta a reabsorção de sódio e

excreção renal de potássio. Além de estimular a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), liberação de AVP, catecolaminas, glicogenólise, função renal e vasoconstrição, e atua também sobre o comportamento alimentar, estimulando a ingestão de água e o apetite para o sódio (FITZSIMONS, 1998; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

1.1.2 Sistema Renina-Angiotensina Cerebral

Todos os componentes do SRA, incluindo os precursores e enzimas necessárias para a produção e degradação de angiotensina, assim como os seus receptores AT₁ e AT₂, foram identificados no cérebro (SAAVEDRA, 1992; FITZSIMONS, 1998). Os receptores AT₁, expressos no cérebro e tecidos periféricos, são responsáveis por ações clássicas do SRA, incluindo a homeostase da pressão arterial e a regulação da ingestão e balanço hídrico (DAVISSON *et al.*, 2000). O SRA cerebral promove aumento da pressão arterial, sede, apetite ao sódio, secreção de AVP e de ACTH (PHILLIPS, 1987). A ANG II cerebral atua regulando a pressão sanguínea independentemente do SRA sistêmico, por interferir na secreção de AVP e ACTH ou na modulação do reflexo barorreceptor e da atividade de eferências simpáticas. A ANG II sistêmica atua principalmente sobre os CVOs, onde ela pode ativar neurônios angiotensinérgicos, que por sua vez mediarão ações dipsogênicas (FITZSIMONS, 1998). No entanto, o SRA cerebral pode agir independente do SRA sistêmico quando a origem reguladora utiliza outra via de sinalização.

1.1.3 Receptores de Angiotensina

As ações da ANG II são mediadas através dos receptores AT₁ e AT₂:

- **AT₁**: é um receptor específico ligado à membrana e acoplado a proteína G. As suas ações incluem: vasoconstrição generalizada, particularmente pronunciada nas arteríolas eferentes renais, aumento da liberação de noradrenalina das terminações nervosas simpáticas, reforçando a vasoconstrição e aumentando a frequência cardíaca

e a força de contração do coração; estimulação da reabsorção tubular proximal de sódio; secreção de aldosterona do córtex supra-renal (RANG *et al.*, 2004). Os receptores AT₁ neuronais são responsáveis por mediar ações estimulatórias da ANG II na pressão arterial, ingestão de água e sal, e secreção de AVP. (BOHLEN & ALBRECHT, 2006). O receptor AT₁ de ANG II é encontrado ao longo da lâmina terminal de todos os mamíferos. O receptor AT₁ é encontrado em alta concentração no SFO e no OVLT sendo também expresso no MnPO (McKINLEY, 1999), no PVN e no SON, núcleo parabraquial lateral, medula ventrolateral e núcleo do trato solitário (NTS), onde participam da regulação do sistema cardiovascular e/ou balanço hidroeletrólítico (McKINLEY, 2003).

- **AT₂**: a função deste receptor ainda não está bem estabelecida, sabe-se que podem atuar no estabelecimento da diferenciação celular, apoptose e vasodilatação (RANG *et al.*, 2004; BOHLEN & ALBRECHT, 2006).

1.1.4 Funções da Angiotensina na Sede e Appetite ao Sal

A sede é uma sensação que motiva a procura, obtenção e consumo de água, e é desencadeada pela desidratação celular (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005). A sede é um componente importante da seqüência coordenada de respostas fisiológicas que mantém o volume e a composição dos líquidos corporais (McKINLEY, 2004). A ANG II é um hormônio dipsogênico e natriorexigênico. Produz sede agindo sobre os CVOs. Dos vários receptores de ANG II, os mais importantes para seu efeito dipsogênico são os receptores AT₁ presentes nos CVOs, tais como SFO e OVLT, podendo haver também alguma participação de receptores AT₂ (FITZSIMONS, 1998).

Os principais sítios de ação da ANG II no cérebro são a AP, SFO e OVLT. A AP está envolvida na ação pressora da ANG II, enquanto que o SFO está relacionado ao comportamento de ingestão, efeito pressor e secreção de AVP. O OVLT e estruturas adjacentes são importantes para a ação central da ANG II (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

A administração central de um antagonista dos receptores AT_1 bloqueou a ingestão, a liberação de AVP, respostas pressora, natriurese, reduziu a secreção de renina e a expressão do gene *c-fos* na LT em resposta a administração central de renina ou ANG II (McKINLEY, 1999). A ação da ANG II na indução de apetite ao sódio pode também ser mediada pelos neurônios na LT. Em ratos a administração central ou periférica de ANG II provocou aumento do apetite ao sódio (PHILLIPS, 1987; McKINLEY, 1999). Além disso, baixo nível de sal na dieta pode resultar em hipovolemia e ingestão preferencial de sódio (PHILLIPS, 1987).

A osmorregulação, a regulação de volume e o balanço de fluidos corporais geralmente, são regulados na maioria das vezes por dois sistemas centrais, um que controla a sede e o comportamento de ingestão de sódio e um que controla a secreção pela neurohipófise do hormônio peptídico AVP e OT (STRICKER & VERBALI, 2007).

Na presença de estímulo hipovolêmico (hemorragia ou desidratação) ocorre um aumento da ANG II circulante devido à queda da pressão arterial e conseqüente secreção de renina. A ANG II, por sua vez, age em receptores no SFO. As informações aferentes oriundas dos barorreceptores cardiopulmonares que chegam ao núcleo do trato solitário (NTS) participam também do controle da liberação de AVP e, ainda, induzem sede e ingestão de sódio em resposta a queda do volume sanguíneo ou queda da pressão arterial (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005). A ingestão de sódio é fundamental para repor o volume perdido durante a desidratação (DE LUCA *et al.*, 2000).

A desidratação celular e a hipovolemia são as duas causas principais de déficit de ingestão. O aumento da carga de sódio em função da perda de água intracelular é detectada por osmorreceptores e possivelmente por sensores de sódio localizados no hipotálamo ou CVOs. A hipovolemia é detectada por estes sensores que causam um aumento tardio no apetite ao sódio, bem como na sede. O SRA parece estar mais envolvido no comportamento de ingestão induzido por hipovolemia (FITZSIMONS, 1998).

A hiperosmolalidade é um forte estímulo para a ingestão da água. Quando as células osmorreceptoras no SFO e OVLT são expostas a hiperosmolalidade ativam neurônios que projetam para o PVN e para SON no hipotálamo para estimular a sede. Uma queda na pressão arterial aumenta a sede em resposta a ANG II administrada por via intracerebroventricular (i.c.v.). Entretanto, a sede é inibida pelo aumento na pressão arterial, a qual é detectada por barorreceptores arteriais e inibe a sede induzida pela infusão de ANG II, hipovolemia ou hiperosmolalidade. A ANG II é um forte agente dipsogênico que atua sobre receptores AT_1 presentes no SFO e induz aumento da expressão da proteína *c-fos* no MnPO, SFO, PVN, e SON (SKOTT, 2003).

Muitos estimuladores da sede, tais como a hipovolemia e a ANG II induzem também apetite ao sódio, o qual é geralmente mais lento para responder e persistente para cessar sua atividade, diferente da resposta dipsogênica. Os osmorreceptores que provocam o apetite ao sódio são os mesmos induzidos pela sede e estão localizados no OVLT e no SFO. O apetite ao sódio é estimulado pela deficiência de sódio, hipovolemia, pela ANG II, e por mineralocorticóides (SKOTT, 2003).

Os núcleos SFO, OVLT e a AP contêm receptores angiotensinérgicos que são acessíveis a ANG II circulante. O aumento nos níveis de ANG II circulante parece ter um importante papel na estimulação de apetite ao sódio após deficiência de sódio, porque em ratos privados de sódio e adrenalectomizados, o tratamento com captopril reduziu a ingestão de sódio por um efeito periférico e a infusão de ANG II restaurou a ingestão de sódio. Isto é consistente com o papel do SRA circulante na regulação do apetite ao sódio através dos CVOs (SKOTT, 2003).

A ingestão de alimento, a liberação de AVP e de ACTH, e a regulação da pressão arterial parecem ser ativadas pela ação sinérgica da ANGII e da aldosterona. A interação da aldosterona e da ANG II pode envolver neurônios ocitocinérgicos centrais, os quais limitam a ingestão de Cloreto de sódio induzida pela ANG II (i.c.v.) (SKOTT, 2003). A aldosterona pode atravessar a barreira hematoencefálica, e aumentar o número de receptores angiotensinérgicos cerebrais (PHILLIPS, 1987).

A ANG II e a aldosterona atuam no sentido de conservar sódio e impedir queda na volemia e pressão arterial. As ações desses hormônios são antagonizadas pela ocitocina e ANP, estes são secretados na circulação sanguínea durante expansão de volume isotônica e hipertônica, e ambos têm ação natriurética, esses hormônios também inibem a sede e o apetite ao sódio (ANTUNES-RODRIGUES, 2005).

1.2 Regulação Neuroimunoendócrina na Endotoxemia

A sepse é uma condição que resulta de uma resposta inflamatória nociva ou prejudicial no hospedeiro frente a uma infecção. Muitos dos componentes da resposta imune inata que estão normalmente relacionadas com a defesa do hospedeiro contra infecção podem, sob algumas circunstâncias, causar danos celulares e teciduais levando a falha múltipla dos órgãos, característica clínica da sepse. A sepse e o choque endotóxico podem ser induzidos através de modelos experimentais utilizando o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (COHEN, 2002).

O LPS é uma endotoxina presente na parede celular de bactérias Gram-negativas sendo composta por três domínios: antígeno O, núcleo e lipídeo A. O lipídeo O é uma cadeia variável de unidades repetidas de oligossacarídeos que se estendem ao meio externo e é específica para cada LPS, depende 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 a membrana externa da bactéria e é responsável pelo princípio endotóxico do LPS. Quando uma bactéria Gram-negativa se divide ou morre no organismo hospedeiro, a endotoxina é liberada em forma de LPS livre ou associada à proteína A da parede externa bacteriana. O LPS se associa aos 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 (RIETSCHER *et al.*, 1996 apud ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005).

O LPS tem sido utilizado experimentalmente para mimetizar uma situação clínica de choque endotóxico (WAN *et al.*, 1993), esta endotoxina causa alterações hemodinâmicas e liberação de hormônios, tais como, AVP, OT (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2003; 2004; 2005; CARNIO *et al.*, 2006), ANP (STABILE *et al.*, 2007), hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) (McCANN *et al.*, 2000; BORGES *et al.*, 2006) e corticosterona (WAN *et al.*, 1993; BORGES *et al.*, 2006). Esses hormônios são importantes para manutenção do equilíbrio hemodinâmico e regulação da resposta inflamatória.

A resposta do organismo frente às alterações da homeostase causadas por LPS é chamada de reação de fase aguda, essa resposta é mediada em parte por citocinas pró-inflamatórias, tais como: interleucina-1beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose

tumoral-alfa (TNF- α) que são sintetizadas por neutrófilos, macrófagos, células endoteliais e musculares, que por sua vez desencadeiam a liberação de mediadores secundários (por exemplo, óxido nítrico – NO - e prostaglandinas - PGs) (MATSUNAGA *et al.*, 2000). Como consequência, ocorre diminuição do tônus muscular e do débito cardíaco resultando em hipotensão e má perfusão tecidual (MACHADO *et al.*, 2004).

A IL-6 e TNF α atuam sinergicamente com a IL-1 em resposta a pirógenos exógenos (LUHESHI, 1998; ROTH & SOUZA, 2001). O TNF- α é uma das primeiras citocinas que aparece na circulação após administração sistêmica de LPS, seguida por traços de IL-1 β e altas concentrações de IL-6, IL-8 (ROTH, 1993 apud ROTH & SOUZA, 2001). Essas citocinas são produzidas nas fases iniciais da infecção e são responsáveis, por meio de sua ação no hipotálamo, pelo aparecimento da febre que inibe a multiplicação bacteriana (MACHADO *et al.*, 2004).

