



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROPSIQUIATRIA E
CIÊNCIAS DO COMPORTAMENTO**

RAPHAELLE LIMA DE ALMEIDA BELTRÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA HMGB1 (NUCLEAR HIGH MOBILITY
GROUP BOX – 1) E COPEPTINA NO SISTEMA HIPOTÁLAMO
NEUROHIPOFISÁRIO NA SEPSE EXPERIMENTAL**

Recife

2020

RAPHAELLE LIMA DE ALMEIDA BELTRÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA HMGB1 (NUCLEAR HIGH MOBILITY
GROUP BOX – 1) E COPEPTINA NO SISTEMA HIPOTÁLAMO
NEUROHIPOFISÁRIO NA SEPSE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em neurociências.

Área de concentração: Neurociências

Orientador: Profa. Dra. Dayane Aparecida Gomes

Co-orientador: Eduardo Carvalho Lira

Recife

2020

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Elaine Freitas CRB4-1790

B453c Beltrão, Raphaella Lima de Almeida
Caracterização da proteína HMGB1 (nuclear high mobility group box – 1) e copeptina no sistema hipotálamo neurohipofisário na sepse experimental / Raphaella Lima de Almeida Beltrão. – 2020.
96 f.: il.

Orientadora: Dayane Aparecida Gomes.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento. Recife, 2020.

Inclui referências e anexos.

1. Arginina Vasopressina. 2. Choque Séptico. 3. Proteína HMGB1. 4. Copeptina. I. Gomes, Dayane Aparecida (Orientadora). II. Título.

612.665 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS2021-098)

RAPHAELLE LIMA DE ALMEIDA BELTRÃO

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA HMGB1 (NUCLEAR HIGH MOBILITY
GROUP BOX – 1) E COCEPTINA NO SISTEMA HIPOTÁLAMO
NEUROHIPOFISÁRIO NA SEPSE EXPERIMENTAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neuropsiquiatria e Ciências do Comportamento, Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em neurociências.

Aprovada em: 21/09/2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Dayane Aparecida Gomes (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Sandra Lopes de Souza (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Michelly Cristiny Pereira (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Léucio Duarte Vieira Filho (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dra. Valéria Nunes de Souza (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho às pessoas mais importantes de minha vida, sem as quais não conseguiria alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Mário Beltrão e Maria de Lourdes (*in memoriam*) que sempre me incentivaram e me deram todo o apoio necessário.

Ao meu esposo, Juan Teixeira, por fazer parte da minha vida de forma tão importante.

Aos meus filhos, Miguel e Bernardo, por me apresentarem o mais puro amor.

A minha irmã, Rubia Beltrão, por sempre estar ao meu lado nos bons e maus momentos, pelo amor, carinho e constante apoio.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado a permissão de chegar até aqui, e por toda a força concedida na concretização desse sonho. A Ele toda Honra e toda Glória!

Ao meu esposo (Juan Teixeira) sempre tão presente e parceiro e principalmente pela compreensão nos meus momentos de ausência.

À minha orientadora, Professora Dayane Gomes, por ter me recebido de uma forma surpreendente em seu laboratório e ter me apresentado o mundo da experimentação animal. Foram pequenos e grandes gestos de cuidado que não terei como descrever aqui e recompensar. Agradeço-lhe, também, pela confiança, paciência, apoio constante e dedicação.

À Professora Sandra Lopes por todo apoio dado durante a minha trajetória na pós-graduação, principalmente quando tudo estava tão difícil.

À professora Carolina Peixoto que nunca hesitou em oferecer ajuda e apoio. Com você aprendi que garra e determinação ultrapassam qualquer barreira.

À professora Renata Campina sempre disposta a me ouvir e a mostrar que tudo acontece com um propósito e serve para o nosso crescimento. Foram muitos cafés...

À Professora Belmira Andrade, que me recepcionou tão bem em seu ambiente de trabalho e esteve sempre disposta a ajudar. Um agradecimento especial, a sua orientanda Ricielle Lopes, sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos.

Ao professor Léucio Duarte, pela atenção, disponibilidade e por suas contribuições na construção desse trabalho.

À Cláudia Oliveira, médica veterinária do Departamento de Fisiologia e Farmacologia, por toda atenção e empenho no treinamento da manipulação com animais.

Aos amigos do Laboratório de Neuroendocrinologia (LNEN), por terem caminhado junto comigo durante todo esse tempo. Em especial a José Carlos (Júnior), Matheus e Leticya que me recepcionaram tão bem no laboratório e sempre

estavam dispostos a ajudar. Nunca mediram esforços para compartilhar seus conhecimentos. Serei eternamente grata por tanta parceria.

Aos amigos de laboratório, Eduarda Patrícia, Elifrances Galdino, sempre prontos para auxiliar na execução dos procedimentos experimentais e sempre vibrando por cada conquista.

Aos colegas (Gabriel e Larissa) do Laboratório de Neuroplasticidade e Comportamento, por toda atenção, parceria e disponibilidade.

Aos colegas de trabalho do Departamento de Anatomia da UFPE, minha gratidão por tanta parceria.

Aos amigos de sala: Livia Lira, Jaiurte Martins, Douglas Monteiro, Ewerton Silva e Isla Ariadny, que não pouparam esforços para me ajudar, e que sempre me incentivaram a seguir em frente apesar das adversidades do mundo da pesquisa.

Aos professores que abriram as portas de seus laboratórios e permitiram o uso de equipamentos imprescindíveis para a realização deste trabalho: Prof^a Bernadete Maia, Prof^a Glória Duarte, Prof^a Valéria Souza, Prof^a Manuela Figueroa, Prof^o Danyel Perez.

Aos professores, funcionários, responsáveis e alunos integrantes da pesquisa, que de forma direta ou indireta cooperaram e participaram dessa trajetória.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudo para realização do curso de doutorado.

Aos meus queridos amigos e familiares, em especial a minha sogra sempre tão presente, que entenderam a minha ausência durante a realização deste trabalho.

“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”

(CORALINA, 1983, p. 136)

RESUMO

Sepse é definida como uma disfunção orgânica potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção que continua sendo uma das principais causas de morbimortalidade no mundo. Estudos apontam uma estreita correlação entre o sistema nervoso central, o sistema imunológico e a resposta do hospedeiro à sepse. Uma prova desta relação é a disfunção neurohipofisária que ocorre na sepse, com destaque para as alterações da síntese e secreção de vasopressina (AVP), que exhibe um padrão bifásico, contribuindo para a perpetuação do estado de choque e a disfunção múltipla de órgãos. Quando a célula é exposta a agentes inflamatórios, a HMGB1 (NUCLEAR HIGH MOBILITY GROUP BOX – 1) sai do seu domínio nuclear e ganha o ambiente extracelular, por isso ela tem sido alvo de vários estudos e, embora não tenha sido verificada correlação entre os níveis séricos de HMGB1 com a gravidade da doença, seus níveis elevados quase sempre estão associados com a morte do indivíduo. Portanto, este estudo teve por objetivo avaliar se houve alteração no conteúdo protéico da HMGB1 e da coceptina no sistema hipotálamo neurohipofisário durante o desenvolvimento do choque séptico. Foram utilizados 46 ratos machos adultos (60 dias) (*Rattus norvegicus*). A sepse foi induzida através do experimento *in vivo* através do modelo de ligadura e punção cecal (CLP) e o grupo controle (CTR) foi submetido à cirurgia simulada. Ao analisar o perfil temporal da sepse, foi verificado que 6h após o CLP ocorreu aumento nas concentrações plasmáticas de creatinina, ureia e lactato e uma diminuição de albumina 12h. A imunohistoquímica dos núcleos paraventriculares não revelaram diferenças na expressão proteica de coceptina, porém ao analisar as marcações dos núcleos supraópticos, foi visto que em 6h ocorreu um aumento da expressão proteica de coceptina entre CTR 0 e 6h, assim como entre CLP 0 e 6h. Não foram encontradas diferenças nas marcações para HMGB1 entre animais CLP e CTR. Em suma, o perfil bioquímico assemelha-se ao encontrado no quadro de sepse. Não foram encontradas evidências de que a produção de coceptina (marcador indireto de AVP) esteja comprometida durante a sepse. Por fim, a proteína HMGB1 no núcleo supraóptico não foi modulada pela sepse na fase inicial.

PALAVRAS CHAVES: Arginina Vasopressina. Choque Séptico. Proteína HMGB1. Copeptina.

