



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

VIVIAN ROSSI PERAS

**ENVOLVIMENTO DAS VIAS GLUTAMATÉRGICAS NO  
NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN)  
NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E  
AUTONÔMICAS À ENDOTOXEMIA POR LPS EM RATOS  
ACORDADOS**

---

Londrina  
2014

VIVIAN ROSSI PERAS

**ENVOLVIMENTO DAS VIAS GLUTAMATÉRGICAS NO  
NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN)  
NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E  
AUTONÔMICAS À ENDOTOXEMIA POR LPS EM RATOS  
ACORDADOS**

Dissertação de apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Prof. Dr<sup>a</sup> Marli Cardoso Martins Pinge.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

P426e Peras, Vivian Rossi.

Envolvimento das vias glutamatérgicas no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nas respostas cardiovasculares e autonômicas à endotoxemia por LPS em ratos acordados / Vivian Rossi Peras. – Londrina, 2014.

65 f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.

Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2014.

Inclui bibliografia.

1. Sistema cardiovascular – Teses. 2. Vasopressina – Teses. 3. Pressão arterial – Teses. 4. Toxinas bacterianas – Teses. 5. Ácido glutâmico – Teses. 6. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Sociedade Brasileira de Fisiologia. IV. Título.

CDU 612.1

VIVIAN ROSSI PERAS

**ENVOLVIMENTO DAS VIAS GLUTAMATÉRGICAS NO NÚCLEO  
PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN) NAS RESPOSTAS  
CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS À ENDOTOXEMIA POR  
LPS EM RATOS ACORDADOS**

Dissertação de apresentada ao Curso de Pós-Graduação *Strictu Sensu* em Ciências Fisiológicas pelo Programa Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para à obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Prof. Dra. Marli Cardoso Martins  
Pinge  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes  
Universidade Estadual de Londrina - UEL

---

Prof. Dr. Rubens Fazan Júnior  
Universidade de São Paulo- FMRP/USP

Londrina, 20 de março de 2014

Dedico este trabalho a meus pais,  
irmãs e ao meu noivo. Vocês são a  
minha inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus fonte inesgotável de amor e sabedoria, sem Ele nada disso estaria acontecendo e definitivamente eu não estaria aqui. Meu Deus, meu Pai, obrigada por me sustentar sempre!

Agradeço aos meus pais por todo apoio e dedicação, por me aguentar sempre, por me incentivarem sempre e não negarem nada, absolutamente nada.

Agradeço a minha irmã Marianne pelo socorro sempre, principalmente no inglês e por sempre estar ao meu lado.

Agradeço a minha irmã-filha Patricia, pois nunca me abandonou, sempre me ajudou, incentivou, sempre veio com palavras certas na hora certa e principalmente pela companhia sempre!!!!

Agradeço ao meu companheiro, noivo e futuro marido (falta pouco agora) Ramiro, que apareceu na minha vida de uma forma inesperada e tornou meus dias mais alegres, mais coloridos e perfumados! Você me faz muito feliz! Obrigada pelo apoio de sempre!

Agradeço a minha orientadora pela oportunidade de poder desenvolver o meu trabalho no seu laboratório e por toda ajuda.

Aos anjos Milene, Natália, Karla e Deborah que apareceram na minha vida e me ajudaram nos momentos que eu mais precisei, que me socorreram em todas as horas, que me animaram e não me deixaram desistir.

Ao meu amigo best friend Eric que me ajudou muito e torce sempre por mim!

Aos colegas de laboratório pela ajuda, pelo ensino e aprendizado.

Gostaria de agradecer ao programa multicêntrico pelo apoio, oportunidade e por me arranjar um marido rs.

Agradeço também ao prof Dr. José Antunes Rodrigues por ter aberto as portas do seu laboratório na FMRP/USP-RP, onde realizei as dosagens de vasopressina do meu trabalho, bem como as técnicas Maria Walcy e Milene por toda ajuda. E também não podia deixar de agradecer aos alunos de mestrado e

doutorado do prof. Dr. Antunes pelo ótimo tempo que passei no laboratório onde aprendi muito e vocês tiveram paciência e dedicação em explicar e me ajudar. Meus sinceros agradecimentos a Fernanda Vechiato, Priscila Rivas, Lucas Kinesiess e Ricardo Colleti. Muito obrigada!

Gostaria de agradecer também algumas pessoas que contribuíram indiretamente para eu chegar até aqui, Pr Michel, Pra Sandra meu afilhado fofo Benjamym Hactus e Dra Elsie. Sou eternamente grata a vocês.

... porque tudo que o homem semear, isso também ceifará. (Galátas 6:7b)

PERAS, Vivian Rossi. **Envolvimento das vias glutamatérgicas no núcleo paraventricular do hipotálamo (pvn) nas respostas cardiovasculares e autonômicas à endotoxemia por lps em ratos acordados**. 2014. 66 f. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2014.

## RESUMO

Durante a endotoxemia ou sepse tem-se uma grande liberação de vasopressina e óxido nítrico e que provavelmente envolvendo o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Um trabalho da literatura demonstrou que no PVN os receptores NMDA estão envolvidos com a atividade simpática ao passo que o subtipo não-NMDA parece ativar uma via vasopressinérgica. Nosso objetivo foi avaliar a participação dos receptores NMDA e não-NMDA do PVN nas respostas cardiovasculares e na concentração plasmática de vasopressina à administração endovenosa de LPS em ratos acordados. Foram utilizados ratos Wistar entre 280-320g que através de estereotaxia foi realizado o implante crônico bilateral de cânulas direcionadas ao PVN. Após 3 dias de recuperação esses animais foram submetidos a canulação de artéria e veia femoral para posterior registro da pressão arterial média. Após 30 minutos de registro basal foi realizada a microinjeção bilateral de Ly 235959, Salina 0,9%, ou NBQX e após 5 minutos seguiu-se a administração endovenosa de LPS (5mg/kg/ml) e registro por 2 horas. No final dos experimentos foi coletado sangue e em seguida os animais foram eutanasiados com uma sobre dose de anestésico e marcação dos sítios de microinjeção com Azul de Evans 2%. Na microinjeção bilateral de salina e Ly, após LPS foi observada hipotensão e taquicardia respectivamente ( $\Delta PAM = -19 \pm 7$ ,  $\Delta FC = 105 \pm 17$ ), ( $\Delta PAM = 13, \pm 6,8$  mmHg,  $\Delta FC = 70 \pm 18$  bpm). Nos animais tratados com NBQX, após o LPS observou-se hipertensão e taquicardia ( $\Delta PAM = 14,6 \pm 7$  mmHg;  $\Delta FC = 76,4 \pm 19$  bpm). O aumento da concentração plasmática de vasopressina foi observado nos grupos salina ( $39,9 \text{ pg} \pm 9,4 \text{ pg/ml}$ ) e NBQX ( $12,5 \pm 2 \text{ pg/ml}$ ). O LPS reduziu o ganho barorreflexo dos controle e dos animais tratados com LY. Nossos dados sugerem que os efeitos hipotensores provocados pela endotoxemia são em parte devido à ativação dos receptores não-NMDA no PVN e, a liberação de vasopressina estimulada por LPS se deve em parte por ativação do receptor NMDA no PVN.

**Palavras-chave:** Vasopressina. Pressão arterial e glutamato.

Peras, Vivian Rossi. **Involvement Of Glutamatergic Pathways In The Paraventricular Nucleus Of The Hypothalamus (Pvn) In The Autonomic And Cardiovascular Responses To Endotoxemia By Lps In Awake Rats**. 2014. 66 p. Dissertação (Mestrado Multicêntrico em Ciências Fisiológicas)- State University of Londrina, Londrina, 2014.

## ABSTRACT

During endotoxemia or sepsis has been a large release of vasopressin and nitric oxide and probably involving the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). A study of the literature showed that the pvn nmda receptors are involved in the sympathetic activity whereas the non- nmda subtype appears to activate a pathway vasopressinergic . Our objective was to evaluate the role of nmda and non- nmda receptors in the cardiovascular responses PVN and in plasma vasopressin to intravenous administration of Lps in conscious rats . Wistar rats were used between 280 - 320g that through bilateral stereotactic implantation of chronic cannulae aimed at the pvn was performed . After 3 days of recovery these animals underwent cannulation of the femoral artery and vein for later registration mean arterial pressure. After 30 minutes of baseline recording bilateral microinjection of LY 235959 , salt 0.9 % , or NBQX was performed and after 5 minutes was followed by the intravenous administration of LPS ( 5mg/kg/ml ) and registration for 2 hours . At the end of the experiments , blood was collected , and then the animals were euthanized with an over dose of anesthetic and marking of sites of microinjection with 2 % evans blue . In bilateral microinjection of saline and LY after ILPS hypotension and tachycardia was observed respectively (  $\Delta$ MAP =  $-19 \pm 7$  ,  $\Delta$ HR =  $105 \pm 17$  ) , (  $\Delta$ MAP =  $13 \pm 6.8$  mmhg ,  $\Delta$ HR =  $70 \pm 18$ bpm ) . In animals treated with NBQX after LPS was observed hypertension and tachycardia (  $\Delta$ MAP =  $14.6 \pm 7$  mmhg ;  $\Delta$ HR =  $76.4 \pm 19$ bpm ) . The increase in plasma concentration of vasopressin was observed in the saline group (  $39.9 \pm 9.4$  pg / ml) and NBQX (  $12.5 \pm 2$  pg / ml). Lps reduced the gain of baroreflex control and treated animals ly.nossos data suggest that the hypotensive effects caused by endotoxemia are in part due to activation of non - nmda receptors in the pvn and vasopressin release stimulated by Lps is due in part by activation of the nmda receptor in the PVN .

**Key words:** vasopressin. Blood pressure and glutamate.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1 –</b>	Representação esquemática dos locais de microinjeção do PVN .....	33
<b>Figura 2 –</b>	Alterações cardiovasculares dos grupos que receberam endovenosaente salina.....	35
<b>Figura 3 –</b>	Alterações cardiovasculares dos grupos que receberam endovenosaente LPS .....	36
<b>Figura 4 –</b>	Concentração plasmática de vasopressina .....	50
<b>Figura 5 –</b>	Análise do Barorreflexo espontâneo.....	53

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1 –</b>	Valores basais dos parâmetros cardiovasculares .....	34
<b>Tabela 2 –</b>	Análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da Pressão Arterial Sistólica (PAS) .....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocortitrófico
ADH	Hormônio Anti-Diurético
AMPA	Amino-3-hydroxy-5-metil-4-isoxazol proprionato
AVP	Vasopressina
CCB	Centro de Ciência Biológicas
CEEA	Comitê de ética em Experimentação Animal
CIF	Departamento de Ciência Fisiológicas
CVLM	Bulbo Ventrolateral Caudal
FC	Frequência Cardíaca
GABA	Ácido Gama-aminobutírico
HF	Alta Frequência
IL	Interleucina
IML	Coluna Intermédio Lateral
IP	Intervalo de Pulso
KA	Cainato
LF	Baixa Frequência
L-glu	Glutamato
LPS	Lipopolissacarídeo
NA	Núcleo Ambíguo
NMDA	N-Metil-D-Aspartato
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OT	Ocitocina
PA	Pressão Arterial
PAD	Pressão Arterial Diastólica
PAS	Pressão Arterial Sistólica
PVN	Núcleo Paraventricular do Hipotálamo
RVLM	Bulbo Rostroventrolateral
SBR	Sensibilidade Barorreflexa
SIRS	Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNC	Sistema Nervoso Central

SON	Núcleo Supra Ótico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VLF	Muito Baixa Frequência

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	23
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	23
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>24</b>
3.1	ANIMAIS .....	24
3.2	IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA DIRECIONADAS AO PVN .....	24
3.3	CANULAÇÃO DE ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS .....	25
3.4	REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL .....	25
3.5	INDUÇÃO DA ENDOTOXEMIA .....	26
3.6	PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	26
3.6.1	Grupos Experimentais .....	26
3.6.2	Análise da Pressão Arterial .....	27
3.6.3	Registro do Grupo Controle .....	27
3.6.4	Registro do Grupo Tratado .....	27
3.7	ADMINISTRAÇÃO DE BICUCULINA NO PVN .....	27
3.8	MARCAÇÃO E HISTOLOGIA DO CÉREBRO .....	28
3.9	ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E DO INTERVALO DE PULSO .....	28
3.10	ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO .....	39
3.11	DOSAGEM DE VASOPRESSINA .....	30
3.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
3.13	ANÁLISE DOS DADOS .....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>

<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>59</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A regulação da pressão arterial (PA) é uma das funções fisiológicas mais complexas, que depende de ações integradas dos sistemas cardiovasculares, renal, neural e endócrino, é a pressão exercida pelo sangue dentro dos vasos sanguíneos com a força proveniente dos batimentos cardíacos.

