

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

Michael Brian Santiago

**ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS E
CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O
CHOQUE SÉPTICO INDUZIDO PELA
LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP).**

ALFENAS/MG

2014

MICHAEL BRIAN SANTIAGO

**ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS E
CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O
CHOQUE SÉPTICO INDUZIDO PELA
LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP).**

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutorado em Fisiologia pelo programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.

Área de concentração: Neuroendocrinologia, equilíbrio hidroeletrolítico e cardiorrespiratório.

Orientador: Alexandre Giusti Paiva

ALFENAS/MG

2014

Santiago, Michael Brian.

Alterações neuroendócrinas e cardiorrespiratórias durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) /

Michael Brian Santiago. - 2014.

133 f. -

Orientador: Alexandre Giusti-Paiva.

Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Choque séptico. 2. Arginina vasopressina. 3. Barorreflexo. 4. Óxido nítrico. I. Paiva, Alexandre Giusti. II. Título.

CDD: 616.4

MICHAEL BRIAN SANTIAGO

**ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS E
CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O
CHOQUE SÉPTICO INDUZIDO PELA
LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP).**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor em Fisiologia pelo programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de Alfenas-MG.

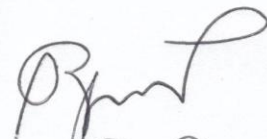
Área de concentração: Neuroendocrinologia, equilíbrio hidroeletrólítico e cardiorrespiratório.

APROVADO EM: 21-03-14

Prof^o. Dr. Alexandre Giusti Paiva

INSTITUIÇÃO: UNIFAL-MG

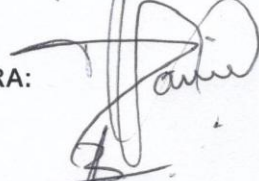
ASSINATURA:



Prof^o. Dr. Daniel Badauê Passos Jr

INSTITUIÇÃO: UFS

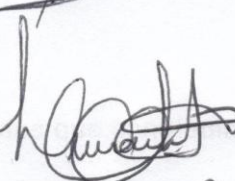
ASSINATURA:



Prof^a. Dr^a. Lisandra Brandino de Oliveira

INSTITUIÇÃO: UFOP

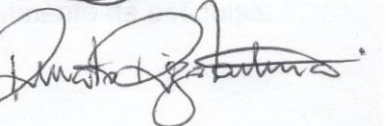
ASSINATURA:



Prof^o. Dr. Luis Carlos Reis

INSTITUIÇÃO: UFRRJ

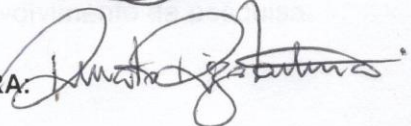
ASSINATURA:



Prof^o. Dr. Renato Rizo Ventura

INSTITUIÇÃO: UNIFAL-MG

ASSINATURA:



Dedico esta tese a todos que contribuíram
para desenvolvimento da pesquisa.

AGRADECIMENTO

À Deus, por sempre colocar as oportunidades em meu caminho e me dar capacidade para transpor as dificuldades.

Aos Parentes, Marcus, Gláucia, Marcus Aurélio, Marta e Ferando por sempre me apoiarem nos momentos importantes durante este período.

A minha namorada, Carla, pelo companheirismo, incentivo, ajuda, em todos os momentos.

A minha filha isabelli, por mudar completamente o meu modo de pensar, agir, sentir e por me tornar uma pessoa ainda mais responsável e comprometida com a minha pesquisa.

Ao meu orientador, Alexandre Giusti, por abrir as portas da pós-graduação para um estudante desconhecido e por toda ajuda prestada durante esses anos de convivência.

Aos pós-doutorados do laboratório, Alexandre Vieira e Fabiana, pela amizade, conselhos, ajuda e dedicação durante esses anos.

Aos professores Dr. José Antunes e Lucila, por disponibilizarem a estrutura do laboratório para realização dos experimentos.

Aos docentes do laboratório, Renato, Jalile, Roseli, Giovanni, Bento pela amizade e ajuda.

Aos técnicos do laboratório, Marina, José, Fátima e Marília, pela amizade e cuidados com os animais.

A todos os colegas de laboratório de alfenas: Mara, Layla, Viviane, Vanessa Cardoso, Luciana, Silvia, Aline, Ana Laura, Fernanda, Laisa, Lidiane, Heloísa, Delcio, Daniel, Bruno, Wesley, Melissa, Adriele, Érika, Daniela, Vanessa pereira, Kriss e de Ribeirão Preto: André, Silvia, Josi, Rodrigo, Milene, Val e Davi pela amizade, bagunças, risadas e discussões científicas.

“O bom mesmo é quando você se permite
A rir até parecer bobo,
E vê que no fim, por mais bobo que tenha parecido,
Bobos foram aqueles que se privaram de sentir”

Rafael Lebre

RESUMO

A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS), culminando com o choque séptico é uma das principais causas de morbidade e mortalidade nas unidades de tratamento intensivo (UTI). Diante disso, a busca por um completo entendimento da fisiopatologia desta SRIS, possibilitando o desenvolvimento de novas terapias, ainda é questão de grande interesse no meio científico. Portanto, o objetivo do trabalho foi verificar as alterações neuroendócrinas e cardiorrespiratórias, identificando as causas, durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura de perfuração cecal (CLP; Cecal ligation and puncture). Durante o choque séptico induzido pela CLP houve um aumento da secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) nas primeiras 4 horas após a cirurgia de CLP quando comparado com grupo controle (Sham), no entanto, 6 horas após a cirurgia de CLP a secreção desses hormônios diminuiu para valores basais apesar da queda da pressão arterial média (PAM) quando comparado com Sham, resultando em um quadro de deficiência da secreção de vasopressina. Angiotensina (ANG II) e peptídeo natriurético atrial (ANP) permaneceram aumentados durante as 6 horas observadas. O tratamento com salina hipertônica (SH) (NaCl 7,5%, 4 ml /kg) 6 horas após o CLP ou Sham, proporcionou aumento na secreção de OT e ANP e queda da concentração plasmática de ANG II, sem diferenças quando comparado ao Sham. A secreção de AVP foi maior durante 10 minutos após a aplicação de SH, restaurando transitoriamente a PAM, no entanto, 30 minutos após, a secreção de AVP permaneceu menor quando comparado com Sham, mesmo com o aumento da osmolalidade (sem diferença entre CLP e Sham). O tratamento intracerebroventricular (i.c.v.) com o bloqueador inespecífico da óxido nítrico sintase (NOS) (L-Name) promoveu aumento da secreção de AVP durante os 30 minutos após a administração de SH no grupo submetido a cirurgia de CLP quando comparado com Sham. Após uma segunda aplicação de SH, 30 minutos após a primeira aplicação, não foi observada diferença na secreção de AVP entre CLP e Sham. Tais resultados evidenciaram que neste quadro de choque séptico experimental a secreção de AVP está sendo bloqueada pela síntese de NO. O tratamento com hidroxietilamido isotônico (HES 4ml/kg; 8 ml/kg; 16 ml/kg) e hipertônico (Hyper-HES, 4 ml/kg) seis horas após a CLP não promoveu diferença na PAM e frequência cardíaca (FC) após 24 horas da cirurgia de CLP. No entanto, imediatamente após administração, o Hyper-HES promoveu

aumento da PAM por 1 hora e aumentou a secreção de AVP e OT 5 minutos após a aplicação. A administração do HES não promoveu aumento da PAM imediatamente após a aplicação e também não alterou a secreção de AVP e OT, exceto a dose 16 ml/kg que promoveu aumento da secreção de OT. O tratamento prévio com antagonista de AVP (V_1), aboliu a resposta pressora desencadeada pela administração de Hyper-HES. Do mesmo modo, o tratamento prévio com antagonista de OT, não alterou as respostas da PAM após aplicação e Hyper-HES e HES, sugerindo que apenas as soluções hipertônicas (cristaloides ou colóides) são eficazes em restabelecer a pressão arterial durante o choque séptico por aumentar a secreção de AVP. Após 24 horas da cirurgia de CLP a PAM permaneceu baixa e sem alterações na FC quando comparado com grupo Sham. Neste mesmo tempo, observamos uma atenuação das respostas barorreflexas e quimiorreflexas acompanhada por um menor número de neurônios positivos para cFOS no núcleo do trato solitário comissural (NTSc) e intermediário (NTSi) após intermitente ativação do quimiorreflexo quando comparado com o grupo Sham, que persiste mesmo restaurando a PAM. O pré-tratamento com L-Name e Aminoguanidina i.c.v. (Ag, bloqueador específico da NOS induzida) promoveram uma atenuação dos déficits da resposta quimiorreflexa. Além do mais, o tratamento com Ag promoveu atenuação da queda no número de neurônios positivos para cFOS (NTSc e NTSi) após intermitente ativação quimiorreflexa, sugerindo o envolvimento do NO na deficiência da resposta quimiorreflexa durante o choque séptico experimental.

Palavras chaves: Choque séptico. Arginina vasopressina. Barorreflexo, Quimiorreflexo. Óxido nítrico.

ABSTRACT

The systemic inflammatory response syndrome (SIRS), culminating in septic shock is a major cause of morbidity and mortality in intensive care units (ICU). Therefore, the search for a complete understanding of the pathophysiology of SIRS, enabling the development of new therapies, it is still a matter of great interest in the scientific community. Therefore, the aim of the study was to assess cardiorespiratory and neuroendocrine changes, identifying the causes, during experimental septic shock induced by cecal ligation and perforation (CLP). During septic shock induced by CLP there is an increased secretion of vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) in the first 4 hours after CLP surgery compared with a control group (Sham). 6 hours after CLP surgery, the secretion of these hormones decreased to baseline and they remained in basal levels despite the fall in blood pressure (BP), resulting in a framework of disability of AVP secretion. Angiotensin (ANG II) and atrial natriuretic peptide (ANP) remained increased during the first 6 hours observed. Treatment with hypertonic saline (HS) (7.5% NaCl , 4 mL / kg), six hours after CLP or Sham, increased in the secretion of OT and ANP and decreased ANG II plasma concentration in CLP and sham groups. The AVP secretion was highest during 10 minutes after application of HS, temporarily restoring BP, however, after 30 minutes, AVP secretion was decreased when compared to Sham, even with increased osmolarity (no difference between sham and CLP). Considering intracerebroventricularly (i.c.v.) treatment of a nonspecific blocker of nitric oxide synthase (NOS) (L-Name) CLP surgery group, compared to sham group, showed a higher secretion of AVP during the 30 minutes after HS. After a second application of HS, 30 minutes after the first application, no difference in secretion of vasopressin between sham and CLP was observed. These results showed that secretion of AVP is being blocked by the NO synthesis in the experimental septic shock. Treatment with isotonic hydroxyethyl starch (HES 4ml/kg, 8 ml/kg, 16 ml/kg) and hypertonic (Hyper-HES, 4 ml/kg) six hours after CLP caused no significant difference in blood pressure and heart rate (HR). 24 hours after CLP surgery, however, immediately after administration, Hyper-HES promoted an increase in BP for 1 hour and increased secretion of AVP and OT 5 minutes after its application. The administration of HES did not increase BP immediately after its application and did not alter the secretion of AVP and OT. Only the dose of 16 ml/kg caused an increase on OT secretion. . Using pretreatment with AVP antagonist (V_1),

but not OT antagonist, it was observed no increase on BP after administration of Hyper-HES, suggesting that only hypertonic solutions (crystalloid or colloid) were effective in restoring blood pressure during septic shock by increasing the secretion of AVP. 24 hours after CLP surgery it was observed a decrease in BP and no change in HR compared to Sham. At this same time, it was observed an attenuation of baroreflex and chemoreflex responses and a smaller number of neurons positive for cFOs after intermittent chemoreflex activation when compared with Sham group, which persists even restoring BP. Pretreatment with L-Name and Aminoguanidine (Ag, specific blocker of induced NOS) promoted an attenuation of the chemoreflex response deficit. Moreover, treatment with Ag promoted attenuation of the fall in the number of neurons positive for cFos after intermittent chemoreflex activation, suggesting the involvement of NO in chemoreflex response deficit during experimental septic shock.

Key words: Septic shock. Arginine vasopressin. Baroreflex. Chemoreflex. Nitric oxide.

LISTRA DE ABREVIATURAS

ACTH -	Hormônio adrenocorticotrófico.
Ag -	Aminoguanidina.
ANG -	Angiotensina.
ANP -	Peptídeo natriurético atrial.
Ant -	Antagonista.
AVP -	Arginina vasopressina.
Car -	Carbacol.
CLP -	Ligadura e perfuração cecal.
ECA -	Enzima conversora de angiotensina.
eNOS -	Óxido nítrico sintase endotelial.
FC -	Frequência cardíaca.
Fr -	Frequência respiratória.
Glu -	Glutamato.
Hct -	Hematócrito.
HES -	Hidroxietilamido isotônico.
Hyper-HES -	Hidroxietilamido hipertônico.
i.p. -	Intraperitoneal.
i.v. -	Intravenoso.
IL-1 -	Interleucina-1.
IL-6 -	Interleucina-6.
KCN -	Cianeto de potássio.
L-Name -	N ω -Nitro-L-arginina metil éster HCl.
LPS -	Lipopolissacarídeo.
NaCl -	Cloreto de sódio.
NE -	Noraepinefrina.
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal.
NO -	Óxido nítrico.
NOS -	Óxido nítrico sintase.
NOSi -	Óxido nítrico sintase induzida.
NPS -	Nitroprussiato de sódio.
NTS -	Núcleo do trato solitário.
NTSc -	Núcleo do trato solitário comissural.
NTSi -	Núcleo do trato solitário intermediário.

OT -	Ocitocina.
PA -	Pressão arterial.
PAM -	Pressão arterial média.
P _{o2} -	Pressão parcial de dióxido de carbono.
P _{co2} -	Pressão parcial de oxigênio.
Phe -	Fenilefrina.
PVN -	Núcleo paraventricular.
RVLM -	Bulbo ventrolateral rostral.
SH -	Salina hipertônica.
Sham -	Grupo controle.
SI -	Salina isotônica.
SNC -	Sistema nervoso central.
SON -	Núcleo supraóptico.
SRA -	Sistema renina-angiotensina.
TNF- α -	Fator de necrose tumoral α .
UTI -	Unidade de tratamento intensivo.
VL -	Ventrículo lateral.

LISTRA DE FIGURAS

Figura 1: Foto representativa de uma microinjeção no bulbo ventrolateral rostral (RVLM).....	42
Figura 2: Queda da pressão arterial média (PAM) nos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) quando comparado ao grupo com cirurgia fictícia (Sham).....	57
Figura 3: Frequência cardíaca (FC) dos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham).....	58
Figura 4: Concentração plasmática de vasopressina 6 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	58
Figura 5 Osmolalidade plasmática dos animais submetidos ao choque séptico pela cirurgia de CLP ou grupo controle.....	59
Figura 6: Concentração plasmática de vasopressina e ocitocina após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou Sham sobre a concentrações plasmáticas de vasopressina e ocitocina.	60
Figura 7: Concentração plasmática de ANP e ANG II após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou Sham sobre a concentrações plasmáticas de ANP e ANG II.....	61
Figura 8: Efeito da administração de salina isotônica (SI; NaCl 0,9%; i.v.) e hipertônica (SH; NaCl 7,5%; i.v.) sobre a ingestão de água após a cirurgia fictícia (Sham) ou cirurgia de ligadura de perfuração cecal (CLP)... ..	62
Figura 9: Concentração plasmática de vasopressina e ocitocina após a administração de salina hipertônica (NaCl 7,5%; i.v.) em animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham	63
Figura 10: Concentração plasmática de ANP e ANG II após a administração de salina hipertônica (NaCl 7,5%; i.v.) em animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham.	64
Figura 11: Efeito da administração de L-Name i.c.v. (250µg/2µl) sobre a concentração plasmática de vasopressina 5 e 30 minutos após a salina hipertônica (NaCl 7,5%; i.v.) seis horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).	65

Figura 12: Efeito da administração prévia de L-Name i.c.v. 30 minutos antes da infusão de salina hipertônica (SH; NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v) sobre alterações de pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal	65
Figura 13: Efeito da administração da segunda dose de salina hipertônica (NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) 30 minutos após a primeira aplicação sobre a osmolalidade plasmática em ratos submetidos a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	66
Figura 14: Efeito da administração da segunda dose de salina hipertônica (NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) 30 minutos após a primeira aplicação sobre a concentração plasmática de vasopressina em ratos submetidos a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	66
Figura 15: Efeito sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) após duas aplicações de salina hipertônica (NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) em ratos submetidos a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	67
Figura 16: Efeito sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) após duas aplicações de salina hipertônica (NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) em ratos submetidos a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	68
Figura 17: Alteração do sódio plasmático após administração de hidroxietilamido (HES) 6% isotônico (Nacl 0,9%; 4ml/kg; 8ml/kg; 16ml/kg; i.v.) e hipertônico (Hyper-HES; Nacl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) nos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP).....	68
Figura 18: Alteração da osmolalidade plasmática após administração de hidroxietilamido (HES) 6% isotônico (Nacl 0,9%; 4ml/kg; 8ml/kg; 16ml/kg; i.v.) e hipertônico (Hyper-HES; Nacl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) nos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP).....	68
Figura 19: Alteração do hematócrito após administração de hidroxietilamido (HES) 6% isotônico (Nacl 0,9%; 4ml/kg; 8ml/kg; 16ml/kg; i.v.) e hipertônico (Hyper-HES; Nacl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) nos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP).....	69

- Figura 20: Efeito da administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/Kg sobre a frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP)..... **69**
- Figura 21: Efeito agudo (no momento da aplicação) da administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/Kg sobre a pressão arterial média (PAM) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP)..... **70**
- Figura 22: Efeito agudo (no momento da aplicação) da administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/Kg sobre a frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP)..... **71**
- Figura 23: Concentração plasmática de ocitocina cinco minutos após a administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/kg durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP)..... **71**
- Figura 24: Concentração plasmática de vasopressina cinco minutos após a administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/kg durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP)..... **72**
- Figura 25: Efeito da administração prévia do antagonista de vasopressina (Ant. V1; i.v.) e ocitocina (Ant. OT; i.v.) após expansão com hidroxietilamido 6% hipertônico (Hyper-HES; 4ml/kg; NaCl 7,5%; i.v.) sobre pressão arterial média (PAM) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP)..... **72**
- Figura 26: Efeito da administração prévia do antagonista de vasopressina (Ant. V1; i.v.) e ocitocina (Ant. OT; i.v.) após expansão com hidroxietilamido 6% hipertônico (Hyper-HES; 4ml/kg; NaCl 7,5%; i.v.)

sobre frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP).....	73
Figura 27: Efeito da administração prévia do antagonista de ocitocina (Ant. OT; i.v.) após expansão com hidroxietilamido 6% isotônico (HES) 16 ml/kg i.v. sobre a pressão arterial média (PAM) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP)	73
Figura 28: Efeito da administração prévia do antagonista de ocitocina (Ant. OT; i.v.) após expansão com hidroxietilamido 6% isotônico (HES) 16 ml/kg i.v. sobre a pressão arterial média (PAM) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP)	74
Figura 29: Efeito da administração de cianeto de potássio (40µg/0,1ml; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e frequência respiratória (Fr; C) 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham) em ratos.....	75
Figura 30: Efeito da administração de fenilefrina (5µg/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham) em ratos.....	75
Figura 31: Efeito da administração de nitroprussiato de sódio (30µg/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham) em ratos.....	76
Figura 32: Efeito da administração de L-NAME i.c.v. (250µg mg/2µl) sobre a pressão arterial média (PAM) 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham) em ratos.....	76
Figura 33: Efeito da administração do cianeto de potássio (40µg/0,1ml; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e frequência respiratória (Fr; C) 30 minutos após aplicação de L-NAME ic.v. 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham) em ratos.....	77
Figura 34: Efeito da administração de fenilefrina (5µg/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 30 minutos após aplicação de L-NAME ic.v. 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham) em ratos.....	77
Figura 35: Efeito da administração de nitroprussiato de sódio (30µg/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 30	

minutos após aplicação de L - NAME i.c.v. 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham) em ratos.....	78
Figura 36: Efeito da administração de L-NAME (20mg/kg;i.v.) e infusão contínua de Fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).....	78
Figura 37: Efeito da administração de cianeto de potássio (40µg/0,1ml;i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e frequência respiratória (Fr; C) após restauração da PAM com L-NAME (20mg/kg;i.v) ou infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).....	79
Figura 38: Efeito da administração de fenilefrina (5µg/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) após restauração da PAM com L-NAME (20mg/kg;i.v) ou infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).....	79
Figura 39: Efeito da administração de nitroprussiato (30µg/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) após restauração da PAM com L-NAME (20mg/kg;i.v) ou infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).....	80
Figura 40: Avaliação da sensibilidade barorreflexa 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos com pressão arterial média restaurada com L-NAME (20mg/kg;i.v) ou infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.).....	80
Figura 41: Efeito da administração de angiotensina II (ANG II; i.c.v.; 50ng/µl) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC;B) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	81
Figura 42: Efeito da administração angiotensina II (ANG II; i.c.v.; 50ng/µl) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM) após restauração da PAM com infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).....	81
Figura 43: Efeito da administração Carbachol (Car; i.c.v.; 0,5nmol/ µl) ou salina	

sobre as alterações da pressão arterial média (PAM) após restauração da PAM com infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).....	81
Figura 44: Efeito da administração Carbachol (Car; i.c.v.; 0,5nmol/ µl) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM) após restauração da PAM com infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).....	82
Figura 45: Efeito da administração de glutamato (Glu; 0,5nmol/ µl) ou salina na área RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	82
Figura 46: Efeito da administração de glutamato (Glu;0,5nmol/ µl) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM) após restauração da PAM com infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75µg/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP).....	83
Figura 47: Efeito da administração de cianeto de potássio (40µg/0,1ml;i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e frequência respiratória (Fr; C) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	84
Figura 48: Efeito do pré-tratamento com L-Name (20mg/kg; i.p.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC, B) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	85
Figura 49: Efeito do pré-tratamento com L-Name (20mg/kg; i.p.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC, B) e frequência respiratória (Fr; C) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	86
Figura 50: Efeito do pré-tratamento com aminoguanidina (10mg/kg; i.p.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC, B) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham)	87
Figura 51: Efeito do pré-tratamento com aminoguanidina (10mg/kg; i.p.) ou salina	

sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC, B) e frequência respiratória (Fr; C) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	88
Figura 52: Efeito do pré-tratamento com L-Name (i.c.v. 250µl/2µl), ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC, B) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	89
Figura 53: Efeito do pré-tratamento com L-Name (250µmg/2µl; i.c.v.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC, B) e frequência respiratória (Fr; C) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).	89
Figura 54: Efeito do pré-tratamento com aminoguanidina (Ag; i.c.v. 250µl/2µl), ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC, B) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).	90
Figura 55: Efeito do pré-tratamento com aminoguanidina (Ag; 250µg/2µl; i.c.v.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC, B) e frequência respiratória (Fr; C) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	91
Figura 56 Fotomicrografias representativas de cortes do bulbo de células positivas para FOS do núcleo trato solitário comissural de animais submetidos a intermitente ativação do quimiorreflexo pela administração de cianeto de potássio (KCN; 40µg/0,1; i.v.) ou salina, 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham). CC: Canal central.....	92
Figura 57: Números de neurônios ativados no núcleo do trato solitário comissural de animais submetidos a intermitente ativação do quimiorreflexo pela administração de cianeto de potássio (KCN; 40µg/0,1; i.v.) ou salina, 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham).....	92
Figura 58: Fotomicrografias representativas de cortes do bulbo de células positivas para FOS do núcleo trato solitário intermediário de animais	

submetidos a intermitente ativação do quimiorreflexo pela administração de cianeto de potássio (KCN; 40µg/0,1; i.v.) ou salina, 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou ciru grupo controle (Sham). CC: Canal central..... **93**

Figura 59: Números de neurônios ativados no núcleo do trato solitário intermediário de animais submetidos a intermitente ativação do quimiorreflexo pela administração de cianeto de potássio (KCN; 40µg/0,1; i.v.) ou salina, 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham). **93**

SUMARIO

1.0	INTRODUÇÃO	26
1.1	RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	28
1.2	RESTAURAÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL UTILIZANDO EXPANSORES DE VOLUME DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	32
1.3	RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	35
2.0	OBJETIVOS	38
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
2.1.1	Análise das alterações neuroendócrinas após aplicação de salina hipertônica durante o choque séptico	38
	Efeito da expansão de volume sanguíneo com hidroxietilamido (HES) 130/0,4 durante o choque séptico	38
2.1.2	Análise das alterações cardiorrespiratórias durante o choque séptico	38
2.1.3	Avaliação da resposta quimiorreflexa após ativação pela administração de cianeto de potássio (KCN) durante o choque séptico	39
2.1.4	METODOLOGIA	40
3.0	METODOLOGIA	40
3.1	ANIMAIS.....	40
3.2	CIRURGIAS.....	40
3.2.1	Canulação da veia jugular	40
3.2.2	Canulação da artéria e veia femoral	41
3.2.3	Ligadura e perfuração cecal	41
3.2.4	Estereotáxia	42
3.3	INJEÇÃO DAS DROGAS NO CÉREBRO.....	42
3.4	HISTOLOGIA DO CÉREBRO.....	43
3.5	MEDIDA INVASIVA DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA.....	43
3.6	PLETISMOGRAFIA.....	43
3.7	DOSAGEM HORMONAL.....	44
3.8	DOSAGEM DA OSMOLARIDADE PLASMÁTICA.....	45
3.9	IMUNOHISTOQUÍMICA.....	45
3.10	ANÁLISE DA ESTATÍSTICA.....	46
4.0	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	47

4.1	CHOQUE SÉPTICO INDUZIDO PELA LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP) X GRUPO CONTROLE (SHAM).....	47
4.1.1	Determinação da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	47
4.2	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES HORMONAIS APÓS A APLICAÇÃO DE SALINA HIPERTÔNICA DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	47
4.2.1	Determinação das concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, peptídeo natriurético atrial (ANP), angiotensina II (ANG II) e osmolalidade plasmática durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	47
4.2.2	Avaliação das concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, ANP, ANG II e osmolalidade plasmática após um estímulo osmótico com Salina hipertônica (SH) durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	48
4.2.3	Avaliação do efeito do L-Name (250µg/2µl; i.c.v.) após um estímulo osmótico com SH sobre a concentração plasmática de vasopressina e osmolalidade plasmática durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	48
4.2.4	Avaliação do efeito do L-Name (250µg/2µl; i.c.v.) após um estímulo osmótico com SH sobre PAM e FC durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	49
4.2.5	Avaliação da concentração plasmática de vasopressina e osmolalidade plasmática após dois estímulos osmóticos com SH durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	49
4.2.6	Avaliação da PAM e FC após dois estímulos osmóticos com SH durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	49
4.3	EFEITO DA EXPANSÃO COM HIDROXIETILAMIDO (HES) 130/0,4 DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	50
4.3.1	Avaliação da concentração plasmática de vasopressina, ocitocina, osmolalidade, sódio plasmático e hematócrito após a expansão sanguínea com hidroxietilamido 6% isotônico (HES) e hipertônico (Hyper-HES) durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	50
4.3.2	Avaliação da PAM e FC após a expansão sanguínea com hidroxietilamido 6% isotônico (HES) e hipertônico (Hyper-HES) durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	51

4.3.3	Avaliar a participação de vasopressina e ocitocina na alteração da PAM após a expansão com HES e Hyper-HES durante o choque séptico.....	51
4.4	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	51
4.4.1	Avaliação das alterações no baro e quimiorreflexo vinte e quatro horas após o choque séptico induzido por CLP.....	52
4.4.2	Avaliação da sensibilidade barorreflexa durante o choque séptico.....	52
4.4.3	Avaliação do efeito do L-Name (250µg/2µl; i.c.v.) após administração de KCN, Phe e NPS sobre PAM e FC durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	52
4.4.4	Avaliação da ANGII (i.c.v.; 50ng/µl) e Carbacol (Car; i.c.v.; 0,5nmol/µl) nas alterações da PAM e FC 24 horas após o choque séptico induzido por CLP.....	53
4.4.5	Avaliação do efeito de glutamato (Glu; 10 nmol/0,1µl) na área do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) nas alterações da PAM e FC 24 horas após choque séptico induzido por CLP.....	53
4.4.6	Restauração da PAM durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	53
4.5	AVALIAÇÕES DAS ALTERAÇÕES DA RESPOSTA QUIMIORREFLEXA EM DIFERENTES TEMPOS APÓS O CHOQUE SÉPTICO.....	54
	Avaliação das alterações do quimiorreflexo em diferentes tempos após o	
4.5.1	choque séptico induzido por CLP.....	54
4.5.2	Avaliação dos neurônios positivos para c-Fos no NTS após ativação intermitente com KCN durante o choque séptico experimental.....	54
	Avaliação do efeito do pré-tratamento com L-Name (20mg/kg; i.p.) ou aminoguanidina (Ag; 10mg/kg; i.p.) após administração de KCN sobre PAM e FC durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	54
4.5.3	Avaliação do efeito do pré-tratamento com L-Name (250µg/kg; i.c.v.) ou aminoguanidina (Ag; 250µg/kg; i.c.v.) após administração de KCN, Phe e NPS sobre PAM e FC durante o choque séptico experimental induzido por CLP.....	55
4.5.4	Efeito do pré-tratamento com Ag i.c.v. sobre os neurônios positivos para c-Fos no NTS após ativação intermitente com KCN durante o choque séptico experimental.....	56

5.0	RESULTADOS	57
5.1	CHOQUE SÉPTICO INDUZIDO PELA LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP) X GRUPO CONTROLE (SHAM).....	57
5.2	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	59
5.3	EFEITO DA EXPANSÃO COM HIDROXIETILAMIDO (HES 130/0,4 DURANTE O CHOQUE SÉPTICO)	67
5.4	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	74
5.5	AVALIAÇÕES DO QUIMIORREFLEXO ATIVADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE CIANETO DE POTÁSSIO (KCN) DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	83
6.0	DISCUSSÃO	94
6.1	HIPOTENSÃO DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	94
6.2	ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES DAS ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	96
6.3	ANÁLISE DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE SALINA HIPERTÔNICA (NACL 7,5%, 4ML/KG, I.V.) DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.	97
6.4	EFEITO DA EXPANSÃO COM HIDROXIETILAMIDO 130/0,4 ISOTÔNICO (HES) E HIPERTÔNICA (HYPER-HES) DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	99
6.5	ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.....	102
7.0	CONCLUSÃO	107
	REFERÊNCIAS	108

1 INTRODUÇÃO

A manutenção da constância do meio interno dos organismos vivos, dentro de parâmetros relativamente estreitos, denominada homeostase, é condição essencial para a preservação da vida nas diferentes espécies. O volume, a pressão, e a composição eletrolítica do líquido extracelular devem ser mantidos dentro de estreitos limites de variação (ANTUNES-RODRIGUES, et al. 2004). Alguns agentes, principalmente externos (agente estressor), podem perturbar a homeostase do meio interno, gerando uma situação denominada de estresse. Durante o estresse, o organismo promove a ativação de alguns sistemas de controle (denominados genericamente de carga alostática), a fim de retornar às condições de equilíbrio. Esta nova situação em que o organismo apresenta-se em equilíbrio apesar da presença do agente estressor é denominado alostase (MCEWEN, 2000; MCEWEN; SEEMAN, 1999; MCEWEN, 2007). Entre os sistemas fisiológicos envolvidos no retorno do organismo a uma situação de equilíbrio, destaca-se o sistema nervoso, endócrino e o sistema imune.

A resposta do organismo é diferente para os diversos agentes estressores, implicando em uma variedade na magnitude de ativação de cada sistema (CHROUSOS, 1998). O sistema endócrino tem uma importante função na manutenção da homeostase em diversas situações de estresse, incluindo na sepse.(BERTOK, 1998).

A sepse apresenta alta prevalência em hospitais, particularmente em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs). Mais de 500.000 pacientes são acometidos por sepse a cada ano nos Estados Unidos. Apenas 55 a 65% desses sobrevivem (RUSSEL; WALLEY; SINGER, 2008; SCHOENBERG; WEISS; RADERMACHER, 1998; WHEELER; BERNARD, 1999). A incidência de sepse vem aumentando, provavelmente, em decorrência do maior emprego de terapias imunossupressoras e de métodos diagnósticos e terapêuticos cada vez mais agressivos (GIUSTI-PAIVA; SANTIAGO, 2010)

O prognóstico em longo prazo também é ruim. Apenas 30% dos pacientes que recebem alta do hospital sobrevivem após o primeiro ano (SCHOENBERG; WEISS; RADERMACHER, 1998). O manejo de pacientes com sepse, sepse grave e choque séptico requer abordagem combinada, empregando medidas diagnósticas rigorosas, introdução rápida de antibióticos eficazes e tratamento de suporte (BOCHUD; GLAUSER; CALANDRA, 2001; DELLINGER, et al. 2008; HOTCHKISS; KARL, 2003; WHEELER; BERNARD, 1999).

O choque séptico, a instância mais grave da sepse, é definido como estado de hipoperfusão e/ou disfunção orgânica causado por agente infeccioso, que cursa com hipotensão refratária a expansão volêmica adequada e conduz à necessidade de agentes vasopressores (BONE; SIBBALD; SPRUNG, 1992; MUCKART; BHAGWANJEE, 1997).

O tratamento antimicrobiano permanece como arma principal para pacientes com choque séptico, não substituindo, contudo, a necessidade premente de drenagem de abscessos e de remoção de corpo estranho e tecido necrótico, quando presentes (BOCHUD; GLAUSER; CALANDRA, 2001). O tratamento de suporte tem como base a reposição vigorosa de fluidos. Em seguida, os vasopressores são os agentes mais relevantes no suporte hemodinâmico desses pacientes (BALK, 2004; HOTCHKISS; KARL, 2003; WHEELER; BERNARD, 1999).

A ligadura e perfuração do ceco (CLP; Cecal ligation and puncture) é um modelo experimental bastante utilizado para mimetizar o quadro de sepse e choque séptico. O modelo de injúria com liberação da flora bacteriana é o que mais se assemelha ao quadro de sepse em humanos, decorrente de traumas com perfurações das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Nesse modelo, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico (BROOKS, et al. 2007). Apesar de esse modelo experimental estar mais próximo a um quadro clínico e, por isso, ser um modelo mais adequado para o estudo da sepse/choque séptico, a maioria dos estudos experimentais baseiam-se em modelos nos quais a bactéria ou o LPS são administrados i.v ou i.p. Dados da literatura têm demonstrado que a patogênese da sepse, causada pela administração de LPS ou de bactérias i.v., difere daquela induzida por um foco infeccioso, como acontece em uma peritonite. A diferença dos resultados obtidos entre esses modelos é devido à intensidade do estímulo, ao local de indução e à forma de administração (em *bolus* ou liberação gradativa), induzindo uma cinética distinta de liberação dos mediadores inflamatórios (WALLEY, et al. 1996). A partir desses fatos, a utilização do modelo CLP para o estudo da sepse/choque séptico, descrito inicialmente por Wichtermann et al. (1980), apresenta maior relevância para a compreensão da evolução da doença.

A sepse resulta de uma descompensação hemodinâmica decorrente de presença de agentes infecciosos e mediadores inflamatórios na circulação sangüínea, levando a má distribuição do fluxo sangüíneo na microcirculação. (HOLLENBERG, et al. 2004).

A produção de citocinas pode ser observada no estabelecimento, manutenção e controle de diversas funções fisiológicas como sono, ovulação e exercícios. Entretanto, durante o desenvolvimento de um processo inflamatório/infeccioso a produção dessas citocinas apresenta-se extremamente elevada (TURNBULL; RIVIER, 1996). Foi descrito que em resposta a um estímulo inflamatório/infeccioso, como por exemplo, o induzido pela administração de LPS, o sistema imune desencadeia a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (RAMACHANDRA, et al. 1992). Estes estimulam uma intensa resposta celular, com liberação de células do sistema imune (LICINIO; FROST, 2000). Esta atividade

do sistema imune é sinalizada para o sistema nervoso central (SNC) que desencadeia algumas respostas tais como febre, alterações comportamentais e alterações neuroendócrinas como, por exemplo, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, redução da atividade dos eixos hipotálamo-hipófise-tireóide e hipotálamo-hipófise-gonadal, resultando em modificações nas concentrações plasmáticas de vários hormônios (RIVIER, 2003; KARCH, et al. 2002; WILLIAMS, et al. 2001; BATTAGLIA, et al. 1997, 1998, 2000; WATANOBE; HAYAKAWA, 2003; MANDRUP-POULSEN, et al. 1996; RETTORI, et al. 1991, 1987; RIVEST, et al. 1993; RIVEST; RIVIER, 1993 a,b,c; PEETERS, et al. 2003; YAMASHITA, et al. 1989; SATO, et al. 1990; TUMBULL; RIVIER, 1999; PHELPS, et al. 2001).

Apesar de recentes avanços, a busca por um completo entendimento da fisiopatologia do choque séptico, possibilitando o desenvolvimento de novas terapias, ainda é questão de grande interesse no meio científico (BUWALDA; INCE, 2002; PINSKY; PAYEN, 2005; SCHORR, 2009). Diante do exposto, o foco do estudo foi avaliar as alterações neuroendócrinas e cardiorrespiratórias durante o choque séptico..

1.1 RESPOSTAS NEUROENDÓCRINAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO

A angiotensina II (ANG II ou ANG (1-8) é o principal peptídeo do sistema renina angiotensina (SRA). Ela é formada a partir da clivagem do angiotensinogênio de origem hepática pela renina de origem renal, formando angiotensina I (ANG I ou ANG(1-10)). Essa por sua vez é clivada pela enzima conversora de angiotensina (ECA) formando a ANG II, especialmente no leito vascular pulmonar. Uma vez formada a Ang II atua em seus receptores específicos em órgãos-alvos regulando a pressão arterial, a homeostase cardiovascular e o equilíbrio hidroeletrólítico, tanto em condições fisiológicas quanto patológicas (DZAU, et al. 1988; KRIEGER, 1998; SANTOS, et al. 2005, PAUL, et al. 2006).

A ANG II liga-se com alta afinidade em seus receptores localizados na superfície celular. Dois tipos principais de receptores são bem caracterizados, AT1 e AT2, ambos com distribuição heterogênea em tecidos periféricos e cerebrais. Os dois receptores diferem em seus mecanismos de sinalização e atividades biológicas (ARDAILLOU, 1999; UNGER, 2002).

O receptor AT1 está presente em tecidos somáticos e cerebrais, predominantemente em órgãos e tecidos envolvidos no balanço eletrolítico e regulação da pressão sanguínea, como glândulas adrenais, células do músculo liso vascular, rim e coração. Sua estimulação medeia também o crescimento e proliferação de células do músculo liso vascular, estando

também implicada em várias doenças cardiovasculares, renais e cerebrais, tais como hipertrofia do ventrículo esquerdo, hipertrofia da camada média vascular, arritmias cardíacas, aterosclerose e glomerulosclerose (UNGER, 2002).

O receptor AT2 está presentes em alta densidade em todos os tecidos durante o desenvolvimento fetal e são menos abundantes em tecidos adultos, estando expressos em altas concentrações na medula adrenal, útero, ovários, endotélio vascular e áreas específicas do cérebro. Sua expressão está também elevada na insuficiência cardíaca, nos processos de reparo após infarto, em lesões de pele e no sistema nervoso. Sendo assim, o receptor AT2 parece estar envolvido no controle da proliferação e diferenciação celular, angiogênese, regeneração tecidual e apoptose (UNGER, 2002).

Poucos estudos correlacionam o quadro de sepse com ANG II. Sabe-se que no quadro de sepse os animais e humanos apresentam hiporreatividade para ANG II (CHENG, et al. 2005).

A ANG II é um importante mediador inflamatório na sepse, haja vista que estudos recentes têm demonstrado que estes efeitos são importantes em diversas patologias. No entanto, ao mesmo tempo em que a ANGII tem uma participação indesejável no processo inflamatório que conduz a lesão dos tecidos do hospedeiro em sepse, este mesmo mediador é responsável por promover vasoconstrição e aumento da pressão arterial. Esta vasoconstrição é, por sua vez, uma ação desejável em pacientes acometidos por choque séptico (DANDONA, et al. 2007; YAO, et al. 2007; MARCHESI, et al. 2008).