ABSTRACT

Sepsis is defined as an organic dysfunction caused by an unregulated host response to infection that remains one of the main causes of morbidity and mortality worldwide. Studies point to a close correlation between the central nervous system, the immune system and the host's response to sepsis. A proof of this relationship is a neurohypophyseal dysfunction that occurs in sepsis, with emphasis on changes in the synthesis and secretion of vasopressin (AVP), which exhibits a biphasic pattern, contributing to the perpetuation of shock and organic dysfunction. When a cell is exposed to inflammatory agents, an HMGB1 (NUCLEAR HIGH MOBILITY GROUP BOX - 1) leaves its nuclear domain and gains the extracellular environment, which is why it has been the subject of several studies and, although it has not been verified between levels serum HMGB1 with the severity of the disease, their level levels are almost always associated with the individual's death. Therefore, this study aimed to assess whether there was a change in the protein content of HMGB1 and copeptin in the neurohypophyseal hypothalamic system during the development of septic shock. 46 adult male rats (60 days) (*Rattus norvegicus*) were used. Sepsis was induced through the in vivo experiment using the cecal ligation and puncture model (CLP) and the control group (CTR) underwent simulated surgery. When analyzing the temporal profile of sepsis, it was found that 6 hours after the CLP there were occurrences in the plasma levels of creatinine, urea and lactate and a decrease in albumin 12 hours. The immunohistochemistry of the paraventricular nuclei did not reveal differences in the protein expression of copeptin, however, when analyzing the markings of the supraoptic nuclei, it was seen that in 6h there was an increase in the protein expression of copeptin between CTR 0 and 6h, as well as between CLP 0 and 6h. No differences were found in the markings for HMGB1 between CLP and CTR animals. In short, the biochemical profile is similar to that found in the case of sepsis. No evidence was found that -production of copeptin (an indirect marker of AVP) is compromised during sepsis. Finally, the HMGB1 protein in the supraoptic core was not modulated by sepsis in the initial phase.

KEY WORDS: Arginine vasopressin. Shock septic. HMGB1 protein. Copeptin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Translocação da proteína HMGB1 (Nuclear high mobility group box – 1) do seu domínio nuclear para o ambiente extracelular.....	22
Figura 2 –	Desenho do sistema hipotálamo neurohipofisário (SHN).....	24
Figura 3 –	Representação esquemática do peptídeo precursor (preprovasopressina) de AVP	25
Figura 4 –	Diagrama do modelo de ligadura e punção do ceco. Fonte: Extraído de Bura et al., 2005.....	34
Figura 5 –	Representação esquemática da localização do SON (núcleo supraópticos) e PVN (núcleo paraventricular) em corte coronal do encéfalo (Paxinos; Watson, 2005).....	40
Figura 6 –	Fotomicrografia ilustrando a localização do SON (núcleo supraópticos) e PVN (núcleo paraventricular) em corte coronal do encéfalo.....	40
Figura 7 –	Percentual de sobrevivência dos animais.....	42
Figura 8 –	Concentrações séricas de albumina.....	43
Figura 9 –	Concentrações séricas de creatinina.....	44
Figura 10 –	Concentrações séricas de ureia.....	45
Figura 11 –	Concentrações séricas de lactato.....	46
Figura 12 –	Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade para coceptina em secções coronais do SON (núcleo supraóptico) e PVN (núcleo paraventricular) de animais CTR (controle) e CLP (ligadura e punção cecal).....	47
Figura 13 –	Marcações imunorreativas para coceptina nos núcleos paraventriculares (PVN).....	48
Figura 14 –	Marcações imunorreativas para coceptina nos núcleos supra-ópticos (SON).....	48
Figura 15 –	Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade para HMGB1 em secções coronais do SON (núcleo supraóptico).....	50
Figura 16 –	Marcações imunorreativas para HMGB1 nos núcleos supraópticos (SON).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ANG II	Angiotensina II
AP	Área Postrema
AV3V	Região Ântero-Ventral Do Terceiro Ventrículo
AVP	Vasopressina
CLP	Ligadura E Punção Cecal
CTR	Controle
CVOs	Órgãos Circunventriculares
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
HMGB-1	High mobility group Box-1
IL-1 β	Interleucina 1-beta
IHQ	Imunohistoquímica
LCE	Líquido Cerebroespinal
LT	Lâmina Terminal
MnPO	Núcleo Preóptico Mediano
NF- κ B	Fator Nuclear kappa B
NMDA	Receptores N-Metil-D-aspartato
OT	Ocitocina
OVLT	Órgão Vasculoso Da Lâmina Terminal

PaLM	Magnocelular Lateral
PaMM	Porção Magnocelular Medial
PBS	Tampão fosfato de sódio
PVN	Núcleo Paraventricular
RAGE	Receptor for Advanced Glycation Endoproduct
SFO	Órgão Subfornicial
SHN	Sistema Hipotálamo Neurohipofisário
SNC	Sistema Nervoso Central
SON	Núcleo supraópticos.
TLR2	Toll-like Receptor-2
TLR4	Toll-like Receptor-4
TNF α	Fator De Necrose Tumoral – alfa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1	SEPSE	17
2.1.1	Fisiopatologia da sepse	18
2.1.2	HMGB1	20
2.2	SISTEMA HIPOTÁLAMO NEUROHIPOFISÁRIO (SHN)	22
2.3	VASOPRESSINA	24
2.3.1	AVP e ativação do SHN na sepse	28
3	HIPÓTESE	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	OBJETIVO GERAL	31
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
5	MÉTODO	32
5.1	ANIMAIS	32
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL	32
5.3	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
5.3.1	Modelo Experimental de sepse	33
5.3.2	Coleta sanguínea	35
5.3.3	Perfusão transcardíaca	36
5.3.4	Procedimentos Imunohistoquímicos	36
5.3.4.1	Imunohistoquímica contra a proteína Copeptina	37
5.3.4.2	Imunohistoquímica contra a proteína HMGB1	38
5.3.4.3	Análise quantitativa da marcação de neurônios	39

6	ANÁLISE DOS RESULTADOS	41
7	RESULTADOS	42
7.1	ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	43
7.2	ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES PARA COPEPTINA	46
7.3	ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES PARA HMGB1	49
8	DISCUSSÃO	52
8.1	PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA	52
8.2	DADOS BIOMIQUÍMICOS	53
8.3	SEPSE E VASOPRESSINA	55
8.4	SEPSE E HMGB1	58
9	CONCLUSÃO	60
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE A – ARTIGO: VASOPRESSIN AND COPEPTIN RELEASE DURING SEPSIS AND SEPTIC SHOCK.	71
	ANEXO A - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO	95
	ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	96

1 INTRODUÇÃO

A sepse é uma disfunção grave dos sistemas orgânicos causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção (ABRAHAM, 2016) (RHODES; EVANS; ALHAZZANI; LEVY *et al.*, 2017). Esta síndrome grave se caracteriza por sua elevada mortalidade e figura como um importante problema de saúde pública no Brasil (SILVA; PEDRO MDE; SOGAYAR; MOHOVIC *et al.*, 2004) e no mundo (HODGIN; MOSS, 2008; MAYR; YENDE; ANGUS, 2014). Embora as formas de tratamento tenham evoluído e gerado um aumento da sobrevida à curto prazo, um grande número de pacientes com sepse ainda experimentam quadros de imunossupressão prolongados, que muitas vezes culminam na morbidade e mortalidade à longo prazo (MARINI; VINCENT; ANNANE, 2015).

Durante a sepse, a hipófise posterior é influenciada por citocinas pró-inflamatórias que atravessam a barreira hematoencefálica e, por meio de uma interação complexa do sistema nervoso autônomo e células imunes, que estimula a liberação de vasopressina (AVP) em uma primeira fase aguda. Por outro lado, em uma fase mais tardia da sepse, verifica-se uma redução na secreção deste peptídeo, tal fato seria consequência de uma resposta neurohipofisária anormal. A redução da secreção de AVP contribui para a instalação do estado de choque, progressão da inflamação com subsequente disfunção múltipla de órgãos e morte (GIUSTI-PAIVA; BRIAN SANTIAGO, 2010).

Nos últimos anos, a HMGB1 (High mobility group Box-1) uma proteína não-histona ligada ao DNA que recebe este nome por sua rápida mobilidade no gel de eletroforese, tem sido extensivamente estudada no contexto da inflamação por suas funções prototípicas de alarme, ativando a imunidade inata, após ser liberado ativamente das células ou passivamente liberado após a morte celular (YANG; WANG; ANDERSSON, 2020). Quando a célula é exposta a agentes inflamatórios, a HMGB1 sai dos domínios do núcleo e ganha o ambiente extracelular (LI; YU; YANG, 2015). Nesta ocasião, esta proteína sofre acetilação, um processo irreversível que a faz ser expulsa do citosol por meio de vesículas de exocitose (GARDELLA; ANDREI; FERRERA; LOTTI *et al.*, 2002).

O papel da HMGB1 na sepse tem sido alvo de estudos recentes e, embora não tenha sido mostrado haver correlação entre os níveis séricos de HMGB1 com a

gravidade da doença, níveis elevados quase sempre estão associados com a morte do indivíduo (ZHANG; KANG; ZEH; LOTZE *et al.*, 2013). Portanto, é importante ampliar os conhecimentos sobre a repercussão da sepse no sistema hipotálamo neurohipofisário, no que concerne a regulação da coceptina e HMGB1.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 SEPSE

Durante décadas, a sepse foi considerada uma disseminação sistêmica da infecção, levando a manifestações clínicas graves, com comprometimento de múltiplos órgãos e sistemas, com alta morbidade e mortalidade. A compreensão de que as manifestações sistêmicas da infecção podem ocorrer por meio de mediadores inflamatórios sem a necessidade de disseminação de microrganismos, levou ao conceito moderno de sepse (BONE; BALK; CERRA; DELLINGER *et al.*, 1992).

