

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

MARIANE CRISTINA GUTTERVILL LEITE

**PARTICIPAÇÃO DE ENDOCANABINÓIDES, ARGININA-VASOPRESSINA E
ENDOTELINA-1 EM UM MODELO DE SEPSE SEVERA (CLP) EM RATOS**

Curitiba

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
FARMACOLOGIA

MARIANE CRISTINA GUTTERVILL LEITE

**PARTICIPAÇÃO DE ENDOCANABINÓIDES, ARGININA-VASOPRESSINA E
ENDOTELINA-1 EM UM MODELO DE SEPSE SEVERA (CLP) EM RATOS**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal do Paraná
para obtenção do título de Mestre
em Farmacologia.

Área de concentração:

Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Aleksander
Roberto Zampronio

Curitiba

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Leite, Mariane Cristina Guttervill

Participação de endocanabinóides, arginina-vasopressina e endotelina-1 em um modelo de sepse severa (CLP) em ratos. / Mariane Cristina Guttervill Leite. – Curitiba, 2014.

101 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Aleksander Roberto Zampronio

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

1. Sepse 2. Arginina Vasopressina 3. Endotelina-1 I. Título II. Zampronio, Aleksander Roberto III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.

CDD (20. ed.) 615.7



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Farmacologia



PARECER

A Comissão Examinadora da Dissertação de Mestrado intitulada "PARTICIPAÇÃO DE ENDOCANABINÓIDES, ARGINININA-VASOPRESSINA E ENDOTELINA-1 EM UM MODELO DE SEPSE SEVERA (CLP) EM RATOS", de autoria da pós-graduanda MARIANE CRISTINA GUTTERVILL LEITE, sob orientação do Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio e composta pelos professores Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Presidente - Farmacologia - UFPR); Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia - UFPR) e Prof.^a Dr.^a Yanna Dantas Ratmann (Saúde Comunitária - UFPR), reuniu-se e, de acordo com o Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, a pós-graduanda foi APROVADA. Para a devida publicação o trabalho deverá sofrer as modificações sugeridas, que serão conferidas por seu orientador. Em Curitiba, 30 de junho de 2014.

Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio (Presidente - Farmacologia - UFPR)

Prof.^a Dr.^a Alexandra Acco (Farmacologia - UFPR)

Prof.^a Dr.^a Yanna Dantas Ratmann (Saúde Comunitária - UFPR)

Dedico este trabalho aos meus pais João Batista e Maria Josefa, e ao meu irmão João. Pelo amor e dedicação de uma vida inteira.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu professor orientador Aleksander Zamprônio, pela oportunidade, pela ajuda incondicional, por todos os ensinamentos e experiência repassada, pela paciência e pela confiança em meu trabalho e pela dedicação com que me mostrou o melhor caminho para a execução deste trabalho. Recebi nobres ensinamentos de um nobre professor. Fica aqui o meu muito obrigada e a minha admiração.

As pessoas mais importantes de minha vida: minha mãe, Maria pela disposição, pelos ensinamentos, pela companhia e pelo amor inesgotável; ao meu pai João pelo apoio, incentivo ao estudo, pelos ensinamentos e pela compreensão nos momentos de ausência e ao meu irmão João, pela torcida, pela companhia e por ser meu amigo. Ao meu amor, Aleksander Avalca, por ter sido muito companheiro e estar presente em todos os momentos dessa jornada. Pelo incentivo e apoio constante, por ser acima de tudo meu amigo. A concretização desse sonho só foi possível com o apoio e a colaboração mútua de vocês.

A minha avó, Maria Valdolina, (*in memoriam*) pelas orações, pela generosidade, pelo incentivo e pela torcida durante esta jornada.

Ao amigo Daniel Fraga, pela ajuda na realização dos experimentos iniciais, pelos ensinamentos e pelas valiosas contribuições.

A todos os pesquisadores e colegas do Laboratório de Inflamação e Febre, em especial: a Amanda, pela ajuda nos experimentos, pelas conversas, pelos ensinamentos e pelas experiências trocadas. A Georgea, pela companhia durante muitos almoços e seminários. Ao Luís, pela ajuda nos experimentos,

pelos momentos de descontração, pelas conversas e pelas risadas. A Haíssa, pela ajuda nos experimentos, pela companhia e pelas conversas. As alunas de Iniciação Científica, Débora e Fernanda, pela contribuição em meu trabalho. A Tatiane, ao Diego e a Bruna, pela amizade. A todos obrigada, pela disponibilidade em ajudar na execução deste trabalho, pela amizade, pelos grandes momentos de convívio e por todos os ensinamentos repassados. E por compartilharem comigo as dúvidas e angústias dessa vida acadêmica

A todos os professores do colegiado do PPG em Farmacologia por contribuírem para minha formação.

A professora Sarai Hess da Universidade do Contestado, pela oportunidade de trabalhar com pesquisa durante a graduação, ao professor Eduardo Manoel da Universidade da Região de Joinville, pelos valiosos ensinamentos em Farmacologia.

Aos funcionários do Departamento de Farmacologia por sempre estarem prontos para ajudar e aos funcionários do Biotério pelo bom atendimento e pelo fornecimento dos animais.

Aos animais experimentais. Obrigada por terem sido a ferramenta para o meu aperfeiçoamento.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

Aos meus familiares e amigos muito obrigada!

A todos aqueles que torceram por mim e que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão desta pesquisa.

Nada lhe posso dar que já não exista em você mesmo. Não posso abrir-lhe outro mundo de imagens, além daquele que há em sua própria alma. Nada lhe posso dar a não ser a oportunidade, o impulso, a chave. Eu o ajudarei a tornar visível o seu próprio mundo, e isso é tudo.

Hermann Hesse

RESUMO

Estudos prévios demonstraram que a endotelina-1(ET-1) reduziu a frequência de correntes excitatórias espontâneas em células magnocelulares de ratos através da ativação de receptores ET_A. Como se obteve uma redução na frequência de disparo e não na amplitude das correntes, esses dados sugeriram um efeito pré-sináptico. Além disso, o antagonista canabinóide CB₁ aboliu esse efeito sugerindo um envolvimento dos endocanabinóides (eCB). Estudos anteriores demonstraram também que durante a sepse ocorre um aumento nos níveis de eCB e ET-1. Deste modo aventamos a hipótese de que durante a sepse severa, a ET-1 por meio da ativação do receptor ET_A induz uma liberação de eCB, os quais causariam uma diminuição dos níveis de arginina vasopressina (AVP), e isso poderia contribuir para o aumento da mortalidade nesta condição clínica. A sepse foi induzida em ratos Wistar machos (180-200g) por ligação e punção do ceco (CLP). Uma curva de sobrevida utilizando 1, 3 e 9 furos foi feita com o objetivo de determinar o número de furos necessários para induzir sepse severa. Na curva de sobrevida, os ratos com 1,3 e 9 furos, apresentaram uma taxa de sobrevida de 84%, 26% e 0%, respectivamente. O número de furos escolhido para os experimentos subsequentes foi 3. Nos experimentos subsequentes, os animais foram tratados com antagonista do receptor CB₁ rimonabanto (10 mg/kg ou 20 mg/kg, p.o.) 4 h após a CLP ou antagonista de receptor ET_A BQ123 (100 pmol i.c.v.), 2h e 4h, 4 e 8 h, e 8 h após a CLP ou com antagonista de receptor ET_B BQ 788 (100 pmol, i.c.v.), 4 e 8 h após a CLP e a sobrevida foi analisada por 7 dias. Os animais tratados com Rim (10 mg/kg e 20 mg/kg) apresentaram um aumento na taxa de sobrevida em relação ao grupo CLP/veículo. No tratamento com BQ 123, 2 e 4h ou 8 h após a CLP, os animais não apresentaram um aumento na taxa de sobrevida. Por outro lado, no tratamento com BQ123 4 e 8 h após a CLP, houve um aumento significativo na taxa de sobrevida em relação ao grupo controle (CLP/veículo). Diferentemente, o tratamento dos animais com BQ788, 4 e 8 h após a CLP não modificou a taxa de sobrevida dos animais. Para a medida da temperatura corporal (T_c), 5 dias antes da CLP, registradores de temperatura foram implantados na cavidade peritoneal dos animais. A T_c foi medida em intervalos de 30 min, 2 h antes até 12 h após a CLP. Na avaliação da temperatura, a CLP induziu um aumento da temperatura corporal dos animais e o rimonabanto reduziu este aumento a níveis similares àqueles observados para o grupo falso-operado. Para a avaliação da migração celular, após o tratamento com antagonista de receptor CB₁ ou com veículo foi realizada a coleta do exsudato peritoneal dos animais 8 h após a CLP e posteriormente foi feita a contagem global e diferencial de leucócitos. A CLP induziu um aumento significativo na migração de leucócitos, particularmente neutrófilos para a cavidade peritoneal dos animais. O tratamento dos animais com rimonabanto não alterou a migração celular para o peritônio. Ainda, foi realizada a coleta de sangue dos animais por punção cardíaca 2, 4, 6, 8 e 12 h após a CLP, juntamente com o tratamento dos animais com rimonabanto 4 h após a CLP ou com BQ123 4 e 8 h após a CLP. O número de leucócitos circulantes foi avaliado em todos os tempos, enquanto que os níveis circulantes de interleucina-6 (IL-6) foram avaliados 6 e 8 h após a CLP e os níveis de AVP foram avaliados 6, 8 e 12 h após a CLP. Não foram encontradas diferenças significativas no número de leucócitos circulantes 2 h

após a CLP. Na contagem global e diferencial de leucócitos circulantes 4h após a CLP foi observado neutropenia do grupo CLP/veículo em relação ao sham e após 6h foi observado leucopenia decorrente de neutropenia e linfopenia do grupo CLP/veículo. O tratamento com rimonabanto não modificou nenhum destes parâmetros. Em relação à dosagem de IL-6, 6 e 8 h após a CLP houve um aumento nos níveis plasmáticos de IL-6 e o tratamento dos animais com rimonabanto também não modificou este aumento. Na avaliação da dosagem de AVP, após 12 h os grupos CLP/Rim e CLP/BQ123 apresentaram aumento dos níveis de AVP comparado aos grupos CLP/Veículo. Para a análise estatística das curvas de sobrevida foi realizado teste de log rank. Para os testes de migração, leucometria, níveis de AVP e níveis de IL-6 foi realizada ANOVA de uma via seguido pelo teste de Bonferroni, enquanto que para os testes de temperatura foi utilizada ANOVA de duas vias seguido do teste de Bonferroni. Estes dados sugerem que o bloqueio de receptores CB₁ e de receptores centrais ET_A previne a mortalidade induzida por CLP em ratos. O bloqueio dos receptores CB₁, não alterou respostas periféricas como migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, contagem global e diferencial de leucócitos e níveis de IL-6 mas reduziu a resposta febril e alterou os níveis de AVP no plasma sugerindo uma ação central desse antagonista. Nossos resultados mostram que o bloqueio de receptores centrais ET_A e CB₁ aumentam os níveis de AVP na fase tardia da sepse induzida por CLP e este efeito está relacionado a um aumento da sobrevida dos animais após a administração desses antagonistas.

Palavras-chaves: sepse, endocanabinóides, arginina-vasopressina e endotelina-1.

ABSTRACT

Previous studies have shown that endothelin-1 (ET-1) was able to reduce the frequency of spontaneous excitatory currents in magnocellular cells of rats through activation of ET_A receptors. As there was a reduction in the firing frequency and not at the amplitude of the currents, the data suggested a presynaptic effect. Further, the CB₁ antagonist abolished this inhibitory effect suggesting the involvement of endocannabinoids (eCB). Previous studies also demonstrated that during sepsis there was an increased of ET-1 and eCB levels. Thus we hypothesized that during severe sepsis, ET-1 through the activation of the ET_A receptor induces a release of eCB, which would cause a decrease in the levels of arginine vasopressin (AVP), and this could contribute to increased mortality in this condition. Sepsis was induced in Male Wistar rats (180-200g) by cecal ligation and puncture (CLP). A survival curve was performed using 1, 3 and 9 punctures in order to determine the number of punctures needed to induce severe sepsis. In the survival curve, the animals with 1, 3 and 9 punctures presented a survival rate of 84 %, 26 % and 0 %, respectively. The number of punctures chosen for the subsequent experiments was 3. In subsequent experiments, animals were treated with CB₁ receptor antagonist rimonabant (Rim, 10 mg/kg or 20 mg/kg, by oral route) 4 h after CLP or receptor antagonist BQ123 ET_A (100 pmol icv), 2h and 4h, 4 and 8 h and 8 h after CLP or ET_B receptor antagonist BQ 788 (100 pmol, icv), 4 and 8 h after CLP and survival was assessed for 7 days. Animals treated with Rim (10 mg/kg and 20 mg/kg) showed an increase in survival compared to the CLP group / vehicle. In the treatment with BQ 123, 2 and 4 h or 8 h after CLP, the animals did not show an increase in survival. Moreover, in the treatment with BQ123, 4 h and 8 h after CLP, there was a significant increase in survival compared to the control group (CLP/vehicle). In contrast, treatment of animals with BQ788, 4 and 8 h after CLP did not alter the survival rate of the animals. To measure body temperature (T_c), 5 days before CLP, temperature recorders were implanted in the peritoneal cavity of animals. The T_c was measured at intervals of 30 min, 2 h before until 12 h after CLP. In assessing the temperature, CLP induced an increase in body temperature of the animals and Rimonabant reduced this increase to levels similar to those observed in the sham group. For the assessment of cell migration after treatment with CB₁ receptor antagonist or with vehicle, collecting the peritoneal exudate of the animals was performed 8 h after CLP and the global leukocyte count and differential was performed. The CLP induced a significant increase in the migration of leukocytes, particularly neutrophils into the peritoneal cavity of the animals. Treatment with rimonabant did not alter the cell migration into the peritoneum. The collection of blood from the animals by cardiac puncture 2, 4, 6, 8 and 12 h after CLP was performed, along with the treatment of animals with rimonabant, 4 h after CLP or BQ123, 4 and 8 h after CLP. The number of circulating leukocytes was assessed at all times while circulating levels of interleukin-6 (IL-6) were evaluated 6 and 8 h after CLP and levels of AVP were evaluated 6, 8 and 12 h after CLP. Treatment with rimonabant did not modify any of these parameters. Regarding IL-6, 6 and 8 h after CLP there was an increase in plasma levels of IL-6 and rimonabant treatment of animals also did not change with this increase. In assessing the dosage of AVP, 12 h after CLP, CLP/Rim and CLP/BQ123 groups showed increased levels of AVP compared with CLP/vehicle group. For statistical

analysis of survival curves was performed log rank test. For tests of cell migration, leukocyte count, and measurement of AVP and IL-6 one-way ANOVA followed by Bonferroni test was performed. And for temperature, two-way ANOVA followed by Bonferroni test was used. We have shown in this study that the blockage of CB₁ receptors and central ET_A receptors prevented the mortality induced by CLP in rats. These data suggest that blockade of central CB₁ receptors and ET_A receptors prevent CLP-induced mortality in rats. Blockade of CB₁ receptors, did not alter peripheral responses such as neutrophil migration into the peritoneal cavity, global and differential leukocyte count and IL-6 but reduced the febrile response and altered levels of AVP in plasma suggesting a central action of this antagonist. Our results show that the blockage of central ET_A and CB₁ receptors and increase levels of AVP in the late phase of CLP induced sepsis and this effect is related to an increased survival of the animals after administration of these antagonists.

Keywords: Sepsis, endocannabinoids, arginine vasopressin and endothelin-1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Síntese da anandamida:.....	29
Figura 2: Síntese do 2-AG:	29
Figura 3: Mecanismos de inativação dos endocanabinóides:.....	30
Figura 4: Curva de sobrevivência dos animais após CLP:	58
Figura 5: Efeito do tratamento com rimonabanto após a CLP sobre a taxa de sobrevivência dos animais:	60
Figura 6: Efeito do tratamento com BQ123 2 e 4 h ou 8 h após CLP sobre a taxa de sobrevivência dos animais:	62
Figura 7: Efeito do tratamento com BQ 123 e BQ 788 4 e 8 h após a CLP sobre a taxa de sobrevivência dos animais:	63
Figura 8: Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto sobre a temperatura corporal dos animais após CLP:	65
Figura 9: Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto sobre a migração celular para a cavidade peritoneal após a CLP:.....	68
Figura 10: Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto sobre os níveis plasmáticos de IL-6 após CLP:	69
Figura 11: Avaliação do número de leucócitos circulantes 2 e 4 h após a indução de CLP:.....	70
Figura 12: Efeito do rimonabanto sobre o número de leucócitos circulantes 6 e 8 h após a indução de CLP:	71
Figura 13: Efeito do do tratamento dos animais com rimonabanto ou com BQ123 sobre os níveis plasmáticos de AVP após CLP:	73
Figura 14: Representação esquemática da sequência de eventos proposta a partir dos resultados obtidos neste estudo:	87

LISTA DE ABREVIATURAS

2-AG: 2-araquidonoilglicerol

ACCP: Associação Americana de Médicos Pneumologistas

ACTH: Hormônio adrenocorticotrófico

ADH: hormônio antidiurético

AEA: anandamida

AM251: antagonista de receptor CB₁

AMPC: adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: análise de variância

ANP: peptídeo natriurético atrial

ATP: trifosfato de adenosina

AVP: arginina vasopressina

BQ123: antagonista de receptor ET_A

BQ788: antagonista de receptor ET_B

CaM: camoldulina

CB₁: receptor canabinóide tipo 1

CB₂: receptor canabinóide tipo 2

CLP: ligadura e punção do ceco

CMC: carboximetilcelulose

COX-2: ciclooxigenase 2

CXCR2: receptor de quimiocina

DAG: diacilglicerol

DAG-lipase: sn-1-diacilglicerol lipase

DGL: diacilglicerol lipase

DNA: deoxiribonucleico

e.p.m.: erro padrão da média

eCB: endocanabinóides

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético disódico

ELISA: ensaio imunoadsorvente ligado à enzima

eNOS: óxido nítrico sintase endotelial

ET-1: Endotelina-1

ET-2: Endotelina-2

ET-3: Endotelina-3

ET_A: receptor para endotelina tipo A

ET_B: receptor para endotelina tipo B

FAAH: amida hidroxilase dos ácidos graxos

GABA: ácido amino gaba butírico

GPCR: receptor de proteína acoplado à proteína G

HMGB: grupo de alta mobilidade B1

i.c.v.: intracerebroventricular

I.P. intraperitoneal

IL: interleucina

IP₃: inositol trifosfato

KATP: canais de potássio sensíveis ao ATP

Liso PI: liso fosfatidil inositol

LPA: ácido lisofosfatídico

LPS: lipopolissacarídeo

LTA: ácido lipoteicóico

MIF: fator inibidor de macrófago

MODS: síndrome da falência múltipla de órgãos

RNAm: RNA mensageiro

NAPE-PLD: n-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D

NAT: n-acetil transferase

NF-kB: fator de transcrição nuclear kB

NLR: receptor do tipo NOD

NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain receptors*

OTR: receptor de ocitocina

P.O. via oral

PaCO₂: pressão de CO₂ na artéria pulmonar

PAMP: padrão molecular associado a patógenos

PBS: salina tamponada com fosfatos

PE: fosfatidietanolamina

PGE₂: prostaglandina E₂

PGI₂: prostaciclina

PI: fosfatidilinositol

PIP₂: fosfatidilinositol bifosfato

PKC: proteína quinase C

PLC β : fosfolipase C β

PMN: polimorfonucleares

PRRs: receptor de reconhecimento de patógeno

PVN: núcleo paraventricular

q.s.p.: quantidade suficiente para

ROS: espécies reativas de oxigênio

S.C. subcutâneo

SCCM: Sociedade de Medicina de Cuidados Intensivos

SIRS: síndrome da resposta inflamatória sistêmica

SON: núcleo supraótico

Tc: temperatura corporal

TGF β : fator de crescimento de transformação β

THC: tetraidrocanabinol

TLRs: receptor do tipo Toll

TNF- α : Fator de necrose tumoral- α

UCI: unidade de cuidado intensivo

UTIs: Unidades de Tratamento Intensivo

V₁: receptor de vasopressina do tipo V₁

V₂: receptor de vasopressina do tipo V₂

V₃: receptor de vasopressina do tipo V₃

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Epidemiologia e fisiopatologia da sepse:.....	20
1.2 Endocanabinóides e sepse.....	27
1.3 Arginina-vasopressina e sepse.....	34
1.4 Endotelina-1 e sepse.....	39
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 Animais:.....	45
3.2 Soluções:.....	45
3.4 Indução de Sepse por Ligadura e Perfuração do Ceco (CLP).....	47
3.5 Design experimental I: Curva de sobrevida.....	48
3.6 Design experimental II: Efeito dos tratamentos com antagonistas CB ₁ , ET _A e ET _B na sobrevida dos animais.....	48
3.6.1 Efeito do tratamento com antagonista CB ₁ na sobrevida dos animais.....	49
3.6.2 Cirurgia para implantação de cânulas no ventrículo lateral.....	49
3.6.3 Efeito dos tratamentos com antagonistas ET _A e ET _B na sobrevida dos animais.....	50
3.7 Design experimental III: Avaliação da temperatura corporal após o tratamento com antagonista CB ₁	51
3.7.1 Cirurgia de Implante do registrador de temperatura.....	51
3.7.2 Efeito do bloqueio do receptor CB ₁ na temperatura corporal (T _c):.....	52
3.8 Design experimental IV: Efeito do antagonista de receptor CB ₁ sobre a migração celular para a cavidade peritoneal induzida durante a sepse.....	53
3.9 Design experimental V: Efeito do antagonista de receptor CB ₁ sobre leucopenia/leucocitose e sobre os níveis circulantes de IL-6 durante a sepse.....	54
3.10 Design experimental VI: Efeito do antagonista de receptor CB ₁ e do antagonista de receptor ET _A sobre os níveis circulantes de AVP durante a sepse.....	55
3.11 Análise estatística.....	55
4 RESULTADOS.....	57
4.1 Curva de sobrevida após indução de sepse severa por CLP:.....	57
4.2 Efeito do tratamento com rimonabanto na sobrevida dos animais após indução de sepse severa por CLP:.....	59
4.3 Efeito do tratamento com antagonistas dos receptores ET _A e ET _B na taxa de sobrevida após a CLP:.....	61

4.4 Efeito do tratamento com rimonabanto na temperatura corporal dos animais após CLP	64
4.5 Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto na migração celular, níveis de IL-6 e no número de leucócitos circulantes após a CLP	66
4.6 Efeito do rimonabanto e do BQ 123 sobre os níveis circulantes de AVP após CLP	72
5 DISCUSSÃO	74
6 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88

1 INTRODUÇÃO

A sepse envolve a liberação de diversos mediadores inflamatórios, neuropeptídeos e hormônios. Neste estudo, focalizaremos a endotelina-1 (ET-1), a arginina vasopressina (AVP) e os endocanabinóides endógenos (eCB), buscando uma relação entre eles neste processo. A razão para isto reside em estudos anteriores de nosso grupo que evidenciaram uma relação entre ET-1, eCB e AVP através de estudos eletrofisiológicos (ZAMPRONIO et al., 2010). Neste estudo, observamos que a ET-1 foi capaz de reduzir a frequência das correntes excitatórias espontâneas em células magnocelulares do núcleo supra-óptico de ratos através da ativação de receptores ET_A . Como houve redução na frequência de disparos e não na amplitude das correntes, os dados sugeriram um efeito pré-sináptico. Ainda, o antagonista de receptores CB_1 AM251 aboliu este efeito inibitório sugerindo a participação de eCB agindo retrogradamente nos neurônios pré-sinápticos (ZAMPRONIO et al., 2010). No entanto, estes estudos foram feitos em fatias isoladas de cérebro e, portanto, não sabemos qual correlação com estados clínicos ou sua utilidade terapêutica, se é que há alguma.