Durante uma infecção, produtos bacterianos e virais promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias de células imunes. O LPS causa uma variedade de mudanças no SNC mediada na maioria das vezes pelas citocinas. A resposta neuroendócrina com a ativação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) pode ser mimetizada pela injeção central ou periférica (via endovenosa (e.v.) ou intraperitoneal (i.p.)) de LPS (McCANN *et al.*, 2000).

O LPS circulante via citocinas pró-inflamatórias ativa o cérebro através dos CVOs, inicialmente na AP e no OVLT. Xia & Krukoff (2001) observaram que dose de 12,5 μ g/Kg de LPS (L-4005) induziu a expressão do gene da IL-1 β nos CVOs, plexo coróide, meninges, vasos sanguíneos e hipófise uma hora após a administração da endotoxina bacteriana. Já a dose de 50 μ g/Kg induziu a expressão do gene da IL-1 β no NTS e aumentou os níveis de RNA heteronuclear de vasopressina no hipotálamo. As áreas cerebrais ativadas por ambas as doses de LPS foram a AP, OVLT, NTS, área preóptica, SON e PVN (XIA & KRUKOFF, 2001). Trabalhos realizados por outros autores reforçam a hipótese de que o LPS induziu intensa imunorreatividade nuclear para Fos em neurônios magnocelulares ocitocinérgicos e vasopressinérgicos no SON e no PVN (ELMQUIST *et al.*, 1996; MATSUNAGA *et al.*, 2000).

Luheshi (1998) levanta duas hipóteses para explicar como as citocinas circulantes podem influenciar o cérebro. Uma delas sugere que essas citocinas se comunicam com o cérebro através de áreas desprovidas de barreira hematoencefálica, como os CVOs. A outra hipótese sugere que ocorre ativação de receptores de citocinas presentes nas células endoteliais que transmitem sinais para o cérebro via outros mediadores (LUHESHI, 1998).

Roth & Souza (2001) reforçam que as citocinas podem se comunicar com o SNC através de áreas cerebrais desprovidos de barreira hematoencefálica (CVOs). Os receptores de citocinas estão localizados na superfície de células endoteliais no cérebro e são alvos potenciais das citocinas circulantes. As células gliais e células endoteliais poderão produzir e liberar mediadores secundários (NO, prostaglandina E_2 - PGE_2 - e monóxido de carbono - CO) no cérebro e ter acesso a estruturas termorregulatórias na área pré-óptica e no núcleo hipotalâmico, os quais estão envolvidos na regulação da temperatura corporal.

Quan *et al.* (1999), informou que doses de LPS superiores a 0,5 mg/Kg são capazes de mimetizar uma sepse, enquanto que doses inferiores a esta são consideradas subendotóxicas. Estes pesquisadores mostraram que a administração periférica de doses subendotóxicas de LPS (sorotipo 055:B5) induziu a expressão do mRNA da IL-1 β e TNF- α somente no plexo coróide, meninge e nos CVOs, os quais estão envolvidos no processo da febre. O OVLT e AV3V têm sido identificados como sítios de produção de IL-1 β e TNF- α em resposta a injeções de doses endotóxica de LPS (QUAN *et al.*, 1999).

Estudos realizados por Matsunaga *et al.* (2000) observaram que doses subendotóxicas (5 e 125 μ g/Kg) de LPS (sorotipo 055:B5) induziram a imunorreatividade nuclear para Fos em neurônios magnocelulares ocitocinérgicos e vasopressinérgicos no SON e no PVN. Esses resultados também foram observados em modelos experimentais de choque endotóxico, em que esta endotoxina (1,5 mg/Kg, sorotipo 026:B6) aumentou o número de células com imunorreatividade nuclear para Fos no SON e PVN do hipotálamo, além de ter aumentado os níveis plasmáticos de AVP, OT, ACTH e corticosterona. Neste estudo, verificou-se que a lesão eletrolítica na região AV3V reduziu significativamente a imunorreatividade nuclear para Fos no PVN e no SON e a secreção de AVP e OT, determinando que a integridade da região AV3V é essencial para secreção de hormônios hipofisários induzida por LPS (BORGES *et al.*, 2006). Além disso, lesão eletrolítica no SFO também promoveu uma redução significativa na imunorreatividade nuclear para Fos no SON e PVN, bem como a secreção dos hormônios AVP e OT induzida por LPS (BORGES & ROCHA, 2006).

Sabe-se que AVP participa da regulação da pressão arterial e da osmolalidade plasmática (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005). Foi observado em estudos com doses endotóxicas de LPS que na fase inicial do choque endotóxico ocorre aumento significativo nos níveis plasmáticos de AVP, no entanto, em período prolongado ocorreu um declínio substancial na secreção deste hormônio mesmo na presença de uma hipotensão arterial (CARNIO *et al.*, 2006; GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2003). No modelo de choque endotóxico, foi observado que a infusão de solução salina hipertônica restaurou a pressão arterial, sugerindo

que a capacidade do sistema neurohipofisário para a secreção de AVP não foi alterada (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2007). Trabalhos realizados por Giusti-Paiva *et al.* (2003, 2005) demonstraram que o NO e o CO podem exercer um efeito inibitório sobre a secreção deste hormônio induzido por LPS (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2003; 2005).

NO e CO são moléculas gasosas sintetizadas endogenamente e atuam como neurotransmissores no SNC. A produção de NO é catalizada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que utiliza como precursor a L-arginina. Existem três isoformas conhecidas da NOS: uma forma induzível (iNOS ou NOS-II): expressa nos macrófagos e nas células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos, como microorganismos invasores; e duas constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio (eNOS ou NOS-III) e nos neurônios (nNOS ou NOS-I). A NOS-III não se restringe ao endotélio, sendo também encontrada em miócitos cardíacos, células mensageiras renais, osteoblastos e osteoclastos e, em pequenas quantidades, nas plaquetas (RANG *et al.*, 2004). A enzima NOS-I foi detectada em várias áreas cerebrais, inclusive em estruturas-chaves envolvidas na regulação da homeostase dos fluidos corporais e pressão arterial (LIU *et al.*, 1998). A produção de CO ocorre durante o catabolismo do grupo heme pela enzima heme-oxigenase (HO), que tem sua localização similar a da NOS no SNC, presente também no hipotálamo. Existem três isoformas da HO, sendo que a HO-2 é a isoforma constitutiva e a HO-1 é a induzida. A HO-1 é encontrada principalmente em macrófagos, mas pode ser expressa em vários tecidos, incluindo o SNC após alguns estímulos, tais como a própria heme, estresse oxidativo e LPS (GIUSTI-PAIVA, 2004).

O LPS bacteriano e as citocinas pró-inflamatórias induzem ou regulam algumas enzimas presentes no cérebro, as quais são responsáveis pela formação de pequenas moléculas sinalizadoras tais como, NO, CO e a PGE₂ (ROTH & SOUZA, 2001). Estudos *in vitro* em cultura primária de astrócitos de ratos mostraram que o LPS aumentou a liberação de PGE₂, e que a dexametasona e um inibidor específico da ciclooxigenase-2 (COX-2) causaram uma redução na liberação de PGE₂ induzida por LPS (PISTRITTO *et al.*, 1999).

Pesquisas com estes moduladores gasosos mostraram que NO liberado após estimulação por LPS (sorotipo 026:B6) atenuou a secreção AVP (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2003). Em 2005, estes pesquisadores demonstraram que o NO e o CO estão envolvidos tanto na liberação de AVP como de OT em resposta ao choque endotóxico, uma vez que o NO e CO atuam como moduladores inibitórios na secreção de AVP e OT durante a endotoxemia (GIUSTI-PAIVA *et al.*, 2005).

Summy-Long *et al.* (2002) enfatizaram o papel do NO administrado centralmente sobre a liberação de OT, demonstraram que a inibição da NOS causou um aumento na concentração plasmática de OT, o qual foi atenuado por inibição da COX ou por antagonista do receptor H1 e H2 de histamina. Tanto a IL-1 β , como PGE₂ e PGD₂ também estimularam a liberação de OT, porém somente a PGD₂ afetou os níveis circulantes de AVP (SUMMY-LONG *et al.*, 2002).

Em 2003, foi confirmado a participação da histamina e do LPS na ativação de neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos via ativação de PGs. O inibidor da síntese de PGs reduziu a resposta da OT e preveniu a resposta de AVP a histamina ou LPS. Por conseguinte, a histamina e a PGE₁, PGE₂ ou PGF_{2 α} regularam da secreção de OT, visto que a histamina e somente a PGE₁ regularam a secreção de vasopressina (KNIGGE *et al.*, 2003). Além do LPS, a IL-1 β (e.v.) também estimulou a secreção de AVP e OT, sendo que a secreção de AVP pode estar na dependência da ação de PGE₂, desde que o emprego de seu antagonista inibiu a secreção de AVP, mas não de OT induzida por IL-1 β (NAITO *et al.*, 1991).

Estas evidências corroboram com a hipótese de que mecanismos diferenciados de regulação da secreção de OT e AVP podem ocorrer em resposta ao LPS e que o sistema nitrérgico teria como ação central restringir a secreção desses hormônios. Além disso, a regulação diferenciada de OT e AVP pode ser mediada por estímulos dependentes de PGs.

Pesquisas realizadas *in vitro* com cultura de células de Kupffer mostraram que a PGE₂ inibiu a síntese de NO. A síntese deste composto foi inibida tanto por análogos de PGs, como por outros prostanóides. Esses dados sugerem que PGs podem ser importantes reguladores endógenos da produção de NO (HARBRECHT *et al.*, 1995).

A ativação do sistema renina-angiotensina e do eixo HHA tem um papel importante na resposta ao estresse. Agentes estressores ativam componentes neuroendócrinos, que incluem aumento na liberação de hormônio liberador de corticotropina (CRH) e AVP de neurônios parvocelulares na circulação portal, na secreção de OT pela neurohipófise, na secreção de renina pelos rins e posteriormente secreção de ACTH que leva a secreção de glicocorticóides pela adrenal (CARRASCO & VAN DE KAR, 2003). A OT pode aumentar a liberação de ACTH sob certas condições, por outro lado o ANP atua inibindo a liberação de ACTH por ação direta na hipófise. Os glicocorticóides ao se ligarem em seus receptores presentes no hipotálamo e na adenohipófise inibem a liberação de AVP e CRH, bem como a liberação de ACTH. Além disso, a ANG II, liberada em condições de hipovolemia, esta associada com a liberação de ACTH. Enquanto que o ANP tem efeitos opostos, sendo liberado em condições

em que há expansão de volume, causa diurese, natriurese, atua centralmente inibindo a secreção de AVP e CRH (McCANN et al, 2000).

Os esteróides supra-renais são sintetizados e liberados de acordo com as necessidades, sob a influência do ACTH, que é secretado pela adenohipófise. A secreção de ACTH é regulada, em parte, pelo CRH derivado do hipotálamo e, em parte, pelo nível de glicocorticóides na circulação sanguínea. Além disso, AVP pode alcançar a adenohipófise através dos vasos portais curtos da neurohipófise, também estimulando a liberação de ACTH e pode desempenhar um papel fisiológico (CARRASCO & VAN DE KAR, 2003; GOODMAN & GILMAN, 2003). Por sua vez, a liberação de CRH é inibida pelos níveis sanguíneos de glicocorticóides e é influenciada pelo estímulo do SNC (McCANN *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2004).