A sepse é uma disfunção orgânica com risco de vida causada por uma resposta desregulada do hospedeiro à infecção, levando ao choque séptico. O choque séptico é um subconjunto de sepse no qual anormalidades circulatórias e metabólicas subjacentes são críticas o suficiente para aumentar substancialmente a mortalidade (SINGER; DEUTSCHMAN; SEYMOUR; SHANKAR-HARI *et al.*, 2016). De acordo com o Terceiro Consenso Internacional para Sepse e Choque Séptico (Sepse-3) o termo SIRS (síndrome da resposta inflamatória sistêmica) não é mais empregado como critério clínico para sepse e a terminologia “sepse grave” não é mais considerada um subconjunto de sepse (RHODES; EVANS; ALHAZZANI; LEVY *et al.*, 2017; SINGER; DEUTSCHMAN; SEYMOUR; SHANKAR-HARI *et al.*, 2016).

Independentemente das alterações nas definições, sepse e choque séptico continuam sendo uma condição grave associada a alta morbimortalidade na UTI em todo o mundo (ANNANE; TRABOLD; SHARSHAR; JARRIN *et al.*, 1999) (LEVY; FINK; MARSHALL; ABRAHAM *et al.*, 2003; SINGER; DEUTSCHMAN; SEYMOUR; SHANKAR-HARI *et al.*, 2016), representando aproximadamente 1400 mortes diárias (BURGDORFF; BUCHER; SCHUMANN, 2018). A taxa de mortalidade por choque séptico é de cerca de 50%, de acordo com alguns estudos epidemiológicos (RHODES *et al.*, 2016; MACHADO *et al.*, 2017). Em um estudo multicêntrico realizado no Brasil, um terço dos leitos da unidade de terapia intensiva foram ocupados por pacientes sépticos, com uma taxa de mortalidade de 55,7% (MACHADO; CAVALCANTI; BOZZA; FERREIRA *et al.*, 2017).

Embora as formas de tratamento tenham evoluído e gerado um aumento da sobrevida à curto prazo, um grande número de pacientes com sepse ainda experimentam quadros de imunossupressão prolongados, que muitas vezes culminam na morbidade e mortalidade à longo prazo (MARINI; VINCENT; ANNANE, 2015). Consequentemente, as novas estratégias terapêuticas não devem visar apenas o aumento da sobrevida à curto prazo, mas impedir a incapacidade à longo prazo, restaurando o equilíbrio e a função do sistema imunológico (STEVENS; CHAPMAN; FRASER; KUCHEL *et al.*, 2017).

2.1.1 Fisiopatologia da Seps

A patogênese da seps é complexa e envolve múltiplos aspectos da interação entre os microrganismos infectantes e o hospedeiro. O reconhecimento de patógenos e a ativação celular resultante são fundamentais para o controle da infecção. Paradoxalmente, a resposta inflamatória do hospedeiro também é o substrato para as alterações fisiopatológicas na seps (SALOMAO; BRUNIALTI; RAPOZO; BAGGIO-ZAPPIA *et al.*, 2012; VAN DER POLL; VAN DE VEERDONK; SCICLUNA; NETEA, 2017).

As células imunológicas expressam um conjunto de receptores conhecidos como receptores de reconhecimento de padrões (do inglês, Pattern recognition receptors ou RRP) que iniciam rapidamente respostas de defesa do hospedeiro após a detecção de danos nos tecidos ou infecção microbiana. A presença de uma infecção microbiana é detectada pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos conservados (do inglês, Pathogen-associated molecular pattern ou PAMPs) que são expressos por microrganismos invasores e inócuos. Por outro lado, o reconhecimento imune do tecido danificado é mediado por proteínas intracelulares ou mediadores que são liberados das células que estão em processo de morte celular. Essas proteínas são conhecidas como 'alarminas' e, juntamente com os PAMPs, são denominados padrões moleculares associados a danos (do inglês, DAMPs) (BIANCHI, 2007). Os receptores Toll-like (TLRs), que são uma subfamília de PRRs, emergiram como receptores cruciais para o reconhecimento de DAMPs e o início da resposta inflamatória (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008).

A ativação desses vários receptores durante a infecção é fundamental para o reconhecimento de uma ampla gama de microorganismos e resulta em efeitos complementares, sinérgicos ou antagônicos, modulando a imunidade inata e adaptativa (SALOMAO; BRUNIALTI; RAPOZO; BAGGIO-ZAPPIA *et al.*, 2012). Durante a sepse, ocorre uma ativação sistêmica e completa das respostas imunes devido à liberação de níveis muito altos de DAMPs de microorganismos invasores e/ou tecido hospedeiro danificado, o que leva à superestimulação das células imunes. Como resultado, a sepse é acompanhada por uma resposta de citocina marcadamente desequilibrada (conhecida como 'tempestade de citocinas'), que converte respostas que normalmente são benéficas para combater infecções em inflamação excessiva e prejudicial (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008).

É importante destacar que os PRRs também podem reconhecer produtos dos hospedeiros, chamados alarmes ou sinais de perigo, como proteínas de choque térmico e a proteína HMGB1, que desempenham um papel importante na regulação da resposta inflamatória (ISHII; KOYAMA; NAKAGAWA; COBAN *et al.*, 2008).

A liberação de mediadores inflamatórios por células imunes inatas após o reconhecimento de patógenos, como fator de necrose tumoral - alfa (TNF- α), interleucina (IL) -6 e IL-1 e seu efeito nas células endoteliais, resultando na ativação da coagulação, vasodilatação, vazamento endotelial, rolagem e extravasamento de neutrófilos e mediadores inflamatórios para o espaço extravascular, ressalta a fisiopatologia das disfunções orgânicas e hipotensão durante a sepse (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

A possibilidade para a ocorrência de trombose durante a sepse é aumentada pelas atividades simultaneamente comprometidas das três principais vias anticoagulantes: anti-trombina, inibidor da via do fator tecidual (TFPI) e o sistema da proteína C (LEVI; VAN DER POLL, 2017). Muitos estudos apoiam a potência anticoagulante do sistema da proteína C *in vivo*, mostrando que prejudicar sua função converte bacteremia experimental subletal em sepse letal com coagulação intravascular disseminada (DANESE; VETRANO; ZHANG; POPLIS *et al.*, 2010).

Perturbação da integridade da barreira endotelial é um fenômeno-chave na fisiopatologia da sepse. Em condições homeostáticas, a função da barreira endotelial é mantida pelo citoesqueleto celular, glicocálix, moléculas de adesão

intercelular e proteínas de suporte (OPAL; VAN DER POLL, 2015). As conexões célula à célula são mantidas através de junções aderentes e junções de oclusão (DARWISH; LILES, 2013). Na resposta à infecção localizada, leucócitos e plaquetas aderem à superfície endotelial e migram para os locais em que as bactérias estão se multiplicando. Na sepse, o processo inflamatório exacerbado contribui para a perda da integridade da barreira, levando a um extravasamento de proteínas e plasma para o espaço extravascular, formação de edema e perfusão microvascular reduzida (VAN DER POLL; VAN DE VEERDONK; SCICLUNA; NETEA, 2017).

2.1.2 HMGB1

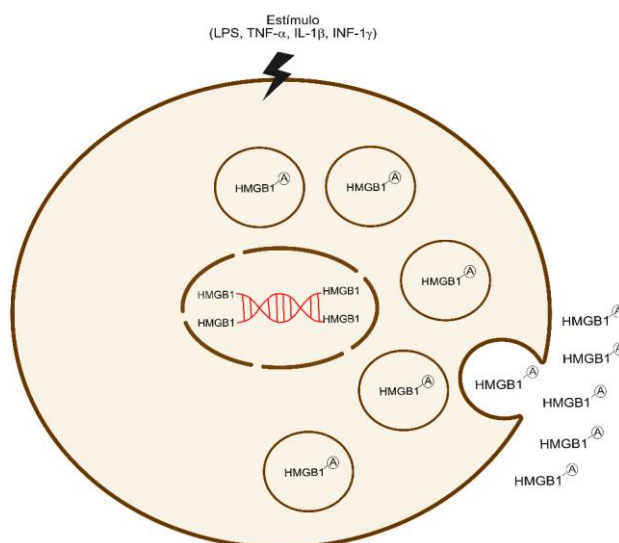
A HMGB1, previamente chamada de HMG1 ou anfoterina, é uma proteína composta por 215 aminoácidos cujo peso molecular aproximado é de 25-27KDa, foi originalmente descrita há 40 anos (GOODWIN; SANDERS; JOHNS, 1973) como uma proteína não-histona ligada ao DNA. É uma proteína abundante no núcleo da célula e recebe este nome por sua rápida mobilidade no gel de eletroforese. Sua função dentro do núcleo se limita à estabilização da estrutura do nucleossomo e a facilitação da transcrição gênica, o que a torna um importante promotor da homeostase nuclear (KANG; CHEN; ZHANG; HOU *et al.*, 2014). Quando a célula sofre alguma injúria ou é exposta a agentes inflamatórios, ela sai do núcleo e sofre acetilação, um processo irreversível que a faz ser expulsa do citosol por meio de vesículas de exocitose (figura 1) (GARDELLA; ANDREI; FERRERA; LOTTI *et al.*, 2002).

A HMGB1 foi inicialmente identificada no cérebro (GOODWIN; SANDERS; JOHNS, 1973) e desde a sua descoberta, despertou grande interesse da comunidade científica sobre seu papel no sistema nervoso central (SNC) (LEI *et al.*, 2013). Atualmente, sabe-se que esta proteína pode ser facilmente encontrada no núcleo de neurônios, astrócitos e células da hipófise de cérebros de ratos em condições fisiológicas (ZHANG; KANG; ZEH; LOTZE *et al.*, 2013), bem como em situações de estresse inflamatório e outras condições patológicas (DEUTSCHMAN; RAJ; MCGUIRE; KELZ, 2013).