Outros hormônios avaliados no estudo foram a vasopressina (AVP) e ocitocina (OT). Ambos são peptídeos constituídos por 9 aminoácidos, produzidos por neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular (PVN) e neurônios magnocelulares dos núcleos PVN e supraóptico (SON) do hipotálamo. Esses peptídeos são produzidos nestes neurônios parvocelulares e liberados na eminência mediana e transportado pelos vasos longos a adeno-hipófise onde atuam estimulando a liberação de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e prolactina (RIVIER 1983; DE BOLD, et al., 1984; GIBBS, et al. 1984; TURNBULL; RIVIER, 1996; AGUILERA; RABADAN-DIEHL, 2000). Os neurônios magnocelulares têm seus terminais axonais principalmente na neuro-hipófise, onde a AVP e OT são armazenadas. Após estímulos adequados e a consequente ativação dos corpos celulares dos neurônios magnocelulares, esses peptídeos são liberados na neuro-hipófise e transportado pelos vasos portais curtos à adeno-hipófise e/ou atingem a circulação sistêmica (PORTER, et al. 1983; ANTUNES-RODRIGUES, et al. 2004).

Uma vez lançados na circulação esses peptídeos são transportados na forma livre, sendo rapidamente degradados pelas endopeptidases o que resulta em meia vida curta. Desta forma a concentração plasmática constitui um bom indicador da capacidade de secreção hormonal pelo sistema hipotálamo neuro-hipofisário (PORTER, et al.1983).

As ações da AVP são mediadas por três subtipos diferentes receptores, V_{1a} , V_{1b} e V_2 (BINRBAUMER, 2000). Expressão de receptor V_{1a} foi observada em músculo liso vascular e fígado, de receptor V_{1b} na pituitária anterior e V_2 nos rins (MOREL, et al., 1993; BINRBAUMER, 2000). Os receptores V_{1a} estão envolvidos no controle da pressão sanguínea e em todas as outras funções conhecidas da AVP, exceto para a estimulação da secreção de corticotropina pela adeno-hipófise, a qual é mediada por receptor V_{1b} e pelos efeitos antidiuréticos, mediados pelos receptores V_2 . A presença de receptores V_{1a} foi detectada em várias estruturas do SNC, sugerindo que o V_{1a} é o principal receptor responsável pelos principais efeitos centrais da AVP (TRIBOLLET, et al. 1988).

Os receptores de OT têm grande diversidade de distribuição tecidual como no útero, glândula mamária, pituitária, cérebro, rins, timo, ovários, testículos, coração e vasos sanguíneos e a existência de subtipos de receptores de OT ainda não está bem estabelecida (GIMPL; FAHRENHOLZ, 2001). Além disso, altas concentrações de OT podem interagir com receptores V_1 e V_2 da AVP (THIBONNIER, et al., 1998).

A secreção de AVP é estimulada pelo aumento da osmolalidade plasmática e queda da pressão arterial, enquanto a OT é estimulada pela hipervolemia, trabalho de parto e lactação. Entretanto, vários outros sinais estressores podem regular a secreção desses peptídeos, tais como: contenção, inalação de éter, calor/frio e endotoxemia (KASTING 1986, 1988; McCANN et al. 2000; JORGENSENG, et al. 2002; ONAKA, 2004)

A secreção de AVP no choque endotóxico tem um padrão bifásico em animais e seres humanos. Inicialmente é caracterizada uma elevada secreção (até 2 horas após o estímulo), enquanto em uma fase tardia (4 horas após o estímulo), é anormalmente baixo para o grau de hipotensão. Nos seres humanos, esse declínio inicia-se 6 h após o diagnóstico de choque séptico e resultam em deficiência relativa de 36 h. Sharshar et al. (2003), demonstraram que todos os pacientes apresentaram baixos níveis de AVP no prazo de 24 horas do diagnóstico de choque séptico. Em contraste, durante o choque cardiogênico e hipovolêmico a secreção de AVP está elevada. O choque séptico provoca um aumento transitório inicial de AVP, que diminui na fase tardia, o que tem sido interpretado como deficiência do hormônio.

O baixo nível de AVP provavelmente é devido a sua secreção prejudicada, ao invés, do aumento do metabolismo das endopeptidases. Mecanismos propostos para a redução de AVP durante a sepse incluem o esgotamento da pituitária em resposta a liberação mediada por barorreceptores, disfunção autonômica e efeito inibitório exercido pelo aumento da liberação de óxido nítrico (NO) no hipotálamo (GIUSTI-PAIVA, et al. 2002; 2003b; SKLAR; SCHRIER, 1983; GARRARD, et al. 1993; LANDRY, et al. 1997).

Outro hormônio que participa do equilíbrio hidroeletrólítico avaliado no presente estudo foi o peptídeo natriurético atrial (ANP), que foi descoberto em 1983 (FLYNN; De

BOLD; De BOLD, 1983). Foi demonstrado em ratos, que a infusão intravenosa de extrato atrial provocava um potente efeito hipotensor e diurético (KUHN, 2004; VANDERHEYDEN, et al. 2004).

O ANP apresenta a formação de um anel composto por 17 aminoácidos ligados por pontes de dissulfeto entre dois resíduos de cisteína, nas posições 7 e 23, sendo essa formação essencial para o reconhecimento do peptídeo pelo receptor de membrana (BRENNER, et al., 1990; VANDERHEYDEN, et al. 2004).

O gene precursor do ANP codifica 151 aminoácidos (pré-pro-hormônio) que proteoliticamente é processado à forma de pro-hormônio contendo 126 aminoácidos (pro ANP1-126) estocados no interior dos miócitos atriais. O pro ANP é clivado durante o processo de secreção pelo átrio por protease específica, para formar o proANP1-98 (fragmento amino-terminal) e o protótipo biologicamente ativo contendo 28 aminoácidos (ANP99-126) denominado fragmento carboxi-terminal. As sequências do ANP encontradas em rato e humano são idênticas, exceto na posição 12. Em humano ocorre a substituição do aminoácido metionina por isoleucina. (BRENNER, et al. 1990; SAMSON: LEVIN et al.1997; VANDERHEYDEN, et al. 2004).

Além do átrio cardíaco, o ANP e sua molécula precursora estão presentes em outros tecidos como o hipotálamo, arco aórtico, pulmões, pituitária, adrenais, rins, ventrículo, estômago, pâncreas e testículos. Entretanto, apesar de presente em vários tecidos, a produção atrial é dezenas de vezes superior à de outras regiões (GARDNER, et al. 1986; JIRIKOWISKI, et al. 1986; GARDNER, et al. 1987; GUTKOWSKA, et al. 1989; GARDNER, et al. 1986; ONG, et al. 1987; SAKAMOTO, et al. 1985; VESELY, et al. 1992)

O ANP promove efeitos que são importantes para homeostase do fluido corporal e para a regulação de pressão arterial. No sistema cardiovascular o ANP promove resposta hipotensora devido à redução do débito cardíaco, do volume intravascular e da resistência vascular periférica (ALLEN, et al. 1987; BREUHAUS, et al. 1985; PARKES, et al. 1988). Nos rins o ANP aumenta o ritmo de filtração glomerular, inibe o transporte de sódio pelo segmento medular do ducto coletor, inibe secreção de renina, de aldosterona, aumenta a diurese e natriurese (KUHN, 2000; BURNETT-JR, et al. 1984; COGAN, 1986; SONNENBERG, et al. 1986; MAACK, et al. 1984).

O ANP participa da resposta imunológica inata e adquirida e foi demonstrado ter um efeito modulador sobre a função dos macrófagos e dos neutrófilos (VOLLMAR, 2004; WIEDERMANN, et al. 1992).

Existem poucos estudos demonstrando a participação do ANP durante o choque séptico. Diante disso, buscamos analisar as alterações neuroendócrinas durante o choque séptico experimental induzido pela CLP.

1.2 RESTAURAÇÕES DA PRESSÃO ARTERIAL UTILIZANDO EXPANSORES DE VOLUME DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

A fluidoterapia é uma prática clínica de rotina para se obter um equilíbrio hemodinâmico e de perfusão dos tecidos no tratamento de pacientes com choque hemorrágico ou séptico. Devendo ser a primeira medida a ser tomada no suporte hemodinâmico ao paciente com choque séptico e hipovolêmico (SILVA, 2008; RIVERS, et al. 2001; DELLINGER, et al. 2004). No choque hemorrágico o tratamento inicial com expansores de volume sanguíneo é efetivo para manter os parâmetros cardiovasculares, mas ao mesmo não é observado em pacientes com choque séptico, onde somente expansão com solução hipertônica promove melhora aguda da pressão arterial média (PAM) (LETSON, et al. 2010; SANTIAGO, et al. 2013; GIUSTI-PAIVA, et al. 2009). Uma das possíveis explicações poderia ser a concentração plasmática de AVP elevada no choque hemorrágico, porém baixa no choque séptico (RAJANI, 2010; SHARSHAR, et al. 2003).

A fluidoterapia é baseada na restauração do volume e composição dos líquidos corporais à normalidade, assim como a manutenção do equilíbrio dos eletrólitos. A infusão de grandes quantidades de líquido (coloides ou cristaloides) é frequentemente usada para restabelecer a perfusão adequada dos tecidos (RIVERS, et al. 2004).

Ainda é amplamente discutida a escolha da solução a ser infundida no paciente hemodinamicamente instável. Como primeira escolha, na reposição volêmica, é recomendado a utilização de solução cristalóide, no entanto, ambas, coloides e cristaloides, apresentam vantagens e desvantagens (MARTEL, et al. 2002; WADE, et al. 1997).

Infusões de cristaloides, como por exemplo, cloreto de sódio 0,9% ou solução Ringer com lactato, são os tipos mais comuns de fluidos administrados durante o tratamento de choque séptico. A expansão do volume plasmático ocorre e é benéfica no regime de reanimação, mas pode promover alteração na estabilidade hemodinâmica. Apenas um quarto do montante infundido permanece no espaço intravascular, com os restantes três quartos distribuídos no espaço extravascular, resultando em apenas um aumento transitório no volume de plasma. Significativa hemodiluição das proteínas do plasma e uma diminuição da pressão coloidosmótica, juntamente com um aumento generalizado da permeabilidade microvascular (tanto do ponto de função pulmonar e sistêmica) podem ocorrer (SINGH, et al. 2009). A expansão do volume plasmático pode resultar em redução do nível plasmático de AVP e aumento de outros hormônios, como: ANP e OT (GODINO et al, 2005; RUGINSK, et al. 2007; VENTURA, et al. 2002).

Em relação a expansão de volume com soluções coloidais, na forma de compostos sintéticos ou não sintético por exemplo, hidroxietilamido, albumina, dextran e gelatina, têm teoricamente maior expansão de volume por unidade de infusão em relação as soluções

cristalóides. O uso do coloide, no entanto, tem o potencial para um maior número de efeitos adversos, por exemplo, lesão tubular renal, diminuir os níveis do fator VIII, e prolongamento do tempo de tromboplastina parcial (SCHORTGEN, et al. 2001; SHATNEY, et al. 1983). Soluções colóides possuem maior custo do que soluções cristalóides.

A principal vantagem dos expansores de volume colóide sobre os cristalóides está no tempo de ação. O efeito das soluções colóides é mais prolongado quando comparado ao efeito dos cristalóides, principalmente por terem elevado peso molecular, favorecendo sua permanência no leito vascular (SINGH, et al. 2009).

Entre os principais colóides utilizados clinicamente podem ser destacados a gelatina, o dextran, o hidroxietilamido e a albumina. Normalmente os colóides são dissolvidos em cristalóides isotônicos (NaCl ou glicose). A gelatina é preparada a partir da hidrólise do colágeno bovino e quando ligadas à uréia, formam polímeros de aproximadamente 35000 daltons. Já os dextrans são polímeros lineares de D-glicose, e de alto peso molecular, sendo os mais utilizados o dextran 40 e dextran 70, com pesos moleculares de 40000 e 70000 respectivamente. O dextran 70 geralmente provoca distúrbios da coagulação, principalmente em ratos. O hidroxietilamido (HES) é sintetizado a partir da amilopectina (polissacarídeo extraído do amido). Após uma reação com óxido de etileno, ocorre uma substituição no carbono 2 (C2) da glicose, do hidrogênio pelo grupo hidroxietil, o que confere maior resistência a ação da alfa-amilase. Existem três gerações desta substância que são o hidroxietilamido 450/0,7 (Plasmin[®], primeira geração), 200/0,6 (Haes-Steril[®], segunda geração) e o 130/0,4 (Voluven[®], terceira geração). Todas são identificadas quanto ao peso molecular (450, 200 ou 130 kDa) e quanto ao grau de substituição. Na prática, o hidroxietilamido 450/0,7 possui maior capacidade de tracionar água para o vaso sanguíneo e maior resistência a ação da amilase plasmática em decorrência do maior peso molecular e maior grau de substituição, respectivamente. No entanto, devido a sua maior permanência na corrente sanguínea também está associado a um maior grau de comprometimento hematológico, principalmente distúrbios da coagulação. Com o desenvolvimento dos hidroxietilamido de segunda e terceira gerações, a capacidade como expansor de volume é menor, porém é acompanhada de um menor comprometimento hematológico. Tanto o dextran como o hidroxietilamido são utilizados em solução contendo 6% destes colóides, frequentemente dissolvidos em salina isotônica e utilizados na dose de 4ml/kg. A associação dextran 6% + NaCl 7,5% também tem sido utilizada para expansão do volume plasmático no choque hemorrágico. Com relação à utilização da albumina, nota-se uma variabilidade no volume e na concentração (5 a 20%) utilizada (WESTPHAL, et al. 2009; LANG, et al. 2001)

Os expansores de volume têm sido empregados em alguns quadros clínicos de queda da pressão arterial ou de redução do volume sanguíneo (principalmente durante o

choque hemorrágico). Entretanto, no choque séptico, a utilização dos expansores de volume tem sido bastante restrita e de pouca eficácia. Isto se deve principalmente pelo fato de que a utilização de soluções cristaloides isotônicas provocam edema, complicando o quadro clínico do paciente, pelo curto tempo de ação e pela falta de um expansor adequado para esta situação clínica.

O uso de tipos alternativos de fluidos para a ressuscitação, como a salina hipertônica foi proposto por Velasco, et al. (1989). Essa solução pode causar uma rápida expansão do volume plasmático induzida pela mobilização do fluido do compartimento intracelular para o intravascular. Isso resulta em um aumento no volume plasmático total em até 4 vezes maior que o volume real infundido, no entanto, estes efeitos são de curta duração. A adição de coloides em solução hipertônica prolonga a duração da expansão do volume e, portanto, acentua os efeitos sobre a circulação central e regional (SINGH, et al. 2009).

A solução de dextrana em salina hipertônica (NaCl, 7,5%) tem sido estudada na fluidoterapia de animais experimentais e seres humanos com choque hemorrágico ou traumático (WADE, et al. 1997; JUNGER, et al. 1997). Com base nestes resultados, o interesse no uso da solução hipertônica no tratamento da sepse tem surgido. Estudos utilizando soluções coloides em salinas hipertônicas sobre os efeitos na função hemodinâmica, na expansão do volume intravascular, função do sistema imunitário e na função endotelial foram realizados. Uma melhora na função cardiovascular e perfusão esplâncnica foi observada em um modelo de choque séptico induzido em cães (ING, et al. 1994). A salina hipertônica promoveu melhora transitória no fluxo sanguíneo tanto sistêmica quanto regional em cães durante choque séptico (HORTON: WALKER, 1991).

Após o choque induzido por infusão de endotoxina de *E. coli*, a administração de solução hipertônica de hidroetilamido ou salina resultou em aumento do volume plasmático, pressão arterial e débito cardíaco, sendo esses efeitos apenas transitórios (ARMISTEAD, et al. 1989; GIUSTI-PAIVA, et al. 2007; BATISTA, et al. 2009). Vários efeitos imunomoduladores também têm sido descritos após o uso da solução hipertônica no tratamento do choque séptico, como a redução significativa de colônias bacterianas e produção de superóxido (SHIELDS, et al. 2003).

Diante do descrito, a escolha de um expansor de volume ideal durante o choque séptico é de grande interesse no meio científico e clínico. Portanto, um dos nossos objetivos é avaliar a expansão de volume sanguíneo com salina ou hidroxietilamido isotônico e hipertônico durante o choque séptico experimental induzido pela CLP.

1.3 RESPOSTAS CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO

A perfusão tecidual adequada é garantida pela manutenção da força motriz da circulação - diferença de pressão sanguínea - em níveis adequados e razoavelmente constantes, esteja o indivíduo em repouso ou desenvolvendo diferentes atividades. A manutenção (componente tônico), bem como a variação momento a momento da pressão arterial (PA) (componente fásico) dependem de mecanismos complexos e redundantes que determinam ajustes apropriados da frequência e contratilidade cardíacas, do estado contrátil dos vasos de resistência e de capacitância e da distribuição de fluido dentro e fora dos vasos (MICHELINI, 1999; KAPLAN, 1998).

Sabe-se que embora muitos reflexos estejam envolvidos na modulação da atividade simpática, os barorreceptores arteriais (alta pressão) são considerados o mais importante mecanismo de controle reflexo da PA, momento a momento. Tais receptores são, na verdade, mecanorreceptores posicionados estrategicamente na crista da aorta e no seio carotídeo, que são sensíveis a variações pressóricas, enviando informações de alteração da PA ao sistema nervoso central via nervos vago e glossofaríngeo. A deformação da parede dos vasos induzida por aumentos da PA gera potenciais de ação que são conduzidos ao núcleo do trato solitário (NTS), no sistema nervoso central. A partir daí, são produzidas respostas de aumento da atividade vagal e queda da frequência cardíaca bem como de redução da atividade simpática para o coração e os vasos, contribuindo para a bradicardia, reduzindo a contratilidade cardíaca e a resistência vascular periférica e aumentando a capacitância venosa (MICHELINI, 1999; KRIEGER, et al. 1999 e 1982)

Na hipertensão sustentada, esses mecanorreceptores sofrem adaptação, deslocando sua faixa de funcionamento para um novo nível de PA, que normalmente é acompanhada de redução da sensibilidade dos pressorreceptores (KRIEGER, et al. 1982). Isso determina que, para igual variação da PA, os hipertensos têm uma menor quantidade de informações e conseqüentemente uma deficiência na regulação reflexa da PA. A menor sensibilidade dos barorreceptores é provavelmente o maior determinante do aumento da variabilidade da PA em indivíduos hipertensos, e de forma indireta associada às conseqüentes lesões dos órgãos-alvo (IRIGOYEN; KRIEGER, 1998; FLORAS et al. 1988).

A função do barorreceptor, expressa como sensibilidade barorreflexa, está prejudicada durante a hipertensão e doenças cardiovasculares (SU, et al. 1986). Essa redução também é observada em pacientes com sepse, que poderia ser explicado pela deficiência na secreção de AVP observada na fase tardia da sepse. (ANNANE, et al. 1999; SCHMIDT, et al. 2001; SHARSHAR, et al. 2003a). Adicionalmente, endotoxemia em humanos resulta em diminuição batimento/ batimento ou pulso/pulso (variabilidade) das oscilações da frequência cardíaca e pressão sanguínea, respectivamente. Esses dados

sugerem desacoplamento entre sistema autônomo e cardiovascular a nível fisiológico. (GODIN; BUCHMAN, 1996; TOWEILL, et al. 2000).

Sepse grave é caracterizada pela falência autonômica que pode preceder ao choque ou a disfunção múltipla de órgãos (SHARSHAR, et al. 2003a). Essas alterações autonômicas podem ocorrer devido às concentrações excessivas de catecolaminas circulantes podendo comprometer o centro do controle autonômico. (ANNANE, et al., 1999). No entanto, esse comprometimento também pode ser devido às várias lesões no cérebro causada por isquemia, hemorragia e inflamação durante a sepse. (BOLTON, et al. 1993; SHARSHAR, et al. 2003b). Outro fator é alto índice de apoptose de neurônios de centro autonômicos cardiovasculares em pacientes com sepse. (SHARSHAR, et al. 2003b).

Outro componente analisado no nosso trabalho foi à resposta quimiorreflexa. Os mecanismos neurais de controle do sistema cardiovascular e respiratório envolvem a ativação de sensores periféricos, os quais transmitem, por meio de suas aferências, as informações captadas para regiões específicas do sistema nervoso central (SNC). Nestas regiões específicas, as informações são integradas, promovendo ajustes rápidos na pressão arterial, frequência cardíaca e ventilação por meio de alterações nas atividades eferentes autonômicas e respiratórias, além da liberação de neuro-hormônios (COMROE, 1939; KOLLMEYER; KLEINMAN, 1975).

Os quimiorreceptores periféricos são estruturas especializadas em detectar alterações na pressão parcial de oxigênio (PO_2), na pressão parcial de gás carbônico (PCO_2) e nas concentrações de hidrogênio (pH) do sangue (HEYMANS; BOUCKAERT, 1930; BISCOE; SAMPSON, 1967, BISCOE, et al. 1969). As células quimiossensíveis localizadas nos corpúsculos carotídeos constituem tecido circunscrito que recebe irrigação por meio de uma pequena artéria (artéria do corpúsculo carotídeo), irrigação esta que lhes confere a maior relação perfusão sanguínea por grama de tecido de todo o organismo. Quando um animal é submetido a situação de hipóxia, o decréscimo na P_{O_2} nas células glomus (tipo I) causa, sequencialmente, inibição dos canais de K^+ sensível ao ATP nas células quimiossensíveis, despolarização da membrana e ativação dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, liberação de neurotransmissores (dopamina e ATP) por vesículas e a geração de potenciais de ação nos terminais neurais que se propagam pelo nervo carotídeo, em direção ao SNC (GONZALES, et al. 1995).

Estudos de Franchini e Krieger (1993) e Haibara et al. (1995) mostraram que ativação do quimiorreflexo por meio da injeção de cianeto de potássio (KCN; i.v.) em ratos não anestesiados, promove aumento da pressão arterial, intensa bradicardia e aumento na frequência respiratória (Fr) (taquipnéia), bem como uma resposta comportamental de exploração do ambiente. Além disso, Haibara et al. (1995) demonstraram que as respostas

cardiovasculares à estimulação dos quimiorreceptores periféricos (respostas pressora e bradicardia) são resultantes da ativação de dois mecanismos independentes:

- Elevação da pressão arterial, decorrente do aumento na atividade simpática, a qual foi praticamente bloqueada pela injeção prévia (i.v.) de prazosin (antagonista alfa-1adrenérgico) sem alterar a resposta de bradicardia.
- Resposta bradicárdica, decorrente da ativação da via parassimpática, a qual foi bloqueada pela injeção prévia (i.v.) de metil-atropina (antagonista dos receptores colinérgicos) sem alterar a resposta pressora.

As aferências dos quimiorreceptores periféricos têm como primeira estação sináptica porções distintas do núcleo do trato solitário (NTS) (COTTLE, 1964; CRILL; REIS, 1968; CIRIELLO, et al. 1981; MIFFLIN, 1992). Este núcleo é formado por um conjunto heterogeneo de neurônios localizados na porção dorso-medial do bulbo, o qual no seu sentido rostro-caudal se estende em colunas bilaterais que se unem na porção mais caudal (CIRIELLO, et al. 1994).

Poucos estudos foram realizados em animais ou humanos submetidos ao choque séptico avaliando os quimiorreceptores. O principal estudo foi realizado por ZAPATA et al., (2011). Neste estudo, avaliou-se o corpo carotídeo de gatos. Nele se observou a excitação do corpo carotídeo após a administração de LPS e a desorganização das células glomus 5 horas após a administração de LPS.

Apesar de alguns estudos demonstrarem um prejuízo das respostas barorreflexas e quimiorreflexas durante o choque séptico, ainda não foi proposto um possível mecanismo responsável por esses prejuízos. Diante disso, nosso objetivo é analisar as alterações neuroendócrinas e cardiorrespiratórias durante o choque séptico, seguido ou não por reposição de diferentes expansores de volume, dessa forma contribuindo para um melhor entendimento da fisiopatologia desta síndrome, possibilitando o desenvolvimento de novas terapias.

2.0 OBJETIVO

Verificar alterações neuroendócrinas e cardiorrespiratórias no modelo experimental de choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração do ceco (CLP).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Os objetivos foram divididos em quatro partes.

2.1.1 **Análise das alterações neuroendócrinas após aplicação de salina hipertônica durante o choque séptico:**

a) Verificar a concentração plasmática de AVP, OT, ANP e ANG II durante o choque séptico.

b) Verificar a ação da expansão de volume sanguíneo com solução salina isotônica (SI) e hipertônica (SH) sobre a concentração dos hormônios citados acima, PAM, FC e osmolalidade durante o choque séptico experimental.

c) Verificar o efeito da administração de L-NAME i.c.v. sobre a concentração plasmática de vasopressina, PAM e FC após uma aplicação de SH em animais submetidos ao choque séptico experimental.

d) Verificar o efeito de duas aplicações de SH sobre a concentração plasmática de vasopressina, osmolalidade, PAM e FC em animais submetidos ao choque séptico experimental.

2.1.2 **Efeito da expansão com hidroxietilamido (HES) 130/0,4 durante o choque séptico.**

a) Verificar a ação da expansão de volume sanguíneo com solução de hidroxietilamido 6% isotônico (HES) e hipertônico (Hyper-HES) sobre osmolalidade e sódio plasmático, PAM, FC, concentração plasmática de AVP e OT em animais submetidos ao choque séptico experimental.

b) Verificar ação de antagonistas de receptores para AVP e OT sobre a PAM e FC durante a expansão com HES e Hyper-HES em animais submetidos ao choque séptico experimental.

2.1.3 Análise das alterações cardiorrespiratórias durante o choque séptico.

a) Verificar as alterações do baro e quimiorreflexo em animais submetidos ao choque séptico experimental.

b) Verificar a sensibilidade barorreflexa em animais submetidos ao choque séptico experimental.

c) Verificar o efeito da administração de L-Name i.c.v. 24 horas após o CLP sobre as alterações de PAM, FC e Fr provodas pela ativação do quimiorreflexo em animais submetidos ao choque séptico experimental.

d) Verificar o efeito da administração de L-Name i.c.v. 24 horas após o CLP sobre as alterações de PAM e FC provodas pela ativação do barorreflexo em animais submetidos ao choque séptico experimental.

e) Verificar o efeito da restauração da PAM 24 horas após o CLP sobre as alterações de PAM, FC e Fr provocadas pela ativação do quimiorreflexo em animais submetidos ao choque séptico experimental.

f) Verificar o efeito da restauração da PAM 24 horas após o CLP sobre as alterações de PAM e FC provocadas pela ativação do barorreflexo em animais submetidos ao choque séptico experimental.

g) Verificar as alterações das aplicações de Carbachol e ANGII i.c.v. sobre a PAM e FC em animais submetidos ao choque séptico experimental.

h) Verificar os efeitos da aplicação de glutamato na região do RVLM sobre a PAM e FC em animais submetidos ao choque séptico experimental.

2.1.4 Avaliações da resposta quimiorreflexa após ativação pela administração de cianeto de potássio (KCN) durante o choque séptico.

a) Verificar a alteração do quimiorreflexo em diferentes tempos em animais submetidos ao choque séptico experimental.

b) Verificar número de neurônios marcados para FOS no núcleo do trato solitário (NTS) durante intermitentes aplicações de KCN em animais submetidos ao choque séptico experimental.

c) Verificar efeito do pré-tratamento com L-Name e aminoguanidina i.c.v. e i.p. sobre a atividade do quimiorreflexo durante o choque séptico.

3.0 METODOLOGIA

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas- UNIFAL.

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, adultos (250-350 g), provenientes do biotério da Universidade Federal de Alfenas – MG. Os animais foram ambientados a temperatura controlada (23 ± 2 °C) e acesso livre à água e alimento, sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12h (Luz 7:00 – 19:00h). Todos os experimentos foram iniciados pela manhã entre 08 e 09h:00. Experimentos foram aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Alfenas sob o protocolo # 470/2012.

3.2 CIRURGIAS

Foram feitas 4 tipos de cirurgia: Canulação da veia jugular, canulação da artéria e veia femoral, ligadura e perfuração cecal e estereotaxia.

3.2.1 CANULAÇÃO DA VEIA JUGULAR

Na véspera dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg) e submetidos ao implante cirúrgico de cânulas de polietileno. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de silicone flexível (Silastic) de 12 cm colado a um pedaço quadrado de folha de silicone. Uma agulha 20 G foi conectada na cânula. Com o animal sob anestesia, uma incisão longitudinal foi feita sobre a área onde a veia jugular externa direita passa sob músculo peitoral maior. A agulha conectada a cânula foi inserida para o lúmen da veia. A cânula foi passada por dentro e fora do recipiente. Depois de retirada agulha, a cânula foi puxada para trás ligeiramente, com intuito de inseri-la no vaso. Após esse processo, a cânula foi pressionada para baixo, em direção ao coração.

Com a cânula na veia, a folha de silicone foi suturada no músculo. A cânula foi exteriorizada na região escapular dorsal do rato com o auxílio de um trocater. Procedimento realizado como descrito por Harms e Ojeda (1974).

3.2.2 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAL

Na véspera dos experimentos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, i.p.) e submetidos ao implante cirúrgico de cânulas de polietileno. As cânulas utilizadas foram confeccionadas a partir de um tubo de polietileno (PE-10) de 4 a 5 cm soldado a um outro tubo de polietileno (PE-50) com comprimento ajustado (aproximadamente 15 cm) de acordo com o tamanho do animal. obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Os animais foram submetidos a canulação da artéria e/ou veia femoral. Uma vez implantadas, nos respectivos vasos, as cânulas foram exteriorizadas na região escapular dorsal do rato com o auxílio de um trocater, onde foram fixadas com linha de sutura. Estes procedimentos foram realizados como descrito por Vieira et al. (2012).

3.2.3 LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP)

A indução do choque séptico foi realizada pelo modelo CLP (Cecal Ligation and Puncture). Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, i.p.). Após a realização de tricotomia na região abdominal, os ratos foram colocados em mesa cirúrgica. A assepsia local foi feita com álcool 70%. Os ratos foram, em seguida, submetidos a uma laparotomia com incisão longitudinal de, aproximadamente, 1 cm e subsequente, exposição do ceco. O ceco foi semi-ocluído com fio de seda, na região próxima à válvula íleocecal. O ceco foi perfurado dez vezes com agulha estéril (16 Gauge) e, logo após, foi levemente comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. Em seguida, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal. Posteriormente, a musculatura e pele também foram suturadas e a região abdominal foi assepsiada com álcool 70%. Os ratos receberam hidratação com 2 ml de solução fisiológica i.p., para reposição de fluido. Para a recuperação, os ratos foram colocados em uma caixa devidamente aquecida, para retorno da anestesia. Os ratos controles (Sham) foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos não sofrendo, contudo, semi-oclusão e perfuração do ceco. Estes procedimentos foram realizados como

descrito por Wichterman et al. (1980).

3.2.4 ESTEREOTAXIA

Os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250mg/kg, i.p.), colocados no aparelho de estereotáxico, e a seguir, foi feita uma incisão longitudinal na pele da região dorsal da cabeça e no tecido subcutâneo adjacente de 1 cm de extensão. O tecido subcutâneo e perióstio foram removidos para perfuração do osso parietal direito e uma cânula foi introduzida visando atingir o ventrículo direito (VL). Para a canulação do VL foram utilizados os seguintes parâmetros, respectivamente posterior, lateral direito e ventral em relação ao bregma: 0,5; 1,4 e 3,5 mm. Para a canulação do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) foram utilizadas as seguintes coordenadas, respectivamente posterior, lateral direito e ventral em relação ao Lambda: 3,6; 1,9 e 7,0 mm. A cânula foi fixada ao osso utilizando acrílico autopolimerizável, após a fixação de 2 parafusos no osso. Após os experimentos os cérebros foram removidos para confirmar o sítio de injeção por meio de métodos histológicos. Estes procedimentos foram realizados de acordo com VIEIRA, et al. (2010 e 2012).

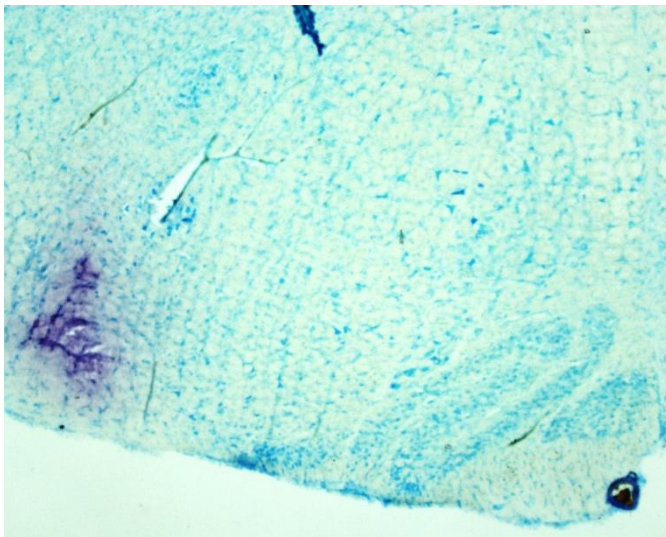


Figura 1: Foto representativa de uma microinjeção no bulbo ventrolateral rostral (RVLM).
Fonte: Do autor

3.3. INJEÇÃO DAS DROGAS NO CÉREBRO

As drogas dissolvidas em solução salina fisiológica estéril foram injetadas no cérebro dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5 μ l), conectada por um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A agulha injetora utilizada para a área RVLM foi 1,5 mm mais longa do que a cânula fixada no cérebro. A agulha injetora para VL foi 2 mm mais longa que a cânula fixada no cérebro (VIEIRA, et al. 2010 e 2012).

3.4 HISTOLOGIA DO CÉREBRO

Ao término dos protocolos experimentais foram realizadas microinjeções do corante azul de Evans no VL e RVLM. Logo após, os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (250 mg/kg). A seguir foram submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml) seguida de perfusão com solução de formalina a 10% (50 ml). A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50 μ m de espessura) no ponto de injeção (área RVL e VL) foram feitos com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos foram montados em lâminas, corados pelo método de Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções na área RVL e VL (VIEIRA, et al. 2010 e 2012).

3.5 MEDIDA INVASIVA DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) e cânula venosa para a administração sistêmica de drogas. A cânula arterial, previamente heparinizada, foi conectada a um transdutor mecanoelétrico de pressão (MLT 844, ADInstruments), cujo sinal foi devidamente amplificado, digitalizado através de uma interface analógico/digital a uma frequência de 1000 Hz em um microcomputador equipado com um software apropriado (LabChart). A PAM e FC foram derivadas da PAP por meio deste sistema de aquisição (SANTIAGO, et al. 2013).

3.6 PLETISMOGRAFIA

Os parâmetros ventilatórios foram medidos pelo método de pletismografia de corpo inteiro para pequenos animais. O animal foi colocado em uma caixa pletismográfica rígida vedada a entrada de gases. Para o cálculo dos parâmetros ventilatórios foram consideradas as oscilações de pressão no interior da câmara em decorrência da diferença de temperatura entre o gás inspirado (aproximadamente 25°C) e o gás expirado (37 °C). Durante a realização de cada medida de ventilação, a câmara do animal permaneceu totalmente vedada por curtos períodos de tempo (aproximadamente 2 min) e os sinais gerados pelas oscilações de pressão causadas pela respiração do animal foram captados por um dispositivo conectado à câmara que contém um transdutor de pressão diferencial de alta sensibilidade (ML141 Spirometer, PowerLab AdInstruments). O software de aquisição de dados amplifica os sinais captados pelo transdutor e quantifica a amplitude e a frequência dos sinais respiratórios. Dessa forma, o registro nos permite calcular, o volume corrente (V_T) e a frequência respiratória (Fr) do animal. Estes procedimentos foram realizados de acordo com Bartlett e Tenney (1970).

3.7 DOSAGEM HORMONAL.

Amostras de, sangue foram coletadas do tronco em tubos plásticos após decapitação e imediatamente mantidas em gelo. Os tubos continham heparina (para vasopressina e ocitocina) ou inibidores peptídicos (para ANP e ANG II). O plasma foi separado por centrifugação (3000 rpm, 4°C, 15 min.) e dividido em alíquotas, que foram em seguida mantidas a -70°C até o momento das dosagens hormonais. As dosagens de vasopressina, ocitocina, ANP e ANG II foram realizadas utilizando-se a técnica de radioimunoensaio como descrito anteriormente (Morris; Alexander, 1989). Os radioimunoensaios da vasopressina e ocitocina plasmáticas foram realizado após a extração previa do plasma com acetona e éter de petróleo, utilizando 1ml de plasma e acrescentando 2mL de acetona. As amostras foram agitadas e centrifugadas (3000rpm, 20min, 4°C). A seguir, o sobrenadante foi descartado em um tubo contendo 2ml de éter de petróleo e agitado. Após a separação das duas fases líquidas (aproximadamente 10min), a fase superior foi aspirada e o restante liofilizado. ANG II e ANP foram determinadas após a extração do plasma pelo método descrito anteriormente por Gutkowska et al, (1984). Após a centrifugação, os peptídeos foram extraídos em coluna de sílica (Bond Elut SPE). As colunas foram pré-ativadas por lavagens sequenciais com 4 mL de TFA 60% acetonitrilo/0.1% e 20 mL de TFA a 0,1%. Após a aplicação da amostra, as colunas foram lavadas com 20 mL de TFA a 0,1%. Os peptídeos adsorvidos foram eluidos com 3 mL de TFA a 60% acetonitrilo/0.1% em tubos de polipropileno. A sensibilidade do

radioimunoensaio e coeficientes intra e interensaio de variação foram de 0,8 pg/ml, 7,7-11,9% de vasopressina, 0,9 pg / ml e 7,0-12,6% de ocitocina, 0,5pg/ml, 10,9-17,1% para ANGI II e 0,7pg/ml, 4,8-10,0% para ANP. Todo o procedimento foi feito em duplicata (ELIAS, et al. 1997).

3.8 MEDIDA DA OSMOLALIDADE SÉRICA

Após a decapitação, o sangue foi armazenado em tubo sem heparina. As amostras de sangue foram centrifugadas e o soro foi utilizado para a determinação da osmolalidade plasmática pelo método do abaixamento do ponto de congelamento, utilizando um osmômetro.

3.9 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os ratos foram anestesiadas com tribromoetanol (250 mg/Kg) e perfundidos através de uma punção intracardíaca com salina (250 mL) contendo 5000U/l de heparina, seguido pela perfusão com fixador paraformaldeído 4% em tampão fosfato (PBS 0,1 M; 500 mL) sendo posteriormente os bulbos submetidos aos procedimentos imunohistoquímicos. Após sua remoção, os bulbos foram mergulhados em fixador durante 4 horas e em seguida colocados em solução de sacarose a 30% em PBS (0,1 M) a 4°C. Após 48 horas, os bulbos foram seccionados em cortes de 30 µm de espessura utilizando um criostato e coletados em PBS (0,01 M). Imediatamente após, foram realizados o bloqueio da peroxidase endógena (solução de H₂O₂ 1%) por 30 minutos e os cortes foram lavados com PBS (0,01 M) 3 vezes por 5 minutos. Posteriormente, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com albumina bovina 5% em 0,1 M de PBS durante uma hora. Os cortes foram processados primeiro para imunorreatividade para Fos ficando incubados durante a noite com o anticorpo primário anti-fos de coelho (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) diluído 1:10.000 em PBS (0,1 M) contendo 2% de soro normal de caprino 0.3% Triton X-100 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Após lavagem, os cortes foram incubados com segundo anticorpo biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA, diluído 1:200 em 1.5% de normal goat serum - PBS) seguido pelo complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Elite, 1:200 em PBS) ambos por 1 hora a temperatura ambiente. Para coloração, foi empregado diaminobenzidina (DAB, Sigma - Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) intensificado com cloreto

de cobalto 1% e sulfato de níquel 1%. O produto da reação conferiu uma coloração violeta escuro-preto ao núcleo. Estes procedimentos foram realizados de acordo com o descrito em CRUZ, et al. (2010). A área em estudo, o núcleo do trato solitário (NTS) foi identificada e delimitada de acordo com o atlas Paxinos e Watson (1997). As células positivas para FOS foram contadas com auxílio de um microscópio Nikon modelo H55L.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Para comparação de duas médias foi aplicado o teste “t” de Student. A significância estatística entre os grupos experimentais foi determinada por análise da variância (ANOVA) “One-way” ou “Two-way”, seguido do pós-teste de Newman-Keuls ou Bonferroni, respectivamente.