Neste estudo, será testada a hipótese de que durante a sepse severa, a ET-1, através da ativação de receptores ET_A presentes no sistema nervoso central, induz a liberação eCB, os quais agindo retrogradamente causam uma diminuição na neurotransmissão glutamatérgica, e como consequência há um decréscimo na liberação de AVP, e em resposta a isso ocorre uma diminuição nos mecanismos vasopressores compensatórios contribuindo para o aumento na morbidade e mortalidade na sepse.

Estas hipóteses serão investigadas em um modelo de sepse severa em ratos através do modelo de ligação e punção cecal (CLP, do inglês *Cecal Ligation and Puncture*). Deste modo, torna-se necessário inicialmente alguns esclarecimentos sobre a epidemiologia e fisiopatologia da sepse e posteriormente, o que já é conhecido sobre o envolvimento de ET-1, eCB e AVP nesta condição em ratos para que possamos dar prosseguimento ao estudo.

1.1 Epidemiologia e fisiopatologia da sepse:

A sepse é definida como uma resposta inflamatória sistêmica proveniente de uma infecção. Em 1991, uma conferência foi realizada pela *American College of Chest Physicians* (ACCP) e pela *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) e foi desenvolvida uma definição simples e universal para sepse, com o objetivo de facilitar sua pesquisa, melhorar seu diagnóstico precoce e seu tratamento. Um resultado importante desta conferência foi à introdução do termo “Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica” (SIRS), a qual é definida como uma combinação de vários sinais clínicos sem a existência de uma infecção subjacente (BONE et al., 1992). A SIRS pode ser desencadeada por uma série de condições não infecciosas, como trauma, queimaduras, choque hipovolêmico, pancreatite, e outras doenças.

Clinicamente, a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS) é diagnosticada quando há a ocorrência de, no mínimo, dois dos seguintes critérios: febre acima de 38°C ou hipotermia abaixo de 36°C, taquicardia com frequência cardíaca acima de 90 batimentos/minuto, taquipnéia com frequência

respiratória acima de 20 movimentos respiratórios por minuto ou hiperventilação com PaCO₂ abaixo de 32 mmHg, leucocitose acima de 12.000/mm³ ou leucopenia abaixo de 4.000/mm³ ou mais de 10% de formas bastonetes (BONE et al., 1992; DELLINGER et al., 2013; MEMBERS OF THE AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS COMMITTEE, 1992). Já o diagnóstico de sepse requer uma evidência clínica de infecção, juntamente com um estado de doença subjacente, a SIRS.

Duas síndromes clínicas adicionais têm sido associadas à sepse: a sepse severa e o choque séptico. A primeira síndrome é conhecida por sepse severa, e refere-se a uma sepse complicada por uma disfunção de órgão, como hipóxia, hipotensão, oligúria, hipoperfusão, acidose láctica, e enzimas do fígado elevadas ou alteração da função cerebral (ABRAHAM et al., 2000, MATOT e SPRUNG, 2001, BONE et al., 1992, DESPOND et al., 2001). A sepse severa pode facilmente evoluir para a síndrome da falência múltipla de órgãos (MODS), ou choque séptico.

O choque séptico refere-se a um estado de falência circulatória aguda que é caracterizado por hipotensão arterial persistente (pressão sistólica inferior à 90 mmHg ou uma pressão arterial média inferior à 60 mmHg), apesar de reposição fluida adequada e na ausência de outras causas de hipotensão arterial (BONE et al., 1992, LEVY et al., 2003, DESPOND et al., 2001). É uma síndrome altamente letal de choque cardiovascular que pode levar ao óbito em 24-48 h após seu início e é invariavelmente acompanhada por necrose isquêmica e colapso cardiovascular.

Os sinais clínicos da SIRS comumente se desenvolvem cedo durante a sepse tanto em humanos quanto em roedores. Seu desenvolvimento sugere uma incapacidade de regular e limitar a resposta inflamatória, cujos resultados levam ao desenvolvimento de choque séptico, disfunção múltipla de órgãos e letalidade. Além disso, é possível que a SIRS deva-se a uma incapacidade em deter o agente infeccioso patogênico que desencadeou a resposta séptica (ANGUS, 2012). A sepse e suas diversas manifestações são causadas por um agente patógeno infeccioso, mas o fato da SIRS se desenvolver também durante condições de inflamação estéreis (ex. politraumatismo) indica a possibilidade da SIRS ocorrer na ausência de organismos infecciosos (DEJAGER et al., 2011).

Na sepse, muitos dos componentes da resposta imune inata, que são normalmente próprios da defesa do hospedeiro contra infecção podem, em algumas situações, causar dano tecidual e falência múltipla de órgãos, o marco clínico da sepse (COHEN, 2002). Os locais mais comuns dos sítios infecciosos são os pulmões, cavidade abdominal, o trato urinário e infecção primária na corrente sanguínea (ALBERTI et al., 2002).

Tem sido mostrado que a sepse se desenvolve quando a resposta inicial do hospedeiro a uma infecção se torna amplificada e subsequentemente desregulada (COHEN, 2002), levando a um desequilíbrio entre a resposta pró-inflamatória e anti-inflamatória. Também tem sido relatado que a resposta imune inata, a qual diferentemente da resposta imune adaptativa, é capaz de responder imediatamente a patógenos invasores, tem um papel fundamental no início da fisiopatologia da sepse (HANSEN et al., 2012). A ativação desta primeira linha de defesa celular resulta em uma excessiva liberação de

citocinas, quimiocinas e outros reguladores inflamatórios. As citocinas regulam uma variedade de componentes da resposta inflamatória, como: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, dor e migração de células imunes para o foco da infecção, processo que é crucial em conter uma infecção localizada e prevenir que esta se torne sistêmica. No entanto, uma liberação incontrolada de citocinas pode levar a uma disfunção endotelial, caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade venular generalizada. A síndrome resultante deste extravasamento é clinicamente associada à hipotensão, hemoconcentração, extravasamento macromolecular, e edema, que são achados frequentes em pacientes sépticos (RIVERS et al., 2012). A disfunção da barreira endotelial permite que patógenos e seus produtos adentrem ainda mais o organismo hospedeiro prejudicando os mecanismos de regulação, e por fim, causando a disfunção de órgãos (DENK et al., 2012).

Tradicionalmente, a sepse pode ser entendida como uma reação sistêmica excessiva do sistema pro-inflamatório a patógenos microbianos invasivos. Mais recentemente, foi proposto que a fase inicial da hiperinflamação é seguida ou sobreposta por um prolongado estado de imunossupressão (GERMAIN, 2012; HOTCHKISS e NICHOLSON, 2006), referido como imunoparalísia induzida pela sepse (HOTCHKISS e OPAL, 2010). Este estado imunoparalítico é caracterizado por respostas prejudicadas do sistema imune inato e adaptativo e, pode desempenhar um papel fundamental na patogênese da lesão tecidual, falência múltipla de órgãos, e morte (SCHULTE et al., 2013a).

O sistema imune inato detecta microorganismos invasores via receptores de reconhecimento padrão (PRRs), os quais são expressos na

barreira epitelial bem como nas células imunes, como células dendríticas e macrófagos (KONDO et al., 2012). Uma família específica de PRRs chamada receptores do tipo Toll (TLRs), reconhece estruturas moleculares dos microorganismos, chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Este reconhecimento também pode ocorrer por PRRs intracelulares conhecidos como receptores do tipo NOD (NLR), por mecanismos ainda não bem definidos. Exemplos de PAMPs bacterianos incluem lipopolissacarídeo, peptidoglicano, ácido lipoteicoico, flagelina, e DNA bacteriano (ISHII et al., 2008; VAN DER POLL e OPAL, 2008). A estimulação dos TLRs e NLR resulta em desencadeamento da cascata de sinalização. Dependendo do receptor envolvido, este processo leva à ativação de um programa de resposta que inclui a ativação do fator de transcrição nuclear κB (NF- κB), seguido pela produção e secreção de citocinas, quimiocinas, óxido nítrico e expressão de enzimas (iNOS, COX₂) (O'NEILL, 2011; TAKEDA e AKIRA, 2004).

O termo citocinas descreve uma classe de proteínas mediadoras com baixo peso molecular (40kDa) as quais são produzidas de modo regulado para afetar a ativação e diferenciação da resposta imune. Uma vez liberadas, citocinas pró-inflamatórias levam a uma subsequente ativação da resposta imune inata ou adaptativa, caracterizada pela produção adicional de imunoreguladores ou citocinas efetoras (CAVAILLON et al., 1992). As células mononucleares tem um papel importante no sinal de amplificação, liberando as clássicas citocinas pró-inflamatórias interleucina (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), outras como IL-12, IL-15 e IL-18 e uma série de outras moléculas, como o fator inibidor de macrófago e grupo de alta mobilidade B1 (COHEN, 2002).

Uma liberação descontrolada de numerosos mediadores pró-inflamatórios parece ter um papel chave na patogênese da sepse e da SIRS (KRAGSBJERG et al.,1995). Recentemente, um interessante estudo demonstrou que a migração celular para o sítio inflamatório inicial (neste estudo o peritônio) é essencial para a resolução da sepse e que a IL-33 está envolvida em permitir que os leucócitos presentes na circulação sejam capazes de executar tal tarefa (ALVES-FILHO et al., 2010).

Contornar estes problemas é um desafio bastante grande e exige uma terapêutica cuidadosa. O maior problema clínico no tratamento de pacientes com sepse, como dito anteriormente, é o desenvolvimento de falência cardiovascular progressiva, que se deve à excessiva vasodilatação e hiporreatividade vascular às catecolaminas (INCE, 2005; LANDRY e OLIVER, 2001). A disfunção endotelial representa outro marco da sepse e é caracterizada por extravasamento de fluidos e proteínas, bem como a formação de edema em tecidos e órgãos vitais (KAMPMEIER et al., 2010). Esta condição está associada com um saldo positivo de fluido, que por sua vez, está relacionado com um aumento da mortalidade e um aumento da estadia do paciente na unidade de cuidado intensivo (UCI) (SCHULLER et al., 1991; SCHULTE et al., 2013b; SIMMONS et al., 1987).

A taxa de mortalidade por sepse pode ser reduzida pelo diagnóstico precoce e pelo início rápido da terapia adequada. O tratamento da sepse deve ser direcionado para os seguintes pontos: tratamento específico de uma fonte infecciosa, reanimação líquida ótima, uso de pressores ou inotrópicos, tratamento da proteína C reativa, controle rigoroso da glicemia e terapia para tratar o déficit de oxigênio celular. A determinação do micro-organismo

infeccioso causador da infecção inicial é a condição mais importante para uma boa terapêutica da síndrome, uma vez que todas as demais fases do tratamento são condicionadas ao controle da fonte causadora de infecção (HOTCHKISS e KARL, 2003).

Associado a isso, como a hiperativação do sistema inflamatório é uma característica da sepse, é compreensível que dentre as estratégias terapêuticas existam como alvos mediadores pró-inflamatórios. Deste modo, intervenções destinadas a bloquear o grupo de alta mobilidade B1, fator inibidor de macrófago, proteínas do sistema complemento como a C5a e a C5aR e também caspases representam alvos promissores para o tratamento terapêutico na clínica da sepse (RIEDEMANN et al., 2003).

Deste modo, como citado acima o diagnóstico de sepse necessita de uma terapia rápida e específica incluindo administração precoce de antibióticos e controle de sua origem (DELLINGER et al., 2013). Além disto, a sepse tem um prognóstico pior que a SIRS sendo a condição que mais leva a mortalidade em pacientes das unidades de terapia intensiva. Assim, diferenciar a sepse e a SIRS é de fundamental importância, e este é um dilema comum para o intensivista (MEYNAAR et al., 2011).

Apesar dos avanços contínuos da medicina e tecnologia, a incidência de sepse continua aumentando. De 2000 para 2008, as hospitalizações para sepse foram de 326 000 para 727 000 de acordo com o Centro de Controle de Doenças do *National Hospital Discharge Survey* (HALL et al., 2011). Com uma taxa de mortalidade de 15% a 30%, a sepse representa a décima primeira causa de morte nos Estados Unidos e é responsável por 7% das causas de morte em crianças (GAIESKI et al., 2013; LUCE et al., 2007). Representa um

significante peso na economia com um total de custo em 2007 estimado em \$24,3 bilhões para pacientes com sepse severa, um aumento de 57% desde 2003 (LAGU et al., 2012). No Brasil, projeções econômicas realizadas em 2003, estimaram um gasto de US\$ 8.5 bilhões por ano para a gestão hospitalar de pacientes com sepse (TELES et al., 2008).

1. 2 Endocanabinóides e sepse

A farmacologia dos receptores canabinóides começou a ser estudada, há aproximadamente 50 anos, quando o Δ^9 -tetrahydrocannabinol (Δ^9 -THC) foi isolado e sintetizado pelo laboratório de Mechoulam e demonstrado ser o constituinte principal da *marijuana* (MECHOULAM e GAONI, 1965). O receptor canabinóide CB₁ foi clonado do cérebro de rato em 1990 (MATSUDA et al., 1990), e o receptor CB₂, foi identificado pela sequência homóloga três anos depois (MUNRO et al., 1993). Estas descobertas não só estabeleceram o mecanismo de ação do THC, como estimularam o desenvolvimento de subtipos seletivos de agonistas e antagonistas e iniciaram a procura por ligantes canabinóides endógenos localizados no sistema nervoso central (PIOMELLI, 2003).

Os eCB são ligantes endógenos para receptores CB₁ e CB₂ e são liberados como mensageiros retrógrados por muitos neurônios, incluindo os neurônios magnocelulares hipotalâmicos. Os receptores CB₁ estão localizados nestes neurônios, bem como nos lóbulos ou na hipófise, sugerindo um importante papel dos eCB na produção e liberação de hormônios, dentre eles a arginina-vasopressina (AVP) (DE LAURENTIIS et al., 2010).Dois principais

eCB foram identificados: a anandamida (N-araquidonoil etanolamina) (DEVANE et al., 1992) e o 2-araquidonilglicerol (2-AG) (MECHOULAM et al., 1995), ambos eicosanóides (PIOMELLI e GREENGARD, 1990). O 2-AG está presente em altas concentrações no tecido cerebral, aproximadamente 200 vezes mais que a anandamida (SUGIURA et al., 2006). A anandamida e o 2-AG são formados por vias dependentes de fosfolipídios e cujas enzimas de síntese são a N-acilfosfatidiletanolamida-fosfolipase D seletiva (NAPE-PLD) e a sn-1-diacilglicerol lipase seletiva (DAG Lipase), respectivamente (BISOGLIO et al., 2003; OKAMOTO et al., 2005). A formação da anandamida (Figura 1) é reflexo da hidrólise do precursor N-araquidonil fosfatidietanolamina (PE) catalisada pela enzima fosfolipase D (CADAS et al., 1997; DI MARZO et al., 1994) e é dependente de Ca^{2+} e AMPc. Esses dois segundos mensageiros controlam a atividade da N-acetil transferase (NAT) (CADAS et al., 1997) enzima responsável por catalisar a transformação de fosfatidiletanolamina (PE) em N-araquidonil-PE, e em seguida a fosfolipase D catalisa a transformação deste em anandamida (PIOMELLI, 2003). A sequência de formação do 2-AG (Figura 2), em contrapartida, inclui a hidrólise de fosfolipídeos de membrana em diacilglicerol (DAG), catalisada pela fosfolipase C, e a conversão subsequente de DAG a 2-AG, catalisada por diacilglicerol lipase (DGL) (IVERSEN, 2003; PIOMELLI, 2003). Há uma segunda via de formação do 2-AG, que envolve a hidrólise do fosfatidilinositol (PI) pela fosfolipase A1 e hidrólise do metabólito resultante Liso PI por uma fosfolipase C específica (UEDA et al., 1993). O 2-AG também pode ser formado através da conversão do ácido lisofosfatídico (LPA) à 2-AG.

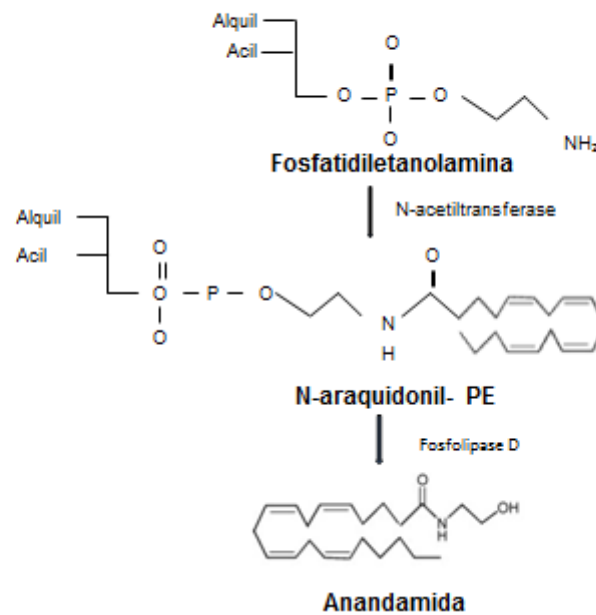


Figura 1: Síntese da anandamida:

A sequência da formação é: primeiro, a síntese da N-araquidonil fosfatidiletanolamina (PE), catalisada pela enzima N-acetil transferase, segundo, a hidrólise do N-araquidonil-PE, para produzir AEA, reação catalisada pela fosfolipase D. Adaptado de PIOMELLI, 2003.

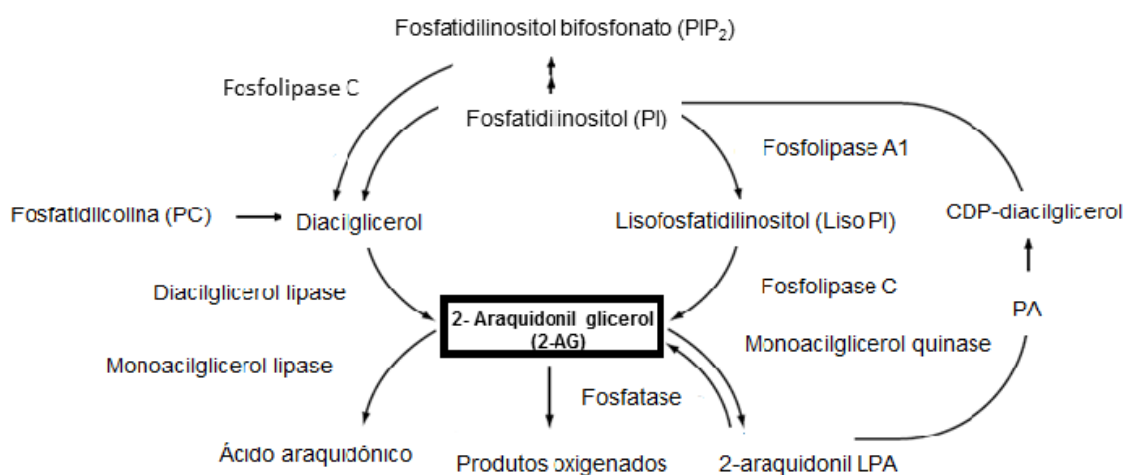


Figura 2: Síntese do 2-AG:

A sequência de formação é, clivagem do fosfatidilinositol (PI) em diacilglicerol (DAG), catalisada pela fosfolipase C, e a conversão subsequente de DAG a 2-AG,

catalisada por diacilglicerol lipase (DGL). Ou hidrólise do fosfatidilinositol (PI) pela fosfolipase A1 e hidrólise do resultante Liso PI por uma fosfolipase C específica. O 2-AG também pode ser formado através da conversão do ácido lisofosfatídico (LPA) à 2-AG. Adaptado de SUGIURA, 2006.

Os eCB são inativados principalmente por recaptação e posteriormente hidrolisados por enzimas específicas: a anandamida é metabolizada pela amida hidroxilase dos ácidos graxos (FAAH) em etolamida e ácido araquidônico (Figura 3) e o 2-AG por uma lípase de monoacilglicerol e também pela FAAH (GOPARAJU et al., 1999) em ácido araquidônico e glicerol (DI MARZO et al., 1998).

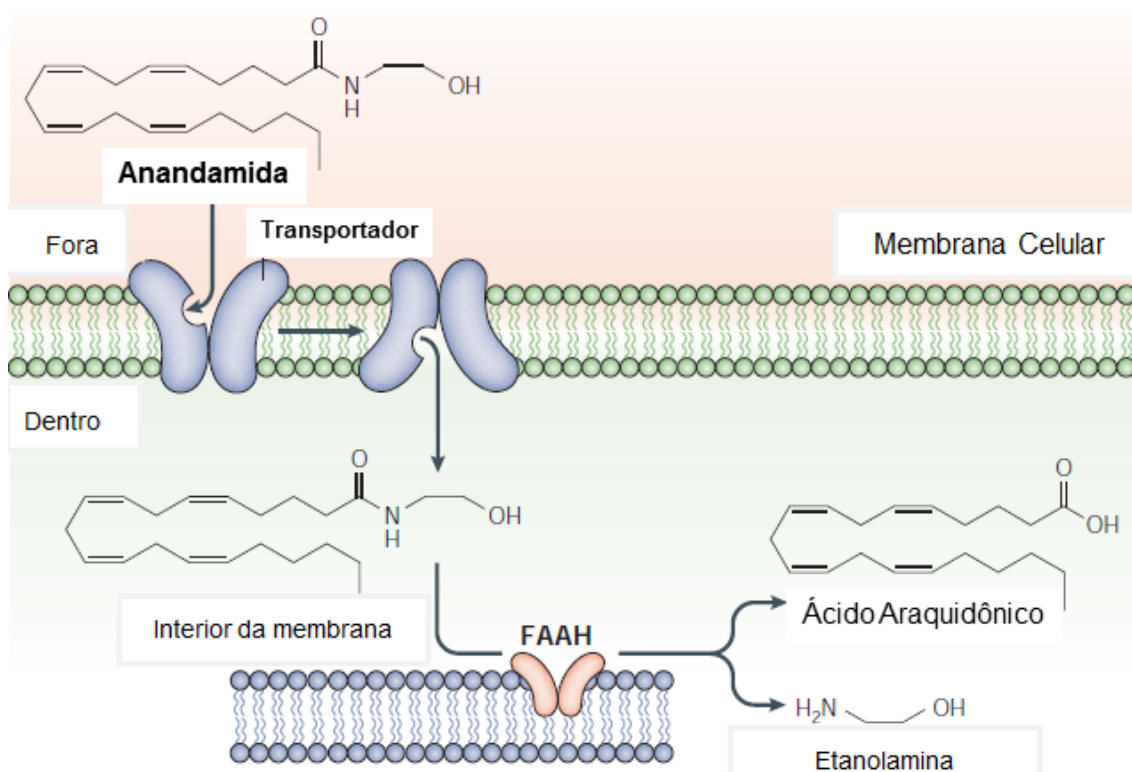


Figura 3: Mecanismos de inativação dos endocanabinóides:

A anandamida pode ser internalizada pelos neurônios através de um mecanismo transportador de alta afinidade. No interior da célula, a anandamida é

hidrolisada pela FAAH. Mecanismo similar se aplica ao 2-AG, sendo este hidrolisado pelo MGL (não mostrado). Adaptado de PIOMELLI, 2003.

