



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL de LONDRINA

---

SAMANTHA BAGOLAN DE ABREU

**PAPEL DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO  
HIPOTÁLAMO (PVN) NAS ALTERAÇÕES  
CARDIOVASCULARES DERIVADAS DA ENDOTOXEMIA  
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)**

SAMANTHA BAGOLAN DE ABREU

**PAPEL DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO  
HIPOTÁLAMO (PVN) NAS ALTERAÇÕES  
CARDIOVASCULARES DERIVADAS DA ENDOTOXEMIA  
INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientadora: Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge

Londrina  
2010

**Catálogo na publicação elaborada pela bibliotecária Mônica de Oliveira CRB-8 6489**

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

A162p Abreu, Samantha Bagolan de.  
Papel do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nas alterações cardiovasculares derivadas da endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS) / Samantha Bagolan de Abreu. – Londrina, 2010.  
75f. : il.

Orientador: Marli Cardoso Martins Pinge.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2010.  
Bibliografia: f.64-83

1. Patologia Experimental – Teses. 2. Núcleo Paraventricular do Hipotálamo – Teses. 3. Endotoxemia – Teses. I. Pinge, Marli Cardoso Martins. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. III. Título.

CDU 616-092

SAMANTHA BAGOLAN DE ABREU

**PAPEL DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN)  
NAS ALTERAÇÕES CARDIOVASCULARES DERIVADAS DA  
ENDOTOXEMIA INDUZIDA POR LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco  
UEL – Londrina - PR

---

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 22 de julho de 2010.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus pela força e por todas as oportunidades que tem colocado em minha vida.

À minha família por todo o apoio, compreensão e ajuda nos momentos em que pensei em desistir.

À minha orientadora Profa. Dra. Marli, por tantos anos de companhia e orientação e por tudo o que me ensinou.

Aos amigos de laboratório pela ajuda e pela companhia de todos os dias.

Aos amigos Leonardo e Karina pelos momentos de diversão e alegria dentro do departamento.

Ao Prof. Dr. Phileno que me deu uma das maiores oportunidades da minha vida.

À Rafaela por me receber na Suíça com tanto carinho.

Aos meus amigos de trabalho em Genebra que me ensinaram o valor da diplomacia e que transformaram profundamente meu modo de ver a vida.

Ao meu namorado Ludovic presença constante, ajuda nas horas difíceis, que me mostrou que tudo pode ficar bem apenas com um sorriso.

Aos meus ratinhos que involuntariamente doaram suas vidas para que esse trabalho pudesse se realizar.

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram na conclusão desse trabalho, mesmo aqueles que torceram contra e colocaram obstáculos em meu caminho, pois a cada vitória me fortaleci.

ABREU, Samantha Bagolan de. **Papel do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) nas alterações cardiovasculares derivadas da endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo (LPS)**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2010.

## RESUMO

A endotoxemia ainda constitui uma das principais causas de morte em unidades de terapia intensiva, sendo que os principais agentes etiológicos são bactérias gram-negativas seguidas pelas gram-positivas, e em menor escala os fungos. É caracterizada por hipotensão sistêmica, hiporeatividade aos vasoconstritores, subseqüentes anormalidades na função e perfusão tecidual, seguida de falência múltipla de órgãos. A ativação simpática prejudicada durante a endotoxemia parece desempenhar um papel bastante importante no desenvolvimento do choque endotóxico. A literatura tem mostrado que durante a endotoxemia, 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 paraventricular (PVN), que estão envolvidos na liberação de vasopressina e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), os quais estão aumentados nas fases iniciais da endotoxemia. O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do PVN nas respostas cardiovasculares e autônomas periféricas e produção de óxido nítrico (NO) após a indução de endotoxemia por administração de LPS, assim como identificar os efeitos nos parâmetros cardiovasculares do LPS aplicado diretamente nos neurônios do PVN em animais acordados. Ratos Wistar foram submetidos à cirurgia para implantação de cânulas-guia direcionadas ao PVN e cateterização de artéria e veia femorais, e divididos em dois grupos A e B. O grupo A recebeu microinjeção de solução salina (0,9%), ou muscimol (15 mM) agonista dos receptores gabaérgicos A, ou ácido quinurênico (40 mM) antagonista dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos, e foram submetidos à endotoxemia por administração intravenosa (i.v.) de LPS (5 mg/ml). O grupo B recebeu microinjeção de LPS no PVN ou ácido quinurênico (40 mM) + LPS no PVN sem indução de endotoxemia. No grupo A após a microinjeção de salina + LPS i.v. (SS) os animais demonstraram três fases distintas na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), uma queda inicial da PA nos primeiros 5 minutos, uma segunda fase de recuperação por volta de 25 minutos e uma estabilização da hipotensão após 50 minutos, na FC houve taquicardia, após muscimol + LPS i.v. (SM) a hipotensão foi atenuada na primeira fase da endotoxemia com valores de SS  $\Delta PAM = -35 \pm 9$  mm Hg vs. SM  $\Delta PAM = -1 \pm 9$  mm Hg, acompanhada de grande taquicardia SS  $\Delta FC = +31 \pm 14$  bpm vs. SM  $\Delta FC = +122 \pm 31$  bpm. Após ácido quinurênico + LPS i.v. (SAQ) não houve mudança na PAM, porém houve taquicardia com valores de SS  $\Delta FC = +80 \pm 24$  bpm vs. SAQ  $\Delta FC = +125 \pm 23$  bpm. No grupo B após o LPS no PVN (LC) houve aumento da PAM e da FC com valores de  $\Delta PAM = +12,33 \pm 3,10$  mm Hg e  $\Delta FC = +78,85 \pm 14,23$  bpm, após a microinjeção de ácido quinurênico no PVN anterior ao LPS no PVN (LCAQ) houve uma atenuação no aumento de PAM e FC com valores de  $\Delta PAM = -2,75 \pm 2,10$  mm Hg e  $\Delta FC = -20,84 \pm 15,14$  bpm. A análise espectral em SS apresentou no parâmetro IP o componente variabilidade (var), baixa frequência (LF) e alta frequência (HF) reduzidos, em SM apresentou no parâmetro

pressão arterial sistólica (PAS) variabilidade e LF diminuídos, em SAQ nenhum dos parâmetros foi modificados. Em LCAQ no parâmetro PAS houve uma diminuição nos componentes var, LF e aumento de HF em unidades normalizadas e em IP houve diminuição de var. Em SS houve aumento dos níveis de NO plasmático, em SM e SAQ os níveis de NO também se apresentaram aumentados. Em LC e LCAQ os níveis de NO demonstraram valores basais sem endotoxemia. Em conjunto os dados trazem evidências que o PVN possui uma participação importante nas respostas cardiovasculares durante a endotoxemia participando na modulação das respostas cardiovasculares e autonômas durante a fase inicial da endotoxemia induzida por LPS.

**Palavras-chave:** Pressão arterial. Muscimol. Variabilidade da frequência cardíaca. Lipopolissacarídeo. Sistema nervoso simpático.

ABREU, Samantha Bagolan de. **Role of paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN) in the cardiovascular changes resulting from the septicemia induced by lipopolysaccharide (LPS)**. 2010. 75 p. Dissertation (Master in Experimental Pathology) - State University of Londrina, Londrina, 2010.

## ABSTRACT

Sepsis remains a major cause of death in intensive care units, and the main etiologic agents are gram-negative bacteria followed by gram-positive bacteria, and fungi on a smaller scale. It is characterized by systemic hypotension, hyporeactivity to vasoconstrictors, subsequent abnormalities in function and tissue perfusion, followed by multiple organ failure. The impaired sympathetic activation during sepsis appears to play a very important role in the development of septic shock. The literature has been shown that during sepsis, certain areas of the central nervous system are activated and have important role in the development of pathophysiological adaptations to the immunological challenge. Among those there are some key areas, such as the supra-optic nucleus (SON) and paraventricular nucleus of hypothalamus (PVN), which are involved in the release of vasopressin and ACTH, which are increased in the early stages of sepsis. The main objective was to evaluate the participation of the PVN on autonomic and peripheral cardiovascular responses and production of nitric oxide (NO) after induction of endotoxemia by LPS administration, as well as identify the effects and possible effect of LPS applied directly in the neurons of the PVN in awake animals. Wistar rats underwent surgery for implantation of guide cannula directed to the PVN and catheterization of the femoral artery and vein, received microinjection of saline (0.9%), or muscimol (15 mM), or acid quinurenic (40 mM) and were subjected to sepsis by peripheral injection of LPS (5 mg/ml). After saline animals showed three distinct phases in mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) after muscimol hypotension was attenuated in the first phase (SS  $\Delta$ MAP =  $-35 \pm 9$  mm Hg vs. SM  $\Delta$ MAP =  $-1 \pm 9$  mm Hg) together with tachycardia (SS  $\Delta$ HR =  $+ 31 \pm 14$  bpm vs. SM  $\Delta$ HR =  $+122 \pm 31$ bpm). After acid quinurenic no change in MAP but there was tachycardia with a peak at 5 minutes (SS  $\Delta$ HR =  $+ 80 \pm 24$  bpm vs.  $\Delta$ HR SAQ =  $+ 125 \pm 23$  bpm). Two separate groups received microinjection of LPS into PVN and acid quinurenic (40 mM) without induction of sepsis. After the central LPS there was increase MAP and HR ( $\Delta$ MAP =  $+12.33 \pm 3.10$  mm Hg and  $\Delta$ HR =  $+ 78.85 \pm 14.23$  bpm) after microinjection of acid quinurenic before the central LPS, animals had an attenuation in the increase in MAP and HR ( $\Delta$ MAP =  $- 2.75 \pm 2.10$  mm Hg and  $\Delta$ HR =  $- 20.84 \pm 15.14$  bpm). Spectral analysis showed reduced variability in sepsis and after muscimol a further decrease in this variability and also caused a decrease in LF component, after acid quinurenic none of the parameters was modified. After microinjection of LPS in animals with prior microinjection acid quinurenic there is a decrease in variability and in LF and HF components. Sepsis induced increased levels of plasma NO, after muscimol and acid quinurenic, the NO levels were also increased. After microinjection of LPS central and quinurenic acid followed by central LPS the NO demonstrate baseline levels without septicemia. Our results provide evidence that the PVN has an important role in the cardiovascular responses during septicemia.

**Keywords:** Arterial pressure. Muscimol. Heart rate variability. Lipopolysaccharide. Sympathetic nervous system.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Figura esquemática com a localização das suturas de referência para a cirurgia estereotáxica .....24
- Figura 2** - Foto ilustrativa de corte histológico evidenciando a região do PVN e os locais de microinjeção .....28
- Figura 3** - Modelo de distribuição da curva padrão e amostras em microplaca de 96 poços .....29
- Figura 4** - Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a microinjeção de solução salina 0,9% no PVN no grupo controle não submetido à septicemia.....33
- Figura 5** - Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a microinjeção no grupo salina + LPS e no grupo muscimol+ LPS .....35
- Figura 6** - Variação máxima aos 40 minutos da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) (A) e aos 60 minutos da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) (B), após a microinjeção de salina e muscimol .....36
- Figura 7** - Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B) após a microinjeção no grupo salina + LPS e no grupo ácido quinurênico + LPS.....37
- Figura 8** - Variação máxima aos 5 minutos da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) (A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) (B), após a microinjeção de salina e ácido quinurênico .....38

<b>Figura 9</b> - Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a microinjeção de LPS no grupo LPS no PVN e no grupo ácido quinurênico+ LPS no PVN.....	40
<b>Figura 11</b> - Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) (A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) (B), 10 minutos após a microinjeção de LPS no grupo LC e no grupo LCAQ .....	41
<b>Figura 11</b> - Valores médios dos componentes do parâmetro PAS nos animais do grupo SS antes e após serem submetidos à septicemia por LPS .....	44
<b>Figura 12</b> - Valores médios dos componentes do parâmetro IP nos animais do grupo SS antes e após serem submetidos à septicemia por LPS.....	45
<b>Figura 13</b> - Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo SS comparado com os do grupo SM.....	48
<b>Figura 14</b> - Valores médios dos componentes dos parâmetros IP nos animais do grupo SS comparado com os do grupo SM .....	49
<b>Figura 15</b> - Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo SS comparado com os do grupo SAQ.....	51
<b>Figura 16</b> - Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo SS comparado com os do grupo SAQ .....	52
<b>Figura 17</b> - Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo LC comparado com os do grupo LCAQ.....	54
<b>Figura 18</b> - Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo LC comparado com os do grupo LCAQ .....	55
<b>Figura 19</b> - Concentrações plasmáticas de NO nos vários grupos nas condições pós-droga .....	56

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> -Valores médios para os componentes da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) comparando-se o grupo SS antes e depois da indução da endotoxemia .....	42
<b>Tabela 2</b> -Valores médios para os componentes da análise espectral do intervalo de pulso (IP) comparando-se o grupo SS antes e depois da indução da endotoxemia .....	43
<b>Tabela 3</b> -Valores médios para os componentes da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) comparando-se o grupo SS com o grupo SM após LPS.....	47
<b>Tabela 4</b> -Valores médios para os componentes da análise espectral do intervalo de pulso (IP) comparando-se o grupo SS com o grupo SM após LPS .....	47
<b>Tabela 5</b> -Valores médios para os componentes da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) comparando-se o grupo SS com o grupo SAQ após LPS .....	50
<b>Tabela 6</b> -Valores médios para os componentes da análise espectral do intervalo de pulso (IP) comparando-se o grupo SS com o grupo SAQ após LPS .....	50
<b>Tabela 7</b> -Valores médios para os componentes da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) comparando-se o grupo LC com o grupo LCAQ após LPS .....	53
<b>Tabela 8</b> -Médios para os componentes da análise espectral do intervalo de pulso (IP) comparando-se o grupo LC com o grupo LCAQ após LPS.....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACTH</b>	Hormônio Adrenocorticotrófico
<b>ANRS</b>	Atividade no Nervo Simpático Renal
<b>AVP</b>	Vasopressina
<b>CCB</b>	Centro de Ciências Biológicas
<b>CIF</b>	Departamento de Ciências Fisiológicas
<b>CLP</b>	Ligamento do Ceco e Punctura
<b>CRF/ CRH</b>	Fator/Hormônio Liberador de Corticotrofina
<b>FC</b>	Frequência Cardíaca
<b>GABA</b>	Ácido Amino $\gamma$ - butirico
<b>HF</b>	Alta Frequência
<b>HPA</b>	Eixo Hipotálamo- Hipófise- Adrenal
<b>HRVS</b>	Sinal de Variabilidade de Frequência Cardíaca
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$
<b>iNOS</b>	Óxido Nítrico Sintase Induzível
<b>LBP</b>	Proteína Ligadora de Lipopolissacarídeo
<b>LF</b>	Baixa Frequência
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MAPK</b>	Proteínas Quinases Mitógeno-ativadas
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	Fator Nuclear Kb
<b>NO</b>	Óxido Nitrico
<b>NTS</b>	Núcleo do Trato Solitário
<b>OVLТ</b>	<i>Organum Vasculosum da Lamina Terminalis</i>
<b>PA</b>	Pressão Arterial
<b>PAM</b>	Pressão Arterial Média
<b>PAP</b>	Pressão Arterial Pulsátil

<b>PAS</b>	Presão Arterial Sistólica
<b>PI</b>	Intervalo de Pulso
<b>PVN</b>	Núcleo Paraventricular
<b>RVLM</b>	Bulbo Ventrolateral Rostral
<b>SCN</b>	Núcleo Supraquiasmático
<b>SON</b>	Núcleo Supraóptico
<b>TLR-4/TLR-2</b>	Receptor semelhante a Toll 4/2
<b>TNF- <math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
<b>UEL</b>	Universidade Estadual de Londrina
<b>UTI</b>	Unidades de Terapia Intensiva
<b>VLF</b>	Muito Baixa Frequência

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	22
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	22
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	22
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
3.1	ANIMAIS.....	23
3.2	IMPLANTE DE CÂNULAS-GUIA DIRECIONADAS AO PVN .....	23
3.3	CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS .....	24
3.4	REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA .....	25
3.5	PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS .....	25
3.5.1	Grupos Experimentais .....	25
3.5.2	Análise da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca .....	26
3.6	HISTOLOGIA.....	28
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO PLASMA .....	28
3.8	ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE.....	29
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA RESULTADOS .....	30
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	32
4.1	ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES.....	32
4.1.1	Efeito da Microinjeção de Salina (Grupo Controle).....	32
4.1.2	Efeitos da Microinjeção de Salina, Muscimol e Ác. Quinurênico em Ratos Submetidos à Endotoxemia.....	34
4.1.3	Efeitos da Microinjeção de Ips no Pvn e da Microinjeção Prévia com Ác. Quinurênico .....	39
4.2	ANÁLISE DA MODULAÇÃO PELO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO .....	41
4.2.1	Efeitos da Microinjeção de Solução Salina em Animais Submetidos à Endotoxemia.....	42
4.2.2	Efeitos da Microinjeção de Muscimol e Ácido Quinurênico em Ratos Submetidos à Endotoxemia.....	46

4.2.3	Efeitos da Microinjeção Ácido Quinurênico em Animais que Foram Submetidos à Microinjeção de Lps no Pvn.....	53
4.3	ANÁLISE INDIRETA DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO PLASMA .....	56
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>65</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>66</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A endotoxemia ainda constitui uma das principais causas de morte em unidades de terapia intensiva, sendo que os principais agentes etiológicos são bactérias gram-negativas seguidas pelas gram-positivas, e em menor escala os fungos (LEE *et al.*, 2002). É caracterizada por hipotensão sistêmica, hiporeatividade aos vasoconstritores, subseqüentes anormalidades na função e perfusão tecidual, seguida de falência múltipla de órgãos (BONE *et al.*, 1997).

Infecções por bactérias gram-negativas são associadas com manifestações inflamatórias e imunológicas incluindo febre, lesões e disfunção neurológica. O lipopolissacarídeo (LPS) é o principal componente de parede celular responsável por dano tecidual e outras mudanças fisiopatológicas associadas com infecções por gram-negativas (HOLST *et al.*, 1996; MORRISON & RYAN, 1987; OLSON *et al.*; 1995). A endotoxina pode ativar diretamente os macrófagos, as células endoteliais e o sistema complemento, levando a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios: fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF), óxido nítrico (NO), complementos e eicosanóides (SHAPIRO *et al.*, 1993; WANG *et al.*, 1999).

A sequência de alterações cardiovasculares durante a endotoxemia por LPS é complexa, mas pode ser vista como uma vasodilatação generalizada, o que leva ao colapso circulatório devido a dois fatores: aumento na produção de NO e sensibilidade diminuída aos agentes vasoconstritores endógenos (NAVA *et al.*, 1992; MAYEUX, 1997; WOLKOW, 1998.).

O NO é um dos principais mediadores inflamatórios liberados durante a endotoxemia. O papel deste já está bem estabelecido na regulação cardiovascular, no entanto o NO parece ter muitos outros papéis importantes em funções biológicas (MONCADA *et al.*, 2006). Ele é sintetizado enzimaticamente a partir do aminoácido L-arginina, por um grupo de hemoproteínas conhecidas por NO sintases (NOS). Até o presente momento foram identificadas três isoformas da NOS: neuronal NOS (nNOS ou NOS I) presente no cérebro, medula espinhal, gânglios simpáticos, nervos periféricos, células epiteliais do estômago, útero, pulmão e músculo esquelético; endotelial NOS (eNOS ou NOS III) encontrada em células endoteliais, músculo liso vascular e músculo cardíaco, sendo estas duas isoformas expressas constitutivamente dentro de condições fisiológicas, e uma terceira

isoforma induzível da NOS (iNOS ou NOS II), cujas fontes podem ser células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, neutrófilos, células do músculo liso vascular e fibroblastos (MONCADA, 1993; RANDEMSKI *et al.*, 1990; MAYER & ANDREW, 1998; COLASANTI & SUZUKI, 2000).

O NO exerce um papel importante na regulação cardiovascular, tanto no âmbito periférico como central (MONCADA & HIGGS, 2006; SHAPOVAL *et al.*, 1991; MARTINS-PINGE *et al.*, 1997; 1999). O papel do NO no bulbo rostro-ventrolateral (RVLM; principal eferência dos neurônios pré-ganglionares simpáticos) foi avaliado em condições de endotoxemia (CHANG *et al.*, 2001), onde foi verificado que existe uma prevalência da ativação da enzima iNOS sobre a nNOS, e que isso é crucial para determinar a redução ou mesmo a perda dos componentes vasomotores da pressão arterial, características dessa situação.

Segundo estudos de Wright e colaboradores (1990), Hailman (1996) e Vasselon (1999), o LPS quando injetado sistemicamente forma um complexo com o CD14 solúvel (sCD14) e com a proteína ligante de LPS (LBP) no sangue. Quando o complexo LPS-sCD14-LPB chega ao contato das células nas quais a membrana expressa CD14 (mCD14), o LPS é transferido da sCD14 para a mCD14 e o LPS monomérico se liga a membrana celular. Então uma mudança conformacional na mCD14 transloca o LPS para dentro da célula.