Áreas do bulbo cerebral que medeiam os efeitos simpáticos e vagais estão sob a influência dos impulsos neurais que se originam nos barorreceptores, quimiorreceptores, hipotálamo, córtex cerebral e pele.

Quando ocorre aumento da PA, barorreceptores localizados no seio carotídeo e no arco da aorta são ativados, iniciando um arco reflexo que resulta em liberação de vasopressina na circulação. A vasopressina (AVP) produz potente vasoconstrição, contribuindo para a manutenção da pressão arterial durante estímulos hipotensores. (GIUSTI-PAIVA ET AL, 2004). Dessa forma, a perfusão tecidual está garantida pela PA estando o indivíduo em repouso ou em atividade. As alterações no fluxo ocorrem nas diferentes horas do dia e depende do que o indivíduo está fazendo.

A manutenção da PA e sua variação momento a momento dependem de mecanismos de respostas de curto e longo prazo. A regulação neuro-humoral da PA funciona como um arco-reflexo que envolve receptores, aferências, centros de integração, eferências, efetores e hormônios.

As alterações do tônus vascular, que regulam a resistência vascular periférica, dependem de diferentes fatores funcionais, destacando a atividade simpática, cujo controle central é feito pelo sistema nervoso autônomo (SNA) e é modulada por aferências de diferentes reflexos e por substâncias que alteram a constrição do vaso. Já é sabido do envolvimento de três arcos reflexos na modulação da atividade simpática mediados pelos barorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares e pelos quimioceptores.

Os barorreceptores arteriais são os mais importantes no controle reflexo da pressão arterial momento a momento. Localizam-se na crosta da aorta e no seio carotídeo e são ativados por ação mecânica de distensão vascular sendo determinada pela alteração da pressão intravascular que ativam áreas do sistema nervoso central (SNC) e controlam a PA.

O aumento da PA ativa esses mecanorreceptores e através do nervo glossofaríngeo e vago levam a informação para o núcleo do trato solitário (NTS) no SNC, sendo esta região considerada a primeira estação central de recebimento de informações da periferia. Do NTS neurônios de segunda e terceira ordem se projetam para duas áreas localizadas no bulbo ventrolateral, sendo a primeira para neurônios inibitórios localizados no bulbo ventrolateral caudal (CVLM) que se projeta para neurônios pré-motores simpáticos para a área rostroventrolateral do bulbo (RVLM) cujos neurônios pré-ganglionares se projetam para a coluna intermédio lateral (IML) da medula espinhal que é a fonte do fluxo simpático para o coração e para os vasos. E a segunda área está localizada no núcleo ambíguo (NA) e núcleo motor dorsal do nervo vago que contem corpos celulares de neurônios pré-ganglionares parassimpáticos. Sendo assim essas duas áreas atuam de maneira a controlar a frequência cardíaca. (DAMPNEY 1994).

Sendo assim, quando ocorre elevação dos níveis pressóricos, ocorre uma redução reflexa da atividade simpática e aumento da atividade vagal resultando em queda da PA. Quando ocorre o inverso, ou seja, queda dos níveis da PA ocorre então uma redução do tônus vagal e um aumento da atividade simpática. (DAMPNEY 1994).

O controle reflexo da circulação controlado pelos barorreceptores é também um importante preditor de risco após eventos cardiovasculares, sendo que a sensibilidade barorreflexa (SBR) tem sido vista como estratégia para o manejo de doenças cardiovasculares, sendo que sua redução é associada com uma incompetente regulação da PA e aumento do risco de mortalidade em pacientes com doenças cardiovasculares. Já um aumento na SBR é atribuído a uma modulação autonômica benéfica da função cardiovascular. (FERRER ET AL 1991).

A modulação da função autonômica do coração pode ser feita através de uma ferramenta muito utilizada que é a análise da variabilidade da frequência cardíaca (FC) e da PA. A FC varia batimento a batimento como consequência das adaptações que o SNA promove para manutenção da homeostase do sistema cardiovascular e sua avaliação é feita através das variações dos intervalos RR. (TASK FORCE). A análise espectral é uma ferramenta de pesquisa para avaliação da variabilidade da frequência cardíaca e tem permitido um aumento do entendimento do papel do SNA nas diferentes situações fisiopatológicas

do sistema cardiovascular e é feita através do estudo da potência espectral nos intervalos RR. (TASK FORCE).

A potência dos espectros, ou seja, da decomposição dos sinais cardiovasculares é dividida em três faixas ou bandas de frequências distintas chamadas de componentes espectrais. A primeira é alta frequência (*High Frequency* - HF: 0,75 a 3,00 Hz), baixa frequência (*Low Frequency* - LF: 0,20 a 0,75 Hz) e muito baixa frequência (*Very Low Frequency* - VLF: < 0,20 Hz) (TASK FORCE, 1996).

Diversas correlações fisiológicas são feitas e estudadas a partir dos componentes espectrais, sendo que os componentes de alta frequência (HF) são obtidos através da atividade do nervo vago, ou do sistema nervoso parassimpático, o de muito baixa frequência (VLF) é reflexo da atuação do sistema nervoso simpático e parassimpático e sofre influências de outras atividades neuro-humorais (ex. sistema renina-angiotensina), e os de baixa frequência (LF) é decorrente da ação simpática e parassimpática sobre o coração com predominância do simpático. (TASK FORCE).

A sepse é um conjunto de reações desenvolvidas pelo ser humano em resposta a algum microrganismo patogênico. É uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica, caracterizada por um conjunto de manifestações graves em todo o organismo, sendo que sua severidade está no comprometimento dos diferentes sistemas. (LI ET AL 2007; KERSCHEM ET AL 2007). (OBERHOLZER ET AL, 2001 WESTPHAL ET AL, 2009).

A sepse permanece como um grande desafio em todo o mundo e além de ser a principal causa de morte nas unidades de terapia intensiva (UTI) está entre as principais causas de morte no mundo. (SALES JUNIOR 2006, REINHART ET AL, 2013). Mundialmente cerca de 20 a 30 milhões de pacientes são atingidos anualmente e, a cada hora, cerca de 1.000 pessoas e, a cada dia, por volta de 24 mil pessoas morrem de sepse, sendo esta responsável por cerca de oito milhões de morte por ano (REINHART ET AL, 2013).

Com diagnóstico difícil, ela é tardiamente diagnosticada, visto que febre, taquicardia, taquipneia ou alterações na contagem de leucócitos não são específicas para sepse. (REINHART ET AL, 2013). Pode-se manifestar em três estágios progressivos sendo o primeiro, a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS), caracterizada por alterações na temperatura corporal ( $38^{\circ}\text{C} < T < 36^{\circ}\text{C}$ ), Taquicardia (batimentos  $> 90\text{bpm}$ ), taquipneia ( $\text{Fr} > 20\text{cpm}$ ) e alterações nas

contagens de leucócitos ( $12.000 < \text{leuc} < 4.000$ , o segundo a sepse grave (sepse + comprometimento de uma ou mais função orgânica) e o terceiro o choque séptico que é a associação da sepse com hipotensão refratária a reposição volêmica. (BONE ET AL, 1992, ALBERTI ET AL, 2003, DAVID, 2004 e DIAS 2013).

No quadro de sepse devem ser avaliados e tratados três mecanismos distintos, porém interligados que são o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória. O tratamento da sepse é feito por antibióticos e fármacos que irão atuar nas alterações cardiovasculares. (BONE ET AL 1992, FRACASSO 2008).

As infecções por bactérias gram-positivas são menos frequentes do que as com gram-negativas ou endotoxinas. Essa síndrome é caracterizada por hipotensão, disfunção sistêmica, hipoperfusão de tecidos podendo levar a morte celular e comprometimento renal e pulmonar (PARRILO 1993). De tal modo que, a maior parte dos estudos clínicos e experimentais refere-se à sepse causada pelas bactérias Gram-negativas ou por endotoxemia.

O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente da parede celular de bactérias gram-negativas, é responsável pelo dano tecidual e por produzir no homem e em animais em experimentação o estado de choque séptico, sendo o seu alvo principal o endotélio vascular. (BANNERMAN AND GOLDBLUM, 2003; BUTENSHOEN ET AL, 2010). O LPS é responsável pela ativação de mediadores endógenos secretados por células inflamatórias ativadas, principalmente os macrófagos, fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8) entre outras. (ABBAS, 2004, CORREIA ET AL, 2008, BENJAMIM 2001).

Amplamente utilizado no estudo da sepse o LPS mimetiza os efeitos observados nos casos de sepse e choque séptico como, por exemplo, as alterações cardiovasculares e hemodinâmicas, diminuição do débito urinário, hiporresponsividade aos agentes vasoconstritores e grande quantidade de citocinas produzidas, entre outros (BENJAMIM 2001, (CHROUSOS, 1995, HADDAD ET al., 2002, LICINIO AND WONG, 1997, MCCANN ET al., 1994 and TURNBULL AND RIVIER, 1999, WICHTERMAN ET al. 1980. MICHIE ET al. 1988). Sua infusão também causa injúria renal, incluindo queda na taxa de filtração (CUNNINGHAM ET AL. 2004; TIWARI ET AL. 2005, KNOTEK ET AL. 2001), o que torna a infusão de LPS uma ferramenta útil para compreender a trajetória complexa da sepse. (DOI 2009).

A resposta do organismo à endotoxemia inclui mudanças hemodinâmicas e a liberação de hormônios como a adrenocorticotropina (ACTH), vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) (RIVIER ET al. 1989). Essas compensações são importantes para a homeostasia cardiovascular, modulação inflamatória e controle da temperatura corporal (McCANN ET al., 2000). Além disso, AVP e glicocorticoides são usados na clínica como tratamento para a sepse em humanos (GIUSTI-PAIVA ET AL 2004).

A sequência de eventos cardiovasculares durante a septicemia por LPS é complexa, mas pode ser vista como uma vasodilatação generalizada, o que leva ao final ao colapso circulatório devido a dois fatores: aumentada produção de óxido nítrico e sensibilidade diminuída aos agentes vasoconstritores endógenos (NAVA ET al. 1992; MAYEUX, 1997; WOLKOW, 1998.).

A ativação simpática prejudicada durante a septicemia parece desempenhar um papel importante no desenvolvimento do choque séptico. Annane e colaboradores (1999) têm demonstrado que o choque séptico é caracterizado por altas concentrações nas catecolaminas circulantes, mas com modulação simpática prejudicada tanto nos vasos quanto no coração, sugerindo que a alteração na regulação autonômica central contribui para a falência circulatória.

A literatura tem mostrado que durante a sepse, certas áreas do sistema nervoso central são ativadas e possuem papel relevante no desenvolvimento das adaptações fisiopatológicas frente ao desafio imunológico. Dentre essas áreas algumas apresentam participação chave, como o núcleo supra-óptico (SON) e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), que estão envolvidos na liberação de arginina vasopressina (AVP) e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), as quais estão aumentadas nas fases iniciais da sepse (RIVIER, 2003; CORRÊA ET AL., 2007).

O núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) está envolvido no controle central do sistema cardiovascular e é o principal local de integração da função autonômica na manutenção da homeostase (DAMPNEY, 1994; BADOER, 2001) e também no controle da pressão arterial (MARTINS-PINGE ET AL, 2013). No PVN, vários neurotransmissores participam da regulação cardiovascular como o glutamato que aumenta a atividade nervosa simpática, e o ácido gama-aminobutírico (GABA) que reduz. (GABOR E LEENEN, 2012, XU ET AL 2011; KC, 2010).

O PVN está localizado ao redor do terceiro ventrículo ocupando menos de um terço de  $\text{mm}^3$ , e possui oito subdivisões que são claramente distintas, sendo três delas magnocelulares e cinco parvocelulares.

A parte magnocelular é dividida em anterior, media e posterior sendo que a posterior é a maior e seria essa parte de correspondência da divisão magnocelular. A divisão parvocelular consiste em cinco divisões distintas, a periventricular, anterior, medial, dorsal e lateral cada qual com células de formas e ações diferentes. A porção magnocelular é responsável por sintetizar, transportar e secretar os hormônios da neurohipófise ocitocina e vasopressina (SWANSON & SAWCHENKO, 1983), regular o balanço hídrico, a função cardiovascular, o trabalho de parto e a lactação (BUSNARDO ET AL, 2009). O estímulo para liberação de vasopressina é a queda da pressão arterial ou do volume sanguíneo e o aumento da osmolalidade do sangue, levando ao aumento de reabsorção de água pelos rins sendo assim um potente agente vasoconstritor. (CUNINGHAM ET al., 2004 BISSET & CHOWDREY, 1988).

Os neurônios hipotalâmicos magnocelulares recebem inervação glutamatérgica, sendo que o glutamato (L-glu) é um aminoácido importante em quase todas as sinapses cerebrais e é um neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central (SNC) (DANBOLT 2001). Segundo Busnardo (2009) os subtipos de receptores glutamatérgicos que medeiam respostas cardiovasculares à microinjeção de L-glu no PVN têm sido estudados amplamente. Para KANAAN ET AL (1989) a microinjeção do L-glu no PVN leva a um aumento da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Os receptores glutamatérgicos são divididos em dois tipos: os ionotrópicos e os metabotrópicos. Cada subtipo de canal funcional do glutamato é composto por uma família de genes. Os ionotrópicos são classificados de acordo com seus receptores de canais iônicos e são conhecidos como N-metil-D-aspartato (NMDA), os não NMDA, Cainato (KA) e a-amino-3-hidroxy-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA). Os receptores metabotrópicos do glutamato (mGlu) estão acoplados a proteína G ativando segundo mensageiro. Podem afetar tanto outros canais iônicos como alguns processos celulares. (MAYER e ARMSTRONG, 2004.).

A porção parvocelular, além de regular a função da adenohipófise, está conectada às áreas do cérebro que são responsáveis pela função nervosa simpática. (SWANSON & KUYPERS, 1980). Os neurônios parvocelulares tem

conecção direta com a área rostroventrolateral do bulbo (RVLM) cuja região é responsável pela atividade simpática, controle do tônus vascular assim como os reflexos dos barorreceptores e quimioceptores cardiopulmonares (DAMPNEY, 1994). Esses neurônios também têm projeções diretas para a coluna intermédio lateral da medula onde estão localizados os motoneurônios simpáticos pré-ganglionares. (DAMPNEY, 1994, BADOER 2001, MASTELARI et al., 2011).

A vasopressina é conhecida também como hormônio antidiurético (ADH), e é produzida pelo núcleo supra-quiasmático do hipotálamo, núcleo supra-óptico e pela divisão magnocelular do PVN, sendo liberada pela hipófise posterior. Sua função principal é regular o equilíbrio hidroeletrólítico (TONELLI ET AL, 2001).

A interação entre os estímulos osmóticos e volêmicos levam ao controle do balanço hídrico, sendo que alterações na pressão osmótica ativam osmorreceptores localizados no hipotálamo anterior que quando percebem um aumento da osmolalidade, estimulam a secreção do ADH que leva ao aumento da reabsorção de água nos túbulos renais, sendo que esse mecanismo também leva ao aumento da ingestão hídrica pela ativação do centro da sede. Já em casos de uma redução da osmolalidade ocorre uma supressão da secreção de ADH levando ao aumento da excreção renal (NAVES ET AL, 2003).

A secreção de AVP está aumentada na fase inicial da sepse visando o restabelecimento da pressão arterial (SHIMIZU ET AL, 2009). Porém em alguns seres humanos com choque séptico adiantado os vasos são sensíveis aos efeitos vasoconstritores da AVP exógena, o que leva a entender que os níveis plasmáticos desse hormônio estão muito abaixo nesses pacientes, quando comparados com pacientes com choque cardiogênico com mesmos níveis de pressão. (LANDRY ET AL, 2007, CARNIO ET AL, 2005). Esses dados sugerem que as alterações nos níveis de AVP não são devidas as alterações da pressão arterial, mas sim a outros mecanismos do choque séptico. (CARNIO ET AL, 2005).

Um trabalho publicado recentemente demonstrou que a neurotransmissão pelo glutamato no PVN parece envolver dois mecanismos periféricos distintos para o aumento observado na pressão arterial: um envolvendo a ativação simpática e mediado pelos receptores NMDA, e outro utilizando a liberação de vasopressina e mediado pelos receptores não NMDA (BUSNARDO ET al., 2009). Sabe-se então que durante a endotoxemia ou sepse tem-se uma grande liberação de vasopressina, e que não existem dados na literatura que identifiquem o subtipo

de receptor glutamatérgico que durante a endotoxemia por LPS leva a liberação de vasopressina, e se os mesmos participariam nas respostas cardiovasculares e autonômicas à injeção endovenosa de LPS.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral:

Analisar o envolvimento dos subtipos de receptores para o glutamato no núcleo paraventricular do hipotálamo nas respostas cardiovasculares e autonômicas, bem com a liberação de vasopressina em animais submetidos à endotoxemia por LPS.

### 2.2 Específicos:

Verificar os efeitos cardiovasculares em ratos submetidos à endotoxemia por administração endovenosa de LPS e tratados previamente com salina, LY235959 (inibidor do receptor NMDA) ou NBQX (inibidor do receptor não NMDA) no PVN de ratos acordados.

Analisar os efeitos autonômicos em ratos submetidos à endotoxemia por administração endovenosa de LPS e tratados previamente com salina, LY235959 ou NBQX no PVN de ratos acordados.

Dosar os níveis de vasopressina em todos os grupos experimentais após 2 horas da administração de LPS.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da universidade (CEEAA; processo nº 16370.2012.27).

#### 3.1 ANIMAIS

Para este trabalho foram utilizados ratos Wistar, provenientes do biotério central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). O peso dos animais foi padronizado entre 280 a 320g e, foram colocados em gaiolas coletivas (máximo de 5 animais) à temperatura de  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$  com ciclo claro/escuro de 12 h. Água e ração fornecidas “ad libitum”, e os animais eram mantidos no biotério setorial do CIF da UEL.

#### 3.2 IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA DIRECIONADAS AO PVN

A metodologia de implante crônico de cânulas-guia direcionadas ao PVN foi de acordo com de Abreu e colaboradores (2009). Inicialmente os ratos foram anestesiados com tribromoetanol (Aldrich, Milwaukee, WI) 2,5% (250mg/kg, i.p.) e postos em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (Insight). A barra incisiva foi posicionada 5,0 mm abaixo da linha interaural. Em seguida, foi realizada a tricotomia da cabeça seguida de abertura da pele no sentido rostro caudal, deixando em evidência a sutura bregma. A seguir, foram produzidos dois orifícios bilaterais e equidistantes da linha média, para o implante das cânulas-guia, cujas coordenadas estereotáxicas (PAXINOS & WATSON, 1986) utilizaram como referência à sutura bregma (AP= -1,7 mm, L= 0,5 mm; DV= 7,6 mm). A torre foi posicionada sem inclinação (0 grau). Para dar suporte às cânulas-guia, utilizou-se uma peça (“pé de pato”) com encaixe entalhado para as cânulas-guia. Estas foram separadas por uma distância de 1(mm) mm. Foram fixados no crânio do animal dois parafusos pequenos, um em cada extremidade da abertura no sentido rostro-caudal, com o objetivo de reforçar a fixação das cânulas-guia pelo acrílico. Essas cânulas foram fixadas no

crânio com resina acrílica. Após a completa fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida e com o objetivo de não obstruir as cânulas-guia até a realização dos experimentos, foi introduzida nas mesmas um ocluser. Em seguida retirou-se o animal do aparelho estereotáxico e como medida profilática, após a cirurgia cerebral foi administrada uma dose de poli-antibiótico veterinário com estreptomicina e penicilina por via intramuscular. O animal retornou ao biotério e lá permaneceu por 3 (três) dias para recuperação da cirurgia.

### 3.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS

Após os 3 dias de recuperação da cirurgia cerebral, os animais foram submetidos à nova cirurgia sob anestesia de Tribromoethanol 2,5% (250 mg/kg, i.p), para implantação de cateteres na artéria e veia femorais. O cateter foi constituído por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldado a um segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchido com solução salina 0,9% e anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina) e obstruído com um ocluser

Para a canulação, foi feita uma incisão de aproximadamente 7mm na fossa ilíaca direita do animal e a artéria femoral direita foi dissecada. Um fio de algodão foi utilizado para isolar a região distal da artéria femoral e uma pinça hemostática foi colocada nela, obstruindo o fluxo arterial temporariamente. Em seguida, um pequeno corte foi feito na artéria femoral e o cateter foi introduzido cuidadosamente e amarrado na artéria. Após esse procedimento, o cateter foi exteriorizado na região dorsal do animal através de um trocater, por via subcutânea e fixada a pele do animal por sutura cirúrgica. Para a administração de drogas, um cateter similar foi introduzido na veia femoral com o mesmo método descrito para a artéria femoral.

Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório. O cateter arterial foi utilizado para o registro da pressão arterial e o cateter venoso para administração de LPS.

### 3.4 REGISTROS DA PRESSÃO ARTERIAL

Após 24 horas da canulação, os animais foram submetidos ao registro basal da pressão arterial, seguido do protocolo experimental. O registro

direto da pressão arterial foi realizado através de uma cânula previamente implantada na artéria femoral. O registro foi feito com os animais não anestesiados e com livre movimentação em caixas individuais, sendo registrado um animal por vez. A cânula arterial do animal foi acoplada a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) e conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ ADInstruments). Durante o período de registro (aproximadamente 3 horas) os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso. Experimentos pilotos já evidenciaram que os procedimentos utilizados neste trabalho não causam reações dolorosas ou outro tipo de comportamento que interfira no registro cardiovascular ou que não seja previsível pela administração de certas substâncias no PVN.

### 3.5 INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA

Para a indução da endotoxemia foi administrada em bolus por via endovenosa uma dose de Lipopolissacáride de *Escherichia coli* (LPS) sorotipo 026: B6 na dose de 5 mg/kg, segundo trabalho prévio do nosso laboratório (Mehanna et al., 2007), 5 minutos após a microinjeção no PVN de salina, LY ou NBQX.

### 3.6 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Após 24 horas da canulação, os animais foram submetidos ao registro basal da pressão arterial, seguido do protocolo experimental. Inicialmente foi feito o registro basal (cerca de 30 minutos) desses animais para adaptação e seguiu-se com a avaliação cardiovascular.

#### 3.6.1 Grupos Experimentais

Os animais foram divididos inicialmente em dois grandes grupos sendo o primeiro o grupo controle, que é o grupo que recebeu salina endovenosa; e o segundo o tratado, ou seja, aquele que recebeu LPS endovenoso. Após essa divisão os grupos foram subdivididos de acordo com as substâncias administradas no PVN que foram: LY235959, antagonista do receptor NMDA, 2nmol/100 nl, BUSNARDO 2009 (Tocris, Westwoods Business Park Ellisville, MO, USA) ou NBQX,

antagonista do receptor não NMDA, 2nmol/100 nl BUSNARDO 2009 (Tocris, Westwoods Business Park Ellisville, MO, USA), ou salina fisiológica (100 nl), totalizando 6 grupos experimentais.