Para a análise da figura 40 (sensibilidade barorreflexa) foi feito o teste área sobre a curva.

O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

4.0 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Descrições dos protocolos experimentais realizados no projeto.

4.1 CHOQUE SÉPTICO INDUZIDO PELA LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP) X CIRURGIA FICTÍCIA (SHAM).

Descrição do protocolo experimental realizado nos animais submetidos à cirurgia de CLP.

4.1.1 Determinação da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foi canulado a artéria femoral dos animais. Avaliação da PAM e FC foram feitas antes e 2, 4, 6, 12, 24 horas após a cirurgia.

Grupos: CLP; Sham (n= Oito por grupo)

4.2 Análise das alterações hormonais após aplicação de salina hipertônica durante o choque séptico.

Descrição dos protocolos experimentais para análise das alterações hormonais após aplicação de salina hipertônica.

4.2.1 Determinação das concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, peptídeo natriurético atrial (ANP), angiotensina II (ANG II) e osmolalidade plasmática durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. Antes e 2, 4 e 6 horas após a cirurgia os animais foram decapitados para coleta de sangue e posterior dosagem das concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, ANP, ANG II e determinação da osmolalidade sérica.

Grupos: CLP; Sham (n=10 por grupo e para cada tempo).

4.2.2 Avaliação das concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, ANP, ANG II e osmolalidade plasmática após um estímulo osmótico com Salina hipertônica (SH) durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. Um dia antes do experimento, foi canulada a veia jugular. Seis horas após a cirurgia da CLP foi administrado SH. 5, 10 e 30 minutos após administração de SH, os animais foram decapitados para coleta de sangue e posterior dosagem das concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, ANP, ANG II e determinação da osmolalidade sérica.

Grupos: Sham + SH; CLP + SH (n=10 por grupo e para cada tempo)

4.2.3 Avaliação do efeito do L-Name (250µg/2µl; i.c.v.) após um estímulo osmótico com SH sobre a concentração plasmática de vasopressina e osmolalidade plasmática durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para realização desse experimentos, os animais foram previamente submetidos a implantes no ventrículo lateral (VL), permanecendo em repouso por cinco dias. Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a canulação da veia jugular. No dia do experimento, no momento que foi realizado a cirurgia de CLP ou Sham foi considerado o tempo 0. Seis horas após a cirurgia foi administrado L-Name (250µg/2µl i.c.v.; GIUSTIPIAVA, et al. 2003). Após 30 minutos da administração do L-Name foi aplicado SH. Cinco e trinta minutos após a administração de SH os animais foram decapitados para coleta de sangue e posterior dosagem das concentrações plasmáticas de vasopressina e osmolalidade.

Grupos: CLP + L-Name+ SH; CLP + salina + SH (n= 10 por grupo e para cada tempo)

4.2.4 Avaliação do efeito do L-Name (250µg/2µl; i.c.v.) após um estímulo osmótico com SH sobre PAM e FC durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para realização desse experimentos, os animais foram previamente submetidos a implantes no ventrículo lateral (VL), permanecendo em repouso por cinco dias. Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a canulação da veia jugular. No dia do experimento, no momento que foi realizada a cirurgia de CLP ou Sham foi considerado o tempo 0. Seis horas após a cirurgia foi administrado L-Name (250µg/2µl i.c.v.). Após 30 minutos da administração de L-Name foi aplicado SH. Durante uma hora após SH foram verificados alterações da PAM e FC minuto a minuto.

Grupos: CLP + L-Name+ SH; CLP + salina + SH (n= 8 por grupo)

4.2.5 Avaliação da concentração plasmática de vasopressina e osmolalidade plasmática após dois estímulos osmóticos com SH durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foi canulada veia jugular. Seis horas após cirurgia, foi feita primeira administração de SH. Após trinta minutos da primeira aplicação novamente foi administrado SH. Cinco minutos após a segunda aplicação de SH os animais foram decaptados e foi coletado o sangue para posterior dosagem das concentrações plasmáticas de vasopressina e medida da osmolalidade sérica.

Grupos: Sham + SH; CLP + SH (n= 8 por grupo)

4.2.6 Avaliação da PAM e FC após dois estímulos osmóticos com SH durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foram canuladas a veia jugular e artéria femoral. Seis horas após cirurgia, foi feita primeira administração de SH. Após trinta minutos da primeira aplicação novamente foi administrado SH. Durante uma hora após SH foram verificados alterações da PAM e FC minuto a minuto.

Grupos: Sham + SH; CLP + SH (n=8 por grupo)

4.3 EFEITO DA EXPANSÃO DE VOLUME SANGUÍNEO COM HIDROXIETILAMIDO (HES) 130/0,4 DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

Descrição dos protocolos experimentais para expansão de volume sanguíneo com hidroxietilamido.

4.3.1 Avaliação da concentração plasmática de vasopressina, ocitocina, osmolalidade, sódio plasmático e hematócrito após a expansão sanguínea com hidroxietilamido 6% isotônico (HES) e hipertônico (Hyper-HES) durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foi canulada a veia jugular. Seis horas após cirurgia de CLP foi feita a expansão de volume sanguíneo com HES (NaCl 0,9%; i.v.; 4mL/kg; 8mL/kg; 16mL/kg) e Hyper-HES (NaCl 7,5%; i.v.;4mL/kg) (BATISTA, et al., 2009). Para dosagem hormonal os animais foram decapitados 5 minutos após a expansão. Para dosagem do sódio, osmolalidade plasmática sérica e hematócrito foi retirado o sangue 30 minutos após a expansão.

Grupos experimentais: Sham; CLP + salina isotônica; CLP + HES 4mL/kg; CLP + HES 8mL/kg; CLP + HES 16mL/kg; CLP + Hyper-HES 4mL/kg (n=10 por grupo e para cada tempo)

4.3.2 Avaliação da PAM e FC após a expansão sanguínea com hidroxietilamido 6% isotônico (HES) e hipertônico (Hyper-HES) durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foram canuladas a veia jugular e artéria femoral. Seis horas após cirurgia de CLP foi feita a expansão de volume sanguíneo com HES (NaCl 0,9%; i.v.; 4mL/kg; 8mL/kg; 16mL/kg) e Hyper-HES (NaCl 7,5%; i.v.; 4mL/kg). Alterações de PAM e FC foram verificadas minuto a minuto durante uma hora após a expansão.

Grupos experimentais: Sham; CLP + salina isotônica; CLP + HES 4ml/kg; CLP + HES 8ml/kg; CLP + HES 16ml/kg; CLP + Hyper-HES 4ml/kg (n=8 por grupo).

4.3.3 Avaliar a participação de vasopressina e ocitocina na alteração da PAM após a expansão com HES e Hyper-HES durante o choque séptico.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP. No dia anterior, foram canuladas a veia jugular e artéria femoral. 5 minutos antes da expansão foi administrado antagonista do receptor de vasopressina (V_1 ; i.v.; 10 μ g/kg) ou antagonista do receptor de ocitocina (i.v.; 1mg/kg) (SANTIAGO, et al., 2013). Seis horas após cirurgia de CLP foi administrado HES 16ml/kg ou Hyper-HES. Alterações da PAM e FC foram verificadas minuto a minuto durante uma hora após a expansão.

Grupos: CLP + Ant. V_1 + Hyper-HES; CLP + Ant. OT + Hyper-HES; CLP + salina + Hyper-HES (n= 8 por grupo).

CLP + Ant. OT+ HES 16ml/kg; CLP + salina + HES 16ml/kg (n=8 por grupo).

4.4 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

Descrição dos protocolos experimentais para análise das alterações cardiorrespiratórias.

4.4.1 Avaliação das alterações no baro e quimiorreflexo vinte e quatro horas após o choque séptico induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foram canuladas a veia jugular e artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia (CLP e Sham) foi administrado cianeto de potássio (KCN; 40µg/0,1ml; iv), fenilefrina (Phe; 5µg/kg; iv) e nitroprussiato de sódio (NPS; 30 µg/kg; iv) (MOREIRA, et al. 2009). Para avaliação da resposta quimiorreflexa, os animais estavam na caixa pletismográfica para verificação simultânea da frequência respiratória (Fr), PAM e FC após a administração de KCN. Após a administração de Phe e NPS foram verificadas somente as alterações da PAM e FC.

Grupos: Sham; CLP (n=8 por grupo)

4.4.2 Avaliação da sensibilidade barorreflexa durante o choque séptico.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foram canuladas a veia jugular e artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia (CLP e Sham) foi aplicado diferentes doses de Phe (0,5; 1; 3; 5; 10 µg/kg; i.v.) e NPS (1; 4; 7; 10; 30 µg/kg; i.v.) (CARDOSO, et al. 2005). Em cada dose verificaram-se as alterações de PAM e FC.

Grupos: Sham; CLP (n=8 por grupo).

4.4.3 Avaliação do efeito do L-Name (250µg/2µl; i.c.v.) após administração de KCN, Phe e NPS sobre PAM e FC durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para realização desse experimentos, os animais previamente foram submetidos a implantes no ventrículo lateral (VL), permanecendo em repouso por cinco dias. Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a canulação da veia jugular e artéria femoral. No dia do experimento, no momento que foi realizado a cirurgia de CLP ou Sham foi considerado o tempo 0. Vinte e quatro horas após a cirurgia foi feita a administração de L-

Name. Após 30 minutos da aplicação de L-Name, foram realizadas as administrações de KCN, Phe e NPS. Foram verificadas as alterações de PAM, FC e Fr (para o KCN) e PAM e FC (para Phe e NPS)

Grupos: Sham + salina; CLP + salina; Sham + L-Name; CLP + L-Name (n=8 por grupo)

4.4.4 Avaliação da ANGII (i.c.v.; 50ng/μl) e Carbacol (Car; i.c.v.; 0,5nmol/μl) nas alterações da PAM e FC 24 horas após o choque séptico induzido por CLP.

Para realização desse experimento, os animais foram previamente submetidos a implantes no ventrículo lateral (VL), permanecendo em repouso por cinco dias. Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a canulação da artéria femoral. No dia do experimento, no momento que foi realizado a cirurgia de CLP ou Sham foi considerado o tempo 0. Vinte quatro horas após a cirurgia foi feita administração de ANGII (50ng/μl; i.c.v.) (VIEIRA. et al. 2010) ou Car (0,5nmol/μl;i.c.v) (VIEIRA, et al. 2012) e verificaram-se as alterações da PAM e FC

Grupos: Sham + ANG II; CLP + ANG II; Sham+ salina; CLP + salina;(n=8 por grupo)
Sham + Car; CLP + Car; Sham+ salina; CLP + salina; (n=8 por grupo)

4.4.5 Avaliação do efeito de glutamato (Glu; 10 nmol/0,1μl) na área do bulbo ventrolateral rostral (RVLM) nas alterações da PAM e FC 24 horas após choque séptico induzido por CLP.

Para realização desse experimento, os animais previamente foram submetidos a implantes no RVLM, permanecendo em repouso por cinco dias. Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a canulação da artéria femoral. No dia do experimento, no momento que foi realizado a cirurgia de CLP ou Sham foi considerado o tempo 0. Vinte quatro horas após a cirurgia foi feita administração de Glu (10nmol/0,1μl) (VIEIRA, et al.,2006) na área RVLM e verificaram-se as alterações da PAM e FC.

Grupos: Sham + Glu; CLP + Glu; Sham + salina; CLP + salina; (n=8 por grupo)

4.4.6 Restauração da PAM durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP. No dia anterior, foram canuladas a artéria femoral e veia jugular. Vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP foi restaurada a pressão arterial dos animais por dois protocolos. Restauração da pressão com L-Name (20mg/kg/i.v.) (HIRAI et al, 1995) ou infusão contínua de Phe (0,75µg/0,03ml/min) (CRUZ et al., 2010). No protocolo de infusão contínua de Phe, também foi canulada a veia femoral para restauração da PAM. Com a pressão restaurada foram repetidos os protocolos 11 á 15 (n=8 por grupo).

4.5 AVALIAÇÕES DA RESPOSTA QUIMIORREFLEXA APÓS ATIVAÇÃO PELA ADMINISTRAÇÃO DE CIANETO DE POTÁSSIO (KCN) DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

Descrição dos protocolos experimentais para avaliações da resposta quimiorreflexa após a ativação pela administração de KCN.

4.5.1 Avaliação das alterações do quimiorreflexo em diferentes tempos após o choque séptico induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foram canuladas a veia jugular e artéria femoral. Antes e 3, 6, 12 e 24 horas após a cirurgia (CLP e Sham) foi administrado KCN. Para avaliação da resposta quimiorreflexa os animais estavam na caixa pletismográfica para verificações simultaneas da Fr, PAM e FC.

Grupos: Sham; CLP (n=8 por grupo)

4.5.2 Avaliação dos neurônios positivos para FOS no NTS após ativação intermitente com KCN durante o choque séptico experimental.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foram canuladas a veia jugular e artéria femoral. Vinte e quatro horas após a cirurgia (CLP ou Sham) foi feita ativação intermitente do quimiorreflexo. Para ativação do quimiorreflexo foi administrado KCN (160µg/kg em 50µl/i.v.) ou salina (NaCl 0,9%;i.v.;50µl). Cada animal recebeu “bolus” intravenoso de KCN ou salina a cada 3 minutos durante 30 minutos (CRUZ, et al. 2010). Após 1 hora da última aplicação o animal foi anestesiado, perfundido e houve a retirada do bulbo para futura análise de neurônios positivos para c-Fos no núcleo do trato solitário comissural (NTSc) ou intermediário (NTSi).

Grupos: Sham + salina; Sham + KCN; CLP + salina; CLP + KCN (n=6 por grupo).

4.5.3 Avaliação do efeito do pré-tratamento com L-Name (20mg/kg; i.p.) ou aminoguanidina (Ag; 10mg/kg; i.p.) após administração de KCN sobre PAM, FC e Fr durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para a realização desse experimento foram utilizados animais submetidos a cirurgia de CLP ou Sham. No dia anterior, foram canuladas a veia jugular e artéria femoral. Trinta minutos antes da cirurgia, foi administrado L-Name (20mg/kg; i.p.) (BIANCARDI, et al. 2007) ou Ag (10mg/kg; i.p.) (GIUSTI-PAIVA, et al. 2002). Antes e 3, 6, 12 e 24 horas após a cirurgia (CLP e Sham) foi administrado KCN. Para avaliação da resposta quimiorreflexa os animais estavam na caixa pletismográfica para verificações simultâneas da Fr, PAM e FC.

Grupos: Sham + salina; Sham + L-Name; Sham + Ag; CLP + salina; CLP + L-Name; CLP + Ag (n=8 por grupo).

4.5.4 Avaliação do efeito do pré-tratamento com L-Name (250µg/kg; i.c.v.) ou aminoguanidina (Ag; 250µg/kg; i.c.v.) após administração de KCN, Phe e NPS sobre PAM e FC durante o choque séptico experimental induzido por CLP.

Para realização desse experimentos, os animais previamente foram submetidos a implantes no ventrículo lateral (VL), permanecendo em repouso por cinco dias. Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a canulação da veia jugular e artéria femoral.

No dia do experimento, no momento que foi realizado a cirurgia de CLP ou Sham foi considerado o tempo 0. Trinta minutos antes da cirurgia (CLP ou Sham) foi administrado L-Name (250µg/kg; i.c.v) ou Ag (250µg/kg; i.c.v) (GIUSTI-PAIVA, et al. 2002 e 2003). Antes e 3, 6, 12 e 24 horas após a cirurgia (CLP e Sham) foi administrado KCN ou salina. Para avaliação da resposta quimiorreflexa os animais estavam na caixa pletismográfica para verificações simultaneas da Fr, PAM e FC.

Grupos: Sham + salina; Sham + L-Name; Sham + Ag; CLP + salina; CLP + L-Name; CLP + Ag (n=8 por grupo).

4.5.5 Efeito do pré-tratamento com Ag i.c.v. sobre os neurônios positivos para FOS no NTS após ativação intermitente com KCN durante o choque séptico experimental.

Para realização desse experimento, os animais foram previamente submetidos a implantes no ventrículo lateral (VL), permanecendo em repouso por cinco dias. Um dia antes do experimento, os animais foram submetidos a canulação da veia jugular e artéria femoral. No dia do experimento, no momento que foi realizado a cirurgia de CLP ou Sham foi considerado o tempo 0. 30 minutos antes da cirurgia de CLP ou Sham, os animais foram pré-tratados com Ag i.c.v. Vinte e quatro horas após a cirurgia (CLP ou Sham) foi feita ativação intermitente do quimiorreflexo. Para ativação do quimiorreflexo foi administrado KCN (160µg/kg em 50µl/i.v.). Cada animal recebeu “bolus” intravenoso de KCN a cada 3 minutos durante 30 minutos. Após 1 hora da última aplicação o animal foi anestesiado, perfundido e houve a retirada o cérebro para futura análise de neurônios positivos para c-Fos no núcleo do trato solitário comissural (NTSc) ou intermediário (NTSi).

Grupos: Sham + KCN + salina i.c.v.; Sham + KCN + Ag i.c.v.; CLP + KCN + salina i.c.v.; CLP + KCN + Ag i.c.v. (n=6 por grupo).

5.0 RESULTADOS

A descrição dos resultados foram divididos em cinco partes:

5.1 CHOQUE SÉPTICO INDUZIDO PELA LIGADURA E PERFURAÇÃO CECAL (CLP) X GRUPO CONTROLE (SHAM).

Na figura 2, observa-se uma queda significativa ($p < 0,001$) da pressão arterial média (PAM) a partir da segunda hora após a ligadura e perfuração do ceco (CLP) que se mantém por todo o período de avaliação quando comparado ao grupo Sham. A partir deste dado foram avaliadas as alterações cardiovasculares e neuroendócrinas após a expansão de volume sanguíneo com hidroxietilamido.

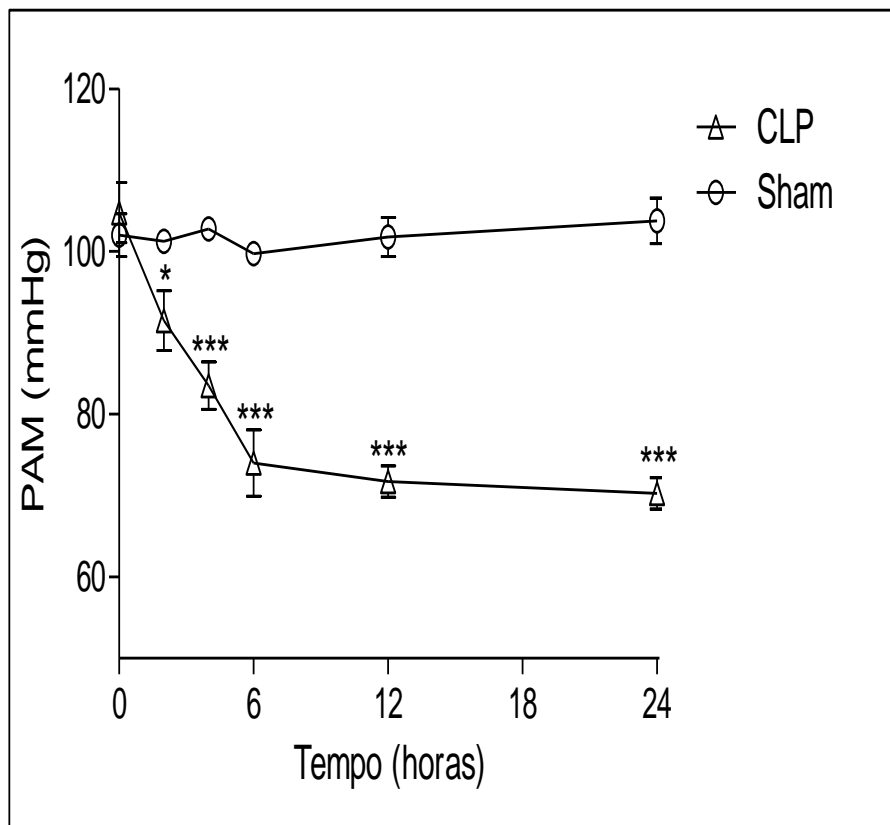


Figura 2. Pressão arterial média (PAM) nos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) quando comparado com grupo com grupo controle (Sham). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado com Sham (One way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Ao contrário da PAM, a frequência cardíaca (FC) tem um aumento significativo a partir da segunda hora após o CLP, que se mantém até 6 horas ($p < 0,001$). Doze horas após o CLP, houve uma queda da FC, mas continuava significativamente maior quando comparado com grupo Sham. Na vigésima quarta hora após o CLP, não foi observada diferença significativa. (Figura 3) A partir deste dado, foram avaliadas as alterações cardiorrespiratórias durante o choque séptico.

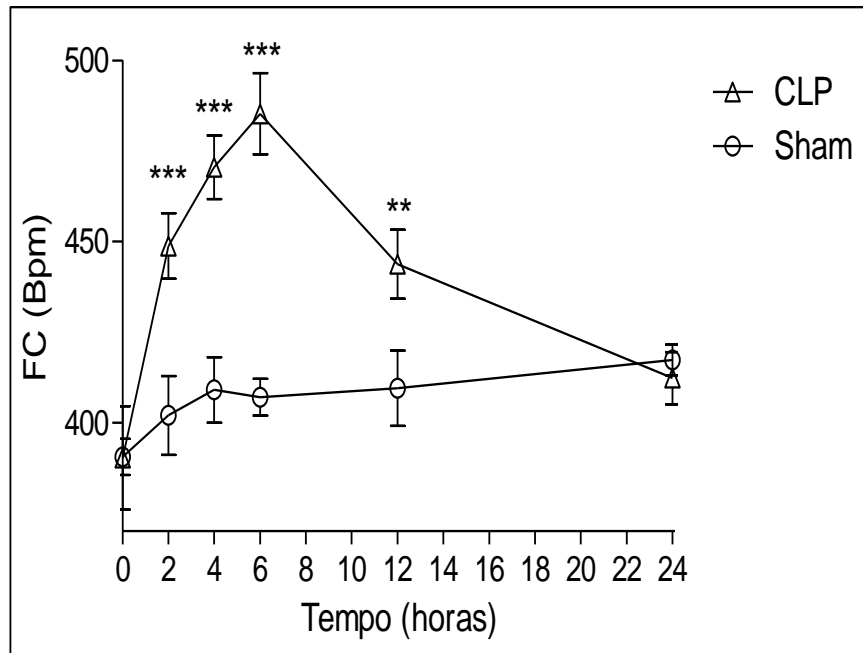


Figura 3. Frequência cardíaca (FC) dos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao Sham (One way ANOVA).
Fonte: Do autor.

Com relação a concentração plasmática de vasopressina, 6 horas após CLP, não houve diferença significativa entre o grupo CLP e Sham, como observado na figura 4. A partir deste dado foram avaliada as alterações neuroendócrinas durante o choque séptico.

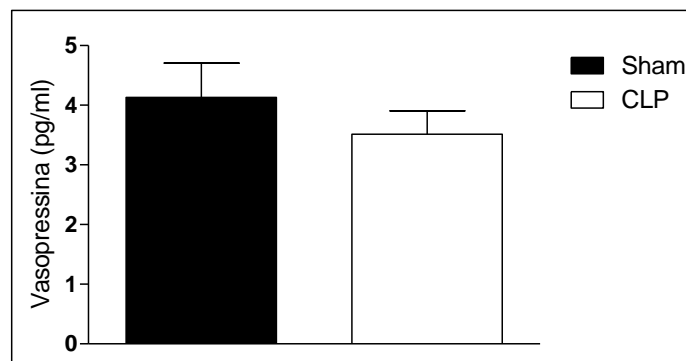


Figura 4. Concentração plasmática de vasopressina 6 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou grupo controle (Sham) (Test t).
Fonte: Do autor.

5.2 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

Osmolalidade dos animais submetidos à cirurgia de CLP não apresentou diferença significativa quando comparado com os animais Sham durante as primeiras seis horas após a cirurgia (figura 5).

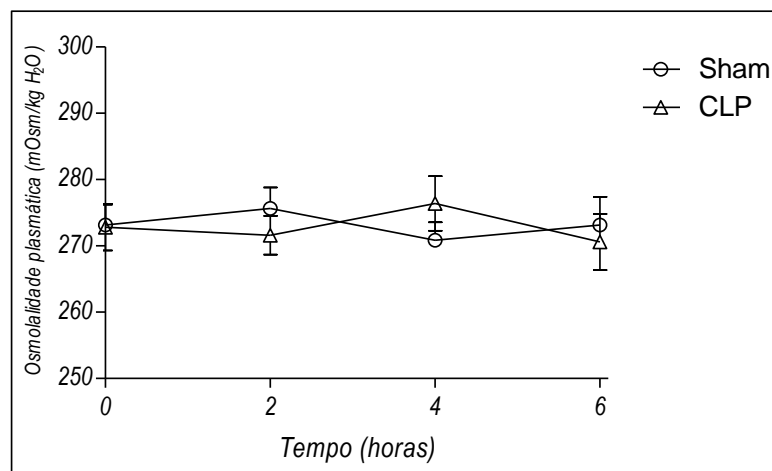


Figura 5. Osmolalidade plasmática dos animais submetidos ao choque séptico pela cirurgia de CLP ou grupo controle (Sham) (One way ANOVA).
Fonte: Do autor.

Após a cirurgia de CLP, observou-se aumento da concentração plasmática de AVP e OT que persiste até 4 horas ($P < 0,001$) quando comparado com grupo Sham. Após 6 horas da CLP a concentração de AVP permanece alta em comparação ao Sham, mas menor quando comparado no tempo de 4h após a CLP. A concentração plasmática de OT não apresentou diferença no tempo de 6h quando comparada com o grupo Sham (Figura 6).

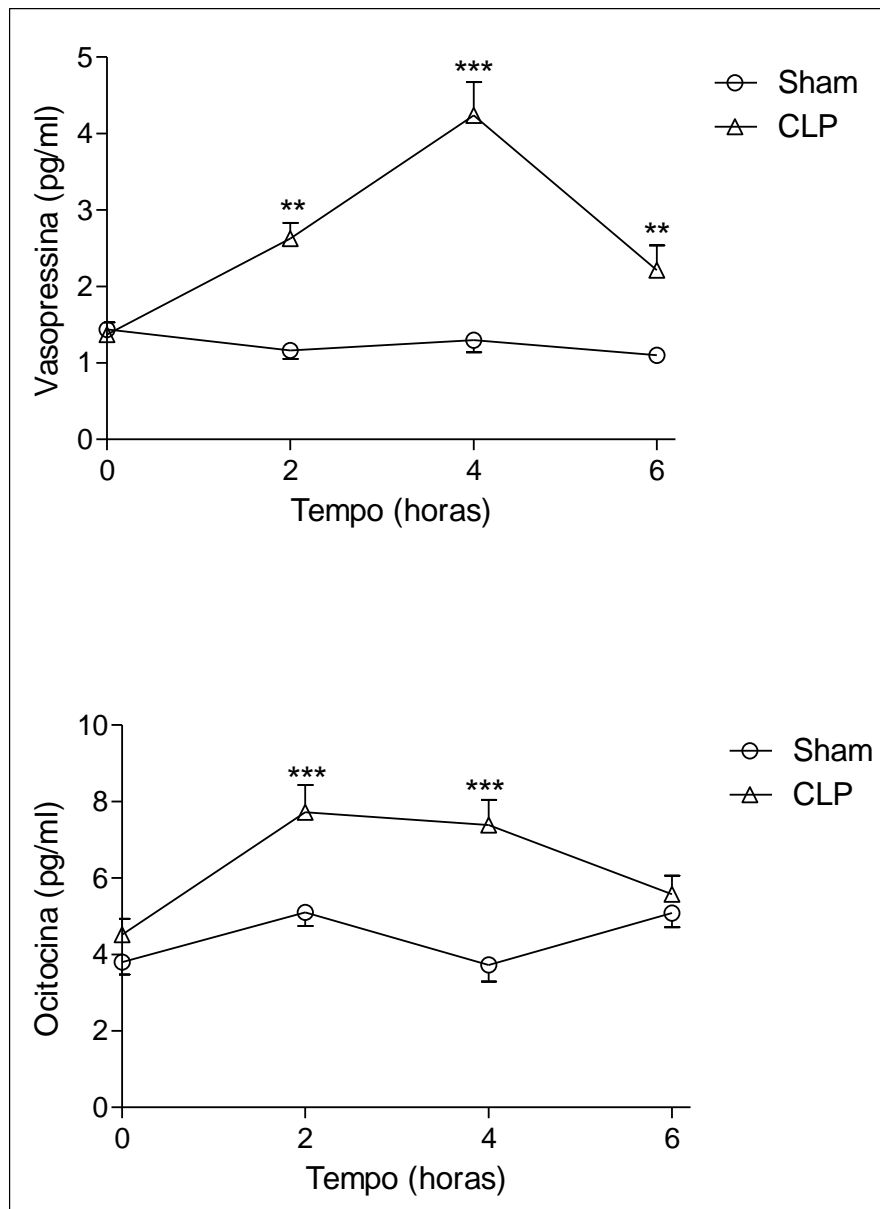


Figura 6. Concentração plasmática de vasopressina e ocitocina após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou Sham. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham (One way ANOVA).
Fonte: Do autor.

Após a cirurgia de CLP, observou-se um aumento na concentração plasmática do ANP ($p < 0,05$) e ANG II ($p < 0,001$) quando comparado com grupo Sham (Figura 7).

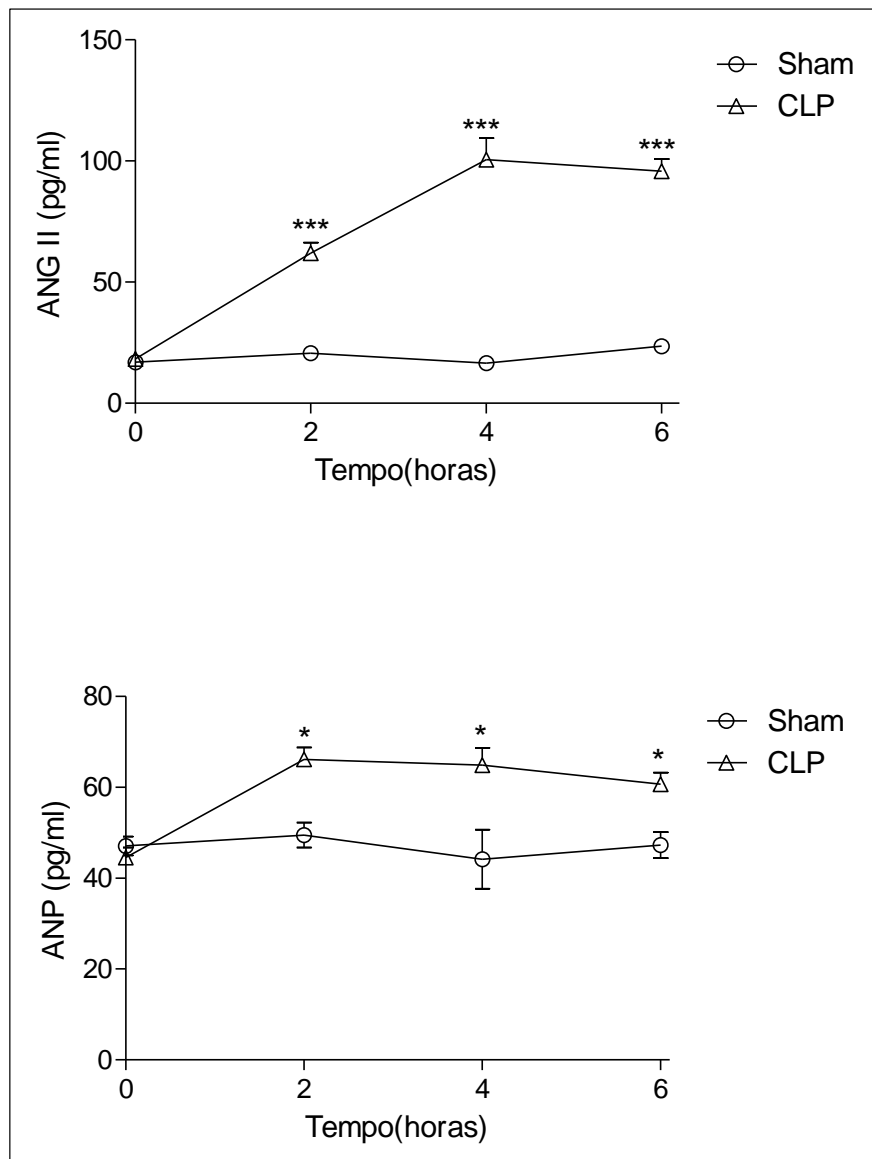


Figura 7. Concentração plasmática de ANP e ANG II após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou Sham sobre a concentrações plasmáticas de ANP e ANG II. * $p < 0,05$; *** $P < 0,001$ comparado ao grupo Sham (One way ANOVA).
Fonte: Do autor.

Após administração de SH (NaCl 7,5%, i.v.) observamos um aumento na osmolalidade plasmática durante 30 minutos em comparação aos grupos controles com salina isotônica ($p < 0,001$), mas não foi observada diferença no aumento da osmolalidade entre os grupos experimentais CLP + SH e Sham + SH. (Figura 8)

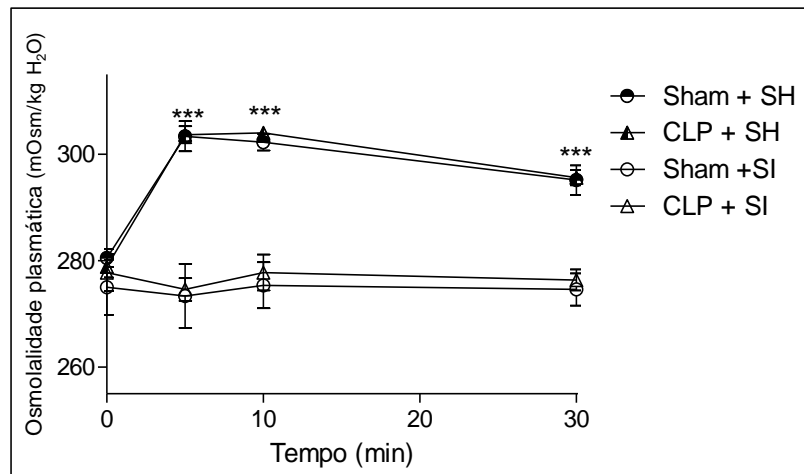


Figura 8. Efeito da administração de salina isotônica (SI; NaCl 0,9%; i.v.) e hipertônica (SH; NaCl 7,5%; i.v.) sobre a osmolaridade seis horas cirurgia de ligadura de perfuração cecal (CLP) ou Sham. *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo controle (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após administração de SH, houve aumento na concentração plasmática de AVP e OT nos dois grupos experimentais quando comparado com período anterior à administração ($p < 0,001$). No entanto, o aumento ($p < 0,05$) da concentração plasmática de vasopressina é maior no grupo CLP quando comparado com grupo Sham, somente 10 minutos após a administração de SH, pois 30 minutos após administração, a concentração de vasopressina no grupo CLP foi menor quando comparado com grupo Sham ($p < 0,05$) (Figura 9).

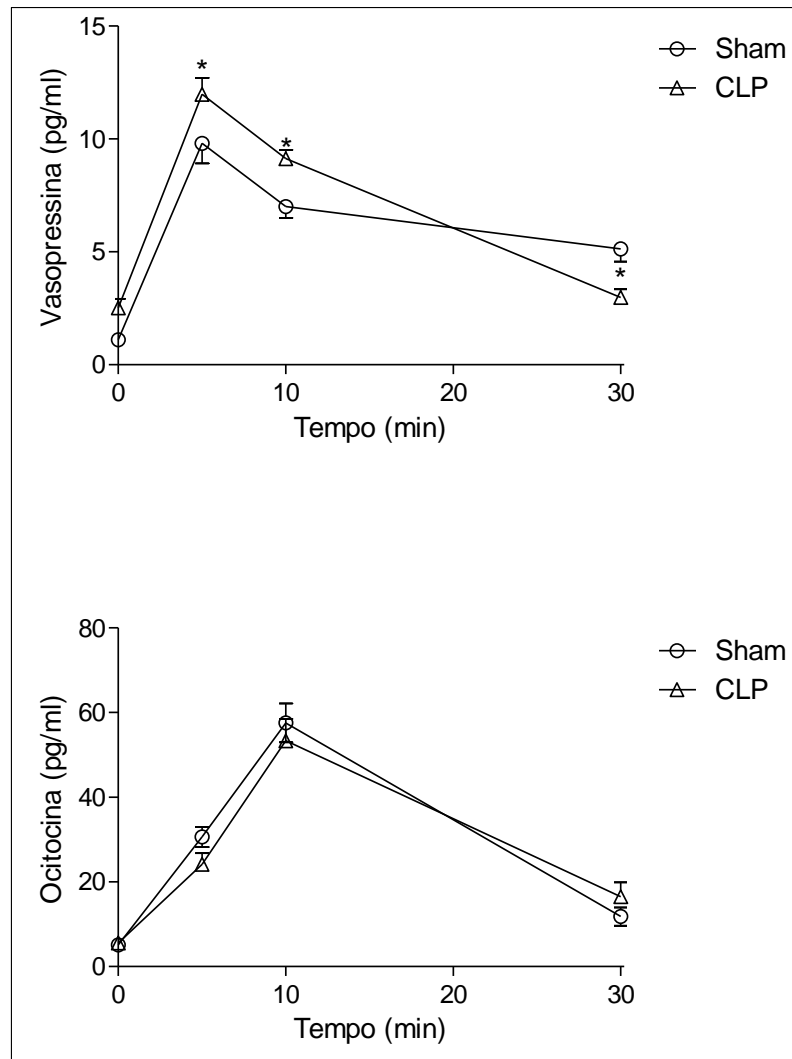


Figura 9. Concentração plasmática de vasopressina e ocitocina após a administração de salina hipertônica (NaCl 7,5%; i.v.) seis horas após a cirurgia de CLP ou Sham * $p < 0,05$ comparado ao grupo Sham (One way ANOVA).
Fonte: Do autor.

Após o estímulo com SH observamos um aumento ($p < 0,001$) na concentração plasmática de ANP e uma queda ($p < 0,001$) de ANG II nos dois grupos experimentais quando comparado com antes da administração de SH. O aumento da concentração plasmática de ANP não foi diferentes entre os grupos. No entanto, após a administração de SH o grupo CLP permaneceu com ANG II em maior concentração quando comparado com grupo Sham durante os 30 minutos analisados (Figura 10).