Estudos anteriores mostraram que injeções periféricas de LPS ativam o fator nuclear kappa B (NFκB) que induz a transcrição de genes pró-inflamatórios no cérebro, iNOS e hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (BAUMANN & GAULDIE, 1994; QUAN *et al.*, 1998; QUAN *et al.*, 2002; RAMACHANDRA *et al.*, 1992; SCHMAHL *et al.*, 1980; TURRIN *et al.*, 2002). Porém os mecanismos pelos quais o LPS periférico afeta o cérebro não são totalmente entendidos, Singh e Jiang (2004) propuseram duas hipóteses, que tanto o LPS atravessa a barreira hemato-encefálica e causa efeitos diretos e deletérios ou não atravessa mas se liga aos receptores toll like 4 ou toll like 2 (TLR-4/TLR-2) presente na membrana das células endoteliais do cérebro que através da liberação de IL-1β e/ou NO, causa efeitos centrais. Dessa forma, o sistema nervoso central (SNC) desempenha papel importante nas respostas adaptativas de compensação ao desafio imunológico por LPS.

Os TLR-4, TLR-2 e mCD14 são locais chaves de ligação ao LPS nas membranas celulares (ULEVITCH & TOBIAS, 1995). Uma propriedade única dos

locais de ligação ao LPS, é que, a ligação do LPS a esses locais induz a sua expressão e posteriormente aumenta a ligação ao LPS (HAILMAN *et al.*, 1996; LEHNARDT *et al.*; 2002). A sinalização dada pelo complexo CD14/TLR-4 ativa o NF $\kappa$ B através de uma cascata de fosforilação dada pela família de proteínas quinases mitógeno-ativadas (MAPK). A MAPK especialmente a p38 desempenha papel crucial na liberação de citocinas e apoptose (ARBABI *et al.*, 2002). Assim, através de experimentos, Singh e Jiang (2004) mostraram que são as células endoteliais cerebrais, e não o PVN hipotalâmico que contém a forma induzível dos locais de ligação de LPS.

A literatura tem mostrado que durante a endotoxemia, certas áreas do SNC 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 PVN, que estão envolvidos na liberação de vasopressina e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), os quais estão aumentados nas fases iniciais da endotoxemia (RIVIER, 2003; CORRÊA *et al.*, 2007). Além disso, existem evidências de que a neurotransmissão por aminoácidos no PVN, principalmente ácido amino- $\gamma$ -butírico (GABA) e glutamato (Glu), participe das vias envolvidas na endotoxemia (WAN *et al.*, 1994).

A ativação simpática prejudicada durante a endotoxemia parece desempenhar um papel bastante importante no desenvolvimento do choque endotóxico. Annane e colaboradores (1999) tem demonstrado que o choque endotóxico 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.

O PVN é conhecido por ser um local de integração para respostas autonômicas e neuroendócrinas (SWANSON & SAWCHENKO, 1983). Além do papel bem estabelecido do PVN no eixo hipotálamo-hipófise, o PVN também é conhecido por seu papel no controle homeostático da pressão arterial e atividade simpática (COOTE, 1995; COOTE *et al.*, 1998; BADOER, 2001; COOTE, 2005). A informação barorreceptora atinge o PVN via o núcleo do trato solitário (NTS) e outras regiões do tronco cerebral incluindo o bulbo ventrolateral (VLM). Neurônios do PVN por sua vez, se projetam para muitos outros sítios, incluindo os próprios NTS e VLM

(SWANSON & SAWCHENKO, 1983); regiões fundamentais para o controle tônico e fásico da função cardiovascular (DAMPNEY, 1994). No PVN vários neurotransmissores participam da rede de informações processadas por este núcleo e entre eles os aminoácidos GABA e Glu e o NO tem papel relevante na função cardiovascular (MARTINS-PINGE *et al.*, 2004, 2005).

Em humanos o PVN é um grupo nuclear largo e achatado, orientado paralelamente ao terceiro ventrículo na parte superior do hipotálamo, próximo ao sulco hipotalâmico. Embora esteja principalmente na zona medial, partes do PVN estendem-se até a zona periventricular (BURT, 1995). É anatomicamente dividido em três divisões magnocelulares e cinco parvocelulares (SWANSON & KUYPERS, 1980; SWANSON & SAWCHENKO, 1983). As divisões magnocelulares são coletivamente conhecidas como subnúcleos magnocelulares anterior, posterior e medial. Neurônios dessas regiões se projetam para a neurohipófise e estão envolvidos na produção de hormônios da pituitária posterior (SWANSON & SAWCHENKO, 1983).

As divisões parvocelulares compreendem os subnúcleos periventriculares dorsal, lateral e medial e o subnúcleo parvocelular anterior. Essas regiões se projetam aos núcleos autônomos do tronco cerebral e coluna espinhal e são responsáveis pela ativação do sistema nervoso simpático incluindo a regulação cardiovascular (SAWCHENKO & SWANSON, 1982).

A principal característica dos neurônios magnocelulares é a expressão de uma corrente transiente de  $K^+$  (BOURQUE, 1988; TASKER & DUDEK, 1991). Em contraste, os neurônios parvocelulares usualmente não mostram uma corrente transiente de  $K^+$ , mas a maioria gera um potencial de limiar baixo,  $Ca^{2+}$  dependente (TASKER & DUDEK, 1991).

Informações relativas ao estado cardiovascular do organismo chegam ao PVN via NTS. Há neurônios que se projetam para a coluna intermédio-lateral da medula espinhal tóraco-lombar e fazem sinapse com os neurônios motores simpáticos pré-ganglionares presentes lá. De fato, o PVN é uma das cinco áreas no cérebro que se projetam para a coluna intermédio-lateral, e por isso foi chamado de núcleo pré-motor (DAMPNEY, 1994).

Outra projeção importante do PVN é para o RVLM. O RVLM também é um núcleo pré-motor e tem sido foco de intensa pesquisa. Esta é uma área muito importante para a manutenção tônica da atividade nervosa simpática. Estudos

neuroanatômicos demonstraram que aproximadamente 88% dos neurônios marcados no PVN se projetam para o RVLM ipsilateral, indicando que essa projeção é quase totalmente unilateral (BADOER, 2001). Os neurônios que se projetam para o RVLM estão localizados em toda a parte no PVN, com sua máxima concentração localizada aproximadamente no meio dos níveis rostral e caudal do PVN.

O estudo de BADOER (2001) também forneceu a primeira evidência que existem neurônios no PVN que enviam colaterais tanto para a coluna espinal como para o RVLM. Estes neurônios estavam localizados totalmente do lado ipsilateral aos locais de injeção e eram distribuídos através de quase dois terços da extensão rostro-caudal do PVN.

Estas observações indicam que existem neurônios no PVN que podem: a) diretamente influenciar a atividade do nervo simpático via conexões diretas com a coluna intermédia lateral celular da coluna espinal tóraco-lombar; b) indiretamente influenciar a atividade do nervo simpático via suas conexões com o RVLM, o qual inerva a coluna intermédia-lateral, e c) influenciar tanto direta como indiretamente a atividade do nervo simpático via conexões colaterais com ambos, coluna espinal e RVLM (BADOER, 2001).

Neurônios no PVN são ativos continuamente e sujeitos a inibição provenientes de vias gabaérgicas e nitrérgicas (ZHANG & PATEL, 1998). A estimulação do PVN pode produzir aumento ou queda na pressão arterial e na atividade do nervo renal simpático (ANSR) (ZHANG & PATEL, 1998; YANG & COOTE, 1998, 1999).

Segundo BOUDABA (1996) há evidência, através de estudos eletrofisiológicos, de projeções inibitórias para os neurônios magnocelulares e parvocelulares do PVN de uma área dorsal ao quiasma óptico que parece incluir o núcleo supraquiasmático (SCN).

O GABA é um dos mais importantes neurotransmissores no sistema nervoso central, sendo o aminoácido inibitório de maior abrangência. Um estudo eletrofisiológico demonstrou que a grande maioria dos impulsos sinápticos locais para os neurônios do PVN são gabaérgicos (TASKER & DUDEK, 1993), perfazendo aproximadamente 50% da inervação nos neurônios do PVN (DECAVEL & VAN DEN POL, 1990), e que uma significativa proporção dessa inervação gabaérgica deriva de regiões intrínsecas do hipotálamo (ROLAND & SAWCHENKO, 1993).

A diminuição na função hipotalâmica do GABA pode contribuir para a hipertensão, embora o hipotálamo contenha uma concentração relativamente alta de GABA em animais normotensos, a sua quantidade é reduzida em modelos de hipertensão em animais (HAMBLEY *et al.*, 1984).

Atualmente, sabe-se que a neurotransmissão excitatória no sistema nervoso dos mamíferos é predominantemente mediada por Glu (FREMRAU *et al.*, 2004; WATKINS e JANE, 2006). Esse aminoácido constitui o neurotransmissor usado na maioria das sinapses no cérebro, sozinho ou em conjunto com neuropeptídeos e outros compostos neuroativos com os quais é co-localizado (BROMAN, 2000). Além disso, Glu é criticamente envolvido em processos de neuroplasticidade como a potenciação e depressão de longo prazo (MALENKA e NICOLL, 1999; DERKACH *et al.*, 2007).

O Glu medeia suas ações no SNC dos mamíferos via ativação de uma grande variedade de receptores ionotrópicos (ligantes dos canais iônicos de cátions) e metabotrópicos (acoplados a proteínas G) (KEW & KEMP, 2005).

Os receptores ionotrópicos do Glu são canais ligantes de íons que medeiam a transmissão rápida da informação na maioria das sinapses cerebrais (WOLLMUTH e SOBOLEVSKY, 2004). Os receptores ionotrópicos de Glu correspondem a três famílias principais denominadas AMPA, NMDA e kainato (KEW e KEMP, 2005 e MAYER, 2005).

A análise espectral da variabilidade da frequência cardíaca e as flutuações da pressão arterial permitem uma análise indireta, mas não invasiva do controle autonômico cardiovascular em uma vasta variedade de perturbações fisiológicas (AKSELROD *et al.*, 1981; PAGANI *et al.*, 1986; MONTANO *et al.*, 1994). Em especial, a endotoxemia, está associada com uma significativa redução da variabilidade da frequência cardíaca (ANNANE *et al.*, 1999; ELLENBY *et al.*, 2001; LAKE *et al.*, 2002). Em neonatos com endotoxemia foi observada uma reduzida variabilidade da frequência cardíaca antes do aparecimento dos sintomas clínicos da infecção (LAKE *et al.*, 2002), tornando-se esta ferramenta de valor prognóstico em pacientes hospitalizados. No entanto, a razão para essa diminuída variabilidade na endotoxemia não está esclarecida.

Nas últimas duas décadas, tem sido demonstrado consistentemente que as variações batida-a-batida da frequência cardíaca contém informação sobre a atividade dos efetores autônomos controlando o débito cardíaco (SAUL, 1990). O

interesse na análise espectral é focado na separação quantitativa de mecanismos fisiologicamente relevantes de um complexo débito cardíaco, as variações batida-a-batida na frequência cardíaca instantânea ou o que tem sido mais apropriadamente chamado de sinal de variabilidade de frequência cardíaca (HRVS).

O espectro de força do HRVS em mamíferos usualmente revela três componentes espectrais. Tendo o trabalho pioneiro de Akserlrod e colaboradores (1981) em cães anestesiados como exemplo, esses componentes são: um componente de alta frequência (HF), um componente de baixa frequência (LF) e um com frequência muito baixa (VLF).

O componente HF é causado por uma inibição do tônus vagal durante a inspiração. A inibição inspiratória é promovida no centro cardiovascular e explica porque a frequência cardíaca flutua com a frequência respiratória. Em adição, os reflexos periféricos provenientes dos receptores de estiramento torácicos também contribuem para essa chamada arritmia sinusal respiratória (ASR). A ASR é claramente abolida pela atropina ou vagotomia e o poder de HF tem sido usado com índice da condução vagal (ALTMIRAS, 1999).

O componente LF do HRVS é usualmente caracterizado por um padrão oscilatório com um período de 10 segundos. Esse ritmo é originado da própria oscilação na parte vasomotora da alça de barorreflexo como resultado de uma retroalimentação negativa (MADWED *et al.*, 1989) e é comumente associado com as flutuações sincronizadas na PA, as chamadas ondas de Mayer. Antagonistas muscarínicos e  $\beta$ -adrenoceptores são conhecidos por mudar a área do pico de LF. Em cães o componente LF parece ser principalmente mediado pelo sistema nervoso parassimpático (AKSELROD *et al.*, 1985) enquanto em ratos a influência simpática conta com 80% da área de LF.

O componente VLF leva em conta todas as outras mudanças na frequência cardíaca, incluindo aqueles associados com fatores termoreguladores, humorais e locais (ALTMIRAS, 1999).

Diante do exposto os objetivos desse trabalho foram determinados considerando que: o LPS periférico não atravessa a barreira hemato-encefálica, mas se acumula dentro das células endoteliais cerebrais (SINGH & JIANG, 2004); a ligação do LPS com seu receptor pode desencadear uma série de eventos sinalizadores levando a liberação de NO e IL-1 $\beta$  nas células endoteliais (ARBABI *et al.*, 2002); o IL-1 $\beta$  e/ou NO pode desempenhar um importante papel na transferência

de informação da barreira hemato-encefálica para o hipotálamo in vivo (SINGH & JIANG ,2004); o LPS induz a expressão e liberação de IL-1 $\beta$  e esta IL-1 $\beta$  ativa o PVN hipotalâmico (GLUE *et al.*,2002).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar a participação do PVN nas respostas cardiovasculares e autonômas periféricas e produção de NO após a indução de endotoxemia por administração de LPS, assim como identificar os efeitos do LPS aplicado diretamente nos neurônios do PVN em animais acordados.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a participação dos aminoácidos GABA e Glu na região do PVN através da microinjeção local de agonista dos receptores GABA A (muscimol) e antagonista dos receptores ionotrópicos do Glu (ácido quinurênico) sobre a PA e FC.
- Identificar os efeitos sobre as respostas cardiovasculares do LPS aplicado diretamente nos neurônios do PVN em animais acordados.
- Analisar o balanço autonômico na variabilidade da frequência cardíaca pela análise espectral após indução de endotoxemia pela administração endovenosa de LPS, assim como, após microinjeção de LPS diretamente nos neurônios do PVN.
- Quantificar os níveis plasmáticos de NO em condições de normalidade e endotoxemia na presença de agonista gabaérgico e antagonista glutamatérgico, assim como, após microinjeção de LPS diretamente nos neurônios do PVN.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

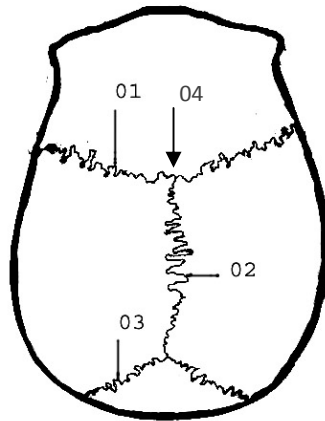
Este trabalho foi realizado no Departamento de Ciências Fisiológicas (CIF) do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Estadual de Londrina (UEL) e todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade (Processo número 02/09). Foram utilizados 35 ratos Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais tiveram o peso padronizado entre 250 a 280 gramas, foram mantidos em gaiolas coletivas (máximo 5 animais por gaiola), à temperatura constante de 22°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas “ad libitum”.

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

Os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e submetidos à cirurgia estereotáxica, para tanto, foram 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 as suturas cranianas. A seguir, foram produzidos dois forâmes bilaterais e eqüidistantes da linha média, para o implante das cânulas-guia, cujas coordenadas estereotáxicas (PAXINOS & WATSON, 1986) utilizaram como referência o 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 um 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 introduzido nas mesmas um oclusor. Em seguida, o animal foi retirado do aparelho estereotáxico

e como medida profilática, após a cirurgia cerebral administrou-se uma dose de penicilina por via intramuscular. Em seguida, o animal retornou ao biotério e lá permaneceu por três dias em gaiola individual, para recuperação da cirurgia.

**Figura 1** Figura Esquemática com a localização das suturas de referência para a cirurgia estereotáxica. 01 – sutura coronal, 02 – sutura sagital, 03 – sutura lambdóide, 04 - bregma.



### 3.3 CANULAÇÃO DA ARTÉRIA E VEIA FEMORAIS

Após os 3 dias de recuperação, os animais foram submetidos à nova cirurgia sob anestesia de pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) para implantação de catéteres na artéria e veia femorais. O catéter foi constituído por segmento de polietileno PE-10 (4-5 cm) soldado a segmento de polietileno PE-50 (12-13 cm), previamente preenchido com solução salina 0,9% e obstruído com um oclisor. Uma incisão de 1,0 cm foi feita 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 nela colocada, obstruindo temporariamente o fluxo arterial. Em seguida, um pequeno corte foi feito na artéria femoral e o catéter introduzido e cuidadosamente amarrado a artéria. Após esse procedimento, o catéter foi exteriorizado na região dorsal do animal através de um trocater por via subcutânea e fixada à pele por sutura cirúrgica, e por fim, o catéter foi preenchido com anticoagulante (15 U/mL de heparina em solução salina) e obstruído novamente com oclisor. Para a administração endovenosa de drogas, um catéter similar foi introduzido na veia femoral.

Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório. O catéter arterial foi utilizado para registro da PA e o catéter venoso para administração de drogas. Após 24 horas da cateterização, os animais foram submetidos ao registro basal da PA, seguido do protocolo experimental. Os animais foram mantidos em caixas individuais durante todo o período pós-operatório e de registro da pressão arterial.


### 3.4 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA


O registro direto da PA e FC foi realizado através de um catéter previamente implantado na artéria femoral. O registro foi feito com os animais acordados e com livre movimentação. O catéter arterial do animal foi acoplado a um transdutor de pressão (Powerlab modelo MLT0380) o qual foi conectado a um sistema de registro computadorizado (Powerlab/ ADInstruments). O sinal de FC é gerado a partir do sinal de PA pelo software. Durante o período de registro os animais foram mantidos dentro de caixas individuais em ambiente silencioso.

### 3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.5.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais, de acordo com o esquema abaixo:

Microinjeção PVN + LPS intravenoso (GRUPO A)	 <ul style="list-style-type: none"> <li data-bbox="858 1637 1235 1675">1- Salina PVN+ LPS (SS)</li> <li data-bbox="858 1771 1289 1809">2- Muscimol PVN+ LPS (SM)</li> <li data-bbox="858 1906 1410 1944">3- Ác. Quinurênico PVN + LPS (SAQ)</li> </ul>
---	---

Microinjeção PVN (GRUPO B)  (LCAQ)	 <ul style="list-style-type: none"> <li>1- Salina PVN</li> <li>2- LPS PVN (LC)</li> <li>3- Ác. Quinurênico PVN + LPS PVN</li> </ul>
---	--

### 3.5.2 Análise da Pressão Arterial e Frequência Cardíaca

No dia do experimento o animal foi mantido em sua gaiola moradia, em ambiente silencioso e desprovido de estímulos estressantes. O registro basal foi obtido por 30 minutos.

#### Grupo A

Após o registro basal, os animais do GRUPO A receberam microinjeções bilaterais no PVN das seguintes drogas: solução salina (NaCl 0,9%), muscimol (15 mM) ou ácido quinurênico (40 mM) no volume de 100 nL . Após 10 minutos de registro, os animais receberam administração endovenosa (*in bolus*) de LPS de *Escherichia coli* sorotipo 026: B6 (5 mg/kg). A avaliação cardiovascular foi então registrada por 2 horas. Após esse período os animais foram anestesiados com éter etílico para a retirada de sangue por punção cardíaca, e em seguida foram então eutanasiados com sobredose de anestésico. Os sítios da microinjeção foram corados com azul de Evans 1% (100 nL), e o cérebro foi retirado e conservado em formalina 10%.

#### Grupo B

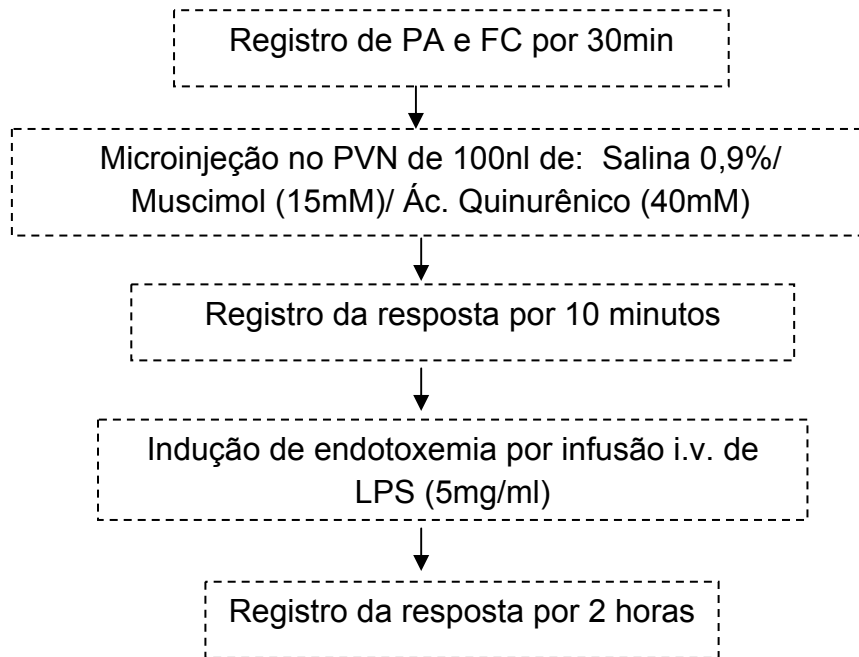
Após o registro basal os animais receberam microinjeções bilaterais no PVN das seguintes drogas: solução salina (NaCl 0,9%), LPS(5 mg/mL), ou ácido quinurênico (40 mM) no volume de 100 nL. No grupo que recebeu ácido quinurênico após 10 minutos foi realizada a microinjeção bilateral de LPS . A avaliação cardiovascular foi então registrada por 1 hora.