### 3.6.2 Análise da Pressão Arterial

No dia do experimento o animal foi mantido em gaiola individual, em ambiente silencioso e desprovido de estímulos estressantes.

### 3.6.3 Registro do Grupo Controle

Após o registro basal, os animais do grupo controle receberam microinjeções bilaterais de 100nL no PVN das seguintes drogas: solução salina (NaCl 0,9%), Ly 235959 (2nM) ou NBQM (2nM). Após cinco minutos de registro, os animais receberam endovenosamente (in bolus) solução salina 1mL/kg. A avaliação cardiovascular foi registrada por 2 horas.

### 3.6.4 Registro do Grupo Tratado

Após o registro basal, os animais do grupo controle receberam microinjeções bilaterais de 100nL no PVN das seguintes drogas: solução salina (NaCl 0,9%), Ly 235959 (2nM) ou NBQM (2nM). Após cinco minutos de registro, os animais receberam endovenosamente (in bolus) LPS de *Escherichia coli* sorotipo 026:B6 (5mg/kg). A avaliação cardiovascular foi registrada por 2 horas.

## 3.7 ADMINISTRAÇÃO DE BICUCULINA NO PVN

A bicuculina (BIC) é um antagonista gabaérgico, O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um neurotransmissor inibidor em todo o sistema nervoso central. A microinjeção no PVN de BIC faz com que o animal apresente comportamento de auto-limpeza e busca pela caixa sem sinais de agressividade, promove também taquicardia e aumento da PA.

Todos os animais de todos os grupos experimentais ao final do protocolo experimental receberam centralmente a administração bilateral de

Bicuculina (2nM), após a qual foi realizado registro por 15 minutos. O objetivo era obter uma marcação funcional do PVN.

### 3.8 MARCAÇÃO E HISTOLOGIA DO CÉREBRO

No final dos experimentos os animais foram eutanasiados com uma sobre dose de anestésico e logo em seguida, os sítios de microinjeção foram marcados com uma solução de Azul de Evans 2%, num volume de 100 nanolitros (nl). O cérebro do animal foi retirado e colocado em formalina 10 % para posterior corte histológico e análise das lâminas. O cérebro foi seccionado em criostato através de cortes de 25  $\mu$ m para a região do PVN. Os cortes obtidos foram posicionados em lâminas de vidro e corados pela técnica do vermelho neutro 1%. Somente os animais que tiveram os sítios marcados na área do PVN (PAXINOS & WATSON, 1998) foram considerados como animal experimental.

### 3.9 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA (VFC)

A análise da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e pressão arterial sistólica (PAS) no domínio da frequência foi realizada utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2. 4 (<http://www.danielpenteado.com>) (TEZINI et al., 2013). Uma vez que o programa computacional não realiza aquisição de dados, registros de PA, com no mínimo 10 minutos de duração, foram processados pelo programa computacional LabChart 7.0 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália), o qual é capaz de detectar pontos de inflexão nos pulsos de pressão e gerar séries, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS para cada ciclo cardíaco.

As séries temporais, batimento-a-batimento, com valores de IP e PAS foram reamostradas em 10 Hz (1 valor a cada 100 ms) por interpolação cúbica do tipo *spline*, para regularização do intervalo de tempo entre os batimentos. As séries com valores interpolados de IP e PAS foram divididas em segmentos com 512 valores cada, com sobreposição de 50% (Protocolo de Welch). A estacionariedade dos valores de IP e PAS de cada segmento foi examinada visualmente e os segmentos com artefatos ou transientes foram excluídos.

Após a inspeção visual dos segmentos com valores interpolados de IP e PAS, os segmentos considerados adequados foram integrados em bandas de baixa frequência (LF: 0,20 - 0,75 Hz) e alta frequência (HF: 0,75 - 3,00 Hz), e os resultados foram expressos em unidades absolutas ( $\text{ms}^2$  ou  $\text{mmHg}^2$ ) e normalizadas (un). Os valores normalizados foram obtidos por meio do cálculo da potência relativa das bandas de LF e HF levando em consideração a potência total de espectro menos a potência da banda de muito baixa frequência (VLF:  $< 0,20$  Hz). Para avaliar o balanço simpatovagal cardíaco, calculou-se a razão entre a potência das bandas de LF e HF (LF/HF) do espectro do IP.

### 3.10 ANÁLISE DO BARORREFLEXO ESPONTÂNEO

A sensibilidade barorreflexa (SBR) foi avaliada no domínio do tempo por meio do Método da Sequência. Utilizando-se o programa computacional CardioSeries v2. 4 (<http://www.danielpenteadado.com>), séries temporais batimento-a-batimento com valores de IP e PAS foram utilizadas para análise da SBR. As séries temporais foram analisadas em busca de sequências de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos progressivos da PAS foram acompanhados por aumentos progressivos do IP, ou reduções progressivas da PAS foram acompanhadas por reduções progressivas do IP. Para detecção das alterações da PAS e do IP foram utilizados os limiares de 0 mmHg e 0 ms, respectivamente. Após detecção de uma rampa de PAS (sequência de quatro ou mais batimentos nos quais aumentos ou reduções progressivas da PAS foram acompanhados, ou não, de aumentos ou reduções do IP), o programa computacional buscava por alterações no IP sem qualquer intervalo, ou seja, *delay* de zero batimentos. Uma sequência barorreflexa só foi utilizada quando o coeficiente de correlação ( $r$ ) entre os valores de PAS e IP foi maior ou igual a 0,8. A SBR foi determinada a partir da média da inclinação da reta da regressão linear entre os valores de PAS e IP de cada sequência barorreflexa encontrada.

### 3.11 DOSAGEM DE VASOPRESSINA

A vasopressina foi dosada utilizando o plasma sanguíneo coletado e quantificada através do método de radioimunoensaio (RIE). Esse procedimento foi realizado em colaboração do prof Dr José Antunes Rodrigues da FMRP/USP-RP.

A concentração plasmática do hormônio AVP ocorre após a extração da mesma, segundo as técnicas descritas por Morris e Alexander (1989). A extração do hormônio AVP é realizada com acetona e éter de petróleo. No RIE, é utilizado anticorpo de coelho anti-AVP e peptídeos marcados com <sup>125</sup>I. O hormônio marcado é separado do não marcado com o auxílio da técnica de anticorpo secundário (anticorpo antigamaglobulina de coelho produzido em cabra) específicos para o hormônio analisado. Por fim, polietilenoglicol (PEG 6,25% ou 12,5% para AVP) é utilizado para a precipitação do complexo hormônio-anticorpo formado. A radioatividade no precipitado é determinada com o auxílio de um contador gama (Auto-Gama Counting System Cobra II da Instrument Company, Packard, USA). Todos os dados foram expressos em pg/ml de plasma.

### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada utilizando-se o programa estatístico "INSTAT" (GraphPad, San Diego, CA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). As comparações entre controle e tratado foram analisadas pela análise de Variância (ANOVA) two way seguida do pós-teste de Bonferroni considerando as diferenças significantes para um valor de  $p < 0,05$ .

### 3.13 ANÁLISE DOS DADOS

Os grupos foram analisados separadamente em grupos controle (salina periférica) e grupo com LPS.

A análise dos efeitos pelo tempo de registro foi subdividido em 3 fases, já que de acordo com dados prévios do nosso laboratório (Mehanna et al., 2007) observou-se que as alterações agudas nas variáveis analisadas de pressão arterial e frequência cardíaca ocorriam nos 5 minutos após a infusão endovenosa de

LPS sendo essa fase denominada fase 1, a fase 2 aos 25 minutos e a fase 3 aos 50 minutos após a infusão de LPS.

Para análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial bem como para análise do barorreflexo espontâneo foi utilizado o tempo de 50 minutos após a administração periférica de salina 0,9% ou LPS.

Para a dosagem de vasopressina foi utilizado o plasma congelado em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$ , cujo sangue coletado ao final do experimento direto da artéria femoral já canulada foi centrifugado por 20 minutos em uma temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  em 3000rpm.

## 4 RESULTADOS

Os grupos analisados foram divididos em controle (salina) e LPS. A análise dos efeitos pelo tempo de registro foi subdividido em 3 fases, já que de acordo com dados prévios do nosso laboratório (Mehanna et al., 2007) observou-se que as principais alterações nas variáveis analisadas de pressão arterial e frequência cardíaca ocorriam nos 5 minutos após a infusão endovenosa de LPS sendo essa fase denominada fase 1, a fase 2 aos 25 minutos e a fase 3 aos 50 minutos após a infusão de LPS, além disso, utilizamos esses mesmos tempos para análise do grupo controle.

A confirmação do sítio de microinjeção bilateral no PVN foi realizada através da visualização de corte histológico, corado com azul de Evans, auxílio do Atlas Paxinos & Watson (1998) e somente os ratos com marcação da microinjeção na área do PVN foram considerados para análise. O esquema representativo encontra-se na Figura 1.

O período de registro basal dos animais foi de aproximadamente 30 min e não houve diferença em nenhum dos grupos analisados tanto para a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS) como também na pressão arterial diastólica (PAD).(Tabela 1). Os efeitos, para as mesmas variáveis, após administração central de salina, LY (antagonista dos receptores NMDA) ou NBQX (antagonista dos receptores não-NMDA) nos grupos controle e LPS estão apresentados nas figuras 2 e 3, respectivamente.

Na análise das alterações cardiovasculares, no grupo controle, observamos taquicardia na Fase 1 de todos os grupos e nas Fases 2 e 3 do grupo

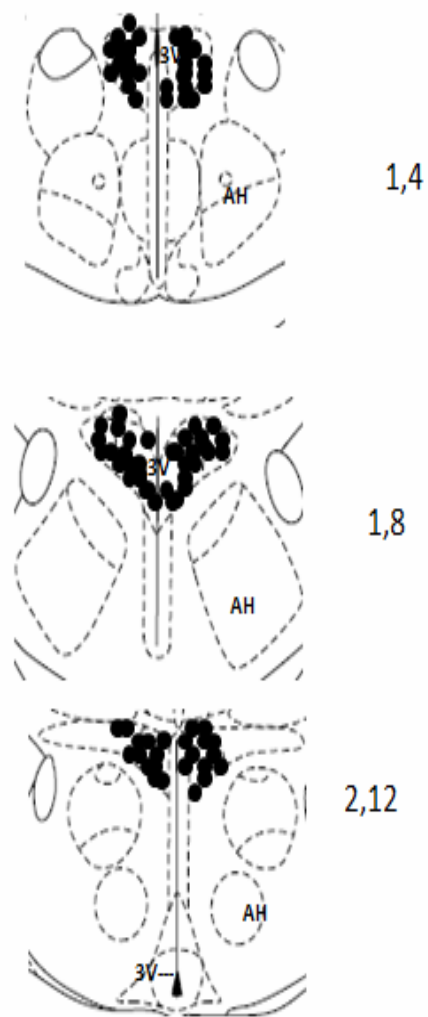
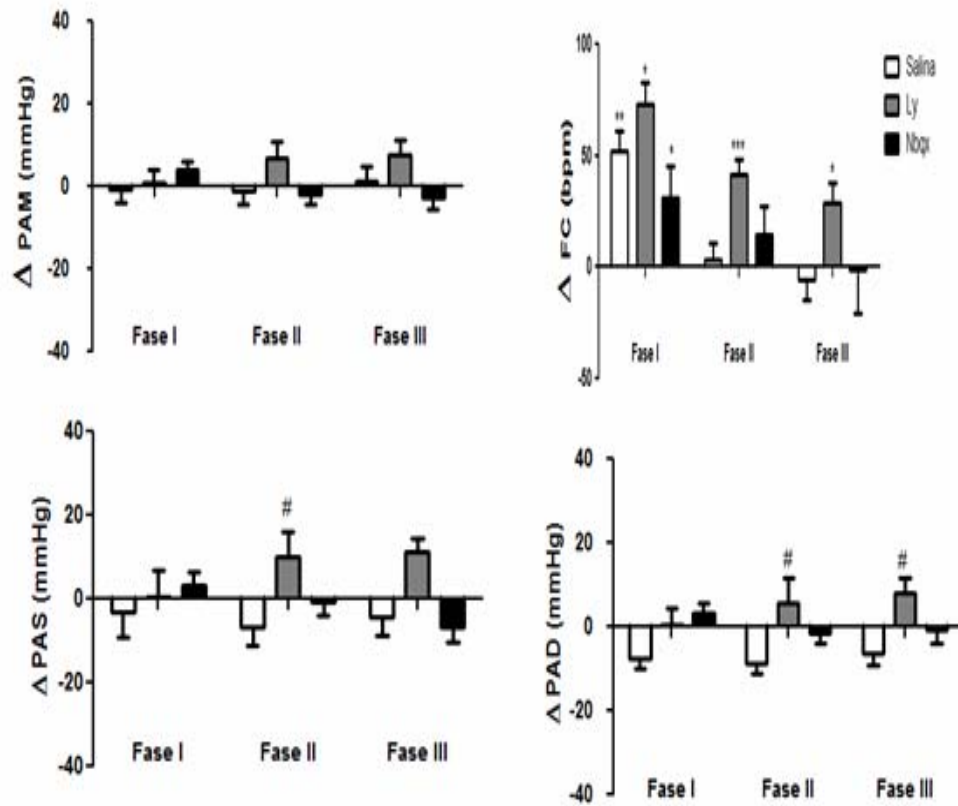