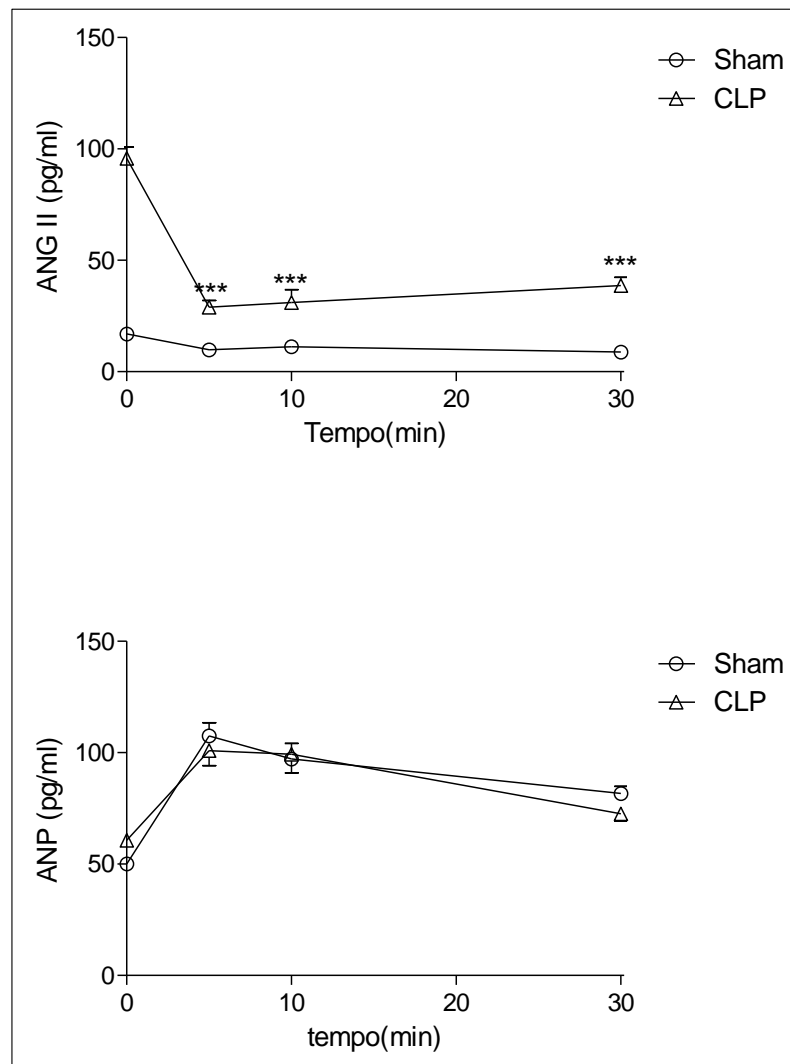


Figura 10. Concentração plasmática de ANP e ANG II após a administração de salina hipertônica (NaCl 7,5%; i.v.) seis horas após a cirurgia de CLP ou Sham. ***P<0,001 comparado ao grupo Sham (One way ANOVA).
Fonte: Do autor.

Após administração prévia (30 minutos antes da administração de SH) de L-Name (i.c.v.; 250µg/2µl), observou-se maior ($p<0,001$) concentração plasmática de AVP 5 e 30 minutos após a administração de SH nos animais submetidos à cirurgia de CLP quando comparado com grupo CLP + Salina+ SH, como demonstrado na figura 11.

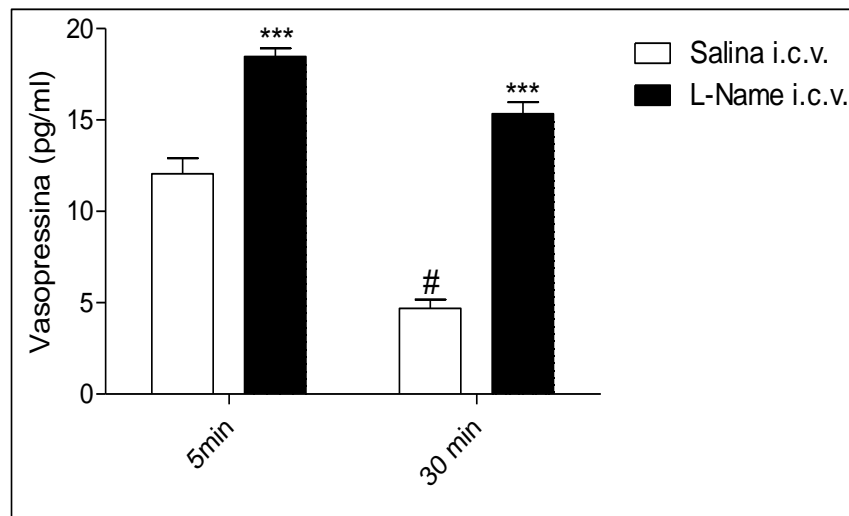


Figura 11. Efeito da administração prévia de L-Name i.c.v. (250 μ g/2 μ l) sobre a concentração plasmática de vasopressina 5 e 30 minutos após a salina hipertônica (NaCl 7,5%; i.v.) seis horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP). ***P<0,001 quando comparado ao grupo salina. #p<0,05 quando comparado ao grupo salina 5 min (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Administração prévia de L-Name também promoveu um maior aumento da PAM após a administração de SH quando comparado com o grupo CLP + Salina + SH. Não foi detectada diferença na FC durante o período analisado (Figura 12)

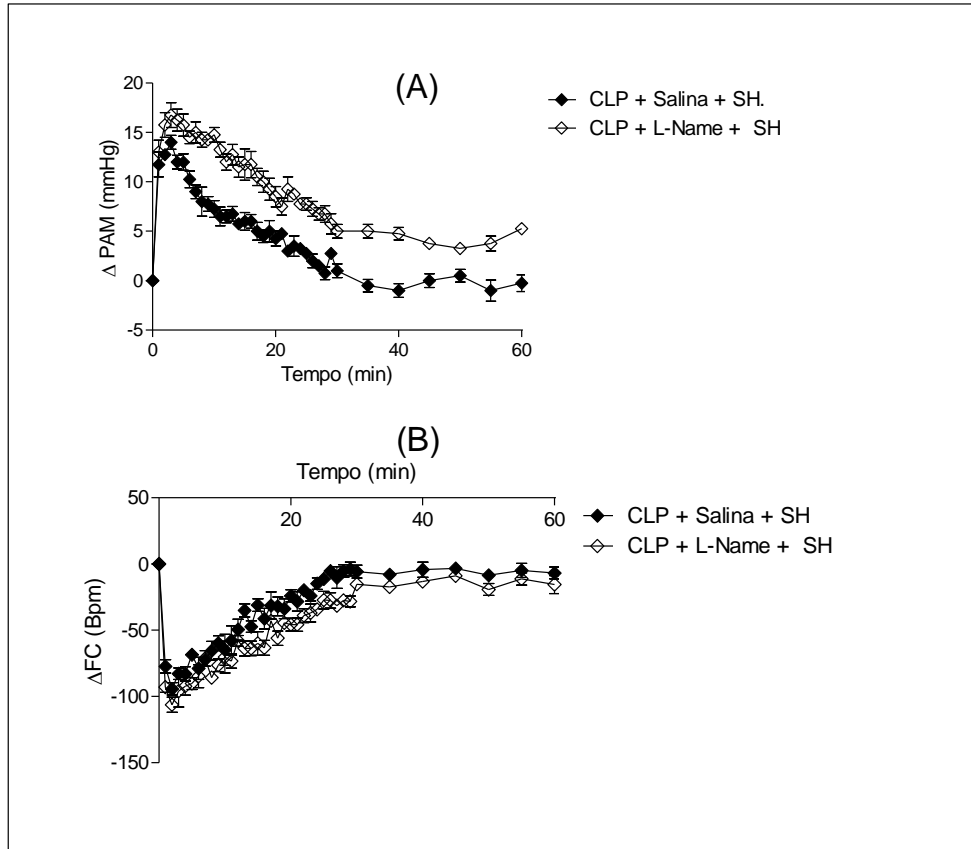


Figura 12. Efeito da administração prévia de L-Name i.c.v. 30 minutos antes da infusão de salina hipertônica (SH; NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v) sobre alterações de pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) seis horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

As figuras 13 e 14 demonstram que não houve diferença na osmolalidade plasmática e na concentração de AVP entre o grupos CLP e Sham após a aplicação de duas SH.

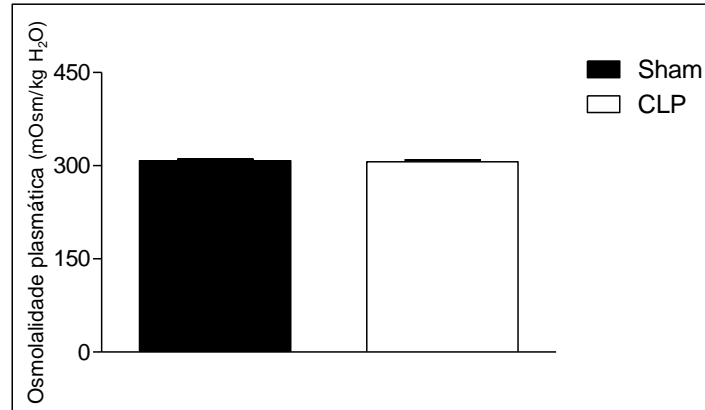


Figura 13. Efeito de duas infusões de salina hipertônica (NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.), em intervalo de 30 minutos, sobre a osmolalidade sérica seis horas após a cirurgia de ligação e perfuração cecal (CLP) ou Sham (Test t).
Fonte: Do autor.

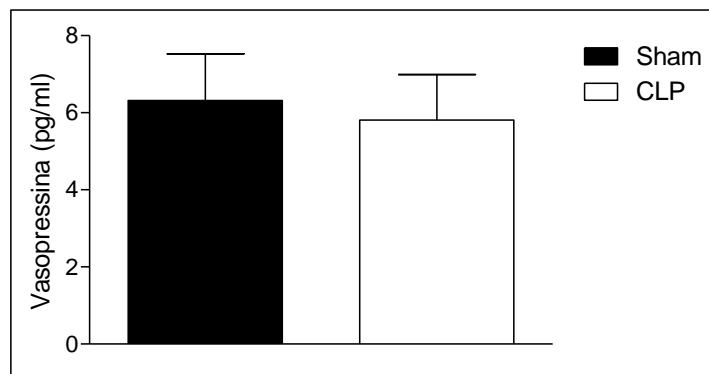


Figura 14. Efeito de duas infusões de salina hipertônica (NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) em intervalo de 30 minutos sobre a concentração plasmática de vasopressina seis horas após a cirurgia de ligação e perfuração cecal (CLP) ou Sham (Test t).
Fonte: Do autor.

A SH promoveu aumento da PAM imediatamente após a sua aplicação persistindo por aproximadamente 30 minutos. O aumento da PAM foi acompanhado de uma queda da FC. Após uma segunda aplicação (30 minutos após a primeira aplicação), novamente observa-se aumento da PAM e queda da FC sem diferença entre os grupos experimentais (Figura 15)

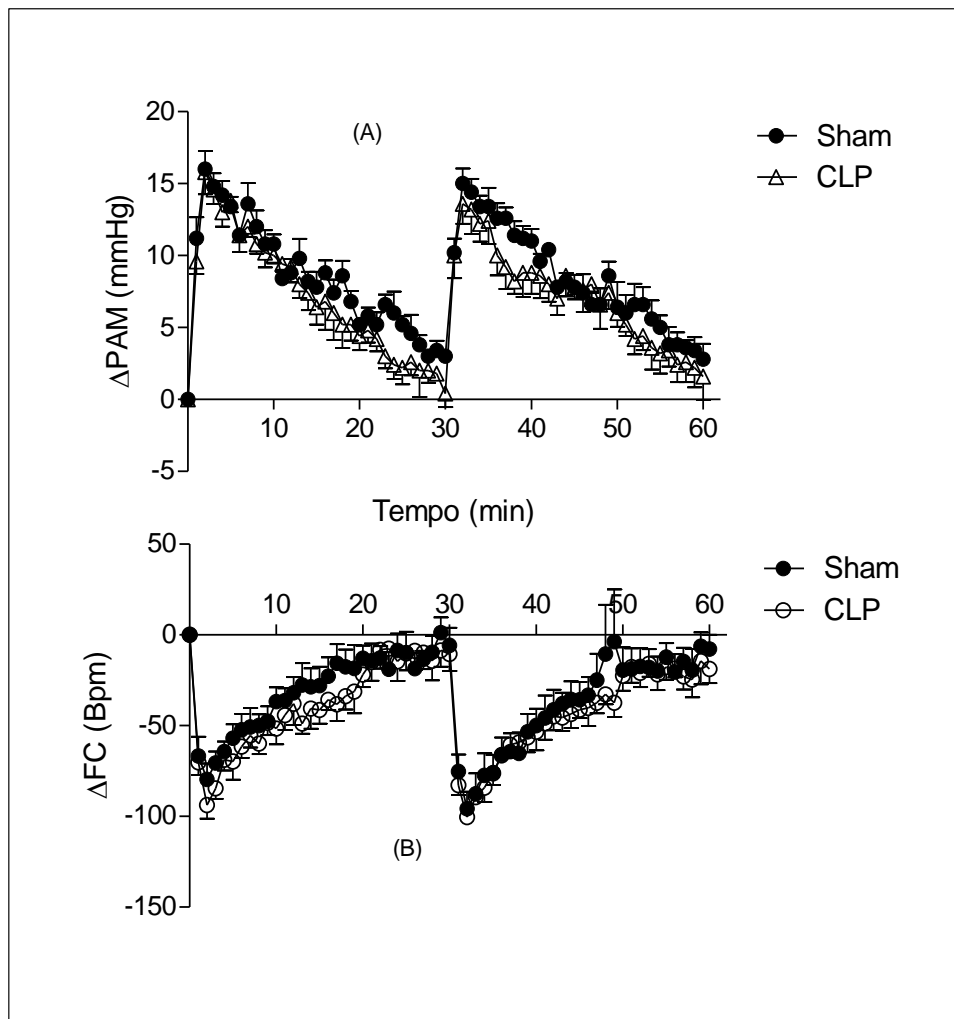


Figura 15. Efeito de duas infusões de SH, em intervalos de 30 min, sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B). NaCl 7,5%; (4ml/kg; i.v.) foi administrado 6 horas e 6 horas e trinta min após a cirurgia de ligação e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

5.3 EFEITO DA EXPANSÃO COM HIDROXIETILAMIDO (HES) 130/0,4 DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

A expansão de volume sanguíneo com hidroxietilamido 6% hipertônica (Hyper-HES) (NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) seis horas após a cirurgia de CLP promoveu aumento da concentração de sódio plasmático, aumento da osmolalidade plasmática, e a redução do hematócrito 30 minutos após a expansão quando comparado com período anterior à expansão ($p < 0,001$). A expansão de volume sanguíneo com hidroxietilamido (HES) isotônico não promoveu diferença significativa quando comparado com período anterior à expansão

na concentração plasmática de sódio e osmolalidade, mas promoveu redução do hematócrito, em todas as doses (Figura 16, 17 e 18).

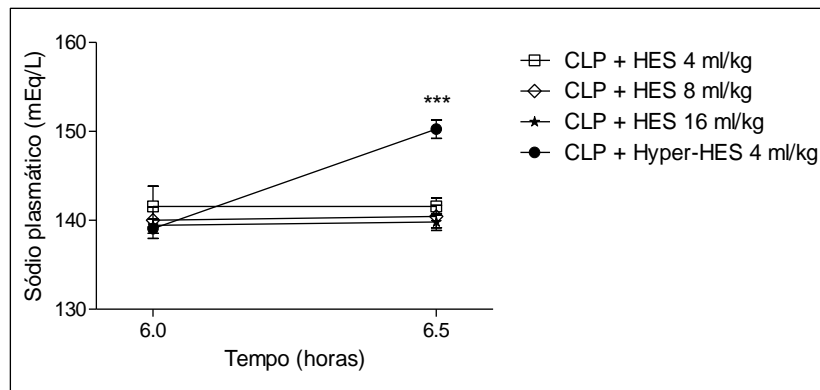


Figura 16. Alteração do sódio plasmático após administração de hidroxietilamido (HES) 6% isotônico (NaCl 0,9%; 4ml/kg; 8ml/kg; 16ml/kg; i.v.) e hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) nos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP). *** $p < 0,001$ comparado ao tempo anterior a administração (One way ANOVA).

Fonte: Do autor.

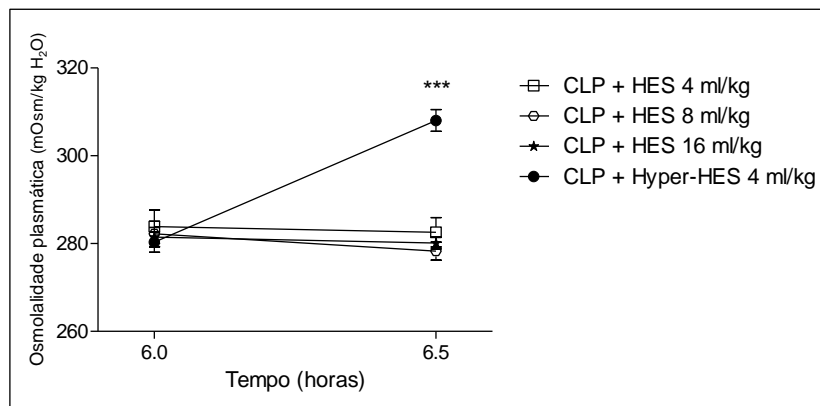


Figura 17: Alteração da osmolalidade plasmática após administração de hidroxietilamido (HES) 6% isotônico (NaCl 0,9%; 4ml/kg; 8ml/kg; 16ml/kg; i.v.) e hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) nos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP). *** $p < 0,001$ comparado ao tempo anterior a administração (One way ANOVA).

Fonte: Do autor.

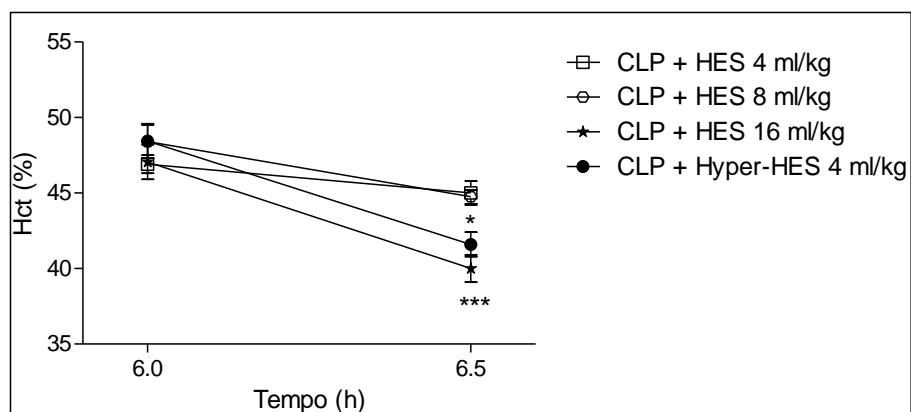


Figura 18. Alteração do hematócrito após administração de hidroxietilamido (HES) 6% isotônico (NaCl 0,9%; 4ml/kg; 8ml/kg; 16ml/kg; i.v.) e hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; 4ml/kg; i.v.) nos animais submetidos ao choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP).. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado ao tempo anterior a administração (One way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Todos os grupos experimentais submetidos à cirurgia de CLP tiveram uma queda significativa da PAM e um aumento de FC a partir da segunda hora, como descrito anteriormente. Após o tratamento com HES (independente da dose) ou hyper-HES, 6 horas após o CLP não foi observado alteração de PAM e FC 12 e 24 horas após CLP (Figura 19 e 20).

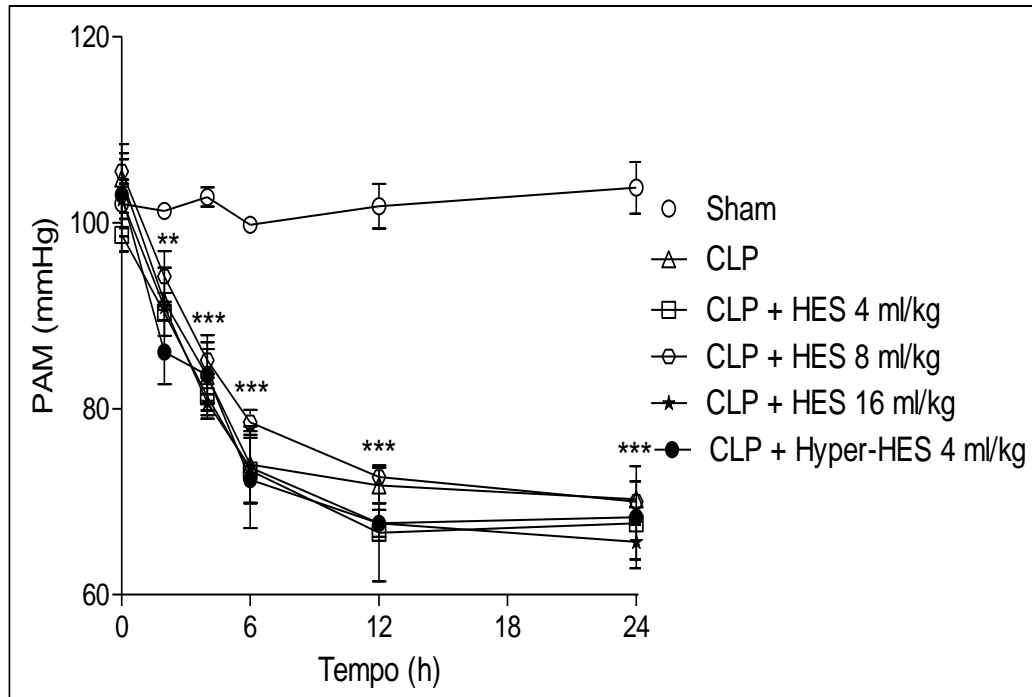


Figura 19. Efeito da administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/Kg sobre a pressão arterial durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao Sham.

Fonte: Do autor (One way ANOVA).

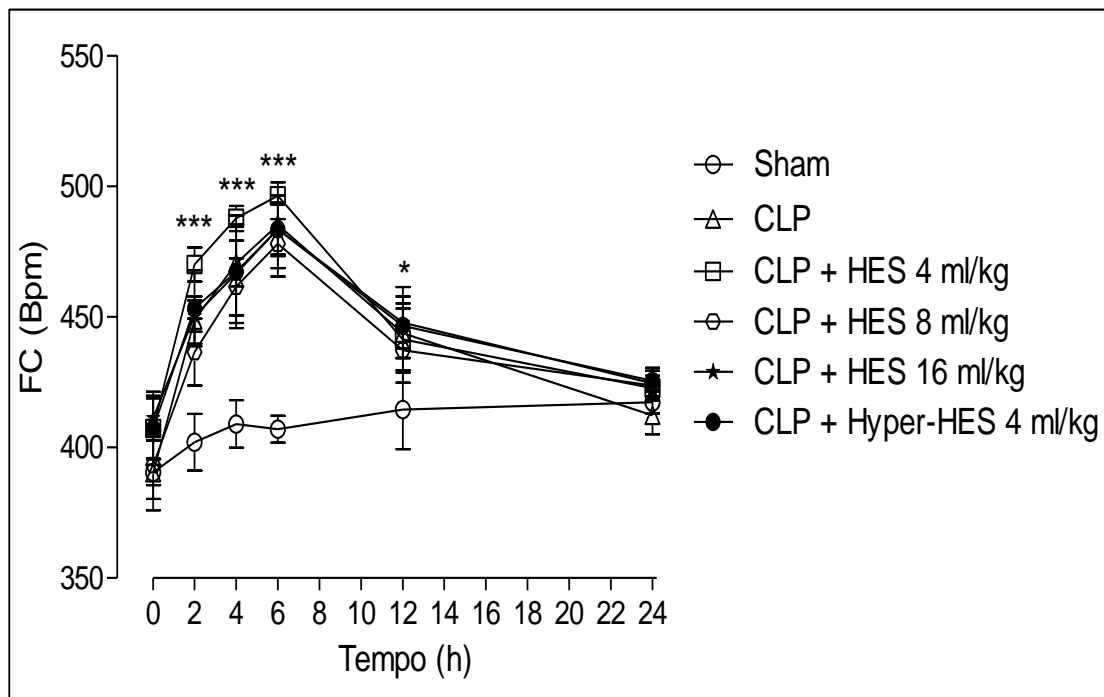


Figura 20. Efeito da administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/Kg sobre a frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico induzido pela CLP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ comparado ao Sham (One way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Alterações de PAM e FC foram observadas quando houve o acompanhamento minuto a minuto após a expansão. A expansão com Hyper-HES promoveu significativo aumento da PAM que persistiu durante uma hora, acompanhado de uma queda significativa da FC. No entanto, a expansão isotônica com HES 4ml/kg; 8ml/kg; 16ml/kg não promoveu alterações significantes da PAM, mas houve uma queda da FC dose dependente, como descrito na figura 21 e 22.

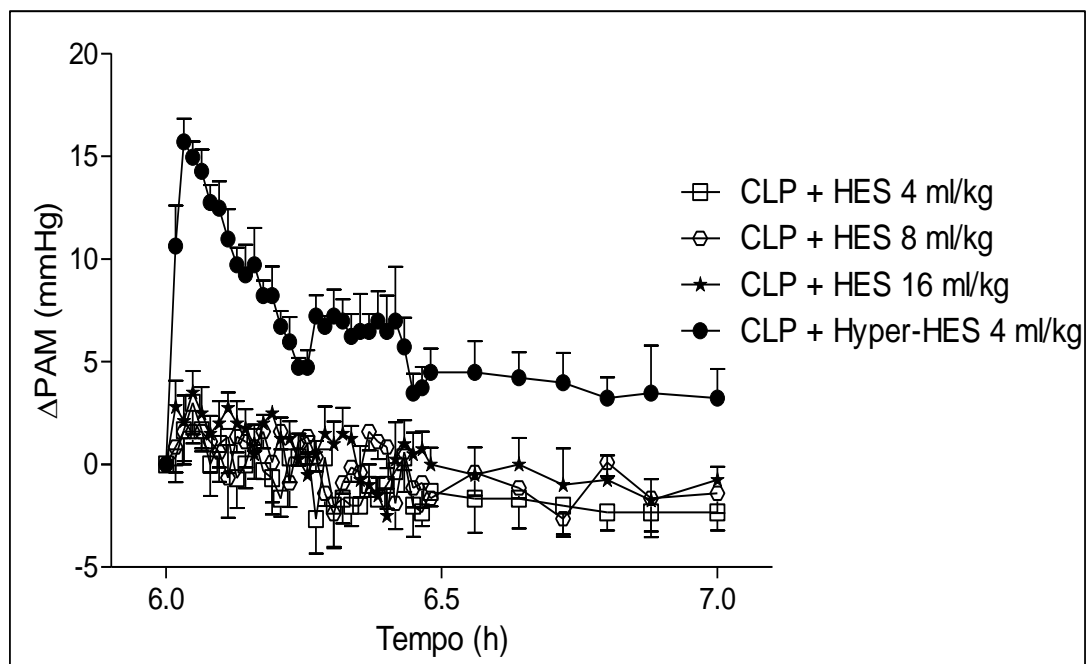


Figura 21. Efeito agudo (no momento da aplicação) da administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/Kg sobre a pressão arterial média (PAM) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

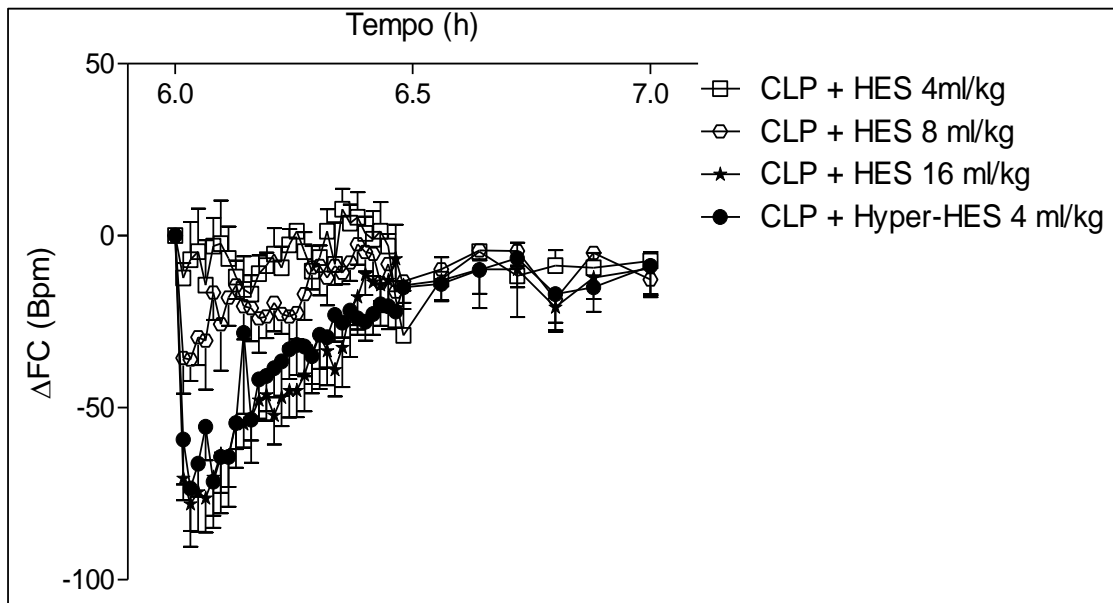


Figura 22. Efeito agudo (no momento da aplicação) da administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/Kg sobre a frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

A expansão com Hyper-HES promoveu aumento ($p<0,001$) significativo na concentração plasmática de AVP e OT cinco minutos após a expansão (6 horas após o CLP), enquanto a expansão com HES isotônico não promoveu nenhuma alteração na concentração plasmática desses hormônios, com exceção a expansão com HES 16 ml/kg que promoveu significativo aumento ($p<0,001$) de ocitocina (Figura 23 e 24).

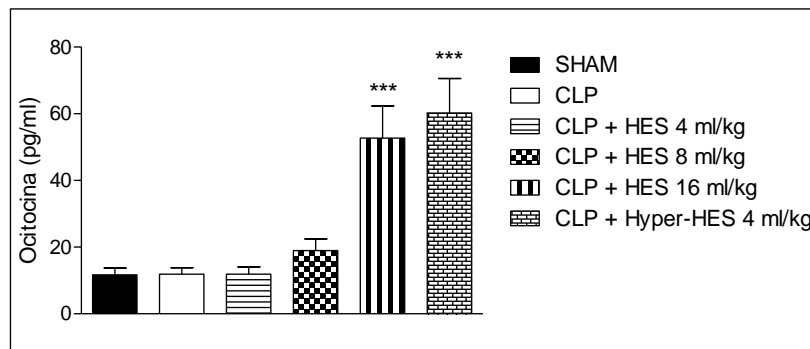


Figura 23. Concentração plasmática de ocitocina cinco minutos após a administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/kg durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP). *** $p<0,001$ comparado ao grupo CLP (One way ANOVA).

Fonte: Do autor.

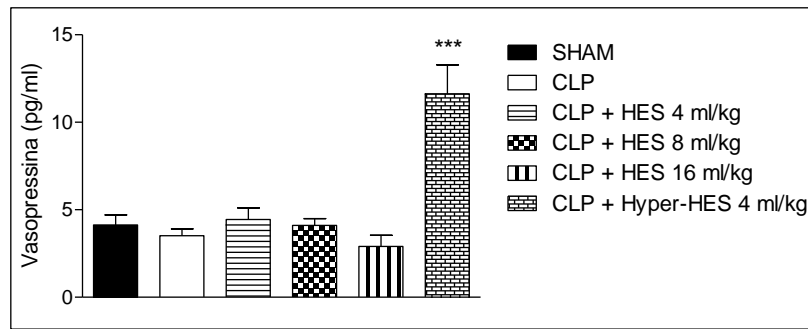


Figura 24. Concentração plasmática de vasopressina cinco minutos após a administração de hidroxietilamido 6% (HES) isotônico (NaCl 0,9%; i.v.) nas doses de 4, 8, 16 ml/Kg ou hidroxietilamido hipertônico (Hyper-HES; NaCl 7,5%; i.v.) na dose de 4 ml/kg durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP). *** $p < 0,001$ comparado ao grupo CLP (One way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Como descrito anteriormente, a expansão com Hyper-HES promoveu aumento da PAM e queda da FC. Quando administrado previamente (5 minutos antes da expansão) o antagonista de vasopressina (20ng/kg; i.v.) não observamos o aumento da PAM após a expansão com Hyper-HES, não alterando a queda da FC. Administração prévia do antagonista de ocitocina (1mg/kg; i.v.) não promove nenhuma alteração nas respostas analisadas após expansão com Hyper-HES (Figura 25 e 26).

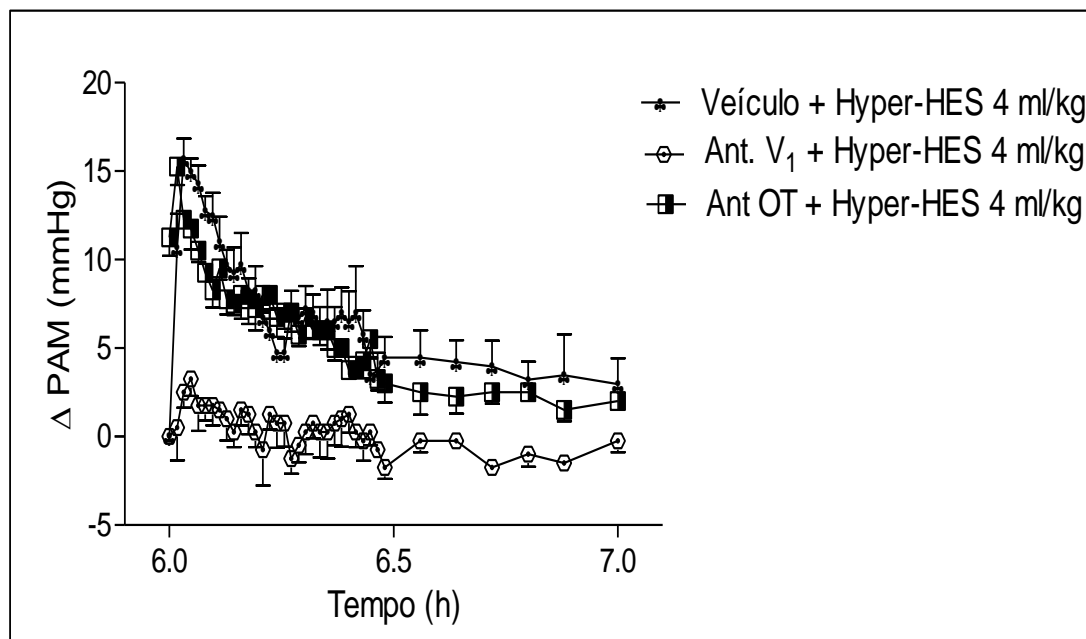


Figura 25. Efeito da administração prévia do antagonista de vasopressina (Ant. V₁; i.v.) e ocitocina (Ant. OT; i.v.) após expansão com hidroxietilamido 6% hipertônico (Hyper-HES; 4ml/kg; NaCl 7,5%; i.v.) sobre pressão arterial média (PAM) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

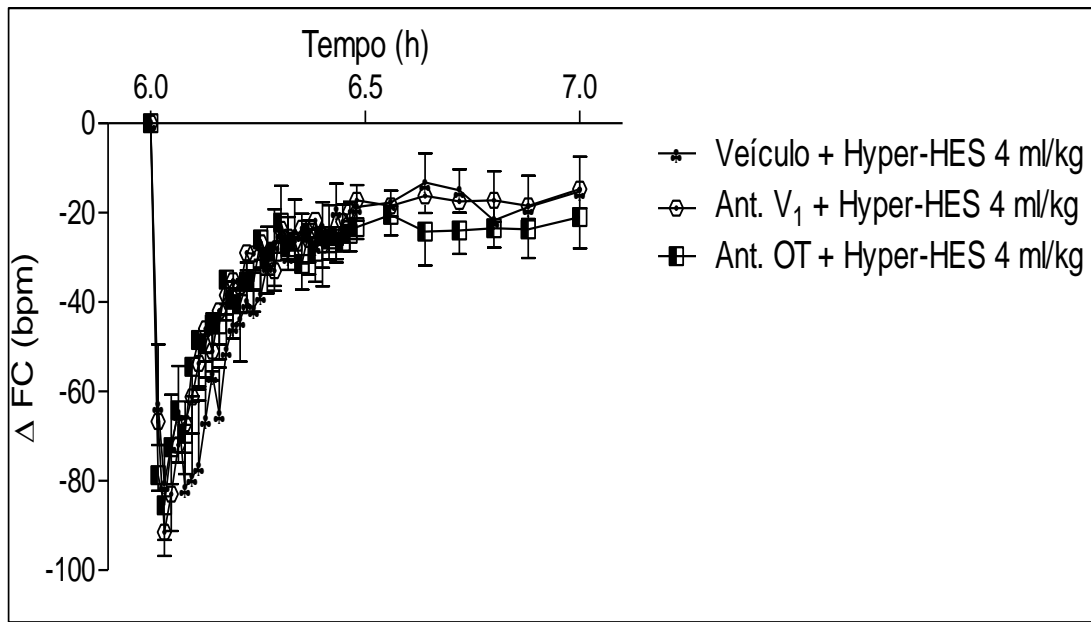


Figura 26: Efeito da administração prévia do antagonista de vasopressina (Ant. V₁; i.v.) e ocitocina (Ant. OT; i.v.) após expansão com hidroxietilamido 6% hipertônico (Hyper-HES; 4ml/kg; NaCl 7,5%; i.v.) sobre frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor

Como descrito anteriormente, a expansão isotônica com HES 16 ml/kg não promoveu aumento da PAM, mas é observada uma redução da FC. Quando administrado previamente, o antagonista de ocitocina (1mg/kg; i.v.) não alterou a resposta pressórica de FC frente a expansão isotônica com HES 16 mL/kg (Figuras 27 e 28).