Os dois receptores canabinóides que foram caracterizados, CB₁ e CB₂ pertencem à superfamília dos receptores de membrana ligados à proteína G (MATSUDA et al., 1990; MUNRO et al., 1993). O receptor CB₁ é considerado o receptor acoplado a proteína G mais abundante no sistema nervoso central, em regiões como o hipotálamo, gânglios da base, amígdala, neocórtex, hipocampo, cerebelo, tronco encefálico e medula espinhal (HERKENHAM et al., 1990). No entanto, também está presente no sistema nervoso periférico (DE PETROCELLIS et al., 2004) e é expresso em terminais axônicos. Os eCB são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem no receptor CB₁ de neurônios pré-sinápticos. O resultado dessa ligação é uma redução da liberação de outros neurotransmissores, como o GABA e o glutamato (FREUND et al., 2003; HASHIMOTODANI et al., 2007). Quando os canabinóides endógenos se ligam aos receptores CB₁ desencadeiam uma série de mecanismos intracelulares característicos dos receptores acoplados à proteína G_{i/o}. A maioria dos autores descreve três eventos importantes: (1) inibição da adenilato ciclase, levando a uma diminuição dos níveis de AMPc intracelular e de proteínas quinases A; (2) estimulação de sinalização de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAP quinase); (3) inibição de canais de Ca²⁺ dependentes de voltagem do tipo N e P/Q, e estimulação de canais de K⁺ tipo A resultando numa diminuição do influxo de cálcio e num aumento do efluxo de potássio. Portanto, considerando a localização pré-sináptica do receptor CB₁ como mencionado anteriormente, acredita-se que uma vez sintetizados, os eCB sejam liberados pela membrana pós-sináptica, difundindo-se para a

membrana pré-sináptica e agindo nos receptores canabinóides, o que muito provavelmente contribui para uma inibição da liberação de neurotransmissores em geral (DE PETROCELLIS et al., 2004; DI MARZO et al., 1998; LUTZ, 2002), por interferirem em uma etapa dependente de cálcio no processo de liberação de vesículas sinápticas (HOFFMAN e LUPICA, 2000).

Agonistas canabinóides CB_1 inibem canais de cálcio voltagem dependentes do tipo N e P/Q (MACKIE e HILLE, 1992; TWITCHELL et al., 2014). Acredita-se que este efeito resulte da interação direta das subunidades β e γ da $G_{i/o}$ com os canais (WILSON, 2002), e pode ser responsável pela depressão da liberação do transmissor GABA no hipocampo (HOFFMAN e LUPICA, 2000) e das sinapses glutamatérgicas no estriado dorsal (GERDEMAN e LOVINGER, 2001; HUANG et al., 2001).

Externamente ao sistema nervoso central, os eCB são produzidos sob demanda e agem em células localizadas perto do seu local de síntese. Por exemplo, são formados por leucócitos e plaquetas circulantes, e induzem relaxamento vascular por interagir com receptores canabinóides CB_1 na superfície vizinha do endotélio e musculatura lisa vascular (BÁTKAI et al., 2001).

Os receptores CB_2 são expressos em tecidos periféricos, principalmente no sistema imune (FELDER e GLASS, 1998; MUNRO et al., 1993; PERTWEE, 1999). São dominantes em macrófagos, neutrófilos e linfócitos, e sua ativação, ligada à inibição da atividade da adenilato ciclase, desencadeia um efeito global anti-inflamatório e imunossupressor (KLEIN, 2005).

A ativação do receptor CB_2 aumenta a produção de citocina IL-10, por macrófagos murinos (CORREA et al., 2005) e interrompe o processamento de

antígenos por estas células, o que leva a uma apresentação incompleta de antígenos às células T (MATVEYEVA et al., 2000; MCCOY et al., 1999). *In vitro*, o receptor CB₂ quando ativado induz apoptose de linfócito T e B (LOMBARD et al., 2007; MCKALLIP et al., 2002). Csóka et al. demonstrou que a ativação de receptores CB₂ por liberação de eCB contribui para a mortalidade, invasão bacteriana, produção de IL-10 e morte das células do sistema imunológico durante a sepse (CSÓKA et al., 2009).

Os eCB são produzidos em resposta a estímulos inflamatórios e estresse oxidativo (DI MARZO et al., 1996; WANG et al., 2001), estão presentes em elevadas concentrações no soro de pacientes e animais que sofreram choque séptico e são fatores que podem modular a resposta imunológica (WAGNER et al., 2001; WANG et al., 2001).

Nos estágios primários do choque séptico, vários mediadores inflamatórios, como, histamina, prostaglandina, óxido nítrico e citocinas, são produzidos e causam vasodilatação aguda em animais (VINCENT, 1998). Mais tarde, descobriu-se que os endocanabinóides também contribuem para o desenvolvimento de hipotensão nos estágios primários do choque. A anandamida e o 2-AG são gerados por plaquetas e macrófagos durante o choque séptico (WAGNER et al., 1998), hemorrágico (WAGNER et al., 1997) e cardiogênico (LAGNEUX e LAMONTAGNE, 2001) e causam hipotensão através da ativação de receptores canabinóides CB₁, que são localizados no endotélio ou na musculatura lisa vascular.

O sistema endocanabinóide também tem um papel fundamental na regulação da neurotransmissão excitatória glutamatérgica em geral (PIOMELLI, 2003) e nas células magnocelulares vasopressinérgicas. Os canabinóides

exógenos tem mostrado exercer um efeito inibitório na secreção de hormônios pela glândula pituitária posterior (DI et al., 2005). A aplicação do ativo canabinóide da *Marijuana*, o THC em ratos resulta em aumento da diurese, o que é mediado pelas ações inibitórias centrais dos canabinóides (CB) na liberação de AVP (AMES, 1958; SOFIA et al., 1973).

1.3 Arginina-vasopressina e sepse

A arginina vasopressina (AVP), um polipeptídeo com uma ligação dissulfeto entre os dois aminoácidos de cisteínas (BARBERIS et al., 1998) também conhecida como vasopressina ou hormônio antidiurético (ADH do inglês *antidiuretic hormone*), é um hormônio sintetizado no núcleo paraventricular (PVN) e no núcleo supraóptico (SON) e é armazenada na glândula pituitária posterior (KAMPMEIER et al., 2010). Após ser isolada e sintetizada no ano de 1950, foi comprovado que este hormônio possuía efeito vasopressor e antidiurético (TURNER et al., 1951; DU VIGNEAUD, 1954).

Os principais estímulos fisiológicos para a secreção de AVP são: a hiperosmolalidade plasmática, a hipotensão e a hipovolemia grave (SCHRIER et al., 1979). A modulação da neurotransmissão glutamatérgica é um mecanismo importante para ajustar a liberação de mediadores neuroendócrinos inclusive da AVP. A secreção de vasopressina depende da atividade das células magnocelulares e estas são reguladas pelas sinapses excitatórias glutamatérgicas (HRABOVSKY e LIPOSITS, 2008; JOURDAIN et al., 1998; MOOS et al., 1997; NISSEN et al., 1995; SHIBUYA et al., 2000; ZAMPRONIO et al., 2010).

Os principais efeitos da AVP e seus análogos ocorrem através da ativação de receptores acoplados a proteína G classificados em V_1 , localizado primordialmente nos leitos vasculares, V_2 encontrado nos rins, e dos receptores V_3 encontrado na pituitária. Em adição, a AVP pode ativar receptores de ocitocina (OTR) e o receptor purinérgico P_2 (P_2R) (ZENTENO-SAVIN et al., 2000).

Funcionalmente, o receptor V_1 ativa a família de receptores da proteína $G_{q/11}$. As subunidades α regulam a atividade das isoformas β da fosfolipase C (BARBERIS et al., 1998). Uma variedade de vias de sinalização estão associadas ao receptor V_1 e estas vias incluem ativação do influxo de cálcio, da fosfolipase A_2 , da fosfolipase C e da fosfolipase D (BRILEY et al., 1994). Na musculatura lisa vascular, os receptores V_1 são encontrados em grande quantidade e causam vasoconstrição por aumentar os níveis intracelulares de cálcio através da ativação de fosfotidil-inositol-bisfosfonato (HOLMES et al., 2003). Esta vasoconstrição promovida pela ativação dos receptores V_1 nas células do músculo liso vascular é mediada pela hidrólise do fosfatidilinositol bisfosfato (PIP_2) para o inositol trifosfato (IP_3) e diacilglicerol (DAG) via ativação da fosfolipase C. Estes segundos-mensageiros aumentam as concentrações de cálcio intracelular através de vários mecanismos, incluindo ativação de canais de cálcio regulados por ligantes e canais de cálcio regulados por voltagem via proteína quinase C, bem como esvaziamento dos estoques de Ca^{2+} intracelular do retículo endoplasmático (SURKS, 1999).

Em altas concentrações citosólicas, o cálcio forma um complexo com a calmodulina que ativa a quinase, a qual fosforila a cadeia leve de miosina. A miosina fosforilada ativa a miosina ATPase por agir ao longo dos filamentos de

actina, que contraem os músculos. Já a vasodilatação ocorre quando a quinase interage com a miosina fosfatase, que desfosforila a miosina e previne a contração (SURKS, 1999).

Além da ativação dos receptores V_1 , a restauração do tônus vascular promovida pela AVP no estado de choque vasoplégico (resistente à catecolamina) ocorre através de no mínimo mais 3 fatores: modulação de canais K^+ sensíveis a ATP (K_{ATP}), modulação do NO e potencialização de agentes vasoconstritores e adrenérgicos (HOLMES et al., 2003).

Portanto, acredita-se que este efeito vasoconstritor da AVP seja responsável pela melhoria na perfusão dos órgãos, melhorando o prognóstico do choque séptico e justificando sua utilização durante esta condição. No entanto, algumas evidências experimentais sugerem que a ativação de V_1R endoteliais também exerce efeitos vasodilatadores em alguns leitos vasculares (ex. artérias pulmonares e coronarianas), provavelmente por mediar aumento da liberação do NO (EVORA et al., 2003; SAI et al., 1995). Os efeitos desejados da AVP e análogos durante a sepse são basicamente relacionados à ativação dos receptores V_1 (LEONE et al., 2004).

O efeito antidiurético da AVP ocorre via ativação de receptor V_2 . A AVP regula a excreção da água do rim por aumentar a permeabilidade osmótica da água do ducto coletor renal, efeito explicado pelo acoplamento do receptor V_2 com a via de sinalização G_s , o qual ativa AMPc (BIRNBAUMER, 2000). A ativação dos receptores V_2 leva a uma cascata de eventos que culmina com a reabsorção de água no túbulo coletor, por aumentar o número de canais permeáveis exclusivamente à água e localizados nas membranas apicais do túbulo coletor, sendo o mais importante deles a aquaporina-2 (ROCHA et al.,

2000). Além de aumentar a permeabilidade do ducto coletor à água, a ativação dos receptores V_2 também aumenta o transporte de ureia no ducto coletor medular interno e o transporte de Na^+ no ramo ascendente espesso e no ducto coletor; ambos efeitos contribuem para a capacidade de concentração da urina do rim (BANKIR e TRINH, 2000).

O receptor V_3 se localiza na glândula pituitária e a ativação deste pela AVP causa secreção de hormônio adenocorticotrófico da glândula pituitária de uma maneira dose-dependente através da ativação da proteína C quinase (PKC) via $G_{q/11}$. (THIBONNIER et al., 1998).

O receptor de ocitocina pode ser considerado um receptor não-seletivo para a AVP. A AVP e a ocitocina possuem afinidade igual pelo receptor de ocitocina, enquanto que para o receptor V_1 a AVP possui 30 vezes mais afinidade que a ocitocina (PETER et al., 1995) e a sua ativação do receptor de ocitocina leva à vasodilatação por desencadear ativação da óxido nítrico sintase no endotélio vascular (THIBONNIER et al., 1998).

Foi demonstrado que a AVP pode agir também em receptores purinérgicos (ZENTENO-SAVIN et al., 2000). Os receptores purinérgicos, também pertencentes à família dos receptores acoplados a proteína G, causam vasodilatação na musculatura lisa vascular, por aumentar a síntese e liberação de prostaciclina e óxido nítrico (BOARDER e HOURANI, 1998).

A sepse severa está associada com uma queda nos níveis de AVP (ERRINGTON et al., 1971; MORALES et al., 1999), e isto pode contribuir para a hipotensão refratária que é observada nos estados avançados de choque séptico (HOLMES et al., 2003). A AVP é um hormônio essencial para a homeostasia cardiovascular e osmótica e, como mencionado anteriormente,

está emergindo como uma terapia racional para a sepse (HOLMES et al., 2004). Melhorar os níveis fisiológicos de AVP pode restaurar o tônus vascular (HOLMES et al., 2004).

No entanto, um estado de choque induz um aumento dos níveis de AVP (ARNAULD et al., 1977; WANG et al., 1988). Estes níveis supra fisiológicos causam intensa vasoconstrição e auxiliam na manutenção da perfusão de órgãos (ABBOUD et al., 1990; SCHWARTZ e REID, 1981). De um estoque total de AVP, 10-20% podem ser rapidamente liberados na corrente sanguínea (HOLMES et al., 2001). Um estado de choque prolongado está associado com uma queda nos níveis de AVP (ERRINGTON et al., 1971; MORALES et al., 1999), que pode estar relacionada à depleção de seus estoques. Assim, a secreção diminui se o estímulo continua (LANDRY et al., 2001; SHARSHAR et al., 2002), e isto pode contribuir para a hipotensão refratária que é observada nos estados avançados de choque (HOLMES et al., 2003). Esta ação cinética explica o curso bifásico das concentrações plasmáticas da AVP durante o choque séptico, com uma elevação seguida de diminuição (SKLAR E SCHRIER, 1983).

A mortalidade hospitalar de choque circulatório exigindo vasopressores excede 50% dos casos e aproximadamente 40% desses são causados por hipotensão progressiva (BACKER et al., 2010).

Estudos mostraram que a infusão de baixas doses de AVP em pacientes com choque séptico e vasodilatação, diminui a dose de norepinefrina requerida para manter a pressão arterial e o débito cardíaco, diminui a resistência vascular pulmonar e aumenta a produção de urina. Portanto, baixas doses de

AVP podem melhorar a função renal e também a função de outros órgãos no choque séptico (GOLD et al., 2000; HOLMES et al., 2001).

1.4 Endotelina-1 e sepse

As endotelinas, uma família de peptídeos descoberta há mais de vinte anos, são vasoconstritores potentes dos vasos sanguíneos de mamíferos (INOUE et al., 1989). A ET-1 é um peptídeo que foi primeiramente descoberto em 1988 (INOUE et al., 1989; YANAGISAWA et al., 1988), ao ser isolada e sequenciada de um sobrenadante de cultura de células endoteliais aórticas (INOUE et al., 1989). Por outro lado, a ET-2 e ET-3 foram descobertas após o isolamento dos genes relacionados à ET-1. As endotelinas podem afetar os vasos sanguíneos de diferentes tamanhos e subtipos (INOUE et al., 1989) incluindo vasos linfáticos (FORTES et al., 1989) e também podem agir em outros tipos de células, como da musculatura lisa, bem como nas células epiteliais da árvore brônquica (MAGGI et al., 1989).

Em 1985, Hickey et al. demonstraram que as células endoteliais aórticas geravam uma substância polipeptídica que induzia contração das células vasculares da musculatura lisa de uma maneira dependente de Ca^{2+} (HICKEY et al., 1985). Posteriormente, descobriu-se que a ET-1 é formada como um pré-peptídeo que é clivado em substância ativa por várias peptidases (KOTSOVOLIS e KALLARAS, 2010). Fatores físicos, bioquímicos e humorais regulam a transcrição do gene da ET-1 estimulando a síntese da pré-proendotelina-1, que contém 203 aminoácidos. Este pré-hormônio é então transformado pelas endopeptidases em *big*-endotelina-1, que é a forma

circulante no plasma, mas que é funcionalmente inativa (RUBANYI et al., 1994). As enzimas de conversão da endotelina, quinases e metaloproteases clivam a *big*-endotelina entre as posições 21(triptofano) e 22 (valina), liberando a forma ativa da ET-1 com 21 aminoácidos (LEVIN, 1995).

A ET-1 é produzida principalmente por células endoteliais, mas também em células musculares lisas vasculares, células da mucosa epitelial, macrófagos, mastócitos, células do miocárdio, células de Kupffer, algumas células nervosas e células epiteliais da traqueia (WANECEK et al., 2000). Os estímulos que desencadeiam a produção de ET-1 são o estresse de cisalhamento (ou *shear stress*) do endotélio, hipóxia, endotoxinas, fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), fator de crescimento de transformação β (TGF- β), adrenalina, trombina e angiotensina-II, enquanto que prostaciclina, NO, peptídeo natriurético (ANP) e heparina inibem a produção de ET- 1 (WANECEK et al., 2000).

A expressão dos receptores da endotelina é regulada em paralelo com a expressão da ET-1 (RHOTEN et al., 1997). Existem dois receptores para a endotelina: o receptor ET_A e o receptor ET_B, ambos pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteína G (ALEXANDER et al., 2008; AUDET e BOUVIER, 2012). O receptor ET_A e o receptor ET_B são farmacologicamente caracterizados pelas suas afinidades pela família de peptídeos, endotelinas: o receptor ET_A tem afinidade pela ET-1 e ET-2 e 100 vezes menos afinidade pela ET-3, enquanto que o receptor ET_B apresenta afinidade igual para todos os ligantes (BARTON e YANAGISAWA, 2008; YANAGISAWA et al., 1988). O receptor ET_A é expresso nas células musculares lisas vasculares enquanto que o receptor ET_B é expresso principalmente em tecidos vasculares endoteliais e

epiteliais, bem como nas células musculares lisas (FROMMMER e MÜLLER-LADNER, 2008). A ativação de o receptor ET_A e o receptor ET_B medeia várias funções importantes que incluem vasoconstrição, reestruturação cardiovascular, proliferação celular, diferenciação celular, produção de matriz celular e controle da secreção de água e sódio (BARTON e YANAGISAWA, 2008; RODRÍGUEZ-PASCUAL et al., 2011).

No músculo liso vascular, a estimulação de o receptor ET_A acoplado a proteína $G_{q/11}$ e $G_{12/13}$ pela ET-1 induz fosforilação da cadeia leve de miosina que desencadeia vasoconstrição mediada através de quinase de cadeia leve de miosina dependente de Ca^{2+} e de Rho-quinase independente de Ca^{2+} (SCHONER, 2008; WANG et al., 2001; WIRTH et al., 2008). O aumento da concentração de cálcio intracelular resulta na ativação da quinase de cadeia leve de miosina e fosforilação da miosina. Uma vez fosforilada a miosina interage com filamentos da actina promovendo a contração (SOMLYO e SOMLYO, 2000).

Nas células endoteliais, a estimulação de receptor ET_B pela ET-1 exerce duas funções principais: i) liberação de vasodilatadores, como NO e prostaciclina (PGI_2), e ii) depuração da ET-1 da circulação no interior dos pulmões e rim. A ET-1, liberada pelas células endoteliais, se liga a receptor ET_B expresso nas células endoteliais para elevar a concentração de cálcio intracelular, via proteína Gq ligada à fosfolipase $C\beta$ ($PLC\beta$). O aumento de cálcio intracelular induz ativação de óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) dependente de Ca^{2+} / CaM e indução da expressão de ciclooxigenase-2 (COX-2) dependente de Ca^{2+} , levando à produção de NO e PGI_2 , respectivamente (MAZZUCA e KHALIL, 2012).

Embora os papéis patofisiológicos do receptor ET_A e receptor ET_B não estejam completamente elucidados, o receptor ET_A é considerado um receptor envolvido na patogênese e desenvolvimento de várias doenças (BARTON; YANAGISAWA, 2008, RODRIGUEZ-PASCUAL e BUSNADIEGO, 2011). Por outro lado, o receptor ET_B, tem sido classificado como um receptor que possui funções benéficas para o organismo, como “*receptor clearance*”, que previne a estimulação excessiva da ET-1 pelo receptor ET_A e melhora a produção de NO e PGI₂, os quais causam vasodilatação (THORIN e WEBB, 2010).

No choque séptico e em uma variedade de estados patológicos, como por exemplo, infarto do órgão e diversos estados de choque, há aumentos substanciais da concentração de endotelina que normalmente são baixos (BATTISTINI et al., 1996; ISKIT et al., 2004; VOERMAN et al., 1992) e esta elevação parece estar relacionada com a maior ou menor morbidade na sepse (PITTET et al., 1991).

Em ensaios experimentais, a endotoxina induz a expressão de RNAm da pré-pro endotelina-1 no pulmão e coração (HEMSÉN, 1991; KADDOURA et al., 1996), e uma elevação dos níveis plasmáticos de ET-1 é observada em várias espécies durante a endotoxemia (CHOU et al., 1995; KASZAKI et al., 1997; PERNOW et al., 1990). Também se tem sugerido que a ET-1 contribui para disfunção de sistemas de órgãos vitais no choque séptico (OLDNER et al., 1999; PITTET et al., 1991; RUETTEN e THIEMERMANN, 1996; WANECEK et al., 1999).

Estudos sugeriram que a liberação endógena de endotelina durante endotoxemia pode ajudar a neutralizar a hipotensão grave no choque séptico, especialmente no ambiente de inibição da óxido nítrico sintase (ISKIT e GUC,

2004, ISKIT e GUC 2003). No entanto, o aumento dos níveis de endotelina pode levar à vasoconstrição excessiva em leitos vasculares periféricos, além de contribuir para a disfunção múltipla de órgãos durante a endotoxemia, como citado acima (WANECEK et al., 2000). A liberação de ET-1 parece ser benéfica por auxiliar na manutenção da pressão arterial e perfusão de órgão durante a fase primária do choque séptico (VEMULAPALLI et al., 1991). Por outro lado, um aumento excessivo dos níveis plasmáticos de endotelina por longos períodos causa profunda vasoconstrição e hipoperfusão nos tecidos em vários leitos vasculares, e isto certamente é prejudicial (RUETTEN e THIEMERMANN, 1996).

Um estudo realizado em 2004 por Iskit e colaboradores demonstrou que o uso de bosentan, um antagonista não-seletivo de receptor de endotelina, em um modelo de sepse severa (CLP) melhorou a taxa de sobrevivência quando administrado em camundongos durante a fase tardia da sepse. Sugere-se neste estudo, que o bloqueio dos receptores de endotelina durante a fase tardia e/ou hipodinâmica do choque séptico parece ser uma estratégia promissora para o tratamento da sepse (ISKIT et al., 2004).

Os dados apresentados até o momento demonstram claramente que a ET-1, os eCB e a AVP estão intimamente relacionados com a sepse. Portanto, entender as inter-relações entre estas três substâncias torna-se não somente importante para entender a sepse, mas para buscar novas estratégias terapêuticas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente estudo visa investigar as inter-relações entre ET-1, endocanabinóides e AVP na mortalidade, na migração celular para a cavidade peritoneal, na leucocitose e leucopenia, na temperatura corporal durante sepse severa induzida por ligação e perfuração do ceco.

2.2 Objetivos específicos

Estabelecer a curva de sobrevivência em ratos com sepse induzida por CLP;

Avaliar o efeito do antagonista CB₁ rimonabanto e dos antagonistas de endotelina ET_A e ET_B na mortalidade dos animais induzida pela CLP.