Figura 1. Representação esquemática baseada no atlas Paxinos and Watson (1986) dos locais de microinjeção em cortes seriados do rostral (1,4mm) para caudal (2,12mm) da região do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (●) Microinjeção dentro do PVN. 3V (terceiro ventrículo) e AH (hipotálamo anterior).

**Tabela 1.** Valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), pressão arterial sistólica (PAS), e pressão arterial diastólica (PAD) em animais acordados de todos os grupos experimentais.

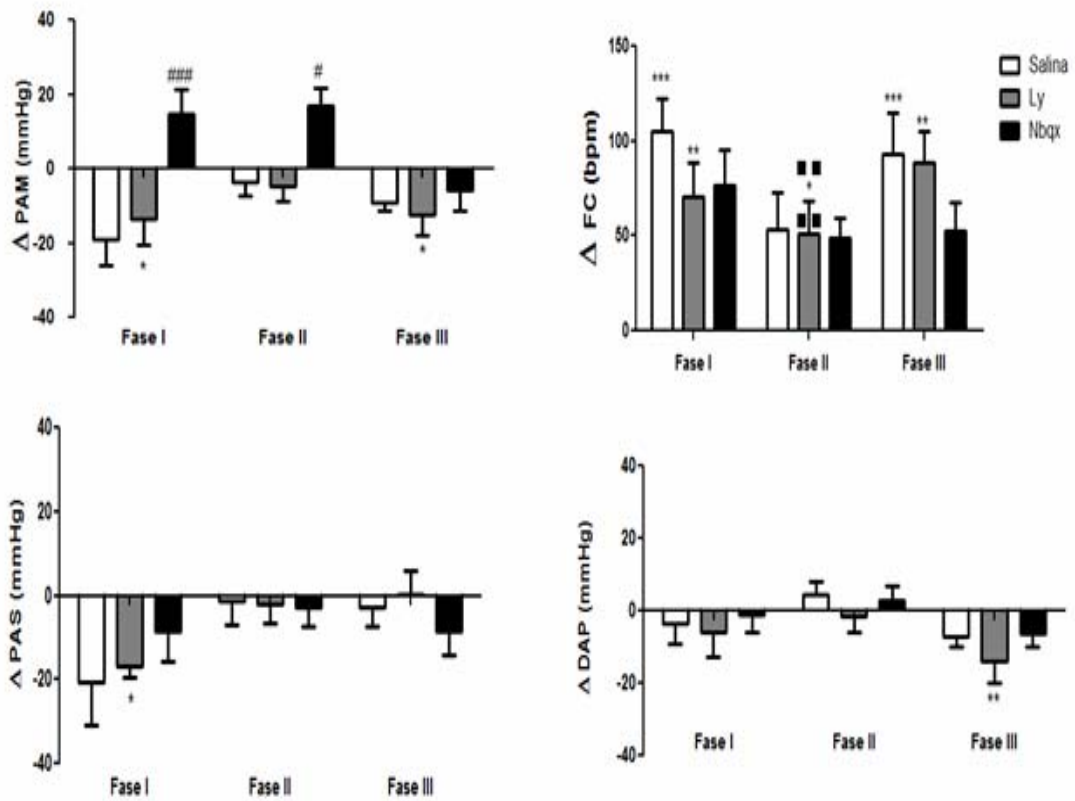
Central	Salina		Ly		NBQX	
	Salina	LPS	Salina	LPS	Salina	LPS
I.V	(n=08)	(n=07)	(n=10)	(n=10)	(n=07)	(n=11)
<b>Valores basais</b>						
PAM, mmHg	105,6±0,1	107,1±0	117±7,2	102,1±1,7	106,3±1,2	98,8±4,2
FC, bpm	369,2±11	391,5±12	380,6±11	377,4±9,7	408,2±17	387,7±11
PAS, mmHg	134,6±7	135,5±4	147,9±4	127,1±2	136,6±4,3	123±3,7
PAD, mmHg	83,2±7	86,4±3	97,8±3,7	83,1±3,1	84,9±3	80,5±2



**Figura 2.** Alterações cardiovasculares dos grupos que receberam endovenosamente de salina (grupo salina (n=08), grupo LY (n=10) e grupo NBQX (n=07). Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC), Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD).

\* Comparação com relação ao basal (valores de  $p \rightarrow p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ )

# Comparação com o grupo salina (valor de  $p \rightarrow p < 0,05\#$ )



**Figura 3.** Alterações cardiovasculares dos grupos que receberam endovenosamente LPS. (Grupo salina (n=11), grupo LY (n=10), grupo NBQX (n=14). Pressão Arterial Média (PAM), Frequência Cardíaca (FC), Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Pressão Arterial Diastólica (PAD).

\* Comparação com relação ao basal (valores de  $p \rightarrow p < 0,05^*$ ;  $p < 0,01^{**}$  e  $p < 0,001^{***}$ )

# Comparação com o grupo salina (valor de  $p \rightarrow p < 0,05^{\#}$ ;  $p < 0,01^{\#\#}$ )

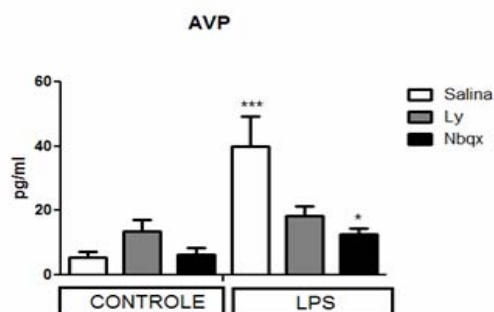
LY quando comparado com os valores basais. Quando analisado esses grupos nas diferentes fases observamos que apenas o grupo LY apresenta aumento da PAS na Fase 2 e da PAD nas fases 2 e 3.

Na análise dos parâmetros cardiovasculares do grupo que recebeu LPS observamos uma hipotensão no grupo LY nas fases 1 e 3. Taquicardia na fase 1 dos grupos salina e LY, na fase 2 do grupo LY e na fase 3 dos grupos salina e LY. Na PAS observamos hipotensão no grupo LY na fase 1 e na PAD hipotensão no grupo LY na fase 3.

Os níveis plasmáticos de vasopressina após a administração de LPS estão aumentados nos grupos salina e NBQX. Entretanto, quando comparamos os valores entre os grupos Ly observa-se que não há alteração na concentração de vasopressina após a administração de LPS. Por outro lado, a administração de NBQX não preveniu o aumento de vasopressina no grupo LPS comparado ao controle (figura 4).

Na análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e da pressão arterial, observamos que nos parâmetros da PAS houve um aumento dos componentes de variância e LF do grupo controle NBQX quando comparado ao grupo controle salina e aumento do componente HF do grupo LPS- NBQX quando comparado ao grupo LPS salina (tabela 2).

Já quando comparado os grupos LY observamos aumento da variância no grupo LPS e nos grupos NBQX ocorre uma diminuição do componente LF no grupo LPS (tabela 2).



**Figura 4.** Concentração plasmática de vasopressina. (Grupos experimentais CONTROLE (salina n=06, LY n= 08 e NBQX n=06), grupos experimentais LPS ( salina n=08, LY n=07 e NBQX n=11) Comparação dos grupos com o grupo salina. (\*\*\*) valor de  $p < 0,001$ ; e \*  $p < 0,05$ )

**Tabela 2.** Análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso (IP) e da Pressão Arterial Sistólica (PAS)

	Salina		LY		NBQX	
	Salina	LPS	Salina	LPS	Salina	LPS
	(n=07)	(n=07)	(n=10)	(n=10)	(n=07)	(n=11)
<b>Parâmetros Espectrais; PAS</b>						
Variância, mmHg <sup>2</sup>	19,6±3,9	31,1±3,2	19,7± 3,8	33,5±4,6##	39,7±6,2***	35±5,5
LF, mmHg <sup>2</sup>	3,6±1,2	2,4±0,5	4,0±0,6	3,07±1,1	16,7±2*	8,8±2
HF, mmHg <sup>2</sup>	2,4±0,4	3,4±1,4	2,0±0,4	9,7±3,1	5,4±1,5	15,4±3
<b>Parâmetros Espectrais , IP</b>						
Variância, ms <sup>2</sup>	31±19,5	19±6,2	52±10,8*	12±6,9###	47,7±10,9	12,8±8###
LF, ms <sup>2</sup>	1,7±1	0,07±0,1	1,9±0,4	0,1±0,3	0,4±1,62	0,1±0,3
LF, nu	24,5±5,8	13±4,5	36±4,6	12,5±5,3##	25±5,4	11±3,8
HF, ms <sup>2</sup>	1,8 ±1	0,5±0,3	2,7±1,9	1±0,3	3±1,7	1,9±1,1
HF, nu	75,5±5,7	87±4,2	64±4,6	87,5±5,3##	75±5,4	89±3,8
LF/HF	0,6±0,2	0,2±0,07	0,64±0,1	,15±0,1	0,4±0,2	0,1±0,06

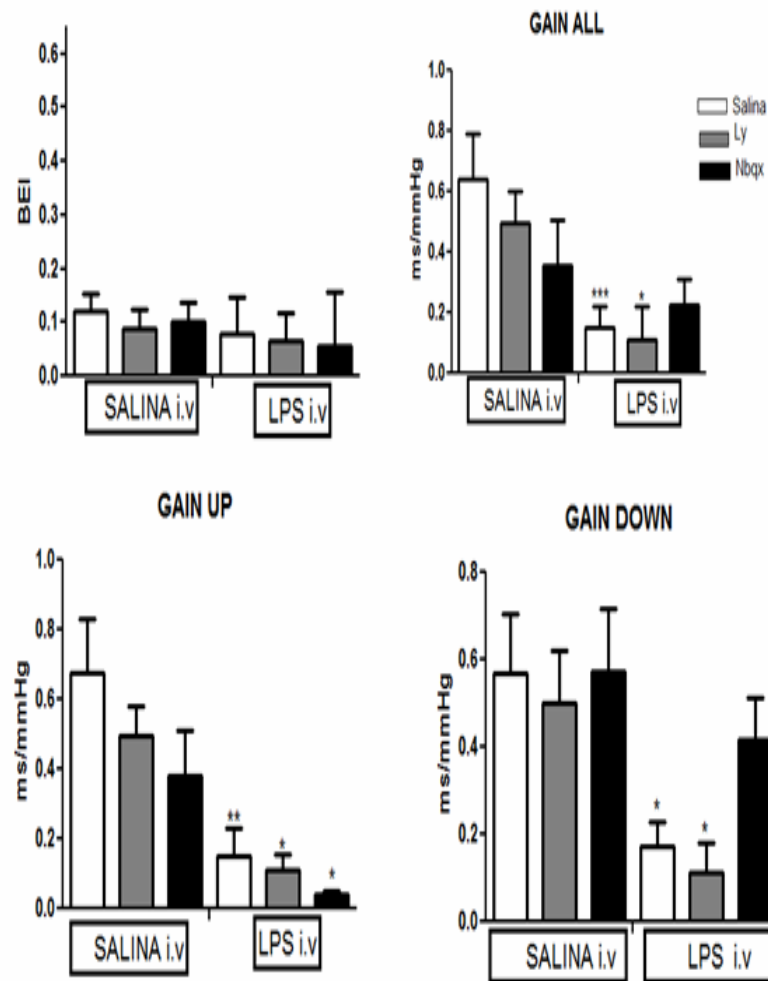
Comparação com grupo salina onde \* $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,01$ .