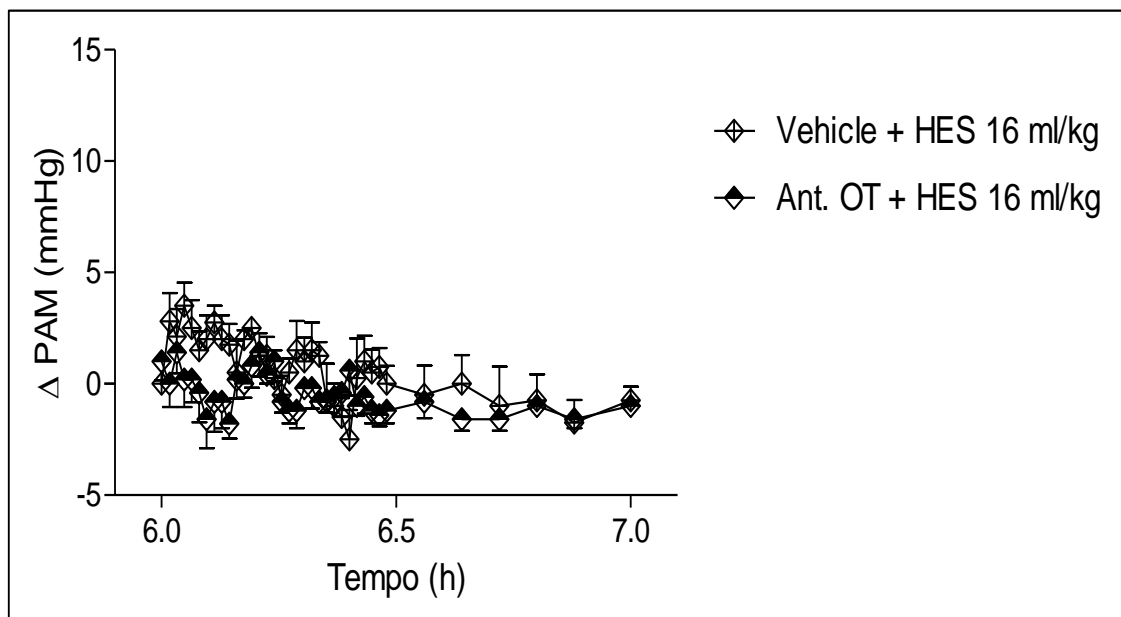


Figura 27. Efeito da administração prévia do antagonista de ocitocina (Ant. OT; i.v.) após expansão com hidroxietilamido 6% isotônico (HES) 16 ml/kg i.v. sobre a pressão arterial média (PAM) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

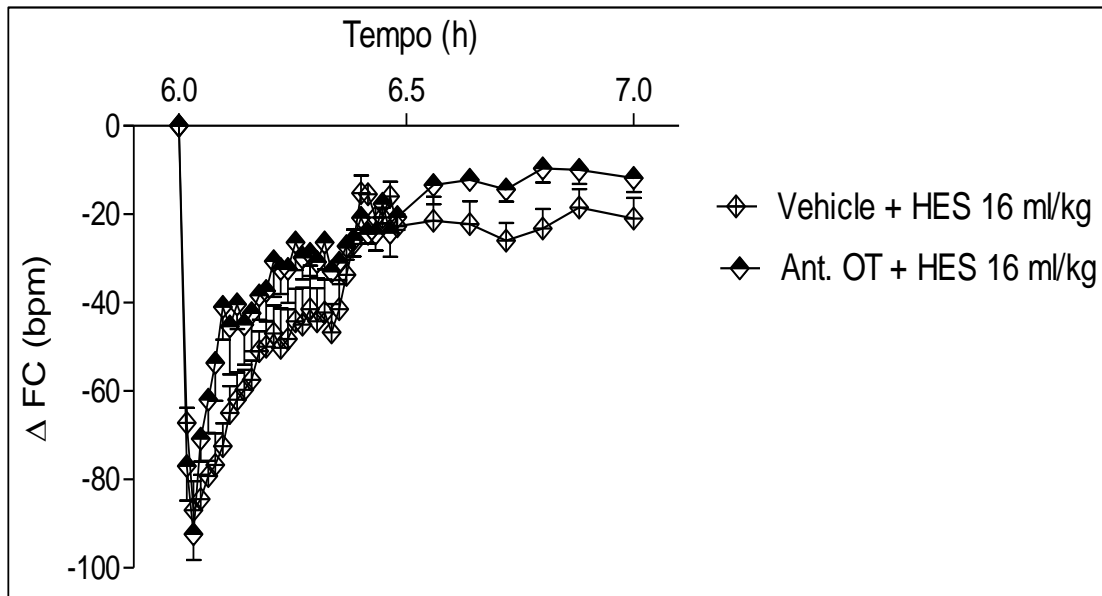


Figura 28. Efeito da administração prévia do antagonista de ocitocina (Ant. OT; i.v.) após expansão com hidroxietilamido 6% isotônico (HES) 16 ml/kg i.v. sobre a frequência cardíaca (FC) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor

5.4 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

O quimiorreceptor periférico foi ativado através de injeção de cianeto de potássio (KCN; 40 μ g/0.1 mL; i.v.) 24 horas após CLP ou cirurgia fictícia (SHAM). Vinte e quatro horas após a cirurgia CLP foi observada atenuação da resposta pressora ($p < 0,001$), bradicárdica ($p < 0,001$) e taquipnéica ($p < 0,001$) em resposta ao KCN quando comparado com Sham (Figura 29)

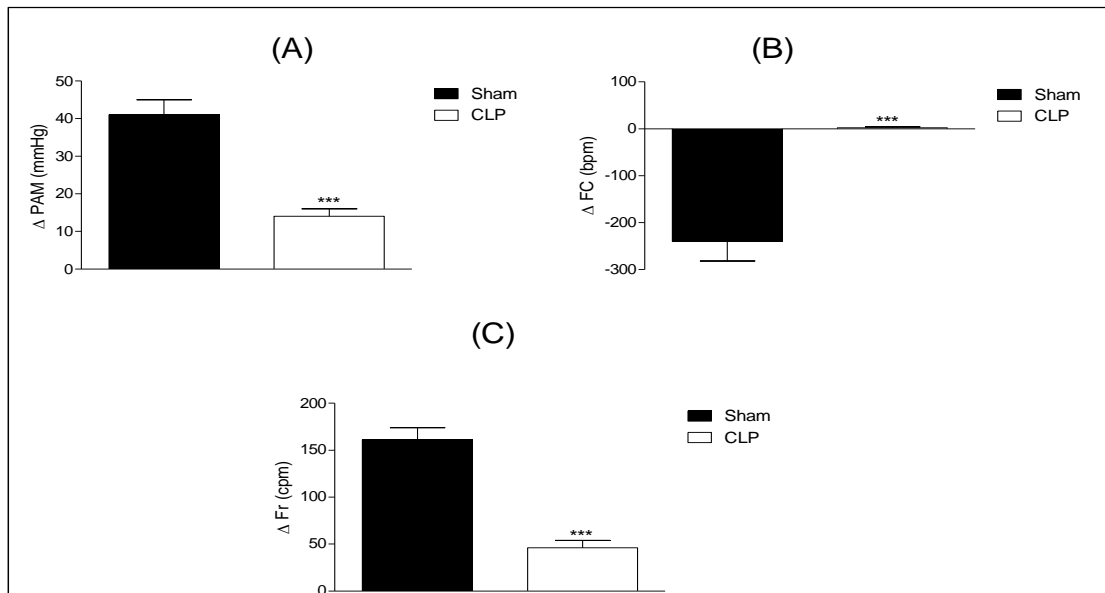


Figura 29. Efeito da administração de cianeto de potássio (40 μ g/0,1ml; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e frequência respiratória (Fr; C) 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham (Test t).

Fonte: Do autor.

O teste do barorreflexo foi avaliado através da injeção i.v. de fenilefrina (Phe; 5 μ g/kg) e nitroprussiato de sódio (NPS; 30 μ g/kg) 24 horas após CLP ou SHAM. CLP atenuou ambas as respostas, pressora ($p < 0,001$) e bradicárdica ($p < 0,001$) da Phe (Figura 30). Por outro lado, a cirurgia CLP atenuou somente a resposta taquicárdica do NPS ($p < 0,001$) mas não a pressórica (Figura 31).

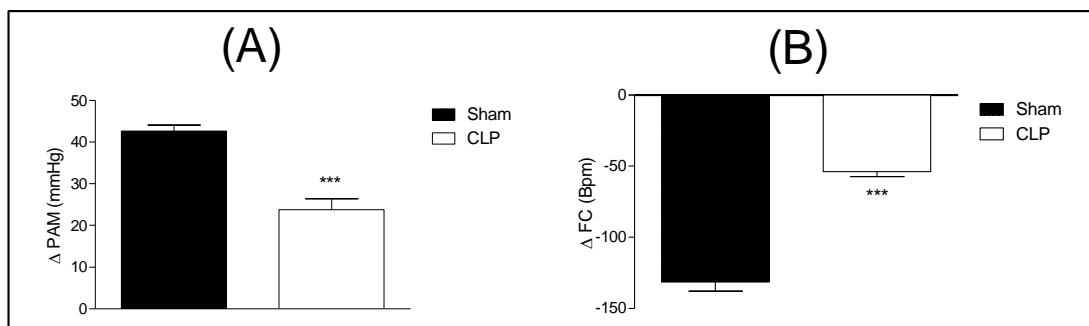


Figura 30. Efeito da administração de fenilefrina (5 μ g/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham (Test t).

Fonte: Do autor.

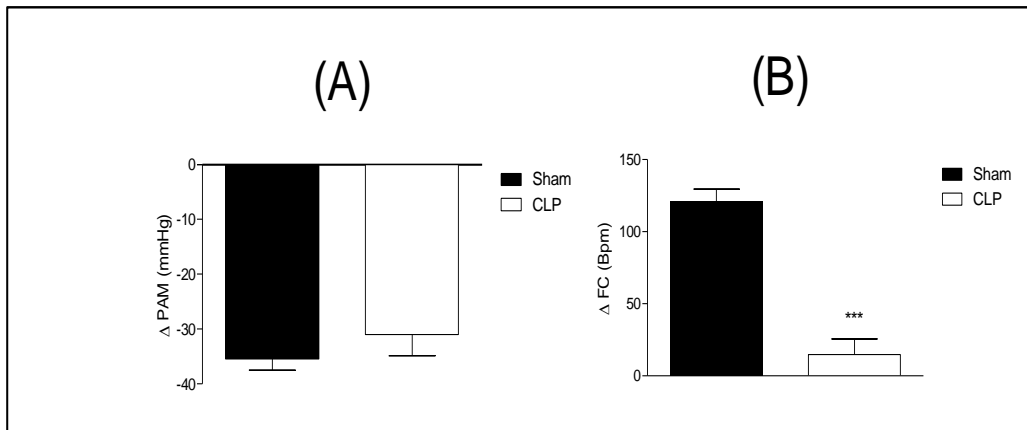


Figura 31. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio (30 μ g/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham (Test t).
Fonte: Do autor.

Trinta minutos antes dos desafios foi administrado i.c.v. L-Name (250 μ g/2 μ L) 24 horas após o CLP ou Sham. O L-Name após trinta minutos promoveu um aumento da pressão arterial maior no grupo CLP comparado com grupo Sham ($P < 0,001$) (Figura 32).

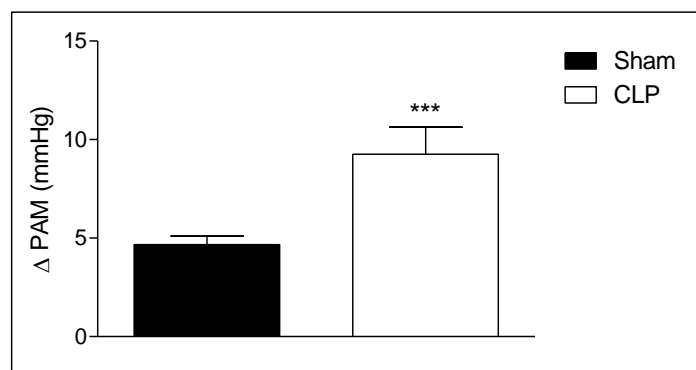


Figura 32. Efeito da administração de L-NAME i.c.v. (250 μ g mg/2 μ L) sobre a pressão arterial média (PAM) 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham.
Fonte: Do autor.

Após 30 minutos da aplicação do L-Name i.c.v repetiu-se o teste com administração de KCN i.v. 24 horas após CLP ou Sham. Administração prévia de L-Name i.c.v. não alterou as respostas reflexas do KCN (PAM, FC e Fr) quando comparado com grupo Sham + Salina i.c.v. O mesmo é observado no grupo submetido à cirurgia de CLP, o L-Name não promoveu alteração da PAM e FC, com exceção da Fr que promoveu uma atenuação da queda

($p < 0,05$) quando comparado com o grupo submetido ao CLP + salina i.c.v. após o estímulo com KCN (Figura 33).

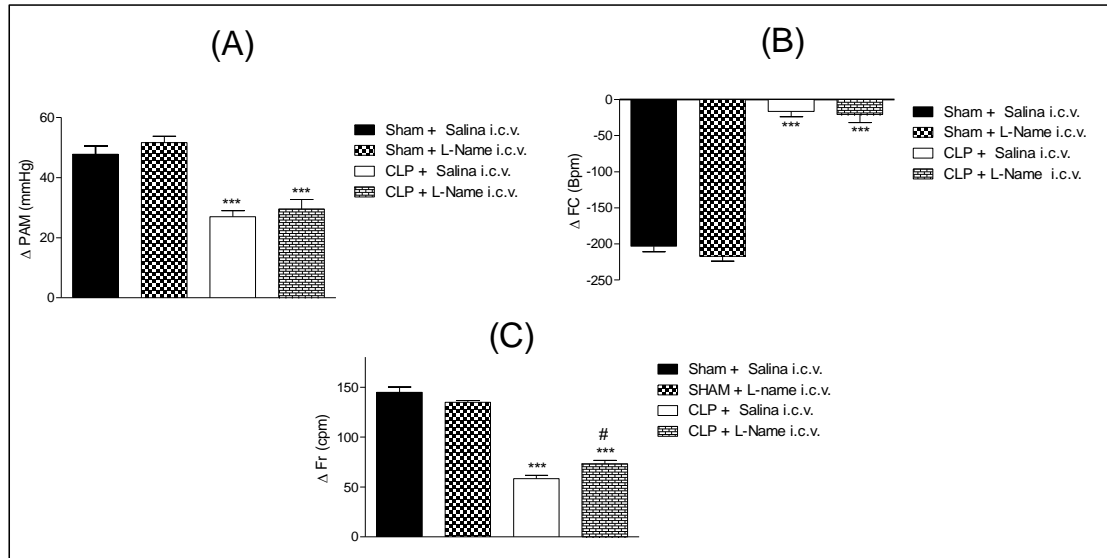


Figura 33. Efeito da administração do cianeto de potássio (40 μ g/0,1ml; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e frequência respiratória (Fr; C) 30 minutos após aplicação de L-NAME ic.v. 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham; # $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP+salina i.c.v. (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Administração prévia de L-Name i.c.v não alterou as respostas da PAM e FC após a administração de Phe e NPS 24 horas após CLP quando comparado com o grupo CLP + Salina i.c.v. como demonstrado nas figuras 34 e 35.

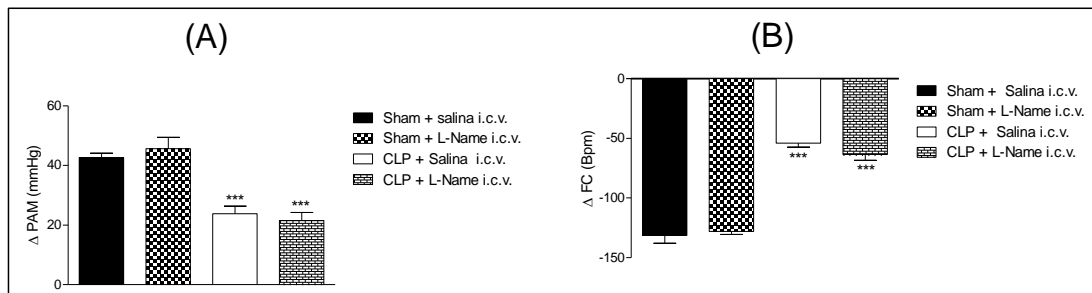


Figura 34. Efeito da administração de fenilefrina (5 μ g/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 30 minutos após aplicação de L-NAME ic.v. 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos. *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

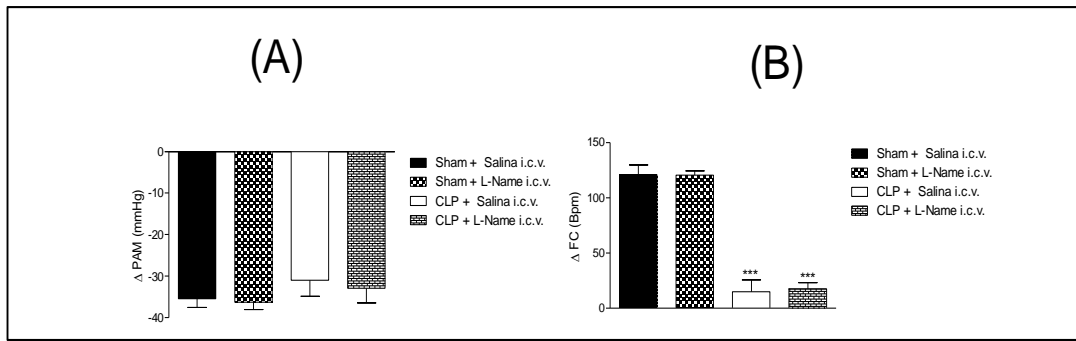


Figura 35. Efeito da administração de nitroprussiato de sódio ($30\mu\text{g}/\text{kg}$; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 30 minutos após aplicação de L-NAME ic.v. 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham (Two way ANOVA)

Fonte: Do autor.

Foi restaurada a pressão arterial dos animais 24 horas após a cirurgia de CLP associada à administração de com L-Name ($20\text{mg}/\text{kg}$; i.v.) e com infusão contínua de Phe ($0,75\mu\text{g}/0,03\text{mL}/\text{min}$; i.v.). Dez minutos após a administração i.v., o L-Name promoveu um aumento da PAM para $107,5 \pm 6,97$ mmHg enquanto a perfusão contínua com Phe promoveu um aumento para $97,250 \pm 5,9$ mmHg quando comparado com grupo que foi administrado salina ($72,8 \pm 4,8$ mmHg) (Figura 36)

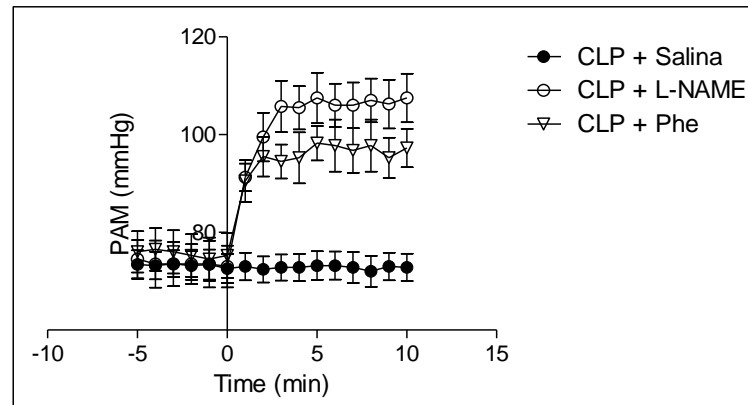


Figura 36. Efeito da administração de L-NAME ($20\text{mg}/\text{kg}$; i.v.) e infusão contínua de Fenilefrina (Phe; $0,75\mu\text{g}/0,03\text{mL}/\text{min}$; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após a PAM ser restaurada nos animais submetidos ao CLP, foram repetidos os testes com KCN, Phe e NPS. Para o desafio com KCN, a restauração da PAM não promoveu nenhuma modificação das respostas quando analisadas a FC e a Fr. Em relação a resposta ao desafio com KCN, a restauração da PAM somente com L-Name promoveu uma melhor resposta pressórica ($p < 0,05$) quando comparado com grupo que foi

administrada salina, enquanto a restauração da PAM com infusão contínua de Phe não promoveu nenhuma modificação (figura 37)

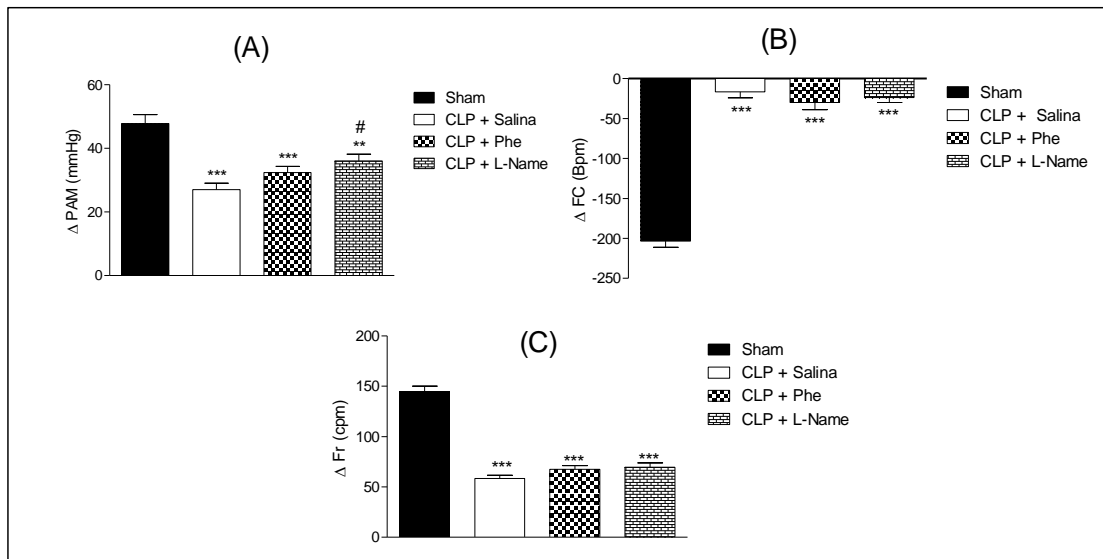


Figura 37. Efeito da administração de cianeto de potássio (40 μ g/0,1ml;i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e frequência respiratória (Fr; C) após restauração da PAM com L-NAME (20mg/kg;i.v) ou infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75 μ g/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP)** p<0,01; ***p<0,001 quando comparado ao grupo Sham; # p<0,05 quando comparado ao grupo CLP (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Quando analisadas as figuras 38 e 39 observa-se que a restauração da PAM com L-Name e Phe não promoveu nenhuma modificação nas respostas aos desafios com NPS e Phe. Somente quando foi analisada a resposta frente ao desafio com Phe, a restauração com L-Name reverteu a queda da resposta quando comparado com grupo CLP + Salina.

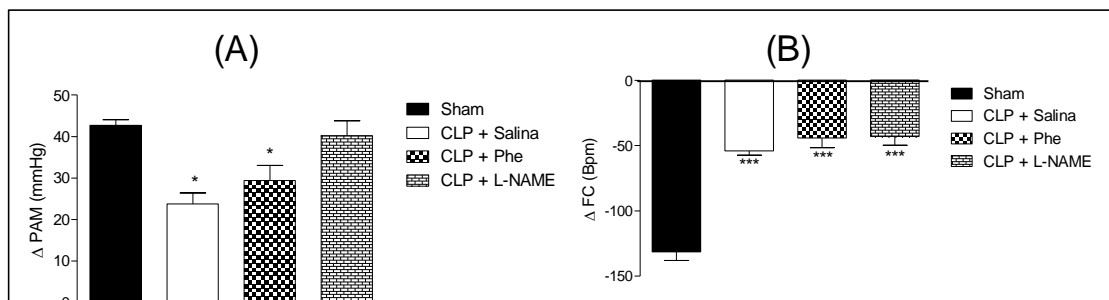


Figura 38. Efeito da administração de fenilefrina (5 μ g/kg; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) após restauração da PAM com L-NAME (20mg/kg;i.v) ou infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75 μ g/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP). *p<0,5; ***p<0,001 quando comparado ao grupo Sham (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

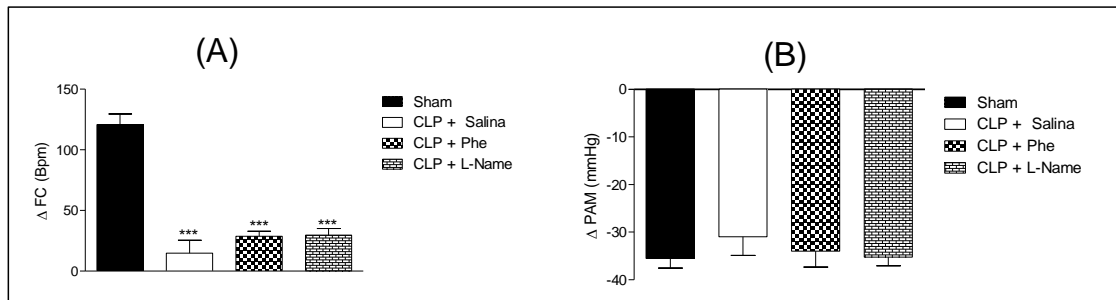


Figura 39. Efeito da administração de nitroprussiato ($30\mu\text{g}/\text{kg}$; i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) após restauração da PAM com L-NAME ($20\text{mg}/\text{kg}$; i.v) ou infusão contínua de fenilefrina (Phe; $0,75\mu\text{g}/0,03\text{ml}/\text{min}$; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP). *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Sham (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Com a PAM restaurada, foi verificada a sensibilidade do barorreflexo. A sensibilidade barorreflexa dos animais submetidos a cirurgia CLP está diminuída quando comparado com controle (sham) ($p < 0,05$). A restauração com L-Name ou com infusão contínua de Phe não promoveu nenhuma mudança na sensibilidade barorreflexa dos animais submetidos a cirurgia de CLP como demonstrado na figura 40.

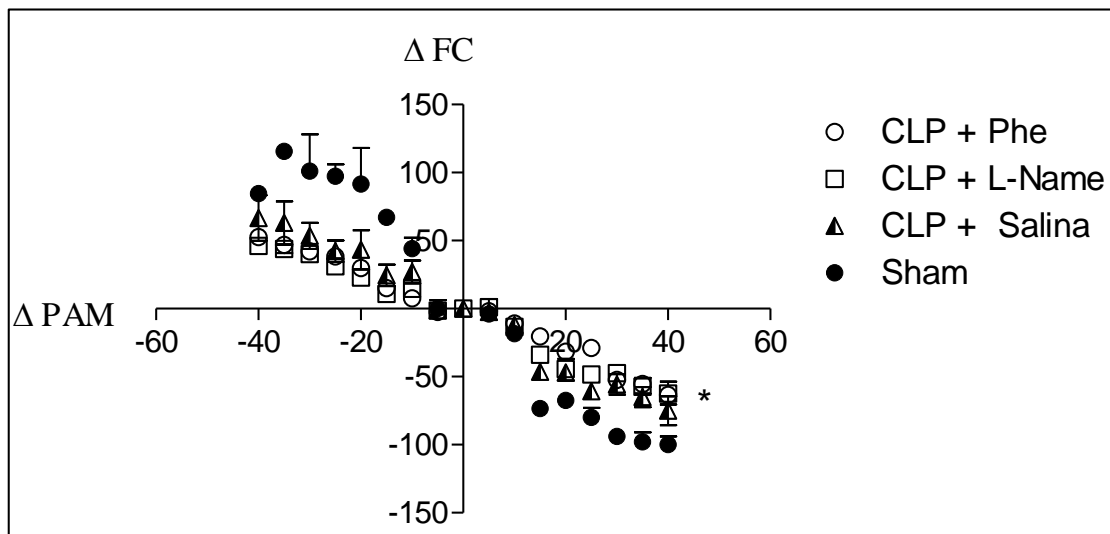


Figura 40. Avaliação da sensibilidade barorreflexa 24 horas após a cirurgia de ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham) em ratos com pressão arterial média restaurada com L-NAME ($20\text{mg}/\text{kg}$; i.v) ou infusão contínua de fenilefrina (Phe; $0,75\mu\text{g}/0,03\text{ml}/\text{min}$; i.v.). * $p < 0,05$ quando comparado ao Sham (test área sobre a curva).

Fonte: Do autor.

Analisando a figura 41, os animais Sham tratados com ANG II ($50\text{ng}/\mu\text{l}$; i.c.v.) apresentaram um aumento na PAM ($P < 0,001$). Animais submetidos ao CLP tratados com ANG II i.c.v. também apresentaram aumento na PAM ($P < 0,001$) quando comparados ao grupo CLP + salina, mas esse aumento foi menor quando comparado com grupo Sham + ANG II. A frequência cardíaca não teve diferença entre os grupos experimentais.

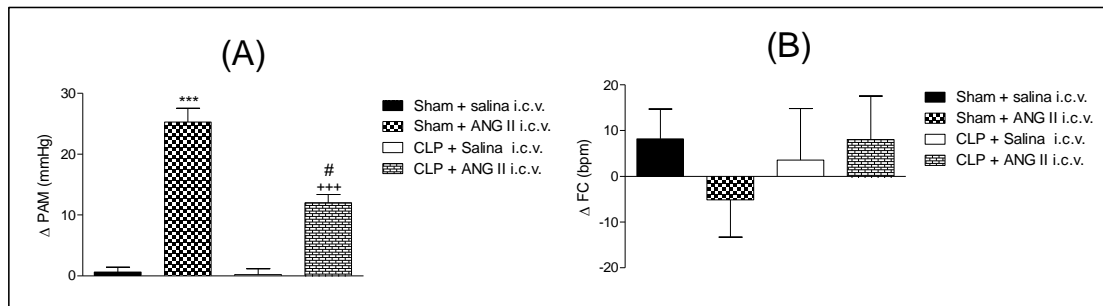


Figura 41. Efeito da administração de angiotensina II (ANG II; i.c.v.; 50ng/ μ l) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). *** $p < 0,001$ quando comparado ao Sham + Salina i.c.v.; ### $p < 0,001$ quando comparado ao CLP + Salina i.c.v.; # $p < 0,05$ quando comparado ao Sham + ANG II i.c.v. (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após restaurar a pressão arterial com infusão contínua de Phe, repetiu-se o teste citado acima (ANG II, i.c.v.). Mesmo com a PAM restaurada, o resultado do grupo de animais submetidos ao CLP não tiveram diferença significativa quando comparado com grupo CLP + salina (figura 42)

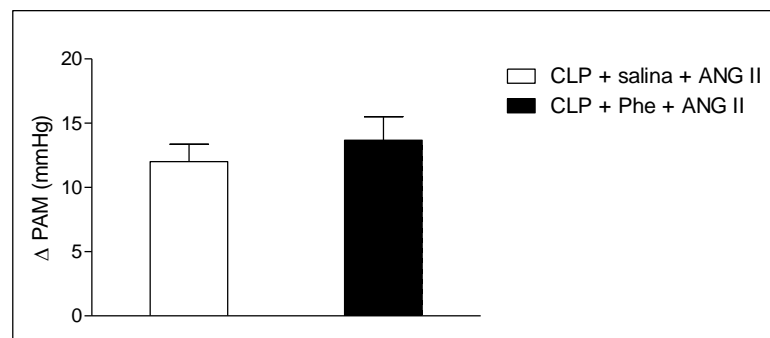


Figura 42. Efeito da administração angiotensina II (ANG II; i.c.v.; 50ng/ μ l) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM) após restauração da PAM com infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75 μ g/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) (Test t).

Fonte: Do autor.

A administração i.c.v de Carbacol (Car; 0,5nmol/ μ l) promoveu aumento da PAM do grupo Sham em relação ao grupo Sham + salina ($p < 0,001$). O mesmo é observado no grupo CLP + Car quando comparado com grupo CLP + salina ($p < 0,001$), mas esse aumento é menor quando comparado com grupo Sham + Car ($p < 0,05$) (Figura 43).

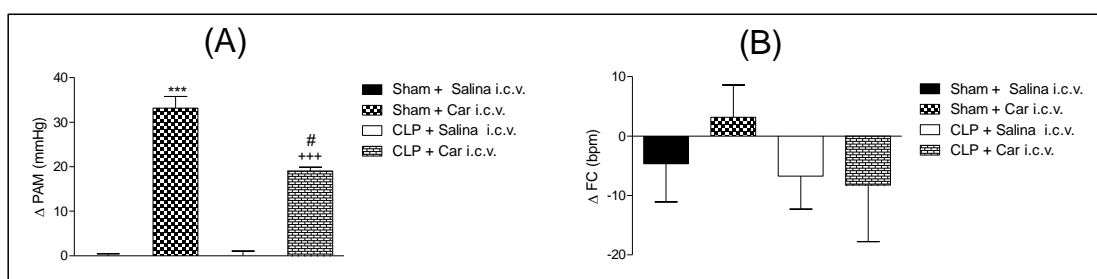


Figura 43. Efeito da administração de carbacol (Car; i.c.v.; 0,5nmol/ μ l) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). *** $p < 0,001$ quando comparado ao Sham + Salina i.c.v.; +++ $p < 0,001$ quando comparado ao CLP + Salina i.c.v.; # $p < 0,05$ quando comparado ao Sham + Car i.c.v (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após restaurar a pressão arterial com infusão contínua de Phe, repetiu-se o teste citado acima (Car, i.c.v.). Mesmo com a PAM restaurada os animais submetidos ao CLP não diferiram significativamente quando comparados com grupo CLP + salina (figura 44)

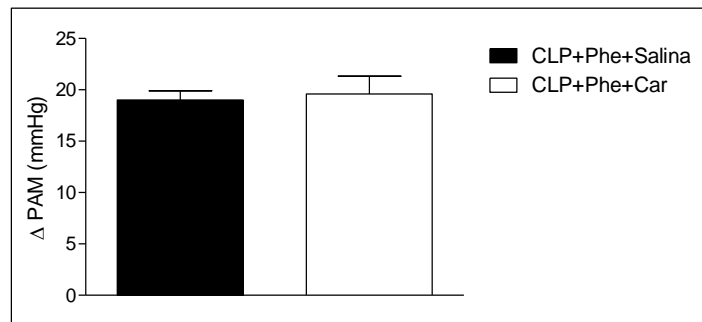


Figura 44. Efeito da administração Carbacol (Car; i.c.v.; 0,5nmol/ μ l) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM) após restauração da PAM com infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75 μ g/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) (Test t).

Fonte: Do autor.

De acordo com a figura 45, a administração de glutamato no RVLM promoveu aumento da PAM no grupo Sham quando comparado com grupo Sham + Salina ($P < 0,001$). O mesmo é observado no grupo CLP, quando comparado com CLP + salina ($P < 0,001$), mas esse aumento é menor quando comparado com o grupo Sham + Glu. ($P < 0,5$) (Figura 45).

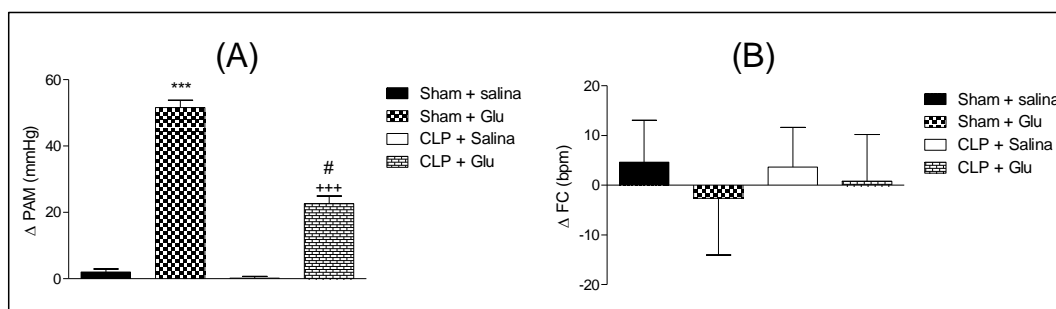


Figura 45. Efeito da administração de glutamato (100nmol/0,1 μ l) ou salina na área RVLM sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). *** $p < 0,001$ quando comparado ao Sham + Salina ; +++ $p < 0,001$ quando comparado ao CLP + Salina; # $p < 0,5$ quando comparado ao Sham + Glu (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após restaurar a pressão arterial com infusão contínua de Phe, repetiu-se o teste citado acima (Glu na região RVLM.). Mesmo com a PAM restaurada os animais submetidos ao CLP não tiveram diferença significativa quando comparado com grupo CLP + salina (figura 46)

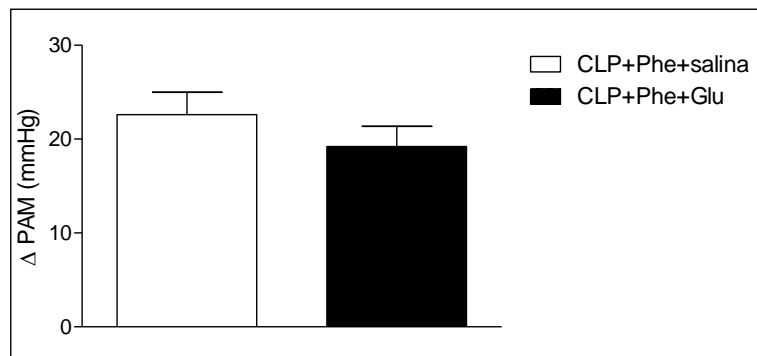


Figura 46. Efeito da administração de glutamato (Glu; 100nmol/ 0,1μl ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM) após restauração da PAM com infusão contínua de fenilefrina (Phe; 0,75μg/0,03ml/min; i.v.) 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) (Test t).

Fonte: Do autor.

5.5 AVALIAÇÕES DO QUIMIORREFLEXO ATIVADOS PELA ADMINISTRAÇÃO DE CIANETO DE POTÁSSIO (KCN) DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

A figura 47 representa a atividade do quimiorreflexo durante o choque séptico induzido pelo CLP ou cirurgia fictícia (Sham). Até a sexta hora após o CLP não observamos diferença significativa nas respostas do quimiorreflexo quando comparado com grupo Sham. Doze horas e 24 horas após a cirurgia de CLP observamos um déficit nas respostas de PAM, FC e FR comparado com grupo Sham ($P < 0,05$).

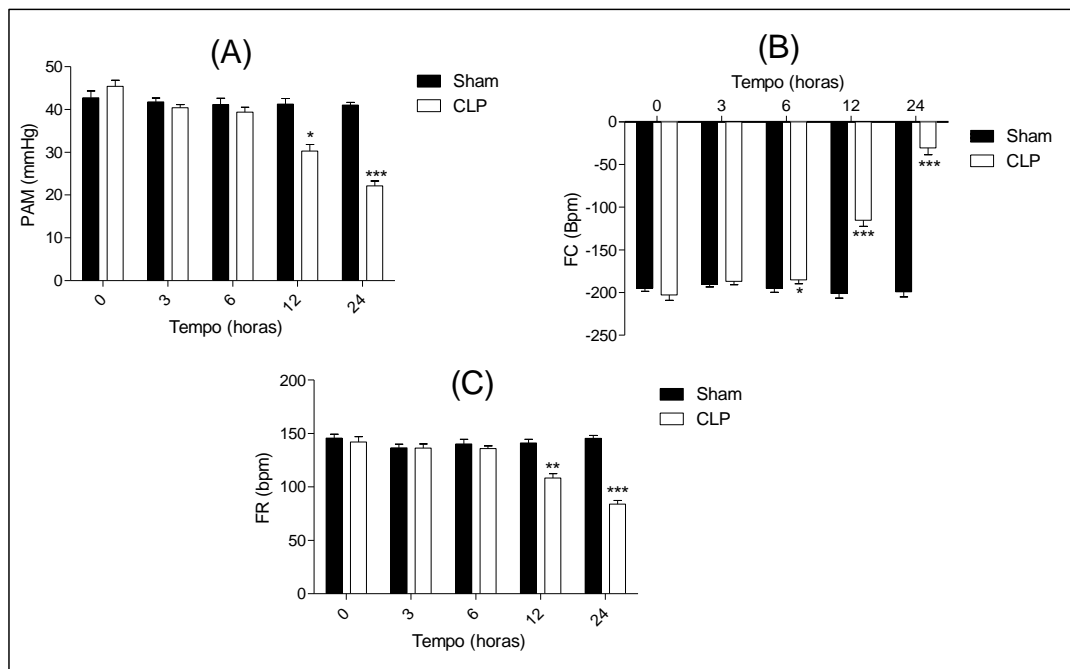


Figura 47. Efeito da administração de cianeto de potássio (40µg/0,1ml;i.v.) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e frequência respiratória (Fr; C) durante o choque séptico induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ comparado ao grupo Sham.

Fonte: Do autor (Test t).

Após o tratamento com L-Name (20mg/kg; i.p.), os grupos CLP + L-Name e Sham + L-Name apresentaram elevação da PAM, que se mantiveram mais alta durante todo o período analisado quando comparado com os respectivos control, CLP + salina e Sham + salina, respectivamente ($P < 0,01$). Mas o aumento da PAM do grupo CLP + L-Name foi significativamente menor a partir da 12^a hora após o CLP quando comparado com animais Sham + L-Name ($p < 0,01$) (Figura 48 A).