Após esse período os animais foram anestesiados com éter etílico para a retirada de sangue por punção cardíaca. Os animais foram então

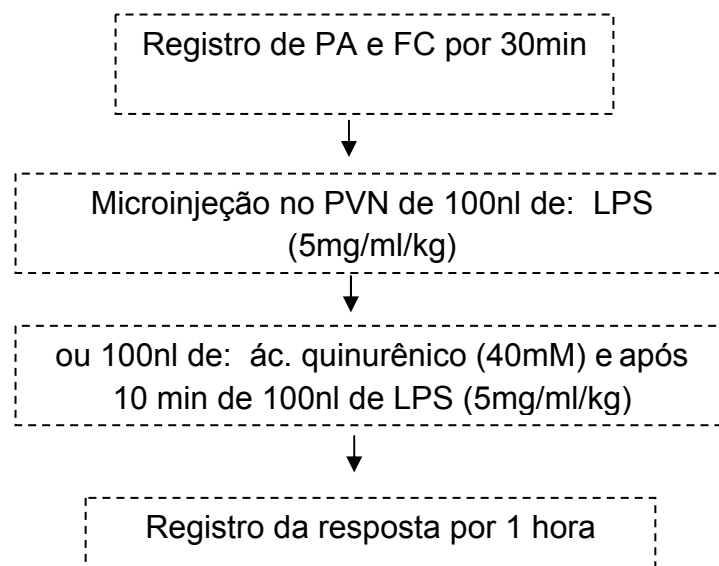
eutanasiados com sobredose de anestésico. Tiveram o sítio da microinjeção corado com azul de Evans 1% (100 nL), e o cérebro foi retirado e conservado em formalina 10%.

Abaixo dois esquemas resumindo os protocolos experimentais:

#### GRUPO A



#### GRUPO B

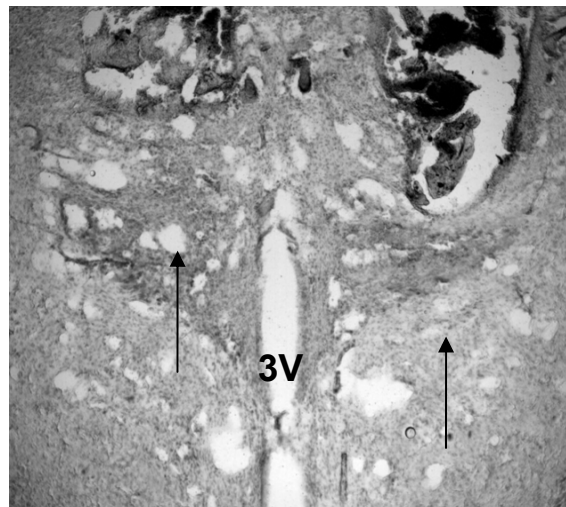


### 3.6 HISTOLOGIA

Os animais foram eutanasiados ao final do protocolo experimental e o local da microinjeção marcado com corante azul de Evans (100nL). Os cérebros foram retirados e armazenados em formalina 10%. Após foram incluídos em parafina e seccionados em micrótomo em cortes de 10  $\mu\text{m}$  para a região do PVN.

Os cortes obtidos foram posicionados e fixados em lâminas de vidro, corados com coloração de cresil – violeta e cobertos com lamínula de vidro. Posteriormente foi feita a visualização ao microscópio óptico para confirmação do local da microinjeção. . Somente os animais que tiveram os sítios marcados na área do PVN foram considerados como animais experimentais.

**Figura 2** – Foto ilustrativa de corte histológico evidenciando a região do PVN e os locais de microinjeção. Coloração cresil-violeta. Corte na espessura de 10  $\mu\text{m}$ . As setas indicam os locais de microinjeção.



### 3.7 QUANTIFICAÇÃO DE NO NO PLASMA

A estimativa da concentração de NO nas amostras foi realizada pela técnica descrita por Navarro-González e colaboradores (1998) adaptada. O método baseia-se na redução de nitrato a nitrito mediada por reações de óxido-redução ocorridas entre o nitrato presente na amostra e o sistema cádmio-cobre dos reagentes, com posterior diazotação e detecção colorimétrica do azocomposto formado pela adição do reagente de Griess a 550 nm (GRIESS, 1879).



(PAP), desta forma determinando batimento a batimento os valores das pressões sistólicas e diastólicas. Séries de intervalos de pulso (PI) batimento a batimento do sinal da PAP foram também gerados pela mensuração do espaço de tempo entre ondas sistólicas adjacentes. De um período de registro basal de 60 minutos, as séries temporais de PI e PA sistólica (SAP) foram divididas em segmentos contíguos de 300 batimentos, sobrepostos pela metade.

Após o cálculo do valor médio e variância para cada segmento, os mesmos foram submetidos a uma análise espectral baseado em um modelo autoregressivo anteriormente descrito (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996; MALLIANI *et al.*, 1991).

Em resumo, um modelamento dos componentes oscilatórios presentes em segmentos estacionários das séries temporais batimento a batimento da SAP e PI foram calculados baseados no recurso de Levinson-Durbin com a ordem do modelo escolhida de acordo com o critério de Akaike (MALLIANI *et al.*, 1991). Este procedimento permite uma quantificação automática do centro de frequência e força de cada componente oscilatório presente na série temporal. Os componentes oscilatórios são definidos como tendo muito baixa (VLF: 0.01-0.20 Hz), baixa (LF: 0.20-0.75 Hz) ou alta frequência (HF: 0.75-2.50 Hz). A força dos componentes LF e HF da variabilidade da frequência cardíaca é também expressa em unidades normalizadas obtidas por cálculo da porcentagem da variabilidade de LF e HF com respeito à força total subtraindo-se a força do componente VLF. O procedimento de normalização tem a tendência de minimizar o efeito das mudanças da variância total nos valores absolutos de LF e HF. A proporção entre LF e HF foi calculada para obter o índice de balanço da modulação autonômica para determinar a variabilidade cardíaca (TASK FORCE OF THE EUROPEAN SOCIETY OF CARDIOLOGY AND THE NORTH AMERICAN SOCIETY OF PACING AND ELECTROPHYSIOLOGY, 1996; MALLIANI *et al.*, 1991).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Comparações feitas num mesmo animal foram analisadas pelo teste *t* Student pareado. As comparações entre grupos diferentes foram analisadas pelo teste *t* Student não pareado. As diferenças foram consideradas significantes para um valor de  $p < 0,05$ .

No grupo A as comparações foram feitas nos momentos antes e depois à administração de LPS. No grupo B foram feitas nos momentos antes e depois à microinjeção de LPS.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES

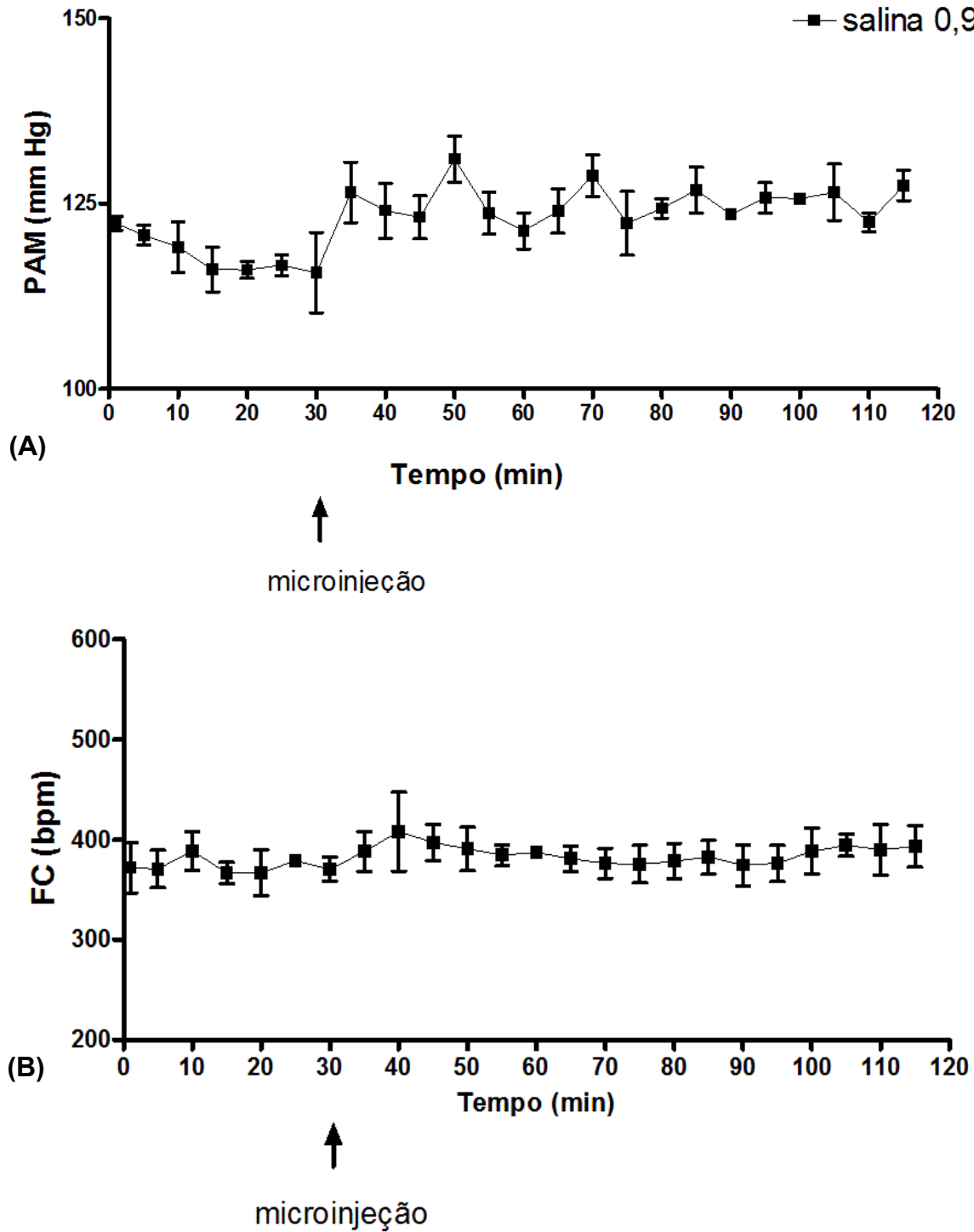
Os animais foram comparados em dois grupos: a) animais que tiveram a endotoxemia induzida por LPS endovenoso e b) animais que tiveram microinjeção de LPS no PVN.

A média dos valores de PAM e FC basal para todos os grupos experimentais eram respectivamente de  $120 \pm 4$  mm Hg e  $379 \pm 13$  bpm , n=35.

#### 4.1.1 Efeito da Microinjeção de Salina no PVN (Grupo Controle)

Foi feito um grupo controle (n=3) onde os animais receberam microinjeção de solução salina 0,9% no PVN para evidenciar que as respostas obtidas pelas microinjeções não foram obtidas por estimulação mecânica do núcleo. Durante todo o registro antes e depois da microinjeção os animais mostraram o mesmo padrão de PA e FC com apenas um leve aumento na FC após a microinjeção. Valores médios antes e depois da microinjeção foram respectivamente de  $118 \pm 3$  mm Hg e  $124 \pm 1$  para a PAM e de  $373 \pm 15$  bpm e  $414 \pm 8$  bpm para FC, como demonstrado na figura 3.

**Figura 4** – Alterações em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B) em valores absolutos, após a microinjeção de solução salina 0,9% no PVN no grupo controle não submetido à endotoxemia (n=3). A seta indica o momento da microinjeção, sendo os 30 minutos anteriores o registro da PA e FC basais.

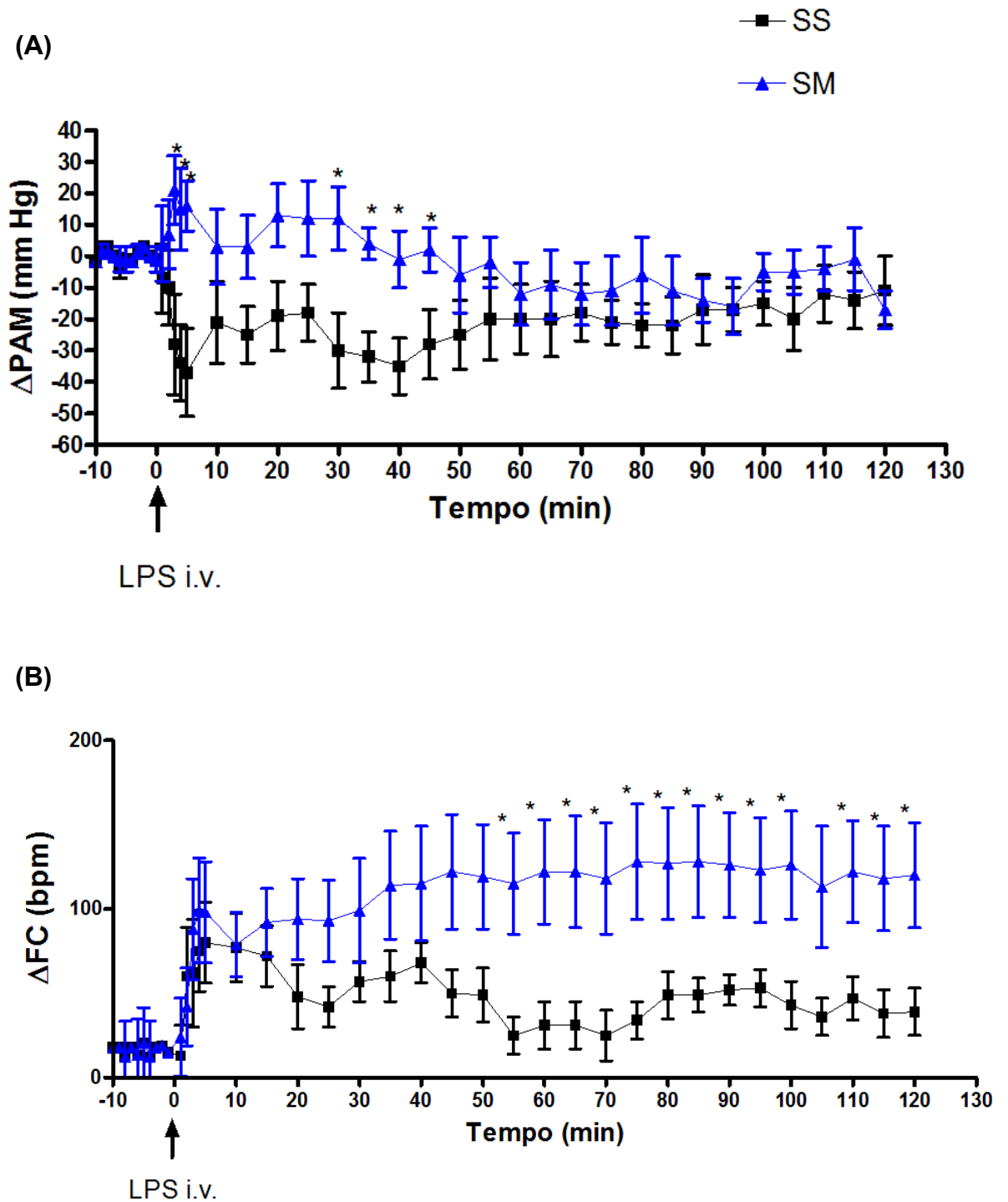


#### 4.1.2 Efeitos da Microinjeção com Salina, Muscimol e Ácido Quinurênico em Ratos Submetidos à Endotoxemia.

Ambos os grupos muscimol + LPS (SM) e ácido quinurênico + LPS (SAQ) foram comparados com o grupo Salina+ LPS (SS). O grupo SS (n=7) mostrou as três fases características da endotoxemia, uma queda inicial da PA nos primeiros 5 minutos, uma segunda fase de recuperação por volta de 25 minutos e uma estabilização da hipotensão após 50 minutos, a FC foi marcada por taquicardia. Já o grupo SM (n=6) que recebeu microinjeção de muscimol 10 minutos antes da indução da endotoxemia, teve uma menor hipotensão, ou seja, a hipotensão foi amenizada e em alguns casos abolida com um pico de resposta aos 40 minutos (SS  $\Delta PAM = -35 \pm 9$  mm Hg vs. SM  $\Delta PAM = -1 \pm 9$  mm Hg), a FC foi marcada por grande taquicardia com pico aos 60 minutos (SS  $\Delta FC = +31 \pm 14$  bpm vs. SM  $\Delta FC = +122 \pm 31$  bpm), como mostrado nas figuras 4 e 5.

O grupo SAQ (n=6) quando comparado com o grupo SS não demonstrou diferença no parâmetro da PA, mas mostrou um aumento na FC com diferenças estatisticamente significativas nos pontos a partir dos 50 minutos, porém sem diferença significativa nos picos de queda de PA (SS  $\Delta PAM = -37 \pm 14$  mm Hg vs. SAQ  $\Delta PAM = -30 \pm 7,28$  mm Hg) e aumento de FC (SS  $\Delta FC = +80 \pm 24$  bpm vs. SAQ  $\Delta FC = +125 \pm 23$  bpm) ambos aos 5 minutos, como mostrado nas figuras 6 e 7.

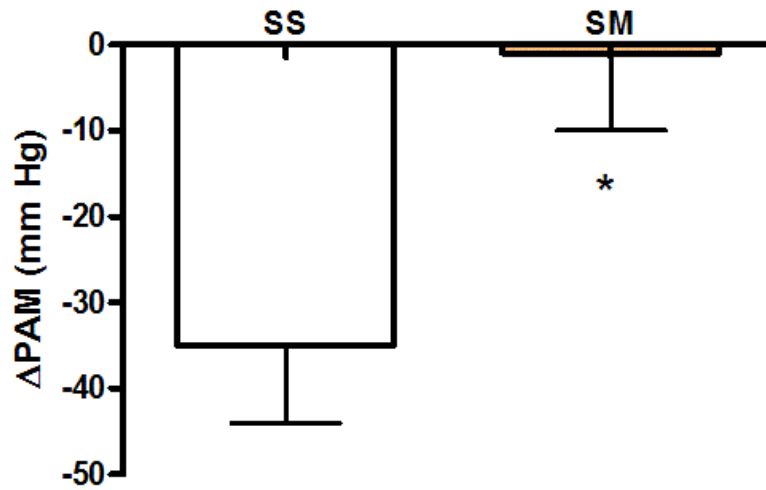
**Figura 5** – Variação em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a indução de endotoxemia por LPS em ambos os grupos. Diferença entre SS e SM. \* $p < 0,05$ .



**Figura 6** – Variação máxima aos 40 minutos da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) (A) e aos 60 minutos da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) (B), no grupo SS (n=7) e no grupo SM (n=6) após a indução de endotoxemia por LPS. \* Diferença entre SS e SM,  $p < 0,05$ .