A ativação do eixo HHA induzida por LPS parece ser mediada por citocinas, tais como, a IL-1, TNF- α e IL-6 liberadas de macrófagos ativados (BEISHUIZEN & THIJS, 2003). O TNF- α e IL-1 β são reconhecidos como mediadores iniciais da cascata de citocinas induzida por LPS (ROTH & SOUZA, 2001). Essas citocinas estimulam o CRH e, conseqüentemente, a secreção de ACTH, este por sua vez, estimula a supra-renal a sintetizar e secretar corticosterona (BERNE *et al.*, 2000; GRION *et al.*, 2007). Sabe-se que tanto a IL-1 como a IL-6 aumentam a concentração plasmática de ACTH, no entanto o TNF- α pode estimular ou não a liberação basal de ACTH (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005). A IL-1 estimula a liberação de CRH pelos neurônios hipotalâmicos, atua diretamente na hipófise para aumentar a liberação de ACTH, além de estimular diretamente a glândula supra-renal a produzir glicocorticóides, este por sua vez, promove um efeito inibitório sobre o sistema imune (GOODMAN & GILMAN, 2003).

Xia & Krukoff (2001) verificaram que a administração sistêmica de LPS causou uma forte ativação do eixo HHA, indução de citocinas pró-inflamatórias e a expressão difusa do gene *c-fos* em várias regiões cerebrais, sugerindo o envolvimento de múltiplos circuitos neuronais no SNC frente a este estímulo. A ativação do SNC é importante na resposta de defesa do hospedeiro contra a inflamação, incluindo a regulação da circulação sistêmica, temperatura corporal, manutenção da homeostase. Doses endotóxicas de LPS causam hipotensão, desregulação da barreira hematoencefálica e falha múltipla dos órgãos. Além disso, a resposta do hospedeiro a doses subendotóxicas de LPS pode incluir mudanças variáveis na atividade cardiovascular, a qual pode influenciar a ativação neuronal no cérebro. Foi demonstrado que neurônios parvocelulares no PVN são ativados 60 min após a

administração de doses subendotóxicas de LPS (sorotipo L-4005), sugerindo que a resposta precoce do ACTH ao LPS é regulada pelo hipotálamo (XIA & KRUKOFF, 2001).

Além do ACTH foi mostrado que doadores de NO estimulam a liberação de corticosterona. O NO media a resposta aguda ao ACTH, uma vez que uma inibição da NOS bloqueou a estimulação da liberação de corticosterona induzida por ACTH. O doador de NO também estimulou a liberação de PGs, que por sua vez estimulou a liberação de corticosterona pela adrenal *in vitro*. A inibição da COX, conseqüentemente inibição da liberação de PGs, preveniu a liberação de corticosterona pela adrenal *in vitro* induzida tanto por doador de NO como pelo ACTH, sugerindo que as PGs podem agir como mediadores da liberação aguda de corticosterona estimulada por NO ou por ACTH (MOHN *et al.*, 2005).

OT e ANP além de participarem do controle hidroeletrólítico (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005), também são importantes na resposta imune. Tem sido demonstrado um possível papel protetor da OT contra danos oxidativos causados por sepse e pielonefrite aguda e crônica possivelmente por atuar inibindo a infiltração de neutrófilos, bem como inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias (ISERI *et al.*, 2005; BIYIKLI *et al.*, 2006). Parece que o ANP pode atuar como um imunomodulador, uma vez que este hormônio causou inibição da expressão de NOS-II por LPS, além de inibir também a secreção de TNF- α nos macrófagos e atenuar a liberação de IL-1 β . No entanto, o ANP não afetou a secreção das citocinas antiinflamatórias como ocorreu para o antagonista do receptor de IL-1 (IL1ra) e IL-10 (KIEMER & VOLLMAR, 2001; VOLLMAR, 2005).

Os glicocorticóides têm um papel importante na resposta imune por atuarem diminuindo a saída de neutrófilos dos vasos sanguíneos, reduzindo a atividade dos neutrófilos e dos macrófagos, diminuindo a produção de prostanóides, devido à expressão reduzida da COX-2, diminuindo a produção de citocinas (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, TNF- γ), produção de NOS-II e liberação de histamina dos basófilos (BERNE *et al.*, 2000; RANG *et al.*, 2004).

1.3 Objetivo

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar a participação da Angiotensina II sistêmica na regulação da secreção de Vasopressina, Ocitocina, Corticosterona e Peptídeo Natriurético Atrial em ratos submetidos a concentrações subendotóxicas de lipopolissacarídeo bacteriano.

1.3.2 Objetivo Específico

- 1) Estudar os efeitos da administração de LPS (0,1 ou 0,3 mg/Kg) sobre a concentração plasmática de Vasopressina, Ocitocina, Corticosterona e Peptídeo Natriurético Atrial.
- 2) Estudar os efeitos da administração endovenosa de antagonista de receptores AT₁ de Angiotensina II, losartan (10 mg/Kg), sobre a concentração plasmática de Vasopressina, Ocitocina, Corticosterona e Peptídeo Natriurético Atrial em resposta ao LPS (0,1 ou 0,3 mg/Kg).

2 MATERIAL E MÉTODOS

Os protocolos experimentais desta dissertação foram desenvolvidos no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (FMRP/USP), sob a co-orientação do Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues conforme previsto no Projeto: Casadinho.

Para avaliar a participação da angiotensina II sobre a regulação da secreção dos hormônios plasmáticos induzidos por LPS, foi administrado um antagonista de receptores AT₁, losartan (10 mg/Kg, e.v.), 10 min antes de LPS, a secreção desses hormônios foi avaliada 30 min ou 120 min após a administração de LPS nas concentrações de 0,1 ou 0,3 mg/Kg, respectivamente. No dia anterior ao experimento, os animais dos três grupos experimentais (Basal, LPS e Losartan + LPS) receberam um implante cirúrgico de cateter na veia jugular direita.

2.1 Animais

Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar com peso corporal entre 250 – 300 g, provenientes do Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Foram mantidos em gaiolas individuais, com água e ração *ad libidum* em condições ambientais de luz (7:00 h às 19:00 h) e temperatura controlada (22±1°C). Os experimentos foram realizados entre 8:00 h e 10:00 h.

2.2 Implante Cirúrgico de Cateter na Veia Jugular

No dia anterior ao experimento, os animais foram previamente anestesiados com 2,2,2-tribromoetanol (TBE, Aldrich) e submetidos à colocação de uma cânula de silástico na veia jugular externa direita (dow corning corp. med. prod. 0,20 mm x 0,37mm), segundo a técnica descrita por Harms e Ojeda, 1974. A cânula foi introduzida 2,3cm em direção ao átrio

direito e posicionada na junção da veia cava superior e átrio direito. A outra extremidade livre do cateter foi exteriorizada na área interescapular, próximo ao osso occipital, com o auxílio de um trocar. Para evitar a obstrução da cânula, logo após a cirurgia e 4 e 5 horas antes do experimento, a cânula foi lavada com 0,2 ml de salina heparinizada (125 ul/ml).

2.3 Coleta de Sangue

Para as dosagens hormonais de vasopressina, ocitocina, corticosterona e ANP os animais foram sacrificados por decapitação e, logo em seguida, o sangue do tronco foi coletado em tubos de polipropileno, mantidos sob gelo, contendo anticoagulante (10 µl de heparina/ml de sangue). O plasma foi separado por centrifugação a 3000 rpm, durante 15 minutos, em centrífuga refrigerada a 4°C, e em seguida estocado a – 20 °C até o momento de cada dosagem.

2.4 Dosagem de Hormônios Plasmáticos

As dosagens hormonais de AVP, OT, Corticosterona e ANP foram realizadas conforme os Protocolos de Dosagem Radioimunológica de Hormônios do Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo.

2.4.1 Dosagem Plasmática de AVP, OT e ANP por Radioimunoensaio (RIE)

O plasma armazenado a – 70 °C foi utilizado para as dosagens de AVP, OT e ANP plasmático utilizando-se técnicas específicas de RIE para cada hormônio, após as extrações

dos mesmos, segundo as técnicas descritas por Haanwinckel *et al.*, 1995 (AVP e OT) e Gutkowska *et al.*, 1984 (ANP).

A extração dos hormônios AVP e OT foram realizadas 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 no aparelho Speed Vac sendo as amostras estocadas a -20 °C para posterior dosagem por RIE. A extração do ANP foi realizada utilizando-se colunas C-18 (SEP-Column RIK-SEPCOL-1, Península Laboratories), em 1 ml de plasma foi adicionado 2 ml de ácido trifluoroacético (TFA 0,1 %) e após agitação, o sobrenadante foi aplicado na coluna C-18, previamente ativada com 20 ml de solução acetonitrila 60 % em TFA 0,1 %. A eluição foi realizada com 3 ml de solução acetonitrila 60 % e o extrato obtido foi liofilizado e então estocada a - 20 °C.

No dia da realização do RIE, as amostras de AVP e OT foram ressuspensas em 250 µl de tampão AVP ou OT (tampão TRIS 0,05M com albumina humana 0,25 %), sendo que, 100 µl do ressuspensão foi utilizado para o ensaio, em monoplicata. As amostras de ANP foram ressuspensas em 400 µl de tampão ANP (tampão fosfato 0,5 M, pH 7,4, contendo albumina bovina, 0,1 % NaCl 0,05 M, triton X-100 e NaNO₃ 0,01 %), sendo que, 100 µl do ressuspensão foi utilizado para o ensaio, em monoplicata.

No RIE, peptídeos marcados com ¹²⁵I foram utilizados com a contagem de 7000 cpm/100 µl para o ANP, 4000 cpm/100 µl para a OT e 2000 cpm/100 µl para a AVP, o volume final de incubação foi de 500 µl durante quatro dias a 4 °C. Os anti-soros utilizados (primeiro anticorpo de coelho anti-AVP, anti-OT e anti-ANP) foram específicos para os hormônios analisados sem reação cruzada com outros peptídeos. Foi adicionado 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 horas 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 horas 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.

2.4.2 Dosagem Plasmática de Corticosterona por RIE

O plasma armazenado a -70°C foi utilizado para a dosagem de corticosterona plasmática utilizando técnica específica de RIE para este hormônio, após a extração do mesmo, segundo a técnica descrita por Durlo *et al.*, 2004.

A extração de corticosterona foi realizada utilizando 25 μl de plasma, adicionado de 1 ml de etanol P.A. purificado e destilado seguida de agitação contínua (15 segundos) e centrifugação (2500 rpm por 15 min à 4°C), sendo o sobrenadante decantado em um tubo e em seguida as amostras foram liofilizadas no aparelho Speed Vac e estocadas a -20°C para posterior dosagem por RIE.

No dia da realização do RIE, as amostras foram ressuspensas em 2,5 ml de tampão de ensaio RIE esteróides (1 l de tampão fosfato 0,01 M, pH 7,5; 1 g de gelatina (BACTO GELATIN “DIFCO” CERTIFIED) incubado a 40°C por 24 horas e armazenado a -20°C). Foi retirado 500 μl do ressuspensão para o ensaio, em monoplicata. No RIE, foi utilizado 100 μl de corticosterona marcada com trício (^3H -corticosterona), 100 μl de anticorpo anti-corticosterona (preparado no Laboratório de Neuroendocrinologia da FMRP/USP, a partir de coelhos imunizados com hormônios conjugados com globulina bovina, diluição 1:5000) nas amostras desconhecidas, os tubos foram agitados e deixados *overnight*. No dia seguinte a separação das frações livre e ligada são realizada com a utilização da solução de carvão-dextrana 0,5/0,05%. As amostras permaneceram em repouso por 15 min e foram centrifugadas a 2500 rpm por 15 min a 4°C . O sobrenadante foi decantado em tubos contendo 4 ml de coquetel de cintilação (SCINTISAFETM ECONO 1, FISHER SCIENTIFIC SX20-5). A radioatividade foi contada em cpm através do contador de radiação beta (LS 6500 – Beckman, Beckmann Instruments Inc., Fullerton, CA, USA).