Após o tratamento com L-Name, o grupo CLP + L-Name e Sham + L-Name apresentaram menor FC durante as 12 horas após as cirurgia quando comparado com os seus respectivos grupos, CLP + salina e Sham + salina ($p < 0,05$). Não foi observado diferença significativa da FC entre os grupos CLP + L-Name e Sham + L-Name. (Figura 48 B)

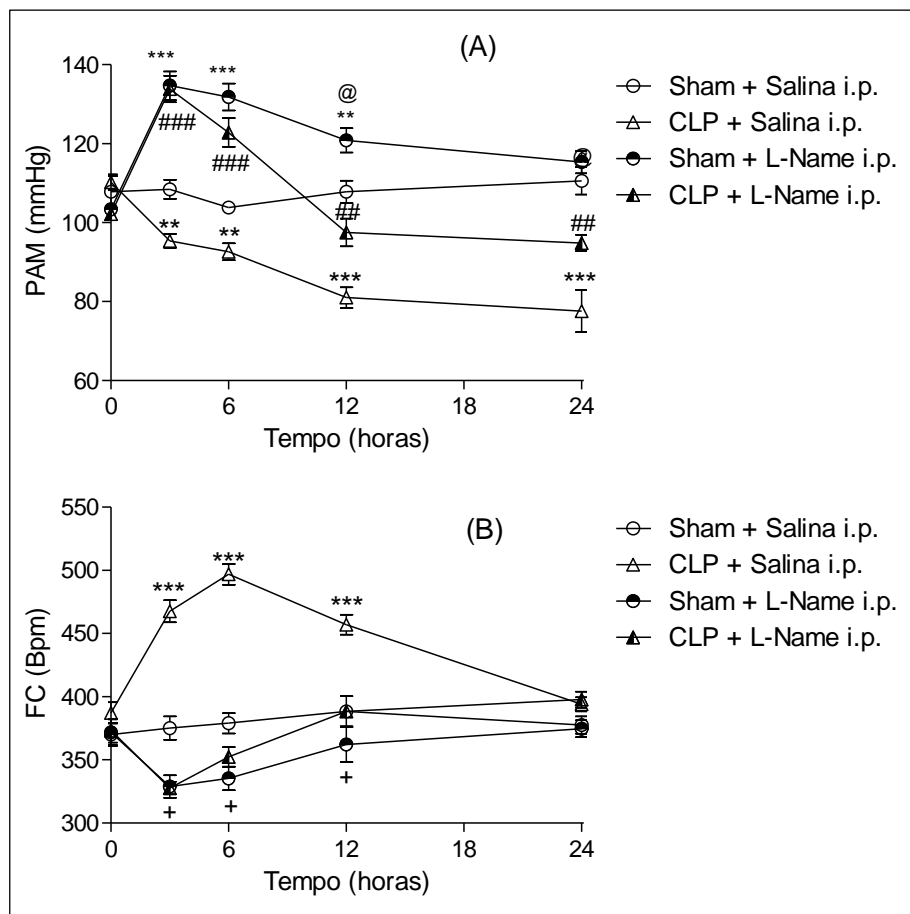


Figura 48. Efeito do pré-tratamento com L-Name (20mg/kg; i.p.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC, B) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). ** $p < 0,001$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao Sham + salina i.p.; ## $p < 0,01$ quando comparado ao CLP + Salina i.p.; @ $p < 0,05$ quando comparado ao grupo CLP + L-Name i.p (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após o tratamento com L-Name i.p., os grupos CLP + L-Name e Sham + L-Name apresentaram maiores respostas pressóricas (somente até 6 horas após a cirurgia, Sham ou CLP) após a ativação do quimiorreflexo quando comparado aos grupos CLP + salina e Sham + salina, respectivamente ($P < 0,05$). Os animais CLP + salina apresentam uma queda nas respostas (PAM, FC e Fr) 12 horas após a cirurgia de CLP quando comparado com Sham + salina ($p < 0,01$). O grupo CLP + L-Name teve uma atenuação da queda 12 horas após CLP quando comparado com grupo CLP + salina ($p < 0,05$) (figura 49)

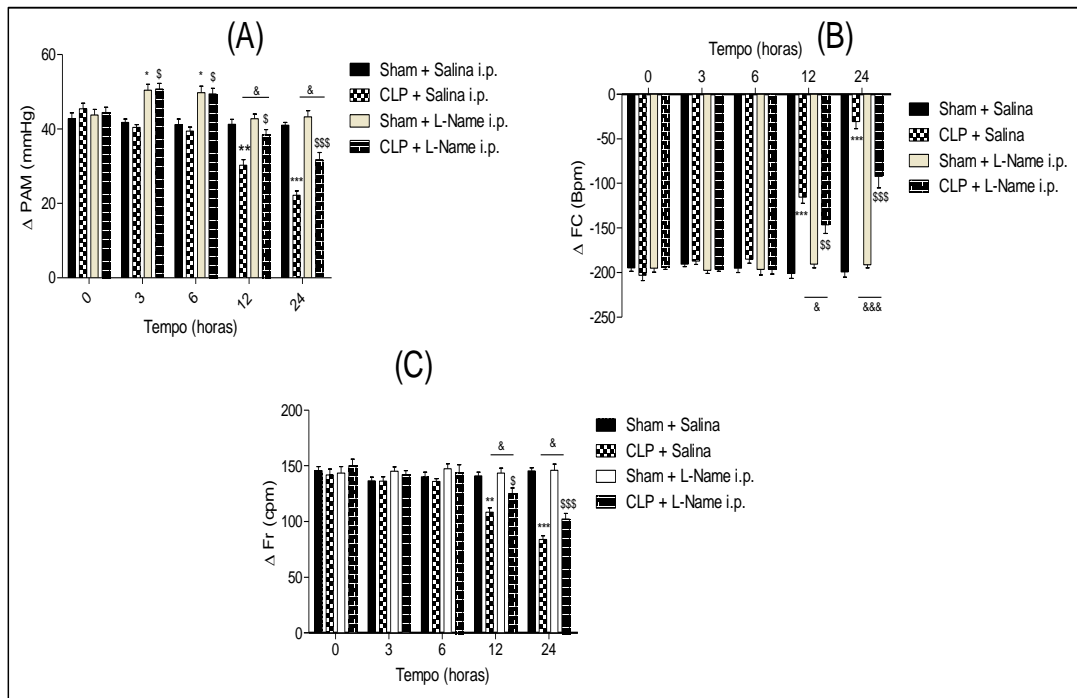


Figura 49. Efeito do pré-tratamento com L-Name (20mg/kg; i.p.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC, B) e frequência respiratória (Fr; C) após a ativação quimiorreflexa com KCN durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Sham + Salina i.p.; § $p < 0,05$; §§§ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Sham + L-Name i.p.; & $p < 0,05$; &&& $p < 0,001$ quando comparado ao grupo CLP + Salina i.p. (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após o tratamento com aminoguanidina (Ag; 10mg/kg; i.p.) o grupo Sham + Ag não apresentou diferença significativa da PAM quando comparado com grupo Sham + salina durante todo o período analisado. O grupo CLP + salina apresentou uma menor PAM quando comparado com grupo Sham + salina ($p < 0,01$). O grupo CLP + Ag apresentou uma atenuação da queda da PAM 6 horas após a cirurgia de CLP quando comparado com grupo CLP + salina ($p < 0,05$) (Figura 50 A).

Não houve diferença significativa entre os grupos Sham + Ag e Sham + salina quando analisada a FC. O grupo CLP + salina apresentou aumento da FC durante 12 horas após o grupo CLP ($p < 0,01$), sendo que na vigésima quarta hora não houve diferença quando comparado com grupo Sham + salina. O grupo CLP + Ag apresentou uma atenuação do aumento da FC quando comparado com grupo CLP + salina durante 12 horas após o CLP ($p < 0,05$), na vigésima quarta hora após o CLP não há diferença (Figura 50 B).

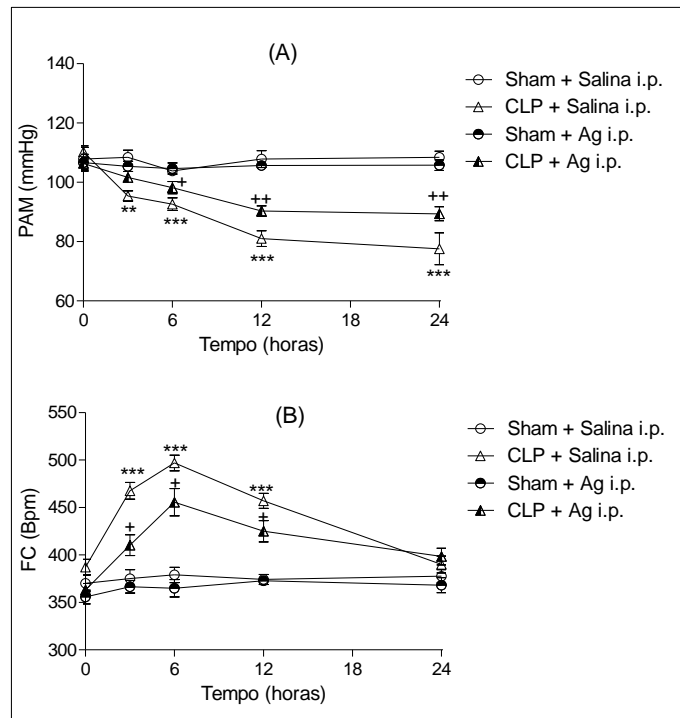


Figura 50. Efeito do pré-tratamento com aminoguanidina (10mg/kg; i.p.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC, B) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham)** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$ quando comparado ao Sham + salina i.p.; + $p < 0,05$; ++ $p < 0,01$ quando comparado ao CLP + salina i.p. (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após o tratamento com Ag i.p não foi observado diferença significativa nas respostas ao KCN (PAM, FC e Fr) entre os grupos Sham + Ag e Sham + salina. O grupo CLP + salina apresentou uma menor resposta (PAM, FC e Fr) após o estímulo com KCN 12 horas após a cirurgia de CLP quando comparado com grupo Sham + salina. Os resultados do grupo CLP + Ag não apresentaram diferenças nas respostas durante todo o período analisado quando comparado com o grupo CLP + salina (Figura 51)

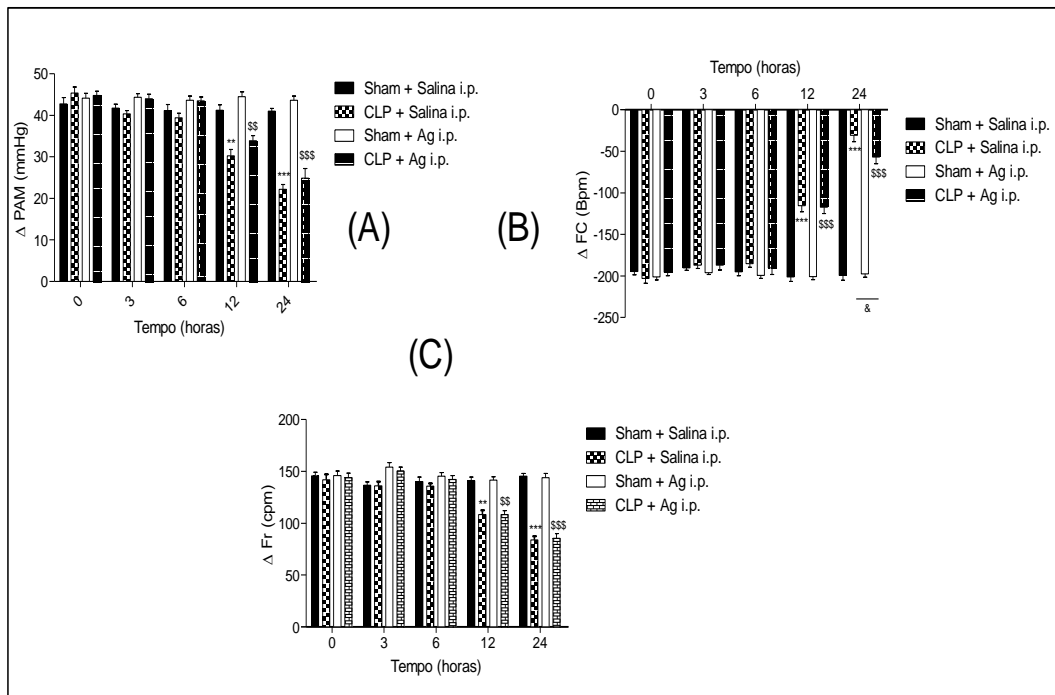


Figura 51. Efeito do pré-tratamento com aminoguanidina (10mg/kg; i.p.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC, B) e frequência respiratória (Fr; C) após a ativação quimiorreflexa com KCN durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). ** $p<0,01$; *** $p<0,001$ quando comparado ao grupo Sham + Salina i.p.; \$ $p<0,05$; \$\$\$ $p<0,001$ quando comparado ao grupo Sham + Ag i.p.; & $p<0,05$ quando comparado ao grupo CLP + Salina i.p. (Two way ANOVA)

Fonte: Do autor.

Após o tratamento com L-Name (i.c.v., 250 μ l/2 μ L), o grupo Sham + L-Name não apresentou diferença na PAM durante todo o período analisado quando comparado com grupo Sham + salina. O grupo CLP + salina apresentou uma menor PAM a após a cirurgia de CLP durante todo o período analisado quando comparado com grupo Shm + salina ($p<0,05$). O grupo CLP + L-Name apresentou uma atenuação da queda da PAM 12 e 24 horas após a cirurgia de CLP quando comparado com grupo CLP + salina ($p<0,05$) (Figura 52 A)

Não foi observada diferença na FC durante todo o período analisado entre os grupos Sham + L-Name e Sham + salina. O grupo CLP + salina e CLP + L-Name apresentaram aumento da FC durante 12 horas após o CLP ($p<0,01$), sendo que na vigésima quarta hora não houve diferença quando comparado com grupo Sham + salina. Não houve diferenças entre os grupos CLP + salina e CLP + L-Name. (Figura 52 B).

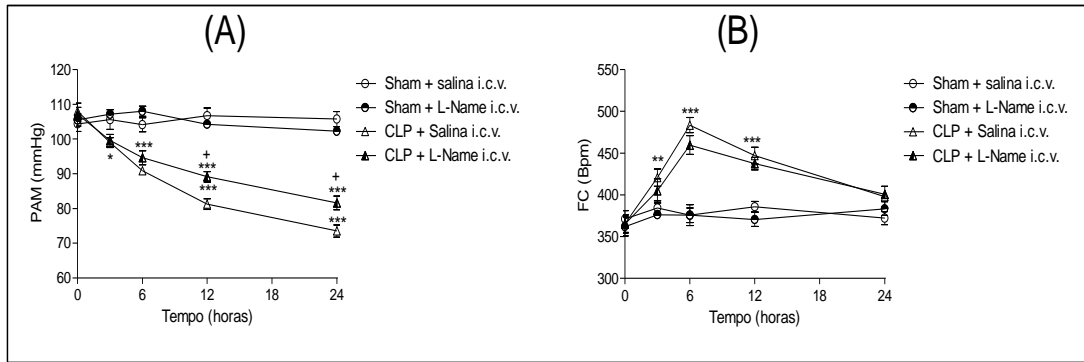


Figura 52. Efeito do pré-tratamento com L-Name (i.c.v., 250µl/2µl), ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC, B) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). *p<0,05; **p<0,01. ***p<0,001 quando comparado com Sham + salina i.p.; +p<0,05 quando comparado ao CLP + salina i.p. (Two way ANOVA)

Fonte: Do autor.

Após o tratamento com L-Name i.c.v., o grupo Sham + L-Name não apresentou diferença nas respostas (PAM, FC e Fr) após o estímulo com KCN durante todo o período analisado quando comparado com grupo Sham + salina. O grupo CLP + salina apresentou um déficit nas respostas (PAM, FC e Fr) após o estímulo com KCN 12 e 24 horas após a cirurgia de CLP quando comparado com grupo Sham + salina. O grupo CLP + L-Name reverteu a queda na décima segunda hora após o CLP e atenuou a queda das respostas na vigésima quarta hora após os estímulos com KCN quando comparado com grupo CLP + salina (p<0,05) (figura 53)

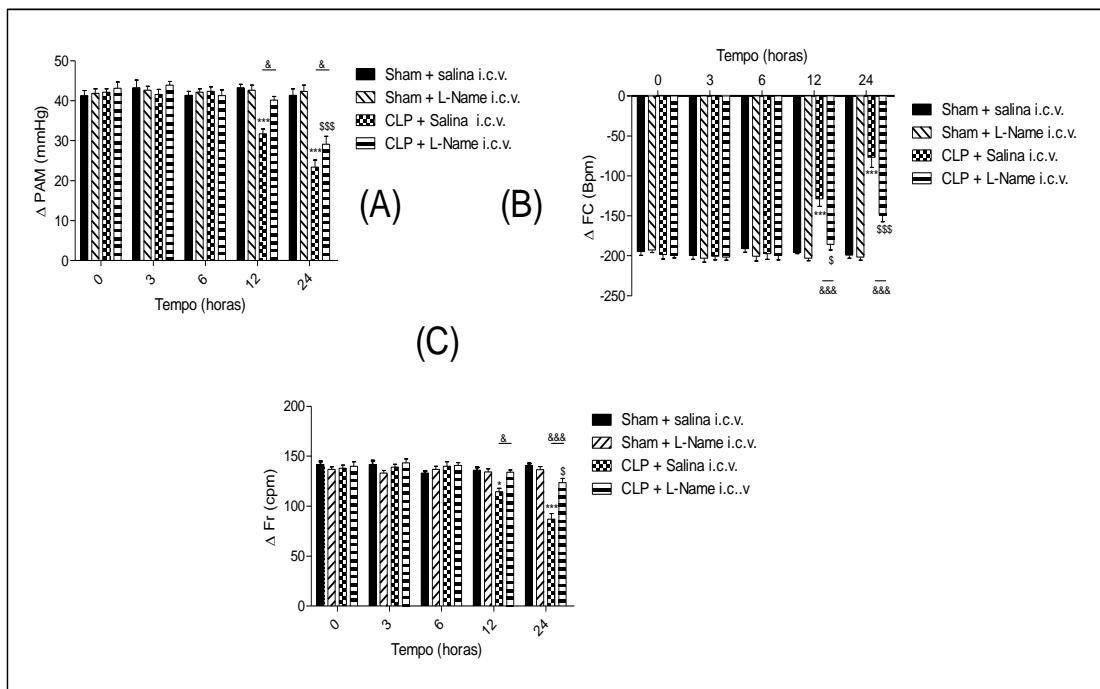


Figura 53. Efeito do pré-tratamento com L-Name (i.c.v., 250µmg/2µl) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC, B) e frequência respiratória (Fr; C) após a ativação quimiorreflexa com KCN durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). *p<0,05; ***p<0,001 quando comparado ao grupo Sham + Salina i.c.v.; § p<0,05; §§§ p<0,001 quando comparado ao grupo Sham + L-Name i.c.v.; & p<0,05; &&& p<0,001 quando comparado ao grupo CLP + Salina i.c.v. (Two way ANOVA)

Fonte: Do autor.

Após o tratamento com aminoguanidina (Ag; i.c.v., 250µl/2µL), o grupo Sham + Ag não apresentou diferença na PAM durante todo o período analisado quando comparado com grupo Sham + salina. O grupo CLP + salina apresentou uma menor PAM após a cirurgia de CLP durante todo o período analisado quando comparado com grupo Sham + salina (p<0,05). O grupo CLP + Ag apresentou uma atenuação da queda da PAM 24 horas após a cirurgia de CLP quando comparado com grupo CLP + salina (p<0,05) (Figura 54 A)

Não foi observado diferenças na FC durante todo o período analisado entre os grupos Sham + Ag e Sham + salina. O grupo CLP + salina e CLP + Ag apresentaram aumento da FC durante 12 horas após o CLP (p<0,01), sendo que na vigésima quarta hora não há diferença quando comparado com grupo Sham + salina. Não houve diferenças entre os grupos CLP + salina e CLP Ag. (Figura 54, B).

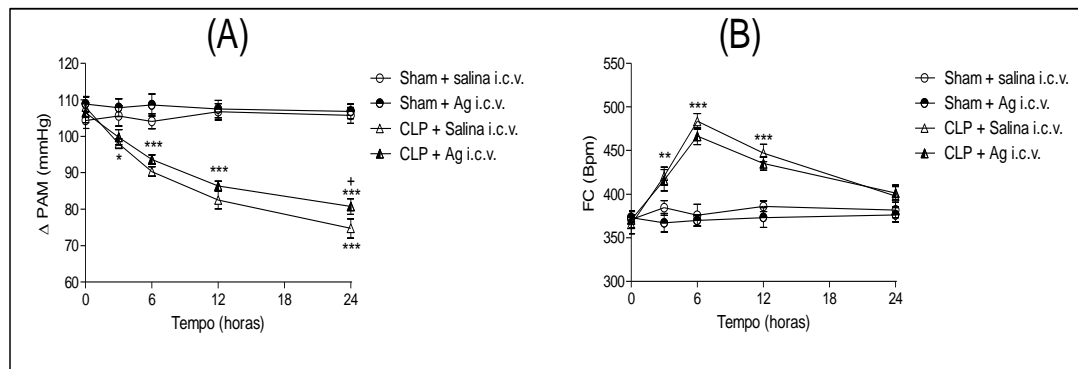


Figura 54. Efeito do pré-tratamento com aminoguanidiana (Ag; i.c.v. 250µl/2µl), ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC, B) durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). *p<0,05; **p<0,01. ***p<0,001 quando comparado ao Sham + salina i.p.; +p<0,05 quando comparado ao CLP + salina i.p. (Two way ANOVA)

Fonte: Do autor.

Após o tratamento com Ag i.c.v., o grupo Sham + Ag não apresentou diferença nas respostas (PAM, FC e Fr) após o estímulo com KCN durante todo o período analisado quando comparado com grupo Sham + salina. O grupo CLP + salina apresentou um déficit nas respostas (PAM, FC e Fr) após o estímulo com KCN 12 e 24 horas após a cirurgia de CLP quando comparado com grupo Sham + salina. O grupo CLP + Ag atenuou a queda das respostas 12 e 24 horas após a cirurgia de CLP após o estímulo com KCN quando comparado com grupo CLP + salina (p<0,05) (figura 55).

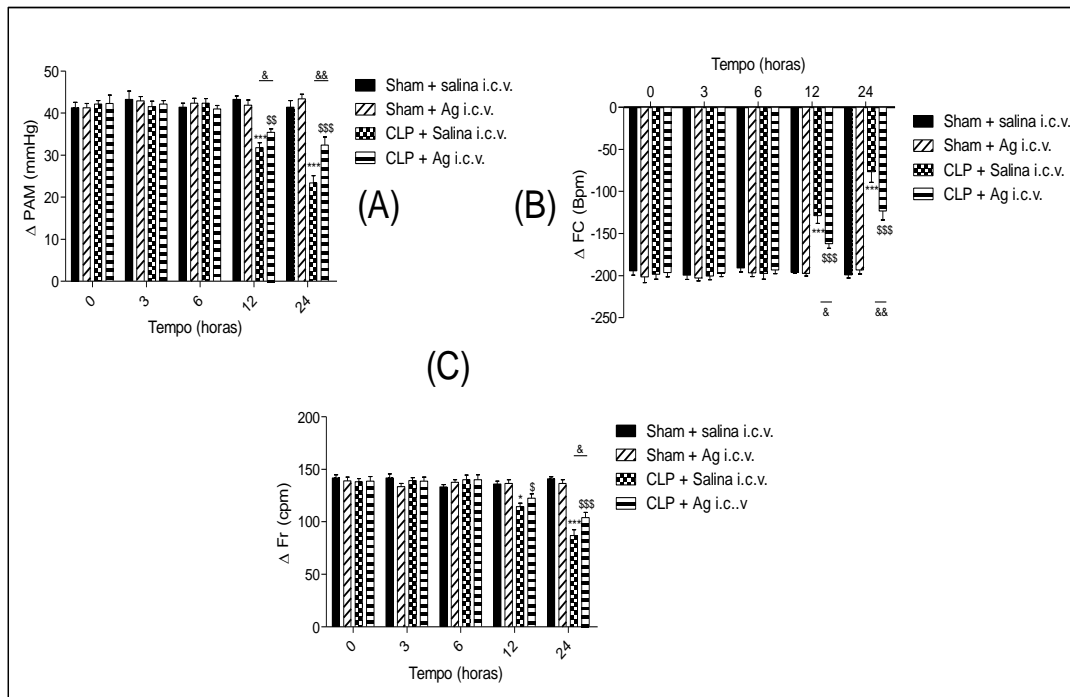


Figura 55. Efeito do pré-tratamento com aminoguanidina (Ag; 250 μ g/2 μ l; i.c.v.) ou salina sobre as alterações da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC, B) e frequência respiratória (Fr; C) após a ativação quimiorreflexa com KCN durante o choque séptico experimental induzido pela ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Sham + Salina i.c.v.; \$\$ $p < 0,01$; \$\$\$ $p < 0,001$ quando comparado ao grupo Sham + Ag i.c.v.; & $p < 0,05$; && $p < 0,01$ quando comparado ao grupo CLP + Salina i.c.v. (Two way ANOVA)

Fonte: Do autor.

Após ativação intermitente com KCN o grupo Sham + KCN + salina apresentou um maior número de células imunorreativas para cFos no núcleo do trato solitário comissural (NTSc) quando comparado com o grupo CLP + KCN + salina 24 horas após cirurgia $P < 0,001$). Após o pré-tratamento com aminoguanidina, o grupo CLP + KCN + Ag apresentou uma atenuação da queda do números de células positivas para FOS quando comparado com CLP + KCN + salina ($p < 0,01$). Não houve diferença entre os grupos Sham (Figuras 56 e 57).

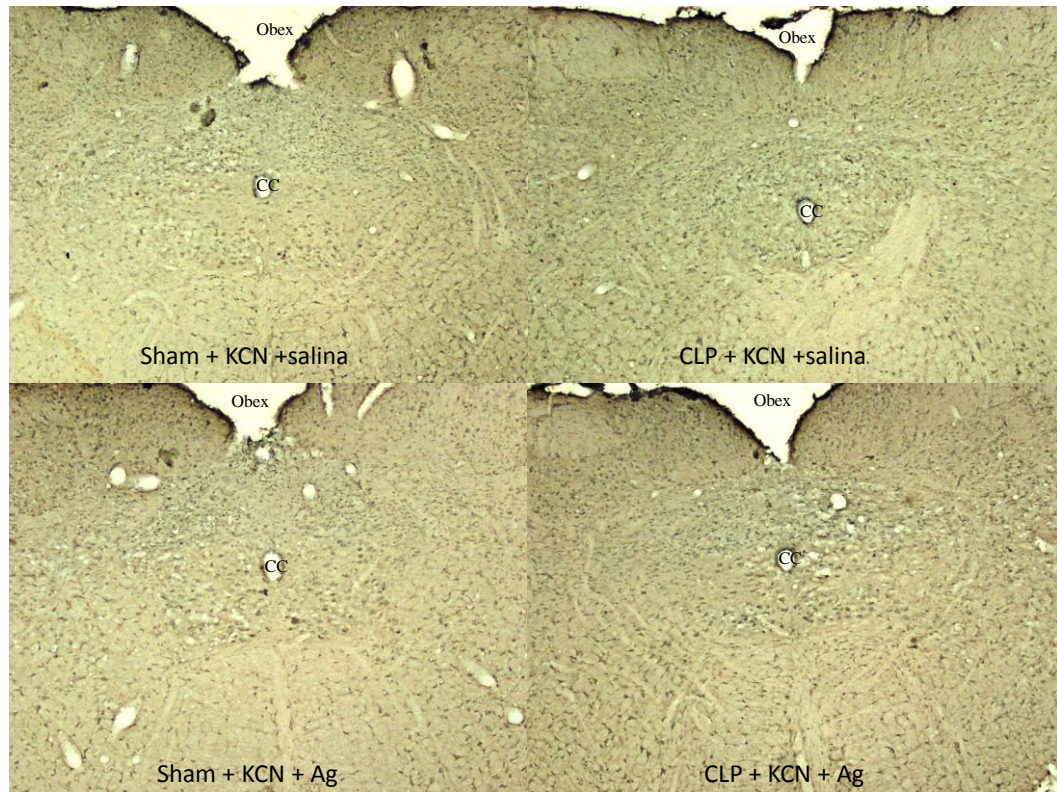


Figura 56. Fotomicrografias representativas de cortes do bulbo de células imunorreativas para FOS do núcleo trato solitário comissural de animais submetidos a intermitente ativação do quimiorreflexo pela administração de cianeto de potássio (KCN; 40 μ g/0,1; i.v.) ou salina, 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). CC: Canal central.

Fonte: Do autor.

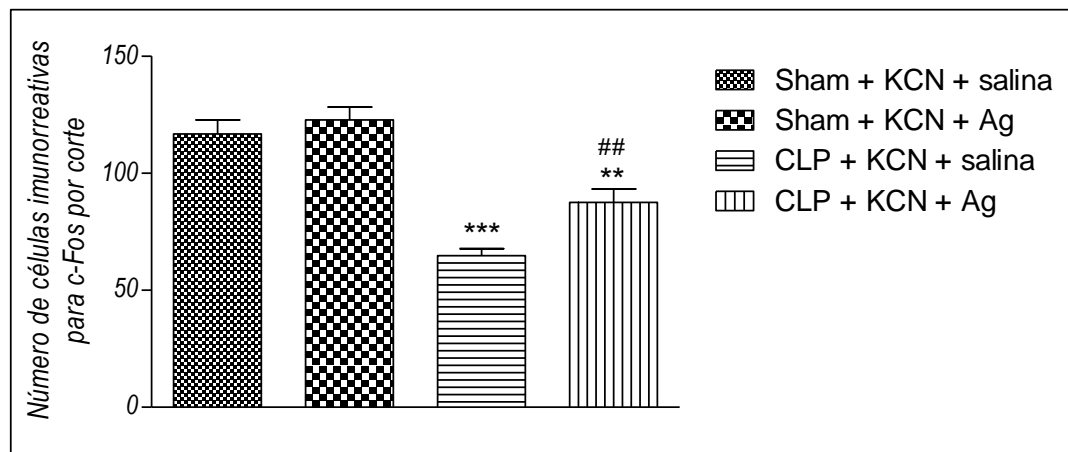


Figura 57. Números de células imunorreativas para FOS no núcleo do trato solitário comissural de animais submetidos a intermitente ativação do quimiorreflexo pela administração de cianeto de potássio (KCN; 40 μ g/0,1; i.v.) ou salina, 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou Sham. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ quando comparado ao Sham+ KCN+ Salina; ## $p < 0,01$ quando comparado ao CLP+KCN+Salina (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

Após ativação intermitente com KCN o grupo Sham + KCN + salina apresentou um maior número de células imunorreativas para cFos no núcleo do trato solitário intermediário (NTSi) quando comparado com o grupo CLP + KCN + salina 24 horas após cirurgia ($P < 0,001$). Após o pré-tratamento com aminoguanidina, o grupo CLP + KCN + Ag apresentou uma atenuação da queda do número de células imunorreativas para FOS quando

comparado com CLP + KCN + salina ($p < 0,05$). Não houve diferença entre os grupos Sham (Figura 58 e 59).

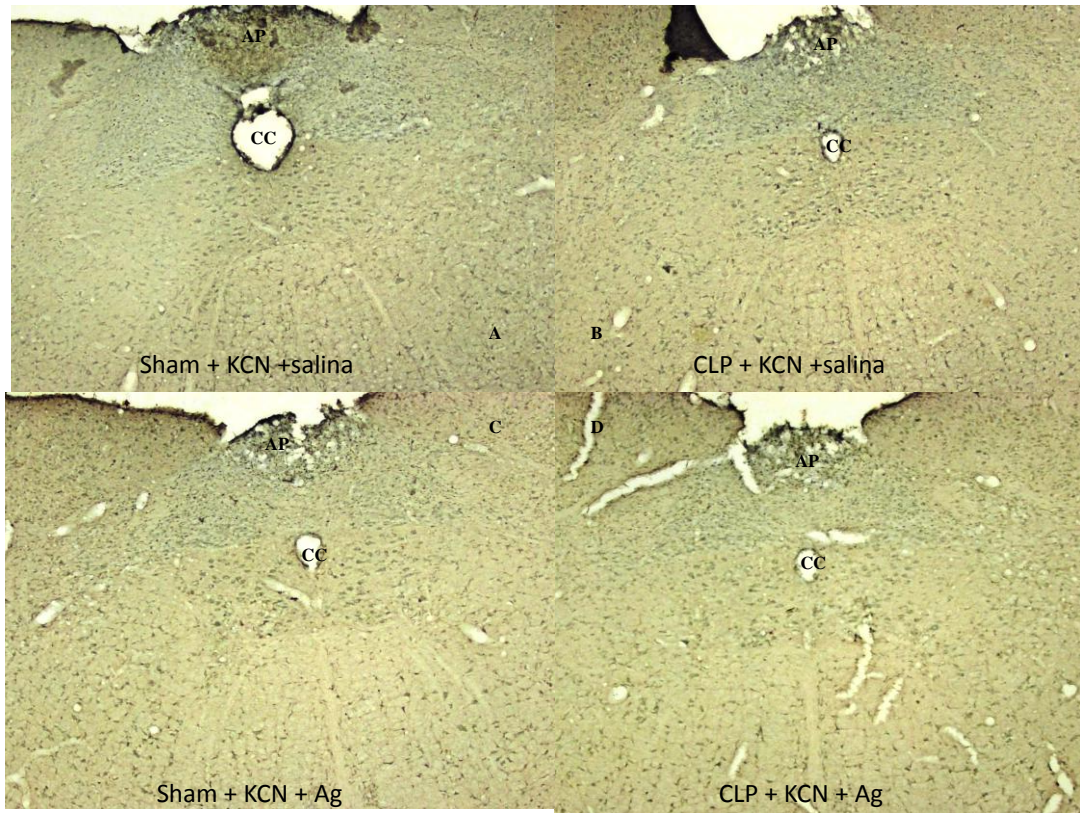


Figura 58. Fotomicrografias representativas de cortes do bulbo de células imunoreativas para Fos do núcleo trato solitário intermediário de animais submetidos a intermitente ativação do quimiorreflexo pela administração de cianeto de potássio (KCN; $40\mu\text{g}/0,1$; i.v.) ou salina, 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). CC: Canal central.

Fonte: Do autor.

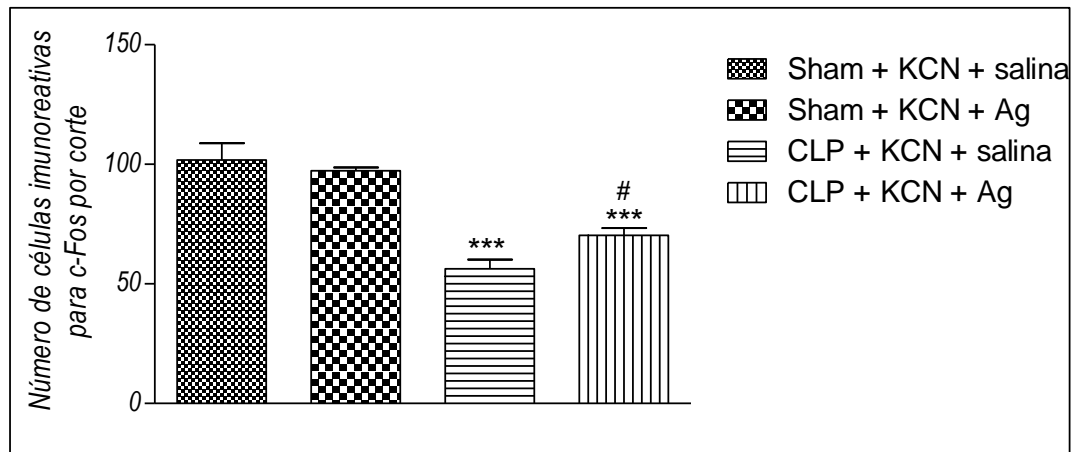


Figura 59. Números de células imunoreativas para Fos no núcleo do trato solitário intermediário de animais submetidos a intermitente ativação do quimiorreflexo pela administração de cianeto de potássio (KCN; $40\mu\text{g}/0,1$; i.v.) ou salina, 24 horas após a ligadura e perfuração cecal (CLP) ou cirurgia fictícia (Sham). *** $p < 0,001$ quando comparado ao Sham+KCN+Salina; # $p < 0,05$ quando comparado ao CLP+KCN+Salina (Two way ANOVA).

Fonte: Do autor.

6.0 DISCUSSÃO

Como demonstrado neste estudo, os animais com choque séptico induzido por CLP apresentaram redução da pressão arterial média (PAM) e hiporeatividade para vasoconstrictores, sinais característicos dessa enfermidade, indicando um bom modelo experimental para o choque séptico. Além disso, todos os animais submetidos à cirurgia de CLP desenvolveram sinais clínicos de sepse, como letargia, piloereção e diarreia, enquanto os animais submetidos à cirurgia fictícia permaneceram ativos em suas caixas. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que utilizaram o mesmo modelo experimental de choque séptico (BENJAMIM, et al. 2000; CORREA, et al. 2007; SALKOWSKI, et al. 1998; TORRES-DUENAS, et al. 2006).

6.1 HIPOTENSÃO DURANTE O CHOQUE SÉPTICO

Thiemermann e Vane (1990), demonstraram que a hipotensão, a produção de edema e o aumento da permeabilidade vascular no choque séptico eram reflexos da produção aumentada de óxido nítrico (NO), pois sua inibição atenuava os sintomas do choque e hipotensão. Existem no mínimo três diferentes isoformas de NO sintase (NOS) em células de mamíferos: NOS endotelial (NOSe ou NOS III) encontrada em células endoteliais, células epiteliais e miócitos cardíacos; NOS neuronal (NOSn ou NOS I) encontrada em células neuronais e músculo esquelético e NOS induzida (NOSi ou NOS II) encontrada em macrófagos, hepatócitos, músculo liso e uma variedade de outros tecidos (DAVIES; HAGEN, 1997). A NOSe e a NOSn são expressas constitutivamente e são ativadas por um aumento no Ca^{+2} intracelular e estão envolvidas na regulação do tônus vascular e neurotransmissão respectivamente, ao passo que a expressão da NOSi é encontrada em macrófagos ativados e polimorfonucleares (PMNs), é induzida por endotoxinas e substâncias pró-inflamatórias, é cálcio-independente e está envolvida na defesa imune (KLOSTERHALFEN; BHARDWAJ, 1998).

As enzimas constitutivas, NOSn e NOSe são capazes de produzir pequenas quantidades de NO, que ativam a guanilato ciclase solúvel no músculo liso vascular, regulam o tônus vascular fisiológico, a pressão sanguínea e a perfusão tecidual, ao passo que o aumento da expressão da NOSi, no endotélio vascular e no músculo liso de animais, como demonstrado por Moncada, et al. (1991) resulta em produção de grandes quantidades

de NO por longos períodos, mantendo a vasodilatação e a resistência a vasoconstritores, mediando as alterações no sistema vascular e o dano tecidual, causando disfunção múltipla de órgãos. Estas alterações podem ser prevenidas pelo pré-tratamento com substâncias anti-inflamatórias, as quais inibem a expressão da NOSi, mas não afetam a atividade da enzima constitutiva (MONCADA, et al. 1991; THIEMERMANN, 1997; TITHERADGE, 1999). Esse dado está de acordo com os dados apresentados no trabalho, pois quando houve administração de Ag periféricamente não foi constatada a redução da PAM, indicando a importância da produção de NO via NOSi durante a hipotensão no choque séptico.

A indução da NOS, aumenta a produção de NO, contribuindo para a fisiopatologia do choque séptico e disfunção múltipla de órgãos, e tem sido proposta ser o maior fator envolvido na vasodilatação patológica e no dano tecidual (THIEMERMANN, 1997). A hiporeatividade cardiovascular para as catecolaminas e outros fármacos vasoconstritores é um dos efeitos mais pronunciados do choque séptico humano e contribui para a alta taxa de mortalidade associada ao choque. É sabido que a endotoxina reproduz a hiporreatividade em animais de laboratório, e uma alta produção de NO é implicada no efeito da endotoxina em alterar a reatividade vascular. A hiporeatividade vascular também foi demonstrada no nosso trabalho seis e vinte e quatro horas após a cirurgia de CLP.

Foi descrito que o LPS induz a NO sintase, que produz NO a partir da L-arginina em tecidos de ratos e que a dexametasona e o inibidor desta enzima (N ω NLA), previnem sua indução e a hiporreatividade vascular associada em aorta de rato (RODRIGUES; FRACASSO, 2007). Todavia, alguns efeitos da endotoxina sobre a pressão sanguínea e reatividade vascular podem preceder a indução da NOS, a qual leva várias horas em modelos animais. Porém, segundo outros autores, a hiporreatividade rápida a norepinefrina (NE), se deve à estimulação da óxido nítrico sintase constitutiva (NOSc) pela endotoxina e a hiporreatividade tardia à NE, se deve à indução do óxido nítrico sintase induzida (NOSi) (AMBROSIO; FRACASSO, 2000). Foi verificado também que, uma vez estabelecida a hiporreatividade à NE, o tratamento com dexametasona não produz efeito. Portanto, a dexametasona só é eficaz em prevenir a hiporreatividade à NE quando o tratamento é prévio (PAYA, et al. 1993; REES, et al. 1990; THIEMERMANN; VANE, 1990; FRACASSO, et al. 2003). A relevância da produção excessiva de NO para o desenvolvimento do choque endotóxico foi demonstrada pelo uso de inibidores da NOS e agentes os quais bloqueiam a expressão da NOSi. A administração de inibidores do óxido nítrico sintase, em modelos animais e no homem, com choque séptico, restaura a pressão sanguínea e a hiporreatividade a agentes vasoconstritores (THIEMERMANN; VANE, 1990). Porém, doses suficientes para inibirem ambas as enzimas, constitutiva e induzida, diminuem a produção de NO, responsável pelo tônus vasodilatador, e, na presença de vasoconstritores

durante a sepse, leva a danos fatais nos órgãos (TITHERADGE, 1999; LANDRY; OLIVER, 2004; RODRIGUES; FRACASSO, 2007).