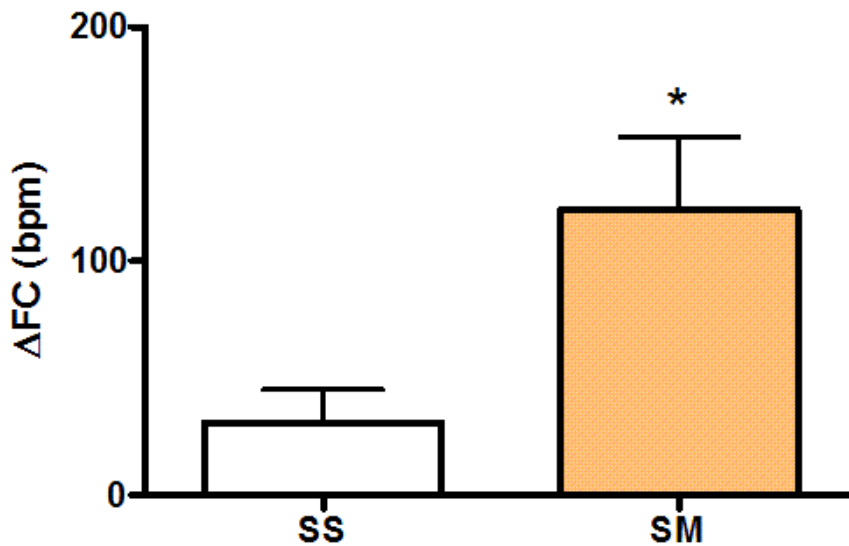
(A)

Pico aos 40 minutos

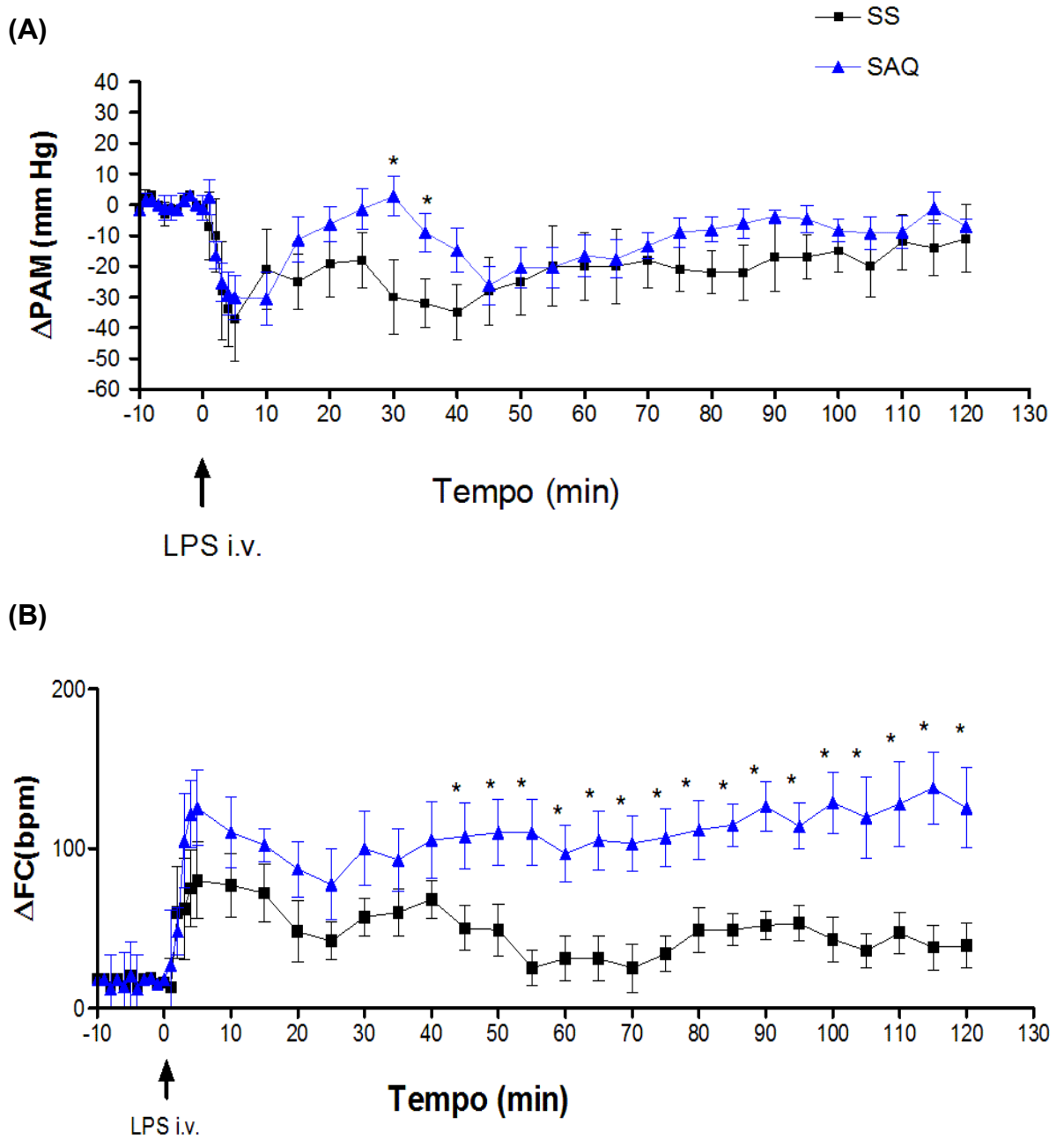


(B)

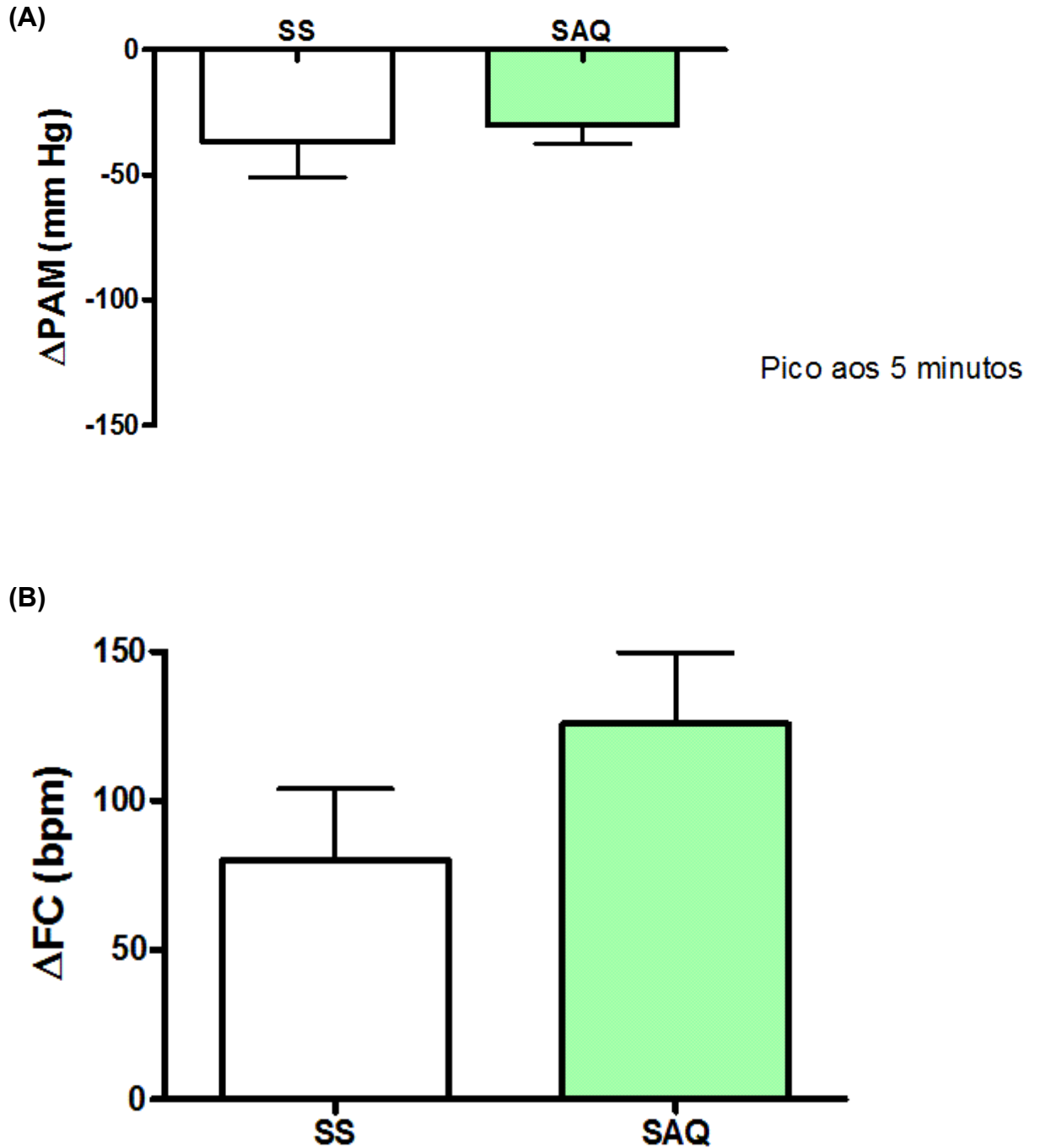
Pico aos 60 minutos



**Figura 7** – Variação em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B) nos grupos SS (n=7) e SAQ (n=6) após a indução de endotoxemia por LPS. Diferença entre SS e SAQ. \* $p < 0,05$ .



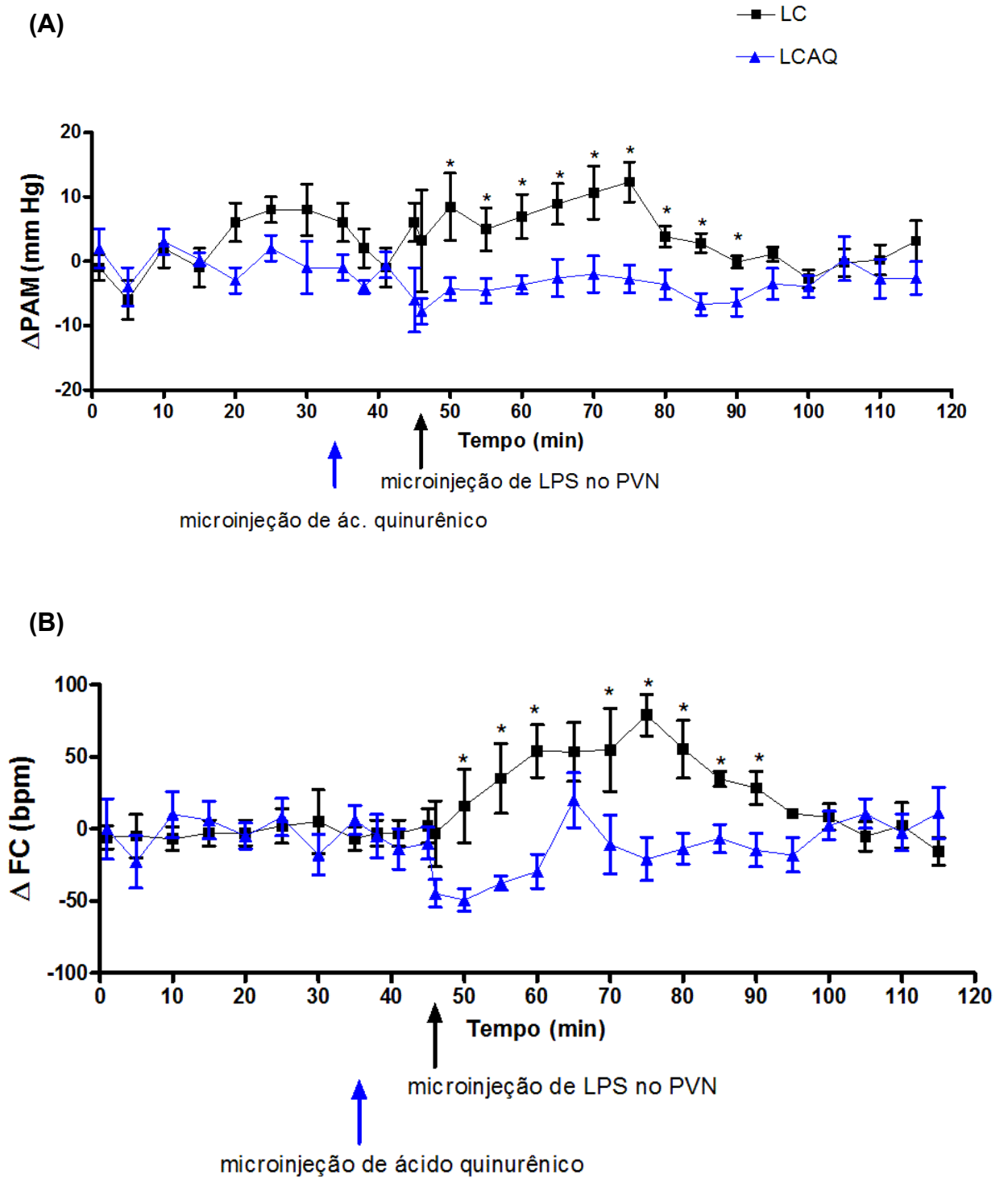
**Figura 8** – Variação máxima aos 5 minutos da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) (A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) (B), nos grupos SS (n=7) e SAQ (n=6) após a indução de endotoxemia por LPS.



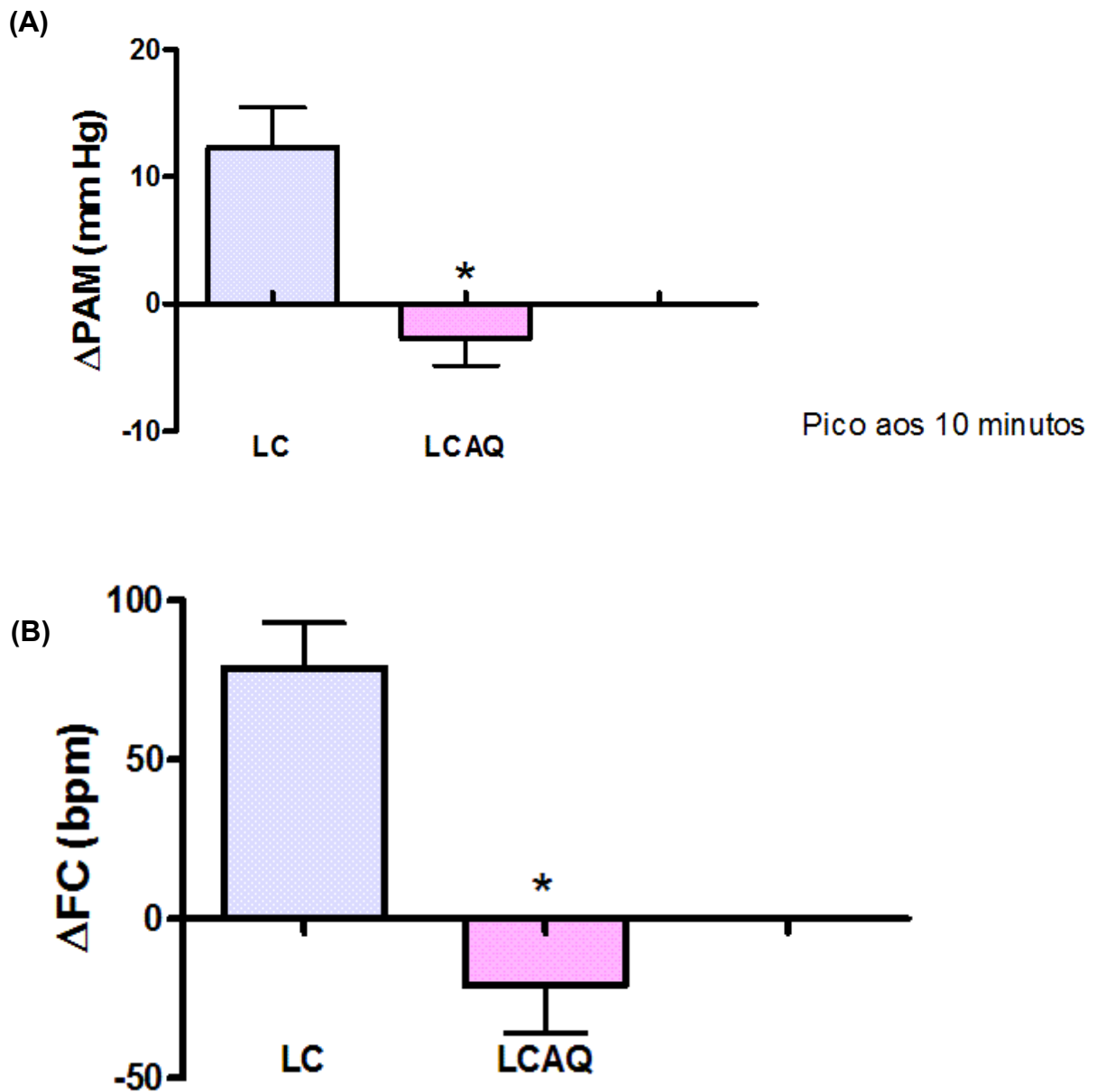
#### 4.1.3 Efeitos da Microinjeção de LPS no PVN e da Microinjeção Prévia com Ácido Quinurênico

Foram comparados entre si os grupos que receberam microinjeção de LPS no PVN. O grupo que recebeu só a microinjeção de LPS (LC n= 6) mostrou aumento da PAM e da FC nos primeiros 15 minutos após a microinjeção, com o pico da resposta aos 10 minutos ( $\Delta PAM = +12,33 \pm 3,10$  mm Hg e  $\Delta FC = + 78,85 \pm 14,23$  bpm). Diante das evidências sobre a neurotransmissão no PVN, cogitou-se a possibilidade dos aumentos de PA e FC serem devido à via excitatória, portanto foi feita a escolha pelo teste de um antagonista dos receptores ionotrópicos do Glu. O grupo que recebeu microinjeção de ácido quinurênico 10 minutos antes da microinjeção de LPS (LCAQ n= 7) obteve atenuação nesse aumento na PAM e FC ( $\Delta PAM = - 2,75 \pm 2,10$  mm Hg e  $\Delta FC = - 20,84 \pm 15,14$  bpm), como mostrados na figura 8 e 9.

**Figura 9** – Variação em função do tempo na pressão arterial média (PAM) (A) e na frequência cardíaca (FC) (B), após a microinjeção de LPS no grupo LC (n=6) e no grupo LCAQ (n=7). Diferença entre LC e LCAQ. \*p<0,05.



**Figura 10** – Variação máxima da pressão arterial média ( $\Delta$ PAM) (A) e da frequência cardíaca ( $\Delta$ FC) (B), 10 minutos após a microinjeção de LPS no grupo LC (n=6) e no grupo LCAQ (n=7). \*p< 0,05.



#### 4.2 ANÁLISE DA MODULAÇÃO PELO SISTEMA NERVOSO AUTÔNOMO

A análise foi feita levando em consideração dois parâmetros básicos. A pressão arterial sistólica (PAS) e o intervalo de pulso (IP) que corresponde à frequência cardíaca, e os dados expressos em valores absolutos, sendo PAS em

mm Hg<sup>2</sup> e IP ms<sup>2</sup>, e em unidades normalizadas (un) que corresponde à porcentagem dos valores absolutos dos componentes LF e HF sem o componente VLF.

#### 4.2.1 Efeitos da Microinjeção de Solução Salina em Animais Submetidos à Endotoxemia.

No parâmetro PAS após a endotoxemia, os animais tiveram mudanças significativas na porcentagem dos componentes de baixa frequência (LF) que corresponde ao sistema nervoso simpático e no de alta frequência (HF) que corresponde ao parassimpático, nos dados normalizados. Onde houve aumento do HF e diminuição do LF, como mostrado na tabela 1 e figura 10.

No parâmetro IP após a endotoxemia, houve mudança significativa na variabilidade (var) e nos componentes HF e LF em dados reais. Houve queda significativa dos 3 componentes como mostrado na tabela 2 e figura 11.

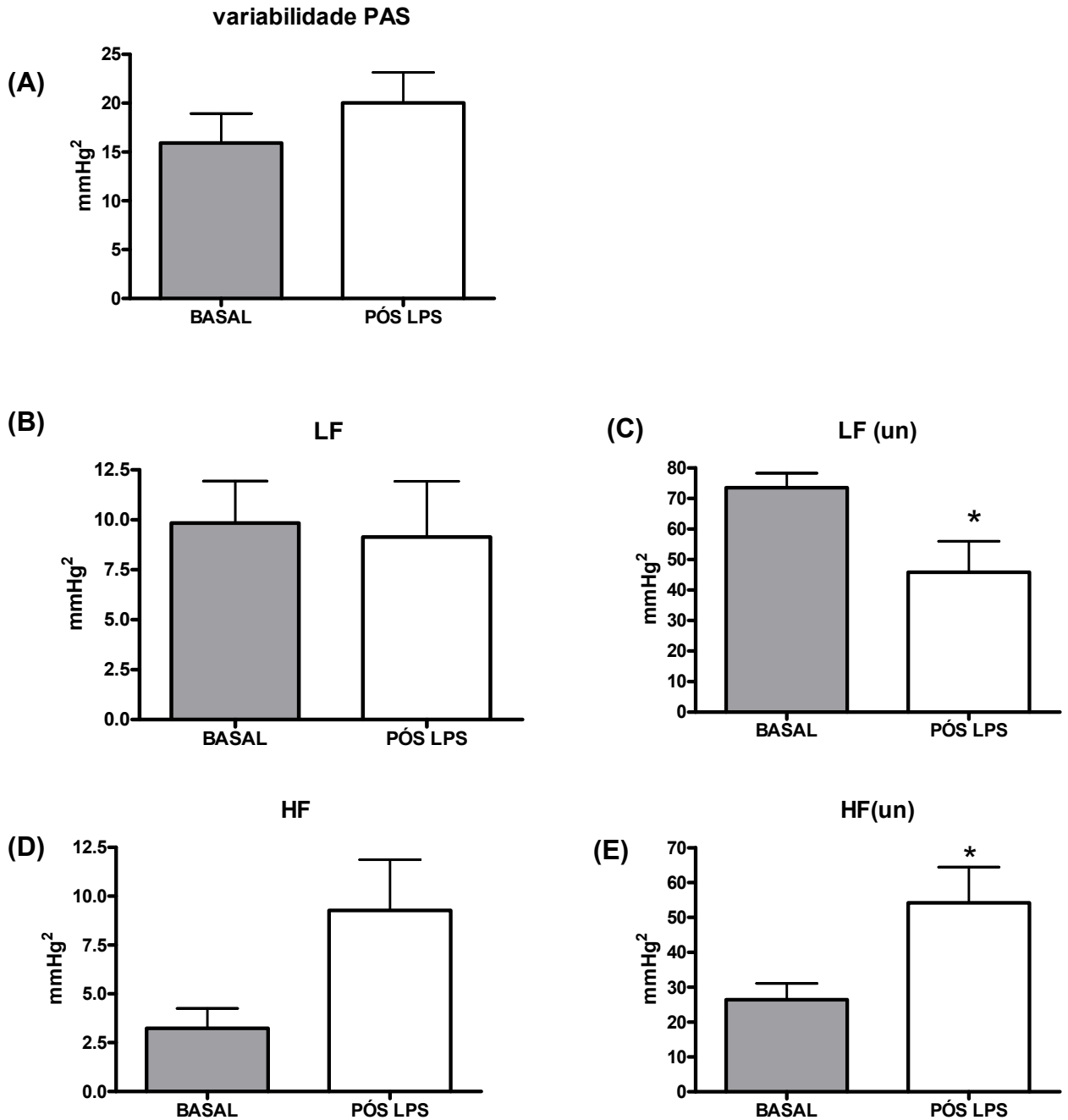
**Tabela 1** – Valores médios para os componentes da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) comparando-se o grupo SS (n=7) antes e depois da indução da endotoxemia. \*p < 0,05. \*\* (un) unidades normalizadas.