Avaliar o efeito do antagonista CB₁ rimonabanto na temperatura corporal durante a sepse;

Avaliar o efeito do antagonista CB₁ rimonabanto na migração de polimorfonucleares para a cavidade peritoneal durante a sepse;

Avaliar o efeito do antagonista CB₁ rimonabanto nos níveis de IL-6 durante a sepse;

Avaliar o efeito do antagonista CB₁ rimonabanto na leucocitose/leucopenia durante a sepse;

Avaliar o efeito do antagonista CB₁ rimonabanto e do antagonista ET_A, BQ123 nos níveis de AVP durante a sepse;

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais:

Foram utilizados ratos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, machos, pesando entre 180-200 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura (22° C), luminosidade com ciclo claro/escuro de 12 h e livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados de acordo com as Diretrizes Brasileiras para a Experimentação Animal definidas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná.

3.2 Soluções:

- Albumina bovina 3%

- albumina bovina fração V _____ 3 g
- PBS 10 % _____ 100 mL

- Corante pancrômico de Rosenfeld

- azul de metileno Giemsa _____ 0,97 g
- azul de metileno May-Grünwald _____ 0,53 g

Acrescentar em um litro de metanol P.A. e filtrar.

- Líquido de Turk

- ácido acético glacial _____ 15 mL
- azul de metileno _____ 1 g

- água mili-Q _____ q.s.p. 500 mL

- Solução mãe de PBS (salina tamponada fosfatada)

- NaCl _____ 80 g

- KCl _____ 2 g

- Na₂HPO₄.2H₂O _____ 14,4 g

- K₂HPO₄ _____ 2 g

- Água-mili-Q _____ q.s.p. 1 litro

O pH foi acertado para 7,4, e a solução foi armazenada a 4° C.

- PBS para coleta do exsudato peritoneal

PBS (diluído 1:10 em água mili-Q) _____ 1000 mL

Heparina (0,2 mL de heparina/100 mL de PBS diluído) _____ 2 mL

Albumina 3% (1 ml de albumina/100 mL de PBS diluído) _____ 10 mL

- Solução de ácido nítrico 5%:

Ácido nítrico 5% _____ 50 mL

Água mili-q _____ 950 mL

- Solução de Azul de Evans 2,5%

Azul de Evans _____ 2,5 mL

Salina _____ 100 mL

3.3 Reagentes e Drogas:

- ✓ Antagonista dos receptores ET_A BQ123 (Sigma Chemicals & Co, São Paulo, Brazil)
- ✓ Antagonista dos receptores ET_B BQ788 (Sigma Chemicals & Co, São Paulo, Brazil)

- ✓ Antagonista dos receptores CB₁ SR141716A (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, EUA)
- ✓ Kit de Elisa para dosagem de AVP (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA)
- ✓ Kit de Elisa para dosagem de IL-6 (Thermo Systems, Rockford, USA)
- ✓ Solução de lidocaína injetável com noradrenalina a 2% (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Brasil)
- ✓ Halotano (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Brasil)
- ✓ Carboximetilcelulose (Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda, Brasil)
- ✓ Cetamina (Vetnil Veterinary Products, Louveira, Brazil)
- ✓ Xilazina (Syntec Laboratory, Cotia, Brazil)

3.4 Indução de Sepse por Ligadura e Perfuração do Ceco (CLP)

A indução de sepse foi feita de acordo com método descrito por Torres-Dueñas, 2006 com pequenas modificações. Os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Foi realizada uma incisão mediana longitudinal na pele do abdômen do animal e em seguida a mesma incisão foi realizada no peritônio. Em seguida, foi feita a exposição e ligação de 75% do ceco com uma agulha de diâmetro 16 G, para induzir sepse severa, posteriormente foram feitas as perfurações na borda antimesentérica do ceco e logo após, foi comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. Os animais foram avaliados quanto à mortalidade, para a determinação do número de perfurações necessárias para o desenvolvimento

de uma sepse severa, na qual ocorre uma mortalidade de aproximadamente 70% dos animais. Após este procedimento, os animais receberam aproximadamente 3 mL de solução salina (s.c.) como líquido de reanimação.

Os animais do grupo falso operado (sham) foram submetidos à falsa cirurgia, isto é, sem ligadura nem perfuração do ceco, cuja sobrevida é de 100%. O procedimento cirúrgico inclui a incisão mediana longitudinal na pele e no peritônio, manipulação do ceco e fechamento da cavidade abdominal. Estes animais foram os controles deste modelo.

3.5 Design experimental I: Curva de sobrevida

Para a curva de sobrevida os animais foram submetidos à falsa-cirurgia ou a CLP, utilizando-se 1 furo, 3 furos ou 9 furos. Após a cirurgia, os animais foram observados a cada 12 h por um período de 7 dias e os resultados foram expressos em porcentagem de animais que sobreviveram. A sepse induzida por 3 furos foi escolhida para os experimentos subsequentes.

Após a determinação do número de furos necessários para o estabelecimento de uma sepse severa, testamos os efeitos dos tratamentos nos parâmetros anteriormente citados.

3.6 Design experimental II: Efeito dos tratamentos com antagonistas CB₁, ET_A e ET_B na sobrevida dos animais

3.6.1 Efeito do tratamento com antagonista CB₁ na sobrevida dos animais

Uma vez estabelecido o número de furos necessários para induzir uma sepse severa, o efeito do antagonista dos receptores CB₁ na sobrevida dos animais foi avaliado. Para tanto, os ratos foram submetidos à CLP e foram tratados com: antagonista de receptor CB₁ rimonabanto (10 mg/kg e 20 mg/kg p.o.) ou com o mesmo volume de veículo (carboximetilcelulose, CMC, 10 % w/v) 4 h após a CLP. A sobrevida foi avaliada a cada 12 h por um período de 7 dias. O tratamento foi feito 4 h após a CLP pois, de acordo com Sharma et al. (1997a), este é o momento em que ocorre um aumento de ET-1 no plasma após a CLP.

3.6.2 Cirurgia para implantação de cânulas no ventrículo lateral.

Os animais foram anestesiados com solução de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.). Após tricotomia e assepsia da pele, os animais foram imobilizados em um aparelho estereotáxico. Foi administrado pela via subcutânea aproximadamente 0,2 mL de uma solução de lidocaína a 2% com vasoconstritor na parte superior da cabeça, seguida de uma incisão de aproximadamente 1 cm de diâmetro na pele, para exposição da calota craniana. Esse procedimento facilitou a remoção do periósteo, inibindo o estímulo doloroso e diminuindo o sangramento.

Após a localização do bregma (tomado como ponto de referência) os parâmetros estereotáxicos utilizados para a perfuração do crânio e implantação da cânula no ventrículo lateral direito foram de: -0,8 mm anteroposterior e -1,5

mm lateralmente, com uma inclinação de -3,3 mm da barra incisal (PAXINOS e WATSON, 2009). A cânula esterilizada, constituída de um segmento de agulhas hipodérmicas, com 16 mm de comprimento e 0,7 mm de diâmetro, foi fixada ao estereotáxico e introduzida no tecido cerebral com coordenada ventral a 2.5 mm abaixo da superfície craniana (PAXINOS e WATSON, 2009). Foi permitido aos animais que se recuperassem da cirurgia por 5 dias e em seguida foi realizada a CLP. Após o experimento, foram injetados no ventrículo lateral de cada animal 2 µl de uma solução de azul de Evans (2,5 % em solução salina). Os cérebros foram removidos após os procedimentos 4.5.3 e a presença do corante no ventrículo lateral foi verificada macroscopicamente. Animais que não apresentaram a coloração do ventrículo ou que apresentaram deslocamento ou bloqueio da cânula durante a injeção, ou ritmo de ganho de peso corporal anormal após a cirurgia foram excluídos do estudo.

3.6.3 Efeito dos tratamentos com antagonistas ET_A e ET_B na sobrevida dos animais

Os animais foram submetidos à CLP, e o antagonista do receptor de ET_A BQ123 (100 pmol 2µl i.c.v.) ou veículo (salina, 2 µl i.c.v.) foi administrado 2 e 4 h, 4 e 8h ou somente 8 h após a CLP e a sobrevida avaliada a cada 12 h por 7 dias.

Com relação ao antagonista de receptor ET_B BQ788, este foi administrado na dose de 100 pmol 2µl i.c.v. 4 e 8 h após a CLP. Animais

controles receberam o mesmo volume de salina nos mesmos tempos. A sobrevivência dos animais foi avaliada a cada 12 h durante 7 dias.

O BQ123 e o BQ788 foram administrados utilizando-se uma agulha de microinjeção (30G curta), conectada a uma seringa de Hamilton (25 µl) por um tubo de polipropileno. As doses e os tempos de administração foram baseados em estudos anteriores (SHARMA et al., 1997a). Estes autores demonstram que os níveis de ET-1 estão aumentados no plasma de 4 à 8 h após a CLP. Assim, escolhemos administrar o BQ 123 em tempos antes (2 e 4 h), durante (4 e 8 h) e após (8 h) o aumento plasmático de ET-1 a fim de selecionar o melhor período de tratamento.

3.7 Design experimental III: Avaliação da temperatura corporal após o tratamento com antagonista CB₁

3.7.1 Cirurgia de Implante do registrador de temperatura

Os registradores remotos de temperatura (SubCue, Calgary, Canadá) foram programados para iniciar o registro de temperatura pelo menos 2 h antes da indução de sepse. Em seguida, o ponto de conexão dos mesmos com o computador foi protegido com silicone biocompatível. Anteriormente à cirurgia, os registradores permaneceram imersos em etanol 70 % no mínimo 30 min antes do implante para garantir a assepsia da superfície dos mesmos, e foram imersos em solução salina estéril imediatamente antes do implante na cavidade peritoneal. Os animais foram anestesiados com solução de cetamina 90 mg/kg e xilazina 10 mg/kg, i.p.. Foi realizada a tricotomia e assepsia da pele, e em

seguida, executada uma incisão de aproximadamente 2 cm na pele e músculos abdominais e o transmissor foi inserido na cavidade peritoneal. Os músculos e a pele foram suturados separadamente. Após 5 dias da cirurgia do implante do registrador de temperatura, iniciou-se a medida da temperatura (BASTOS-PEREIRA et al., 2014).

3.7.2 Efeito do bloqueio do receptor CB₁ na temperatura corporal (T_c):

No dia anterior ao experimento os animais que já possuíam os registradores implantados foram transferidos para uma sala de experimentação mantida à 28°C (temperatura de termoneutralidade dos animais) para ambientação. O registro da temperatura corporal basal dos animais foi realizado no dia seguinte e iniciou-se automaticamente às 7 h da manhã e foi feito em intervalos de 30 min. Os procedimentos de indução de sepse se iniciaram por volta das 9 h da manhã e duraram aproximadamente 1h. Os animais foram tratados com o antagonista de receptor CB₁ (10 mg/kg p.o.) 4 horas após a indução da sepse severa. Os animais foram mantidos na mesma sala, com a temperatura sendo monitorada durante as 24h de avaliação da temperatura corporal. O tempo 0 foi considerado o horário em que foi realizada a CLP.

3.8 Design experimental IV: Efeito do antagonista de receptor CB₁ sobre a migração celular para a cavidade peritoneal induzida durante a sepse

Os animais foram submetidos à CLP e tratados com o antagonista de receptor CB₁ (10 mg/kg p.o.) após 4 h conforme descrito anteriormente no item 4.5.1. Para avaliar o número de células na cavidade peritoneal, após 8 h da indução da sepse os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 10 ml de PBS contendo albumina 0,03% (p/v) e 5 U ml⁻¹ de heparina e o maior volume possível de fluido foi colhido. Para a contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer, as amostras foram diluídas 1:20 em líquido de Turk e avaliadas por microscopia de luz. Para a contagem diferencial, o fluido foi centrifugado (1000g, 10min, 4°C), as células foram ressuspensas em solução de albumina 3% e colocadas em lâminas pré-preparadas. Para tanto, estas foram mantidas por 20 min com solução de detergente neutro em ultrassom, posteriormente foram lavadas uma a uma com água corrente e em seguida com água destilada. Em seguida, as lâminas foram transferidas para um béquer contendo uma solução de ácido nítrico 5%, no qual permaneceram por aproximadamente 16 h. No dia seguinte, as lâminas foram retiradas, enxaguadas com água destilada e transferidas para um béquer contendo álcool 70% até o dia do experimento. As lâminas receberam as células e após secagem à temperatura ambiente foram coradas com Corante Pancrômico de Rosenfeld e analisadas sob microscopia de luz (WERNER et al., 2003).

3.9 Design experimental V: Efeito do antagonista de receptor CB₁ sobre leucopenia/leucocitose e sobre os níveis circulantes de IL-6 durante a sepse

Para a contagem de leucócitos circulantes foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca 2, 4, 6, 8, e 12 horas após a indução da sepse. Na quarta hora após a CLP os animais receberam o tratamento com o antagonista de receptor CB₁ rimonabanto (10 mg/kg p.o.) ou com CMC 10%. Para a coleta, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e o maior volume possível de sangue foi coletado por punção cardíaca com seringas previamente heparinizadas. Após a coleta de sangue, os animais, ainda sob anestesia, foram eutanasiados por deslocamento cervical. As amostras foram diluídas 1:40 em líquido de Turk para a contagem global de leucócitos circulantes e foram confeccionados esfregaços para a posterior coloração das lâminas pelo corante pancrômico de Rosenfeld e contagem diferencial. Para a dosagem de IL-6, as amostras de sangue provenientes de coletas de 6 e 8 h foram centrifugadas (1600g, 10 min, 4°C), o plasma foi separado em alíquotas que foram mantidas em -80°C até o dia da dosagem. A dosagem foi realizada por ELISA (Thermo Systems, Rockford, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 Design experimental VI: Efeito do antagonista de receptor CB₁ e do antagonista de receptor ET_A sobre os níveis circulantes de AVP durante a sepse

Para a dosagem de AVP foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca 6, 8, e 12 horas após a indução da sepse. Na quarta hora após a CLP um grupo de animais recebeu o tratamento com o antagonista de receptor CB₁ rimonabanto (10 mg/kg p.o.) ou com CMC 10% e outro grupo com BQ 123 (100 pmol i.c.v.) após 4 e 8 h da CLP ou salina após a indução da CLP. Para a coleta, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina (90 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e o maior volume possível de sangue foi coletado por punção cardíaca com seringas previamente heparinizadas. As amostras de sangue foram então centrifugadas (1600g, 10 min, 4°C), o plasma foi separado em alíquotas que foram mantidas em -80°C até o momento da dosagem. A dosagem AVP (6, 8 e 12 h) foi realizada por ELISA (*Arginine Vasopressin EIA*, Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) respectivamente, de acordo com as instruções do fabricante.

3.11 Análise estatística

A taxa de sobrevivência foi expressa como porcentagem, e o Teste de Log-rank (Mantel-Cox) foi utilizado para determinar as diferenças na curva de sobrevivência. Os dados de temperatura estão representados como média ± erro padrão da média (e.p.m.) da temperatura corporal. Para análise dos dados de

temperatura foi utilizado análise de variância Two-way (ANOVA) seguida do teste post hoc de Bonferroni. Contagem de células, níveis de IL-6 e de AVP também estão representados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) e foram analisados por One-way ANOVA seguida do teste *post hoc* de Bonferroni. Os valores $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS

4.1 Curva de sobrevivência após indução de sepse severa por CLP:

Os animais do grupo Sham apresentaram uma porcentagem de sobrevivência de 100%, neste e em todos os outros experimentos deste estudo. Após a CLP, na curva de sobrevivência, os animais apresentaram uma taxa de sobrevivência de 84%, 26% e 0% com 1, 3 e 9 furos, respectivamente (Fig. 4). Os animais do grupo CLP/1 furo apresentaram uma taxa de mortalidade de 16%, 48h após a CLP. Nos animais do grupo CLP/3 furos a taxa de mortalidade foi de 63%, 96h após a CLP e no grupo CLP/9 furos a taxa de mortalidade foi de 100%, 96h após a CLP.

Determinou-se que a quantidade de furos necessária para induzir sepse severa, seriam 3 furos, portanto essa foi a quantidade utilizada nos experimentos subsequentes.

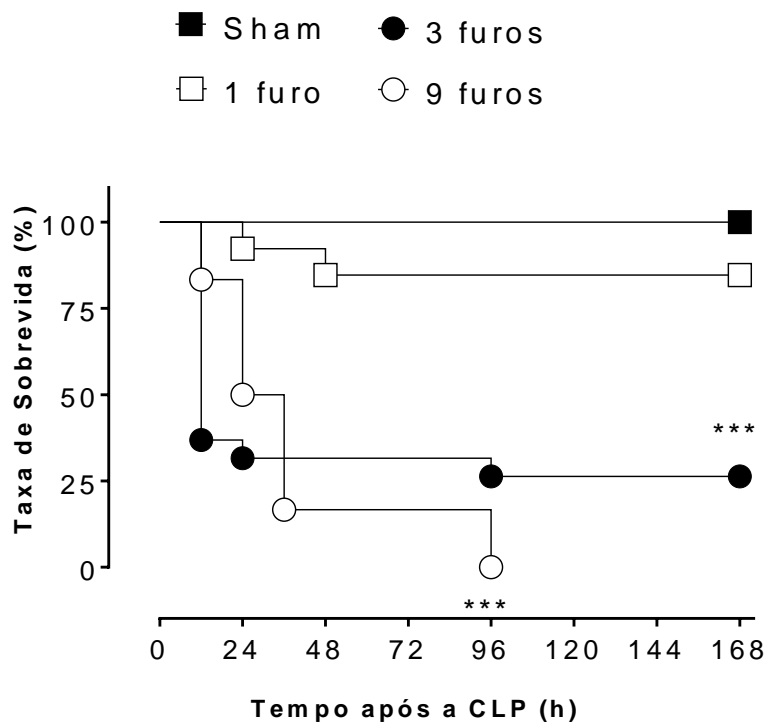


Figura 4: Curva de sobrevivência dos animais após CLP:

Os animais foram submetidos à CLP com 1, 3 e 9 furos ou à falsa cirurgia (sham). Os dados mostram a taxa de sobrevivência (%) avaliada a cada 12 h por 7 dias (n=6-19). *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo sham.

4.2 Efeito do tratamento com rimonabanto na sobrevida dos animais após indução de sepse severa por CLP:

No experimento subsequente, os animais que receberam veículo 4 h após a indução de CLP apresentaram uma taxa de sobrevida de 34% (Fig. 5). O tratamento dos animais com o antagonista de receptor CB₁ rimonabanto, em ambas as doses de 10 ou 20 mg/kg administrado pela via oral 4 h após a CLP aumentou significativamente a taxa de sobrevida dos animais (Fig. 5). Em ambas as doses, os grupos tratados com rimonabanto apresentaram uma taxa de sobrevida de 73%, resultando em uma diferença de 40% do aumento da taxa de sobrevida.

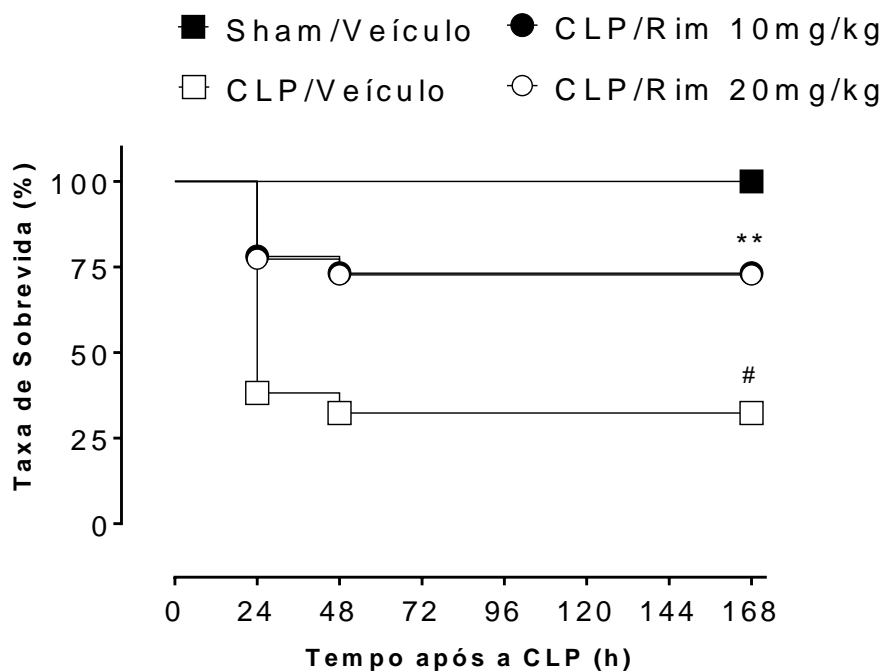


Figura 5: Efeito do tratamento com rimonabanto após a CLP sobre a taxa de sobrevivência dos animais:

Os animais foram submetidos à CLP (3 furos) ou falsa cirurgia (sham) e após 4 h receberam veículo CMC 10% ou rimonabanto (Rim, 10 ou 20 mg/kg). Os dados mostram a taxa de sobrevivência (%) avaliada a cada 12 h por 7 dias (n = 8-41). ** p<0,01 quando comparados ao grupo CLP/veículo e # p<0,01 quando comparados ao grupo sham..

4.3 Efeito do tratamento com antagonistas dos receptores ET_A e ET_B na taxa de sobrevivência após a CLP:

Os animais submetidos à CLP que receberam tratamento com veículo 2 e 4 h, ou 8 h após a indução da sepse apresentaram uma taxa de sobrevivência de 58% e 20%, respectivamente (Fig. 6A e 6B). De maneira similar, o tratamento dos animais submetidos à CLP com BQ 123 apresentaram uma taxa de sobrevivência de 44% e 20% quando o tratamento foi realizado 2 e 4 h ou 8 h após a indução da CLP, respectivamente (Fig. 6A e 6B).

Por outro lado, animais submetidos à CLP e tratados com salina 4 e 8 h após a indução da sepse apresentaram uma taxa de sobrevivência de 14% enquanto que os animais submetidos à CLP e tratados com BQ 123 no mesmo esquema apresentaram uma taxa de sobrevivência de 71% (Fig. 7A). Diferentemente, o antagonista de receptor ET_B, BQ788, administrado após 4 e 8 h após a CLP não modificou significativamente a taxa de sobrevivência (40%) em relação ao grupo que recebeu somente veículo (Fig 7B).