2.5 Drogas e Reagentes

As drogas utilizadas nesta pesquisa experimental foram cedidas pelo Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo (FMRP/USP). As drogas foram: LPS, losartan, 2,2,2 - tribromoetanol (TBE 2,5% - 1 ml/100g de peso corporal, Aldrich, Chem, Company, Inc.) injetado por via intraperitoneal, pentabiótico veterinário (Fontoura-Wyeth) injetado subcutaneamente e liquemine foi utilizado como anticoagulante (Heparina, 5000 UI/ml, Roche).

A dose de LPS foi padronizada no Laboratório de Neuroendocrinologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará por Costa (2008), a partir de dados experimentais utilizando protocolos de avaliação do comportamento de ingestão de água e sal em ratos privados de água e alimento por 36 h, no qual foi demonstrado que o LPS (sorotipo EH100, Sigma) causou estimulação dose dependente da secreção de OT no plasma (0,1 e 0,3 mg/Kg) relacionada à inibição do apetite ao sódio sem alteração da reposição de água.

2.5.1 Lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4 (Sigma)

O LPS é um componente da parede celular de bactérias Gram-negativas. Neste experimento, esta endotoxina foi diluída em solução salina isotônica estéril nas concentrações de 0,1 e 0,3 mg/Kg de peso corporal (p.c.) e administrado por via intraperitoneal (i.p.).

2.5.2 Losartan (Sigma)

O losartan é um antagonista dos receptores de ANG II do subtipo 1 (AT₁) (GOODMAN & GILMAN, 2003; RANG, 2004). Neste experimento, este medicamento foi diluído em solução salina isotônica estéril na concentração de 10 mg/Kg p.c. administrado por via endovenosa (e.v.) na veia jugular direita em um volume de 100 µl.

2.5.3 Veículo (Solução salina isotônica estéril - Samtec Biotecnologia)

Foi utilizado como veículo solução salina isotônica estéril (NaCl 0,15M) administrada por via intraperitoneal (i.p., o volume de solução administrada foi de 0,1 ml/100g p.c.) ou por via endovenosa (e.v.) na veia jugular direita em um volume de 100 µl.

2.6 Protocolos Experimentais

Os animais foram submetidos a doses subendotóxicas de LPS (*Escherichia coli*, sorotipo 0111:B4 nas doses de 0,1 e 0,3 mg/Kg p.c. por via i.p.). Em um outro grupo experimental, os animais foram pré-tratados com losartan ou salina via e.v previamente (10 minutos) ao LPS. Obtendo-se os grupos experimentais abaixo:

Tabela 01: Grupos experimentais.

Tratamento	e.v.	i.p.
Basal	NaCl 0,9%	NaCl 0,9%
LPS	NaCl 0,9%	LPS
Losartan + LPS	Losartan	LPS

Protocolo Experimental I – Avaliar a participação da Angiotensina II sistêmica através da utilização do antagonista AT₁ de ANG II, losartan (10 mg/Kg) sobre a secreção de AVP e OT em ratos submetidos a administração de LPS (0,1 mg/Kg).

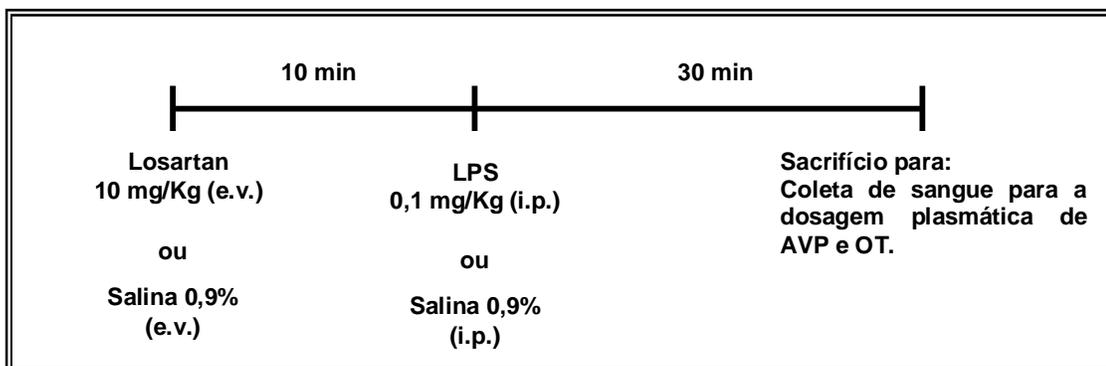


Figura 02: Modelo esquemático do planejamento experimental: participação do losartan (10 mg/Kg) sobre a regulação da secreção dos hormônios neurohipofisários (OT e AVP) associada a administração de LPS (0,1 mg/kg) em animais normohidratados. O período para coleta de sangue neste protocolo foi 30 min após a administração do LPS.

Para a realização deste experimento foram utilizados animais normohidratados divididos em três (3) grupos experimentais: grupo basal (salina + salina) e os grupos tratados (salina + LPS e losartan + LPS). Vinte e quatro horas (24 h) antes do experimento, os animais tiveram a veia jugular direita canulada. Os efeitos de dose subendotóxica induzida pela administração i.p. de LPS (0,1 mg/Kg) na secreção de AVP e OT foram observados: a) com o tratamento; b) 10 min antes, de uma injeção e.v. de losartan (10 mg/Kg, 100 µl); c) 10 min antes de uma injeção e.v. de solução salina estéril (NaCl 0,15M, 100 µl, grupo estimulado com LPS). Os animais foram sacrificados por decapitação 30 min após a administração de LPS ou solução salina estéril, o sangue foi coletado para a dosagem plasmática de hormônios. A administração das drogas foi realizada mantendo os animais dentro de gaiolas individuais.

Protocolo Experimental II – Avaliar a participação da Angiotensina II sistêmica através da utilização do antagonista AT₁ de ANG II, losartan (10 mg/Kg) sobre a secreção de AVP, OT, ANP e corticosterona em ratos submetidos a administração de LPS (0,3 mg/Kg).

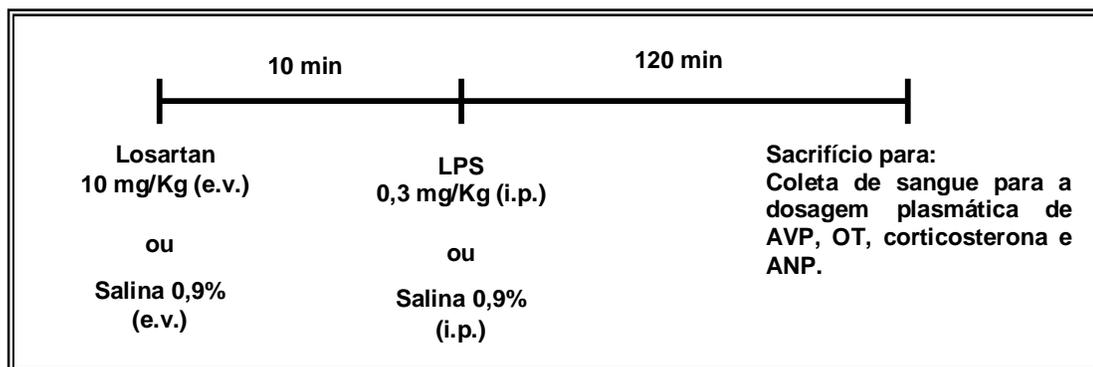


Figura 03: Modelo esquemático do planejamento experimental: participação do losartan (10 mg/Kg) sobre a regulação da secreção dos hormônios neurohipofisários (OT e AVP), corticosterona e ANP associados à administração de LPS (0,3 mg/Kg) em animais normohidratados. O período de para coleta de sangue neste protocolo foi 120 min após a administração do LPS.

Para a realização deste experimento foram utilizados animais normohidratados divididos em três (3) grupos experimentais: grupo basal (salina + salina) e os grupos tratados (salina + LPS e losartan + LPS). Vinte e quatro horas (24 h) antes do experimento, os animais tiveram a veia jugular direita canulada. Os efeitos de dose subendotóxica induzida pela administração i.p. de LPS (0,3 mg/Kg) na secreção de AVP, OT, ANP e corticosterona foram observados: a) com o tratamento; b) 10 min antes de uma injeção e.v. de losartan (10 mg/Kg, 100 µl); c) 10 min antes de uma injeção e.v. de solução salina estéril (NaCl 0,15M, 100 µl, grupo estimulado com LPS). Os animais foram sacrificados por decapitação 120 min após a administração de LPS ou solução salina estéril, o sangue foi coletado para a dosagem plasmática de hormônios. A administração das drogas foi realizada mantendo os animais dentro de gaiolas individuais.

2.7 Análise Estatística

Os resultados são expressos como médias \pm EPM (Erro Padrão da Média) e a significância estatística foi avaliada pelo test t não pareado para confirmação ou negação da hipótese das diferenças entre os grupos experimentais estabelecendo-se como limite de confiança 95% para a desigualdade.

O número de animais por grupo experimental e os valores das médias estão apresentados nas tabelas em Anexo (A a D).

Todas as análises estatísticas foram executadas utilizando Graph Pad Prism 4.

3. RESULTADOS

3.1 Participação da angiotensina na resposta neuroendócrina induzida pela administração de LPS nas doses de 0,1 e 0,3 mg/Kg

Para avaliar a participação da angiotensina II sobre a regulação da secreção dos hormônios plasmáticos induzidos por LPS, foi administrado o antagonista de receptores AT₁, losartan (10 mg/Kg, e.v.), 10 min antes de LPS, a secreção desses hormônios foi avaliada 30 min ou 120 min após a administração de LPS nas concentrações de 0,1 ou 0,3 mg/Kg, respectivamente.

3.1.1 Efeito do LPS sobre a secreção de Ocitocina

Verificou-se que a administração de 0,1 mg/Kg de LPS ou losartan em associação com LPS aumentou a concentração plasmática de ocitocina em 120,3 % e 509,6 %, respectivamente, quando comparado a sua secreção basal. Já a administração de losartan com LPS aumentou em 176,7 % a secreção de ocitocina quando comparado com o grupo estimulado somente por LPS (Figura 04).

A administração de 0,3 mg/Kg de LPS estimulou a secreção plasmática basal de ocitocina em 395,1 %. Potencialização sobre o efeito do LPS ocorreu após sua associação com losartan em cerca de 140 % (Figura 04).

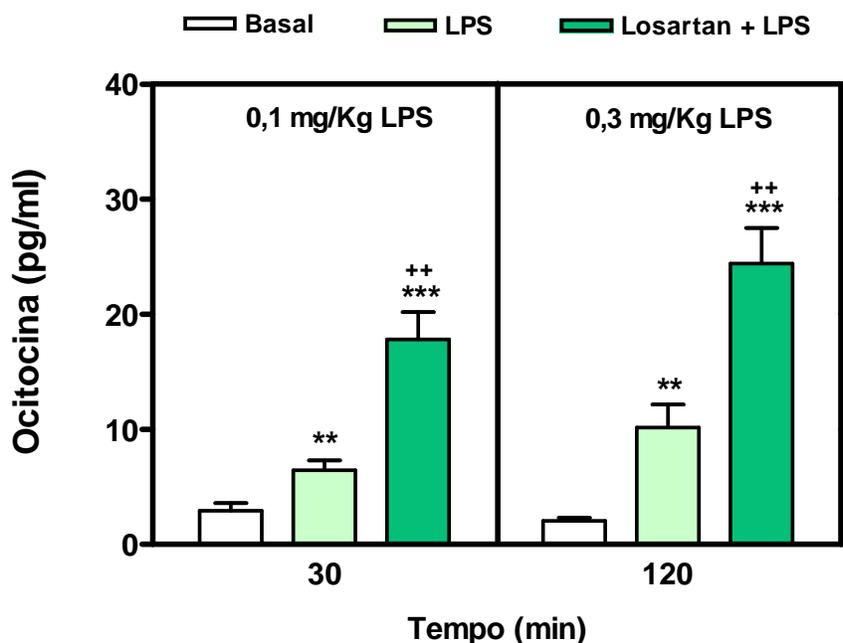


Figura 04: Efeitos da administração de LPS (0,1 e 0,3 mg/Kg) na secreção de ocitocina em ratos pré-tratados com losartan (10 mg/Kg). Os dados são apresentados em médias \pm EPM. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ (tratado versus basal). ++ $p < 0,01$ (tratado versus LPS). O número de animais variou de 3 a 8 por grupo (Test *t*).