A HMGB1 exerce um conhecido efeito proinflamatório *citocina-like* no SNC (ZHANG; KANG; ZEH; LOTZE *et al.*, 2013). O trauma cranioencefálico, por exemplo aumenta a expressão gênica da HMGB1 no córtex fronto-parietal (KANG; CHEN; ZHANG; HOU *et al.*, 2014), além disso, a injeção intraventricular da HMGB1 determinou alterações como aumento da temperatura corporal basal, alteração do comportamento, aversão à comida assim como o aumento da atividade de interleucinas como IL-1 β (Interleucina 1-beta) e TNF- α , efeitos estes bem documentados por diferentes pesquisadores (GARDELLA; ANDREI; FERRERA; LOTTI *et al.*, 2002) (KANG; CHEN; ZHANG; HOU *et al.*, 2014) (WANG; WARD; SAMA, 2009). No entanto, não há dados na literatura sobre uma possível interação entre HMGB1 e diversas outras áreas do SNC conhecidamente relacionadas ao curso da sepse.

O papel da HMGB1 na sepse foi alvo de inúmeros estudos recentes e, embora não tenha sido mostrado haver correlação entre os níveis séricos de HMGB1 com gravidade da doença, níveis elevados quase sempre estão associados com a morte do indivíduo (ZHANG; KANG; ZEH; LOTZE *et al.*, 2013). Baseado neste argumento, a HMGB1 passou a ser implicada como protagonista da sepse, sobretudo numa fase avançada da doença (WANG; WARD; SAMA, 2014) e isto tem sido demonstrado tanto em modelos animais quanto em seres humanos, num momento em que a doença seria irreversível com as opções terapêuticas disponíveis na atualidade (DEUTSCHMAN; RAJ; MCGUIRE; KELZ, 2013) (SEYMOUR; LIU; IWASHYNA; BRUNKHORST *et al.*, 2016). Neste cenário, a HMGB1 comportar-se-ia como um marcador de mortalidade na sepse, cujos mecanismos de ação, inclusive no SNC, ainda carecem de estudos adicionais.

Figura 1 – Translocação da proteína HMGB1 (Nuclear high mobility group box – 1) do seu domínio nuclear para o ambiente extracelular.



Fonte: A autora, 2020.

Durante a sepse, a hipófise posterior é influenciada por citocinas pró-inflamatórias que atravessam a barreira hematoencefálica e, por meio de uma interação complexa do sistema nervoso autônomo e células imunes, estimula a liberação de AVP em uma primeira fase aguda. Já numa fase mais tardia da sepse, verifica-se uma redução da síntese e secreção deste peptídeo, tal fato seria consequência de uma resposta neurohipofisária anormal. A redução da secreção de AVP contribui para a instalação do estado de choque, progressão da inflamação com subsequente disfunção múltipla de órgãos e morte (GIUSTI-PAIVA; BRIAN SANTIAGO, 2010).

2.2 SISTEMA HIPOTÁLAMO NEUROHIPOFISÁRIO (SHN)

O SHN está localizado na porção média do hipotálamo anterior compreende dois núcleos paraventriculares (PVN) de cada lado da parede dorsolateral do terceiro ventrículo e dois núcleos supraópticos (SON). Em uma definição mais ampla, atualmente se aceita que o SHN seja parte de um circuito neural com estruturas dentro da lâmina terminal, o que constitui a parede anterior do terceiro ventrículo, que define o limite anterior do hipotálamo (BROWNSTEIN; RUSSELL;

GAINER, 1980). Além de receber diretamente projeções do órgão subfornicial (SFO) e do órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), o SHN recebe também aferências indiretas destes núcleos por meio do núcleo preóptico mediano (MnPO), projetando-os aos SONs e PVNs, responsáveis pela síntese de AVP e ocitocina (OT) e cujo axônios terminam com múltiplas arborizações na hipófise posterior (ANTUNES-RODRIGUES; DE CASTRO; ELIAS; VALENCA *et al.*, 2004).

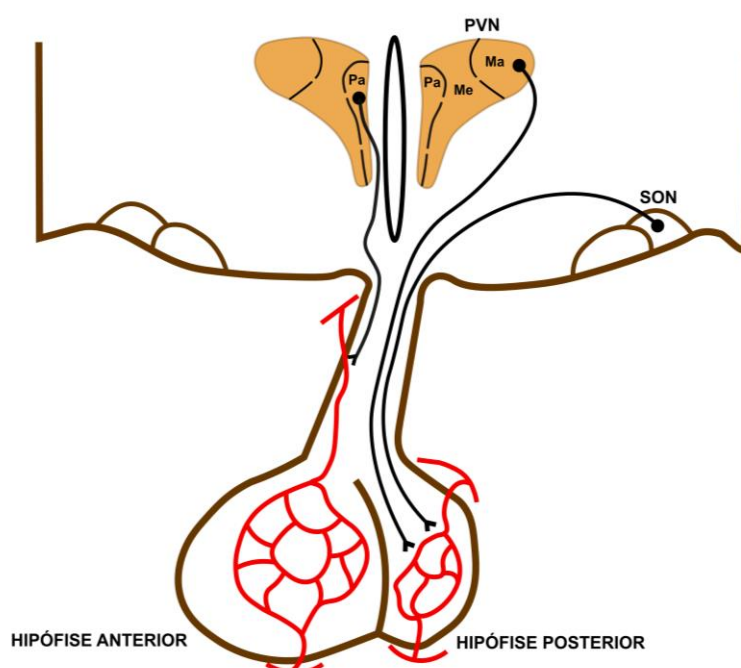
O SON é bilateral ao quiasma óptico e é composto exclusivamente de neurônios magnocelulares. Este núcleo começa cranialmente como uma estrutura grande e se condensa caudalmente, terminando próximo a borda lateral do trato óptico (ARMSTRONG, 1995).

O PVN possui grupos distintos de células, que se projetam não apenas para o lobo posterior da hipófise, mas também para a eminência mediana e para outras áreas do SNC (ARMSTRONG, 1995). O PVN consiste em grupos de neurônios magnocelulares e parvocelulares que estão amplamente agrupados em divisões anatomicamente distintas (SWANSON; SAWCHENKO, 1983). Os neurônios magnocelulares, que se projetam para a hipófise posterior, desempenham uma função endócrina através da secreção de OT e AVP diretamente na circulação (figura 2) (SAWCHENKO; SWANSON, 1983). A maioria dos autores concordam que os dois principais tipos de células são contíguos: a porção magnocelular medial (PaMM), que contém principalmente neurônios oxitocinérgicos, e a divisão magnocelular lateral (PaLM), que contém principalmente neurônios vasopressinérgicos (ARMSTRONG, 1995). Dentro da divisão parvocelular, temos subpopulações distintas de neurônios. Os grupamentos parvocelulares anterior (PaAP) e medial (PaMP) secretam o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e o hormônio liberador de tireotrofina (TRH), na eminência mediana em justaposição aos capilares das veias porta hipofisária, que atuam na hipófise anterior (MECAWI ADE; RUGINSK; ELIAS; VARANDA *et al.*, 2015).

Os axônios destes dois núcleos formam o trato hipotálamo-hipofisário, que terminam na hipófise posterior (ARMSTRONG, 1995). A OT e a AVP são sintetizadas e liberadas pelos neurônios neurosecretórios magnocelulares classificados em AVP-OT (BROWNSTEIN; RUSSELL; GAINER, 1980). Eles são transportados em vesículas através de axônios que se projetam para a hipófise

posterior. A liberação destes hormônios é desencadeada via alterações no potencial de ação causado nas células dos núcleos PVN e SON e propagados até as terminações nervosas neurohipofisárias (MAYBAUER; MAYBAUER; ENKHBAATAR; TRABER, 2008).

Figura 2 – Desenho do sistema hipotálamo neurohipofisário (SHN). Esquema das conexões entre PVN (núcleo paraventricular) e SON (núcleo supraóptico) com a glândula hipófise. Subdivisões do PVN. Região parvocelular (Pa), região lateral magnocelular (Ma) e a região intermediocelular (Me).



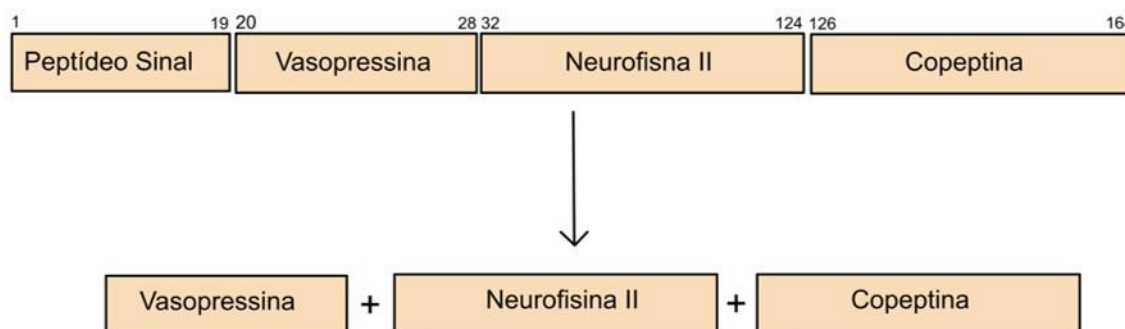
Fonte: A autora, 2020.