Comparação entre o grupo salina com seu respectivo grupo LPS onde ## $p < 0,01$  e ### $p < 0,001$ .

Nos parâmetros espectrais do Intervalo de Pulso (IP) observamos nos grupos controle aumento da variância do grupo LY quando comparado ao grupo salina (tabela 2).

Quando comparamos os grupos LY observamos diminuição da variância e do componente LF e aumento do componente HF do grupo LPS. E nos grupos NBQX observamos diminuição da variância no grupo LPS (tabela 2).

Na análise do barorreflexo espontâneo desses animais observa-se uma redução no ganho total dos grupos salina ( $p < 0,001$ ) e Ly ( $p < 0,05$ ) após a administração de LPS endovenosamente quando comparado ao grupo salina, porém sem diferença no grupo NBQX. Já no ganho de subida verificou-se uma diminuição no ganho nos três grupos analisados após o LPS. No ganho de descida observa-se uma redução nos valores dos grupos salina e Ly e sem alterações no grupo NBQX. Já o índice da efetividade do barorreflexo não se alterou pela administração de LPS. Os resultados do barorreflexo espontâneo podem ser observados na figura 5.



**Figura 5.** Análise do Barorreflexo espontâneo. Grupos Experimentais SALINA (salina n=08, LY n=08, NBQX n=7) grupos experimentais LPS (salina n=07, LY n=07 e NBQX n=09). Comparação dos grupos com o grupo salina. (\*\*\*) valor de  $p < 0,001$ ; e \*\*  $p < 0,01$  e \*  $p < 0,05$ ).

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou que a injeção endovenosa de LPS leva a uma queda na pressão arterial acompanhada de taquicardia. Esses efeitos foram inalterados pelo bloqueio dos receptores NMDA e após a microinjeção de inibidor não NMDA ocorreu à reversão da hipotensão em hipertensão nas 2 primeiras fases, sem alteração na taquicardia. Além disso, observou-se que a administração de LPS leva a um aumento nos níveis plasmáticos de vasopressina. O ganho baroreflexo espontâneo apresentou grande diminuição nos grupos que receberam LPS e o bloqueio não NMDA no PVN impediu essa queda. Os dados da modulação autonômica mostraram que a administração de LPS não promoveu alterações em nenhum dos componentes espectrais, porém os valores do IP apresentaram uma tendência à queda. A administração de Ly no PVN de animais com LPS levou a uma queda significativa na variância e no componente simpático e aumento no componente parassimpático do IP além de um aumento na variância na PAS. O bloqueio não NMDA com NBQX levou a uma queda na variância do IP de forma significativa, sem alterar os outros componentes. Dessa forma, nossos dados permitem sugerir que os efeitos hipotensores provocados pela endotoxemia são em parte devido à ativação dos receptores não NMDA no PVN e, a liberação de vasopressina estimulada por LPS se deve em parte por ativação do receptor NMDA no PVN.

A sepse é a principal causa de morte dentro das Unidades de Terapia Intensiva. (CARVALHO ET AL 2010, GASTMEIER ET AL, 1998, GERLACH 2003). Com isso, diversos estudos estão sendo feitos visando o entendimento desta doença tanto para melhora do prognóstico dos pacientes como para prevenção de casos letais. A sepse é caracterizada por hipotensão, diminuição da resistência vascular periférica, aumento do débito cardíaco, sensibilidade diminuída aos agentes vasoconstritores endógenos e aumento da mortalidade. (PARRILO, 2003, NAVA ET al. 1992; MAYEUX, 1997; WOLKOW, 1998.). Os nossos achados, onde foram observadas hipotensão e taquicardia nos animais que receberam LPS endovenosamente, corroboram com a literatura.

Nossos dados sugerem que a hipotensão devido à injeção de LPS ocorreu devido a uma ativação dos receptores não NMDA, já que foi revertida pelo bloqueio com NBQX no PVN. Não foram encontrados na literatura dados que

mostrem a atividade desses receptores em casos de endotoxemia. No trabalho de Li e colaboradores (2006), eles observaram que a microinjeção unilateral de NMDA no PVN levou a um aumento da pressão arterial média e da frequência cardíaca e essa resposta foi atenuada após administração do antagonista AP-5. Porém quando administrado apenas o AP-5 no PVN observou-se pouco efeito sobre a pressão arterial e a frequência cardíaca bem como na atividade simpática renal. Segundo Busnardo e colaboradores (2009), a resposta pressora a microinjeção de L-glu após o tratamento com LY ou NBQX não proporcionou alteração na pressão arterial, porém a taquicardia foi revertida em bradicardia no grupo LY sugerindo que a taquicardia como resposta a microinjeção do L-glu no PVN é mediada pelos receptores NMDA e as alterações da pressão arterial podem ser mediadas pelos dois receptores glutamatérgicos, os NMDA e os não NMDA. Nossos dados na avaliação do parâmetro de pressão arterial, não encontramos alterações na pressão arterial dos animais que receberam LY. Chen e colaboradores (2003) examinou as respostas dos receptores de glutamato no PVN unilateralmente e encontrou que a resposta à bicuculina após o tratamento como AP-5 e NBQX nos parâmetros de pressão arterial média, frequência cardíaca e a atividade nervosa renal foram reduzidas, porém sem taquicardia, sendo que em seus experimentos os animais estavam anestesiados. Em nosso trabalho os animais estavam com livre movimentação, com o bloqueio bilateral e sem a presença de anestésico, o que poderia explicar a ocorrência de taquicardia nos grupos analisados. Nos dados de Cui e colaboradores (2013) o bloqueio bilateral dos receptores NMDA e não-NMDA do PVN atenuaram a pressão arterial média demonstrando que esses receptores contribuem para o controle tônico do fluxo simpático e da pressão arterial.

Diversos fatores podem levar ao aumento da liberação de vasopressina, sendo os principais o aumento da osmolaridade plasmática (DUNN ET AL 1973); hipotensão (SAIA ET AL 2013); diminuição do volume plasmático (DUNN ET AL 1973); e aumento da temperatura corpórea (KASTING ET AL 1981). Vários autores (KASTING ET AL, 1985, 1986, GIUSTI-PAIVA ET AL, 2002 e 2003, BEISHUIZEN ET AL, 2003, BATALHAO ET AL 2008, PALIN ET AL, 2008) tem demonstrado que a endotoxemia aumenta de forma significativa a liberação de vasopressina. No trabalho de Shimizu 2009, eles observaram que a concentração de AVP no plasma aumentou 60 minutos após a injeção de LPS corroborando com

nossos resultados. Entretanto, no nosso estudo o plasma coletado após 120 minutos do LPS.

Segundo Oliveira-Pelegrin e colaboradores, (2009), a hipotensão na fase inicial da sepse pode levar ao aumento da liberação de vasopressina no plasma. A AVP é secretada pela porção magnocelular do PVN e pelo SON e é controlada por várias sinapses envolvendo vários neurotransmissores, sendo o glutamato o principal neurotransmissor excitatório no controle das células magnocelulares no hipotálamo (BUSNARDO ET AL 2012).

Os nossos resultados a cerca da concentração plasmática de vasopressina mostram uma tendência ao aumento da concentração nos grupos que receberam administração central de LY. Já no grupo LPS houve aumento da concentração de AVP nos grupos salina e NBQX. Não foram encontrados estudos que mostrem os efeitos cardiovasculares após bloqueio central com NBQX ou LY em casos de endotoxemia. No estudo de Busnardo e colaboradores (2007), eles observaram que a liberação de vasopressina é responsável pela resposta de pressão arterial e bradicardia quando realizado a microinjeção de glutamato no SON após o tratamento com o antagonista da vasopressina (dTyr). Em 2012 esses mesmos autores observaram que a microinjeção de glutamato no PVN após o tratamento com o LY levou a um aumento dos níveis de vasopressina plasmática.

A frequência cardíaca varia batimento a batimento devido às adaptações do sistema nervoso autônomo na manutenção do equilíbrio do sistema cardiovascular. Essas alterações podem ser avaliadas através das variações nos intervalos RR, caracterizando a variabilidade da frequência cardíaca (TASK FORCE, 1996, REJANDRA, ET AL 2006). Diversos estudos foram realizados para demonstrar as alterações na variabilidade da frequência cardíaca em pacientes com sepse (AHAMAD ET AL, 2009, BARNABY ET AL, 2002). Nesse sentido, já foi observado que o PVN parece desempenhar um papel central na mediação do ritmo circadiano e da atividade nervosa autonômica (STAUSS 2003; DE ABREU ET AL, 2009). Neurônios do PVN podem modular a atividade do sistema nervoso autônomo, enviando projeções neuronais à coluna intermediolateral e para áreas como o bulbo rostroventrolateral (RVLM), o qual possui um papel central sobre a atividade simpática. O aumento da atividade nervosa simpática que acompanha o nascimento de animais maternos foi impedido por lesão estereotáxica do PVN (SEGAR ET AL,

2002). Dessa forma, o PVN exerce um papel relevante no controle do sistema nervoso autônomo.

No trabalho de Chen e Kuo (2007) em humanos com choque séptico observou-se que os valores de HF estavam aumentados quando comparados com seus controles em pacientes que desenvolveram de forma eventual choque séptico em até seis horas, enquanto os componentes LF, e a razão LF/HF estavam diminuídos nesses pacientes. Nossos dados mostram que nos parâmetros espectrais de pressão sistólica (SAP), houve o aumento da variância e do componente LF do grupo salina quando comparado ao grupo que recebeu administração central de NBQX, ou seja, aumento da atividade simpática nesses animais, já quando estes mesmos animais receberam LPS endovenosamente observamos um aumento do componente parassimpático desses animais, levando a suposição que os receptores não NMDA estariam envolvidos diretamente com a modulação autonômica nos casos de sepse. Nos parâmetros espectrais do intervalo de pulso observou-se uma tendência a redução na variância nos grupos LPS quando comparados aos grupos salina. Foi observado que nos animais que tiveram o bloqueio com o LY um aumento da variância quando comparado com o grupo controle. Quando houve o bloqueio central dos receptores NMDA houve uma diminuição da variância e do componente LF normalizado e um aumento do componente HF normalizado quando comparado os grupos salina com LPS. Supomos então que durante a sepse ocorre ativação de ambos receptores glutamatérgicos tanto os NMDA quanto os não-NMDA. Nossos dados corroboram com a literatura (GODIN ET AL 1996, KORACH ET AL, 2001) que demonstram que durante a endotoxemia a variância do IP está diminuída. Não encontramos estudos da análise espectral da pressão arterial e frequência cardíaca em animais com endotoxemia que receberam bloqueio central dos receptores glutamatérgicos. Dessa forma, nosso estudo é o primeiro a fazer essa análise.