Na tabela 02, ilustram-se diferenças nas porcentagens para a ação de LPS e losartan na secreção de ocitocina para comparações entre os grupos LPS e losartan + LPS *versus* basal ou losartan + LPS *versus* LPS com o objetivo de ressaltar a magnitude das respostas obtidas.

Tabela 02: Porcentagens dos efeitos de LPS na secreção de ocitocina basal ou estimulada em associação ou não com losartan.

Porcentagens dos Efeitos de LPS e Losartan sobre a Secreção de Ocitocina			
Condição	Grupos	0,1 mg/Kg de LPS	0,3 mg/Kg de LPS
Basal	LPS	120,3 %	395,1 %
	Losartan + LPS	509,6 %	1089,8 %
LPS	Losartan + LPS	176,7 %	140,3 %

3.1.2 Efeito do LPS sobre a secreção de Corticosterona

Cerca de 330 % de aumento da secreção de corticosterona foi observado após administração de 0,3 mg/Kg de LPS no tempo de 120 min. Em contrapartida 37,6 % desse aumento foi atenuado por sua associação com losartan (Figura 05).

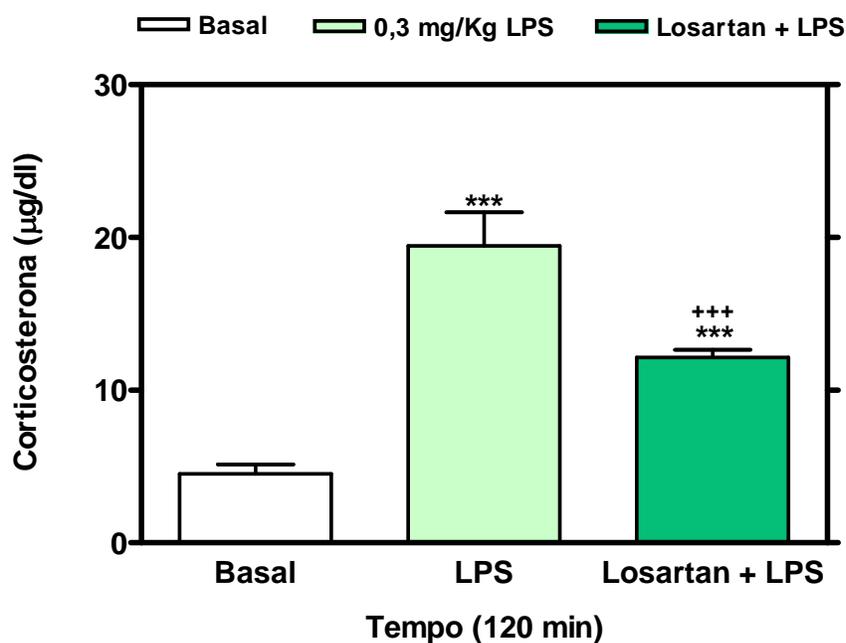


Figura 05: Efeitos da administração de LPS (0,3 mg/Kg) na secreção de corticosterona em ratos pré-tratados com losartan (10 mg/Kg). Os dados são apresentados em médias \pm EPM. *** $p < 0,001$ (tratado versus basal). +++ $p < 0,001$ (tratado versus LPS). O número de animais variou de 6 a 9 por grupo (Test t).

Na tabela 03, ilustra-se diferenças nas percentagens para a ação de LPS e losartan na secreção de corticosterona para comparações entre os grupos LPS e losartan + LPS *versus* basal ou losartan + LPS *versus* LPS com a finalidade de ressaltar a magnitude das respostas obtidas.

Tabela 03: Percentagens dos efeitos de LPS na secreção de corticosterona basal ou estimulada em associação ou não com losartan.

Percentagens dos Efeitos de LPS e Losartan sobre a Secreção de Corticosterona		
Condição	Grupos	0,3 mg/Kg de LPS
Basal	LPS	331,4 %
	Losartan + LPS	169,2 %
LPS	Losartan + LPS	37,6 %

3.1.3 Efeito do LPS sobre a secreção de Peptídeo Natriurético Atrial

A administração de 0,3 mg/Kg de LPS diminuiu em 37,6 % a secreção plasmática de ANP quando comparado com o basal. A associação de losartan + LPS provocou diminuição significativa nos níveis plasmáticos de ANP em cerca de 50 % em relação ao basal ou 24 % em relação ao LPS (Figura 06).

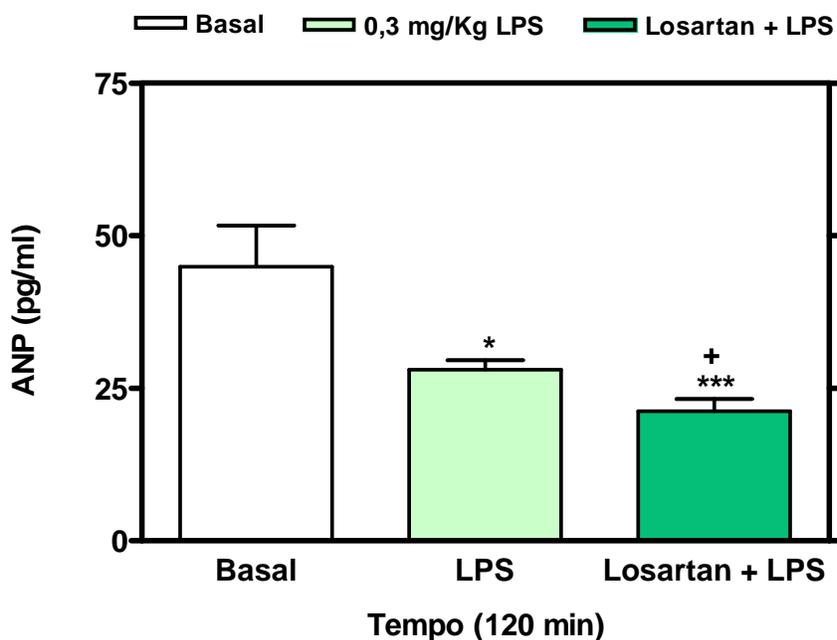


Figura 06: Efeitos da administração de LPS (0,3 mg/Kg) na secreção de ANP em ratos pré-tratados com veículo ou losartan (10 mg/Kg). Os dados são apresentados em médias \pm EPM. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ (tratado versus basal). + $p < 0,05$ (tratado versus LPS). O número de animais variou de 3 a 8 por grupo (Test t).

Na tabela 04, mostra-se as diferenças nas percentagens para a ação de LPS e losartan na secreção de ANP para comparações entre os grupos LPS e losartan + LPS *versus* basal ou losartan + LPS *versus* LPS com o objetivo de ressaltar a magnitude das respostas obtidas.

Tabela 04: Percentagens dos efeitos de LPS na secreção de ANP basal ou estimulada em associação ou não com losartan.

Percentagens dos Efeitos de LPS e Losartan sobre a Secreção de ANP		
Condição	Grupos	0,3 mg/Kg de LPS
Basal	LPS	37,6 %
	Losartan + LPS	52,7 %
LPS	Losartan + LPS	24,2 %

3.1.4 Efeito do LPS sobre a secreção de Vasopressina

A administração de LPS não provocou alterações significativas na secreção plasmática de AVP em quaisquer das condições analisadas (Tabela 05).

Tabela 05: Efeitos da administração de LPS a secreção de vasopressina (pg/ml) basal ou estimulada em associação ou não com losartan. Os valores são expressos como médias \pm EPM. O número entre parêntese refere-se à quantidade de animais por grupo.

Tratamento	LPS 0,1 mg/Kg	LPS 0,3 mg/Kg
Basal	1,5 \pm 0,29 (n = 6)	1,6 \pm 0,28 (n = 8)
LPS	1,5 \pm 0,18 (n = 6)	2,0 \pm 0,59 (n = 8)
Losartan + LPS	1,8 \pm 0,22 (n = 14)	2,5 \pm 0,47 (n = 10)

4. DISCUSSÃO

Este estudo mostrou que a administração sistêmica de LPS promoveu aumento na concentração plasmática de OT, corticosterona e diminuição na liberação plasmática de ANP, porém, sem promover variação significativa sobre a concentração plasmática de AVP. Estes efeitos foram modificados por bloqueio de receptores AT₁ de ANG II, sugerindo um papel modulador da ANG II sistêmica sobre a resposta neuroimunoendócrina ao LPS.

Este estudo mostrou que a administração de LPS nas doses de 0,1 e 0,3 mg/Kg estimulou a secreção plasmática de OT aos 30 min (0,1 mg/Kg) e foi mais intenso aos 120 min (0,3 mg/Kg) de observação. Similar efeito foi observado em nosso laboratório por Costa (2008) usando modelo de privação de água e alimento por 36 h. O LPS (sorotipo EH100) induziu estimulação dose dependente da secreção de OT no plasma (25 a 300 µg/Kg) relacionada à inibição do apetite ao sódio sem alteração da reposição de água.

Nítida diferença de magnitude de resposta secretora favorável à OT em detrimento de AVP estão em acordo com estudos prévios da literatura. Giusti-Paiva *et al.* (2005) verificaram que a secreção de OT foi 12 vezes maior em relação à secreção de AVP em resposta a LPS (1,5 mg/Kg sorotipo O26:B6). Comparativamente às doses subendotóxicas empregadas em nosso estudo, é de se esperar que não tenha ocorrido alteração dos níveis secretórios de AVP dado a redução em pelo menos cinco vezes a concentração de LPS acrescido o fato de que a dose de 1,5 mg/Kg causou diarreia, febre e queda da pressão arterial que seriam possíveis estímulos para a liberação de AVP (GIUSTI-PAIVA, 2004).

Muito embora doses subendotóxicas (5 e 125 µg/Kg) de LPS (sorotipo 055:B5) tenham induzido intensa imunorreatividade nuclear para Fos em neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos no SON e PVN (MATSUNAGA *et al.*, 2000), faixa similar de concentração (0,1 – 0,3 mg/Kg) não apresentou efeito sobre a secreção plasmática de AVP em nosso estudo.

Adicionalmente, Borges *et al.* (2006) mostraram que o LPS (sorotipo 026:B6) além de ter aumentado os níveis plasmáticos de AVP e OT também estimulou a liberação de ACTH e corticosterona. Neste estudo, verificou-se que a lesão eletrolítica da região AV3V reduziu significativamente a imunorreatividade para Fos no PVN e SON e a secreção de AVP e OT estimulada por LPS, determinando que a integridade da região AV3V é parcialmente relevante para atividade neuronal nestes núcleos hipotalâmicos e para a secreção de

hormônios do sistema hipotálamo-neurohipofisário (Borges *et al.*, 2006; CARNIO *et al.*, 2006).