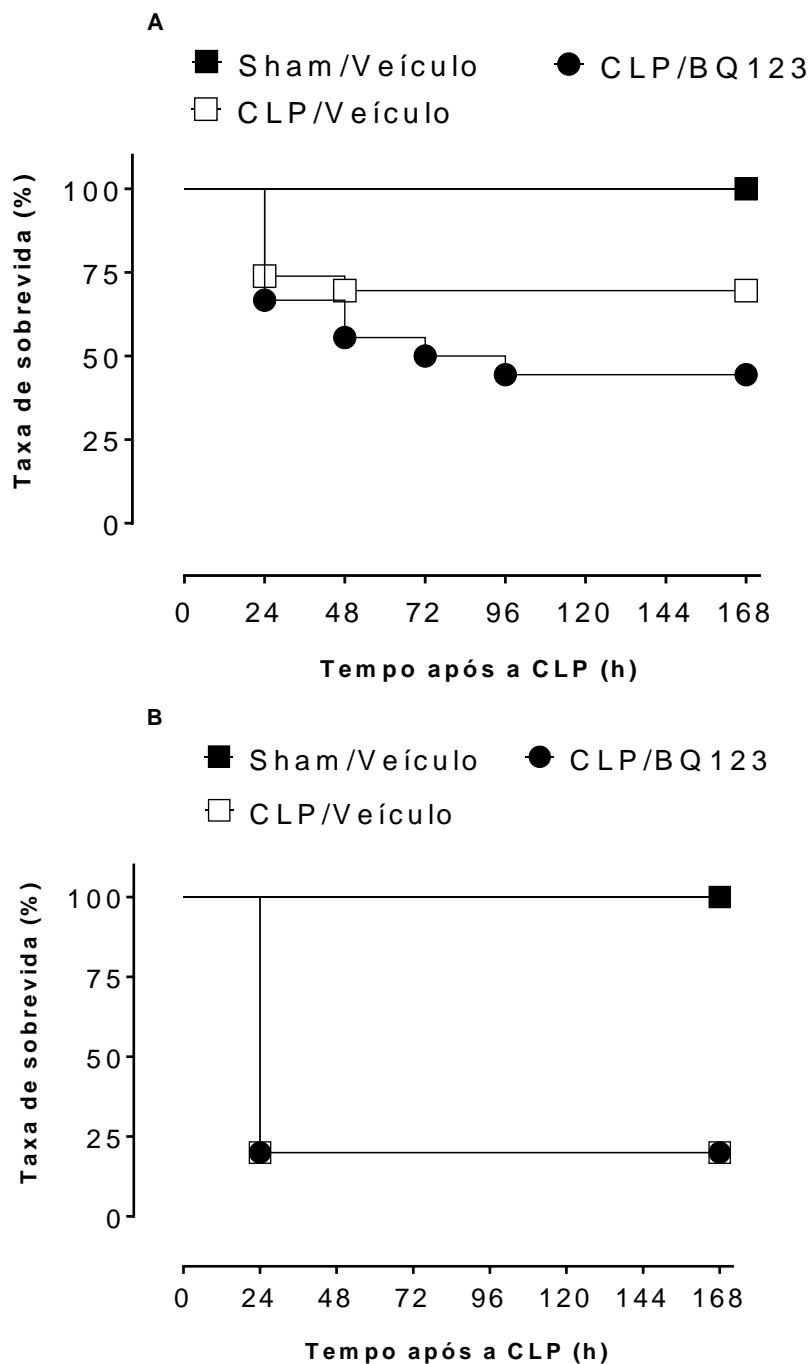


Figura 6: Efeito do tratamento com BQ123 2 e 4 h ou 8 h após CLP sobre a taxa de sobrevivida dos animais:

Os animais foram submetidos à CLP (3 furos) ou à falsa cirurgia (sham) e após 2 e 4 h (painel A), 8 h (Painel B) receberam o antagonista de receptor ET_A BQ123 (100 pmol, i.c.v.) ou o mesmo volume de veículo (salina). Os dados apresentam a taxa de sobrevivida (%) avaliada a cada 12 h durante 7 dias (n=6-18). Não houve diferença estatística entre os grupos CLP/veículo e CLP/BQ123.

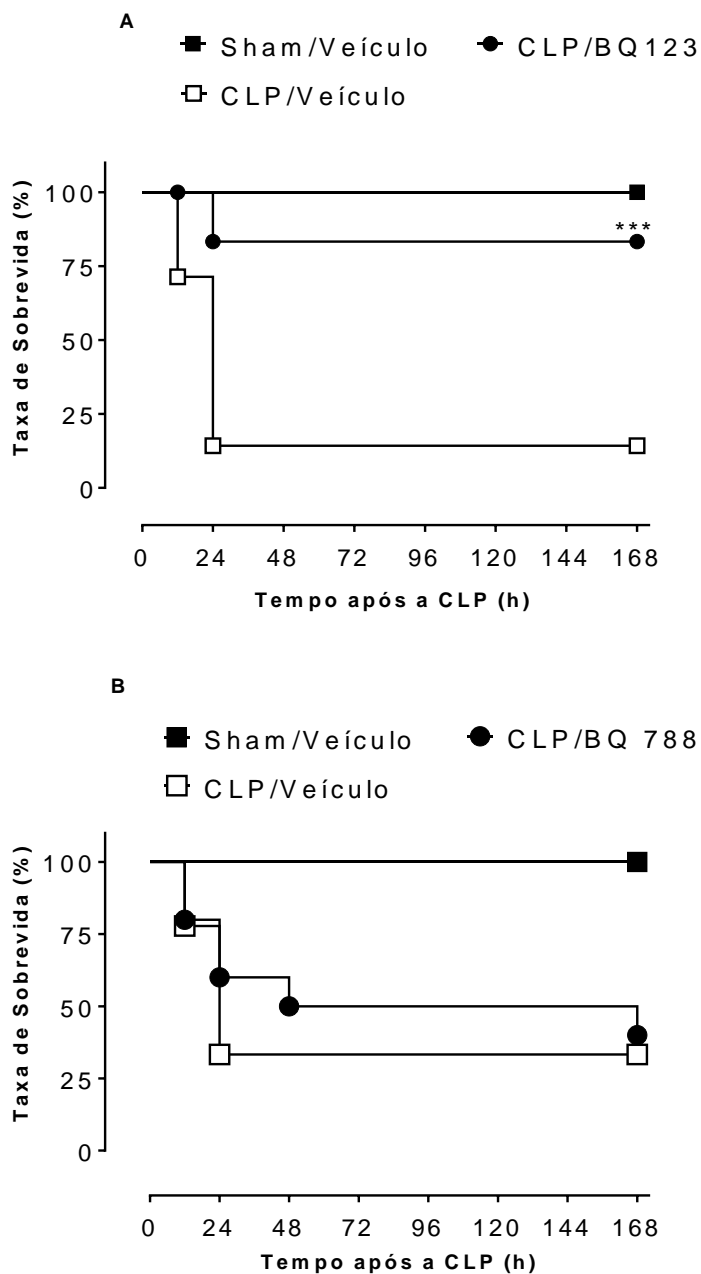


Figura 7: Efeito do tratamento com BQ 123 e BQ 788 4 e 8 h após a CLP sobre a taxa de sobrevida dos animais:

Os animais foram submetidos à CLP (3 furos) ou à falsa cirurgia (sham) e após 4 e 8 h receberam o antagonista de receptor ET_A BQ123 (100 pmol, i.c.v.) (Painel A) ou antagonista de receptor ET_B BQ788 (100 pmol, i.c.v.) (Painel B) ou o mesmo volume de veículo (salina). Os dados apresentam a taxa de sobrevida (%) avaliada a cada 12 h durante 7 dias (n=6-10). *** $p < 0,001$ quando comparados ao grupo CLP/Veículo.

4.4 Efeito do tratamento com rimonabanto na temperatura corporal dos animais após CLP

Este experimento foi executado em uma sala de experimentação com temperatura ambiente de 28°C (temperatura termoneutra para ratos) a fim de que se pudesse observar melhor o desenvolvimento da resposta febril nos animais após a indução de sepse. Todos os grupos apresentaram uma queda na T_c devido à anestesia com solução de cetamina/xilazina, a qual durou aproximadamente 2 h (Fig 8). Em seguida, a T_c retornou aos níveis basais e todos os grupos mostraram um aumento na T_c após a cirurgia com um pico na quarta hora. A partir deste tempo, o grupo sham que recebeu somente veículo apresentou uma diminuição na temperatura corporal que se normalizou após algumas horas. Diferentemente, o grupo submetido à CLP, continuou com a temperatura elevada por aproximadamente 4 h. O tratamento dos animais com rimonabanto reduziu significativamente a temperatura corporal dos animais submetidos à CLP para níveis similares aqueles observados com o grupo falso-operado (Fig. 8).

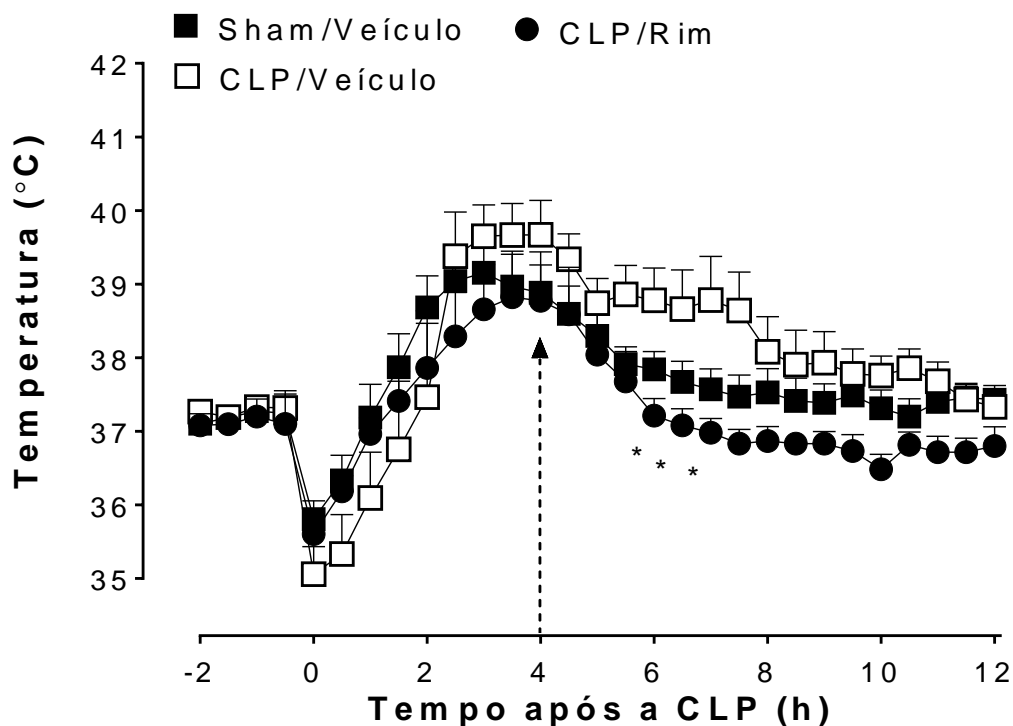


Figura 8: Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto sobre a temperatura corporal dos animais após CLP:

Os animais foram submetidos à CLP ou à falsa cirurgia (Sham) e após 4 h receberam veículo (CMC 10%) ou rimonabanto (Rim, 10 mg/kg) por via oral. A temperatura corporal dos animais foi avaliada a cada 30 min por 2 h anteriores à cirurgia (tempo 0) até 12 h após a CLP. Os dados mostram média \pm erro padrão da média (e.p.m.) da temperatura corporal (°C) dos animais (n = 6-8). * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo CLP/veículo.

4.5 Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto na migração celular, níveis de IL-6 e no número de leucócitos circulantes após a CLP

A fim de compreender melhor os efeitos do rimonabanto na sobrevivência dos animais submetidos à sepse foram avaliados diversos parâmetros desta resposta como a migração celular para a cavidade peritoneal 8 h após a CLP, a contagem global e diferencial de leucócitos no plasma após 2, 4, 6, 8 e 12 h após a CLP e os níveis circulantes de IL-6 no plasma, 6 e 8 h após à CLP. A migração de células, especificamente de neutrófilos, para a cavidade peritoneal foi evidenciada 8 h após a CLP. O tratamento dos animais com rimonabanto 4 h após a CLP na mesma dose que reduziu a mortalidade não alterou a migração celular para a cavidade peritoneal induzida por CLP (Fig. 9).

Um aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 foi observado nos animais do grupo que recebeu veículo, 6 e 8 h após a indução de CLP quando comparados aos animais do grupo sham (Fig. 10) ou animais naive ($153,7 \pm 29,5$ pg/mL). O tratamento dos animais com rimonabanto não alterou os níveis plasmáticos aumentados de IL-6, 6 ou 8 h após a CLP (Fig. 10).

Na sequência, avaliamos o número de leucócitos circulantes antes e após a administração de rimonabanto a fim de caracterizar melhor o modelo utilizado (particularmente 2 h e 4 h após a CLP) bem como para avaliar o efeito do rimonabanto sobre estas variações (particularmente 6h , 8 h e 12h após a CLP). Na contagem global e diferencial de leucócitos no sangue não houve alterações significativas entre os grupos 2 h após a CLP (Fig. 11). Quatro horas após a CLP, o grupo que recebeu somente veículo apresentou neutropenia em relação ao grupo sham (Fig. 11). Foi observada uma leucopenia 6 h após a

CLP em relação ao grupo sham, decorrente de uma neutropenia do grupo e linfocitopenia (Fig.12). O tratamento dos animais com rimonabanto não modificou estas respostas. Não foram observadas alterações significativas no número de leucócitos circulante 8 (Fig. 12) e 12 h após a CLP (dados não apresentados).

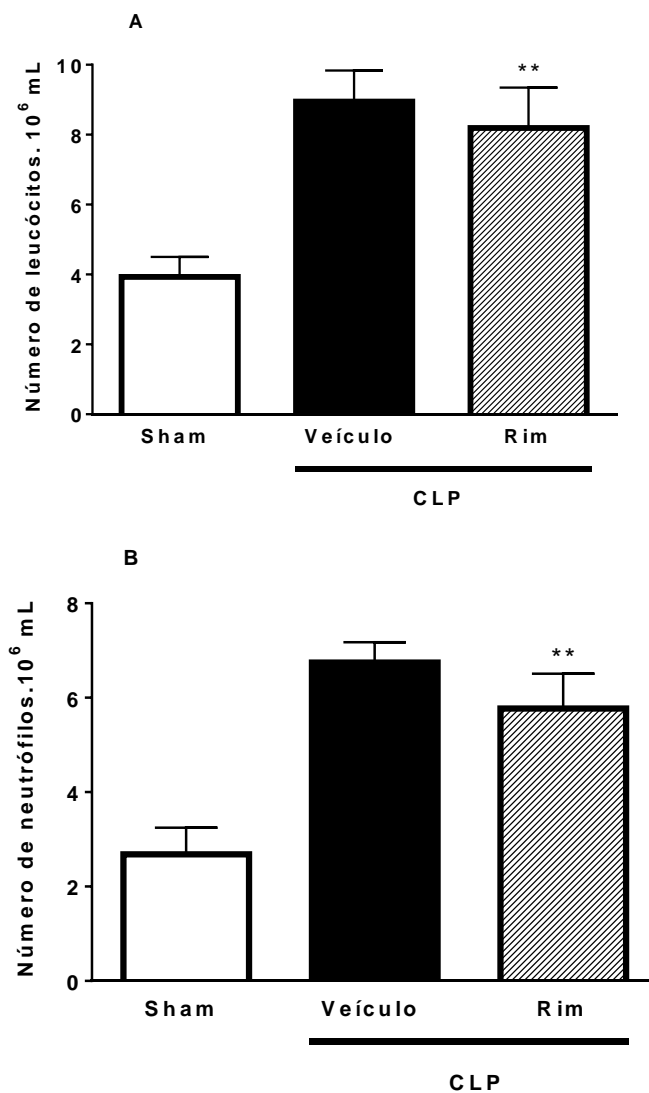


Figura 9: Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto sobre a migração celular para a cavidade peritoneal após a CLP:

Os animais foram submetidos à CLP ou a falsa cirurgia e após 4 h receberam veículo ou rimonabanto (Rim, 10 mg/kg) por via oral. O fluido peritoneal foi coletado 8 h após a CLP e o número de leucócitos totais (painel A) e de neutrófilos (painel B) foi avaliado. Os dados representam média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de células/mL do fluido peritoneal (n=4-7). ** $p < 0,01$ quando comparado ao grupo sham operado.

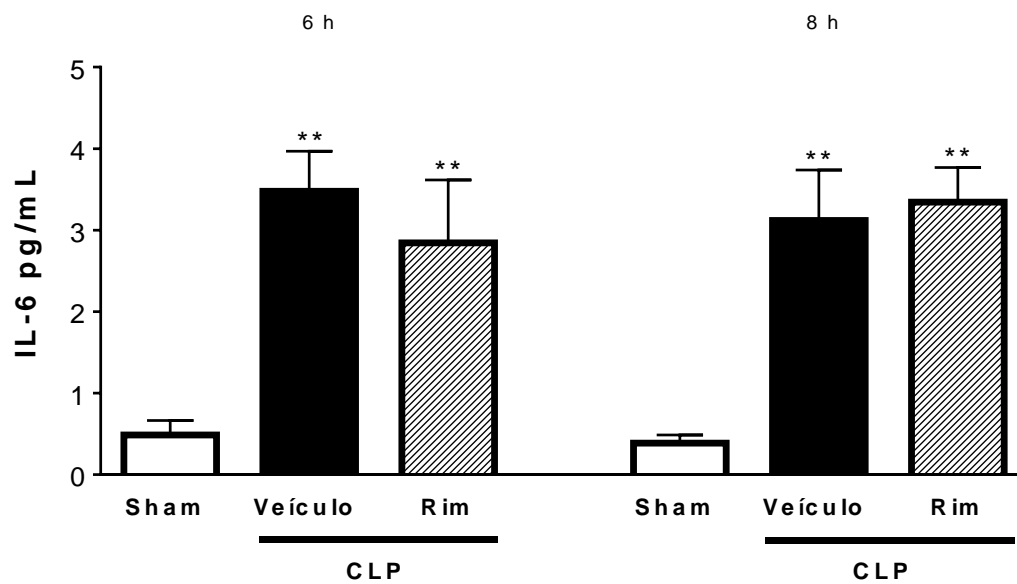


Figura 10: Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto sobre os níveis plasmáticos de IL-6 após CLP:

Os animais foram submetidos à CLP ou a falsa cirurgia (sham) e após 4 h receberam veículo ou Rim (10mg/kg). Amostras de sangue foram coletadas 6 h e 8 h após a CLP para avaliar os níveis de IL-6. Os dados representam a média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos níveis de IL-6 em pg/mL (n=4-7). ** p<0,01 quando comparados ao grupo sham.

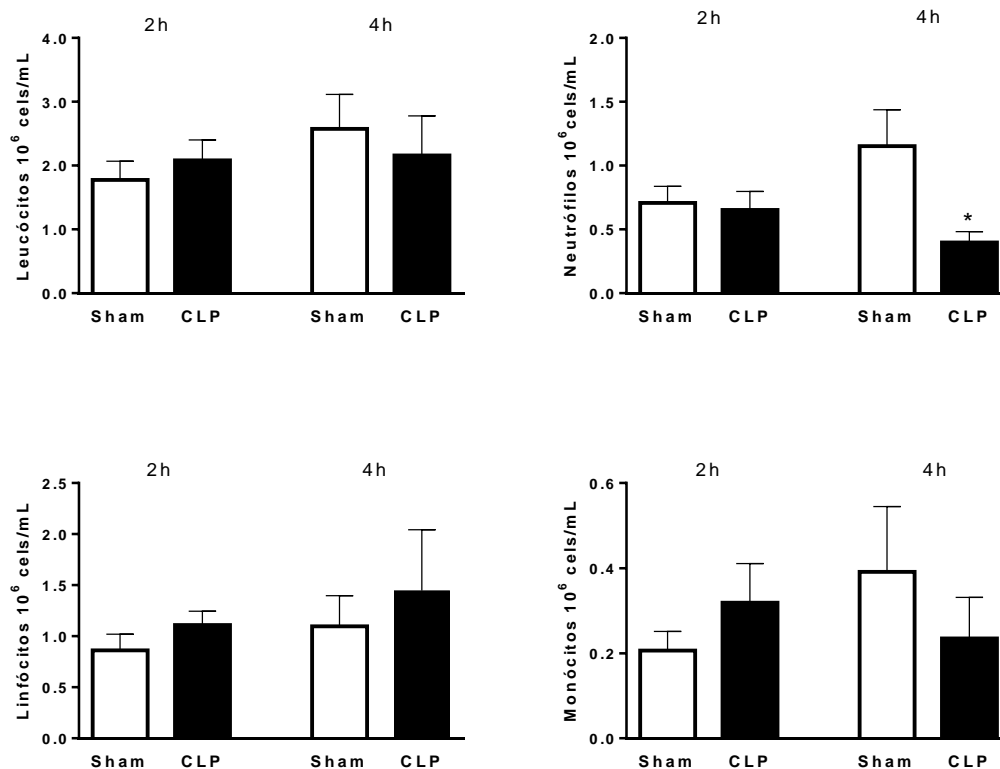


Figura 11: Avaliação do número de leucócitos circulantes 2 e 4 h após a indução de CLP:

Os animais foram submetidos à CLP ou à falsa cirurgia. Amostras de sangue foram coletadas 2 e 4 h após a CLP para avaliar o número de leucócitos circulantes. Os dados representam média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de leucócitos/mL do sangue (n=6). * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo sham.

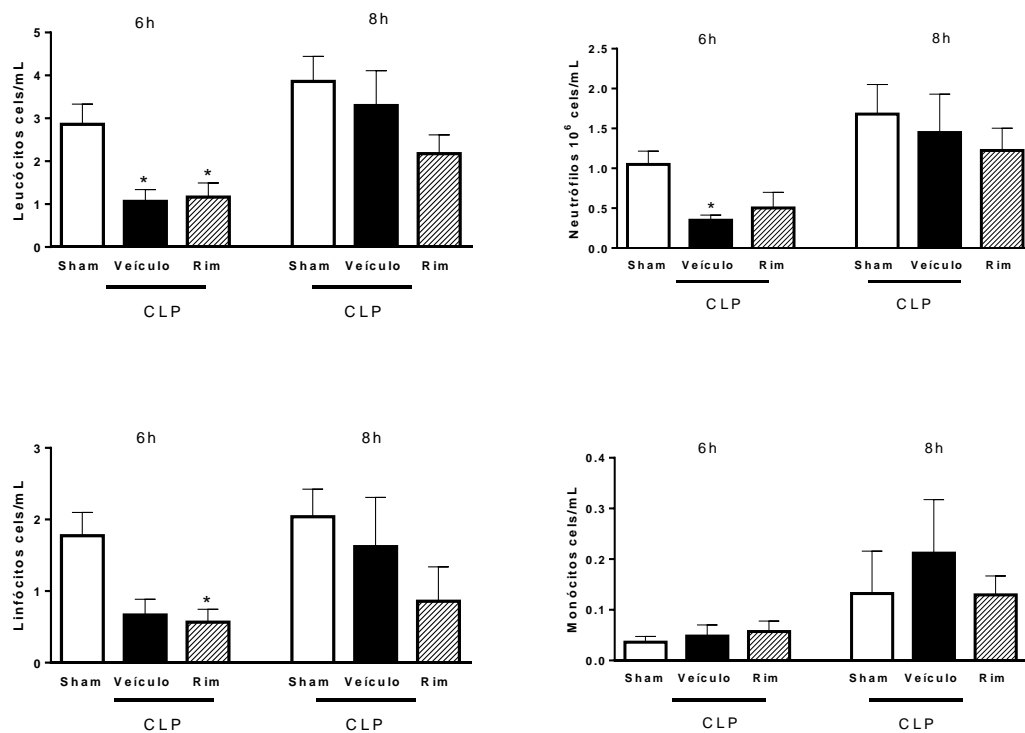


Figura 12: Efeito do rimonabanto sobre o número de leucócitos circulantes 6 e 8 h após a indução de CLP:

Os animais foram submetidos à CLP ou à falsa cirurgia e após 4 h receberam veículo ou Rim (10 mg/kg). Amostras de sangue foram coletadas 6 e 8 h após a CLP para avaliar o número de leucócitos circulantes. Os dados representam média \pm erro padrão da média (e.p.m.) do número de leucócitos/mL do sangue (n=4-7). * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo sham.

4.6 Efeito do rimonabanto e do BQ 123 sobre os níveis circulantes de AVP após CLP

Os níveis circulantes de AVP se mantiveram constantes nos animais sham operados em todos os tempos avaliados. Os níveis de AVP no plasma de animais submetidos à CLP não foram diferentes do grupo sham operado 6 h após a cirurgia. O tratamento dos animais com Rim 4 h após a CLP causou uma diminuição significativa na liberação de AVP na sexta hora em relação ao grupo CLP/Veículo (Fig. 13). Após 8 h, ambos os grupos CLP/Veículo e CLP/Rim apresentaram uma diminuição significativa dos níveis de AVP em relação ao grupo sham operado (Fig.13). No entanto, após 12 h, o tratamento dos animais submetidos à CLP tanto com rimonabanto quanto com BQ123 aumentou significativamente os níveis plasmáticos de AVP quando comparados ao grupo CLP/Veículo (Fig. 13).