<b>Pressão arterial sistólica (PAS) mm Hg<sup>2</sup></b>			
	<b>Basal</b>	<b>Pós LPS</b>	<b>p</b>
<b>VAR</b>	15,92±3,01	20,04±3,11	0,400
<b>LF</b>	9,84±2,10	9,14±2,79	0,847
<b>HF</b>	3,23±1,02	9,28±2,59	0,110
<b>LF (un) **</b>	73,60±4,68	45,81±10,23	0,044*
<b>HF (un) **</b>	26,39±4,68	54,18±10,23	0,044*

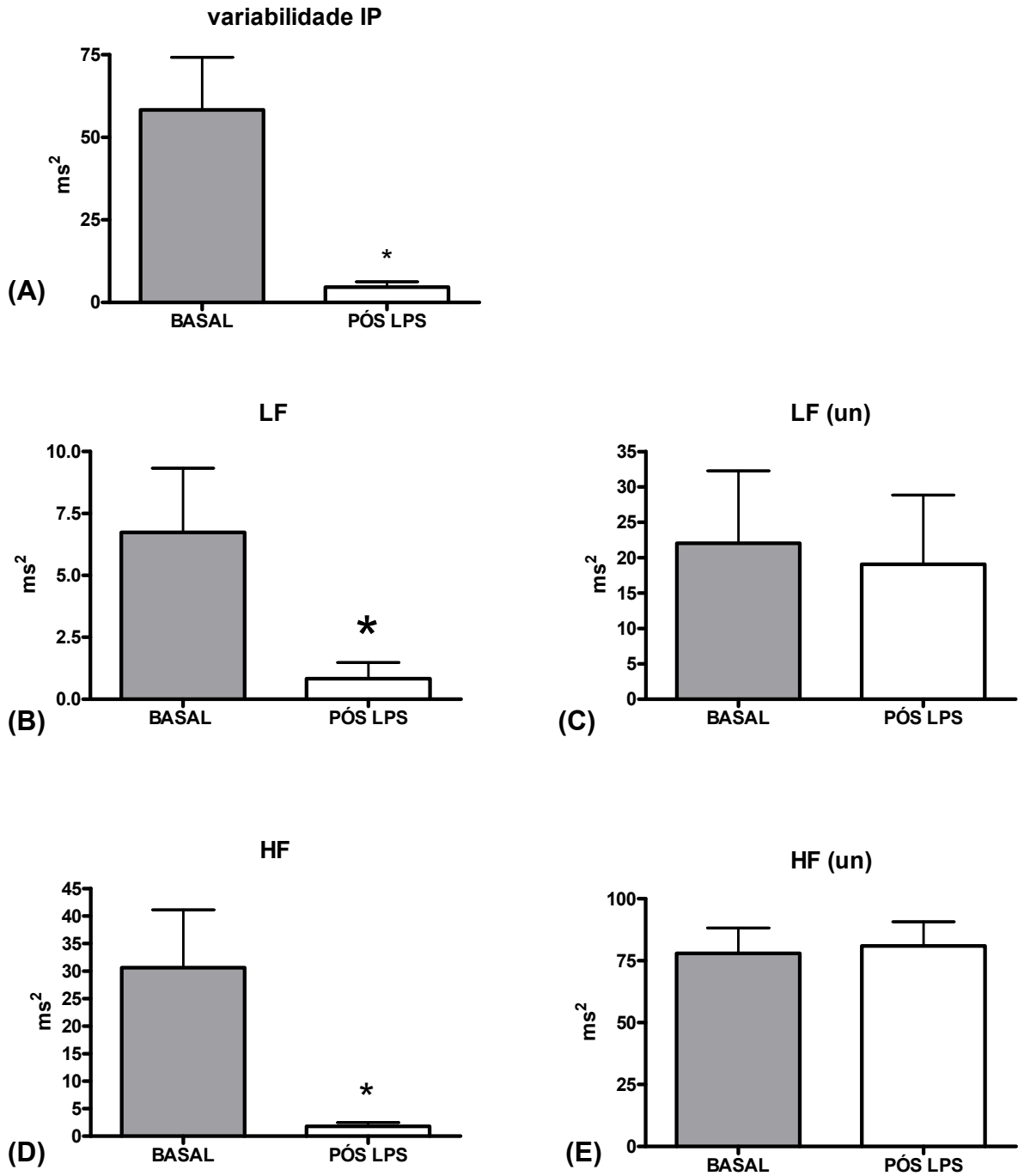
**Tabela 2** – Valores médios para os componentes da análise espectral do intervalo de pulso (IP) comparando-se o grupo SS (n=7) antes e depois da indução da endotoxemia. \*p < 0,05. \*\* (un) unidades normalizadas.

<b>Intervalo de Pulso (IP) ms<sup>2</sup></b>			
	<b>Basal</b>	<b>Pós LPS</b>	<b>p</b>
<b>VAR</b>	58,25±15,95	4,67±1,61	0,019*
<b>LF</b>	6,74±2,59	0,83±0,66	0,044*
<b>HF</b>	30,61±10,50	1,77±0,69	0,043*
<b>LF(un)**</b>	22,05±10,23	19,07±9,79	0,851
<b>HF(un)**</b>	77,94±10,23	80,92±9,79	0,851

**Figura 11** – Valores médios dos componentes do parâmetro PAS nos animais do grupo SS (n=7), antes e após serem submetidos à endotoxemia por LPS. (A) Variabilidade, (B) LF em valores absolutos, (C) LF em unidades normalizadas, (D) HF em valores absolutos, (E) HF em unidades normalizadas. \*  $p < 0.05$ . (un) unidades normalizadas.



**Figura 12** - Valores médios dos componentes do parâmetro IP nos animais do grupo SS (n=7), antes e após serem submetidos à endotoxemia por LPS. \* p<0.05. (un) unidades normalizadas.



#### 4.2.2. Efeitos da Microinjeção de Muscimol e Ácido Quinurênico em Ratos Submetidos à Endotoxemia.

Os animais do grupo SM quando comparados com o grupo SS após a endotoxemia, no parâmetro PAS tiveram uma diminuição nos valores da variabilidade (var) e no componente LF, sendo os valores de variabilidade: SS  $20 \pm 3$  mm Hg<sup>2</sup> vs. SM  $11 \pm 2$  mm Hg<sup>2</sup> e LF: SS  $9 \pm 3$  mm Hg<sup>2</sup> vs. SM  $2 \pm 0,9$  mm Hg<sup>2</sup>,  $p < 0,05$ , como mostrado na tabela 3 e figura 12. Os outros componentes não sofreram diferenças significativas. O parâmetro IP após a endotoxemia, não se modificou em nenhum dos componentes, como mostrado na tabela 4 e figura 13.

Os animais do grupo SAQ quando comparados com os animais do grupo SS após a endotoxemia, não sofreram nenhuma modificação em ambos os parâmetros PAS e IP. Valores mostrados nas tabelas 5 e 6 e figuras 14 e 15.

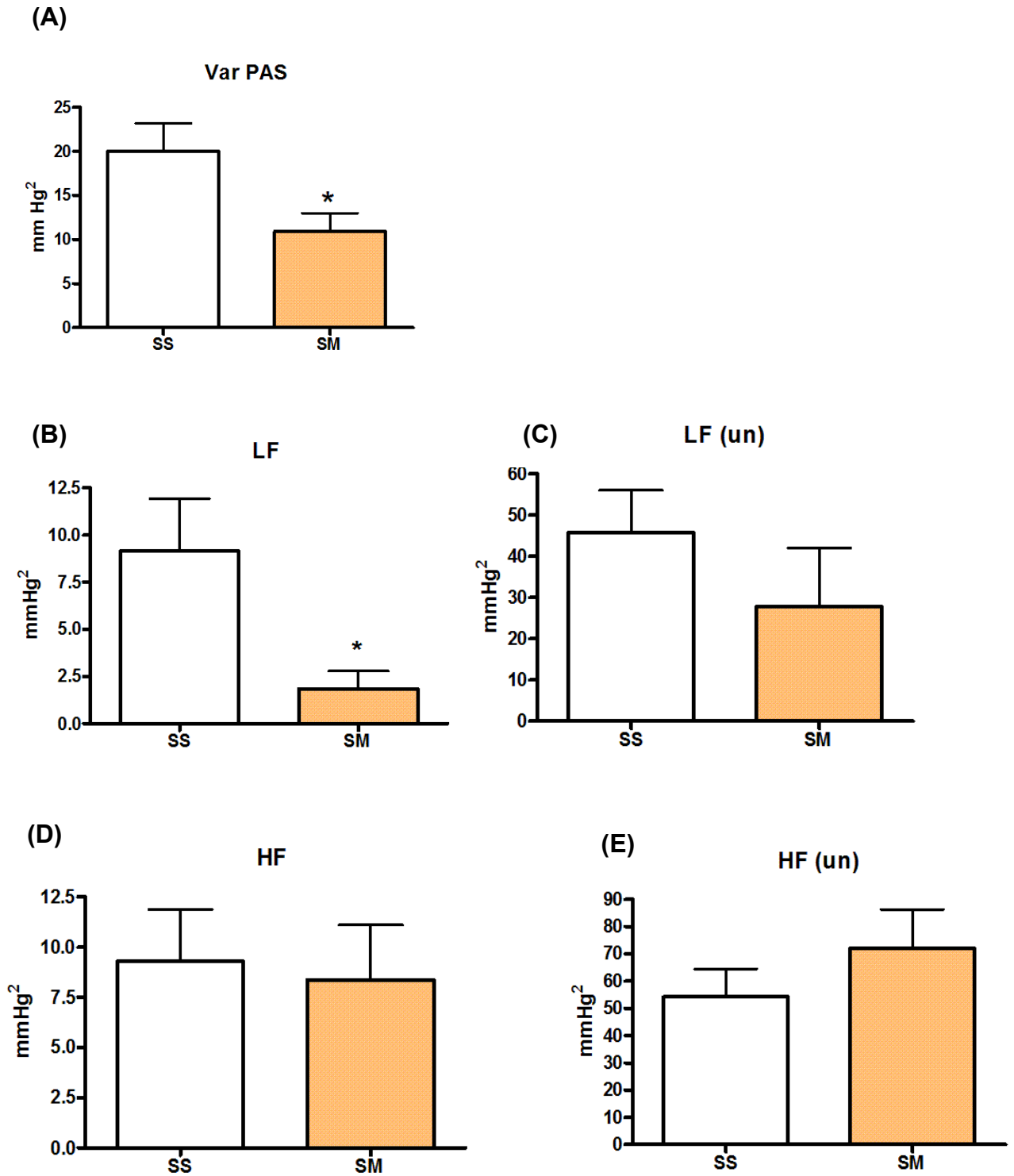
**Tabela 3** – Valores médios para os componentes da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) comparando-se o grupo SS (n=7) com o grupo SM (n=6) após endotoxemia. \* p < 0,05. \*\* (un) unidades normalizadas.

<b>Pressão Arterial Sistólica (PAS) mm Hg<sup>2</sup></b>			
	<b>SS</b>	<b>SM</b>	<b>p</b>
<b>VAR</b>	20,04±3,11	10,93±2,06	0.045*
<b>LF</b>	9,14±2,79	1,86±0,93	0.049*
<b>HF</b>	9,28±2,59	8,36±2,74	0.813
<b>LF(un)**</b>	45,81±10,23	27,86±14,10	0.319
<b>HF(un)**</b>	54,18±10,23	72,14±14,10	0.319

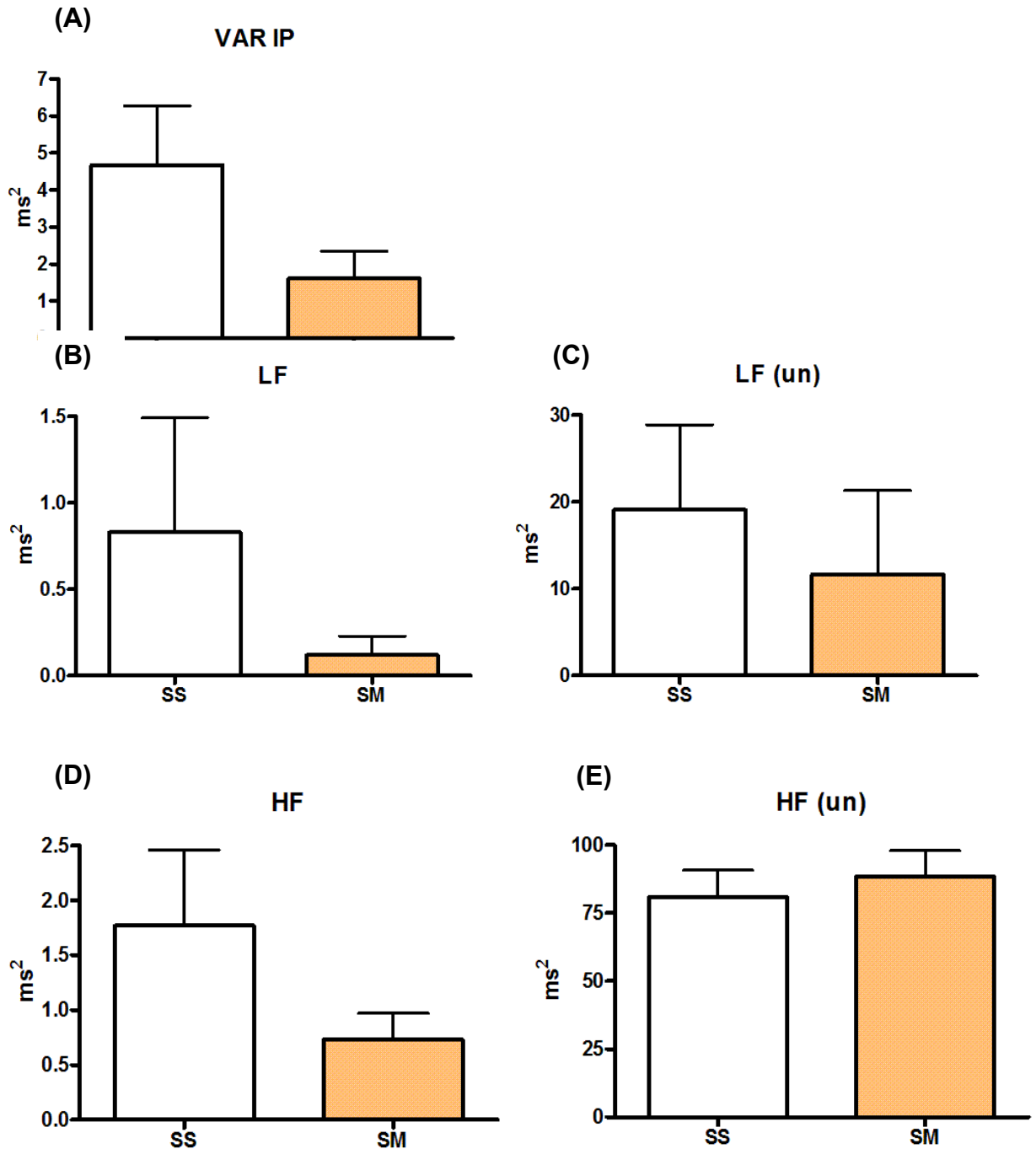
**Tabela 4** -QValores médios para os componentes da análise espectral do intervalo de pulso (IP) comparando-se o grupo SS (n=7) com o grupo SM (n=6) após endotoxemia. \*\*(un) unidades normalizadas.

<b>Intervalo de Pulso (IP) ms<sup>2</sup></b>			
	<b>SS</b>	<b>SM</b>	<b>p</b>
<b>VAR</b>	4,67±1,61	1,61±0,73	0.141
<b>LF</b>	0,83±0,66	0,12±0,11	0.36
<b>HF</b>	1,77±0,69	0,73±0,24	0.222
<b>LF(un)**</b>	19,07±9,79	11,65±9,63	0.54
<b>HF(un)**</b>	80,92±9,79	88,35±9,63	0.605

**Figura 13** –Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo SS (n=7) comparado com os do grupo SM (n=6), após a endotoxemia. (A) variabilidade, (B) LF em valores absolutos, (C) LF em valores normalizados, (D) HF em valores absolutos, (E) HF em valores normalizados. \*  $p < 0.05$ . (un) unidades normalizadas.



**Figura 14** – Valores médios dos componentes dos parâmetros IP nos animais do grupo SS (n=7) comparado com os do grupo SM (n=6) após a endotoxemia. (A) variabilidade, (B) LF em valores absolutos, (C) LF em valores normalizados, (D) HF em valores absolutos, (E) HF em valores normalizados. (un) unidades normalizadas.



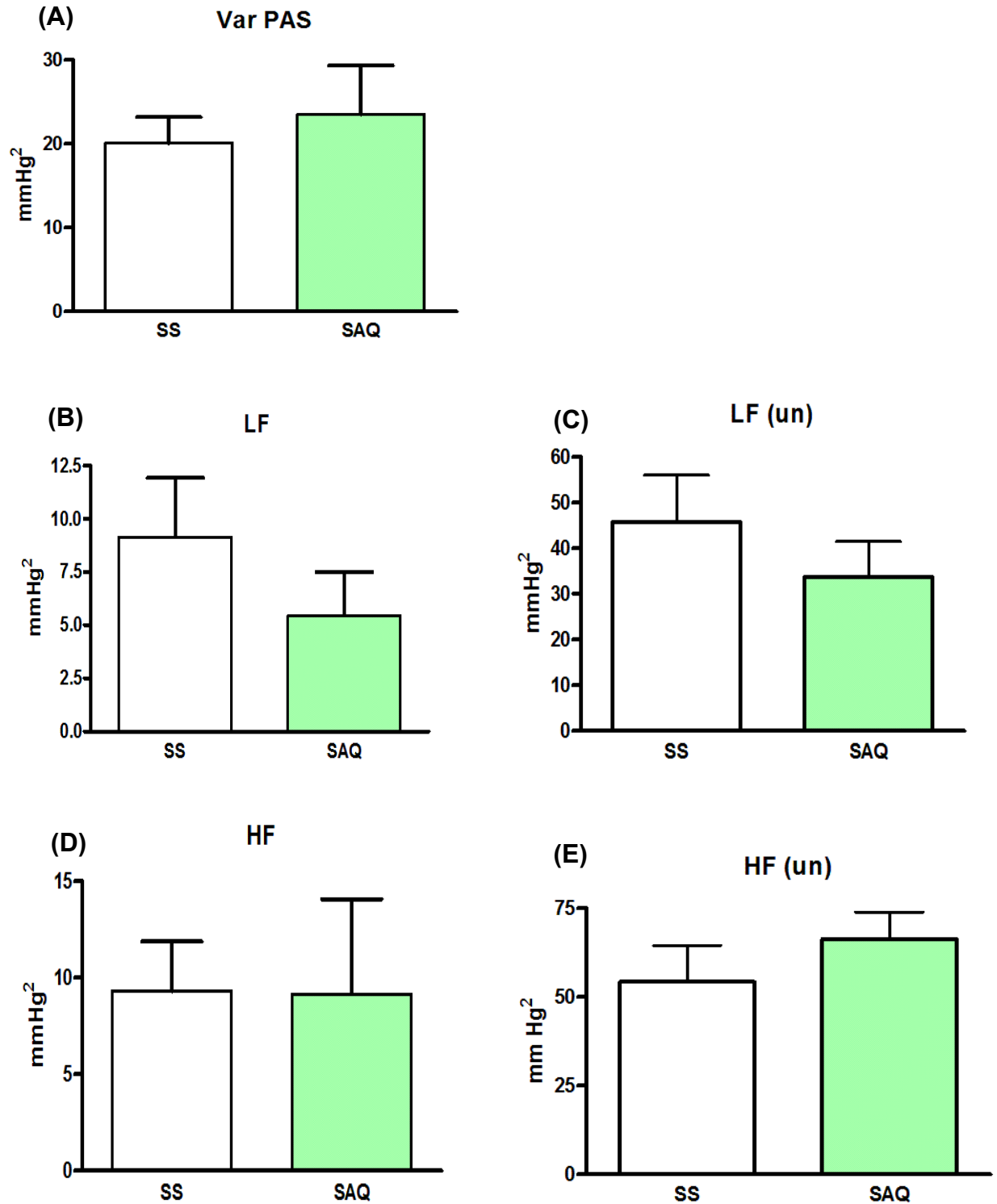
**Tabela 5** – Valores médios para os componentes da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) comparando-se o grupo SS (n=7) com o grupo SAQ (n=6) após a endotoxemia. **\*\***(un) unidades normalizadas.