Adicional ao aumento nos níveis de OT e AVP foi observado a interferência moduladora inibitória de NO e CO na secreção destes hormônios estimulada por LPS, significando que apesar da interferência inibidora destes mediadores gasosos a resposta secretora do sistema magnocelular prepondera com nítida potência favorável à liberação de OT (GIUSTI-PAIVA, 2005). Esta diferença de potência secretora pôde também ser observada para outros estudos que usaram doses subendotóxicas de LPS (abaixo de 0,5 mg/Kg) ou por ação de imunomoduladores produzidos em resposta ao LPS.

Pesquisas realizadas por Iseri e colaboradores (2005) demonstram que a OT protegeu o organismo contra danos oxidativos induzido por sepse possivelmente por atuar inibindo a infiltração de neutrófilos no colón e no fígado. Em modelo de pielonefrite aguda e crônica induzida por *Eschericia coli* (ATCC 25922 1010 unidade formadora de colônia/ml) em ratos, foi demonstrada a atenuação do dano oxidativo renal por inibição da infiltração e ativação de neutrófilos, bem como inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias resultante a tratamento com OT (BIYIKLI *et al.*, 2006).

Parece existir um eixo de regulação neuroimunoendócrina com participação efetiva de citocinas que podem estimular a secreção de OT, a qual inibiria a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Assim, como complemento desta hipótese, a administração de IL-1 β (e.v.) estimulou a secreção de AVP e OT de maneira dose-dependente, sendo que a secreção de AVP pode estar na dependência da ação de PGE₂, desde que o emprego de seu antagonista, SC-19220, inibiu a secreção de AVP, mas não de OT induzida por IL-1 β (NAITO *et al.*, 1991). A participação de prostaglandinas na regulação da secreção de OT foi confirmada pelo fato da infusão i.c.v. de PGE₁, PGE₂ ou PGF_{2 α} , e da PGE₂ ter sido a mais potente dos compostos utilizados (KNIGGE *et al.*, 2003).

A histamina seria outro mediador imune com participação efetiva na modulação da secreção de OT e AVP. A infusão central prévia de antagonistas dos receptores H1 e H2 de histamina inibiu em cerca de 50% a resposta da OT as três PGs. A secreção de AVP foi aumentada pela PGE₁, porém não pela PGE₂ ou PGF_{2 α} . O efeito estimulatório da PGE₁ foi quase abolido pela administração prévia de antagonistas do receptor H1 e H2 de histamina. O pré-tratamento com a injeção sistêmica de um inibidor da síntese de PGs (indometacina) reduziu de maneira dose-dependente a resposta da OT e preveniu a resposta de AVP a histamina ou ao LPS. Por conseguinte, a histamina e a PGE₁, PGE₂ ou PGF_{2 α} interagem na regulação da secreção de OT, visto que a histamina e somente a PGE₁ interagem na regulação

da secreção de vasopressina. Portanto, tanto a histamina como o LPS podem afetar neurônios ocitocinérgicos e vasopressinérgicos via ativação de PGs, provavelmente atuando no SON (KNIGGE *et al.*, 2003).

Estudos realizados por Summy-Long *et al.* (2002) demonstraram a participação do NO sobre a secreção de OT. A inibição i.c.v. da NOS aumentou a concentração plasmática de OT, o qual foi atenuado pela inibição da COX, bem como pelo antagonista dos receptores H1 e H2 de histamina, administrados por via i.c.v. Entretanto, o aumento na secreção de OT induzido por IL-1 β (i.c.v.), foi prevenido pela inibição da COX. A PGE₂ e a PGD₂ (i.c.v.) estimularam a liberação de OT, porém, somente a PGD₂ afetou os níveis circulantes de AVP. Dessa forma, inferiu-se que o NO poderia inibir a liberação de OT estimulada por mecanismo dependente de COX, histamina, e possivelmente IL-1 β (SUMMY-LONG *et al.*, 2002). Estas evidências corroboram a hipótese de que mecanismos diferenciados de regulação da secreção de OT e AVP podem ocorrer em resposta ao LPS e que o sistema nitrérgico teria como ação central restringir a secreção desses hormônios.

Nossos resultados mostraram que o losartan promoveu potencialização do efeito do LPS na secreção de ocitocina, sugerindo que a participação dos receptores AT₁ é importante para a regulação neuroimunoendócrina em resposta à infecção induzida por LPS.

Por outro lado, mostramos que a administração de doses subendotóxicas de LPS em nosso modelo experimental não provocou alterações na secreção plasmática de AVP em quaisquer das condições analisadas. Tem sido mostrado que o estresse, o qual não resulta em alterações na volemia ou na osmolalidade plasmática provoca um aumento na secreção de OT, enquanto a secreção de AVP não é alterada (LAGUNA-ABREU *et al.*, 2005 apud LAUAND *et al.*, 2007). De fato, a ausência de alterações na osmolalidade plasmática parece ter relação com estabilidade dos níveis circulantes de AVP desde que em modelo de privação de água e alimento por 36 h, o LPS (0,25-0,3 mg/Kg sorotipo EH100) não causou alterações nos níveis de sódio, potássio ou na osmolalidade plasmática (COSTA, 2008).

Nossos resultados demonstraram que doses subendotóxicas de LPS não estimularam a secreção de AVP, provavelmente porque nessas condições não existiram alterações hemodinâmicas que pudessem ativar mecanismos indutores da síntese desse hormônio, além disso, os animais utilizados nesses experimentos estavam normohidratados, não apresentando, portanto, alterações de osmolalidade plasmática.

Este estudo também mostrou um aumento (330 %) na secreção de corticosterona induzida por 0,3 mg/Kg de LPS. Estudos preliminares mostraram que o LPS (i.v.) induziu um rápido aumento nos níveis plasmáticos de ACTH (McCANN *et al.*, 2000). Por conseguinte,

foi demonstrado que a endotoxina sistêmica induziu a ativação central do eixo neuroendócrino, estimulando a liberação de CRH e AVP nos vasos porta hipofisário em animais conscientes e sem estresse. Adicionalmente, sugeriu-se que neurônios parvocelulares do PVN podem co-sintetizar CRH e AVP (BEISHUIZEN & THIJS, 2003), o que foi confirmado por pesquisas realizadas por Xia & Krukoff (2001) que demonstraram que os neurônios parvocelulares no PVN foram ativados 60 min após a administração do LPS (sorotipo L-4005) em baixas doses, sugerindo que a resposta precoce do ACTH ao LPS pode ser regulada pelo hipotálamo. Giusti-Paiva *et al.*, (2004) observaram que em modelos experimentais que induzem choque endotóxico ocorre um pico na secreção de corticosterona na segunda hora após a administração da endotoxina. Adicionalmente, a administração sistêmica de 500 µg/Kg de LPS induziu a liberação de ACTH e corticosterona (GRION *et al.*, 2007).

O ACTH é o principal estimulador do córtex adrenal, ativando a síntese e secreção de corticosteróides. Tanto o doador de NO (nitroprussiato de sódio) como o ACTH estimulam a liberação de corticosterona. O NO media a resposta aguda ao ACTH, uma vez que a inibição da NOS bloqueou a estimulação da liberação de corticosterona induzida por ACTH. O doador de NO também estimulou a liberação de PGE, a qual por sua vez estimulou a liberação de corticosterona pela adrenal *in vitro*. Além disso, a inibição da COX, e dessa forma a liberação de PGs preveniu a liberação de corticosterona pela adrenal *in vitro* induzida tanto pelo doador de NO como pelo ACTH. Logo as PGs podem agir como mediadores da liberação aguda de corticosterona estimulada por NO ou por ACTH (MOHN *et al.*, 2005).

A administração de anticorpo anti-CRH suprimiu significativamente a resposta do ACTH a IL-1 β . Interessantemente, o anticorpo anti-OT agiu da mesma forma. Além do CRH e da AVP, a OT também pode ter um papel significativo na mediação da secreção de ACTH induzida por IL-1 β em ratos (WATANOBE *et al.*, 1995).

Yamamoto *et al.* (1994a) avaliaram a influência da IL-1 β na liberação de AVP, ANP e ACTH, bem como a regulação da pressão arterial, frequência cardíaca e temperatura retal em modelo experimental utilizando 3 doses de IL-1 β : dose baixa (1,73), dose média (8,63) e dose alta (43,16 pmol/100 g p.c.) administrada por via e.v. em ratos conscientes. Os grupos que receberam dose baixa (1,73), dose média (8,63) e dose alta (43,16 pmol/g p.c.) de IL-1 β aumentaram os níveis plasmáticos de AVP, ANP e ACTH, respectivamente. Tanto a pressão arterial média, como a temperatura retal aumentou no grupo que recebeu a dose mais baixa de IL-1 β , porém não foi observado alteração da frequência cardíaca. Nos grupos que receberam as doses média e alta, a pressão arterial média diminuiu em 30 min seguida por um aumento

em 120 min, acompanhada por uma diminuição na temperatura retal em ambos os grupos. A inibição da COX atenuou os níveis plasmáticos de AVP e ACTH no grupo que recebeu alta dose de IL-1 β , além de inibir a diminuição na pressão arterial média e queda na temperatura retal. Esses resultados sugerem que a IL-1 β afeta a liberação de AVP e ACTH, a pressão arterial e a termogênese via PGs, no entanto a liberação de ANP relacionada a IL-1 β pode não ser mediada pelas PGs (YAMAMOTO *et al.*, 1994a).

Em contrapartida, o aumento nos níveis de corticosterona induzido pelo LPS foi atenuado por sua associação com losartan. Essas considerações preliminares são reforçadas por estudos em que a administração central de ANG II causa estimulação do eixo HHA, resultando em aumento nos níveis plasmáticos de ACTH e, conseqüentemente de cortisol ou corticosterona (PHILLIPS, 1987; MCKINLEY, 2003). Dessa forma, podemos sugerir que o bloqueio do receptor AT₁ atenua os efeitos do LPS dependente de ANG II sobre a ativação do eixo HHA, caso particular da liberação de corticosterona.

A ativação do SRA e do eixo HHA tem um papel importante na resposta de estresse. Agentes estressores ativam componentes neuroendócrinos, que incluem aumento na secreção de adrenalina e noradrenalina do sistema nervoso simpático e medula adrenal, a liberação de CRH e AVP de neurônios parvocelulares na circulação portal, aumento na secreção de OT pela neurohipófise, aumento na secreção de renina pelos rins e posteriormente secreção de ACTH que leva a secreção de glicocorticóides pela adrenal. O pico de secreção de glicocorticóides aparece entre 30 min e 60 min após o contato com o estressor (CARRASCO & VAN DE KAR, 2003). A OT pode aumentar a liberação de ACTH sob certas condições, visto que o ANP atua inibindo a liberação de ACTH por ação direta na hipófise. Os glicocorticóides ao se ligarem em seus receptores presentes no hipotálamo e na adenohipófise inibem a liberação de AVP e CRH, bem como a liberação de ACTH. Além disso, a ANG II, liberada em condições de hipovolemia, esta associada com a liberação de ACTH. Enquanto que o ANP tem efeitos opostos, sendo liberado em condições em que há expansão de volume, atua centralmente inibindo a secreção de AVP e CRH (McCANN *et al.*, 2000).

Em nosso estudo a administração de 0,3 mg/Kg de LPS diminuiu (37,6 %) a secreção plasmática basal de ANP..

Na sepse, o LPS deprime a função cardíaca por induzir a produção de NO e de GMPc, seu segundo mensageiro. Por sua vez, este efeito pode ser reforçado por ANG II, desde que este hormônio estimula a produção de NO e GMPc e pode ser liberado em resposta ao LPS uma diminuição de maneira dose-dependente no acoplamento excitação-contração em cardiomiócitos (SATOSHI & LEW, 1999).