Nossos resultados mostraram que na avaliação do barorreflexo espontâneo, os animais submetidos à condição de endotoxemia apresentam uma importante diminuição do ganho barorreflexo quando comparados aos do grupo salina. A avaliação da função barorreflexa é importante porque ela exerce um papel protetor durante a sepse (RADAELLI ET AL 2013). Os autores observaram que a sensibilidade dos barorreceptores foi reduzida significativamente 10 minutos após o início da infusão de LPS evidenciando que a endotoxemia é responsável por uma

rápida deterioração da função baroreflexa. Em humanos, Sayk e colaboradores (2008) observaram que a endotoxemia altera a função barorreflexa e que esse evento pode contribuir para os efeitos cardiovasculares indesejáveis causados pela sepse.

Na análise do barorreflexo espontâneo entre os grupos salina e LPS observa-se uma diminuição no ganho de subida de todos os grupos e uma diminuição no ganho total e no ganho de descida dos grupos salina e Ly, ou seja, o LPS faz com que ocorra a perda da capacidade do organismo de responder frente ao desafio imunológico, e os receptores não NMDA no PVN parecem exercer um efeito protetor a essa perda, visto que na comparação do ganho total esses animais não apresentaram perda significativa do ganho baroreflexo. No trabalho de Crestani e colaboradores (2010) onde foi investigado o papel do PVN na modulação barorreflexa, os autores observaram que o bloqueio dos receptores NMDA diminuiu a resposta de bradicardia reflexa porém sem alterar a taquicardia. Já a administração do NBQX não afetou a atividade barorreflexa o que corrobora com nossos resultados. Porém em nosso estudo a perda do ganho barorreflexo foi apenas nos animais submetidos à condição de endotoxemia não havendo alterações do barorreflexo espontâneo nos grupos controles.

Estudos da influência central sobre a função baroreflexa também foram realizados em outras regiões do sistema nervoso central como no Córtex Insular (ALVES ET al., 2009) ou no hipotálamo lateral (CRESTANI ET al., 2009). No trabalho de Crestani e colaboradores (2009) os autores mostraram uma ativação tônica dos receptores do glutamato sobre o barorreflexo a qual é mediada via receptores não-NMDA. Já no trabalho de ALVES e colaboradores (2009), estes observaram que os receptores NMDA influenciam na excitação tônica e na atividade parassimpática do barorreflexo. No entanto, poucos estudos tem avaliado o papel de áreas centrais na análise do baroreflexo espontâneo. Mais especificamente, um trabalho recente de nosso grupo é o único até o momento que realizou análise similar em animais submetidos a um protocolo de estresse ortostático (DE ANDRADE ET AL., 2014). Nesse estudo foi observado que a indução de estresse ortostático não modifica o baroreflexo espontâneo, mas quanto se inibe os neurônios do PVN com muscimol, ocorre grande diminuição, corroborando com nossos dados presentes e reforçando a teoria de que o PVN seja fundamental para a atividade baroreflexa.

## 6 CONCLUSÃO

Sugerimos que apesar de não observarmos o efeito tônico dos inibidores dos receptores glutamatérgicos, observamos que frente a um desafio imunológico como a sepse a inibição dos receptores NMDA (simpático) leva a hipotensão e taquicardia mostrando uma compensação que pode ser vasopressinérgica, já a inibição dos receptores não NMDA (vasopressinérgicos) leva a reversão da hipotensão mostrando que a vasopressina na fase inicial da sepse contribui para a queda da pressão arterial, possivelmente por aumentar a atividade simpática. O bloqueio dos receptores não NMDA apesar de aumentar a vasopressina durante a endotoxemia comparado ao controle, tem uma tendência a ter um aumento menor quando comparado com o grupo salina.

Sugerimos que durante a endotoxemia há uma tendência a diminuir a modulação simpática para o coração e vasos e que o bloqueio dos receptores NMDA acentua esse efeito. Já o bloqueio não NMDA aumenta a atividade simpática em condições de normalidade, sem alterar a modulação autonômica durante a endotoxemia. Nossos dados sugerem uma possível interação inibitória entre esses subtipos de receptores no PVN em casos de sepse.

Nossos resultados adicionam novas informações à literatura no que diz respeito ao papel do sistema nervoso central no controle cardiovascular durante situações de desafio imunológico como na endotoxemia e trabalhos futuros que avaliem outras áreas de controle central da função cardiovascular em situações de sepse ou endotoxemia poderão esclarecer as etapas do processo fisiopatológico dessa doença.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS AK, LICHTMAN AH.** Citocinas (capítulo 11), Imunidade Inata (capítulo 12). In:Imunologia Celular e Molecular. 5ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier; 2004. p.267-301.
- AHMAD,S, TEJUJA,A., NEWMAN, K.D., ZARYCHANSKI R. AND SEELYA.J.E,** Clinical review: A review and analysis of heart rate variability and the diagnosis and prognosis of infection *Critical Care* 2009, **13**:232.
- ALBERTI C, BRUN-BUISSON C, GOODMAN SV, ET AL.** Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med*, 2003; 168:77-84.
- ALVES FH, CRESTANI CC, RESSTEL LB, CORREA FM.** N-methyl-D-aspartate receptors in the insular cortex modulate baroreflex in unanesthetized rats. *Auton Neurosci*. 2009 May 11;147(1-2):56-63.
- Annane D, Trabold F, Sharshar T, Jarrin I, Blanc AS, Raphael JC, Gajdos P.** Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Aug;160(2):458-65.
- BADOER E.** Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001 Jan-Feb;28(1-2):95-9.
- BANNERMAN, D.D. AND GOLDBLUM, S.E.** Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284 2003: L899–L914, 2003; 10.1152/ajplung.00338.2002.
- BARNABY D, FERRICK K, KAPLAN DT, SHAH S, BIJUR P, GALLAGHER EJ.** Heart rate variability in emergency department patients with sepsis. *Acad Emerg Med*. 2002 Jul;9(7):661-70.
- BATALHÃO ME, MORETO V, STABILE AM, ANTUNES-RODRIGUES J, CARNIO EC** Role of dexamethasone on vasopressin release during endotoxemic shock.*Regul Pept*. 2008 Apr 10;147(1-3):67-71.
- BEISHUIZEN, L.G. THIJS.** Endotoxin and the hypothalamo–pituitary–adrenal (HPA) axis. *J. Endotoxin Res.*, 9 (2003), pp. 3–24.
- BENJAMIM, C.F.,** Atualização sobre mediadores em modelos experimentais de sepse. *Medicina, Ribeirão Preto, Simpósio: medicina intensiva - 3<sup>TM</sup> parte34*: 18-26, jan./mar. 2001
- BONE, M.B.G.S.** Diagnóstico e Tratamento Precoces da Sepse em Adulto Protocolo Institucional hospital sírio libanês. <http://www.hospitalsiriolibanes.org.br/sociedade-beneficente-senhoras/Documents/protocolos-institucionais/protocolo-sepse.pdf>.
- BONE RC, BALK RA, CERRA FB, ET AL.** Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/ Society

of Critical Care Medicine. Chest, 1992; 101(6):1644-55.

**BUSNARDO, C., TAVARES, R.F., CORREA, F.M.A.** 2009. Role of N-Methyl-D Aspartate and Non-N-Methyl-D-Aspartate Receptors in the Cardiovascular Effects of L- Glutamate Microinjection Into the Hypothalamic Paraventricular Nucleus of Unanesthetized Rats. Brazil Journal of Neuroscience Research 87:2066–2077

**BUSNARDO C, CRESTANI C.C, RESSTEL L.B, TAVARES R.F, ANTUNES-RODRIGUES J, CORRÊA F. M.** Ionotropic glutamate receptors in hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei mediate vasopressin and oxytocin release in unanesthetized rats. Endocrinology. 2012 May;153(5):2323-31.

**BUTTENSCHOEN, K., RADERMACHER, P. AND BRACHT, H.** Endotoxin elimination in sepsis: physiology and therapeutic application. Langenbecks Arch Surg (2010) 395:597–605.

**CÁRNIO, E.C., STABILE, A.M., BATALHAO, M.E., SILVA, J.S., ANTUNES-RODRIGUES, J.,BRANCO, L.G., MAGDER, S.,** 2005. Vasopressin release during endotoxaemic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase. Pflügers Arch. 450,390–394.

**CARVALHO, R. H., ET AL .** Sepsis, sepsis grave e choque séptico: aspectos clínicos, epidemiológicos e prognóstico em pacientes de Unidade de Terapia Intensiva de um Hospital Universitário. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba , v. 43, n. 5, Oct. 2010.

**CHEN,Q.,H. HAYWOOD, J.,R., AND GLENN M.** Sympathoexcitation by PVN-Injected Bicuculline Requires Activation of Excitatory Amino Acid Receptors in Hypertension. 2003;42:725-731.

**CHEN, W,L.,KUO, C-D,** Characteristics of Heart Rate Variability Can Predict Impending Septic Shock in Emergency Department Patients with Sepsis Acad Emerg Med May 2007, vol. 14, no. 5 www.aemj.org.

**CHROUSOS, G.P.,** 1995. The hypothalamic–pituitary–adrenal axis and immune mediated inflammation. N. Engl. J. Med. 332, 1351–1362.

**CORRÊA, P.B.F., PANCOTO, J.A.T., OLIVEIRA-PELEGRIN, G.R., CÁRNIO, E.C., ROCHA, M.J.A.** 2007. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. Journal of Neuroimmunology. Volume 183, Issues 1–,2007, Pages 17–25.

**CORREIA, M.S.F., FERNANDES, S.R.C., BERNARDI, M.M.** Efeitos da exposição de ratos adultos ao lipopolissacarídeo (LPS) no comportamento estereotipado e na catatonia experimental. Rev Inst Ciênc Saúde 2008;26(2):215-20.

**CRESTANI CC, DEOLINDO MV, ALVES FH, RESSTEL LB, CORREA FM.** Non-N-methyl-d-aspartate glutamate receptors in the lateral hypothalamus modulate cardiac baroreflex responses in conscious rats. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009 Nov;36(11):1079-85.

**CRESTANI CC, ALVES FH, BUSNARDO C, RESSTEL LB, CORREA FM.** N-methyl-D-aspartate glutamate receptors in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate cardiac component of the baroreflex in unanesthetized rats. *Neurosci Res.* 2010 Aug;67(4):317-26.

**CUI BP, LI P, SUN HJ, DING L, ZHOU YB, WANG JJ, KANG YM, ZHU GQ.** Ionotropic glutamate receptors in paraventricular nucleus mediate adipose afferent reflex and regulate sympathetic outflow in rats. *Acta Physiol (Oxf).* 2013 Jun 3.

**CUNNINGHAM PN, WANG Y, GUO R, HE G, QUIGG RJ.**2004. Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. *J Immunol.* 2004 Feb 15;172(4):2629-35.

**DAMPNEY RA.** Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 1994 Apr;74(2):323-64.

**DANBOLT, D.N.,** Glutamate uptake. *Progress in Neurobiology* 65 (2001) 1–105.

**DAVID CM.** Sepsis e síndrome da disfunção orgânica múltipla. In: *Medicina Intensiva.* Ed. Revinter, 2004; 563-580.

**DE ABREU, S.B. ET AL.** Papel do Núcleo Paraventricular do hipotálamo (PVN) nas alterações cardiovasculares derivadas da endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS).2010.80f.Dissertação de Mestrado em Patologia Experimental-UEL, Londrina-Pr.

**DE ANDRADE O, BORGHI SM, DE SOUZA HC, FONTES MA, MARTINS-PINGE MC.** Paraventricular nucleus of hypothalamus participates in the sympathetic modulation and spontaneous fluctuation of baroreflex during head up tilt in unanesthetized rats. *Neurosci Lett.* 2014 Jan 13;558:1-7.

**DOI K, LEELAHAVANICHKUL A, YUEN PS, STAR RA.** Animal models of sepsis and sepsis induced kidney injury. (2009) *J Clin Invest.*119:2868---78.

**DUNN FL, BRENNAN TJ, NELSON AE, ET AL.** The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest* 1973; 52: 3212-3219.

**FRACASSO, J.F.** Contribuição ao entendimento da patogenia da sepse. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.,* v. 29, n.2, p. 119-127, 2008.