<b>Pressão Arterial Sistólica mm Hg<sup>2</sup></b>			
	<b>SS</b>	<b>SAQ</b>	<b>p</b>
<b>VAR</b>	20,04±3,11	23,46±5,18	0.584
<b>LF</b>	9,14±2,79	5,45±3,04	0.392
<b>HF</b>	9,28±2,59	9,13±2,75	0.969
<b>LF (un)**</b>	45,81±10,23	33,75±11,01	0.441
<b>HF (un)**</b>	54,18±10,23	66,24±11,01	0.441

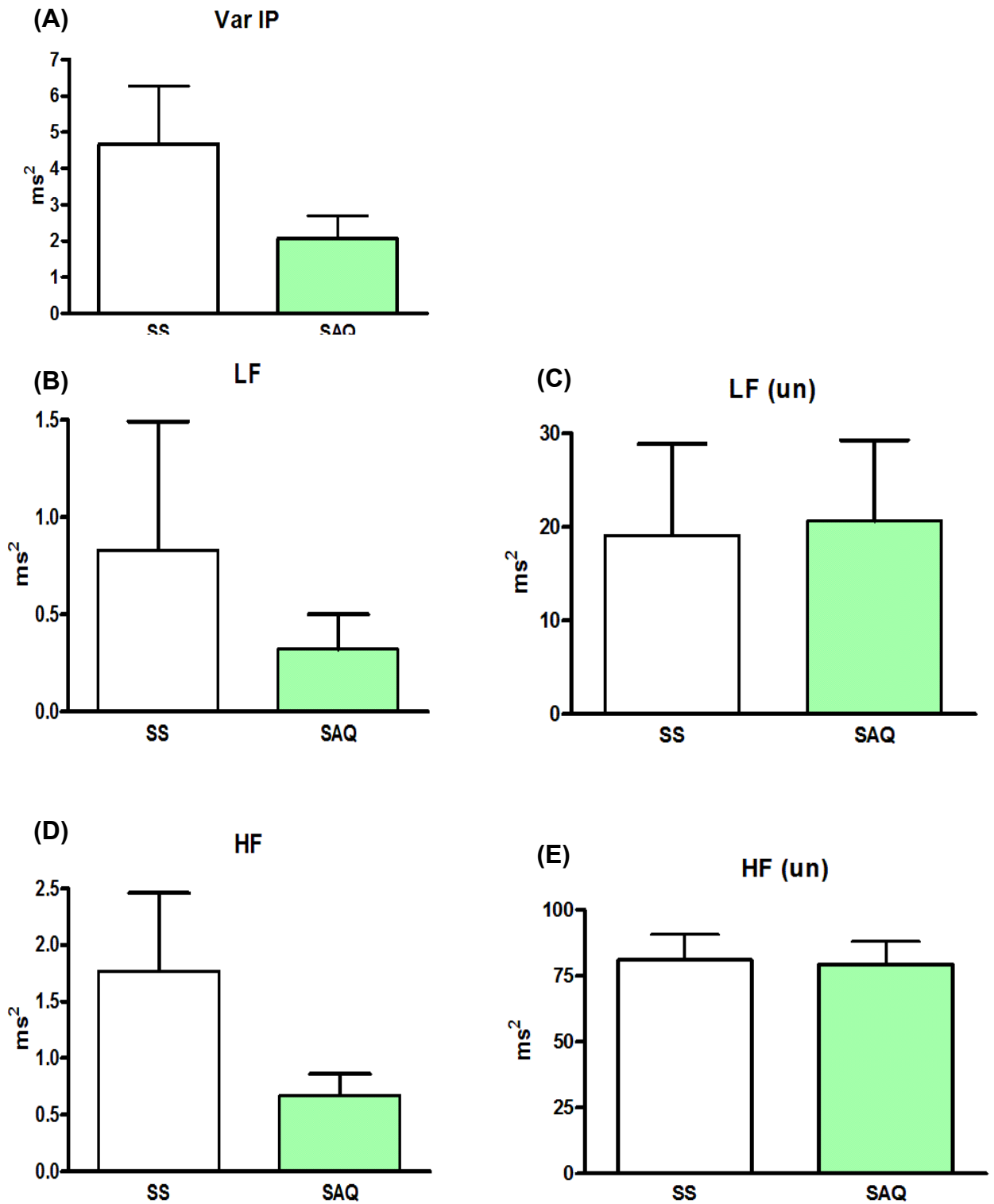
**Tabela 6** – Valores médios para os componentes da análise espectral do intervalo de pulso (IP) comparando-se o grupo SS (n=7) com o grupo SAQ (n=6) após a endotoxemia. **\*\*** (un) unidades normalizadas.

<b>Intervalo de Pulso (IP) ms<sup>2</sup></b>			
	<b>SS</b>	<b>SAQ</b>	<b>p</b>
<b>var</b>	4,67±1,61	2,07±0,63	0.164
<b>LF</b>	0,83±0,66	0,32±0,18	0.473
<b>HF</b>	1,77±0,69	0,67±0,19	0.155
<b>LF (un)**</b>	19,07±9,79	20,62±8,64	0.908
<b>HF (un)**</b>	80,92±9,79	79,37±8,64	0.908

**Figura 15** – Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo SS (n=7) comparado com os do grupo SAQ (n=6) após a endotoxemia. (A) variabilidade, (B) LF em valores absolutos, (C) LF em valores normalizados, (D) HF em valores absolutos, (E) HF em valores normalizados. (un) unidades normalizadas.



**Figura 16** –Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo SS (n=7) comparado com os do grupo SAQ (n=6) após a endotoxemia. (A) variabilidade, (B) LF em valores absolutos, (C) LF em valores normalizados, (D) HF em valores absolutos, (E) HF em valores normalizados. (un) unidades normalizadas.



#### 4.2.3 Efeitos da Microinjeção de Ácido Quinurênico em Animais que Foram Submetidos à Microinjeção de LPS no PVN

No parâmetro PAS a comparação entre os grupos LC e LCAQ após a microinjeção de LPS no PVN, evidenciou uma diferença nos componentes da variabilidade, LF, LF (un) e HF (un), somente houve um aumento significativo em HF (un), os outros componentes mostraram diminuição significativa. Como mostrado na tabela 7 e figura 16.

No parâmetro IP houve após a microinjeção de LPS no PVN, diminuição significativa da variabilidade e aumento do HF, mas sem diferença significativa, provavelmente por haver um erro padrão muito grande no grupo LC. Valores mostrados na tabela 8 e figura 17.

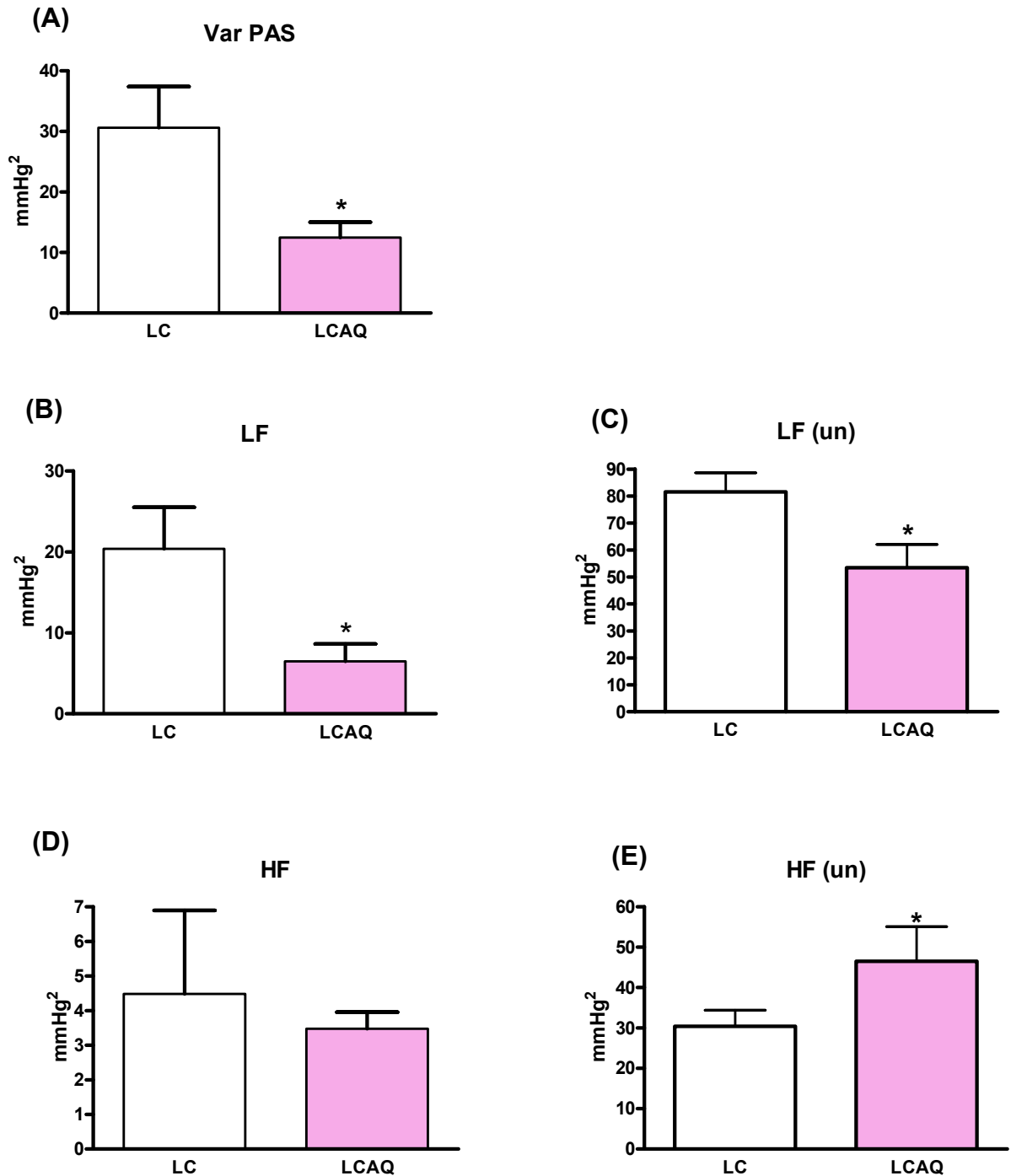
**Tabela 7** – Valores médios para os componentes da análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) comparando-se o grupo LC (n=6) com o grupo LCAQ (n=7) após microinjeção de LPS no PVN.  $p < 0,05$ . **\*(un)** unidades normalizadas.

<b>Pressão Arterial Sistólica</b>			
	<b>LC</b>	<b>LCAQ</b>	<b>p</b>
<b>VAR</b>	30.63±6.78	12.47± 2.55	0.022*
<b>LF</b>	20.39±5.15	6.49±2.14	0.023*
<b>HF</b>	4.48±2.42	3.48±0.48	0.67
<b>LF(un)**</b>	81.55±7.03	53.46±8.59	0.031*
<b>HF(un)**</b>	18.45±7.03	46.54±8.59	0.031*

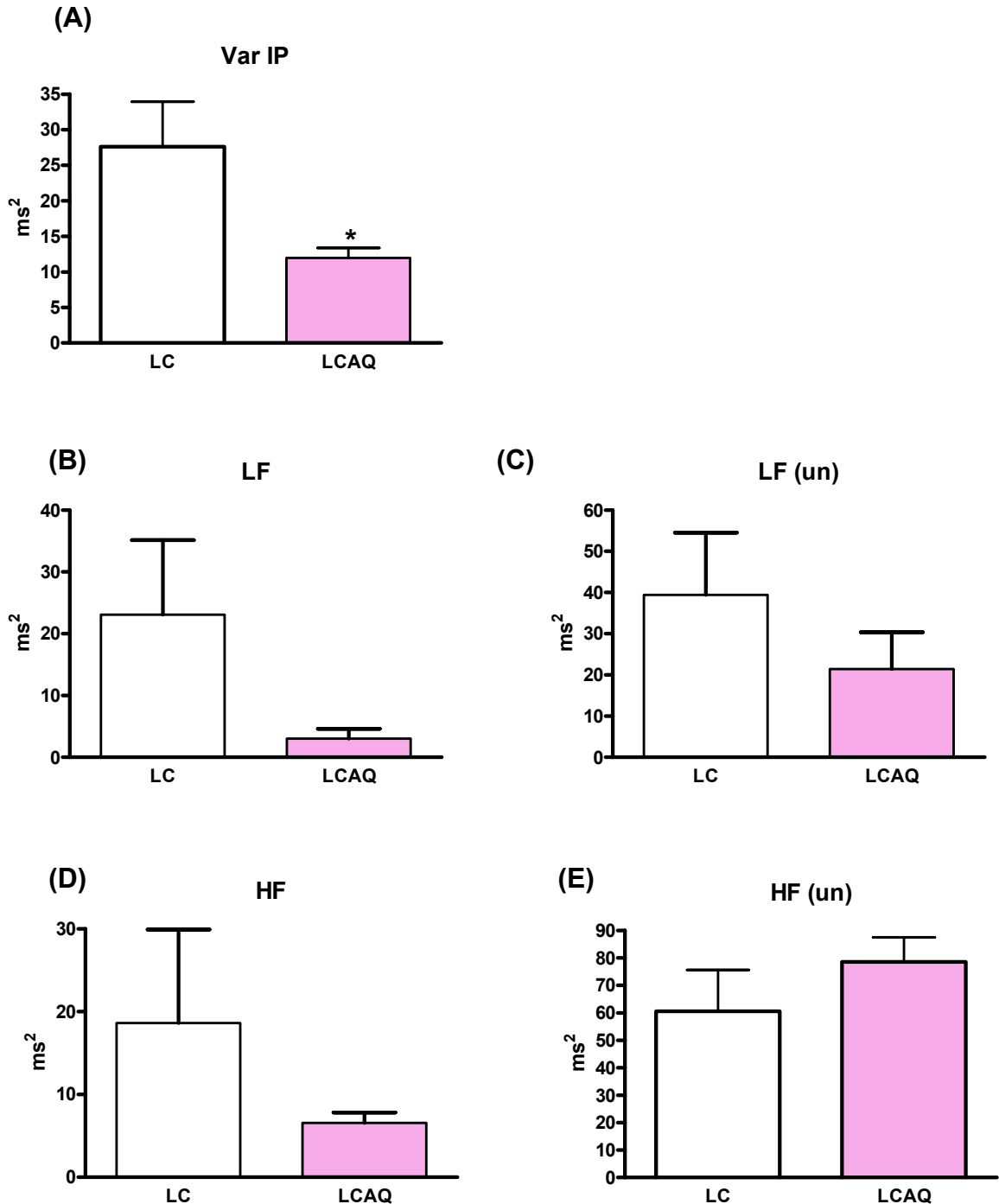
**Tabela 8** – Valores médios para os componentes da análise espectral do intervalo de pulso (IP) comparando-se o grupo LC (n=6) com o grupo LCAQ (n=7) após microinjeção de LPS no PVN.\*  $p < 0,05$ . **\*(un)** unidades normalizadas.

<b>Intervalo de Pulso (IP)</b>			
	<b>LC</b>	<b>LCAQ</b>	<b>p</b>
<b>VAR</b>	27.62±6.32	11.97±1.41	0.024*
<b>LF</b>	23.07±12.09	3.01±1.62	0.102
<b>HF</b>	18.63±11.32	6.55±1.26	0.274
<b>LF(un)**</b>	39.44±15.11	21.43±8.92	0.31
<b>HF(un)**</b>	60.55±15.11	78.55±8.92	0.311

**Figura 17** –Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo LC (n=6) comparado com os do grupo LCAQ (n=7) após a microinjeção de LPS no PVN. (A) variabilidade, (B) LF valores absolutos, (C) LF valores normalizados, (D) HF valores absolutos, (E) HF valores normalizados. \*  $p < 0.05$ . (un) unidades normalizadas.



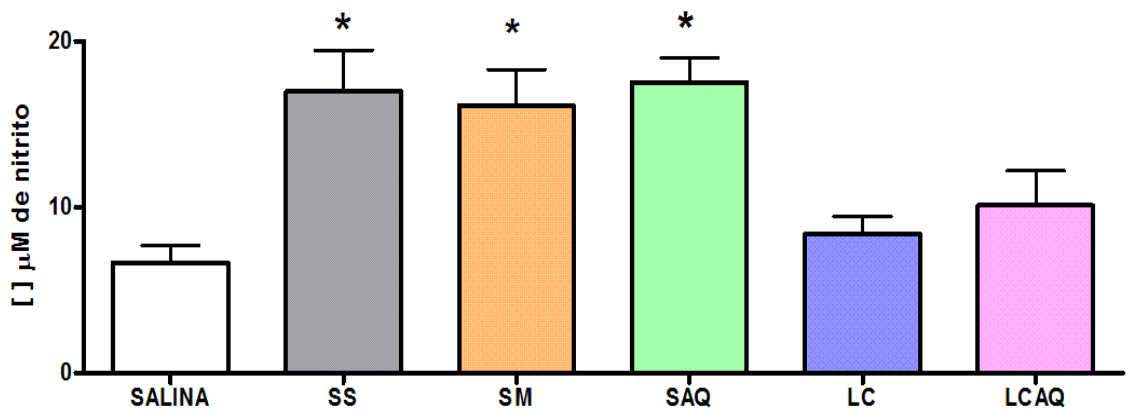
**Figura 18** – Valores médios dos componentes dos parâmetros PAS nos animais do grupo LC (n=6) comparado com os do grupo LCAQ (n=7) após a microinjeção de LPS no PVN. (A) variabilidade, (B) LF valores absolutos, (C) LF valores normalizados, (D) HF valores absolutos, (E) HF valores normalizados. \*  $p < 0.05$ . (un) unidades normalizadas.



#### 4.3 Análise Indireta de NO no Plasma.

A administração de LPS elevou os níveis plasmáticos de NO nos grupos SS ( $16,99 \pm 2,45 \mu\text{M}$  de nitrito) comparado com o grupo Salina que não recebeu LPS ( $6,68 \pm 1,03 \mu\text{M}$  de nitrito). Também se elevaram os níveis plasmáticos de NO nos grupos SM ( $16,13 \pm 2,17 \mu\text{M}$  de nitrito) e SAQ ( $17,53 \pm 1,47 \mu\text{M}$  de nitrito) sem diferenças significantes comparados com o grupo SS. O grupo LC não sofreu mudanças significativas nos níveis de NO ( $8,40 \pm 1,04 \mu\text{M}$  de nitrito), e o mesmo aconteceu com o grupo LCAQ ( $10,10 \pm 2,08 \mu\text{M}$  de nitrito), como mostrado na figura 18.

**Figura 19** – Concentrações plasmáticas de NO nos vários grupos nas condições pós-droga. Grupos comparados por teste T' *Student* não pareado com o grupo salina sem endotoxemia. \*  $p < 0,05$ .



\* Quando comparados com o grupo salina

## 5 DISCUSSÃO

Como a endotoxemia é uma das maiores causas de morte nas unidades de terapia intensiva, muitos estudos tem sido feitos na tentativa de desvendar seus mecanismos tanto periféricos como centrais para a diminuição de casos letais e também para a melhora no prognóstico nos pacientes afetados.

A fisiopatologia da endotoxemia envolve a associação de intrincadas reações desencadeadas pelo patógeno microbiano. Dois mecanismos distintos contribuem para o colapso hemodinâmico: a) extrínsecos (ou exógenos): toxinas, endotoxinas e partículas de proteínas de bactérias gram-positivas, vírus e fungos, e b) intrínsecos (ou endógenos): liberação de mediadores pró-inflamatórios pelas células do hospedeiro (JEAN-BAPTISTE, 2007; ALBERT, 2002).

Existem vários modelos utilizados para se estudar a endotoxemia, e a questão principal é a capacidade de cada modelo em mimetizar o que ocorre na endotoxemia humana. O modelo padrão de ligamento do ceco e punctura (CLP) engloba mais características clínicas e respostas a medicamentos da endotoxemia humana, porém faltam algumas características chaves, especialmente danos ao rim e ao pulmão (DOI, 2009).

Apesar de não ser o modelo que mais se assemelha à endotoxemia humana, o modelo de injeção de LPS intravenoso induz inflamação sistêmica, incluindo aumento em citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e IL-1 sem bacteremia (WICHTERMAN *et al.*,1980 ; MICHIE *et al.*,1988 ). A infusão de LPS também causa lesão renal, incluindo queda na taxa de filtração glomerular (CUNNINGHAM *et al.*,2004; TIWARI *et al.*,2005, KNOTEK *et al.*,2001). Por isso segundo Doi (2009), a infusão de LPS ainda permanece uma ferramenta útil para interrogar algumas questões simples na trajetória complexa da endotoxemia.