Durante uma infecção, produtos bacterianos e virais, tais como o LPS, promovem a liberação de citocinas pró-inflamatórias de células imunes. (McCANN *et al.*, 2000). A administração sistêmica de LPS (sorotipo 055:B5) provocou a síntese e a liberação de citocinas tais como, a IL-1 β , IL-6, e TNF- α (MATSUNAGA *et al.*, 2000). Sendo importante enfatizar o papel imunomodulador do ANP, visto que o ANP inibiu a expressão de NOS-II induzida por LPS, além de inibir também a secreção de TNF- α nos macrófagos. No entanto, o ANP não afeta a secreção das citocinas antiinflamatórias tais como, o antagonista do receptor IL-1 (IL1ra) e a IL-10 (KIEMER & VOLLMAR, 2001; VOLLMAR, 2005).

Marumo *et al.* (1995) elucidaram o papel dos peptídeos na remodelagem vascular, os efeitos do ANP, peptídeo natriurético cerebral (BNP) e peptídeo natriurético do tipo C (CNP) na indução da NOS-II em células do músculo liso aórtico de ratos. O ANP, BNP e CNP quando administrados sozinhos não induziram a produção de nitrito, no entanto estes peptídeos aumentaram significativamente a produção de nitrito induzida por uma combinação com as citocinas IL-1 α e TNF- α . Cada peptídeo natriurético estimulou de maneira dose-dependente o acúmulo de GMPc intracelular. A produção de nitrito de maneira tempo-dependente pelas citocinas foi aumentada com o co-tratamento com CNP e inibida pelo L-NAME (L^G-nitro-L-arginina metil éster, um inibidor da NOS), indicando a participação da via L-arginina-NO. O aumento na produção de nitrito foi acompanhada por um aumento no mRNA de NOS-II. O análogo do GMPc (8-bromo-cGMP) mimetizou todos os efeitos do CNP. O inibidor da proteína cinase dependente de GMPc (KT5823) aumentou a produção de nitrato e os níveis de mRNA da NOS-II induzido por combinação de 8-bromo-GMPc e ambas as citocinas ou pelas duas citocinas sozinhas. Demonstrando, dessa forma, os efeitos estimulatórios do GMPc na NOS-II induzida por citocina e sugere-se que os peptídeos natriuréticos podem ter um papel regulatório na remodelagem via produção de grande quantidades de NO (MARUMO *et al.*, 1995).

Os doadores de NO (nitroprussiato de sódio e S-nitroso-N-acetilpenicilamina) não aumentaram a formação basal de PGE₂ e nem induziram o mRNA da COX-2 e a proteína COX-2. Entretanto, estes doadores amplificaram a produção de PGE₂ induzida por IL-1 β e potencializaram a expressão do mRNA e da proteína COX-2 induzida por IL-1 β . O efeito estimulatório do NO provavelmente é mediado pelo GMPc, uma vez que o inibidor da adenilato ciclase solúvel (azul de metileno) reverteu o efeito estimulatório dos doadores de NO na expressão do mRNA da COX-2, 8-Br-GMPc mimetizou os efeitos estimulatórios dos doadores de NO na expressão do mRNA da COX-2 e, o ANP, o qual aumenta os níveis de GMPc celular via ativação de guanilato ciclase, também amplificou a expressão do mRNA da

COX-2 induzida por IL-1 β (TETSUKA *et al.*, 1996). Na presença de ANP ocorreu uma redução significativa na liberação de PGE₂ e tromboxano B(2). O ANP atenuou o mRNA e a proteína da COX-2. O ANP atenuou a produção de PGE₂ em macrófagos ativados por LPS predominantemente pela via receptores de clearance de ANP (ANP-C). O ANP reduziu os níveis do mRNA e da proteína COX-2 (KIEMER *et al.*, 2002).

Pesquisas realizadas por Yamamoto *et al.* (1994b) demonstraram que a infusão de L-NAME aumentou significativamente os níveis de AVP plasmática, além de ter aumentado a pressão arterial média e diminuído a frequência cardíaca, porém não alterou os níveis de ANP. A infusão de IL-1 β resultou em aumento na secreção de AVP e ANP plasmático com diminuição na pressão arterial média e temperatura retal, sem alterações na frequência cardíaca. A infusão de L-NAME com IL-1 β , aumentou os níveis hormonais de AVP e ANP plasmático, e a resposta depressora a IL-1 β foi parcialmente atenuada pelo L-NAME, sem qualquer alteração na temperatura retal. Neste modelo experimental o NO pode afetar diretamente a liberação de AVP e ANP e a regulação da temperatura corporal, bem como a pressão arterial, porém o NO formado pela IL-1 β pode não ter um efeito direto na liberação desses hormônios, e na regulação da pressão arterial e temperatura (YAMAMOTO *et al.*, 1994b).

Em nosso estudo a administração de LPS 0,3 mg/Kg causou diminuição significativa dos níveis de ANP no plasma, efeito potencializado após sua associação com losartan (10 mg/Kg). A ação clássica da ANG II sistêmica é ativar neurônios angiotensinérgicos centrais, os quais poderiam ativar áreas hipotalâmicas e extrahipotalâmicas envolvidas com mecanismos estimuladores de sede e ingestão seletiva para sódio (para uma revisão ver FITZSIMONS, 1998). Sua ação ocorre preferencialmente para garantir a reposição de água e sódio a partir de déficits ocasionados por perdas hipotônicas de volume. Assim, a ação da ANG II sempre ocorrerá no sentido de corrigir a hipertonicidade plasmática com reposição hídrica para, em seguida, corrigir déficits de massa total de sódio e potássio (ver ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2005). Esses efeitos são obtidos por ativação de receptores AT₁, os quais podem ser especificamente antagonizados por losartan. Por conseguinte, ações de losartan em animais normohidratados podem estar relacionadas somente ao bloqueio de atividade basal de ANG II ou aquele componente representativo do efeito do LPS, caso ocorra. Dessa forma, sugerimos que o bloqueio destes receptores com o losartan inibe os efeitos angiotensinérgicos, e com isso, propomos que o losartan intensifica a diminuição da secreção plasmática de ANP inibida por LPS.

Nossos resultados mostraram que o bloqueio de receptores AT_1 atenuou a ativação do eixo HHA, potencializou o aumento da secreção de OT e diminuição da secreção de ANP alteradas por LPS. Estes efeitos do LPS não foram acompanhados por alterações significativas na secreção de AVP descartando a participação efetiva desse hormônio na regulação neuroimunoendócrina a doses subendotóxicas de LPS. Estes achados sugerem que a participação de OT e corticosterona nessa condição ocorra por sua relação com o sistema neuroimunoendócrino, onde poderiam estar modulando ações imunossupressoras, o que estabeleceria limites para a resposta imune resultante à endotoxemia. Estudos prévios da literatura mostram que a intensa produção sistêmica de NO poderia explicar a diminuição dos níveis plasmáticos de ANP observados neste modelo experimental, desde que aquele mediador gasoso pode atuar como um agente tônico inibidor da liberação de ANP cardíaco. A inibição aditiva resultante ao bloqueio de receptores AT_1 pode ser explicada por um provável componente estimulante exercido pela ANG II sobre a secreção de ANP.

5. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a administração sistêmica de LPS promoveu aumento na secreção de OT, corticosterona e diminuição na liberação de ANP, sem alterar a concentração de AVP no plasma. Os efeitos desta endotoxina foram mais evidentes aos 120 min sobre a secreção de OT e exclusivos para a secreção de corticosterona e ANP. Além disso, o bloqueio de receptores AT₁ potencializou o efeito estimulante do LPS sobre a secreção de OT e seu efeito inibidor sobre a secreção de ANP. Em contraste, esse bloqueio diminuiu a secreção de corticosterona estimulada por LPS, sugerindo a participação efetiva da ANG II como um modulador neuroimunoendócrino da resposta a endotoxemia bacteriana aqui simulada por administração de doses subendotóxicas de LPS.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ANTUNES-RODRIGUES, J., A.C., MOREIRA, A.C., ELIAS, L.L.K., 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. Cap. 9, p.81-116.

ANTUNES-RODRIGUES, J., A.C., MOREIRA, A.C., ELIAS, L.L.K., 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. Cap. 10, p. 116-135.

ANTUNES-RODRIGUES, J., MOREIRA, A.C., ELIAS, L.L.K., CASTRO, M. Neuroimunoendocrinologia Básica: In: De Laurentiis, A. *et al.* **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 35, p. 563 - 579.

BEISHUIZEN A., THUIS, L.G. Endotoxin and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **J. Endotoxin Res.** v. 9 (1), p. 3-24, 2003.

BERNE, R.M., LEVY, M.N., KOEPPEN, B.M., STANTON, B.A. **Fisiologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. Cap. 51, p. 877-909.

BIYIKLI, N.K., TUGTEPE, H., SENER, G., VELIOGLU-OGUNÇ, A., CETINEL, S., MIDILIOGLU, 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.

BOHLEN, O.V., ALBRECHT, H.D. The CNS renin-angiotensin system. **Cell Tissue Res.** v. 326, p. 599-616, 2006.

BORGES, B.C., CARNIO, E.C., 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**. v.1115, p. 83-91, 2006.

BORGES, B.C., ROCHA, M.J.A. Participation of the subfornical nucleus in hypothalamic-neurohypophyseal axis activation during the early phase of endotoxic shock. **Neuroscience Letters**. vol. 404, p. 227-231, 2006.

CARNIO, E.C., MORETO, V., GIUSTI-PAIVA, A., ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuro-immune-endocrine mechanisms during septic shock: role for nitric oxide in vasopressin and oxytocin release. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders – Drug Targets**. v. 6, p. 7-16, 2006.

CARRASCO, G.A., VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**. v. 463, p. 235– 272, 2003.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**. v. 420 (6917), p. 885-91, 19/26 DEC, 2002.

COSTA, Wanda Silva. **Efeitos do lipopolissacarídeo bacteriano (*E. coli* EH100) sobre a regulação do balanço hidroeletrólítico em ratos desidratados**. 2008. Dissertação (Mestrado em Neurociências e Biologia Celular, Área de Concentração Neurociências) Instituto de Ciências Biológicas/Universidade Federal do Pará, Belém.

DAVISSON, R.L., OLIVERIO, M.I., COFFMAN, T.M., SIGMUND, C.D. Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 106 (1), p. 103-106, JULY 2000.

DE LUCA JR, L.A., SUGAWARA, A.M., MENANI, J.V. Brain versus peripheral angiotensin II receptors in hypovolaemia: behavioural and cardiovascular implications. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.27, p. 437–442, 2000.

DURLO, F.V., CASTRO, M., ELIAS, L.L.K., ANTUNES-RODRIGUES, J. Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. **Exp Physiol**. vol. 89, p. 541–548, 2004.

ELMQUIST, J.K., SCAMMELL, T.E., JACOBSON, C.D., SAPER, C.B. Distribution of Fos-like immunoreactivity in the rat brain following intravenous lipopolysaccharide administration. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 371, p. 85-103, 1996.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiological Reviews**. v. 78 (3), July 1998.

GIUSTI-PAIVA, A., RUGINSK, S.G., CASTRO, M., ELIAS, L.L.K., CARNIO, E.C., ANTUNES-RODRIGUES, J. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. **Neuroscience Letters**. v. 346, p. 21–24, 2003.

GIUSTI-PAIVA, Alexandre. **Interação neuro-imuno-endócrina durante o choque endotóxico**. 2004. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

GIUSTI-PAIVA, A., ELIAS, L.L.K., CARNIO, E.C., 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.

GIUSTI-PAIVA, A., MARTINEZ, M.R., BISPO-DA-SILVA, L.B., SALGADO, M.C.O., ELIAS, L.L.K., ANTUNES-RODRIGUES J. Vasopressin mediates the pressor effect of hypertonic saline solution in endotoxic shock. **Shock**. v. 27 (4), p. 416-421, 2007.