2.3 VASOPRESSINA

A AVP é um nonapeptídeo com peso molecular de 1084 daltons (STRUCK; MORGENTHALER; BERGMANN, 2005). A AVP é sintetizada por neurônios magnocelulares. Ele tem origem num peptídeo precursor de 164 aminoácidos designado prevasopressina, que é formada por um peptídeo sinal, AVP, neurofisina II e copeptina (figura 3) (LAND; SCHUTZ; SCHMALE; RICHTER, 1982). Nos grânulos neurosecretórios, o precursor hormonal é proteoliticamente

processado para produzir AVP, neurofisiina II, e coceptina (BAUMANN; DINGMAN, 1976).

Figura 3 – Representação esquemática do peptídeo precursor (preprovasopressina) de AVP. Os números indicam os aminoácidos que constituem a proteína AVP humana.



Fonte: A autora, 2020.

Em resposta a despolarização da membrana excitada por impulsos elétricos gerados no SON e PVN, o hormônio é secretado na circulação sistêmica pelo processo de exocitose. Usualmente, qualquer estímulo para a liberação de AVP também aumenta a taxa de síntese e transporte e, em última análise, mantém os estoques do hormônio na hipófise posterior. A maior parte de AVP recém-sintetizada é estocada intracelularmente e apenas 10-20% do *pool* hormonal dentro da hipófise posterior pode ser liberado (FIELDMAN; FORSLING; LE QUESNE, 1985). Em geral, o processo completo de síntese de AVP, transporte e armazenamento na hipófise posterior, leva entre 1-2 horas (MORGENTHALER; MULLER; STRUCK; BERGMANN *et al.*, 2007). No plasma, a meia-vida de AVP é curta, cerca de 5-15 minutos. Assim, a concentração plasmática reflete a liberação recente de AVP (MUTLU; FACTOR, 2004).

A AVP é instável em plasma e soro, mesmo quando armazenados a -20°C . Uma estratégia para aprimorar a mensuração problemática de um hormônio peptídico bioativo, rapidamente depurado, como a AVP, é medir um peptídeo estável, presumivelmente não funcional, derivado de seu precursor cognato (MORGENTHALER; MULLER; STRUCK; BERGMANN *et al.*, 2007). Ao contrário de

AVP, a copeptina permanece estável *ex vivo* por vários dias à temperatura ambiente no soro ou plasma (MORGENTHALER; STRUCK; ALONSO; BERGMANN, 2006). A copeptina é um peptídeo glicosilado que consiste em 39 aminoácidos com um segmento central rico em leucina, que constitui a porção C-terminal da preprovasopressina (LAND; SCHUTZ; SCHMALE; RICHTER, 1982). Ela é liberada em uma razão equimolar à AVP, é mais estável no sangue e mais simples de determinar. Como resultado de sua geração estequiométrica, as quantidades de fragmentos pro-hormonais não funcionais liberados refletem as dos hormônios maduros e oferecem uma maneira alternativa de avaliar a sua liberação (MORGENTHALER; MULLER; STRUCK; BERGMANN *et al.*, 2007).

A secreção de AVP é regulada pela osmolalidade plasmática (osmorregulação) e por alterações na pressão arterial sistêmica (barorreflexo) e é liberada em resposta a uma variedade de estímulos (dor, hemorragia, hipóxia, administração de salina hipertônica) em animais e em humanos (FIELDMAN; FORSLING; LE QUESNE, 1985); (YILMAN; ERENLER; BAYDIN, 2015). Em condições normais, a secreção de AVP é regulada primariamente por mudanças na osmolalidade plasmática (DUNN; BRENNAN; NELSON; ROBERTSON, 1973) (WADE; KEIL; RAMSAY, 1983).

Uma área neuronal importante no controle da osmolalidade e da secreção de AVP está localizada na região anterior do hipotálamo, onde estão localizadas as estruturas relacionadas à regulação da reposição de água e sal. Os órgãos circunventriculares (CVOs), a região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V) e a área postrema (AP), constituem essas estruturas, localizadas principalmente em torno do terceiro ventrículo. Os CVOs foram caracterizados como regiões osmosensíveis responsáveis por monitorar especificamente as concentrações de Na⁺ extracelular no cérebro (MCKINLEY; BADOER; VIVAS; OLDFIELD, 1995; MCKINLEY; BLAINE; DENTON, 1974).

A lâmina terminal (LT), estrutura do prosencéfalo, adjacente a porção anterior do terceiro ventrículo contém o MnPO e dois outros CVOs, o SFO, e o OVLT. O AV3V inclui parte ventral da AP e o OVLT. A região AV3V, SFO e a AP, no óbex do quarto ventrículo, contém neurônios que são sensíveis às variações de osmolalidade do líquido cerebrospinal (LCR). O OVLT e o SFO são desprovidos de barreira hemato-encefálica e por isso são sensíveis a fatores sistêmicos circulantes que não

podem penetrar diretamente o cérebro. Seus neurônios osmossensíveis enviam projeções para os neurônios neurosecretores magnocelulares e parvocelulares do PVN e SON, podendo assim funcionar como osmorreceptores cerebrais (MCKINLEY; GERSTBERGER; MATHAI; OLDFIELD *et al.*, 1999).

Uma queda na pressão e no volume de plasma também ativa o PVN e o SON após a estimulação dos receptores de baixa e alta pressão. A liberação de AVP nestas condições envolve estimulação por angiotensina II (ANG II). A hipotensão causa liberação de renina renal e formação de ANG II; ligações desse hormônio a receptores AT1 em neurônios do SFO promovem ativação de uma aferência angiotensinérgica central que, por sua vez, tem efeito predominantemente excitatório sobre neurônios vasopressinérgicos (ANTUNES-RODRIGUES; DE CASTRO; ELIAS; VALENCA *et al.*, 2004). Receptores no átrio e ventrículos sinalizam variações no volume sanguíneo, e os do arco aórtico e seios carotídeos sinalizam alterações na pressão arterial. As aferências periféricas são transmitidas por nervos vagais e glossofaríngeos para o núcleo do trato solitário no tronco cerebral, de onde vias pós-sinápticas conectam-se com neurônios magnocelulares do SON e do PVN (SHARE, 1988).

Após sua liberação na corrente sanguínea, a AVP atua a nível periférico através da ligação a três receptores: V1a, V1b e V2 (MORGENTHALER *et al.*, 2007). Os receptores V1a estão localizados principalmente na musculatura vascular lisa da circulação sistêmica, mas também no cérebro, fígado, rins e plaquetas. A estimulação desses receptores causa a liberação de cálcio intracelular e a abertura da contração dos canais de cálcio da célula. Os receptores V2 estão localizados nos dutos coletores renais. A estimulação desses receptores causa a inserção da proteína G acoplada aos canais de água (aquaporinas tipo 2) nos dutos coletores (ROBBEN *et al.*, 2004).

Os receptores V2 também são encontrados nos músculos lisos dos vasos, causando vasodilatação mediada por óxido nítrico e liberação do fator endotelial de von Willebrand. Os receptores V1b (ou V3) são encontrados na hipófise anterior, assim como no cérebro. A estimulação desses receptores causa a liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH estimula a liberação de hormônios

esteróides glicocorticóides da glândula adrenal como parte do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) (TAGAWA et al., 1993; TAGAWA et al., 1995).

2.3.1 AVP e ativação do SHN na sepse

A secreção de AVP exibe um **curso bifásico** durante a sepse tanto em animais como em seres humanos (CORREA; PANCOTO; DE OLIVEIRA-PELEGRIN; CARNIO *et al.*, 2007; GIUSTI-PAIVA; BRIAN SANTIAGO, 2010; GIUSTI-PAIVA; RUGINSK; DE CASTRO; ELIAS *et al.*, 2003; SHARSHAR; BLANCHARD; PAILLARD; RAPHAEL *et al.*, 2003). Primeiro, a secreção de AVP é caracterizada por aumento significativo na fase inicial da sepse; e depois, numa fase tardia, os níveis de AVP passam a se encontrar paradoxalmente baixos para o grau de hipotensão (CORREA; PANCOTO; DE OLIVEIRA-PELEGRIN; CARNIO *et al.*, 2007) (GIUSTI-PAIVA; BRIAN SANTIAGO, 2010).

Durante a fase inicial da sepse, a ativação do hipotálamo promove intensa secreção de AVP (GIUSTI-PAIVA; DE CASTRO; ANTUNES-RODRIGUES; CARNIO, 2002). Evidências têm demonstrado que a sepse estimula a liberação de AVP, independente de variáveis fisiológicas conhecidas por induzir a secreção deste peptídeo (SHIMIZU; KASAI; TAKAMATA, 2009), o que sinaliza que as citocinas poderiam ter efeito direto sobre o SHN ao modificar a secreção fisiológica de AVP. O questionamento sobre se a sepse poderia constituir um estímulo independente para secreção de AVP ainda não foi completamente elucidado.