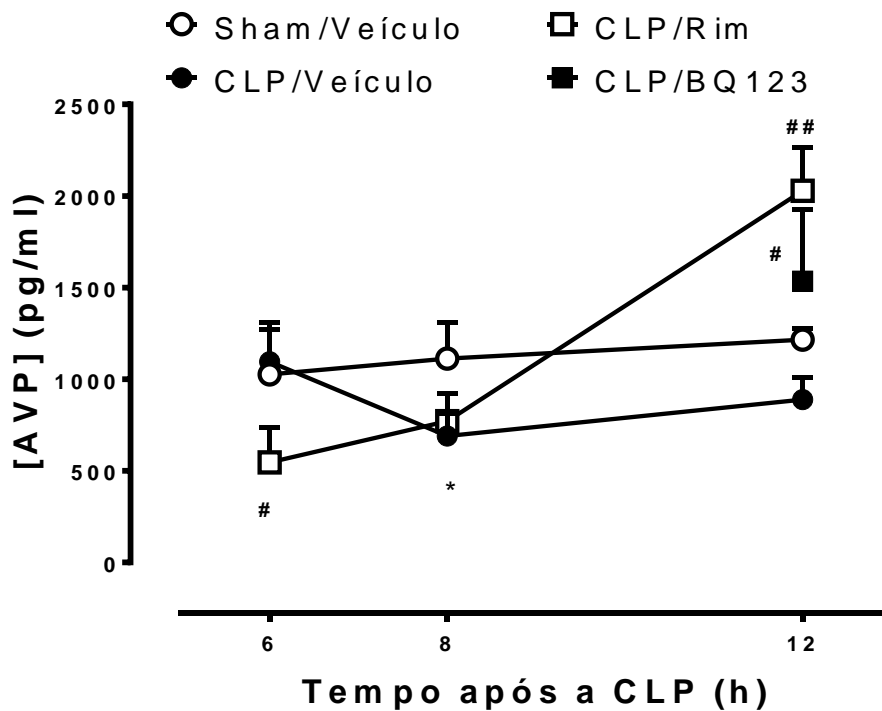


Figura 13: Efeito do tratamento dos animais com rimonabanto ou com BQ123 sobre os níveis plasmáticos de AVP após CLP:

Os animais foram submetidos à CLP ou a falsa cirurgia e receberam veículo (CMC 10%) ou Rim (10 mg/kg) 4 h após a CLP ou BQ 123 (100 pmol, i.c.v.) 4 h e 8h após a CLP. Amostras de sangue foram coletadas 6, 8 e 12 h após a cirurgia afim de avaliar os níveis plasmáticos de AVP por ELISA. Os dados representam média \pm erro padrão da média (e.p.m.) dos níveis de AVP em pg/mL no sangue ($n = 4-12$). # $p < 0.05$ quando comparado ao grupo CLP/Veículo, * $p < 0.05$ quando comparado ao grupo Sham/Veículo, ## $p < 0.05$ quando comprado ao grupo CLP/Veículo.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo evidenciamos que o bloqueio dos receptores CB₁ e dos receptores ET_A centrais reduziu a mortalidade induzida por CLP em ratos. O bloqueio dos receptores CB₁ não afetou as respostas periféricas, tais como migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, a leucocitose e os níveis circulantes de IL-6, mas reduziu a resposta febril e alterou os níveis sanguíneos de AVP, sugerindo uma ação central do antagonista.

A síndrome séptica é caracterizada por alterações fisiopatológicas, tais como hipotensão, hipotermia ou febre, acidose metabólica, hemorragia pulmonar e pode levar à morte em horas (BONE et al., 1989). O modelo de sepse utilizado no presente estudo, CLP, é um modelo clinicamente relevante da sepse, uma vez que reproduz a peritonite séptica em humanos (GOURINE et al., 1998; HUBBARD et al., 2005) e induz febre em ratos e camundongos (GOURINE et al., 1998; WICHTERMAN, 1980). Além disso, a infecção por CLP tem a vantagem de que os microorganismos envolvidos são de origem mista e originados a partir de uma infecção local (HUBBARD et al., 2005). Este modelo envolve uma estimulação pirogênica contínua e reproduz uma infecção com melhor relação ao que ocorre na clínica do que quando o estímulo é introduzido de forma exógena a partir de uma única administração de toxina bacteriana, tal como lipopolisacarídeo (GOURINE et al., 1998). A CLP em roedores tornou-se o modelo mais amplamente utilizado para a sepse experimental e é atualmente considerado como o padrão ouro na investigação da sepse (BURAS et al., 2005; RITTIRSCH et al., 2009). Os efeitos sobre a mortalidade após CLP variam em função do tamanho da agulha e número de punções do ceco e

outras variáveis, tais como reposição volêmica, antibióticos de amplo espectro e nutrição parenteral (BAKER et al., 1983; RITTIRSCH et al., 2009; WICHTERMAN, 1980). Em nosso estudo, verificamos que 1 perfuração produziu uma sepse leve e a maioria dos animais sobreviveram, enquanto que 3 perfurações promoveram uma sepse grave (26% de sobrevida). Nove perfurações produziram uma sepse muito mais grave e a taxa de mortalidade tornaria nosso trabalho inviável. Por esta razão, optamos por 3 perfurações para os experimentos subjacentes.

O envolvimento dos eCB em estados de hipotensão foi descrito anteriormente por Wagner et al., (1997) que demonstrou que SR141716A, um antagonista seletivo de receptor CB_1 , provocou um aumento da pressão sanguínea em ratos submetidos a choque hemorrágico. Estes autores sugeriram que este efeito poderia ser atribuído a uma ação sobre os receptores CB_1 periféricos. Mais tarde, Varga et al., (1998) demonstraram que o mesmo antagonista do receptor CB_1 também reverteu a hipotensão observada no choque séptico após altas doses de LPS. Neste estudo, os autores atribuíram o efeito anti-hipotensor do antagonista do receptor CB_1 , observado 2 h após a injeção de LPS, à inibição da liberação de eCB gerados por macrófagos e plaquetas. Diferentemente do nosso estudo, os pesquisadores sugeriram que este efeito protetor contra a hipotensão, foi devido a um efeito sistêmico, e não central, do SR141716A. Godlewski et al. (2004) relataram que a ativação dos receptores pré-sinápticos de CB_1 por eCB contribui para a inibição da resposta vasopressora neurogênica também na fase inicial do choque séptico induzido por altas doses de LPS. Portanto, o antagonista do receptor CB_1 SR141716 aboliu o efeito inibitório do LPS sobre a resposta vasopressora neurogênica. No

entanto, esses dados são de difícil interpretação, uma vez que o estudo foi feito em ratos anestesiados. Estes autores sugeriram que os receptores CB₁ estavam localizados pré-sinápticamente sobre as fibras nervosas simpáticas pós-ganglionares que inervam os vasos de resistência.

A queda da pressão arterial durante o choque séptico também foi inicialmente atribuída à liberação de TNF- α , seguido por um aumento nos níveis de NO (KIRKEBØEN; STRAND, 1999). Mais tarde, alguns estudos sugeriram que mecanismos centrais podem estar envolvidos nesta hipotensão. A injeção de lidocaína e fentolamina, um antagonista dos receptores α -adrenérgicos, na área pré-óptica do hipotálamo anterior inibiu a hipotensão e aumentou do TNF- α induzidos por altas doses de LPS sugerindo que um mecanismo noradrenérgico central, ao invés de mecanismos periféricos, poderiam estar envolvidos na hipotensão observada durante a sepse (YILMAZ et al., 2008). Além disso, outro estudo do mesmo grupo demonstrou o envolvimento dos eCB sobre este mecanismo central mostrando que a administração via i.c.v. de rimonabanto evitou a redução inicial (10 min a 3 h) na pressão sanguínea induzida por LPS em ratos e que estes efeitos são mediados por receptores CB₁ centrais (VILLANUEVA et al., 2009). No entanto, estes autores, em decorrência do tempo máximo de avaliação de 3 h não relataram a importância deste fato na sobrevivência dos animais.

A pressão arterial dos animais não foi avaliada neste estudo. No entanto, observou-se que a administração periférica do rimonabanto aumentou significativamente a taxa de sobrevivência verificada após sepse induzida por CLP. A primeira diferença entre o nosso estudo e os anteriores foi que o tratamento com o rimonabanto foi realizado 4 h após a indução da sepse, uma situação

mais possível de ser realizada na clínica. A justificativa para a administração do rimonabanto neste horário foi baseada na hipótese levantada previamente. Usando fatias de cérebro demonstramos anteriormente que a ativação dos receptores ET_A por ET-1 induz liberação de eCB, o que leva à inibição das correntes excitatórias pós-sinápticas espontâneas nas células vasopressinérgicas no SON (ZAMPRONIO et al., 2010). A secreção de hormônios tais como a AVP depende da atividade dos neurônios magnocelulares vasopressinérgicos, e isto é controlado pela transmissão glutamatérgica (HRABOVSKY E LIPOSITS, 2008; JOURDAIN et al., 1998; MOOS et al., 1997; NISSEN et al., 1995; SHIBUYA et al., 2000). Por isso, este efeito sobre as células vasopressinérgicas nos sugeriu que a ET-1 poderia exercer uma ação inibitória sobre a liberação de AVP através da liberação de eCB. Um trabalho de Sharma e colaboradores (1997b) demonstrou que níveis elevados de ET-1 foram encontrados 4, 8 e 12 h após a indução da sepse por administração de *E.coli* e que estes voltaram aos níveis basais após 24 horas. Da mesma forma Lundblad et al., (1995) mostraram níveis aumentados de ET-1 após 8 h da indução da sepse por perfuração cecal, retornando aos níveis basais após 24 horas. Portanto, o rimonabanto foi administrado no momento em que os níveis de ET-1 estavam bastante elevados em ratos.

A ET-1 desempenha um papel-chave na regulação de respostas hemodinâmicas que ocorrem durante vários estados de doença, incluindo a sepse. Nos estados de choque, há um aumento substancial dos níveis de ET-1 circulante, que geralmente são baixos e acredita-se que a ET-1 causa mudanças hemodinâmicas similares às aquelas observadas durante a fase hipodinâmica da sepse (ISKIT et al., 2004). Numerosos estudos demonstraram

que o aumento significativo dos níveis de ET-1 no plasma durante a sepse pode ser associado com o aumento da resistência vascular e diminuição do fluxo sanguíneo do órgão sob essas condições (PITTET et al., 1991; SZALAY et al., 1998). Os níveis aumentados de ET-1 podem levar à vasoconstrição excessiva de leitos vasculares periféricos e podem, portanto, contribuir para a disfunção múltipla de órgãos (WANECEK et al., 2000). Um estudo de Szalay e colaboradores (1998) demonstrou que em ratos normais, a injeção de ET-1 causa um aumento da resistência vascular periférica e diminuição do débito cardíaco, semelhante ao estado hipodinâmico que ocorre durante a sepse. Ainda, sugeriram que o uso do antagonista de receptor ET_A, BQ-610 em ratos com sepse induzida por CLP, causa aumento do débito cardíaco e diminuição da resistência vascular periférica total durante a fase hipodinâmica da sepse, sugerindo que a ET-1 desempenha um papel importante no desenvolvimento da fase hipodinâmica e que muitos desses efeitos podem ser significativamente influenciados pelo tratamento com antagonistas de receptor ET_A (SZALAY et al., 1998).

Por outro lado, existem autores que defendem que a ET-1 pode ter um papel benéfico na sepse. Estudos têm sugerido que a liberação de ET-1 endógena durante a endotoxemia pode ajudar a aliviar a hipotensão grave, em especial através da inibição da NO sintase (ISKIT e GUC, 2004, ISKIT e GUC 2003).

Embora não tenhamos medido os níveis de ET-1 em nossos animais, nossos resultados sugerem que o bloqueio dos receptores CB₁ concomitantemente com o aumento deste peptídeo durante a sepse induzida por CLP melhora significativamente a taxa de sobrevivência dos animais.

Portanto, se a hipótese levantada é verdadeira, deve-se esperar que o bloqueio dos receptores endotelinérgicos centrais em momentos semelhantes tenham efeitos similares.

A administração de antagonista do receptor ET_A BQ123 aumentou a taxa de sobrevivência em comparação com o grupo submetido à CLP quando o antagonista foi administrado 4h e 8h após a CLP, mas não apresentou alterações na taxa de sobrevivência, se administrado após 2 e 4 h ou após 8 h. Estes resultados sugerem que os efeitos centrais de ET-1 não são importantes para a taxa de sobrevivência dos animais particularmente nas primeiras horas (2 e 4 h) após a sepse. Após 8 h é possível que o processo já tenha atingido uma determinada gravidade que não seja possível de ser revertido ou que administrações extras de antagonista sejam necessárias. Por outro lado, a participação central de ET-1 é essencial para aumentar a taxa de mortalidade entre 4 h e 8 h após a CLP em ratos. Esses dados também sugerem que os níveis desse peptídeo atingiram níveis centrais importantes em todos esses momentos. O presente estudo corrobora com um estudo anterior de Iskit e colaboradores (2004), no qual os autores demonstraram que a utilização de bosentan, um antagonista não-seletivo dos receptores de endotelina, em um modelo de sepse grave melhorou a taxa de sobrevivência em ratos quando administrado durante a fase tardia da sepse. No entanto, o presente estudo demonstra que este mecanismo é, pelo menos em parte, devido ao bloqueio do receptor no sistema nervoso central.

A administração do antagonista do receptor ET_B , BQ788, ao contrário do antagonista do receptor ET_A , não causou qualquer aumento significativo na taxa de sobrevivência. Um estudo de Fabrício et al. (1998) sugere que a febre

induzida por LPS em ratos é atenuada por bosentan, e BQ788, mas não por BQ123 (FABRÍCIO et al., 1998). Portanto, o aumento da taxa de sobrevivência após o bloqueio de receptores de endotelina não parece estar relacionado com um bloqueio da resposta febril. Na verdade, existem alguns estudos que mostram que o bloqueio da febre por antipiréticos reduz a sobrevivência durante a sepse. Em 1995, Shann alertou a comunidade médica de que o uso de antipiréticos na sepse pode ser prejudicial. Seu pedido foi baseado em vários modelos animais experimentais de infecção grave do que o uso de medicamentos antipiréticos parecem reduzir a taxa de sobrevivência.

Figueiredo e colaboradores (2012) demonstraram que a resposta febril induzida por CLP em ratos ocorreu cerca de 6 e 12 horas após a cirurgia, envolvendo alguns dos pirogênicos endógenos já conhecidos, tais como a IL-1 β , IL-6 e as prostaglandinas. O mesmo grupo mostrou também um papel crucial para a IL-6 na resposta febril induzida pela injeção de bactérias *E. coli* vivas (SOARES et al., 2012). Em nosso estudo, observamos o mesmo padrão de resposta febril descrito por Figueiredo et al. (2012). Além disso, mostramos que o rimonabanto, na mesma dose que melhora as taxas de sobrevivência dos animais, reduz a resposta febril a níveis semelhantes ao do grupo sham, que recebeu apenas veículo. Acreditamos que o efeito de redução da febre exercido pelo rimonabanto seja apenas um efeito secundário à sua ação principal pois, a redução da temperatura corporal somente, como comentado anteriormente, não seria benéfico aos animais. Como demonstraremos mais adiante, esta redução da temperatura corporal dos animais foi acompanhada de outras alterações no caso da administração de rimonabanto, que não são características dos antipiréticos clássicos. Os antipiréticos clássicos, os anti-

inflamatórios não esteroidais, exercem seus efeitos antipiréticos somente através do bloqueio da síntese de prostaglandinas no hipotálamo (SIMMONS et al., 2004).

Os resultados apresentados acima sugerem que possa existir uma correlação temporal entre ET-1 e a liberação de eCB durante a sepse. No entanto, apesar de ter demonstrado que o efeito do antagonista do receptor ET_A parece ocorrer no sistema nervoso central, o mesmo não pode ser dito para o rimonabanto neste ponto. Como mencionado acima, um trabalho anterior sugeriu a participação periférica de eCB na vasodilatação e hipotensão arterial (GODLEWSKI et al., 2004; WAGNER et al., 1998).

O controle da infecção bacteriana é importante para o desenvolvimento ou não da sepse e este controle depende em parte de uma eficiente migração de neutrófilos para o local da infecção (NATHAN, 2006). Recentemente, isto foi demonstrado por um estudo que envolveu a IL-33. Este estudo demonstra o envolvimento desta interleucina em permitir que os leucócitos presentes na circulação migrassem mais eficientemente para o sítio inflamatório e isto é essencial para a resolução de sepse (ALVES-FILHO et al., 2010).

Além da migração de leucócitos para o sítio inflamatório, durante a sepse ocorrem alterações no número de leucócitos circulantes e nos níveis de IL-6 (FIGUEIREDO et al., 2012) que parecem ser importantes para a defesa do organismo contra a infecção. Os granulócitos, especialmente neutrófilos, são produzidos a partir de células mielóides na medula óssea e tem um importante papel na resposta imune inata contra infecções bacterianas e fúngicas (UEDA et al., 2014). Uma vez que a resposta inflamatória é iniciada, os neutrófilos são as primeiras células a serem recrutadas para os sítios de infecção (SIMOVART

et al., 2003). Deste modo, durante a sepse ocorre uma ativação dos neutrófilos e estes são liberados para a corrente sanguínea levando a uma neutrofilia. Porém muitos pacientes apresentam uma diminuição do número de neutrófilos, isto pode ocorrer devido a uma desregulação do receptor de quimiocina CXCR2, o qual tem um papel crucial no recrutamento de neutrófilos. Sabe-se que durante a sepse ocorre uma desregulação na expressão de CXCR2 em neutrófilos circulantes e que isto está associado ao comprometimento da migração para o sítio infeccioso. Tanto um estado de hiperinflamação, no qual ocorre um grande número de neutrófilos, quanto um estado de imunossupressão no qual ocorre um pequeno número de neutrófilos, são estados críticos para o paciente (LIVINGSTON et al., 2003; NAHM et al., 2008; PARK et al., 2011). Em nosso estudo, após 4 horas da CLP, observou-se neutropenia do grupo CLP/Veículo em relação ao grupo sham. Nesta fase inicial da sepse, é mais comum encontrar um aumento do número de neutrófilos, bem como nesta fase é mais comum encontrar aumento da temperatura corporal. Porém, quanto mais severa se torna a SIRS, mais frequentemente se observa uma inversão na contagem de leucócitos (LIU et al., 2012). Nossos resultados apresentaram também uma diminuição significativa na contagem de leucócitos 6 h após a CLP em relação ao grupo sham. Simovart et al., também observaram uma diminuição brusca na contagem de leucócitos na sexta hora após a indução de sepse. Ainda, estes autores associaram esta diminuição na sexta hora com um aumento na contagem de *E. coli* no sangue. De maneira semelhante ao que ocorreu em nosso estudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos na contagem diferencial de monócitos nos horários estabelecidos nesse estudo.

Com relação aos níveis aumentados de IL-6, em concordância com o nosso estudo, Figueiredo et al. (2012) mostra que após 3 h e 6 h da indução da sepse, os animais apresentam níveis elevados desta citocina no plasma. A IL-6, frequentemente encontrada em altos níveis em pacientes com sepse ou choque séptico, parece estar correlacionada com a fase aguda e com a severidade da doença (DAMAS et al., 1991). A IL-6, juntamente com a IL-1 β e o TNF- α são as principais citocinas que agem como pirógenos endógenos ao LPS (KLUGER, 1991). Soares et al., (2012) demonstrou que a febre induzida por injeção de *E. coli* somente foi reduzida quando os níveis de IL-6 no cérebro foram inibidos (FIGUEIREDO et al., 2012; SOARES et al., 2012).

Portanto, é importante salientar que os resultados obtidos neste estudo quanto a estes parâmetros estão, de maneira geral, de acordo com estudos anteriores e funcionam como importantes marcadores da ocorrência e da gravidade da sepse: migração celular para o peritônio, leucopenia caracterizada por neutropenia e linfocitopenia entre 4 e 8 h e níveis aumentados de IL-6 no plasma (ALVES-FILHO et al., 2010; DAMAS et al., 1991; SIMOVART et al., 2003).

No presente estudo, o tratamento dos animais com rimonabanto não modificou a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, a leucometria e os níveis de IL-6, 6 h e 8 h após a CLP. A falta de um efeito do rimonabanto nestas respostas periféricas características da sepse induzida por CLP e a diminuição da resposta febril, uma resposta que é controlada pelo hipotálamo, sugeriu que o Rimonabanto não está atuando periféricamente ao aumentar a taxa de sobrevivência dos animais, mas sim no sistema nervoso central, o que está em conformidade com a nossa hipótese anterior. Além disso, um estudo de

Rinaldi-Carmona et al., 1995 sugeriu que o rimonabanto, além de possuir boa biodisponibilidade oral e uma longa duração de ação, é um antagonista funcional de receptor canabinóide central, apresentando maior afinidade por receptores canabinóides centrais do que por receptores canabinóides periféricos (RINALDI-CARMONA et al., 1995).

Portanto, os resultados obtidos até o momento estão em consonância com os resultados obtidos por Zamprônio et al., (2010) e que embasaram este estudo sugerindo um efeito central das endotelinas e dos eCB. No entanto, até o momento, não podemos afirmar que os efeitos observados para os dois antagonistas (Rimonabanto e BQ123) de aumento da taxa de sobrevivência dos animais estaria ocorrendo pela mesma razão. Mais ainda, que estes efeitos estariam relacionados à liberação de AVP. Portanto o próximo passo foi avaliar se estes tratamentos poderiam modificar os níveis de AVP no sangue. Nossos resultados mostraram que os animais apresentaram níveis plasmáticos normais de AVP 6 h após a CLP, que foi significativamente reduzido 8 h após a CLP e voltou aos níveis normais em 12 h. O tratamento com rimonabanto 4 h após a CLP mudou significativamente este perfil por antecipar a diminuição do AVP (2 h após sua administração, portanto na sexta hora após a CLP), mas 12 h após a CLP aumentou significativamente os níveis circulantes de AVP. Nós não testamos o tratamento BQ123 em todos os horários, mas o aumento dos níveis de AVP após 12 h foi semelhante ao observado após o tratamento com o rimonabanto. Estes resultados estão de acordo, pelo menos em parte com os dados obtidos por Zamprônio et al. (2010). Não sabemos a razão pela qual o tratamento com rimonabanto reduziu os níveis de AVP 6 h após a indução da CLP e isso será abordado em próximos estudos. No entanto, o aumento no

níveis de AVP 12 h após CLP está de acordo com a nossa hipótese sugerida anteriormente. Acreditamos que, em algum momento durante a fase tardia da sepse, a ativação de receptores ET_A e CB_1 no sistema nervoso central reduz a liberação de AVP, o que pode contribuir para a mortalidade dos animais.

É interessante observar que a liberação central de AVP, particularmente na área septal ventral, é capaz de reduzir a resposta febril induzida por $IL-1\beta$ (WILKINSON et al 1994) este inclusive é um mecanismo antipirético de algumas drogas anti-inflamatórias não esteroidais mas não de todas (SOARES et al., 2011).

Portanto, acreditamos que seja possível também que o rimonabanto exerça um efeito antipirético por aumentar a liberação de AVP no sistema nervoso central, possivelmente através do bloqueio de receptores CB_1 centrais. Este ponto necessita de mais estudos.