6.2 ANÁLISE DAS ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

Inúmeros autores demonstram que a administração de LPS ou cirurgia de CLP promovem a liberação de AVP (WILSON, et al. 1981; KASTING, et al. 1986; SANTIAGO, et al. 2013; SAIA, et al. 2011). Aparentemente, a liberação de AVP durante a sepse é independente de estímulos fisiológicos conhecidos (aumento da osmolaridade plasmática, queda da pressão arterial, queda do volume sanguíneo, aumento da temperatura e hipoglicemia) (KASTING, et al., 1986). Com a queda da pressão arterial durante o choque séptico experimental frequentemente inicia-se com o aumento da produção de NO pela iNOS (KEANEY, et al. 1999; VINCENT, 2000). Estranhamente, a queda da pressão arterial não é acompanhada por aumento da liberação de AVP durante o choque séptico (REID, 1997)

Seis horas após o CLP, a concentração de AVP aproxima-se do valor basal, entretanto, neste momento, já está estabelecida uma redução acentuada da pressão arterial, que caracteriza o choque séptico. Assim, numa fase tardia ocorre uma situação de relativa deficiência na secreção de vasopressina, caracterizada por uma redução da pressão arterial e concentração plasmática de AVP inapropriadamente baixa. Esse fenômeno também tem sido observado durante o choque séptico em humanos (LANDRY, et al. 1997; SHARSHAR, et al. 2003), e têm sido estudados os motivos pelos quais a secreção de AVP está reduzida. Entre as causas, tem sido destacada a possível diminuição dos estoques neuro-hipofisário; insuficiência autonômica, indicada pela diminuição da variabilidade da frequência cardíaca (GARRARD, et al. 1993) e ausência de bradicardia reflexa durante a infusão de AVP (LANDRY, et al. 1997b); e a inibição da secreção de AVP pode ser causada pela excessiva produção de óxido nítrico na endoxemia (GIUSTI-PAIVA, et al. 2002; GIUSTI-PAIVA, et al. 2003).

Quanto a secreção de OT, também foi observado que a cirurgia de CLP promove um aumento (pico na 2ª h) seguida por uma redução na sua concentração plasmática, retornando aos valores basais na sexta hora após o CLP. As funções da OT durante o choque séptico são desconhecidas. A OT estimula a secreção do ANP (HAANWINCKEL, et al. 1995; ANTUNES-RODRIGUES, et al. 2004) e poderia estar relacionada com o aumento da secreção de ANP que ocorre após a cirurgia de CLP demonstrada neste estudo. O ANP,

além de sua ação vasodilatadora, provoca extravasamento de líquido do compartimento intravascular para o intersticial, contribuindo para a redução do volume plasmático e da pressão arterial (TUCKER, 1996; VALENTIN, et al. 1997). Além disso, o ANP possui ação anti-inflamatória, principalmente por inibir a produção de citocinas, a expressão de ciclooxigenase-2 e da iNOS (KIEMER, et al. 2002; KIEMER; VOLMAR, 2001; VOLLMAR; SCHULZ, 1995; KIEMER; VOLLMAR, 1998). Entretanto, essa participação é meramente especulativa, pois são escassos os estudos com OT e ANP durante o choque séptico induzido pelo CLP e não existem dados sobre a interação destes dois hormônios neste modelo experimental.

Durante o choque séptico ocorre uma ativação do sistema renina-angiotensina, e, conseqüentemente, aumento da concentração plasmática de ANG II, como demonstrado neste estudo e em outros anteriores (WHITE, et al. 1967; SHARIAT-MADAR; SCHMAIER, 2004)

A ANG II participa do aumento da ingestão de água como já demonstrado, porém no modelo de administração de LPS e sem esclarecer que tipo de estímulo seria responsável para induzir essa resposta (WANG; EVERED, 1993; WANG, et al. 1993). O choque séptico induzido pelo LPS ou CLP, é frequente o quadro de diarreia que, associada à vasodilatação e à febre, poderia levar a uma maior perda de água por evaporação e conseqüentemente desidratação. Nossos experimentos mostraram que não houve alteração da osmolaridade plasmática durante o choque séptico.

A ANG II é o principal indutor da ingestão de água durante o choque endotóxico, uma vez que o pré-tratamento com captopril ou com losartan reduziu a ingestão de água induzida pela administração de LPS. Possivelmente, a queda da pressão arterial, o aumento da atividade simpática e aumento da produção de prostaglandinas durante o choque séptico foram os estímulos para a secreção de renina, e conseqüentemente, o aumento da produção de angiotensina II (GIUSTI-PAIVA, 2004).

6.3 ANÁLISE DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE SALINA HIPERTÔNICA (NACL 7,5%, 4ML/KG, I.V.) DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

Após cinco minutos da aplicação de SH, observou-se nos animais submetidos a cirurgia de CLP maior concentração plasmática de AVP, que persistiu até os 10 minutos quando comparado ao grupo Sham. No entanto, 30 minutos após a aplicação, o grupo CLP teve menor concentração plasmática quando comparado com o Sham. Não foi observada diferença nas concentrações de OT e ANP entre grupo Sham e CLP após aplicação de SH.

No entanto, a ANG II plasmática, apesar da queda observada, permaneceu alta durante todo o período analisado após a aplicação de SH no grupo CLP quando comparado com Sham.

A administração de salina hipertônica promoveu aumento da concentração plasmática de AVP, OT, ANP e redução de ANG II, como já demonstrado anteriormente (ANTUNES-RODRIGUES, et al. 2004; HAANWINCKEL, et al. 1995). O mais intrigante é a liberação de AVP durante o choque séptico, pois inicialmente após a aplicação de SH sua concentração está maior quando comparado com grupo Sham. Este dado já foi demonstrado por Giusti-Paiva, et al. (2007), porém, no choque endotóxico.

A AVP é produzida e secretada por neurônios magnocelulares dos núcleos supra-óptico e paraventricular do hipotálamo. Vários fatores (por exemplo, redução da PAM, temperatura e/ou a dor) podem influenciar a liberação de AVP da neurohipófise, mas a regulação osmótica é um dos mecanismos homeostático mais sensível (ANTUNES-RODRIGUES, et al. 2004; CUNNINGHAM, et al. 2002). Nós observamos que no momento em que a PAM foi reduzida, existiu uma inadequada secreção de AVP, e a administração de SH induziu um aumento dos níveis plasmáticos de AVP, que foram mais elevados no grupo CLP quando comparado com grupo Sham. Estes dados estão de acordo com estudos anteriores que mostram que o choque séptico induzido por LPS provoca uma alteração funcional neuro-hipotalâmica, resultando na facilitação da secreção de AVP, em resposta ao estímulo osmótico, mecanismo este, ainda não compreendido (GRINEVICH, et al. 2003). Além disso, sabe-se que a hipotensão pode alterar a secreção de AVP após um estímulo osmótico (DUNN, et al. 1973).

É bastante discutido se há uma deficiência na produção de AVP ou se ela está sendo inibida por algum fator, como por exemplo NO. Sonnevile, et al. (2010) demonstrou que tanto em ratos como em humanos, há uma redução na expressão e no conteúdo de AVP na neurohipófise, indicando que há depleção de AVP durante o choque séptico induzido por CLP. Essa depleção pode-se justificar pela redução da expressão do peptídeo no núcleo supra-óptico e aumento no núcleo paraventricular, sugerindo alterações na síntese e transporte de AVP, conseqüentemente, promovendo uma redução da concentração plasmática de AVP. Outros trabalhos relatam que concentração plasmática de AVP está baixa no choque séptico, pois a sua liberação está sendo inibida pelo NO, uma vez que, um bloqueador da iNOS administrado i.c.v., mas não i.v., aumentou a liberação de AVP no choque (GIUSTI-PAIVA, et al. 2002).

O nosso estudo acrescenta dados importantes para essa discussão, através de dois protocolos diferentes. Primeiramente, a inibição de NO através da administração i.c.v. de L-Name durante o choque séptico induzido por CLP promoveu aumento da liberação de AVP após o estímulo osmótico quando comparado com grupo que houve administração de salina

i.c.v. e esse aumento persiste durante todo o período analisado (30 minutos após a aplicação). Esse dado indica que a AVP está sendo inibida pelo NO durante o choque séptico após a estimulação osmótica. Além do mais, foi observado um maior pico e duração do aumento da resposta pressórica após o estímulo osmótico no grupo CLP - L-Name - SH quando comparado com o grupo CLP - Salina - SH. Já é bem conhecido que o efeito pressórico da SH é mediado pela liberação de vasopressina, durante o choque séptico induzido por LPS ou CLP (GIUSTI-PAIVA, et al. 2007; SANTIAGO, et al. 2013).

Trinta minutos após a primeira dose de SH observou-se que a concentração plasmática de AVP no grupo CLP + SH está menor se comparado com grupo Sham + SH. Para demonstrar que a AVP não está sendo depletada durante o choque séptico, foi administrado uma segunda dose de SH. Cinco minutos após uma segunda dose de SH, não foi observado diferenças nas concentrações de AVP entre o grupo CLP e Sham, indicando que não houve depleção de AVP durante o choque séptico. No entanto, não podemos desconsiderar que o tempo para produção de uma "nova AVP" foi curto, culminando em uma menor concentração de AVP quando comparado a segunda aplicação de SH com a primeira aplicação de SH.

6.4 EFEITO DA EXPANSÃO COM HIDROXIETILAMIDO 130/0,4 ISOTÔNICO (HES) E HIPERTÔNICA (HYPER-HES) DURANTE O CHOQUE SÉPTICO.

Após as expansões de volume sanguíneo isotônico ou hipertônico foi observada uma redução do hematócrito proporcionalmente a dose de HES administrado, demonstrando a eficácia da expansão. Além do mais, somente a expansão hipertônica promoveu aumento da concentração plasmática de sódio e da osmolaridade.

Observou-se que a administração de soluções isotônica de HES (4, 8 e 16 mL/kg) foi ineficaz no aumento sustentado da PAM durante o choque séptico induzido por CLP. No entanto, a infusão de um pequeno volume de solução hipertônica de hidroxietilamido aumentou o nível de AVP plasmático e restaurou a PAM por aproximadamente uma hora. O provável mecanismo de restauração da PAM após a expansão de volume com Hyper-HES pode ser devido ao aumento dos níveis plasmáticos de AVP, uma vez que, a utilização prévia de um antagonista do receptor V_1 aboliu o aumento da resposta pressórica. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram que endotoxemia causa alterações no sistema hipotálamo-hipófise, resultando na facilitação da liberação de AVP em resposta a um estímulo osmótico (GRINEVICH, et al. 2003).

Durante o choque séptico a infusão de hidroxietilamido isotônico não promoveu alteração da PAM, mesmo após uma grande infusão (i.v.) de 16 mL/kg HES. Este dado está de acordo com a literatura (HOFFMAN, et al. 2002; SCHAPER, et al. 2008). No choque séptico, a vasodilatação provocada pela excessiva produção de óxido nítrico aumenta a complacência do vaso, permitindo que maior volume ocupe o leito vascular sem provocar aumento da pressão arterial (NDUKA; PARRILLO, 2009).

Durante o choque séptico, a infusão intra-vascular de soluções isotônicas gera uma grande expansão de volume sanguíneo, que por sua vez induz a queda da pressão arterial e frequência cardíaca (ANDERSON, et al. 1986; GODINO, et al. 2005). Essa resposta pode ser mediada pela rápida liberação do ANP e OT, pois ambos apresentam efeito natriurético a fim de reduzir o aumento de volume plasmático, além de seus efeitos vasodilatadores (HAANWINCKEL, et al. 1995; GODINO, et al. 2005;). Além disso, ambos os peptídeos tem sido associado no controle reflexo da frequência cardíaca, aumentando estimulação vagal, contribuindo para bradicardia (THOMAS, et al. 2001; MICHELLINI, et al., 2003).

Apesar da OT apresentar a função de vasodilatação através de sua própria ação ou aumentando a liberação de ANP, quando neste estudo houve administração previa de um antagonista de OT (Atosiban) antes da expansão de volume sanguíneo com HES 16 ml/kg, não foi observada diferença na pressão arterial quando comparado com grupo controle. Isto sugere que a participação da OT é pequena na modulação da pressão arterial durante o choque séptico induzido por CLP.

Estudos prévios de outros autores têm demonstrado que a infusão intravenosa de Hyper-HES restaura os parâmetros hemodinâmicos e perfusão tecidual durante o choque séptico (OLIVEIRA, et al. 2002; POLI-DE-FIGUEIREDO, et al. 2006). A vantagem da solução hipertônica é que a administração de pequeno volume pode promover expansão plasmática significativa. A elevada osmolaridade dessa solução aumenta o descolamento de volume do compartimento extra-vascular para intra-vascular, minimizando o edema tecidual devido ao aumento do volume plasmático (DROBIN; HAHN, 2002; POLI-DE-FIGUEIREDO, et al. 2006; VELASCO, et al. 1980). A curta duração do efeito circulatório pode ser atribuída ao rápido equilíbrio do soluto hipertônico entre o compartimento extra e intravascular. O efeito da solução hipertônica foi transitório e o seu uso repetido pode levar ao um aumento excessivo de sódio e osmolaridade plasmática, resultando em sobrecarga de volume sanguíneo, levando a falência cardíaca e edema pulmonar, ou pode induzir acidose metabólica hiperclorêmica e desordens de coagulação (OLIVEIRA, et al. 2002; KRAMER, 2003).

No entanto, o hidroxietilamido pode prolongar esse efeito por ter capacidade de manter volume no espaço vascular (GROCOTT; HAMILTON, 2002). O hidroxietilamido hipertônico apresentou, após sua infusão, um efeito mais pronunciado, uma vez que, a PAM

permaneceu elevada por um tempo maior (aproximadamente 1 hora) quando comparada com outros estudos que promoveram administração de salina hipertônica (aproximadamente 20 minutos) (SANTIAGO, et al. 2013). Isso porque a pressão oncótica promovida no espaço intravascular é maior devido às moléculas de maior peso molecular envolvidas (VELASCO, et al. 1989).

Alguns estudos têm atribuído um melhor efeito hemodinâmico ao uso de colóides associados à solução de salina hipertônica (CHIARA, et al. 2003; NASCIMENTO, et al. 2006). Contudo, o efeito mais importante é a manutenção do efeito da expansão intravascular por períodos maiores, prolongando assim, os efeitos hemodinâmicos e metabólicos benéficos das soluções hipertônicas.

A administração de hidroxietilamido isotônico não teve qualquer efeito sobre o sódio plasmático, no entanto, quando administrado hidroxietilamido em solução hipertônica observamos um aumento considerável de sódio plasmático, demonstrando que a administração de soluções hipertônicas realmente aumenta os níveis de sódio sérico. Áreas específicas do cérebro são ativadas por hiperosmolaridade, e isso induz efeitos cardiovasculares através de mecanismos neurais e hormonais. Hormônios circulantes, como ANG II, bem como a hipertonidade plasmática influenciam na secreção da AVP pela neurohipófise (ANTUNES-RODRIGUES, et al. 2004; CUNNINGHAM, et al. 2002).

Durante a hipotensão, a vasopressina ajuda a manter a pressão arterial agindo como um potente vasoconstrictor, mas no choque séptico citocinas pro-inflamatórias promovem down-regulation dos receptores V_1 , causando atenuação do efeito vasoconstrictor, que contribui para o desenvolvimento da falência cardíaca durante o choque (BARRETT, et al. 2007; BUCHER, et al., 2002). De acordo com estudos anteriores, solução hipertônica reduz a produção de IL-1beta, NO e expressão de iNOS 18 horas após o CLP, melhorando parâmetros metabólicos e cardiovasculares, como aumento da pressão arterial (SHIH, et al. 2008). Redução da expressão de iNOS é crucial para tratamento de pacientes com choque séptico, pois essa enzima aumenta a produção de NO, umas das principais substâncias que promovem redução da resistência periférica e inadequada perfusão tecidual, seguida de falência múltipla dos órgãos (BONE, et al. 1997).

No choque hipovolêmico e cardiogênico, os níveis de AVP estão elevados, mas este aumento não é observado no choque séptico em humanos e em animais (SHARSHAR, et al. 2003; LANDRY, et al. 1997; GIUSTI-PAIVA, et al. 2002 e 2005; BATALHÃO, et al. 2008). O choque séptico causa aumento transitório inicial de AVP, mas seus níveis diminuem na fase tardia do choque séptico para níveis muito baixo, como descrito anteriormente (SHARSHAR, et al. 2003; LANDRY, et al. 1997). Infusão de baixas doses de AVP é utilizada como um tratamento racional para o suporte hemodinâmico.

A razão para uso de AVP incluem a redução nos níveis plasmáticos desse hormônio em pacientes com choque séptico e a hipótese de que administração exógena de vasopressina restaura o tônus vascular e pressão arterial, assim reduzindo o uso de catecolaminas (RUSSELL, et al. 2008; HOLMES, et al. 2001). Os dados obtidos demonstraram a importância da administração de solução hipertônica, acompanhada hidroxietilamido, para o restabelecimento dos níveis de vasopressina e conseqüente restabelecimento da pressão arterial, mostrando que é a hipertonidade do meio a responsável por esse aumento que é mantido pelas soluções colóides.

6.5 ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS DURANTE O CHOQUE SÉPTICO

No presente estudo, observou-se que o CLP prejudicou as respostas autonômicas para ativação do quimiorreflexo e barorreflexo. Além disso, ocorreu uma redução na PAM sem alterações na frequência cardíaca 24 horas após a cirurgia de CLP. O Choque séptico é frequentemente associado com evidente taquicardia que ocorre devido à ativação do barorreflexo e aumento das catecolaminas circulantes no organismo (GROVES, et al. 1973; LEINHARDT, et al. 1993). No entanto, este efeito persiste somente 12 horas após a cirurgia de CLP, sugerindo que o prejuízo no mecanismo do barorreflexo ocorre em uma fase mais tardia. Esses dados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram uma redução na atividade do barorreflexo durante a sepse, que por sua vez tem sido associado com falha nas funções do sistema nervoso autonômico (ANNANE, et al. 1999).

A função do barorreflexo arterial, expressa como sensibilidade do barorreflexo, está prejudicada na hipertensão e outras doenças cardiovasculares (SU, et al. 1986). A redução também foi avaliada em pacientes com sepse, o que poderia explicar a deficiência da secreção de AVP comentada anteriormente (ANNANE, et al. 1999; SHMIDT, et al. 2001; SHARSHAR, et al., 2003a). Além disso, os resultados prévios obtidos em humanos septicêmicos demonstram haver diminuição da variação batimento-a-batimento ou pulso-a-pulso (variabilidade) da FC e PAM, respectivamente, indicando um desacoplamento dos sistemas autonômicos e cardiovasculares (GODIN; BUCHMAN, 1996; TOWEILL, et al. 2000). No entanto, as medições da função autonômica em pacientes sépticos são difíceis de quantificar e nem sempre são reprodutíveis. Por outro lado, existem poucos estudos experimentais que demonstram disfunção autonômica séptica, como um experimento que foi realizado em coelhos anestesiados. Após a administração de LPS i.v. foi observado uma queda da PAM após 2 horas. Neste mesmo tempo, foi observado uma redução da variabilidade da FC e PAM sem alteração plasmática de catecolaminas, indicando

novamente um desacoplamento dos sistemas autonômicos e cardiovasculares (GOLDSTEIN, et al. 1995). No nosso estudo, verificamos a sensibilidade do barorreflexo que está diminuída durante o choque séptico. Mesmo com a restauração da PAM não observamos melhora ou atenuação da redução da sensibilidade.

Mudanças na PAM e volume sanguíneo são percebidas por mecanorreceptores. Esta informação é transmitida pelos nervos vago e glossofaríngeo para regiões autonômicas. O NTS e RVLM são importantes sítios de integração sináptica para os reflexos que resultam em respostas cardiovasculares e neuroendócrinas para manter a pressão arterial e volume sanguíneo (SPYER, 1994). No nosso estudo, verificamos que a administração de um neurotransmissor excitatório (glutamato) na região do RVLM promoveu um menor aumento da PAM quando comparado com o grupo Sham, e essa atenuação não se modificou mesmo com a pressão arterial restaurada. O mesmo é observado pela ativação simpática por administração de Carbachol e ANG II no VL, no qual promove um típico aumento de PAM nos animais Sham. Essa resposta foi atenuada nos animais submetidos ao choque séptico induzido pelo CLP. Com esse resultado podemos sugerir que as vias eferentes da ativação simpáticas estão prejudicadas, e esse prejuízo pode estar relacionado com a perda do tônus vascular que ocorre durante o choque séptico.

Estudo realizado por Bruhn et al. (2009), demonstrou que áreas importante para controle cardiovascular como, locus coeruleus, núcleo parabraquial, bulbo ventral lateral e núcleo do trato solitário apresentaram baixa atividade neuronal durante a fase tardia da sepse. Essas áreas tem importante papel no controle do barorreflexo e quimiorreflexo. No entanto, pouco se sabe sobre a atividade do quimiorreflexo durante o choque séptico.

O quimiorreflexo periférico em nosso estudo foi ativado usando injeção i.v. de cianeto de potássio (KCN), que produz uma hipóxia citotóxica. Estudos anteriores tem demonstrado que ativação do quimiorreflexo com KCN mimetiza o padrão e magnitude das respostas cardiovasculares produzida pela hipóxia hipóxica (5-7% O₂), incluindo rápido aumento da PAM acompanhado de uma queda da frequência cardíaca. Esses efeitos foram abolidos por uma ligadura bilateral das artérias do corpo carotídeo (BARROS, et al. 2002).

Assim, a baixa concentração de KCN utilizada neste estudo é uma ferramenta útil para a ativação do quimiorreflexo periférico. Este procedimento foi validado por vários estudos (HAIBARA, et al. 1999; MACHADO; BONAGAMBA, 2005; BRAGA, et al. 2007). As respostas cardiovasculares provocadas pela hipóxia citotóxica e hipóxia hipóxica foram diretamente comparadas nos mesmos animais não anestesiados e sob as mesmas condições experimentais, fornecendo a evidência de que ambos os estímulos produzem efeitos semelhantes no sistema cardiovascular pela ativação dos quimiorreceptores carotídeos (BARROS, et al. 2002). É provável que depois de ambos tipos de estimulação (hipóxia citotóxica ou hipóxia hipóxica), as células quimiossensíveis despolarizem neurônios

aferentes, que inicialmente ativam o NTS, com subsequente ativação simpática e parassimpática, resultando na elevação da PAM e bradicardia, respectivamente (FINLEY; KATZ, 1992; MIFFLIN, 1992; VARDHAN, et al. 1993; e CIRIELLO, et al. 1994).

Durante o choque séptico induzido pelo CLP, nós observamos que os efeitos da administração de KCN foram diferentes do grupo Sham. Observamos ainda a atenuação do aumento da PAM, da redução da frequência cardíaca e do aumento da frequência respiratória. Além disso, demonstramos que ativação neuronal nas áreas analisadas do NTS, após intermitente ativação do quimiorreflexo através da administração de KCN está diminuída durante o choque séptico experimental induzido pelo CLP quando comparado com animais Sham.

Um dos possíveis mediadores químicos envolvidos neste déficit seria o óxido nítrico. Estudos anteriores têm indicado que o choque séptico promove uma excessiva produção central e periférica de óxido nítrico (NO) (GIUSTI-PAIVA; SANTIAGO, 2010).

O NO é conhecido por estar envolvido na regulação central das funções autonômicas. A nNOS está presente em muitas regiões do cérebro que são importantes para funções cardíacas e respiratórias, incluindo o NTS, bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (VINCENT; KIMURA, 1992; DE VENTE, et al. 1998; LIN, et al. 2007). No NTS foi demonstrado que o NO está envolvido na transdução dos sinais cardiovasculares e respiratórios (MACHADO; BONAGAMBA, 1992; HARADA, et al. 1993; OGAWA, et al. 1995; LO, et al. 1996; MATSUMURA, et al. 1998). Além da regulação central, o NO tem participação importantíssima na regulação do tônus vascular (DAVIES; HAGEN, 1997).

Durante o choque séptico, o NO é um dos fatores que parecem desempenhar um papel duplo. A produção de NO na fase inicial produz efeitos benéficos ao paciente, incluindo a vasodilatação, prevenção de adesão leucocitária e plaquetária, melhorando o fluxo sanguíneo e aumentando a defesa do hospedeiro (THIEMERMANN, 1997). No entanto, a NOS α aumenta a produção de NO na fase final da sepse contribuindo para efeitos deletérios desta síndrome, como a hipotensão, elevação da permeabilidade vascular e lesão de múltiplos órgãos (CORREA, et al. 2007; FEIHL, et al. 2001; OLIVEIRA-PELEGRIN, et al. 2009; SHARSHAR, et al. 2003; THIEMERMANN, 1997; TITHERADGE, 1999; WU, et al. 1995; WU, et al. 2004).

A vasodilatação gerada pela excessiva produção de NO durante o choque séptico (GIUSTI-PAIVA; SANTIAGO, 2010; HOLMES, et al. 2001) poderia ser responsável pelo déficit das respostas autonômicas cardiovasculares após a administração de KCN. Para avaliar essa possibilidade, o efeito da vasodilatação excessiva foi minimizado pela administração i.v. de L-Name e fenilefrina (infusão contínua) 24 horas após a cirurgia de CLP. Mesmo assim, nós observamos que o déficit das respostas autonômicas persistiu,

sugerindo que a excessiva vasodilatação periférica parece não contribuir para o déficit das respostas autonômicas induzido pela administração de KCN.

Após tentativa fracassada da administração de L-Name i.v. 24 após o CLP, foi analisado o efeito do pré-tratamento, ou seja, antes da cirurgia de CLP, foi feita a administração de aminoguanidina (Ag) ou L-Name i.c.v ou i.p..

Com esses experimentos, o nosso estudo forneceu evidências de que o NO central, em função das observações da inibição da NOSi modula as alterações autonômicas durante o choque séptico experimental em ratos, pois a aminoguanidina, um bloqueador de NOSi seletivo, administrado i.c.v. atenuou os déficits das alterações autonômicas (PAM, FC e Fr) após ativação quimiorreflexa durante o choque séptico induzido pela cirurgia de CLP. Além do mais, o tratamento com bloqueador de NOSi i.c.v. atenuou a queda do número de cFOS no NTSi e NTSc após intermitente ativação quimiorreflexa durante o choque séptico quando comparado com seu grupo controle. Vale ressaltar que o NO não deve ser o único fator envolvido, portanto há necessidade de mais estudos sobre o assunto.

O NO derivado da NOSi tem sido implicado em numerosos eventos fisiopatológicos no sistema nervoso central. A NOSi pode ser induzida no cérebro como uma consequência de diferentes processos fisiopatológicos, tais como acidente vascular cerebral, trauma, infecção, sob a forma de meningite, encefalite ou outras condições. Outro mecanismo que induz a síntese de NOSi no cérebro é uma resposta a eventos periféricos, particularmente infecção sistêmica. Nesta situação, a sepse conduz a liberação de citocinas como interleucina -1 β , fator de necrose tumoral α , interleucina-6 e interferon - γ a partir de células imunes e outros, incluindo as células do cérebro (WONG, et al. 1997)

No cérebro, a expressão de NOSi foi caracterizada por astrócitos, células da glia, neurônios e células endoteliais (PARK, et al. 1994; LIU, et al. 2001). Apesar de não mensurar a atividade de NOSi, estudos anteriores demonstram que a produção de NO torna-se reduzida após a administração de Ag (YANG; KRUKOFF, 2000; LEIB, et al. 1998).

A fisiopatologia da sepse sistêmica envolve claramente o sistema nervoso central, afetando a temperatura corpórea, a função neuroendócrina, o comportamento e promovendo alterações autonômicas como descrito neste estudo (LANDRY, et al. 1997). Para avaliar a intensidade da expressão de NOSi no cérebro durante o choque séptico experimental, Wong et al. (1996), analisaram a expressão de NOSi em cérebro de ratos após a administração de LPS. Eles observaram que o RNA mensageiro de NOSi foi detectável em diversas regiões do cérebro, acompanhado por um elevação da concentração de nitrito no fluido cerebrospinal.

Os mecanismos pelos quais a sepse através da expressão de NOSi afeta a função central não são entendidos. No entanto, torna-se cada vez mais evidente que o NO produzido no sistema nervoso central, tem um papel fisiológico importante nas regulações

de fluidos e pressão arterial (KADEKARO, et al. 1998). Esta hipótese tem sido confirmada pela verificação de que os animais com NOSi mutante são resistentes a hipotensão e morte causada pelo LPS (WEI, et al. 1995). Estudo realizado por Granjeiro e Machado (2009), sugeriu que o NO derivado da nNOS na área do NTS pode modular o aumento da frequência respiratória, mas não o aumento da PAM em resposta ao KCN em animais acordados. Outros dados sugerem que NO derivado de vias não nNOS estaria modulando o barorreflexo arterial. E tem sido demonstrado que NO liberado do endotélio na microcirculação possa modular a transmissão sináptica do NTS (WAKI, et al. 2006). Neste contexto, Sakai et al. (2005), observaram que a super expressão de eNOS no NTS causa diminuição da pressão arterial, frequência cardíaca e excreção urinária de epinefrina em ratos acordados, sugerindo que NO derivado do eNOS no NTS tem papel importante na neuromodulação do controle da pressão arterial. Outro estudo relevante foi realizado por Machado e Bonagamba (1992), que demonstrou que microinjeção de um doador de NO na área do NTS produz uma queda da pressão arterial e frequência cardíaca.

No presente estudo encontramos uma atenuação da queda das respostas autonômicas após administração de aminoguanidina i.c.v. em ratos submetidos a cirurgia de CLP. Nossos dados sugerem que o NO sintetizado centralmente exerce uma influência inibitória tônica sobre as respostas autonômicas durante o choque séptico experimental. Além disso, quando analisado o efeito da administração periférica de aminoguanidina, não foi observada uma atenuação das respostas autonômicas. Este fato sugere que a ação do bloqueador da NOSi no sistema nervoso central é mais eficaz no controle das funções autonômicas no nosso modelo experimental do que o bloqueio da NOSi periférica.

7.0 CONCLUSÃO

A expansão de volume sanguíneo com com solução cristalóide hipertônica (NaCl 7,5%) apresentou vantagem quando comparado à administração de solução isotônica (NaCl 0,9%) durante o choque séptico experimental induzido por CLP. A administração de um colóide juntamente com o cristalóide (Hyper-HES) promove aumento da pressão arterial por um período maior quando comparado com a administração de um cristalóide. Em ambos os casos, o aumento da pressão arterial decorrente da administração das soluções hipertônicas cristalóides e/ou colóides parecem ser mediada pela liberação de vasopressina.

A vasopressina tem uma secreção bifásica durante o choque séptico. A baixa secreção de vasopressina durante o choque séptico deve-se pelo aumento da produção de NO central, uma vez que, a utilização de L-Name i.c.v.(bloqueador de NO) promoveu um aumento da secreção de vasopressina. Além do mais, após a administração de solução hipertônica observamos um aumento de vasopressina.

As funções barorreflexas e quimiorreflexas estão prejudicadas durante o choque séptico, independente da restauração da pressão arterial. O NO produzido no SNC via iNOS parece ser uns dos fatores que modulam o déficit das respostas quimiorreflexas durante o choque séptico. Além disso, o NO produzido periféricamente parece não ter influência nas respostas baro- e quimiorreflexas durante o CLP.

REFERENCIAS

AGUILERA, G.; RABADAN-DIEHL, C. Vasopressinergic regulation of the hypothalamic - pituitary-adrenal axis: implications for stress adaptation. **Regul Pept**, v. 96, n. 1-2, p. 23-29, 2000.

ALLEN, D. E.; GELLAI, M. Cardioinhibitory effect of atrial peptide in conscious rats. **Am. J. Physiol**, v. 252, n. 21 p. R610-616, 1987.

AMBROSIO, A. E.; FRACASSO, J. F.; Effect of N ω NLA or dexamethasone on vascular hyporeactivity induced by *e. coli* endotoxin in sham and adrenalectomized rats. **Rev Ciênc Farm**, v.21, n. 2, p. 265-275, 2000.

ANDERSON, J. V.; CRISTOFIDES, N. D.; BLOOM, S. R. Plasma release of atrial natriuretic peptide in response to blood volume expansion. **J Endocrinol**, n.109, p.9-13, 1986.

ANNANE, D., et al. Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. **Am J Respir Crit Care Med**. v. 160, p. 458-465, 1999.

ANNANE, D. et al. Norepinephrine plus dobutamine versus epinephrine alone for management of septic shock: a randomised trial. **Lancet**, v. 370, n. 9588, p. 676-684, 2007.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, n. 84, p.169-208, 2004.

ARDAILLOU, R. Angiotensin II receptors. **J Am Soc Nephrol**, v.10, p.S30- 9. 1999.

ARMISTEAD, C. W. et al. Hypertonic saline solution-hetastarch for fluid resuscitation in experimental septic shock. **Anesth Analg**, v. 69, p. 714–720, 1989.

BALK, R. A. Optimum treatment of severe sepsis and septic shock: evidence in support of the recommendations. **Dis Mon**, v. 50, n. 4, p. 168-213, 2004.

BARBOSA, S. P., et al. Lesion of the anteroventral third ventricle region abolishes the beneficial effects of hypertonic saline on hemorrhagic shock in rats. **Brain Res**, v.530, p. 342-344, 1990.

BARRETT, L. K.; SINGER, M.; CLAPP, L. H. Vasopressin: mechanisms of action on the vasculature in health and in septic shock. **Crit Care Med**, v. 35, p. 33-40, 2007.

BARROS, R. C. et al. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. **Auton. Neurosci.** v. 97, n. 2 p.110-115, 2002

BARTLETT, D. Jr.; TENNEY, S.M. Control of breathing in experimental anemia. **Respir Physiol**, v. 10, n.3, p.384-395, 1970.

BATALHÃO, M. E. et al. Role dexamethasone on vasopressin release during endotoxemic shock. **Regul Pept**, n. 147, p. 67-71, 2008

BATISTA, M. B. et al. Pressor response to fluid resuscitation in endotoxic shock: involvement of vasopressin. **Crit Care Med**, v.37, n. 11, p. 2968-2972, 2009.

BATTAGLIA, D. F. et al. Systemic challenge with endotoxin stimulates corticotropin-releasing hormone and arginine vasopressin secretion into hypophyseal portal blood: coincidence with gonadotropin-releasing hormone suppression. **Endocrinology**, v.139, n.10, p.4175-81, 1998.

_____. Endotoxin inhibits the reproductive neuroendocrine axis while stimulating adrenal steroids: a simultaneous view from hypophyseal portal and peripheral blood.

Endocrinology, v. 138, n.10, p. 4278-4281, 1997.

_____. Endocrine alterations that underlie endotoxin-induced disruption of the follicular phase in ewes. **Biol Reprod**, v. 62, n.1, p. 45-53, 2000.

BENJAMIN, C. F.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Role of nitric oxide in the failure of neutrophil migration in sepsis. **J Infect Dis**. v. 182, p.214-223, 2000.

_____. The chronic consequences of severe sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 75, p. 408-412, 2004.

BERTOK L. Endotoxin as stressor and endotoxemia as stress. **Ann Ny Acad Sci**, v. 851, p. 404-405, 1998.

BIRNBAUMER M. Vasopressin receptors Trends. **Endocrinol Metab**, v.11, n.10, p. 406-410, 2000.

BISCOE, T. J.; LALL, A.; SAMPSON, S. R. On the nerve endings associated with the carotid body glomus cells of the cat. **J Physiol**, v. 200, n. 2, p. 131-132, 1969.

BISCOE, T. J.; SAMPSON, S. R. Stimulus response curves of single carotid body chemoreceptor afferent fibres. **Nature**, v. 215, n. 5101, p. 654-655, 1967.

BOCHUD, P. Y.; GLAUSER, M. P.; CALANDRA, T. Antibiotics in sepsis. **Intensive Care Med**, v.27, p. 33-48, 2001.

_____. International Sepsis Forum. Antibiotic in sepsis. **Intensive Care Med**. v.27, n.1, p.33-48, 2001.

BOLDT, J. et al. Influence on coagulation of a potato-derived hydroxethylstarch (HES 130/0.42) and a maize-derived hydroxethylstarch (HES 103/0.4) in patients undergoing cardiac surgery. **Br J Anaesth**, v. 102, p. 191-197.

BOLTON, C. F.; YOUNG, G. B.; ZOCHODNE, D. W. The neurological complications of sepsis. **Ann Neurol**. v. 33, p. 94-100, 1993.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis, anew hypothesis for pathogeneses of the disease process. **Chest**, v.112, p. 235-243, 1997.

_____. Definitions for sepsis and organ failure. **Crit Care Med**. v. 20, n.6, p.724-726, 1992.

BRAGA, V. A. et al. Activation of peripheral chemoreceptors causes positive inotropic effects in a working heartbrainstem preparation of the rat. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 34, n.11 p.1156-1159, 2007.

BRENNER, B. M., et al. Diverse biological actions of atrial natriuretic peptide. **Physiol Rev**, v. 70, n.3, p.665-699, 1990.

BREUHAUS, B. A., et al. Atriopeptin II lowers cardiac output in conscious sheeps. **Am J Physiol**, v. 249, n. 18, p. 776-780, 1985.

BROOKS, H.F., et al. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. **Metab Brain Dis**, v. 22, n. 3-4, p. 353-373, 2007.

BRUHN, F.H., et al. Blocking systemic nitric oxide production alters neuronal activation in brain structures involved in cardiovascular regulation during polymicrobial sepsis. **Neurosci Lett**, v.453, n. 3, p. 141-146, 2009.

BUCHER, M., et al. Cytokine-mediated down-regulation of vasopressin V (1A) receptors during acute endotoxemia in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v.282, p. 979-984, 2002.

BURNETT-JR, J. C.; GRANCER, J. P.; OPGENORTH, T. J. Effects of synthetic atrial natriuretic factor on renal function and rennin release. **Am J Physiol**, v. 247, n. 16, p. 863-866, 1984.

BUWALDA, M.; INCE C. Opning the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis? **Intensive Care Med**, v. 28, n. 9, p. 1208-1217, 2002.

CARDOSO, L.M., et al. Baroreflex function in conscious rats submitted to iron overload. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 2, p. 205-214, 2005.

CHAN, J. Y.; WANG, S. H.; CHAN, S. H. Differential roles of iNOS and nNOS at rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. **Shock**, v. 15, n.1, p. 65-72, 2001.

CHIARA, O., et al. Resuscitation from hemorrhagic shock: experimental model comparing normal saline, dextran and hypertonic saline solutions. **Crit Care Med**, v. 31, n. 7, p. 1915-1922, 2003.

CHROUSOS, G. P. Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptative response. **Ann New York Acad Sci**, v. 851, p. 311-335, 1998.

CIRIELLO, J.; HOCHSTENBACH, S. L.; RODER, S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat. In: Nucleus of solitary tract. Edited by. I. Robin A. Barraco. **CRC Press**, p. 33-50, 1994.

_____. Horseradish peroxidase study of brain stem projections of carotid sinus and aortic depressor nerves in the cat. **J Auton Nerv Syst.** v. 4, n.1, p. 43-61, 1981.

_____. Collateral axonal projections from ventrolateral medullary non-catecholaminergic neurons to central nucleus of the amygdale. **Brain Res.** v.663, n.2, p. 346-351, 1994

COGAN, M. C. A. Atrial natriuretic factor can increase renal solute excretion primarily by raising glomerular filtration. **Am J. Physiology**, n. 250, p.710 – 714, 1986.

COMROE, J. H. The location and function of the chemoreceptors of the aorta. **Am J Physiol.** v.127, p. 176-190, 1939.

CORREA, P. B., et al. Participation of iNOS-derivedNOin hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **J. Neuroimmunol**, v.183, p.17–25, 2007.

COTTLE, M. K. Degeneration studies of primary afferents of IXTH and XTH cranial nerves in the cat. **J Comp Neurol**, v. 122, p. 329-345, 1964.

CRILL, W. E.; REIS, D. J. Distribution of carotid sinus and depressor nerves in cat brain stem. **AM J Physiol**, v. 214, n. 2, p. 269-276, 1968.

CRUZ, J. C., et al. Fos expression in the NTS in response to peripheral chemoreflex activation in awake rats. **Auton Neurosci**, v. 152, p. 27-34, 2010.

CUNNINGHAM, J. T., et al. Fos immunoreactivity in the diagonal band the perinuclear zone of the supraoptic nucleus after hypertension and hypervolaemia in unanesthetized. **J Neuroendocrinol**, v.14, n.3, p. 219-227, 2002.