No curso da sepse, que evolui para o choque séptico, a disfunção neurohipofisária tem sido descrita como fator crucial responsável pela instalação do quadro de choque (GHEORGHITA; BARBU; GHEORGHIU; CARUNTU, 2015). A deficiência na produção ou secreção de AVP que ocorre nesta fase da sepse não encontra uma explicação na literatura, embora seja sabido que ela exista e que este evento seria um dos responsáveis pela manutenção da instabilidade hemodinâmica e perpetuação do estado de choque com progressiva piora da disfunção múltipla de órgão e sistemas frequentemente assistidos na sepse (GIUSTI-PAIVA; BRIAN SANTIAGO, 2010).

Quando se comparam, nos diversos estudos de sepse experimental, a curva da secreção de AVP (GIUSTI-PAIVA; BRIAN SANTIAGO, 2010; GIUSTI-PAIVA; RUGINSK; DE CASTRO; ELIAS *et al.*, 2003) com a curva da HMGB1 plasmático (O'CONNOR; HANSEN; PUGH; DEAK *et al.*, 2003), observa-se uma correlação temporal entre a fase de hipersecreção de AVP com a elevação progressiva dos níveis de HMGB1 no plasma. Quando os níveis de HMGB1 param de se elevar, justamente no final da sepse para o início do choque séptico (O'CONNOR; HANSEN; PUGH; DEAK *et al.*, 2003), segue-se uma fase de “exaustão” de AVP, que poderia amplificar e perpetuar o estado de choque. Na fase avançada do choque séptico, os níveis séricos de HMGB1 são significativamente mais elevados do que na sepse, o inverso acontece com os níveis plasmáticos de AVP (GIUSTI-PAIVA; BRIAN SANTIAGO, 2010). Embora haja muitos estudos sobre o papel HMGB1 na sepse, muitos destes focam a sua ação periférica. Até onde é de nosso conhecimento, nenhum estudo demonstrou a modulação da atividade do SHN pela HMGB1.

Assim, neste estudo, a sepse experimental foi realizada através do modelo de ligadura e punção do ceco (CLP) para investigarmos as repercussões sobre o sistema hipotálamo neurohipofisário, mais precisamente na produção de coceptina – AVP- pelos núcleos SON e PVN, e na expressão proteica da HMGB1.

3 HIPÓTESE

A sepse induzida através do modelo de ligadura e punção do ceco (CLP) depleta a AVP do sistema hipotálamo neurohipofisário associado com aumento da expressão proteica da HMGB1.

4 OBJETIVO

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar se houve alteração no conteúdo protéico da HMGB1 e da Copeptina no sistema hipotálamo neurohipofisário durante o desenvolvimento do choque séptico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar os parâmetros bioquímicos durante o desenvolvimento da sepse: albumina, creatinina, lactato e ureia.
- 2) Realizar a imunomarcação da proteína copeptina nos SONs e nos PVNs;
- 3) Realizar a imunomarcação da proteína HMGB1 nos SON.

5 MÉTODO

5.1 ANIMAIS

Foram utilizados 46 ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*) da linhagem *Wistar*, pesando entre 200 e 250g (dois meses de idade) fornecidos pelo Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Os animais foram mantidos em ambiente com luz (12h de claro – 12h de escuro) e temperatura controladas ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) com livre acesso à água e alimentação sólida. Todos os experimentos foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e com anuência do Comitê de Ética para o uso de animais da Universidade Federal de Pernambuco. Para minimizar o sofrimento, critérios de humanização previamente descritos (NEMZEK; XIAO; MINARD; BOLGOS *et al.*, 2004) foram utilizados como critérios para eutanásia dos animais com sinais de grande sofrimento. Idealmente, as perguntas científicas devem ser respondidas sem sujeitar os animais da pesquisa a qualquer sofrimento e isso é possível em alguns estudos de choque nos quais os procedimentos e a eutanásia posterior são realizados completamente sob anestesia (SCHNAIDER; SOUZA, 2003). Ao término dos experimentos, os animais foram pré-anestesiados com isoflurano, anestesiados e eutanasiados por decapitação utilizando-se guilhotina própria para roedores. Todos os experimentos executados com o animal vivo foram supervisionados pela médica veterinária Cláudia Paiva de Oliveira.

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo 1 (CLP – ligadura e punção cecal) e grupo 2 (cirurgia simulada- CTR). Cada grupo foi dividido em 3 (três) subgrupos de acordo com o tempo de indução à sepse pelo CLP. Os animais foram estudados nos tempos 0, 6, 12 e 24 horas, respectivamente.

- Grupo 1 (CLP): composto de 24 animais, distribuídos em três subgrupos (0, 6, 12 e 24 horas) de acordo com o tempo de exposição à sepse;
- Grupo 2 (CTR): composto de 24 animais, distribuídos em três subgrupos (0, 6, 12 e 24 horas) de acordo com o tempo da realização da cirurgia simulada.

5.3 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

5.3.1 Modelo Experimental de Sepse

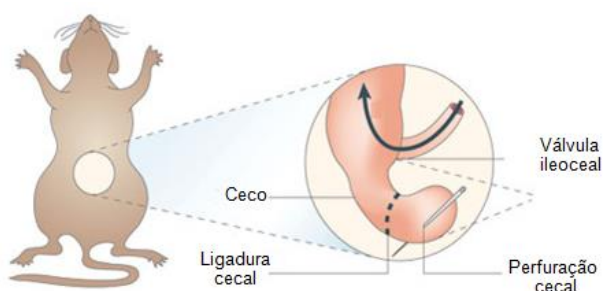
O modelo de sepse mais amplamente utilizado é o modelo de ligadura e punção cecal (CLP), que é reconhecido como tendo uma compatibilidade significativa com a sepse humana (DEJAGER; PINHEIRO; DEJONCKHEERE; LIBERT, 2011; HUBBARD; CHOUDHRY; SCHWACHA; KERBY *et al.*, 2005). Após a realização do CLP, são produzidas respostas imunes, hemodinâmicas e bioquímicas semelhantes à sepse humana (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980). No entanto, uma etapa crítica desse modelo é a reprodutibilidade da mesma quantidade de vazamento intestinal. Por isso é importante que este procedimento seja realizado de forma padronizada e uniforme para criar uma configuração controlada com um número minimizado de variáveis, para desta forma facilitar a comparação de resultados experimentais entre grupos laboratoriais (RITTIRSCH; HUBER-LANG; FLIERL; WARD, 2009).

A sepse foi induzida através do modelo de CLP conforme descrito a seguir (TUON; COMIM; PETRONILHO; BARICHELLO *et al.*, 2008). Inicialmente os animais foram pré-anestesiados com isoflurano (Cristália®) em câmara de indução na capela de exaustão. Na sequência foram anestesiados por injeção intraperitoneal com uma mistura de cetamina (Dopalen, Ceva®) na dose 100 mg/Kg de peso corporal e xilasina (Anasedan, Ceva®) na dose de 10 mg/Kg de peso corporal. O objetivo do uso da anestesia foi deprimir o SNC e bloquear a percepção da dor. Posteriormente foi realizada uma incisão abdominal de 2 cm de comprimento, suficiente para expor o intestino delgado e ceco adjacente (Figura 4).

O ceco foi cuidadosamente isolado para evitar danos aos vasos sanguíneos e foi fortemente ligado logo abaixo da válvula ileocecal com uma linha de seda nº4, sem causar obstrução intestinal. O ceco foi perfurado 2 vezes com uma agulha de calibre 16G próximo a ligadura e recolocado no interior da cavidade abdominal. A incisão abdominal foi fechada com linha de sutura nylon 4.0.

O grupo controle foi submetido ao mesmo procedimento cirúrgico de abertura da cavidade abdominal e manipulação intestinal sem ocorrer neste, a perfuração e punção do ceco (cirurgia simulada- CTR) (BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005)

Figura 4 – Diagrama do modelo de ligadura e punção do ceco.



Fonte: Extraído de Buras et al., 2005.

A cetamina é um anestésico dissociativo que produz efeitos de imobilidade e depressão respiratória. A ação da cetamina, bloqueador do receptor NMDA (N-metil-D-aspartato), deve-se a interrupção entre o córtex sensorial e áreas límbicas de associação (por isso o termo dissociação). A cetamina foi o anestésico de escolha para o desenvolvimento desta pesquisa pelo fato de ser rápida, possuir ação curta, ser de fácil administração e possuir ampla margem de segurança. A xilasina (α -2 agonista) é um potente sedativo que age via depressão do SNC e atua como relaxante muscular.

A mistura anestésica promove aproximadamente 30 minutos de anestesia no plano cirúrgico grau III. Este tempo é suficiente para a realização dos procedimentos

experimentais. Caso fosse necessário, a anestesia poderia ser suplementada com 20-50% da dose administrada inicialmente, até garantir a obtenção do grau cirúrgico.

5.3.2 Coleta sanguínea

Ao término do experimento, (0, 6, 12 e 24 horas após a realização do CLP ou cirurgia simulada), os animais foram pré-anestesiados. Na sequência eles receberam uma dose anestésica própria para a realização da eutanásia (cetamina/200 mg/Kg de peso corporal e Xilasina /10 mg/Kg de peso corporal). Eles foram fixados em uma superfície para o procedimento de abertura da cavidade torácica. Foi realizado primeiramente um corte na parede do abdome expondo-se o processo xifóide. Este corte realizado em forma de “V” na musculatura e costelas, permitiu a exposição do coração na cavidade torácica. Uma seringa de 3 ml foi introduzida no ventrículo esquerdo do coração para a coleta de sangue. Foram coletados 5% do volume sanguíneo do animal (sangue arterial) por punção intracardíaca.