6 CONCLUSÕES

Os nossos resultados sugerem que durante a sepse severa ocorre um aumento de ET-1 por volta de 4 h após a indução da sepse. Ainda, que o bloqueio de receptores ET_A e CB₁ no sistema nervoso central aumentam os níveis de AVP na fase tardia da sepse induzida por CLP. Sugerimos que este efeito está relacionado com o aumento da taxa de sobrevivência dos animais após a administração destes antagonistas. Embora mais estudos sejam necessários, a sequência de eventos proposta neste trabalho está representada na figura 14. Acreditamos que o entendimento das consequências da ativação e bloqueio desses receptores em diferentes fases da sepse pode representar uma abordagem importante para a terapêutica associada a esta patologia.

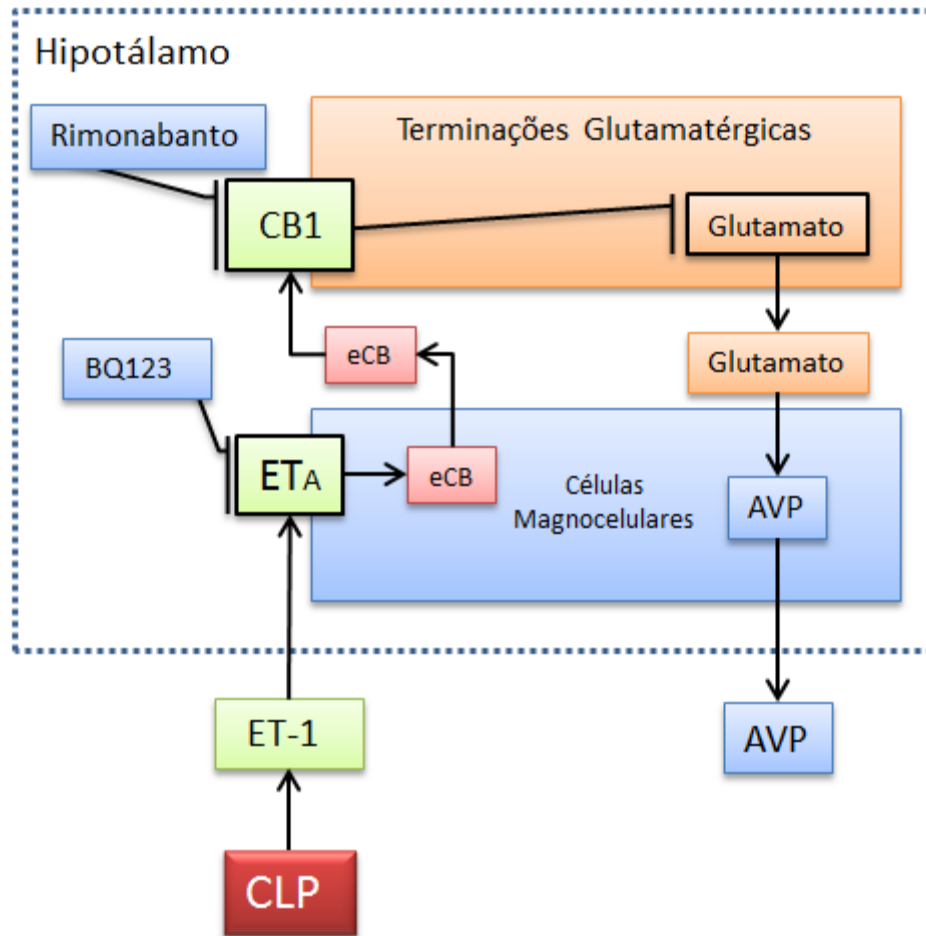


Figura 14: Representação esquemática da sequência de eventos proposta a partir dos resultados obtidos neste estudo:

Após a ligação e perfuração do ceco (CLP) ocorre a liberação sistêmica de endotelina-1 (ET-1) que alcança as células magnocelulares no hipotálamo. A ET-1, atuando em receptores ET_A promove a liberação de endocanabinóides endógenos (eCB). Estes eCB atuam retrogradamente nas terminações pré-sinápticas em receptores CB₁ que inibem a liberação de glutamato, diminuindo a liberação de arginina-vasopressina (AVP). O bloqueio dos receptores ET_A por BQ123 e de receptores CB₁ por rimonabanto aumenta os níveis circulantes de AVP. Na figura, estimulação é representada por (→) enquanto inibição é representada por (⊥).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOUD F. M., FLORAS J.S., AYLWARD P.E., GUO G.B., GUPTA B. N., SCHMID P.G. Role of vasopressin in cardiovascular and blood pressure regulation. **Blood Vessels**, v. 27, p. 106–15, 1990.

ABRAHAM E., MATTHAY M., A., DINARELLO C. A., VINCENT J., COHEN J., OPAL S., M., GLAUSER M., PARSONS P., FISHER C., REPINE J. E. Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: time for a reevaluation. **Critical Care Medicine**, v. 28, n. 1, p. 232–235, 2000.

ALBERTI, C., BRUN-BUISSON C., BURCHARDI J., MARTIN C., GOODMAN S., ARTIGAS A., SICIGNANO A., PALAZZO M., MORENO R., BOULMÉ R., LEPAGE E. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. **Intensive Care Medicine**, v. 28, n. 2, p. 108–21, 2002.

ALEXANDER, S. P. H., MATHIE, A., PETERS, J. A. **Guide to Receptors and Channels (GRAC)**, 3rd edition, v. 153 Suppl p. S1–S209, 2008.

ALVES-FILHO, J. C., SÔNEGO F., SOUTO F.O., FREITAS A., VERRI W., AUXILIADORA-MARTINS M., BASILE-FILHO A., MCKENZIE A. N., XU D., CUNHA F.Q., LIEW F.Y.. Interleukin-33 attenuates sepsis by enhancing neutrophil influx to the site of infection. **Nature Medicine**, v. 16, n. 6, p. 708–12, 2010.

AMES FRANCES. A clinical and metabolic study of acute intoxication with Cannabis sativa and its role in the model psychoses. **The Journal of Mental Science**, v. 104, p. 972–999, 1958.

ANGUS DEREK. The Search for Effective Therapy for Sepsis. **Jama**, v. 306, p. 2614–5, **Jama**, 2012.

ARNAULD, E., CZERNICHOW P., FUMOX F., VINCENT J.D. The effects of hypotension and hypovolaemia on the liberation of vasopressin during haemorrhage in the unanaesthetized monkey (*Macaca mulatta*). **Pflugers Archiv: European journal of physiology**, v. 371, n. 3, p. 193–200, 1977.

AUDET, M. BOUVIER, M. **Restructuring G-Protein- Coupled Receptor Activation Cell**, v. 28 p. 13-22, 2012.

BAKER, C. C., CHAUDRY I.H., GAINES H.O., BAUE A.E. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, n. 2, p. 331–335, 1983.

BANKIR L., TRINH M. M., Renal urea transportes. Direct and indirect regulation by vasopressin. **Experimental Physiology**, v. 85, p. 243-52, 2000.

BARBERIS, C.; MOUILLAC, B.; DURROUX, T. Structural bases of vasopressin/oxytocin receptor function. **The Journal of Endocrinology**, v. 156, n. 2, p. 223–9, 1998.

BARTON, M.; YANAGISAWA, M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 86, n. 8, p. 485–98, 2008.

BASTOS-PEREIRA, A. L., FRAGA D., OTT D., SIMM B., MURGOTT J., ROTH J., ZAMPRONIO A. Involvement of brain cytokines in zymosan-induced febrile response. **Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md.: 1985)**, v. 116, n. 9, p. 1220–9, 2014.

BÁTKAI, S., JARAI Z., WAGNER J.A., GOPARAJU S.K., VARGA K., LIU J., WANG L., MIRSHANI F., KHANOLKAR A.D., MAKRIYANNIS A., URBASCHEK R., GARCIA N., SANYAL J. Endocannabinoids acting at vascular CB1 receptors mediate the vasodilated state in advanced liver cirrhosis. **Nature Medicine**, v. 7, p. 827–32, 2001.

BATTISTINI, B., FORGET, M. A., LAIGHT, D. Potential roles for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 5, n. 3, p. 167–183, 1996.

BIRNBAUMER, M. Vasopressin receptors. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 11, n. 10, p. 406–10, dez. 2000.

BISOGNO, T., HOWELL F., WILLIAMS G., MINASSI A., CASCIO M. G., LIGRESTI A., MORIELLO A. S., PAUL P., WILLIAMS E., GANGADHARAM U., HOBBS C., DI MARZO V.FOHERTY P. Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. **The Journal of Cell Biology**, v. 163, n. 3, p. 463–8, 10 2003.

BOARDER, M. R., HOURANI, S. M. The regulation of vascular function by P2 receptors: multiple sites and multiple receptors. **Trends in Pharmacological sciences**, v. 19, n. 3, p. 99–107, 1998.

BONE, R. C., FISHER C.J., CLEMMER T. P., SLOTMAN G.J., METZ C.A., BALK R.A. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. **Critical Care Medicine**, v. 17, n. 5, p. 389–393, 1989.

BONE, R. C. SIBBALD, W. J. SPRUNG, C. L. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1481–3, 1992.

BRILEY, E. M., LOLAIT S.J., AXELROD J., FELDER C.C. The cloned vasopressin V1a receptor stimulates phospholipase A2, phospholipase C, and phospholipase D through activation of receptor-operated calcium channels. **Neuropeptides**, v. 27, n. 1, p. 63–74, 1994.

BURAS, J. A., HOLZMANN, B., SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 854–65, 2005.

CADAS, H., DI TOMASO, E., PIOMELLI, D. Occurrence and biosynthesis of endogenous cannabinoid precursor, N-arachidonoyl phosphatidylethanolamine, in rat brain. **The Journal of Neuroscience**, v. 17, n. 4, p. 1226–42, 15, 1997.

CAVAILLON, J. M., MUNOZ C., FITTING C., MISSET B., CARLET J. Circulating cytokines: the tip of the iceberg? **Circulatory Shock**, v. 38, n. 2, p. 145–152, 1992.

CHOU, M. C., WILSON, M.A., SPAIN D.A., HADJIMINAS D.A., ANDERSON G.L., CHEADLE W.G., GARRISON R.N. Endothelin-1 expression in the small intestine during chronic peritonitis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 4, n. 6, p. 411–414, 1995.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–91, 2002.

CORREA, F., LEYRE M., DOCAGNE F., CARMEN G. Activation of cannabinoid CB₂ receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling. **British Journal of Pharmacology**, v. 145, n. 4, p. 441–8, 2005.

CSÓKA, B., NEMETH Z., MUKHOPADHYAY P., SPOLARICS Z., RAJESH M., FEDERICI S., DEITCH E., BÁTKAI S., PACHER P. CB₂ cannabinoid receptors contribute to bacterial invasion and mortality in polymicrobial sepsis. **PloS One**, v. 4, n. 7, p. e6409, 2009.

DAMAS, P., DIDIER L., MONIQUE N., VRINDTS Y., GROOTE D. Cytokine Serum Level During Severe Sepsis in Human IL-6 as a Marker of Severity. **Ann. Surg.**, v. 215, p. 356–362, 1991.

DE LAURENTIIS, A., SOLARI F. J., MOHN C., ZUBILETE Z.M., RETTORI V. Endocannabinoid system participates in neuroendocrine control of homeostasis. **Neuroimmunomodulation**, v. 17, n. 3, p. 153–6, 2010.

DE PETROCELLIS, L., CASCIO, M. G., DI MARZO, V. The endocannabinoid system: a general view and latest additions. **British Journal of Pharmacology**, v. 141, n. 5, p. 765–774, 2004.

DEJAGER, L., PINHEIRO I., DEJONCKHEERE E., LIBERT C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in Microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, 2011.

DELLINGER, R. P., LEVY M. RHODES A., ANNANE D., GERLACH H., OPAL S. M., SEVRANSKY J. E., SPRUNG C. L., DOUGLAS I. S., JAESCHKE R., OSBORN T. M., NUNNALLY M. E., TOWNSEND S. R., REINHART K., KLEMPPELL R. M., ANGUS D. C., DEUTSCHMAN C. S., MACHADO F. R., RUBENFELD G. D., WEBB S., BEALE R. J., VINCENT J., MORENO R., Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. **Intensive Care Medicine**, v. 39, n. 2, p. 165–228, 2013.

DENK, S., PERL, M., HUBER-LANG, M. Damage- and pathogen-associated molecular patterns and alarmins: keys to sepsis?. **European Surgical Research.**, v. 48, n. 4, p. 171–9, 2012.

DESPOND, O., PROULX F., CARCILLO J.A., LACROIX J. Pediatric sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 13, n. 3, p. 247–253, 2001.

DEVANE, W. A., HANUS L., BREUER A., PERTWEE R. G., STEVENSON L.A., GRIFFIN G., GIBSON D., MANDELBAUM A., ETINGER A. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**. v. 1558, n. 10, p. 19–22, 1992.

DI MARZO, V., FONTANA A., CADAS H., SCHINELLI S., CIMINO G., SCHWARTZ J. C., PIOMELLI D. Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 686–691, 1994.

DI MARZO, V., DE PETROCELLIS L., SEPE N., BUONO A. Biosynthesis of anandamide and related acylethanolamides in mouse J774 macrophages and N18 neuroblastoma cells. **The Biochemical Journal**, v. 316 (Pt 3, p. 977–984, 1996.

DI MARZO, V., MELCK D., BISOGNO T., DE PETROCELLIS L. Endocannabinoids: Endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action, **Trends in Neurosciences**, p. 521-528, 1998.

DU VIGNEAUD V. Hormones of the posterior pituitary gland: oxytocin and vasopressin. **Harvey Lect.**, v. 50, p. 1–26, 1954.

WAGNER J. A., VARGA K., ELLIS, E. F., RZIGALINSKI B.A., MARTIN B. R., KUNOS G. Activation of peripheral CB 1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. **Nature**. v. 390, p. 518–521, 1997.

ERRINGTON, M. L., HILL, M., LONDON, N. W. The hypothalamic neurosecretory pathways for the release of oxytocin and vasopressin in the cat. **J. Physiol.** v. 217, p. 111–131, 1971.

EVORA, P. R. B., PEARSON P.J., RODRIGUES A. J., VIARO F., SCHAFF H. V. Effect of arginine vasopressin on the canine epicardial coronary artery: experiments on V1-receptor-mediated production of nitric oxide. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 80, n. 5, p. 483–94, 2003.

FABRICIO, A S., SILVA C.A., RAE G.A., D'ORLÉANS-JUSTE P., SOUZA G. E., Essential role for endothelin ET(B) receptors in fever induced by LPS (E. coli) in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 125, n. 3, p. 542–8, 1998.

FELDER, C. C., GLASS, M. Cannabinoid receptors and their endogenous agonists. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 179–200, 1998.

FIGUEIREDO, M. J., SOARES D. M., MARTINS J. M., MACHADO R. R., SORGI C. A., FACCIOLI L. A., MELO L. H., MELO M. C. C., MALVAR D. C., SOUZA G. E. P. Febrile response induced by cecal ligation and puncture (CLP) in rats: involvement of prostaglandin E₂ and cytokines. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 201, n. 2, p. 219–29, 2012.

FORTES, Z. B., SCIVOLETTO, R., GARCIA-LEME, J. Endothelin-1 induces potent constriction of lymphatic vessels in situ. **European Journal of Pharmacology**, v. 170, n. 1-2, p. 69–73, 24 1989.

FREUND, T. F., KATONA, I., PIOMELLI, D. Role of endogenous cannabinoids in synaptic signaling. **Physiological Reviews**, v. 83, n. 3, p. 1017–66, 2003.

FROMMER, K. W., MÜLLER-LADNER, U. Expression and function of ETA and ETB receptors in SSc. **Rheumatology (Oxford, England)**, v. 47 Suppl 5, p. v27–8, 2008.
GAIESKI, D. F., EDWARDS J.M., KALLAN M.J., CARR B. G. Benchmarking the incidence and mortality of severe sepsis in the United States. **Critical Care Medicine**, v. 41, n. 5, p. 1167–74, 2013.

GERDEMAN, G., LOVINGER, D. M. CB₁ cannabinoid receptor inhibits synaptic release of glutamate in rat dorsolateral striatum. **Journal of Neurophysiology**, v. 85, n. 1, p. 468–471, 2001.

GERMAIN, R. N. Maintaining system homeostasis - the third law of Newtonian immunology. **Nat Immunol.** v. 13, n. 10, p. 902–906, 2012.

GODLEWSKI, G., MALINOWSKA, B., SCHLICKER, E. Presynaptic cannabinoid CB₁ receptors are involved in the inhibition of the neurogenic vasopressor response during

septic shock in pithed rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 4, p. 701–8, 2004.

GOLD, J. A., CULLINANE S., CHEN J., OZ M. C., OLIVER J. A., LANDRY D. W. Vasopressin as an alternative to norepinephrine in the treatment of milrinone-induced hypotension. **Critical Care Medicine**, v. 28, p. 249-252. 2000.

GOPARAJU, S. K., UEDA N., TANIGUCHI K., YAMAMOTO S. Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 57, n. 4, p. 417–23, 1999.

GOURINE, A. V., RUDOLPH K., TESFAIGZI J., KLUGER M. J., ALEXANDER V. Role of hypothalamic interleukin-1 β in fever induced by cecal ligation and puncture in rats. **The American Physiological Society**, v. 363, p. 754-61, 1998.

HALL, M. J., WILLIAMS S. N., DEFRANCES C. J., GOLOSINSKIY A. Inpatient care for septicemia or sepsis: a challenge for patients and hospitals. **NCHS data brief**, n. 62, p. 1–8, 2011.

HANSEN, J. D., WOODSON J.C., HERSHBERGER P. K., GRADY C., GREGG J. L., PURCELL M. K. Induction of anti-viral genes during acute infection with Viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) genogroup IVa in Pacific herring (*Clupea pallasii*). **Fish and Shellfish Immunology**, v. 32, n. 2, p. 259–267, 2012.

HASHIMOTODANI, Y., OHNO-SHOSAKU, T., KANO, M. Endocannabinoids and synaptic function in the CNS. **The Neuroscientist**. v. 13, n. 2, p. 127–37, 2007.

HEMSÉN, A. Biochemical and functional characterization of endothelin peptides with special reference to vascular effects. **Acta Physiologica Scandinavica. Supplementum**, v. 602, p. 1–61, 1991.

HERKENHAM, M., LYNN A. B., JOHNSON M. R., MELVIN L. S., COSTA B. R. D. E., RICE K. C. Cannabinoid receptor localization in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 5, p. 1932–1936, 1990.

HICKEY, K. A., RUBANYI G., PAUL R. J., HIGHSMITH R. F., Characterization of a coronary vasoconstrictor produced by cultured endothelial cells. **The American Journal of Physiology**, v. 248, p. C550–C556, 1985.

HOFFMAN, A F., LUPICA, C. R. Mechanisms of cannabinoid inhibition of GABA(A) synaptic transmission in the hippocampus. **The Journal of neuroscience**. v. 20, n. 7, p. 2470–9, 2000.

HOLMES, C. L., LANDRY D. W., GRANTON J. T. The effects of vasopressin on hemodynamics and renal function in severe septic shock: a case series. **Intensive Care Medicine**, v. 27, n. 8, p. 1416–1421, 14 jul. 2001.

HOLMES, C. L.; LANDRY, D. W.; GRANTON, J. T. Science review: Vasopressin and the cardiovascular system part 1--receptor physiology. **Critical Care (London, England)**, v. 7, n. 6, p. 427–34, 2003.

HOLMES, C. L.; LANDRY, D. W.; GRANTON, J. T. Science Review: Vasopressin and the cardiovascular system part 2 - clinical physiology. **Critical Care (London, England)**, v. 8, n. 1, p. 15–23, fev. 2004.

HOTCHKISS R. S., KARL E. I. The pathophysiology and treatment of sepsis. **The New England Journal of Medicine**, vol. 348, p. 138-150, 2003.

HOTCHKISS, R. S., NICHOLSON, D. W. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 11, p. 813–22, 2006.

HOTCHKISS, R. S., OPAL, S. Clinical implications of basic research Immunotherapy for Sepsis — A New Approach against an Ancient Foe. **The New England Journal of Medicine**. p. 87–89, 2010.

HRABOVSZKY, E., LIPOSITS, Z. Novel aspects of glutamatergic signalling in the neuroendocrine system. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 20, n. 6, p. 743–51, 2008.

HUANG, C. C., LO, S. W., HSU, K. S. Presynaptic mechanisms underlying cannabinoid inhibition of excitatory synaptic transmission in rat striatal neurons. **The Journal of Physiology**, v. 532, n. Pt 3, p. 731–48, 2001.

HUBBARD, W. J., CHOUDHRY M., SCHWACHA M. G., KERBY J. D., RUE L. W., BLAND K. I., CHAUDRY I. H., Cecal Ligation and Puncture. **Shock**, v. 24, n. Supplement 1, p. 52–57, 2005.

INCE, C. The microcirculation is the motor of sepsis. **Critical Care (London, England)**, v. 9 Suppl 4, p. S13–9, 2005.

INOUE, A., YANAGISAWA M., KIMURA S., KASUYA Y., MIYAUCHI T., GOTO K., MASAKI T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 8, p. 2863–7, 1989.

ISHII, K. J., KOYAMA S., NAKAGAWA A., COBAN C., AKIRA S. Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. **Cell host & Microbe**, v. 3, n. 6, p. 352–63, 2008.

ISKIT, A. B., SENEL I., SOKMENSUER C., GUC M. O. Endothelin receptor antagonist bosentan improves survival in a murine caecal ligation and puncture model of septic shock. **European Journal of Pharmacology**, v. 506, n. 1, p. 83–8, 2004.

ISKIT, A. B., GUC, M. O. A new therapeutic approach for the treatment of sepsis. **Medical Hypotheses**, v. 62, n. 3, p. 342–5, 2004.

ISKIT, A. B., GUC, O. Effects of endothelin and nitric oxide on organ injury, mesenteric ischemia, and survival in experimental models of septic shock. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 10, p. 953–7, 2003.

IVERSEN, L. Cannabis and the brain. **Brain**, v. 126, n. 6, p. 1252–1270, 2003.

JOURDAIN, P., ISRAEL J. M., DUPOUY B., OLIET S. H., ALLARD M., VITIELLO S., THEODOSIS D. T., POULAIN D. A. Evidence for a hypothalamic oxytocin-sensitive

pattern-generating network governing oxytocin neurons in vitro. **The Journal of neuroscience**, v. 18, n. 17, p. 6641–9, 1998.

KADDOURA, S., CURZEN N. P., EVANS T. W., FIRTH J. D., POOLE-WILSON P. A. Tissue expression of endothelin-1 mRNA in endotoxaemia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 218, n. 3, p. 641–7, 1996.

KAMPMEIER, T. G., REHBERG S., WESTPHAL M., LANGE M. Vasopressin in sepsis and septic shock. **Minerva Anesthesiologica**, v. 76, n. 10, p. 844–50, 2010.

KASZAKI, J., WOLFÁRD A., BOROS M., BARANYI L., OKADA H., NAGY S. Effects of antiendothelin treatment on the early hemodynamic changes in hyperdynamic endotoxemia. **Acta Chirurgica Hungarica**, v. 36, n. 1-4, p. 152–153, 1997.

KIRKEBØEN, K. A., STRAND, O. A. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 43, n. 3, p. 275–288, 1999.

KLEIN, T. W. Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. **Nature Reviews. Immunology**, v. 5, n. 5, p. 400–11, 2005.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. **Physiological Reviews**, v. 71, n. 1, p. 93–127, 1991.