CUSCHIERI, J., et al. Hypertonic preconditioning inhibits macrophage responsiveness to endotoxin. **J Immunol**, v. 168, p.1389-1396, 2002.

DANDONA, P., et al. Angiotensin II and inflammation: the effect of angiotensin-converting enzyme inhibition and angiotensin II receptor blockade. **J Human Hyperten**, v. 21, p. 20-27, 2007.

DAVIES, M. G.; HAGEN, P. Systemic inflammatory response syndrome. **Br J surg**, v.84, p. 920-935, 1997.

DE BOLD, C. R., et al Arginine vasopressin potentiates adrenocorticotropin release induced by ovine corticotropin-releasing adrenocorticotropin release induced by ovine corticotropin-releasing factor. **J Clin Invest**, v.73, n.2, p. 533-538, 1984.

DE VENTE, J. et al. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive, cyclic GMP-producing structures in the rat brain. **Neuroscience**, v. 87, n. 1, p. 207-241, 1998.

DELLINGER, R. P., et al. Surviving Sepsis Campaign Management Guidelines Committee. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med**, v.32, p. 2169-2170, 2004.

_____. Important issues in the design and reporting of clinical trials in severe sepsis and acute lung injury. **J Crit Care**, v.23, n.4, p.493-498, 2008.

DROBIN, D.; HAHN, R. G. Kinetic of isotonic and hypertonic plasma volume expanders. **Anesthesiology**, Philadelphia, v. 96, p. 1371-1380, 2002.

DUNN, F. L. et al. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **J Clin Invest**, v. 52, n. 12, p. 3212-3219, 1973.

DZAU, V. J.; BURT, D. W. Molecular biology of the renin-angiotensin system. **Am J Physiol**, v.255, n. 4, p. 563-73, 1988.

ELIAS, L. L., et al. Effect of plasma osmolality on pituitary-adrenal responses to corticotropin-releasing hormone and atrial natriuretic peptide changes in central diabetes insipidus. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, p. 1243–1247, 1997.

FEIHL, F.; WAEBER, B.; LIAUDET, L. Is nitric oxide overproduction the target of choice for the management of septic shock? **Pharmacol Ther**, v. 91, n. 3, p. 179-213, 2001.

FENG, X. et al. Early treatment with hydroxyethyl starch 130/0.4 causes greater inhibition of pulmonary capillary leakage and inflammatory response than treatment instituted later in sepsis induced by cecal ligation and puncture in rats. **Ann Clin Lab Sci**, v. 37, p. 49-56, 2007.

FINFER, S. et al. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. **N Engl J Med**, v. 350, p. 2247– 2256, 2004.

Finley, J. C., Katz, D. M. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. **Brain Res**. v. 572, n. 1-2, p.108-116,1992

FLORAS, J.S. et al. Consequences of impaired arterial baroreflexes in essential hypertension: effects on pressor responses, plasma noradrenaline and blood pressure in variability. **J Hypertens**.v. 6, p. 525-535, 1988.

FRACASSO, J. F.; SILVA, R. F. P.; LEPERA, E. Z. P. Effect of N^wNLA, an inhibitor of NO-synthase, on the release of tissueplasminogen activator from rat aorta. **Rev Ciênc Farm**, v.24, n.1, p. 23-25, 2003.

_____. Importância dos corticóides na inibição da sintase de óxido nítrico pelo N^wNLA, em ratos tratados com endotoxina. **Rev Ciênc Farm**, v. 20, n.2, p. 494-495, 1999.

FRANCHINI, K. G.; KRIEGER, E. M. Cardiovascular responses of conscious rats to carotid body chemoreceptor stimulation by intravenous KCN. **J Auton Nerv Syst**. v.42, n.1, p. 63-79, 1993.

GARDNER, D. G.; DESCHEPPER, C. F.; BAXTER, J. D. The gene for atrial natriuretic factor is expressed in the aortic arch. **Hypertension**, v.9, p.103-106, 1987.

_____. Atrial natriuretic peptide mRNA is regulated by glucocorticoides in vivo. **Biochem Biophys Res Commun**, v.139, p.1047-1054, 1986.

GARRARD, C. S.; KONTOYANNIS, D. A.; PIEPOLI, M. Spectral analysis of heart rate variability in the sepsis syndrome. **Clin Auton Res**, v. 3, p. 5-13, 1993.

GIBBS, D. M.; VALE, W.; RIVIER, J.; YEN, S. S. Oxytocin potentiates the ACTH releasing activity of CRF (41) but vasopressin. **Life Sci**, v. 34, n.23, p. 2245-2249, 1984.

GIMPL, G.; Fahrenholz, F. The oxytocin receptor system: structure, function, and regulation. **Physiol Rev.** v. 81, n. 2, p. 629-683, 2001.

GIUSTI-PAIAVA, A. Interação neuro-imuno-endócrina durante o choque endotóxico. 2004.106f. Tese (Doutorado em Fisiologia. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004.

GIUSTI-PAIVA, A.; SANTIAGO, M.B. Neurohypophyseal dysfunction during septic shock. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targ**, v, 10, n. 3, p. 247-251, 2010.

GIUSTI-PIAVA, A., et al. Role of nitric oxide in thermoregulation during septic shock: involvement of vasopressin. **Pflugers Arch**, v. 447, p. 175-180, 2003a.

_____. Simvastatin decreases nitric oxide overproduction and reverts the impaired vascular responsiveness induced by experimental septic shock in rats. **Shock**, v. 21, p. 271-275, 2004a.

_____. Vasopressin mediates the pressor effect of hypertonic saline solution in endotoxic shock. **Shock**, v. 27, n. 4, p. 416-421, 2007.

_____. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med**, v. 30, p.1306-1310, 2002.

_____. Inhibitory effect of gaseous neuromodulators in vasopressin and oxytocin release induced by endotoxin in rats. **Neurosci Lett**, v. 381, p. 320-324, 2005.

_____. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. **Neurosci Lett**, Amsterdam, v. 346, p. 21-24, 2003b.

_____. Anteroventral third ventricle (AV3V) lesion reduced hypothalamic activation and hormone secretion induced by lipopolissacaride in rats. **Neuroimmunomodulation**, Basel, 2004.

GLAUSER, M. P. et al. Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: na update. **Clin infect**, v.2, p. S205-S216, 1994.

GODIN, P. J.; BUCHMAN, T. G. Uncoupling of biological oscillators: a complementary hypothesis concernig the pathogenesis of multiple organ dysfunction syndrome. **Crit Care Med**, v. 24, p. 1107-1116, 1996.

GODINO, A. et al. Neurochemical brain groups activated after na isotonic blood volume expansion in rats. **Neuroscience**, v. 133, p. 493-505, 2005.

GOLDSTEIN, B. et al. Autonomic modulation of heart rate variability during endotoxin shock in rabbits. **Crit Care Med**, v. 23, n. 10, p. 1694-1702, 1995.

GONZALEZ, C.. et al. Cellular mechanisms of oxygen chemoreception in the carotid body. **Respir Physiol**. v. 102, n.2-3, p. 137-147, 1995.

GRANJEIRO, E. M.; MACHADO, B. H. NO in the caudal NTS modulates the increase in respiratory frequency in response to chemoreflex activation in awake rats. **Respir Physiol Neurobiol**, v. 166, n. 1, p. 32-40, 2009.

GRINEVICH, V. et al. Lipopolysaccharide endotoxin potentiates the effect of osmotic stimulation on vasopressin synthesis and secretion in the rat hypothalamus. **J Neuroendocrinol**, v. 15, p.141-149, 2003.

GROCOTT, M. P.; HAMILTON, M. A. Resuscitation fluids. **Vox Sang**, v. 82, p.1-8, 2002.

GROVES, A. C. et al. Plasma catecholamines in patients with serious postoperative infection. **Ann. Surg**, v.178, p. 102–107, 1973

GUTKOWSKA, J. et al. Lung is an important source of atrial natriuretic factor in experimental cardiomyopathy. **J Clin Invest**, v. 83, n. 5, p. 1500-1504, 1989.

HAANWINCKEL, M. A. et al. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 95, p. 7902-7906, 1995.

HAIBARA, A. S. et al. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 269, n. 4, p. 1421-1427, 1995.

HARADA, S. et al. Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitaries increases renal sympathetic nerve activity in rabbits. **Circ Res**, v. 72, n. 3, p. 511-516, 1993.

HARMS, P. G.; OJEDA, S. R. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J Appl Physiol**. v. 36, p. 391-392, 1974.

_____. A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. **J Appl Physiol**, Washington, v. 36, p.391-392, 1974.

HEYMANS, C.; BOUCKAERT, J. J. Sinus cardien et reflexes respiratoires. **CR Soc Biol**. v. 103, p. 498-500, 1930.

HIRAI, T. et al. Differential sympathetic nerve responses to nitric oxide synthase inhibition in anesthetized rats. **Am J Physiol**, v. 269, n.4, p. 807-813, 1995.

HOFFMANN, J. N. et al. Hydroxyethyl starch (130 kD), but not crystalloid volume support, improves microcirculation during normotensive endotoxemia. **Anesthesiology**, v. 97, p. 460-470, 2002.

.

HOLLENBERG, S. M. et al. Practice parameters for hemodynamic support of sepsis in adult patients: 2004 update. **Crit Care Med**. v.32, n.9, p. 1928-1948, 2004.

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

HORTON, J. W.; WALKER, P. B. Small-volume hypertonic saline dextran resuscitation from canine endotoxin shock. **Ann Surg**, v.214, p.64-73, 1991.

HOTCHKISS, R. S.; TINSLEY, K. W.; KARL, I. E. Role of apoptotic cell death in sepsis. **Scand J Infect Dis**. v.35, n.9, p.585-592, 2003.

Howe, A. The vasculature of the aortic bodies in the cat. **J Physiol**. v. 28, n.2, p. 311-308, 1956.

HUBBARD, W. J., et al. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v.24, n.1, p 52-57, 2005.

ING, R. D. et al. Hypertonic saline/dextran improves septic myocardial performance. **Am Surg**, v.60, p. 505-508, 1994.

IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, E. M. Baroreflex control of sympathetic activity experimental hypertension. **Brazil J Med Biol Res**, v. 31, n. 31, p. 1213-1220, 1998.

JIRIKOWSKI, G., et al. Coexistence of atrial natriuretic factor (ANF) and oxytocin in neurons of rat hypothalamus. **Neuropeptides**, v.8, p.243-249, 1986.

JUNGER, W. G., et al. Hypertonic saline resuscitation: a tool to modulate immune function in trauma patients. **Shock**, v. 8, p.235–241, 1997.

KADEKARO, M. et al. Effects of L-NAME on cerebral metabolic, vasopressin, oxytocin, and blood pressure responses in hemorrhaged rats. **Am J Physiol**, v. 274, n. 4, p. 1070-1077, 1998.

KAPLAN, N. M. Primary Hypertension: Pathogenesis. In: Clinical Hypertension, **Kaplan NM**. Baltimore: Williams & Wilkins, p. 41-99, 1998.

KARASU, C. Time course of changes in endothelium-dependent and -independent relaxation of chronically diabetic aorta: role of reactive oxygen species. **Eur J Pharmacol**, v. 392, n.3, p.163-73, 2000.

KARSCH, F. J. et al. Mechanisms for ovarian cycle disruption by immune/inflammatory stress. **Stress**, v. 5, n.2, p.101-112, 2002.

KARSCH, F.J. et al. Mechanisms for ovarian cycle disruption by immune/inflammatory stress. **Stress**, v. 5, n.2, p.101-112, 2002.

KASTING, N. W. Characteristics of body temperature, vasopressin, and oxytocin responses to endotoxin in the rat. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 64, p.1575-1578, 1986.

KEANEY, J. F. et al. Methylene blue reverses endotoxin-induced hypotension. **Circ Res**, v.74, p.1121-1125, 1999.

KIEMER, A. K. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by natriuretic peptides. **Endocrinol**, v. 143, n.3, p. 846-852, 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. 68-70, 2001.

_____. Autocrine regulation of inducible nitric-oxide synthase in macrophages by atrial natriuretic peptide. **J Biol Chem**, v. 273, n. 22, p. 13444-13451, 1998.

KLOSTERHALFEN, B.; BHARDWAJ, R. S. Septic shock. **Gen pharmacol**, v. 31, p.25-32, 1998.

KOLLMEYER, K. R.; KLEINMAN, L. I. A respiratory venous chemoreceptor in the young puppy. **J Appl Physiol**. v. 38, n. 5, p. 819-826, 1975.

KRAMER, G. C. Hypertonic resuscitation: physiologic mechanisms and recommendations for trauma care. **J Trauma**, v. 54, p.S89-S99, 2003.

KRIEGER, E. M.; IRIGOYEN, M. C.; KRIEGER, J. E. Fisiopatologia da hipertensão. **Rev Soc Card Est SP**. 1999; 9:1-7.

_____. Resetting of the baroreceptors. **Internal Rev Physiology**. v. 26, p.119-146, 1982.

_____. Angiotensinas - aspectos fisiológicos. **Hipertensão**, v.1, p.1-10. 1998.

KUHN, M. Molecular physiology of natriuretic peptide signaling. **Basic Res Cardiol**, v. 99, p. 76-82, 2004.

LANDRY, D. W. et al. Decifrando os mecanismos do choque. **Sci Am Brasil**, n. 22, p.80-5, 2004.

_____. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. **Circulation**, v. 95, p.1122-1125, 1997.

LEIB, S.L. et al. Inducible nitric oxide synthase and the effect of aminoguanidiiine in experimental neonatal meningitis. **J Infect Dis**, v. 177, n. 3, p. 692-700, 1998.

LEINHARDT, D. J. et al. Plasma NE concentrations do not accurately reflect sympathetic nervous system activity in human sepsis. **Am J Physiol**, v.265, p. 284–288, 1993

LETSON, H. L.; DOBSON, G. P. Small volume 7,5% NaCl with 6% dextran-70 or 6% and 10% hetstarch are associated with arrhythmias and death after 60 minutes of severa hemorrhagic shock in the rat in vivo. **J Trauma**. V. 70, n.6, p. 1444-14452, 2011.

LICINIO, J.; FROST, P. The neuroimmune-endocrine axis: pathophysiological implications for the central nervous system cytokines and hypothalamus-pituitary-adrenal hormone dynamics. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n.10, p.1141-1148, 2000.

LIN, L. H.; TAKTAKISHVILI, O.; TALMAN, W. T. Identification and localization of cell types that express endothelial and neuronal nitric oxide synthase in the rat nucleus tractus solitarii. **Brain Res**, v. 1171, p. 42-51, 2007.

LIU, J.S. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in multiple sclerosis lesions. **Am J Pathol**, v. 158, n. 6, p. 2057-2066, 2001.

LO, W. J. et al. Modulatory effects of nitric oxide on baroreflex activation in the brainstem nuclei of rats. **Chin J Physiol**, v. 39, n. 1, p. 57-62, 1996.

LV, R. et al. Hydroxyethyl starch inhibits intestinal production of cytokines and activation of transcription factors in endotoxaemic rats. **J Int Med Res**, v. 33, p. 379-388, 2005.

MAACK, T. D. N. et al. Effects of auriculin on blood pressure, renal function, and the renin-aldosterone system in dogs. **Am. J. Med.**, v. 77, p. 1069-1075, 1984.

MACHADO, B. H.; BONAGAMBA, L. G. Antagonism of glutamate receptors in the intermediate and caudal NTS of awake rats produced no changes in the hypertensive response to chemoreflex activation. **Auton Neurosci**, b. 117, n. 1, p. 25-32, 2005.

MACHADO, B. H.; BONAGAMBA, L. G. Microinjection of S-nitroocysteine into the nucleus tractus solitarii of conscious rats decreases arterial pressure but L-glutamate does not. **Eur J Pharmacol**, v. 221, n.1, p.179-182, 1992.

MAINES, M.D. The heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. **Ann Rev Pharmacol Toxicol**, v. 37, p.517-554, 1997.

MANDRUP-POULSEN, T., et al. Cytokines and the endocrine system. II Roles in substrate metabolism, modulation of thyroidal and pancreatic endocrine cell functions and autoimmune endocrine diseases. **Eur J Endocrinol**, v.134, n.1, p.21-30, 1996.

MARCHESI, C.; PARADIS, P.; SCHIFFRIN, E. L. Role of the rennin-angiotensin system in vascular inflammation. **Trends in Pharmacol. Scien.**, v. 29, n. 7, p. 367-374, 2008.

MARKS G, BRIEN J, NAKATSU K, MCLAUGHLIN B. Does carbon monoxide have a physiological function? **Trends in Pharmacological Sciences**, v.12, p.185-188, 1991.

MARSH, C. B.; WEWERS, M. D. The pathogenesis of sepsis. Factors that modulate the response to gram-negative bacterial infection. **Clin Chest Med**, v. 17, p.183-197, 1996.

MARTEL, M.J.; ARSENAULT, M.Y.; BARTELLAS, E. Hemorrhagic shock. **J Obster Gynaecol Can**, v.24, p.504-511, 2002.

MARTIN, C., et al. High adenosine plasma concentration as a prognostic index for outcome in patients with septic shock. **Crit Care Med**. v. 28, n. 9, p.3198-3202, 2000.

MARX, G.; PEDDER, S.; SMITH, L. et al. Resuscitation from septic shock with capillary leakage: Hydroxyethyl starch (130Kd), but not ringer's solution maintains plasma volume and systemic oxygenation. **SHOCK**, v. 21, n. 4, p. 336-341, 2004.

MATSUMURA, K., et al. Role of nitric oxide in the nucleus of the solitary tract of rats. **Brain Res**, v. 798, n. 1-2, p. 232-238, 1998.

McCANN, S.M., et al. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. **Brz J Med Bio Res**. v.33, n. 10, p. 1121-1131, 2000.

MCEWEN, B.S. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharm**, v. 22, p. 108-124, 2000.

_____ Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. **Physiol Rev**, v. 87, n.3, p. 873-904, 2007.

_____. Elaborating and testing the concepts of allostasis and allostatic load. **Ann N Y Acad Sci**, v.. 896, p. 30-47, 1999.

_____. Allostasis and allostatic load: implications for neuropsychopharmacology. **Neuropsychopharm**, v. 22, p. 108-124, 2000.

MICHELINI, L. Regulação neuro-humoral da pressão arterial. In: Fisiologia, Ayres MM, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 473-488, 1999.

MICHELLINI, L. C., et al. Oxytocinergic regulation of cardiovascular function: studies in oxytocin-deficient mice. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 284, p. H2269-H2276, 2003.

MIFFLIN, S.W. Arterial chemoreceptor input to nucleus tratus solitarius. **AM J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 263, n. 2, p. 368-375, 1992.

_____. Arterial chemoreceptor input to nucleus tractus solitariae. **Am. J. Physiol.** v.263, p.:368- 375, 1992.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology e pharmacology. **Pharmacol Rev**, v. 43, p.109-142, 1991.

MOREL, A.; LOLAIT, S. J.; BROWNSTEIN, M. J. Molecular cloning and expression of rat V1a and V2 arginine vasopressin receptor. **Regul Pept**, v. 45, n.1-2, p. 53-59, 1993.

MUCKART, D. J.; BHAGWANJEE, S. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. **Crit Care Med**. v.25, n.11, p.1789-1795, 1997.

NASCIMENTO, P.J., et al. Early hemodynamic and renal effects of hemorrhagic shock resuscitation with lactated ringer's solution, hydroxyethyl starch and hypertonic saline with or without 6% dextran-70. **J Sur Res**, v. 136, n.1, p. 98-105, 2006.

NDUKA, O. O.; PARRILLO, J. E. The pathophysiology of septic shock. **Crit Care Clin**, v. 25, n.4, p. 677-702, 2009.

OGAWA, H., et al. Nitric oxide as a retrograde messenger in the nucleus tractus solitarii of rats during hypoxia. **J Physiol**, v. 486, p. 495-504, 1995.

OLIVEIRA, R.P., et al. Hypertonic saline resuscitation in sepsis. **Crit Care**, v. 6, p.418-423, 2002.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R., et al. Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis. **Neuroimmun**, v. 16, n. 1, p. 45-53, 2009.

ONG, H.; et al. Bovine adrenal chromaffin granules are a site of synthesis of atrial natriuretic factor. **Biochem Biophys Res Commun**, v.147, p.957-963, 1987.

PACAK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr Rev**, v. 22, p.502-548, 2001.

PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, v. 328 p. 1471-1477, 1993.

PAUL, M. A., et al. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v.86, n.3, Jul, p.747-803. 2006.

PARK, S. K.; LIN, H. L.; MURPHY, S. Nitric oxide limits transcriptional induction on nitric oxide synthase in CNS glial cells. **Biochem biophys Res Commun**, v. 201, n.2, p. 762-768, 1994.

PARKES, D. G., et al. Rapid haemodynamic responses to atrial natriuretic factor (99-126) in conscious sheep. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 15, n.1, p. 67-70, 1988.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates. **2nd ed. Academic Press**, Orlando, 1983.

PAYA, D., et al. Effect of dexamethasone on the onset and persistence of vascular hyporeactivity induced by *E. coli* lipopolysaccharide in rats. **Circ Shock**, v. 41, p.103-112, 1993.

PEETERS, R. P., et al. Reduced activation and increased inactivation of thyroid hormone in tissues of critically ill patients. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 88, n.7, p.3202-3211, 2003.

PETTERSSON, A., et al. Hemodynamics and plasma ANP after acute blood volume expansion in normotensive and spontaneously hypertensive rats. **Acta Physiol Scand**, v. 133, p.513-518, 1988.

PHELPS, C. P., et al. Plasma interleukin-1 beta, prolactin, ACTH and corticosterone responses to endotoxin after damage of the anterior hypothalamic area. **Neuroimmunomodulation**, v.9, n.6, p. 340-51, 2001.

PIEPER, G. M.; SIEBENEICH, W. Oral administration of the antioxidant, N-acetylcysteine, abrogates diabetes-induced endothelial dysfunction. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 32, n.1, p.101-105, 1998.

PINSKY, M. R.; PAYEN, D. Functional hemodynamic monitoring. **Crit Care**. v.9, n.6, p.566-572, 2005.

POLI-DE-FIGUEIREDO, L. F., et al. Mechanisms of action of hypertonic saline resuscitation in severe sepsis and septic shock. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, v.6, p. 201–206, 2006.

PORTER, J. C., et al Hypothalamic-hypophysial vasculature and its relationship to secretory cells of the hypothalamus and pituitary gland. **Vitam Horm**, v. 40, p. 145-174, 1983.

RAJANI, R.R.; BALL, C.G.; FELICIANO, D.V., et al. Vasopressin in hemorrhagic shock: Review article. **Am Surg**, v. 75, n.12, p. 1207-1212, 2009.

RAMACHANDRA, R. N.; SEHON, A. H.; BERCZI, I. Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock. **Brain Behav Immun**, v.6, n.2, p. 157-16, 1992.

REES, D. D., et al. Dexamethasone prevents the induction by endotoxin of a nitric oxide synthase and the associated effect on vascular tone: An insight into endotoxin shock. **Biochem Biophys Res Commun**, v.173, p.541-547, 1990.

REES, D. D.; PALMER, R. M. J.; MONCADA, S. Role of endothelium derived nitric-oxide in the regulation of blood-pressure. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 86, p.3375-3378, 1989.

REHBERG, S.; ENKHBAATAR, P.; TRABER, D.L. Arginine vasopressin in septic shock: supplement or substitute for norepinephrine? **Crit Care**, v.13, n.4, p.178, 2009.

REID, I.A. Role of vasopressin deficiency in the vasodilation of septic shock. **Circulation**, v. 95, n.5, p. 1108-1110, 1997.

RETTORI, V.; JURCOVICOVA, J.; McCANN SM. Central action of interleukin-1 in altering the release of TSH, growth hormone, and prolactin in the male rat. **J Neurosci Res**, v. 18, n.1, p. 179-183, 1987.

_____. Interleukin 1 alpha inhibits prostaglandin E2 release to suppress pulsatile release of luteinizing hormone but not follicle-stimulating hormone. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 88, n.7, p. 2763-2767, 1991.

RIVIER C Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. **Endocrinology**, v. 113, n.3, p. 939-942, 1983.

_____. In the rat, endogenous nitric oxide modulates the response of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-1 beta, vasopressin, and oxytocin. **J Neurosci**, v. 14, p.1985-1993, 1994.

_____. Role of nitric oxide in regulating the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxemia. **Ann N Y Acad Sci**. v. 992, p. 72-85, 2003.

RIVERS, E., et al. Cerebral lactate uptake during cardiopulmonary resuscitation in humans. **J Cereb Blood Flow Metab**, v. 11, n.3, p. 479-484, 1991.

_____. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med**, v.345, p. 1345-1368, 2001.

RIVEST, S., et al. Centrally injected interleukin-1 beta inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats. **J Neuroendocrinol**, v. 5, n.4, p.445-50, 1993.

_____. Molecular insights on the cerebral innate immune system. **Brain Behav Immun**, v. 17, p.13-19, 2003.

_____. Central mechanisms and sites of action involved in the inhibitory effects of CRF and cytokines on LHRH neuronal activity. **Ann N Y Acad Sci**, v. 697, p.117-141, 1993.

_____. Centrally injected interleukin-1 beta inhibits the hypothalamic LHRH secretion and circulating LH levels via prostaglandins in rats. **J Neuroendocrinol**, v. 5, n.4, p.445-50, 1993.

_____. Interleukin-1 beta inhibits the endogenous expression of the early gene c-fos located within the nucleus of LH-RH neurons and interferes with hypothalamic LH-RH release during proestrus in the rat. **Brain Res**, v. 613, n.1, p. 132-142, 1993.

RIVIWE, C.; VALE, W. Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. **Endocrinology**, v.113, n.3, p. 939-942, 1983.

RODRIGUES, L.A.; FRACASSO, J.F.; Vascular hyporeactivity to angiotensin II induced by *Escherichia Coli* endotoxin is reversed by N ω -Nitro-L-Arginine, an inhibitor of nitric oxide synthase. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.28, n.3, p.341-345, 2007.

RUGINSKI SG et al. Glucocorticoid modulation of neural activity and hormone secretion induced by blood volume expansion. **Exp Neurol**, v. 206, n.2, p. 192-200, 1997.

RUSSELL, J. Á., et al. Vasopressin versus norepinephrine infusion in patients with septic shock. **N Engl J Med**, v. 358, p.877-887, 2008.

SAIA, R. S., et al. Neonatal endotoxin exposure changes neuroendocrine, cardiovascular function and mortality during polymicrobial sepsis in adult rats. **Regul Pept**, v. 8, n. 169, p. 21-30, 2011.

SAKAMOTO, M., et al. Existence of atrial natriuretic polypeptide in kidney. **Biochem Biophys Res Commun**, v.128, p.1281-1287, 1985.

SAKAI, K., et al. Overexpression of eNOS in brain stem reduces enhanced sympathetic drive in mice with myocardial infarction. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 289, n. 5, p. 289-285, 2005.

SALKOWSKI, C.A., et al. Pulmonary and hepatic gene expression following cecal ligation and puncture: monophosphoryl lipid A prophylaxis attenuates sepsis-induced cytokine and chemokine expression and neutrophil infiltration. **Infect. Immun.** v.66, p. 3569–3578, 1998.

SAMSON, W K.; LEVIN, E. R. Natriuretic peptides in health and disease. **Humana Press**, p. 336, 1997..

SANTIAGO, M. B., et al. Neurohypophyseal response to fluid resuscitation during septic shock. **Exp Physiol**, v. 98, n.2, p. 556-563, 2013.

SANTOS, R. A. A., et al. Angiotensin-(1-7) and its receptor as a potential targets for new cardiovascular drugs. **Expert Opin Investig Drugs**, v.14, n.8, Aug, p.1019-31. 2005.

SATO, K., et al. Inhibition of ¹²⁵I organification and thyroid hormone release by interleukin-1, tumor necrosis factor alpha, and interferon-gamma in human thyrocytes in suspension culture. **J Clin Endocrinol Metab**, v.70, n.6, p.1735-1743, 1990.

SCHALLER, M. D., et al. Angiotensin II, vasopressin, and sympathetic activity in conscious rats with endotoxemia. **Am J Physiol**, v. 249, p.H1086-H1092, 1985.

SCHAPER, J., et al. Volume therapy with colloid solutions preserves intestinal microvascular perfusion in endotoxemia, **Resuscitation**, v.76, p.120-128, 2008.

SCHMIDT, H. B., WERDAN, K., MULLER-WERDAN, U. Autonomic dysfunction in the ICU patient. **Curr. Opin. Crit. Care** 7, p. 314–322, 2001.

SCHOENBERG, M. H.; WEISS, M.; RADERMACHER, P. Outcome of patients with sepsis and septic shock after ICU treatment. **Langenbecks Arch Surg**. v. 383, n.1, p.44-48, 1998.

SCHORR, C. Performance improvement in the management of sepsis. **Crit Care Clin.** v. 25, n. 4, p. 857-867, 2009.

SCHORTGEN, F., et al. Effects of hydroxyethyl starch and gelatin on renal function in severe sepsis: a multicenter randomized study. **Lancet**, London, v. 357, p.911–916, 2001.

SHARIAT-MADAR, Z.; SCHMAIER, A. H. The plasma kallikrein/kinin and rennin angiotensin systems in blood pressure regulation in sepsis. **J Endotoxin Res**, v. 10, n.1, p. 3-13, 2004.

SHARSHAR, T., et al. Circulating vasopressin levels in septic shock. **Crit Care Med**, New York, v.31, p.1752-1758, 2003.

_____. Circulation vasopressin levels in septic shock. **Crit Care Med**. v. 31, p. 1752-1758, 2003a.

_____. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. **Lancet**. v. 362, p. 1799-1805, 2003b.

SHATNEY, C. H., et al. Efficacy of hetastarch in the resuscitation of patients with multisystem trauma and shock. **Arch Surg**, v. 118, p.804–809, 1983.

SHIELDS, C., et al. Hypertonic saline enhances host response to bacterial challenge by augmenting receptor-independent neutrophil intracellular superoxide formation. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 238, p.:249– 257, 2003.

SHIH, C. C., et al Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. **Crit Care Med**, v. 36, n.6, p. 1864-1872, 2008.

SILVA, E., et al. Sepsis: from bench to bedside. **Clinics**, v. 63, n.1, p. 109-120, 2008.

SINGH, A., et al. The use of hypertonic saline for fluid resuscitation in sepsis: A Review. **Crit Care Nurs Q**, v. 32, n 1, p. 10-13.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. **Eur Surg Res**, v.35, p. 486-491, 2003.

SKLAR, A. H.; SCHRIER, R. W. Central nervous system mediators of vasopressin release. **Physiology Rev**, v. 63, p.1243-1280, 1983.

SONNENBERG, H., et al. Atrial natriuretic factor inhibits sodium transport in inner medullary collecting duct. **Am. J. Physiol**, v. 250, p. F963 – 966, 1986.

SONNEVILLE, R., et al. Vasopressin synthesis by the magnocellular neurons is different in supraoptic nucleus and in the paraventricular nucleus in human and experimental septic shock. **Brain Pathol**, v.20, p. 613-622, 2010.

SPYER, K.M. Annual review prize lecture. Central nervous Mechanisms contributing to cardiovascular control. **J Physiol**. v.474, n. 1, p. 1-19, 1994.

SU, D. F., et al. Blood pressure and baroreflex sensitivity in conscious hypertensive rats of Lyon strain. **Am J Physiol**. v.251, p. 11-17, 1986.

SZABO, C., et al. Attenuation of the induction of nitric oxide synthase by endogenous glucocorticoids accounts for endotoxin tolerance *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 91, p. 271-275, 1994.

THIBONNIER, M., et al. Signal transduction pathways of the human v1-vascular, v2-renal, v3-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. **Prog Brain Res**, v. 199, p. 147-161, 1998.

THIEMERMANN, C. Nitric oxide and septic shock. **Gen pharmacol**,v.29, p.159-166, 1997.

THOMAS, C.J., et al. ANP, BNP and CNP enhance bradycardic responses to cardiopulmonary chemoreceptor activation in conscious sheep. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, p. R282-R288, 2001.

TIAN, J., et al. Hydroxyethyl starch inhibits NF-kappaB activation and prevents the expression of inflammatory mediators in endotoxic rats. **Ann Clin Lab Sci**, v.33, p. 451-458, 2003.

TITHERADGE, M. A. Nitric oxide in septic shock. **Biochim Biophys Acta**, v. 1411, p.437-55, 1999.

TORRES-DUENAS, D., et al. Failure of neutrophil migration to infectious focus and cardiovascular changes on sepsis in rats: Effects of the inhibition of nitric oxide production, removal of infectious focus, and antimicrobial treatment. **Shock**, v. 25, p. 267–276, 2006.

TOWEILL, D., et al. Linear and nonlinear analysis of hemodynamic signals during sepsis and septic shock. **Crit Care Med.** v. 28, p. 2051-2057, 2000.

_____. Linear and nonlinear analysis of hemodynamic signals during sepsis and septic shock. **Crit. Care Med.**, v. 28, p. 2051–2057, 2000.

TRIBOLLET, E., et al. Localization and pharmacological characterization of high affinity binding sites for vasopressin and oxytocin in the rat brain by light microscopic autoradiography. **Brain Rev**, v. 442, n.1, p. 105-118, 1988.

TUCKER, V. L. Plasma ANP levels and protein extravasation during graded expansion with equilibrated whole blood. **Am J Physiol**, v. 271, p. 601-609, 1996.

TURNBULL, A. V., et al. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. **Physiol Rev**, v.79, n.1, p. 1-71, 1999.

_____. Corticotropin-releasing factor, vasopressin and prostaglandins mediate and nitric oxide restrains the hypothalamic-pituitary- adrenal response to acute local inflammation in the rat. **Endocrinology**, v. 137, n.2, p. 455-463, 1996.

UNGER, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. **Am J Cardiol**, v.89, n.2A, Jan 24, p.3A-9A; discussion 10A. 2002.

VALENTIN, J.P., et al. Influence of dopamine receptor and adrenoceptor blockade on the hemoconcentrating and hypotensive actions of atrial natriuretic peptide. **Can J Physiol Pharmacol**, v. 75, n. 9, p. 1142-11147, 1997.

VANDERHEYDEN, M.; BARTUNEK, J.; GOETHALS, M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects. **The European Journal of Heart Failure**, v. 6, p. 261-268, 2004.

VARDHAN, A.; KACHROO, A.; SAPRU, H. N. Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. **Am. J. Physiol.** v.264, p. 41-50, 1993.

VELASCO, I.T., et al Hypertonic and hyperoncotic resuscitation from severe hemorrhagic shock in dogs: A comparative study. **Crit Care Med**, v.17, p. 261-4, 1989.

_____. Hypertonic NaCl and severe hemorrhagic shock. **AM J Physiol**, v. 239, p. H664-H673, 1980.

VENTURA, R. R., et al. Nitrergic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. **Braz J Med Biol Res**, v. 35, n.9, p. 1101-1109, 2002.

VESELY, D. L.; PALMER, P. A.; GIORDANO, A. T. Atrial natriuretic factor prohormone peptides are present in a variety of tissues. **Peptides**, v.13, p.165-170, 1992.

VICENT, J.L. Update on sepsis: Pathophysiology and treatment. **Acta Clin Belgica**. v. 55, p.79-87, 2000.

VIEIRA, A. A., et al. AV3V lesions reduce the pressor response to L-glutamate into the RVLM. **Brain Res**. v. 1086, n. 1, p. 160-167, 2006.

_____. Commissural NTS lesions enhance the pressor response to central cholinergic and adrenergic activation. **Neurosci Lett**. v. 521, n.1, p. 31-36, 2012.

_____. Role of the organum vasculosum of the lamina terminalis for the chronic cardiovascular effects produced by endogenous and exogenous ANG II in conscious rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v. 299, n.6, p.1564-1571, 2010.

VINCENT, S. R.; KIMURA, H. Histochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat brain. **Neuroscience**, v. 46, n. 4, p. 755-784, 1992.

VOLLMAR, A. M.; SCHULZ, R. Atrial natriuretic peptide inhibits nitric oxide synthesis in mouse macrophages. **Life Sci**, v. 56, n.7, p. 149-155, 1995.

WADE, C. E., et al. Efficacy of hypertonic 7.5% saline and 6% dextran-70 in treating trauma: a meta-analysis of controlled clinical studies. **Surgery**, v. 122, p.609– 616, 1997.

WAKI, H., et al. Endothelial NO synthase activity in nucleus tractus solitarius contributes to hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 48, n. 4, p. 644-650, 2006.

WALLEY, K.R., et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infect Immun.** v. 64, n.11, p.4733-4738, 1996.

WANG, K.; EVERED, M. D. Endotoxin stimulates drinking in rats without changing dehydrational signals controlling thirst. **Am J Physiol**, v. 265, n.5, p. 1043-1051, 1993.

WANG, K.; WASELENCHUK, L.; EVERED, M. D. Stimulation of drinking by bacterial endotoxins in the rat. **Physiol Behav**, v.54, p. 1005-1009, 1993.

WANG, P.; LI, Y.; LI, J. Protective roles of hydroxyethyl starch 130/0,4 in intestinal inflammatory response and oxidative stress after hemorrhagic shock and resuscitation in rats. **Inflammation**, v. 32, n.2, p. 71-82, 2009.

WATANOBE, H.; HAYAKAWA, Y. Hypothalamic interleukin-1 beta and tumor necrosis factor –alpha, but not interleukin-6, mediate the endotoxin-induced suppression of the reproductive axis in rats. **Endocrinology**, v.144, n.11, p. 4868-75, 2003.

WEI, X.Q.; CHARLES, I. G.; SMITH, A., et al. Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 408-411, 1995.

WHEELER, A. P.; BERNARD, G. R. Treating patients with severe sepsis. **N Engl J Med.** v. 340, n. 3, p. 207-214, 1999.

WHITE, F. N.; GOLD, E. M.; VAUGHN, D. L. Renin-aldosterone system in endotoxin shock in the dog. **Am J Physiol**, v. 212, n.5, p. 1195-1198, 1967.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, v.29, p.189-201, 1980.

WIEDERMANN, C.J., et al. Priming of polymorphonuclear neutrophils by atrial natriuretic peptide in vitro. **J Clin Invest**, v. 89, n. 5, p. 1580-1586, 1992.

WILLIAMS, C. Y.; HARRIS, T. G.; BATTAGLIA, D. F., et al. Endotoxin inhibits pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone. **Endocrinology**, Baltimore, v.142, n.5, p. 1915-22, 2001.

WILSON, M. F., et al. Vasopressin release during sepsis and septic shock in baboons and dogs. **Surg Gynecol Obstet.** v. 153, p. 869-872, 1981.

WONG, M.L., et al. Interleukin (IL) 1beta, IL-1 receptor antagonist, IL-10 and IL-13 gene expression in the central nervous system and anterior pituitary during systemic inflammation: pathophysiological implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 94, n. 1, p. 227-232, 1997.

WONG, M. L.; BONGIORNO, P. B.; AL-SHEKHLEE, A., et al. IL-1 beta, IL-1 receptor type 1 and iNOS gene expression in rat brain vasculature and perivascular areas. **Neuroreport**, v. 7, n. 15-17, p. 2445-2448, 1996.

WU, G., et al. Transcriptional regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase gene during the progression of sepsis. **Shock**, v. 22, n. 1, p. 46-50, 2004.

WU, C.C., et al. Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure and improves survival in rodent models of endotoxic shock. **Br J Pharmacol**, v. 114, n. 8, p. 1666-1672, 1995.

YAMASHITA, S., et al. Interleukin-1 inhibits thyrotrophin-induced human thyroglobulin gene expression. **J Endocrinol**, v.122, n.1, p. 177-183, 1989.

YANG, W. W.; KRUKOFF, T. L. Nitric oxide regulates body temperature, neuronal activation and interleukin-1 beta gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus in response to immune stress. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 11, p. 2075-2089, 2000.

YAO, S., et al. Losartan attenuates ventilator-induced lung injury. **J. Surg. Res.**, v.145, n. 1, p. 25-32, 2007.

ZAPATA, P.; LARRAIN, C. How the carotid body works: different strategies and preparations to solve different problems. **Bol Res**. v. 38, n. 4, p. 315-328, 2005.