GOODMAN, GILMAN. Renina e Angiotensina. In: Jackson, E.K. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. Cap. 31, p. 609-633.

GOODMAN, GILMAN. Hormônio adrenocorticotrópico; esteróides adrenocorticais e seus análogos sintéticos; inibidores da síntese e das ações dos hormônios adrenocorticais. In: Schimmer B.P., Parker, K.L. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10 ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. Cap. 60, p. 1241-1261.

GRION, N., REPETTO, E.M., POMERANIEC, Y., CALEJMAN, C.M., ASTORT, F., SANCHEZ, R., PIGNATARO, O.P., ARIAS, P., CYMERYNG, C.B. Induction of nitric oxide synthase and heme oxygenase activities by endotoxin in the rat adrenal cortex:

involvement of both signaling systems in the modulation of ACTH-dependent steroid production. **Journal of Endocrinology**. v. 194, p. 11–20, 2007.

GUTKOWSKA, J., THIBAUT, G., JANUSZEWICZ, P., CANTIN, M., GENEST, J. Direct radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 122, p. 593–601, 1984.

HAANWINCKEL, M.A., ELIAS, L.L.K., FAVARETTO, A.L., 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 Sci USA**. v. 92, p. 7902–7906, 1995.

HARBRECHT, B.G., MCCLURE, E.A., SIMMONS, R.L., BILLIAR, T.R. Prostanoids inhibit Kupffer cell nitric oxide synthesis. **Journal of Surgical Research**. v. 58 (6), p. 625–629, JUNE 1995.

HARMS, P.G., OJEDA, S.R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **Journal of Applied Physiology**. v. 36 (3), March 1974.

ISERI, S.O., SENER, G., SAGLAM, B., GEDIK, N., ERCAN, F., YEGEN, B.C. Oxytocin protects against sepsis-induced multiple organ damage: role of neutrophils. **Journal of Surgical Research**. v. 126, p. 73–81, 2005.

KIEMER, A.K., LEHNER, M.D., HARTUNG, T., VOLLMAR, A.M. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. **Endocrinology**. v. 143(3), p. 846–52, MAR 2002.

KIEMER, A.K., VOLLMAR, A.M. The atrial natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. **Ann. Rheum. Dis**. v. 60, p. iii68–iii70, 2001.

KNIGGE, U., KJAER, A., KRISTOFFERSEN, U., MADSEN, K., TOFTEGAARD, C., JORGENSEN, H., WARBERG, J. Histamine and prostaglandin interaction in regulation of oxytocin and vasopressin secretion. **J Neuroendocrinol**. v.15 (10), p. 940–5, OCT, 2003.

LAUAND, F., RUGINSK, S.G., RODRIGUES, H.L.P., REIS, W.L., CASTRO, M., ELIAS, L.L.K., ANTUNES-RODRIGUES, J. Glucocorticoid modulation of atrial natriuretic peptide, oxytocin, vasopressin and Fos expression in response to osmotic, angiotensinergic and cholinergic stimulation. **Neuroscience**. v. 147, p. 247–257, 2007.

LIU, H., TERRELL, M.L., BUI, V., SUMMY-LONG, J. Y., KADEKARO, M. Nitric oxide control of drinking, vasopressin and oxytocin release and blood pressure in dehydrated rats. **Physiology & Behavior**. v. 63 (5), 763-769,1998.

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.

MACHADO, P.R.L., ARAÚJO, M.I.A.S., CARVALHO, L., CARVALHO, E.M. Mecanismos de resposta imune às infecções. **An. Bras. Dermatol.** Rio de Janeiro, v. 79 (6), p. 647-664, NOV/DEZ 2004.

MARUMO, T., NAKAKI, T., HISHIKAWA, K., HIRAHASHI, J., SUZUKI, H., KATO, R., SARUTA, T. Natriuretic peptide-augmented induction of nitric oxide synthase through cyclic guanosine 3',5'-monophosphate elevation in vascular smooth muscle cells. **Endocrinology**. v. 36(5), p. 2135-42, MAY 1, 1995.

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., ANTUNES-RODRIGUES, J., FRANCI, C.R., ANSELMO-FRANCI, J.A., KARANTH, S., RETTORI, V. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 33, p. 1121-1131, 2000.

McKINLEY, M.J., GERSTBERGER, R., MATHAP, M.L., OLDFIELD, B.J., SCHMID, H. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. **Journal of Clinical Neuroscience**. v. 6 (4), p. 289-301, 1999.

McKINLEY, M.J., ALBISTON, A.L., ALLEN, A.M., MATHAI, M.L., MAY, C.N., MCALLEN, R.M., OLDFIELD, B.J., MENDELSON, F.A.O., CHAI, S.Y. The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 35, p. 901–918, 2003.

McKINLEY, M.J., JOHNSON, A.K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol. Sci**. v. 19, p.1-6, 2004.

MOHN, C.E., FERNANDEZ-SOLARI, J., DE LAURENTIIS, A., PRESTIFILIPPO, J.P., DE LA CAL, C., FUNK, R., BORNSTEIN, S.R., McCANN, S.M., RETTORI, V. The rapid release of corticosterone from the adrenal induced by ACTH is mediated by nitric oxide acting by prostaglandin E2. **Proc Natl Acad Sci U S A**. v. 102(17), p. 6213-8, APR 26, 2005.

NAITO, Y., FUKATA, J., SHINDO, K., EBISUI, O., 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(3), p. 1189-95, FEB 14, 1991.

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

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 kB. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 263, p. 570–574, 1999.

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.

RANG, H.P., DALE M.M., RITTER J.M., MOORE P.K. **Farmacologia**. 5^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

ROTH, J., SOUZA, G.E.P. Fever induction pathways: evidence from responses to systemic or local cytokine formation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** v. 34, p. 301-314, 2001.

SAAVEDRA, J.M. Brain and pituitary angiotensin. **Endocrine Rev.** v. 13 (2), p. 329-80, 1992.

SKOTT, O. Body sodium and volume homeostasis. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** v. 285, R14–R18, 2003.

STABILE, A.M., MORETO, V., ANTUNES-RODRIGUES, J., CARNIO, E.C. Participation of the inducible nitric oxide synthase on atrial natriuretic peptide plasma concentration during endotoxemic shock. **Regulatory Peptides.** v. 140, p. 136–141, 2007.

STRICKER, E.M., VERBALIS, J.G. Hydromineral neuroendocrinology: hydromineral neuroendocrinology. **Exp. Physiol.** v. 92 (3), p. 497–498, 2007.

SUMMY-LONG, J.Y., BUI, V., GESTL, S., KADEKARO, M. Nitric oxide, interleukin and prostaglandin interactions affecting the magnocellular system. **Brain Res.** v. 940 (1-2), p.10-20, JUN 14, 2002.

TETSUKA, T., DAPHNA-IKEN, D., MILLER, B.W., GUAN, Z., BAIER, L.D., MORRISON, A.R. Nitric oxide amplifies interleukin 1-induced cyclooxygenase-2 expression in rat mesangial cells. **J Clin Invest.** v. 97 (9), p. 2051-6, MAY 1, 1996.

VOLLMAR, A.M. The role of atrial natriuretic peptide in the immune system. **Peptides.** v. 26, p. 1086-1094, 2005.

WAN, W., JANZ, L., VRIEND, C.Y., SORENSEN, C.M., GREENBERG, A.H., NANCE, D.M. Differential induction of *c-Fos* immunoreactivity in hypothalamus and brain stem nuclei following central and peripheral administration of endotoxin. **Brain Research Bulletin.** v. 32, p. 581-587, 1993.

WATANOBE, H., SASAKI, S., TAKEBE, K. Involvement of oxytocin and cholecystokinin-8 in interleukin-1 beta-induced adrenocorticotropin secretion in the rat. **Neuroimmunomodulation**. v. 2 (2), p. 88-91, MAR-APR 1995.

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.

YAMAMOTO, T., KIMURA, T., OTA, K., SHOJI, M., INOUE, M., OHTA, M., SATO, K., FUNYU, T., ABE, K. Effects of interleukin-1 beta on blood pressure, thermoregulation, and the release of vasopressin, ACTH and atrial natriuretic hormone. **Tohoku J Exp Med**. vol. 173(2), p. 231-45, JUN 1994a.

YAMAMOTO, T., KIMURA, T., OTA, K., SHOJI, M., INOUE, M., OHTA, M., SATO, K., FUNYU, T., ABE, K. Effects of a nitric oxide synthase inhibitor on vasopressin and atrial natriuretic hormone release, thermogenesis and cardiovascular functions in response to interleukin-1 beta in rats. **Tohoku J Exp Med**. vol.174(1), p. 59-69, SEP 1994b.

ANEXO

ANEXO A: Efeitos da administração de LPS (0,1 e 0,3 mg/Kg) na secreção de ocitocina (pg/ml) basal ou estimulada em associação ou não com losartan (10 mg/Kg).

Tratamento	LPS 0,1 mg/Kg	LPS 0,3 mg/Kg
Basal	2.9 ± 0.66 (n = 5)	2,0 ± 0,27 (n = 6)
LPS	6.4 ± 0.86** (n = 3)	10,1 ± 2,00** (n = 6)
Losartan + LPS	17.8 ± 2.37*** ⁺⁺ (n = 6)	24,4 ± 3,10*** ⁺⁺ (n = 8)

Os valores são expressos como médias ± EPM. O número entre parêntese refere-se à quantidade de animais por grupo. ** p<0,01; ***p<0,001 (tratado versus basal). ⁺⁺ p < 0,01 (tratado versus LPS) Test *t*.

ANEXO B: Efeitos da administração de LPS (0,3 mg/Kg) na secreção de corticosterona (µg/dl) basal ou estimulada em associação ou não com losartan (10 mg/Kg).

Tratamento	LPS 0,3 mg/Kg
Basal	4,5 ± 0,63 (n = 6)
LPS	19,4 ± 2,21*** (n = 6)
Losartan + LPS	12,1 ± 0,52*** ⁺⁺⁺ (n = 9)

Os valores são expressos como médias ± EPM. O número entre parêntese refere-se à quantidade de animais por grupo. ***p<0,001 (tratado versus basal). ⁺⁺⁺ p < 0,001 (tratado versus LPS) Test *t*.

ANEXO C: Efeitos da administração de LPS (0,3 mg/Kg) na secreção de ANP (pg/ml) basal ou estimulada em associação ou não com losartan (10 mg/Kg).

Tratamento	LPS 0,3 mg/Kg
Basal	44,9 ± 6,72 (n = 3)
LPS	28,0 ± 1,57* (n = 3)
Losartan + LPS	21,2 ± 1,97*** ⁺ (n = 8)

Os valores são expressos como médias ± EPM. O número entre parêntese refere-se à quantidade de animais por grupo. * p<0,05; ***p<0,001 (tratado versus basal). ⁺ p < 0,05 (tratado versus LPS) Test *t*.

ANEXO D: Efeitos da administração de LPS (0,1 e 0,3 mg/Kg) na secreção de vasopressina (pg/ml) basal ou estimulada em associação ou não com losartan (10 mg/Kg).

Tratamento	LPS 0,1 mg/Kg	LPS 0,3 mg/Kg
Basal	1,5 ± 0,29 (n = 6)	1,6 ± 0,28 (n = 8)
LPS	1,5 ± 0,18 (n = 6)	2,0 ± 0,59 (n = 8)
Losartan + LPS	1,8 ± 0,22 (n = 14)	2,5 ± 0,47 (n = 10)

Os valores são expressos como médias ± EPM. O número entre parêntese refere-se à quantidade de animais por grupo.

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](#)