- Dois mil microlitros/2ml foram coletados em uma seringa com anti-coagulante (EDTA) e acondicionados em tubo contendo EDTA (BD Vacutainer®). Em seguida o sangue foi centrifugado à 3500 rpm, por 15 min. O plasma foi coletado e armazenado em freezer -20° para posterior análise. O plasma foi utilizado para a dosagem do lactato com kit da LabTest®.
- Mil microlitros/1ml de sangue foram coletados em seringa sem anti-coagulante para obtenção de soro e acondicionados em tubo seco (BD Vacutainer®). Após o tempo de coagulação, o sangue foi centrifugado à 3500 rpm, por 15 min. O soro foi utilizado para análises bioquímicas dos seguintes parâmetros: albumina, ureia e creatinina (dosadas através de kits da LabTest®).

5.3.3 Perfusão Transcardíaca

Ao final da coleta sanguínea, uma cânula acoplada a uma bomba peristáltica foi introduzida no ventrículo esquerdo do coração e presa na área por uma pinça hemostática. A bomba foi acionada em velocidade compatível com a manutenção da integridade dos vasos sanguíneos. Inicialmente foi infundido 100 ml de solução salina (NaCl, 0,9%) a temperatura ambiente para remoção do sangue dos vasos. Este procedimento previne a formação de coágulos e propicia a correta penetração do fixador nos tecidos. A perfusão com salina foi seguida da infusão de 500 mL solução fixadora (4% de paraformaldeído, pH 7,4, em 4° C) (SIGMA-ALDRICH/P6148). Quando foi observada a contração dos membros superiores, indicando a chegada do fixador nesta região, foi adicionado gelo sobre a cabeça do animal, para minimizar a degradação proteica no encéfalo.

5.3.4 Procedimentos Imunohistoquímicos

Ao final da passagem do fixador, foi realizada a decapitação do animal utilizando-se guilhotina própria para roedores. Os encéfalos foram retirados do crânio e pós-fixados na mesma solução fixadora acrescida de sacarose (30%) durante 4 horas. Após esse período, foram armazenados em solução crioprotetora (Tampão fosfato de sódio PBS - mais sacarose 30%) até o momento da realização dos cortes.

Os encéfalos foram crio-seccionados em cortes coronais de 40µm de espessura utilizando-se criostato de congelamento (Criostato-Leica®) a - 20°C. Cinco séries de cortes foram coletadas, para cada animal, em placa de acrílico (24 cavidades) com solução anticongelante e armazenadas a -20°C.

5.3.4.1 Imunohistoquímica contra a Proteína Copeptina

Uma série de cortes foi submetida a reações de imunohistoquímica contra proteína Copeptina. Nesse procedimento os cortes coronais da série foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min). Na sequência foi realizada a recuperação antigênica dos cortes em tampão Borato por 60 minutos no banho maria a 60°C e lavagens em PBS (3 x 10 min). Após as lavagens os cortes foram incubados por 30 minutos em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) diluído em PBS para bloquear a atividade da peroxidase endógena. Em seguida foram realizadas as lavagens em PBS (3 x 10min) e incubação por 60 minutos em solução de bloqueio dos sítios inespecíficos de união ao anticorpo composta por PBS, Triton (0,3 %) e soro albumina bovina (BSA 22%).

Os cortes foram incubados em solução com anticorpo primário anti-copeptina (feito em cabra) por 24 h (Santa Cruz – 7812). Esta solução é composta por PBS, Triton (0,3 %), soro albumina bovina (BSA 22%) e anticorpo contra a proteína Copeptina (1:300). Após o período de incubação os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário por 90 min. Esta solução é composta por Triton (0,3%), PBS e anticorpo secundário biotinilado feito em rato contra cabra (1:500) (Santa Cruz - 2489). Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com PBS (3 x 10 min) e outra incubação (90 min) com complexo Avidina-Biotina 1% (Santa Cruz - 516216). Após esse período de incubação, os cortes foram lavados em PBS (3 x 10 min). Em seguida foi realizada a revelação.

Inicialmente os cortes ficaram incubados por vinte minutos numa solução de 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma-Aldrich D5637) diluído em solução de PBS. Após os vinte minutos, os cortes foram incubados por aproximadamente mais vinte minutos na mesma solução anterior (DAB diluído em PBS) acrescido de peróxido de hidrogênio até os cortes obterem a cor marrom claro. Para neutralizar esta reação, os cortes foram submetidos a lavagens com PBS.

Os cortes foram montados em lâminas previamente gelatinizadas, passaram por processos de desidratação e diafanização e foram, por fim, cobertos com lamínulas e Entellan (MERCK). No processo de desidratação ocorre imersão dos

cortes em uma sequência crescente de concentrações de álcoois (70%, 90%, 100 %-I, 100 %-II - 5 min em cada) seguido de diafanização em xilol (Xilo-I, 5 min, Xilol-II, 5 min).

5.3.4.2 Imunohistoquímica contra a Proteína HMGB-1

Uma série de cortes foi submetida a reações de imunohistoquímica contra proteína HMGB-1. Nesse procedimento os cortes coronais da série foram removidos da solução anti-congelante e submetidos a três séries de lavagens. Na primeira foram lavados em PBS (3 x 10 min), na segunda com água oxigenada 3% (1 x 5 min) (para bloquear a atividade da peroxidase endógena e de alguns sítios inespecíficos de união ao anticorpo) e na terceira novamente em PBS (3 x 10 min) para remover os resíduos do pós fixador.

Em seguida foram incubados em solução com anticorpo primário anti-HMGB-1 (feito em rato) por 48 h. Esta solução é composta por PBS, Triton (0,3 %), soro normal de cabra (NGS 5%) e anticorpo contra a proteína HMGB-1 (1:500) (Santa cruz - 56698). Durante a incubação os cortes permaneceram em recipientes de 1,5 ml posicionados em uma incubadora agitadora refrigerada (Marconi-MA83). Após a incubação os cortes foram submetidos a lavagens em PBS (3 x 10 min) e posteriormente incubados em solução com anticorpo secundário por 90 min. Esta solução é composta por Triton (0,3%), PBS e anticorpo secundário biotinilado feito em cabra contra rato (1:800) (PA1-28567).

Em seguida, os cortes foram novamente submetidos a lavagens com PBS (3 x 10 min) e outra incubação (90 min) com complexo avidina-biotina-peroxidase 1% (Vectastain, Camon, Wiesbaden, Alemanha). Após esse período de incubação, os cortes foram lavados em PBS (2 x 10 min) e acetato de sódio (2 x 10 min) sendo em seguida realizada, durante 5 minutos, a reação de revelação imunoperoxidase com 3,3-diaminobenzidina (DAB/Sigma D5637 diluído em solução de água destilada, níquel sulfato amônio (NAS), acetato de sódio (0.2 M), cloreto de amônio e β -d-Glucose). Após esta reação foi acrescentada na solução anterior a Glucose oxidase até os cortes obterem a cor marrom claro/púrpura. Para neutralizar esta reação, os

cortes foram submetidos a lavagens com acetato de sódio (2 x 10 min) e PBS (2 x 10 min). Os cortes foram montados de forma semelhante aos submetidos ao processo de imunohistoquímica contra a proteína Copeptina.

5.3.4.3 Análise quantitativa da marcação de neurônios

A identificação, delimitação e quantificação das imunomarcações para copeptina e HMGB1 nos núcleos SON e PVN foram realizadas a partir de fotomicrografias adquiridas por meio de uma câmara digital (Samsung SHC-410NAD) adaptada a um microscópio (Olympus BX50), e um computador (Funtech). As aquisições das imagens foram realizadas com magnificação de 40 e 100 com o auxílio do software TV Turner Application e Motic Image Plus 2.0.

Para a identificação e delimitação das áreas estudadas foi utilizado como referência o Atlas Estereotático de Ratos (Paxinos; Watson, 2005). A análise dos neurônios copeptinérgicos do PVN foi realizada a partir de marcações evidentes nos níveis de bregma -1,80 e -1,92. A análise dos neurônios copeptinérgicos do SON foi realizada a partir de marcações evidentes nos níveis de bregma -1,08 e -1,32 (figuras 5 e 6). Neste mesmo nível de bregma foi realizada a análise da HMGB1 no SON.

A intensidade das imunomarcações apresentadas pelos núcleos (SON e PVN) foram analisadas através do programa Image-Pro Plus 6.0. Primeiramente determinamos a área (mm²) de interesse do núcleo estudado e em seguida as marcações existentes dentro dessa área foram selecionadas e quantificadas. O software calculou a área das marcações e calculou a razão: área da marcação/área de interesse.