Uma série de disfunções cardiocirculatórias é evidente no quadro endotóxico como diminuição das frações de ejeção dos ventrículos direito e esquerdo, aumento nos volumes finais sistólicos e diastólicos de ambos os ventrículos, e um volume final de ejeção normal. A frequência cardíaca está elevada e a resistência vascular sistêmica está reduzida (PARKER *et al.*,1990; POELAERT *et al.*,1997).

Há uma produção maciça de NO, devida a expressão aumentada de iNOS. Esse NO interfere no metabolismo de cálcio pelos miócitos e pode prejudicar

a função contrátil. Em adição, as espécies reativas de oxigênio como o peroxinitrito, produzido pelo NO interagindo com os íons superóxido, são diretamente tóxicos aos miócitos.

As alterações vasculares na endotoxemia são principalmente devido ao efeito dos mediadores no músculo liso e disfunção endotelial, pois o NO causa hiperpolarização da membrana plasmática do músculo liso, impedindo que este último responda às catecolaminas e causando uma grande vasodilatação sistêmica.

A disfunção endotelial leva à falta de capacidade das células em manter o tônus vascular com perda da pressão sanguínea e o dano endotelial leva ao extravasamento dos capilares com depleção de volume intravascular e formação de edema em órgãos envolvidos (NDUKA & PARRILLO, 2009). Em experimentos deste grupo, uma observação das estruturas internas dos animais após a eutanásia mostrou vísceras hemorrágicas com grande quantidade de sangue e linfa na cavidade abdominal. Neste estudo não foi feita a observação dos pulmões para verificar a existência ou não de edema pulmonar, mas em estudo de Mehanna e colaboradores (2007), deste mesmo grupo, foi relatado que animais nas mesmas condições que nossos animais controle apresentavam edema pulmonar proeminente e aumento do peso do pulmão apontando, assim como, em outros estudos que o LPS é um estimulante importante para o edema pulmonar agudo em ratos.

É sabido que durante a endotoxemia há uma vasodilatação generalizada causada pela produção maciça de NO com extravasamento de plasma para a cavidade peritoneal, que leva à diminuição da pressão arterial devido à hipovolemia. Nesse processo o hipotálamo é ativado pelo desafio imunológico para tentar restabelecer os níveis pressóricos normais. Nesse momento há grande liberação de vasopressina e grande estímulo para a produção de adrenalina, como mostrado no trabalho de Annane e colaboradores (1999). No entanto, durante a endotoxemia o organismo se mostra com sensibilidade reduzida aos fatores vasoconstritores dificultando assim a vasoconstrição para aumentar os valores pressóricos.

Vários trabalhos foram feitos para se estudar os mecanismos da endotoxemia, e muitos deles incluíam o envolvimento do SNC, mas pouco ou quase nada se sabe sobre a participação do hipotálamo nas respostas cardiovasculares que ocorrem nessa condição, e pouco se sabe principalmente sobre a participação do PVN.

Estudos de Badoer (2001) demonstram que as projeções do PVN para o RVLM são ativadas por queda no volume sanguíneo, sugerindo que haveria aumento da atividade simpática para ajudar no restabelecimento na pressão arterial. Porém, outro estudo (ANNANE *et al.* 1999) já demonstrava que esses animais possuíam modulação simpática prejudicada tanto nos vasos quanto no coração, sugerindo que a alteração na regulação autônoma central contribuiu para a falência circulatória.

Para Vaysettes-Couchay (2005), o aumento da atividade nervosa durante a endotoxemia não é somente devida à atividade baroreceptora, já que o bloqueio desses reflexos e a lesão do NTS não promoveram mudanças significativas na ativação simpática e taquicardia causada por LPS e sobrevivência dos animais.

Levando em consideração essas informações, nosso grupo questionou qual seria a real participação do PVN nas respostas cardiovasculares durante a endotoxemia, quais vias seriam responsáveis pela resposta do núcleo ao desafio imunológico severo, e que extensão dessa resposta seria endócrina ou autônoma

Foi utilizada a manipulação farmacológica específica, uma ferramenta bastante difundida para estudo de função de determinadas vias sinápticas do núcleo para uma melhor avaliação de sua participação, e também para determinar qual seria a possível via de ativação nas diversas situações propostas.

Os resultados demonstram que a ativação da via gabaérgica pelos receptores GABA influencia a resposta cardiovascular durante a endotoxemia. A microinjeção de muscimol, um agonista dos receptores GABA A, resulta em uma atenuação na hipotensão encontrada na primeira fase da endotoxemia em relação aos animais controle, de  $-35 \pm 9$  mm Hg para  $-1 \pm 9$  mm Hg, resulta também em um aumento maior na frequência cardíaca que nos animais controle, de  $+31 \pm 14$  bpm para  $+122 \pm 31$  bpm.

Visualizando o perfil das respostas é possível verificar que o início da taquicardia corresponde ao final da hipotensão, este resultado sugere que talvez essas suas respostas sejam reguladas por vias sinápticas distintas. Fato esse também evidenciado pela visualização dos picos de resposta, onde o pico de queda da PA foi aos 40 minutos e o pico de aumento da FC foi aos 60 minutos.

Estudo de Badoer (2002) demonstrou que existe um aumento de atividade no nervo simpático renal (ANSR) após microinjeção de muscimol em

coelhos, apesar de não ter sido feito o registro da atividade simpática por limitações técnicas, uma possível ANSR aumentada em ratos com a microinjeção de muscimol poderia explicar a atenuação da hipotensão na primeira fase da sepse.

A microinjeção de ácido quinurênico, um antagonista dos receptores glutamatérgicos ionotrópicos, não demonstrou nenhuma mudança na hipotensão apresentada na primeira fase da endotoxemia, porém mostrou um aumento nos valores de frequência cardíaca com diferenças significantes a partir dos 50 minutos de registro.

A microinjeção de ácido quinurênico evidencia uma resposta para a FC semelhante à resposta obtida com o muscimol, sugerindo novamente a possibilidade das respostas para PA e FC serem devidas a duas vias sinápticas distintas. Sugere também que a via inibitória seja responsável pela resposta de PA e que para a FC tanto a via inibitória como a excitatória possam estar envolvidas.

Estudo de Vayssettes-Courchay e colaboradores (2002), conclui após experimentos com a administração de inibidores da NOS que a NOS neuronal não está envolvida nas respostas de ativação simpática e que é a indução da iNOS que participa da hipotensão como já havia sido descrito em outros estudos (THIEMERMANN & VANE, 1990; KILBOURN *et al.* 1990).

Corrêa e colaboradores (2007), mostrou que bloqueando o aumento do óxido nítrico plasmático derivado da iNOS a expressão de c-fos no PVN, núcleo supraóptico (SON) e *organum vasculosum of lamina terminalis* (OVLT) é diminuída e a secreção de vasopressina (AVP) em ratos sépticos por CLP também diminui.

Muitos estudos têm sido feitos para esclarecer o papel da ativação cerebral proveniente da inflamação cerebral, relacionando com a ativação proveniente da infusão periférica e na tentativa de determinar se existe um mesmo padrão de resposta. Após experimentos com a administração de LPS periférico, nosso grupo questionou a possível ação da endotoxina quando microinjetada diretamente no núcleo.

Lund e colaboradores (2006) descreveram que ocorrem mudanças na expressão de genes no hipocampo após a injeção central de LPS. No trabalho de Bonow e colaboradores (2009) foi comparado o perfil de expressão gênica em duas regiões do cérebro, o hipocampo e o córtex cerebral após a microinjeção de LPS no ventrículo lateral e concluiu que embora as expressões gênicas basais sejam únicas, as mudanças induzidas por LPS são similares em ambos hipocampo e

córtex cerebral, sugerindo que essas regiões respondem similarmente à inflamação aguda. A expressão de mRNA que codifica proteínas ribossomais estava também aumentada em ambas as regiões, o que sugere que o cérebro está trabalhando para aumentar sua capacidade para síntese de proteínas.

Estudo de Habu (1998) sugeriu que a administração central de LPS assim como a administração periférica pode estimular a secreção de ACTH. A administração periférica de LPS parece levar à ativação dos grupos celulares adrenérgicos no tronco cerebral o que parece envolver a ativação de aferentes vagais, pois a vagotomia tem demonstrado suprimir a ativação neuronal induzida pelo LPS no NTS (GAYKEMA *et al.*, 1995).

O PVN recebe uma densa inervação noradrenérgica e adrenérgica proveniente dos grupos A1, A2, C1 e C2 do tronco cerebral (SAWCHENKO, 1982; CUNNINGHAM, 1988), os grupos noradrenérgicos celulares A1 e A2 do tronco cerebral se projetam para o PVN, o qual está envolvido na resposta integrada ao estresse. A comunicação bidirecional entre o cérebro e o sistema imune está bem estabelecida, com ambas respostas neuroendócrinas e imune sendo ativadas pelo LPS. O LPS central ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA), um processo parcialmente mediado pelos neurônios noradrenérgicos do tronco cerebral, sugerindo o envolvimento de vias aferentes/eferentes dentro do cérebro. A administração periférica de LPS envolve ativação de aferências vagais levando ao NTS.

Condé (1999), determinou em seus estudos aumento no mRNA do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) no PVN e nos níveis circulantes de corticosterona, refletindo a ativação do eixo HPA em resposta da injeção intracérebro ventricular de LPS como mostrado em outros estudos (HARBUZ, 1992; RIVIER, 1995; RIVEST, 1995). Esse mesmo pesquisador mostrou também que a adrenalectomia não tem efeito na proteína Fos ou mRNA induzidos por LPS dentro das áreas A1. Em contraste, demonstrou que há um aumento no mRNA de c-fos na região A2 nos ratos adrenalectomizados em resposta ao LPS. Esses dados sugerem que a região A2 media os sinais imunes do cérebro em adição aqueles provenientes da periferia pela via vagal.

Xia e Krukoff demonstraram em 2003 que a microinjeção de LPS intracérebro ventricular estimula uma queda temporária na pressão arterial e ativa o PVN e os neurônios catecolaminérgicos do tronco cerebral e que esta ativação está

correlacionada com respostas tanto cardiovasculares como de ativação do eixo hipotálamo-hipófise. Diferentemente, a microinjeção de LPS diretamente no PVN feita por nosso grupo mostrou um aumento na PA e na FC dos animais com uma duração de resposta de aproximadamente 15 minutos. Essa diferença pode estar relacionada com o local da microinjeção, pois nosso grupo fez a microinjeção diretamente no parênquima. Todavia essas mudanças sugerem que o desafio inflamatório central afeta as respostas autonômicas.

Em um segundo grupo foi realizada a microinjeção prévia de ácido quinurênico para inibição dos receptores ionotrópicos glutamatérgicos e em seguida foi feita a microinjeção de LPS diretamente no PVN. Neste caso, houve atenuação na resposta hipertensiva do LPS, o que sugere uma possível participação da via excitatória na resposta de aumento da PA na inflamação cerebral.

A produção maciça de NO pela iNOS é grandemente descrita na literatura como uma das principais reações fisiopatológicas desencadeadas pelo desafio imunológico (NDUKA & PARRILLO, 2009, JEAN-BAPTISTE, 2007; ALBERT, 2002) levando à uma vasodilatação generalizada. Neste estudo a concentração de NO nos grupos experimentais foi mensurada de forma indireta dosando a concentração de nitrito através de uma reação química com o reagente de Griess.

Os animais que não foram submetidos a nenhum tipo de protocolo experimental demonstram uma produção basal de NO, os animais que receberam LPS i.v. tiveram esses valores elevados em três vezes, o mesmo ocorreu com os animais que receberam microinjeção de muscimol e ácido quinurênico e após LPS i.v. Estes resultados sugerem que a modulação do PVN não promove nenhuma alteração na produção de NO periférico pela iNOS.

Os animais que receberam microinjeção de LPS no PVN tiveram a concentração de NO similar aos animais que não sofreram nenhum tipo de protocolo experimental, o mesmo ocorreu com os animais que receberam microinjeção de ácido quinurênico anterior a microinjeção de LPS no PVN. Sugerindo que a inflamação cerebral devida a microinjeção de LPS no PVN e a subsequente ativação do PVN não é suficiente para estimular a produção de NO pela iNOS, e nem promover os sintomas característicos de endotoxemia.

A análise espectral da variabilidade foi utilizada nos registros cardiovasculares de todos os grupos experimentais, a qual é uma ferramenta indireta de avaliação do balanço simpáto-vagal cardíaco. Embora esse método não

discrimine se essa ativação simpática é centralmente mediada ou se é a transmissão neuroefetora periférica que está comprometida (SAYK *et al.* 2008) , é uma ferramenta bastante utilizada atualmente, especialmente em preparações com animais não anestesiados.

Sob a denominação “análise espectral” nós incluímos um grande conjunto de ferramentas matemáticas que permitem a caracterização de sinais de acordo com seu conteúdo de frequência. Como uma comparação simples, a análise espectral é para os sinais temporais o que um prisma é para a luz, uma ferramenta para desvencilhar os diferentes componentes espectrais (cores), escondidos sob a luz branca (ALTIMIRAS, 1999).

Nossos dados estão em conformidade com a literatura (GODIN *et al.* 1996, KORACH *et al.* 2001) que demonstra que durante a endotoxemia a variabilidade no parâmetro IP está diminuída, assim como os componentes espectrais simpático e parassimpático estão diminuídos.

Estudo de Korach (2001) sugere que a relação entre componentes de baixa frequência/alta frequência (LF/HF) poderia ser um teste válido para diagnóstico da endotoxemia em pacientes, uma relação LF/HF baixo determinaria uma condição de endotoxemia. Levando esse conceito em consideração, nossos animais apresentam relação muito baixa após a administração de LPS, o que os caracterizariam em condição endotóxica.

A análise espectral dos grupos experimentais demonstrou que os animais que receberam microinjeção de muscimol anterior ao LPS i.v., demonstraram no componente PAS, correspondente à pressão arterial sistólica, uma diminuição da variabilidade em relação à encontrada no grupo que só recebeu LPS i.v. e desenvolveu o quadro endotóxico e também demonstrou uma diminuição no componente LF, ligado ao sistema simpático. No entanto, no componente IP, ligado à frequência cardíaca, não houve nenhuma diferença entre os grupos salina e muscimol. Quanto aos animais que receberam microinjeção de ácido quinurênico anterior ao LPS i.v., não demonstraram nenhuma diferença em nenhum dos parâmetros.

Os animais que receberam LPS diretamente no PVN quando comparados com os animais que receberam ácido quinurênico anteriormente à microinjeção de LPS, no componente PAS tiveram um aumento de HF em unidades normalizadas, ou seja, no componente parassimpático, enquanto o LF, que

corresponde ao simpático e a variabilidade, diminuíram. No componente IP houve diminuição da variabilidade, sugerindo que provavelmente na ativação direta do núcleo pela inflamação cerebral outra via possa estar agindo para explicar o aumento do componente parassimpático neste caso em particular.

Mais estudos serão necessários para avaliar a real participação do PVN na endotoxemia, outras técnicas e outros modelos poderão ser usados futuramente para um melhor esclarecimento da participação do PVN nas respostas cardiovasculares promovidas na endotoxemia, porém nosso estudo traz evidências de que o núcleo possui uma participação importante nessas respostas cardiovasculares.

## 6 CONCLUSÃO

- A ativação gabaérgica pelo muscimol promove atenuação na resposta de hipotensão derivada da endotoxemia, assim como diminui a variabilidade da frequência cardíaca em animais com endotoxemia que já apresentam variabilidade diminuída.

- A inibição dos receptores ionotrópicos do Glu pelo ácido quinurênico antes da indução da endotoxemia não modifica as alterações na pressão arterial, porém exacerba a taquicardia. O ácido quinurênico também não modifica nenhum dos parâmetros avaliados pela análise espectral durante a endotoxemia.

- A inflamação cerebral causada pela microinjeção de LPS diretamente nos neurônios do PVN causa aumento da pressão arterial e taquicardia, resposta essa que parece ser medida por vias glutamatérgicas, pois a microinjeção de ácido quinurênico previamente ao LPS no PVN atenua esse aumento, assim como a variabilidade da frequência cardíaca nesses animais.

- A condição de endotoxemia promove aumento nos valores de NO independente da modulação de vias gabaérgicas ou glutamatérgicas no PVN. A microinjeção de LPS no PVN não modifica os valores plasmáticos de NO encontrados em animais não- sépticos.

Em conjunto os dados permitem concluir que o PVN participa na modulação das respostas cardiovasculares e autonômicas durante a fase inicial ,que dura aproximadamente duas horas,da endotoxemia induzida por LPS.

## 7 REFERÊNCIAS

- AKSELROD, S; GORDON, D; UBEL,FA; SHANNON, DC; BARGER, AC; COHEN, RJ. Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. **Science** v. 213, p. 220-223, 1981.
- AKSELROD S; GORDON D; MADWED JB; SNIDMAN NC; SHANNON DC; COHEN RJ. Hemodynamic regulation: investigation by spectralanalysis. **American Journal of Physiology** v.249, p. H867–75, 1985.
- ALBERT,C; BRUN-BUISSON,C; BURCHARDI,H.; *et al.* Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicenter cohort study. **Intensive care medicine** v.28, p.108-121,2002
- ALTIMIRAS J. Understanding autonomic sympathovagal balance from short-term heart rate variations. Are we analyzing noise? **Comparative Biochemistry and Physiology** Part A 124, p.447–460, 1999.
- ANNANE D, TRABOLD F, SHARSHAR T, *et al.* Inappropriate sympathetic activation at onsetof septic shock: A spectral analysis approach. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v.160 p. 458–465, 1999.
- ARBABI,S E MAIER, R.V. Mitogen-actived protein kinases. **Critical Care Medicine** v.30 (suppl 1), p. S74-S79, 2002.
- BADOER E, MCKINLAY D, TRIGG L, MCGRATH BP. Distribution of activated neurons in the rabbit brain following a volume load. **Neuroscience**, v.81, p.1065–77, 1997.
- BADOER,E. Hypothalamic Paraventricular Nucleus and cardiovascular regulation, **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology** ,v.28 p. 95-99, 2001
- BADOER, E., NG, C.W, DE MATTEO, R. Tonic sympathoinhibition arising from the hypothalamic PVN in the conscious rabbit. **Brain Research** v.947 p 17-24, 2002.
- BAUMANN H, GAULDIE J. The acute phase response. **Immunology Today**, v.15, n.2, p.74-80, 1994.
- BOUDABA C, SZABÓ K, TASKER JG. Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. **Journal of Neuroscience**. v.16,n.22,p.7151-60,1996.
- BOJE KM, ARORA PK. Microglial-produced nitric oxide and reactive nitrogen oxides mediate neuronal cell death. **Brain Research**. v.587, n.2, p.250–256,1992.
- BONE, R.C.; GRODZIN, C.J.; BALK, R.A. Sepsis, a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**. v.112, p. 235-243, 1997.

- BONOW RH, AÏD S, ZHANG Y, BECKER KG, BOSETTI F. The brain expression of genes involved in inflammatory response, the ribosome, and learning and memory is altered by centrally injected lipopolysaccharide in mice. **Pharmacogenomics Journal**. v.9, n.2, p.116–126,2009.
- BOURQUE, C.W. Transient calcium-dependent potassium current in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus, **The Journal of Physiology**, v.397, p.331-347, 1988.
- BROMAN, J; HASSEL, B; RINVIK, E; OTTERSEN, OP. Biochemistry and anatomy of transmitter glutamate. In: OTTERSEN, OP; STORM-MATHISEN, J. **Handbook of chemical neuroanatomy**. Amsterdam: Elsevier, p. 1-44, 2000.
- BURT, A.M. *Neuroanatomia*, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1995, p.311
- CHANG, JY; WANG, SH; CHAN, SH. Differential roles of iNOS and nNOS at rostral ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. **Shock**, v.15 p. 65-72, 2001.
- CHOI SH, LANGENBACH R, BOSETTI F. Genetic deletion or pharmacological inhibition of cyclooxygenase-1 attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory response and brain injury. **FASEB Journal**. v. 22, p. 1491-1501,2007
- COLASANTI, M e SUZUKI, H. The dual personality of NO. **Trends of Pharmacology Science** v.21, p.249-252, 2000.
- CONDÉ GL, RENSHAWA D, ZUBELEWICZ B, LIGHTMANA SL, HARBUZA MS. Central LPS-Induced c-fos Expression in the PVN and the A1/A2 Brainstem Noradrenergic Cell Groups Is Altered by Adrenalectomy. **Neuroendocrinology** ,v.70, p.175–185,1999.
- COOTE, J.H. Cardiovascular function of the paraventricular nucleus of the hypothalamus, **Biological Signals**, v.4, n.3, p.142-149, 1995.
- COOTE, J.H.; Z. YANG, S. PYNER AND J. DEERING, Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus, **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. v.25 , p. 461,1998.
- COOTE JH. A role for the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the autonomic control of heart and kidney **Experimental Physiology**,v.90 n.2,p.169-73,2005.
- CORRÊA PB, PANCOTO JA, DE OLIVEIRA-PELEGRIN GR, CÁRNIO EC, ROCHA MJ. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **Journal of Neuroimmunology**, v.183,n.1-2,p.17-25,2007.
- CUNNINGHAM ET, SAWCHENKO PE. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. **The Journal of Comparative Neurology**, v.274,p.60–76,1988.