**FERRER MT, KENNEDY WR,** Sahinen F. Baroreflexes in patients with diabetes mellitus. *Neurology* 1991; 41:1462-1466.

**GABOR, A., LEENEN, F.H.H.**Cardiovascular effects of angiotensina II and glutamate in the PVN of Dahl salt-sensitive rats. *B r a i n R e s e a r c h* 1 4 4 7 ( 2 0 1 2 ) 2 8 – 37.

**GASTMEIER P, KAMPF G, WISCHNEWSKI N, HAUER T, SCHULGEN G, SCHUMACHER M, ET AL.** Prevalence of nosocomial infection in representative german hospitals. *J Hosp Infect* 1998; 38:37-49.

**GERLACH H, KEH D.** Recent progress in sepsis epidemiology - have we learned enough? *Crit Care* 2003; 7:333-334.

**GIUSTI-PAIVA, M. DE CASTRO, J. ANTUNES-RODRIGUES, E.C. CARNIO.** Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock *Crit. Care Med.*, 30 (2002), pp. 1306–1310

**GIUSTI-PAIVA A., MARTINEZ M.R.** Administração de vasopressina no tratamento do choque séptico. *BM rev. bras. med;*61(5):259:262:264:passim-260-262-264, maio 2004.

**HADDAD, J.J., SAADE, N.E., SAFIEH-GARABEDIAN, B., 2002.** Cytokines and neuro- immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic–pituitary–adrenal revolving axis. *J. Neuroimmunol.* 133,

**HERMAN JP, EYIGORO, ZIEGLERDR, JENNES** Expression of ionotropic glutamate receptor subunit mRNAs in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. *J Comp Neurol.* 2000 Jul 3;422(3):352-62.

**KANNAN H, HAYASHIDA Y, YAMASHITA H.** 1989. Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats. *Am J Physiol* 256:R1325–R1330.

**KASTING NW, VEALE WL, COOPER KE, ET AL.** Vasopressin may mediate febrile convulsions. *Brain Res* 1981; 213: 327-333.

**KASTING , M. F. MAZUREK , J. B. MARTIN.** Endotoxin increases vasopressin release independently of known physiological stimuli. *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* Published 1 April 1985 Vol. 248 no. E420-E424.

**KASTINGNW.** Characteristics of body temperature, vasopressin, and oxytocin responses to endotoxin in the rat. *Can J Physiol Pharmacol.* 1986 Dec;64(12):1575-8.

**KC P, BALAN KV, TJOE SS, MARTIN RJ, LAMANNA JC, HAXHIU MA, DICK TE** Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned rats. *J Physiol.* 2010 Feb 15;588(Pt 4):725-40.

**KC P, DICK TE.** Modulation of cardiorespiratory function mediated by the paraventricular nucleus. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010 Nov 30;174(1-2):55-64.

**KERSCHEN EJ, FERNANDEZ JA, COOLEY BC, YANG XV, SOOD R, MOSNIER LO, CASTELLINO FJ, MACKMAN N, GRIFFIN JH, WEILER H.** Endotoxemia and sepsis mortality reduction by non-anticoagulant activated protein C. *J Exp Med.* 2007 Oct 1;204(10):2439-48.

**KNOTEK M, ROGACHEV B, WANG W, ECDER T, MELNIKOV V, GENGARO PE, ESSON M, EDELSTEIN CL, DINARELLO CA, SCHRIER RW.** 2001. Endotoxemic renal failure in mice: Role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase. *Kidney Int.* Jun;59(6):2243-9.

**LANDRY, D.W., LEVIN, H.R., GALLANT, E.M., SEO, S., D'ALESSANDRO, D., OZ,M.C., OLIVER, J.A.,** 1997. Vasopressin pressor hypersensitivity in vasodilatory septic shock. *Crit. Care Med.* 25, 1279–1282.

**LI, Y-F, JACKSON ,K.,J., STERN , J. E. RABELER , B.,PATEL, K.P** Interaction between glutamate and GABA systems in the integration of sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* Published 1 December 2006 Vol. 291 no. H2847-2856 DOI: 10.1152/ajpheart.00625.2005.

**LI W, LI J, ASHOK M, WU R, CHEN D, YANG L, YANG H, TRACEY KJ, WANG P, SAMA AE, WANG H.** A cardiovascular drug rescues mice from lethal sepsis by selectively attenuating a late-acting proinflammatory mediator, high mobility group box 1. *J Immunol.* 2007 Mar 15;178(6):3856-64.

**LICINIO, J., WONG, M.L.,** 1997. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. *J. Clin. Invest.* 100, 2941–2947.

**MARTINS-PINGE MC, MUELLER PJ, FOLEY CM, HEESCH CM, HASSER EM.** Regulation of arterial pressure by the paraventricular nucleus in conscious rats: interactions among glutamate, GABA, and nitric oxide. *Front Physiol.* 2012;3:490.

**MAYER ML, ARMSTRONG N.** Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol.* 2004;66:161-81.

**MAYEUX PR, 1997;** *J Toxicol Environ Health.* Aug 8;51(5):415-35. Pathobiology of lipopolysaccharide.

**MCCANN, S.M., LYSON, K., KARANTH, S., GIMENO, M., BELOVA, N.,KAMAT, A., RETTORI, V.,** 1994. Role of cytokines in the endocrine system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 741, 50– 63.

**MCCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J., FRANCI, C.R., ANSELMO-FRANCI, J.A., KARANTH, S., RETTORI, V.,** 2000. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 33, 1121–1131.

**MEHANNA, A., VITORINO, D.C., PANIS, C., BLANCO, E.E.A., PINGE-FILHO, P., MARTINS- PINGE, M.C.,** 2007. Cardiovascular and pulmonary effects of NOS inhibition in endotoxemic conscious rats subjected to swimming training. *Life Sciences* Volume 81, Issue 16, 29 September, Pages 1301–1308

**MICHIE HR, MANOGUE KR, SPRIGGS DR, REVHAUG A, O'DWYER S, DINARELLO CA, CERAMI A, WOLFF SM, WILMORE DW.** 1988. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. *N Engl J Med.* Jun 9;318(23):1481-6.

**MORRIS M, ALEXANDER N.** Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion. *Hypertension*. 1989 Feb;13(2):110-4.

**NAVA E, PALMER RM, MONCADA S.** 1992. The role of nitric oxide in endotoxic shock: effects of NG-monomethyl-L-arginine. ; *J Cardiovasc Pharmacol*. 20 Suppl 12:S132-4.

**NAVES, L.A., VILAR, L., COSTA, A.C.F., DOMINGUES, L., CASULARI, L.A.,** Distúrbios na Secreção e Ação do Hormônio Antidiurético Arq Bras Endocrinol Metab vol 47 nº 4 Agosto 2003.

**OBERHOLZER A, OBERHOLZER C, MOLDAWER LL.** Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock*. 2001 Aug;16(2):83-96.

**OLIVEIRA.PELEGRI G.R. RAVANELLI M.I.B, BRANCO L.G.S. ROCHAM.J.A. T** hermoregulation and Vasopressin Secretion during Polymicrobial Sepsis *Neuroimmunomodulation* 2009;16:45–53.

**PALIN K, MOREAU ML, ORCEL H, DUVOID-GUILLOU A, RABIÉ A, KELLEY KW, MOOS F.** Age-impaired fluid homeostasis depends on the balance of IL-6/IGF-I in the rat supraoptic nuclei. *Neurobiol Aging*. 2009 Oct;30(10):1677-92.

**PARRILLO JE.** Pathogenetic mechanisms of septic shock. *N Engl J Med*. 1993 May 20;328(20):1471-7.

**PAXINOS, G., WATSON, C.,** 1998. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates.

**RADAELLI A, CASTIGLIONI P, CERRITO MG, DE CARLINI C, SORIANO F, DI RIENZO M, LAVITRANO ML, PAOLINI G, MANCIA G.** Infusion of Escherichia coli lipopolysaccharide toxin in rats produces an early and severe impairment of baroreflex function in absence of blood pressure changes. *Shock*. 2013 Feb;39(2):204-9.

**RAJENDRA ACHARYA U, PAUL JOSEPH K, KANNATHAL N, LIM CM, SURI JS.** Heart rate variability: a review. *Med Bio Eng Comput*. v.44,n.12,p.1031-51,2006.

**REINHART, K, DANIELS,K, MACHA. RIBEIRO. F.** O ônus da sepse: uma chamada em apoio ao Dia Mundial da Sepse 2013. *Rev. bras. ter. intensiva*, São Paulo , v. 25, n. 1, Mar. 2013 .

**RIVIER, C., CHIZZONITE, R., VALE, W.,** 1989. In the mouse, the activation of the hypothalamic–pituitary adrenal axis by a lipopolysaccharide (endotoxin) is mediated through interleukin-1. *Endocrinology* 125, 2800–2805.

**RUBINI, R., PORTA, A., BASELLI, G., CERUTTI, S., PARO, M.** 1993. Power spectrum analysis of cardiovascular variability monitored by telemetry in conscious unrestrained rats, *Journal of Autonomic Nervous System*, 45, P.181-190.

**SAIA RS, BERTOZI G, MESTRINER FL, ANTUNES-RODRIGUES J, QUEIRÓZ CUNHA F, CÁRNIO EC.** Cardiovascular and inflammatory response to cholecystokinin during endotoxemic shock. *Shock*. 2013 Jan;39(1):104-13.

**SALES JUNIOR, JOÃO ANDRADE L. ET AL .** Sepsis Brasil: estudo epidemiológico da sepsis em Unidades de Terapia Intensiva brasileiras. *Rev. bras. ter. intensiva*, São Paulo , v. 18, n. 1, Mar. 2006 .

**SEGAR.J.L.,ELLSBURRY,D,L,SMITH,O.M.**Inhibition of sympathetic responses at birth in sheep by lesion of the paraventricular nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Dec;283(6):R1395-403.

**SHIMIZU, F.,KASAI, T. TAKAMATA,A.**Involvement of central angiotensin II type 1 receptors in LPS-induced systemic vasopressin release and blood pressure regulation in rats. *J Appl Physiol* (1985). 2009 Jun;106(6):1943-8.**STAUSS HM. Heart rate variability. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2003 Nov;285(5):R927-31.**

**TASK FORCE** Of The European Society Of Cardiology The North American Society Of Pacing Electrophysiology. Heart rate variability - Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. *European Heart Journal*, v.17, p. 354-381, 1996.

**TIWARI MM, BROCK RW, MEGYESI JK, KAUSHAL GP, MAYEUX PR.** 2005. Disruption of renal peritubular blood flow in lipopolysaccharide-induced renal failure: role of nitric oxide and caspases. *Am J Physiol Renal Physiol*. Dec;289(6):F1324-32.

**TONELLI M, GILL J, PANDEYA S, BOHM C, LEVIN A, KIBERD BA.** Slowing the progression of chronic renal insufficiency. *CMAJ*. 2002 Apr 2;166(7):906-7.

**TURNBULL, A.V., RIVIER, C.L., 1999.** Regulation of the hypothalamic–pituitary adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol. Rev.* 79, 1–71.

**WAN, W., WETMORE, L., SORENSEN, C.M., GREENBERG, A.H., NANCE, D.M. 1994.** Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain *Brain Research Bulletin* Volume 34, Issue 1, 1994, Pages 7–14

**WESTPHAL, G. A. ET AL .** Estratégia de detecção precoce e redução de mortalidade na sepsis grave. *Rev. bras. ter. intensiva*, São Paulo , v. 21, n. 2, June 2009.

**WICHTERMAN KA, BAUE AE, CHAUDRY IH.** 1980. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189–201.

**WOLKOW PP.** Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. *Inflamm Res*. 1998 Apr;47(4):152-66.

**XU,B., CHEN,W-W., FAN,Z-D, HAN,F., XIONG, X-Q, GAO, X-Y. AND ZHU, G-Q.** Responses of neurons in paraventricular nucleus to activation of cardiac afferents and acute myocardial ischaemia in rats. (2011) *Exp Physiol* 96.3 pp 295–304.