KONDO, T., KAWAI, T., AKIRA, S. **Dissecting negative regulation of Toll-like receptor signaling**. **Trends in Immunology**, v. 33, p. 449-58, 2012.

KOTSOVOLIS, G., KALLARAS, K. The role of endothelium and endogenous vasoactive substances in sepsis. **Hippokratia**, v. 14, n. 2, p. 88–93, 2010.

KRAGSBJERG, P., HOLMBERG, H., VIKERFORS, T. Serum concentrations of interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha, and C-reactive protein in patients undergoing major operations. **The European Journal of Surgery = Acta Chirurgica**, v. 161, n. 1, p. 17–22, 1995.

LAGNEUX, C., LAMONTAGNE, D. Involvement of cannabinoids in the cardioprotection induced by lipopolysaccharide. **British Journal of Pharmacology**, v. 132, n. 4, p. 793–796, 2001.

LAGU, T., ROTHBERG M. B., SHIEH M. S., PEKOW P. S., STEINGRUB J. S., LINDENAUER P. K. What is the best method for estimating the burden of severe sepsis in the United States? **Journal of Critical Care**, v. 27, n. 4, 2012.

LANDRY, D. W., OLIVER, J. A. The pathogenesis of vasodilatory shock. **The New England Journal of Medicine**, v. 345, n. 8, p. 588–595, 2001.

LEONE, M., DELMAS A., CHAABANE W., GARNIER F., MARTIN C. Terlipressin in catecholamine-resistant septic shock patients. **Blood**, v. 22, n. 4, p. 314–319, 2004.

LEVIN, E. R. Mechanisms of Disease: Endothelins. **New England Journal of Medicine**, v. 333, n. 6, p. 356–363, 1995.

LIU, E., VOGEL H. J. Naturally occurring hypothermia is more advantageous than fever in severe forms of lipopolysaccharide- and Escherichia coli-induced systemic inflammation. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 302, n. 12, p. R1372–83, 2012.

- LIVINGSTON, D. H., ANJARIA D., WU J., HAUSER C. J., CHANG V., DEITCH E. A., RAMESHWAR P. Bone marrow failure following severe injury in humans. **Ann Surg**, v. 238, n. 5, p. 748–753, 2003.
- LOMBARD, C., NAGARKATTI, M., NAGARKATTI, P. CB₂ cannabinoid receptor agonist, JWH-015, triggers apoptosis in immune cells: Potential role for CB₂-selective ligands as immunosuppressive agents. **Clinical Immunology**, v. 122, n. 3, p. 259–270, 2007.
- LUCE, W. A., HOFFMAN, T. M., BAUER, J. A. Bench-to-bedside review: Developmental influences on the mechanisms, treatment and outcomes of cardiovascular dysfunction in neonatal versus adult sepsis. **Critical Care (London, England)**, v. 11, n. 5, p. 228, 2007.
- LUTZ, B. Molecular biology of cannabinoid receptors. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 66, n. 2-3, p. 123–42, 2002.
- MACKIE, K., HILLE, B. Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 9, p. 3825–3829, 1992.
- MAGGI, C. A., GIULIANI S., PATACCHINI R., ROVERO P., GIACHETTI A., MELI A.. The activity of peptides of the endothelin family in various mammalian smooth muscle preparations. **European Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 1, p. 23–31, 1989.
- MATOT, I., SPRUNG, C. L. Definition of sepsis. **Intensive Care Medicine**, v. 27 Suppl 1, p. S3–9, 2001.
- MATSUDA, L. A., LOLAIT S. J., BROWNSTEIN M. J., YOUNG A. C., BONNER T. I. Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. **Nature**, v. 346, n. 6284, p. 561–564, 1990.
- MATVEYEVA, M., HARTMANN C. B., HARRISON M. T., CABRAL G. A., MCCOY K. L. Delta(9)-tetrahydrocannabinol selectively increases aspartyl cathepsin D proteolytic activity and impairs lysozyme processing by macrophages. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 22, n. 5, p. 373–81, 2000.
- MAZZUCA, M. Q., KHALIL, R. A. Vascular endothelin receptor type B: Structure, function and dysregulation in vascular disease. **Biochemical Pharmacology**, v. 82, p. 147-162, 2012.
- MCCOY, K. L., MATVEYEVA M., CARLISLE S. J., CABRAL G. A. Cannabinoid inhibition of the processing of intact lysozyme by macrophages: evidence for CB₂ receptor participation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, n. 3, p. 1620–5, 1999.
- MCKALLIP, R. J., LOMBARD C., MARTIN B. R., NAGARKATTI M., NAGARKATTI P. S., M. Δ⁹-Tetrahydrocannabinol-Induced Apoptosis in the Thymus and Spleen as a Mechanism of Immunosuppression in Vitro and in Vivo. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 2, p. 451–465, 2002.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT S., HANUS L., LIGUMSKY M., KAMINSKI N. E., SCHATZ A. R., GOPHER A., ALMONG S., MARTIN B. R., COMPTON D. R..

Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. **Biochemical Pharmacology**, v. 50, n. 1, p. 83–90, 1995.

MECHOULAM, R., GAONI, Y. Hashish. IV. The isolation and structure of cannabinolic cannabidiolic and cannabigerolic acids. **Tetrahedron**, v. 21, n. 5, p. 1223–1229, 1965.
MEMBERS OF THE AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS/SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE CONSENSUS COMMITTEE. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. **Critical Care Medicine**, v. 20, n. 6, p. 864–74, 1992.

MEYNAAR, I. A., DROOG W., BATSTRA M., VREEDE R., HERBRINK P. In Critically Ill Patients, Serum Procalcitonin Is More Useful in Differentiating between Sepsis and SIRS than CRP, Il-6, or LBP. **Critical Care Research and Practice**, v. 2011, p. 594–645, 2011.

MOOS, F. C., ROSSI, K., RICHARD, P. Activation of N-methyl-D-aspartate receptors regulates basal electrical activity of oxytocin and vasopressin neurons in lactating rats. **Neuroscience**, v. 77, n. 4, p. 993–1002, 1997.

MORALES, D., MADIGAN J., CULLINANE S., CHEN J., HEATH M., OZ M., OLIVER J. A. Reversal by Vasopressin of Intractable Hypotension in the Late Phase of Hemorrhagic Shock. **Circulation**, v. 100, n. 3, p. 226–229, 1999.

MUNRO, S., THOMAS, K. L., ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61–65, 1993.

NAHM, C. H., CHOI, J. W., LEE, J. Delta neutrophil index in automated immature granulocyte counts for assessing disease severity of patients with sepsis. **Annals of Clinical Laboratory Science**, v. 38, n. 3, p. 241–246, 2008.

NATHAN, C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. **Nature Reviews. Immunology**, v. 6, n. 3, p. 173–82, 2006.

NISSEN, R., HU, B., RENAUD, L. P. Regulation of spontaneous phasic firing of rat supraoptic vasopressin neurones in vivo by glutamate receptors. **The Journal of Physiology**, v. 484, p. 415–24, 1995.

O'NEILL, L. A. J. A critical role for citrate metabolism in LPS signalling. **The Biochemical Journal**, v. 438, n. 3, p. e5–6, 2011.

OKAMOTO, Y., MORISHITA J., WANG J., SCHMID P. C., KREBSBACH R. J., SCHMID H. H. O., UEDA N. Mammalian cells stably overexpressing N-acylphosphatidylethanolamine- hydrolysing phospholipase D exhibit significantly decreased levels of N -acylphosphatidylethanolamines. **Biochem J.** v. 247, p. 241–247, 2005.

OLDNER, A., WANECEK M., WEITZBERG E., SUNDIN P., SOLLEVI A., RUBIO C., ALVING K., RUDEHILL A., HELLSTRO P. M. Differentiated effects on splanchnic homeostasis by selective and non-selective endothelin receptor antagonism in porcine endotoxaemia. **British Journal of Pharmacology**, v. 127, p. 1793–1804, 1999.

PARK, H. J., PYO J. Y., PARK Y. B., LEE S. K., LEE S. W. Delta neutrophil index as an early marker of disease severity in critically ill patients with sepsis. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 299, 2011.

PAXINOS G., WATSOM C., *The Rat Brain in Extereotaxic Coordinates*. Acad. Press, Amsterdam, 2009.

PERNOW, J., HEMSÉN A., HALLÉN A., LUNDBERG J. M. Release of endothelin-like immunoreactivity in relation to neuropeptide Y and catecholamines during endotoxin shock and asphyxia in the pig. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 140, n. 3, p. 311–322, 1990.

PERTWEE, R. G. Pharmacology of cannabinoid receptor ligands. **Current Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 8, p. 635–664, 1999.

PETER J., BURBACH H., ADAN R. A., LOLAIT S. J., VAN LEEUWEN F. W., MEZEY E., BARBERIS C. Molecular neurobiology and pharmacology of the vasopressin/oxytocin receptor family. **Cell Mol Neurobiol**, v. 15, p. 573–95, 1995.

PIOMELLI, D. The molecular logic of endocannabinoid signalling. **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 4, n. 11, p. 873–84, 2003.

PIOMELLI, D., GREENGARD, P. Lipoxygenase metabolites of arachidonic acid in neuronal transmembrane signalling. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 11, n. 9, p. 367–73, 1990.

PITTET, J. F., MOREL D. R., HEMSEN A., GUNNING K., LACROIX J. S., SUTER P. M., LUNDBERG J. M. Elevated plasma endothelin-1 concentrations are associated with the severity of illness in patients with sepsis. **Annals of Surgery**, v. 213, n. 3, p. 261–264, 1991.

RHOTEN R.L., COMAIR Y. G., SHEDID D., CHYATTE D., SIMONSON M. S. Specific repression of the preproendothelin-1 gene in intracranial arteriovenous malformations. **Journal of Neurosurgery**, v. 86, p. 101–108, 1997.

RIEDEMANN N. C., REN-FENG G., WARD P. Novel strategies for the treatment of sepsis. **Nature**, v. 9, p. 517–24, 2003.

RINALDI-CARMONA, M., BARTH F., HÉAULME M., ALONSO R., SHIRE D., CONGY C., SOUBRIÉ P., BRELIÉRE J. C., LE FUR G. Biochemical and pharmacological characterisation of SR141716A, the first potent and selective brain cannabinoid receptor antagonist. **Life Sciences**.v. 53, p. 23–24, 1995.

RITTIRSCH, D., HURGER-LANG M. S., FLIERL M. A., WARD P. A. Immudesign of experimental sepsis by cecal ligation and cecal puncture. **Nat Protocol**. v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009.

RIVERS, E. P., KATRANJI M., JAEHNE K. A., BROWN S., ABOU D. A. G., CANNON C., COBA V. Early interventions in severe sepsis and septic shock: a review of the evidence one decade later. **Minerva Anestesiologica**, v. 78, n. 6, p. 712–24, 2012.

ROCHA, R., STIER C. T., KIFOR I., OCHOA-MAYA M. R., RENNKE H. G., WILLIAMNS G. H., ADLER G. K. Aldosterone: a mediator of myocardial necrosis and renal arteriopathy. **Endocrinology**, v. 141, n. 10, p. 3871–3878, 2000.

RODRÍGUEZ-PASCUAL, F., BUSNADIEGO O., LAGARES D., LAMAS S. Role of endothelin in the cardiovascular system. **Pharmacological Research: The Official Journal of The Italian Pharmacological Society**, v. 63, n. 6, p. 463–72, 2011.

RUBANYI G.M., POLOKOFF M. A. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Pharmacological Reviews**, v. 46(3), p. 325–415, 1994.

RUETTEN, H., THIEMERMANN, C. Effect of selective blockade of endothelin ETB receptors on the liver dysfunction and injury caused by endotoxaemia in the rat. **British Journal of Pharmacology**, v. 119, n. 3, p. 479–86, 1996.

SAI, Y., OKAMURA T., AMAKATA Y., TODA N. Comparison of responses of canine pulmonary artery and vein to angiotensin II, bradykinin and vasopressin. **European Journal of Pharmacology**, v. 282, n. 1-3, p. 235–241, 1995.

SCHONER WILHELM. Salt abuse: the path to hypertension. **Nature**, v. 14(1), p. 64–68, 2008.

SCHRIER, R. W., BERL, T., ANDERSON, R. J. Osmotic and nonosmotic control of vasopressin release. **The American Journal of Physiology**, v. 236, n. 4, p. F321–F332, 1979.

SCHULLER, D., MITCHELL J. P., CALANDRINO F. S., SCHUSTER D. P. Fluid balance during pulmonary edema. Is fluid gain a marker or a cause of poor outcome? **Chest**, v. 100, p. 1068-1075, 1991.

SCHULTE, W., BERNHAGEN, J., BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 165974, 2013a.

SCHULTE, W., BERNHAGEN, J., BUCALA, R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets--an updated view. **Mediators of Inflammation**, v. 2013, p. 165974, 2013b.

SCHWARTZ, J., REID, I. A. Effect of vasopressin blockade on blood pressure regulation during hemorrhage in conscious dogs. **Endocrinology**, v. 109, n. 5, p. 1778–1780, 1981.

SHARMA, A C., MOTEW S. J., FARIAS S., ALDEN K. J., BOSMANN H. B., LAW W. R. FERGUSON J. L. Sepsis alters myocardial and plasma concentrations of endothelin and nitric oxide in rats. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v. 29, n. 5, p. 1469–77, 1997.

SHARSHAR, T., CARLIER R., BLANCHARD A., FEYDY A., GRAY F., PAILLARD M., RAPHAEL J., GAJDOS P., ANNANE D. Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 30, n. 3, p. 497–500, 2002.

SHIBUYA, I., KABASHIMA N., IBRAHIM N., SETIADJI S. V., UETA Y., YAMASHITA H. Pre- and postsynaptic modulation of the electrical activity of rat supraoptic neurones. **Experimental Physiology**, v. 85 Spec No, p. 145S–151S, 2000.

SIMMONS, D. L., BOTTING, R. M., HLA, T. Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. **Pharmacological Reviews**, v. 56, n. 3, p. 387–437, 2004.

SIMMONS, R. S., BERDINE G. G., SEIDENFELD J. J., PRIHODA T. J., HARRIS G. D., SMITH J. D. GILBERT T. J., MOTA E., JOHANSON W. G. Fluid balance and the

adult respiratory distress syndrome. **The American Review of Respiratory Disease**, v. 135, n. 4, p. 924–929, 1987.

SIMOVART, H. E., PÖLDOJA E., KOKK K., TAPPER H., LIIGANT A., TALVIK R., ROOSAAR P. Changes of activated macrophages and apoptotic cell count in the organs of rats during experimental sepsis. **Medicina (Kaunas, Lithuania)**, v. 39, n. 10, p. 932–9, 2003.

SKLAR, A. H., SCHRIER, R. W. Central nervous system mediators of vasopressin release. **Physiol Rev**, v. 63, n. 4, p. 1243–1280, 1983.

SOARES, D. M., CRISTOFOLETTI R., MELO M. C. C., LINDSEY C. J., VEIGA-SOUZA F. H., FABRICIO A. S. C. SOUZA G. E. P. et al. Cyclooxygenase-independent mechanism of ibuprofen-induced antipyresis: The role of central vasopressin V₁ receptors. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 25, n. 6, p. 670–681, 2011.

SOARES, D. M., FIGUEIREDO M. J., MARTINS J. M., MACHADO R. R., SORGI C., FACIOLLI L. H. ALVES-FILHO J. C., CUNHA F. Q., SOUZA G. E. P. A crucial role for IL-6 in the CNS of rats during fever induced by the injection of live E. coli. **Medical microbiology and immunology**, v. 201, n. 1, p. 47–60, 2012.

SOFIA, R. D., NALEPA S. D., HARAKAL J. J. VASSAR H. B., et al. Anti-edema and analgesic properties of delta9-tetrahydrocannabinol (THC). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 186, n. 3, p. 646–655, 1973.

SOMLYO, A. P., SOMLYO, A. V. Topical Review Signal transduction by G-proteins, Rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. **Journal of Physiology**. v. 522 p. 177–185, 2000.

SUGIURA, T., KISHIMOTO S., OKA S., GOKOH M. Biochemistry, pharmacology and physiology of 2-arachidonoylglycerol, an endogenous cannabinoid receptor ligand. **Progress in Lipid Research**, v. 45, n. 5, p. 405–46, 2006.

SURKS, H. K. Regulation of Myosin Phosphatase by a Specific Interaction with cGMP-Dependent Protein Kinase I. **Science**, v. 286, n. 5444, p. 1583–1587, 1999.

SZALAY, L., KASZAKI J., NAGY S., BOROS M. The role of endothelin-1 in circulatory changes during hypodynamic sepsis in the rat. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 10, n. 2, p. 123–128, 1998.

TAKEDA, K., AKIRA, S. TLR signaling pathways. **Seminars in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 3–9, 2004.

TELES, J. M. M., SILVA E., WESTPHAL G., FILHO R. C., MACHADO F. R. Surviving sepsis campaign in Brazil. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 30 Suppl 1, p. 47–52, 2008.

THIBONNIER, M., BERTI-MATTERA L. N., CONARTY D. M., MATTERA R., et al. Signal transduction pathways of the human V₁-vascular, V₂-renal, V₃-pituitary vasopressin and oxytocin receptors. **Progress in Brain Research**, v. 119, p. 147–161, 1998.

THORIN, E., WEBB, D. J. Endothelium-derived endothelin-1. **Pflugers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 459, n. 6, p. 951–958, 2010.

TURNER R.A., PIERCE J.G., DU VIGNEAUD V., THE PURIFICATION AND THE AMINO ACID CONTENT OF VASOPRESSIN. **J. Biol. Chem.**, v. 191, p. 21-28, 1951.

TWITCHELL, W., BROWN S., MACKIE K., WANG X., WHALLEY B. J., STEPHENS G. J. Cannabinoids Inhibit N- and P / Q-Type Calcium Channels in Cultured Rat Hippocampal Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 78, p. 43–50, 2014.

UEDA, H., KOBAYASHI T., KISHIMOTO M., TSUTSUMI T., OKUYAMA H. A possible pathway of phosphoinositide metabolism through EDTA-insensitive phospholipase A1 followed by lysophosphoinositide-specific phospholipase C in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v. 61, n. 5, p. 1874–1881, 1993.

UEDA, T., AOYAMA-ISHIKAWA M., NAKAO A., YAMADA T., USAMI M., KOTANI J. A simple scoring system based on neutrophil count in sepsis patients. **Medical Hypotheses**, v. 82, n. 3, p. 382–6, 2014.

VAN DER POLL, T., OPAL, S. M. Host-pathogen interactions in sepsis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 32–43, 2008.

VEMULAPALLI, S., CHIU P.J., RIVELLI M., FOSTER C. J., SYBERTZ E. J. Modulation of circulating endothelin levels in hypertension and endotoxemia in rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 18, n. 6, p. 895–903, 1991.

VILLANUEVA, A., YILMAZ S. M., MILLINGTON W. R., CUTRERA R. A., STOUFFER D. G., PARSONS L. H., CHEER J. F., FELEDER C. et al. Central cannabinoid 1 receptor antagonist administration prevents endotoxic hypotension affecting norepinephrine release in the preoptic anterior hypothalamic area. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 32, n. 6, p. 614–20, 2009.

VINCENT, J. L. Cardiovascular alterations in septic shock. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 41 Suppl A, p. 9–15, 1998.

VOERMAN, H. J., STEHOUWER C. D., VAN KAMP G. J., STRACK VAN SCHIJNDEL R. J., GROENEVELD A. B., THIJS L. G. Plasma endothelin levels are increased during septic shock. **Critical Care Medicine**, v. 20, n. 8, p. 1097–1101, 1992.

WAGNER, J. A., VARGA K., ELLIS E. F., RZIGALINSKI B. A. MARTIN B. R., KUNOS G. Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 38, n. 7, p. 2048–54, 2001.

WAGNER, J. A.; VARGA, K.; KUNOS, G. Cardiovascular actions of cannabinoids and their generation during shock. **Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)**, v. 76, n. 12, p. 824–36, 1998.

WANECEK, M. et al. Effects on haemodynamics by selective endothelin ET(B) receptor and combined endothelin ET(A)/ET(B) receptor antagonism during endotoxin shock. **European Journal of Pharmacology**, v. 386, n. 2-3, p. 235–45, 15 dez. 1999.

WANECEK, M., OLDNER A., SUNDIN P., ALVING K., WEITZBERG E., RUDEHILL A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. **European Journal of Pharmacology**, v. 407, n. 1-2, p. 1–15, 2000.

WANG, B. C., FLORA-GINTER G., LEADLEY R. J., GOETZ K. L. Ventricular receptors stimulate vasopressin release during hemorrhage. **The American Journal of Physiology**, v. 254, n. 2 Pt 2, p. R204–R211, 1988.

WANG, Y., LIU Y., ITO Y., HASHIGUCHI T., KITAJIMA I., YAMAKUCHI M., SHIMIZU H., MATSUO S., IMAIZUMI H., MARUYAMA I. Simultaneous measurement of anandamide and 2-arachidonoylglycerol by polymyxin B-selective adsorption and subsequent high-performance liquid chromatography analysis: increase in endogenous cannabinoids in the sera of patients with endotoxic shock. **Analytical Biochemistry**, v. 294, n. 1, p. 73–82, 2001.

WERNER, M. F., FRAGA D., MELO M. C., SOUZA G. E., ZAMPRONIO A. R. Importance of the vagus nerve for fever and neutrophil migration induced by intraperitoneal LPS injection. **Inflammation Research** v. 52, n. 7, p. 291–296, 2003.

WICHTERMAN, K. A. Sepsis and Septic Shock -A Review of Laboratory and a Proposal Models. **The Journal of Surgical Research**. v. 201, p. 189–201, 1980.

WILKINSON M. F., HORN T. F., KASTING N. W., PITTMAN Q. J., Central interleukin-1 beta stimulation of vasopressin release into the rat brain: activation of an antipyretic pathway. **J Physiol**, v. 15 p. 641-6, 1994.

WILSON, R. I. Endocannabinoid Signaling in the Brain. **Science**, v. 296, n. 5568, p. 678–682, 2002.

WIRTH, A., BENYÓ Z., LUKASOVA M., LEUTGEB B., WETTSCHURECK N., GORBAY S., ORSY P., HORVÁTH B., MASER-GLUTH C., GREINER E., LEMMER B., SCHUTZ G., GUTKIND J. S. G12-G13-LARG-mediated signaling in vascular smooth muscle is required for salt-induced hypertension. **Nature Medicine**, v. 14, n. 1, p. 64–8, 2008.

YANAGISAWA, M., KURIHARA H., KIMURA S., TOMOBE Y., KOBAYASHI M., MITSUI Y., YAZAKI Y., GOTO K., MASAKI T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. **Nature**, v. 332, n. 6163, p. 411–415, 1988.

YILMAZ, M. S., MILLINGTON, W. R., FELEDER, C. The preoptic anterior hypothalamic area mediates initiation of the hypotensive response induced by LPS in male rats. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 29, n. 2, p. 232–237, 2008.

ZAMPRONIO, A. R., KUZMISKI J. B., FLORENCE C. M., MULLIGAN S. J., PITTMAN Q. J. Opposing actions of endothelin-1 on glutamatergic transmission onto vasopressin and oxytocin neurons in the supraoptic nucleus. **The Journal of Neuroscience**, v. 30, n. 50, p. 16855–63, 2010.

ZENTENO-SAVIN, T., SADA-OVALLE I., CEBALLOS G., RUBIO R. Effects of arginine vasopressin in the heart are mediated by specific intravascular endothelial receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 410, n. 1, p. 15–23, 2000.