CUNNINGHAM, P.N., WANG, Y., GUO, R., HE, G., AND QUIGG, R.J. 2004. Role of Toll-like receptor 4 in endotoxin-induced acute renal failure. **Journal of Immunology**, v.172,p.2629–2635,2004.

DAMPNEY RAL. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiological Reviews**. v.74, p.323-364, 1994.

DECAVEL C.; van den POL A.N. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus, **The Journal of Comparative Neurology**, v.302, p.1019-1037, 1990.

DERKACH, VA; OH, MC; GUIRE, ES; SODERLING, TR. Regulatory mechanisms of AMPA receptors in synaptic plasticity. **Nature Reviews in Neuroscience**, v.8, p. 101 – 113, 2007.

DOI K, LEELAHAVANICHKUL A, YUEN PST ,STAR RA. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury, **The Journal of Clinical Investigation** v. 119 n.10,p.2868-2878.

ELLENBY, MS; McNAMES, J; LAI, S; McDONALD, BA; KRIEGER, D; SELABASSI, RJ; GOLDSTEIN, B. Uncoupling and recoupling of autonomic regulation of the heart beat in pediatric septic shock. **Shock**, v.16, p.274-277, 2001.

FREMEAU, RT; JR; VOGLMAIER, S; SEAL, RP; EDWARDS, RH. VGluts define subsets of excitatory neurons and suggest novel roles for glutamate. **Trends in neuroscience**, v. 27, p. 98-103, 2004.

GAYKEMA RPA, DIJKSTRA I, TILDERS FJH. Subdiaphragmatic vagotomy suppresses endotoxin- induced activation of hypothalamic corticotropin- releasing hormone neurons and ACTH secretion. **Endocrinology** ,v.136,p.4717–4720,1995.

GLUE C, HANSEN JB, SCHJERLING P, JINQUAN T, POULSEN LK. LPS-induced cytokine production in the monocytic cell line THP-1 determined by multiple quantitative competitive PCR (QC-PCR). **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**. v.62,n.6,p.405-12,2002.

GODIN PJ, FLEISHER LA, EIDSATH A, *et al*. Experimental human endotoxemia increases cardiac regularity: Results from a prospective, randomized, crossover trial. **Critical Care Medicine**,v.24,p.1117–1124,1996.

GRIESS, JP. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt “ueber einige azoverbindugen”. **Chem. Ber.**,v. 12,p. 426-428, 1879.

HABU S, WATANOBE H, YASUJIMA M,SUDA T. Different roles of brain interleukin 1 in the adrenocorticotropin response to central versus peripheral administration of lipopolysaccharide in the rat .**Cytokine** v.10,n.5 p.390-394,1998.

HAILMAN E, VASSELON T, KELLEY M, BUSSE LA, HU MC, LICHENSTEIN HS, DETMERS PA, WRIGHT SD. Stimulation of macrophages and neutrophils by complexes of lipopolysaccharide and soluble CD14. **Journal of Immunology**. v.156,n.11,p.4384-90,1996.

HAMBLEY, J.W.; JOHNSTON, G.A.R.; SHAW, J. Alterations in a hypothalamic GABA system in the spontaneously hypertensive rat . **Neurochemistry International**, v. 6,p.813-821, 1984.

HARBUZ MS, LIGHTMAN SL: Stress and the HPA axis- acute, chronic and immunological activation. **Journal of Endocrinology**,v.134,p.327–339,1992.

HOLST, O., ULMER, A.J., BRADE, H., FLAD, H.-D., RIETSCHEL, E.T. Biochemistry and cell biology of bacterial endotoxins **Fems Immunology and Medical Microbiology**. v.16,p. 83–104,1996.

HOSOYA Y. & MATSUSHITA M. Identification and distribution of the spinal and hypophyseal projection neurons in the paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic study with the horseradish peroxidase method. **Experimental Brain Research** v.35, p.315-331,1979.

INGALLS RR, HEINE H, LIEN E, YOSHIMURA A, GOLENBOCK D. Lipopolysaccharide recognition, CD14, and lipopolysaccharide receptors. **Infectious Diseases Clinics of North America**. v.13,n.2,p.341–353. vii,1999.

JEAN- BAPTISTE,E. Cellular mechanisms in sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine** v.22, p. 63-72,2007.

JEOHN GH, KONG LY, WILSON B, HUDSON P, HONG JS. Synergistic neurotoxic effects of combined treatments with cytokines in murine primary mixed neuron/glia cultures. **Journal of Neuroimmunology**,v.85,n.1,p.1–10,1998.

KANNAN, H., A. NIIJIMA, AND H. YAMASHITA. Inhibition of renal sympathetic nerve activity by electrical stimulation of the hypothalamus paraventricular nucleus in anesthetized rats. **Journal of the Autonomic Nervous System**. v.21,p.83-86, 1987.

KILBOURN RG, GROSS SS, JUBRAN A, ADAMS J, GRIFFITH OW, LEVI R, LODATO RF . NG-methyl-L-arginine inhibits tumor necrosis factor-induced hypotension: implications for the involvement of nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, v.87,n.9,p.3629-32,1990.

KEW JN; KEMP, JA. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, v. 179, p. 4-29, 2005.

KNOTEK, M., *et al.* Endotoxemic renal failure in mice: role of tumor necrosis factor independent of inducible nitric oxide synthase. **Kidney International**. v.59,p.2243–2249,2001.

KORACH M, SHARSHAR T, JARRIN I, FOUILLOT JP, RAPHAEL JC, GAJDOS P, ANNANE D. Cardiac variability in critically ill adults: influence of sepsis. **Critical Care Medicine**,v.29,p.1380–1385, 2001.

LAKE, DE; RICHMAN,JS; GRIFFIN, MP; MOORMAN, JR. Sample entropy analysis of neonatal heart rate variability. **American Journal of Physiology**, v.283, p.R789-R797, 2002.

LEE,R.P.; WANG,D; LIN,N.T.;CHEN,H.I. Physiological and chemical indicators for early and late stages of sepsis in conscious rats. **Journal of Biomedical Science** v.9, p. 613-621,2002

LEHNARDT S, LACHANCE C, PATRIZI S, LEFEBVRE S, FOLLETT PL, JENSEN FE, *et al.* The toll-like receptor TLR4 is necessary for lipopolysaccharide-induced oligodendrocyte injury in the CNS. **Journal of Neuroscience**. v.22 ,n.7,p.2478–2486,2002.

LIEN E, MEANS TK, HEINE H, YOSHIMURA A, KUSUMOTO S, FUKASE K, *et al.* Toll-like receptor 4 imparts ligand-specific recognition of bacterial lipopolysaccharide **Journal of Clinical Investigation**. v.105 ,n.4,p.497–504,2000.

LUITEN, P.G.; ter HOST, G.J.; KARST, H.; STEFFENS, A.B. The course of paraventricular hypothalamic efferents to autonomic structures in medulla and spinal cord. **Brain Research**, v.329, n.1-2, p.374-378, 1985

LUND S, CHRISTENSEN KV, HEDTJARN M, MORTENSEN AL, HAGBERG H, FALSIG J, *et al.* The dynamics of the LPS triggered inflammatory response of murine microglia under different culture and in vivo conditions. **Journal of Neuroimmunology**. v.180, n.1–2,p.71–87,2006.

MACHADO, A.B.M. Neuroanatomia Funcional, 2a. Edição, São Paulo: Editora Atheneu, 1998, p. 229-230.

MADWED JB; ALBRETCHT P; MARK RG; COHEN RJ. Low-frequency oscillations in arterial pressure and heart rate: a simple computer model. **American Journal of Physiology** , v. 256 ,p. H1573–9,1989.

MALENKA, RC; NICOLL, RA. Long-term potentiation – a decade of progress? **Science**, v. 285, p. 1870-1874, 1999.

MALLIANI A, PAGANI M, LOMBARDI F, CERUTTI S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. **Circulation**, v.84.p.482–92,1991.

MALPAS SC & COOTE JH. Role of vasopressin in sympathetic response to paraventricular nucleus stimulation in anesthetized rats. **The American Journal of Physiology** v.266, p.228-236, 1994

MARTIN DS, RODRIGO MC, EGLAND MC, BARNES LU. Disinhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus increases mean circulatory filling pressure in conscious rats. **Brain Research**. v.756,n.1-2,p.106-13,1997.

MARTINS-PINGE, M.C.; BARALDI-PASSY, I.; LOPES, UBRÍACO O. . Excitatory effects of nitric oxide within the rostral ventrolateral medulla of freely moving rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 704-707, 1997.

MARTINS-PINGE, M. C. ; ARAÚJO, G. C. ; LOPES, UBRÍACO O . Nitric oxide dependent guanylyl cyclase participates in the glutamatergic neurotransmission within the rostral ventrolateral medulla of awake rats. **Hypertension**, v. 34, n. 2, p. 748-751, 1999.

MARTINS-PINGE, MC; MUELLER, PJ; FOLEY, CM; FRISKEY, S A; HEESCH, C M; HASSER, EM. Cardiovascular effects of nitric oxide and GABA in the paraventricular nucleus of the hypothalamus in conscious rats. **FASEB Journal** v.18, n. 4, p. A668-A668 Suppl. S ,2004

MARTINS-PINGE, MC; MUELLER, PJ; FOLEY, CM; FRISKEY, S A; HEESCH, C M; HASSER, EM. Tonic cardiovascular effects in paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats: GABA, glutamate and NO. **FASEB Journal** v.19 n.4,p.A598-A599 Part 1 Suppl. S ,2005

MAYER, B., ANDREW, P. Nitric oxide synthases : catalytic function and progress towards selective inhibition. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** v.358, n.1, p.127-133, 1998.

MAYER, M.L. Glutamate receptor ion channels. **Curr. Opin. Neurobiol.**, v. 15, p. 282-288, 2005.

MAYEUX,P.R. Pathobiology of lipopolysaccharide. **Journal of Toxixology and Enviromental Health** v.51, p.415-435,1997.

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

MICHIE HR, MANOGUE KR, SPRIGGS DR, REVHAUG A, O'DWYER S, DINARELLO CA, CERAMI A, WOLFF SM, WILMORE DW. Detection of circulating tumor necrosis factor after endotoxin administration. **The New England Journal of Medicine**. v.318, p.1481–1486, 1988.

MONCADA S. e HIGGS, E.A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **New England Journal of Medicine** v.329, p.2002-2012, 1993.

MONCADA, S; HIGGS, EA. The Discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**.,v.47 n.1,p.S193-S201, 2006.

MONTANO,N; GNECCHI RUSCONE, T; PORTA, A; LOMBARDI, F; PAGANI, M; MALLIANI, A. Power spectral analysis of heart rate variability to assess the changes in sympathovagal balance during graded orthostatic tilt. **Circulation**, v.90,p.1826-1831, 1994.

MORRISON DC, RYAN JL. Endotoxins and disease mechanisms. . **Annual Review of Medicine**. v.38,p.417-32,1987.

MOTAWEI K., PYNER S., RANSON R. N., MAHER K. AND COOTE J. H. Terminals of paraventricular spinal neurons are closely associated with adrenal medullary sympathetic preganglionic neurons: immunocytochemical evidence for vasopressin as a possible neurotransmitter in this pathway. **Experimental Brain Research**,v.126, p.68-76,1999.

NAVA,L; PALMER,R.M.J.; MONCADA,S. Role of nitric oxide in endotoxic shock: effects of L-NMA. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v.20, p.S132-S134.,1992.

NAVARRO-GONZÁLVEZ, J A.; GARCÍA-BENAYAS, C.; ARENAS, J. Semiautomated measurement of nitrate in biological fluids. **Clinical Chemistry**, v.44,n.3,p.670-681, 1998.

NDUKA, O.O; PARRILLO, J.E. The pathophysiology of septic shock. **Critical Care Medicine** v.25 p.677-702,2009

OLSON NC, HELLYER PW, DODAM JR. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. **The British Veterinary Journal**. v.151 ,n.5 ,p.489-522,1995.

PAGANI, M; LOMBARDI, F; GUZZETTI, S; RIMOLDI,O; FURLAN,R; PIZZINELLI, P; SANDRONE, G; MALFATTO,G; DELL'ORTO, S; PICCALUGA,E; TURIEL,M; BASELLI,G; CERUTTI,S; MALLIANI,A. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variability as a marker of sympathovagal interaction in man and conscious dogs. **Circulation Research**., v.59,p.178-193, 1986.

PARKER MM, MCCARTHY KE, OGNIBENE FP, *et al*. Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression of septic shock in humans. **Chest** v.97,p.126–31,1990.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd. Edition, **Academic Press**, Sydney, 1986.

POELAERT J, DECLERCK C, VOGELAERS D, *et al*. Left ventricular systolic and diastolic function in septic shock. **Intensive Care Med** v.23,p.553–60,1997.

PYNER S. & COOTE JH. Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord . **Neuroscience** v. 100, n. 3, p. 549-556, 2000.

QUAN, N., WHITESIDE, M., HERKENHAM, M. Time course and localization patterns of interleukin-1beta messenger RNA expression in brain and pituitary after peripheral administration of lipopolysaccharide. **Neuroscience** v.83, p.281–293,1998.

QUAN, N., HE, L., LAI, W. Endothelial activation is an intermediate step for peripheral lipopolysaccharide induced activation of paraventricular nucleus. **Brain Research Bulletin**. v.59, p.447– 452,2002.

RAMACHANDRA, RN, SEHON, AH, BERCI, I., 1992. Neurohormonal host defense in endotoxin shock. **Brain Behavior and Immunity**. v.6, p.157–169,1992.

RADOMSKI, M.W.; PALMER, R.M.; MONCADA, S. Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** v.87, p.10043-10047, 1990.

RANSON RN, MOTAWEI K, PYNER S & COOTE JH. The paraventricular nucleus of the hypothalamus sends efferents to the spinal cord of the rat which closely appose

sympathetic preganglionic neurons projecting to the stellate ganglion. **Experimental Brain Research**. v.120, p.164-172,1998.

RIVEST S, LAFLAMME N. Neuronal activity and neuropeptide gene transcription in the brain of immune-challenged rats. **Journal of Neuroendocrinology** v.7 p. 501–525, 1995.

RIVIER C: Influence of immune signals on the hypothalamo-pituitary axis of the rodent. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v.16,p.151–182,1995.

RIVIER C. Role of nitric oxide in regulating the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxemia. **Annals of the New York Academy of Sciences**.v. 992, p.72-85, 2003.

ROLAND BL, SAWCHENKO PE. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. **Journal of Comparative Neurology**. v.332 n.1,p.123-43,1993.

SAPER CB, LOEWY AD, SWANSON LW & COWAN WM. Direct hypothalamo-autonomic connections. **Brain Research**. v.117, p.305-312,1976.

SAYK F, VIETHEER A, SCHAAF B, WELLHOENER P,WEITZ G LEHNERT H & DODT C. **American Journal of Physiology Regulatory Integrative and Comparative Physiology** v.295 p.891-898, 2008

SCHMAHL FW, BETZ E, HECKERS H, REINHARD U, SCHLOTE W, URBASCHEK B. Metabolic and morphologic brain reactions in shock induced by intracisternal injection of endotoxin. **Advances in Shock Research**, v.4,p.113-7,1980.

SHAPIRO,LE GELFAND,J.A; Cytokines and sepsis: pathology and therapy. **New Horizons** v.1, p.13-22,1993

SHAPOVAL, LN; SAGACH,VF; POBEGAILO, LS. Nitric oxide influences ventrolateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. **Neuroscience Letters**, v.132, p. 47-50, 1991.

SAWCHENKO PE, SWANSON LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Research**. v.257,n.3,p.275-325,1982.

SWANSON, L.W. Mapping the human brain: past, present and future. **Trends in Neuroscience**. v.18, p.471–474,1995.

SWANSON, L.W.; KUYPERS, H.G. The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods, **The Journal of Comparative Neurology**, v.194, n.3, p.555-570, 1980.

SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annual Review of Neuroscience**, v.6, p.269-324, 1983

SWANSON, L.W., MCKELLAR, S. The distribution of oxytocin-neurophysinstained fibres in the spinal cord of the rat and monkey. , **The Journal of Comparative Neurology** v.188, p.87–106,1979.

SHAFTON A. D., RYAN A. & BADOER E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. **Brain Research**. v.801, p.23-243,1998.

SAUL JP. Beat-to-beat variations of heart rate reflect modulation of cardiac autonomic outflow. **NIPS** v.5,p.32–7,1990.

SAWCHENKO PE, Swanson LW: The organisation of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. **Brain Research Reviews**,v.4,p.275–325,1982.

SINGH AK, JIANG Y. How does peripheral lipopolysaccharide induce gene expression in the brain of rats? **Toxicology**. v.201,n.1-3,p.197-207,2004.

Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing and Electrophysiology: Heart rate variability: Standards of measurement, physiological interpretation, and clinical use. **Circulation** ,v.93,p.1043–1065 ,1996.

TASKER, J.G.; DUDEK, F.E. Local inhibitory synaptic inputs to neurones of the paraventricular nucleus in slice of rat hypothalamus, **The Journal of Physiology**, v.469, n.179-192, 1993

TASKER, J.G.; DUDEK, F.E. Electrophysiological properties of neurons in the region of the paraventricular nucleus in slices of rat hypothalamus. **The Journal of Physiology**, v.434, p.271-293, 1991

TIWARI, M.M., BROCK, RW., MEGYESI, JK., KAUSHAL, GP & MAYEUX, PR. Disruption of renal peritubular blood flow in lipopolysaccharideinduced renal failure: role of nitric oxide and caspases. **American. Journal of Physiology: Renal Physiology** v.289, p.F1324–1332, 2005.

THIEMERMANN C, VANE J. Inhibition of nitric oxide synthesis reduces the hypotension induced by bacterial lipopolysaccharides in the rat in vivo. **European Journal of Pharmacology**. v.182,n.3,p.591-5,1990.

TOTH ZE, PALKOVITS M. Distributions of periventricular projections of the paraventricular nucleus to the median eminence and arcuate nucleus. **Brain Research** v.802,p. 294–297,1998

TURRIN, N.P., GAYLE, D., ILYIN, S.E., FLYNN, M.C., LANGHANS, W.,SCHWARTZ, G.J., PLATA-SALAMAN, C.R. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine mRNA induction in the periphery and brain following intraperitoneal administration of bacterial lipopolysaccharide. **Brain Research Bulletin**. v.54, p.443–453,2002.

ULEVITCH RJ, TOBIAS PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Annual Review in Immunology**.v.13:p.437-57,1995.

VASSELON T, HAILMAN E, THIERINGER R, DETMERS PA. Internalization of monomeric lipopolysaccharide occurs after transfer out of cell surface CD14. **Journal of Experimental Medicine**.v.190 ,n.4,p.509-21,1999.

VAYSETTES-COUCHAY, C., BOUYSET, F., VERBEUREN,T.J. Involvement of COX and NOS induction in the sympatho-activation during sepsis. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.98, p. 33-36, 2002

VAYSETTES-COUCHAY, C., BOUYSET, F., VERBEUREN,T.J. Sympathetic activation and tachycardia in lipopolysaccharide treated rats are temporally correlated and unrelated to the baroreflex. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v.120, p. 35-45, 2005.

XIA Y, KRUKOFF TL.Differential neuronal activation in the hypothalamic paraventricular nucleus and autonomic/neuroendocrine responses to I.C.V. endotoxin. **Neuroscience**. v.121, n.1,p.219-31,2003.

YANG Z & COOTE JH Influence of the hypothalamic paraventricular nucleus on cardiovascular neurones in the rostral ventrolateral medulla of the rat .**Journal of Physiology** , v.513.2, p. 521—530,1998.

YANG Z. & COOTE JH. The influence of the paraventricular nucleus on baroreceptor dependent caudal ventrolateral medullary neurons of the rat. **Pflügers Arch**. v.438, p.47-52,1999.

WAN, W; WETMORE, L; SORENSEN, CM; GREENBERG, AH; NANCE, DM. Neural and biochemical mediators of endotoxin and stress-induced c-fos expression in the rat brain. **Brain Research. Bulletin.**, v.34 ,n.1, p.7-14, 1994.

WAN G,H; VISHNUBHAKAT, JM, BLOOM,O ; *et al*. Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1 $\beta$  stimulate release of high mobility group protein-1 by pituicytes. **Surgery** v.126, p.389-392,1999.

WATKINS, JC; JANE, DE. The glutamate story. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, suppl 1, p. S100-108, 2006.

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

WOLKOW, PP. Involvement and dual effects of nitric oxide in septic shock. **Inflammation Research** v.47, p.152-166,1998.

WOLLMUTH, L.P.; SOBOLEVSKY,A.I. Structure and gating of the glutamate receptor ion channel. **Trends Neurosci**. v.27, p.321-328,2004.

WRIGHT, SD. CD14 and innate recognition of bacteria. **Journal of Immunology** v.155, p. 6-8, 1995

ZHANG K & PATEL KP. Effect of nitric oxide within the paraventricular nucleus on renal sympathetic nerve discharge: role of GABA. **American Journal of Physiology:Regulatory Integrative and Comparative Physiology** v.275,p.728-734, 1998.