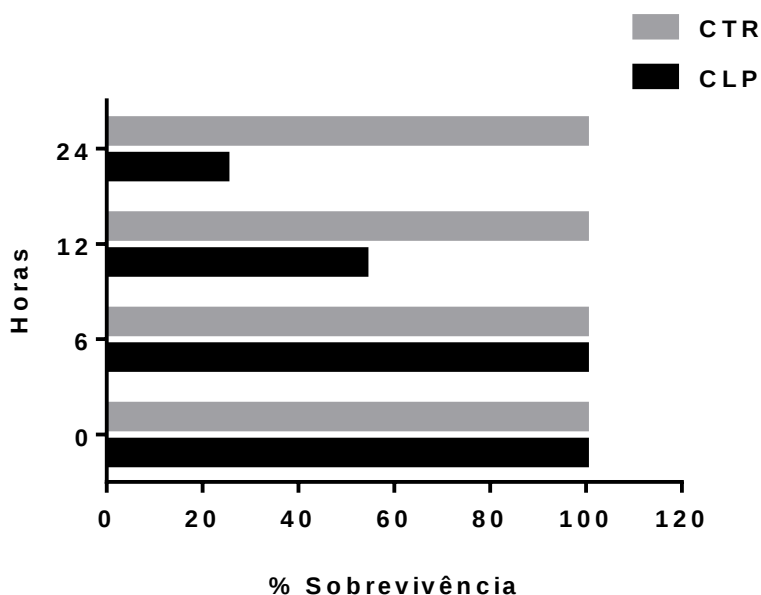
6 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) e foram analisados pelo teste de análise de variância de duas vias (Two-Way) ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni's Multipli Comparison. O nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ($p < 0.05$).

7 RESULTADOS

Inicialmente foram selecionados 48 animais para o experimento, dos quais vinte e quatro participaram do grupo CLP e vinte e quatro o grupo CTR. Cada um desses grupos foram subdivididos de acordo com o tempo de observação após a indução à sepse (0h, 6h, 12h e 24horas). A primeira etapa da pesquisa consistiu em determinar o percentual de sobrevivência em 24 horas. Como pode ser observado (figura 7), 25% dos animais submetidos ao CLP (subgrupo 24h) sobreviveram. Após analisarmos o gráfico, decidimos excluir o subgrupo 24h, visto que seria necessário sacrificar um número muito grande de animais para chegarmos ao nosso “n” experimental. No grupo (CLP – 12h), dos onze animais submetidos ao CLP, seis (55%) sobreviveram até as 12h e cinco morreram. Todos os animais (100%) dos grupos CTR (cirurgia simulada) sobreviveram. Entre os grupos CLP dos subgrupos 0 e 6 horas a sobrevivência foi de 100%.

Figura 7 – Percentual de sobrevivência dos animais CTR: controle; CLP: ligação e punção cecal em relação ao tempo de observação dos animais (0, 6, 12 e 24 h).



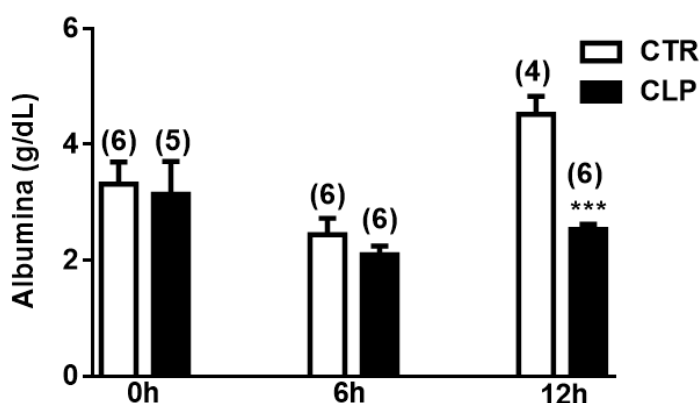
Fonte: A autora, 2020.

7.1 ANÁLISE DOS PARÂMETROS BIOQUÍMICOS

Dosagem de Albumina

No grupo 12h, foi verificada uma redução significativa nas concentrações da albumina de 44% ($p < 0,001$) (CLP *versus* CTR) (figura 8). Os animais CTR e CLP do subgrupo 0h apresentaram valores semelhantes da albumina.

Figura 8 – Concentrações séricas de Albumina. CTR: controle; CLP: ligação e punção cecal. O valor apresentado entre parênteses representa a quantidade de animais por grupo estudado. *** $p < 0,001$, CLP 12h *versus* CTR 12h. As barras representam a média $\pm$ EPM.



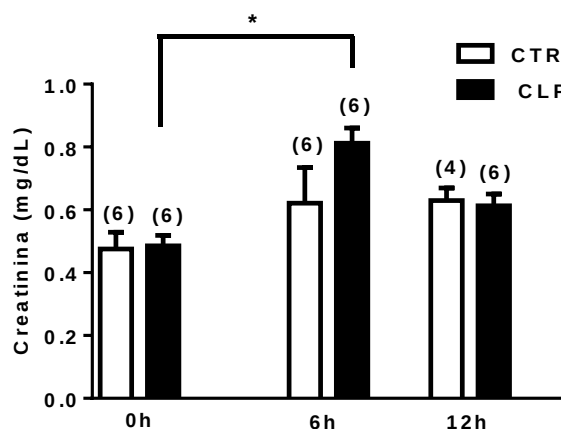
Fonte: A autora, 2020.

Dosagem de Creatinina

Analisando as concentrações de creatinina no grupo 0h, verifica-se uma semelhança entre os valores obtidos entre os subgrupos CTR e CLP. Mudanças significativas foram observadas quando o perfil temporal da sepse foi avaliado

(grupo CLP). Desta forma, os resultados mostram aumento significativo ($p<0,001$) da creatinina plasmática após 6h quando comparado com 0h (figura 9).

Figura 9 – Concentrações séricas de creatinina. CTR: controle; CLP: Ligação e punção cecal. O valor apresentado entre parênteses representa a quantidade de animais por grupo estudado. * $p<0,05$, CLP 0h *versus* CLP 6h. As barras representam a média $\pm$ EPM.

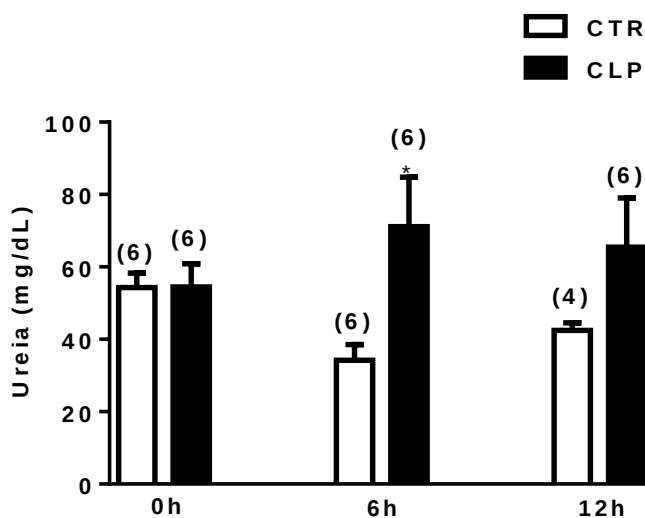


Fonte: A autora, 2020.

Dosagem de Ureia

Analisando as concentrações de ureia no grupo 0h, não verificamos diferença entre os valores obtidos de CTR e CLP. No tempo 6h verifica-se um aumento significativo ($p<0,05$) no grupo CLP comparado ao CTR. Quando observamos o grupo 12h, embora não seja verificada diferença estatística entre os CLP e CTR, encontramos um aumento nas concentrações de ureia de 54% (CLP 0h *versus* CLP 12h) (figura 10).

Figura 10 – Concentrações séricas de Ureia. CTR: controle; CLP: ligação e punção cecal. O valor apresentado entre parênteses representa a quantidade de animais por grupo estudado. * $p < 0,05$, CLP 6h *versus* CTR 6h. As barras representam a média $\pm$ EPM.

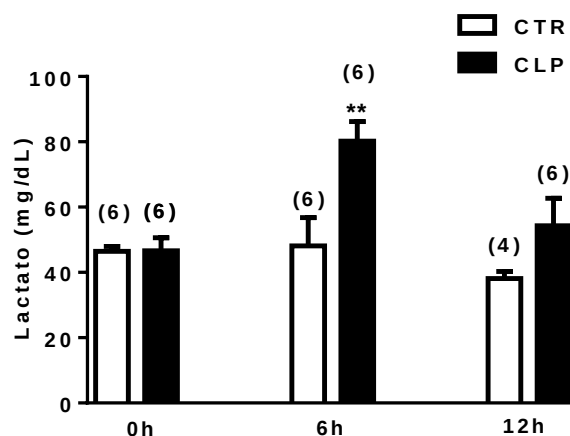


Fonte: A autora, 2020.

Dosagem de Lactato Plasmático

Como pode ser observado na figura 11, entre CTR e CLP, no grupo 0h, foram obtidos valores similares para o lactato plasmático. No tempo 6h verifica-se um aumento significativo em torno de 66% ($p < 0,01$) nas concentrações de lactato em CLP comparado ao CTR. Quando comparamos os valores de lactato no grupo 12h, apesar de não apresentar diferença estatisticamente significativa, podemos observar uma diferença de 42% maior para o grupo CLP.

Figura 11 – Concentrações plasmáticas de Lactato. CTR: controle; CLP: Ligação e punção cecal. O valor apresentado entre parênteses representa a quantidade de animais por grupo estudado. ** $p < 0,01$, CLP 6h *versus* CTR 6h. As barras representam a média $\pm$ EPM.



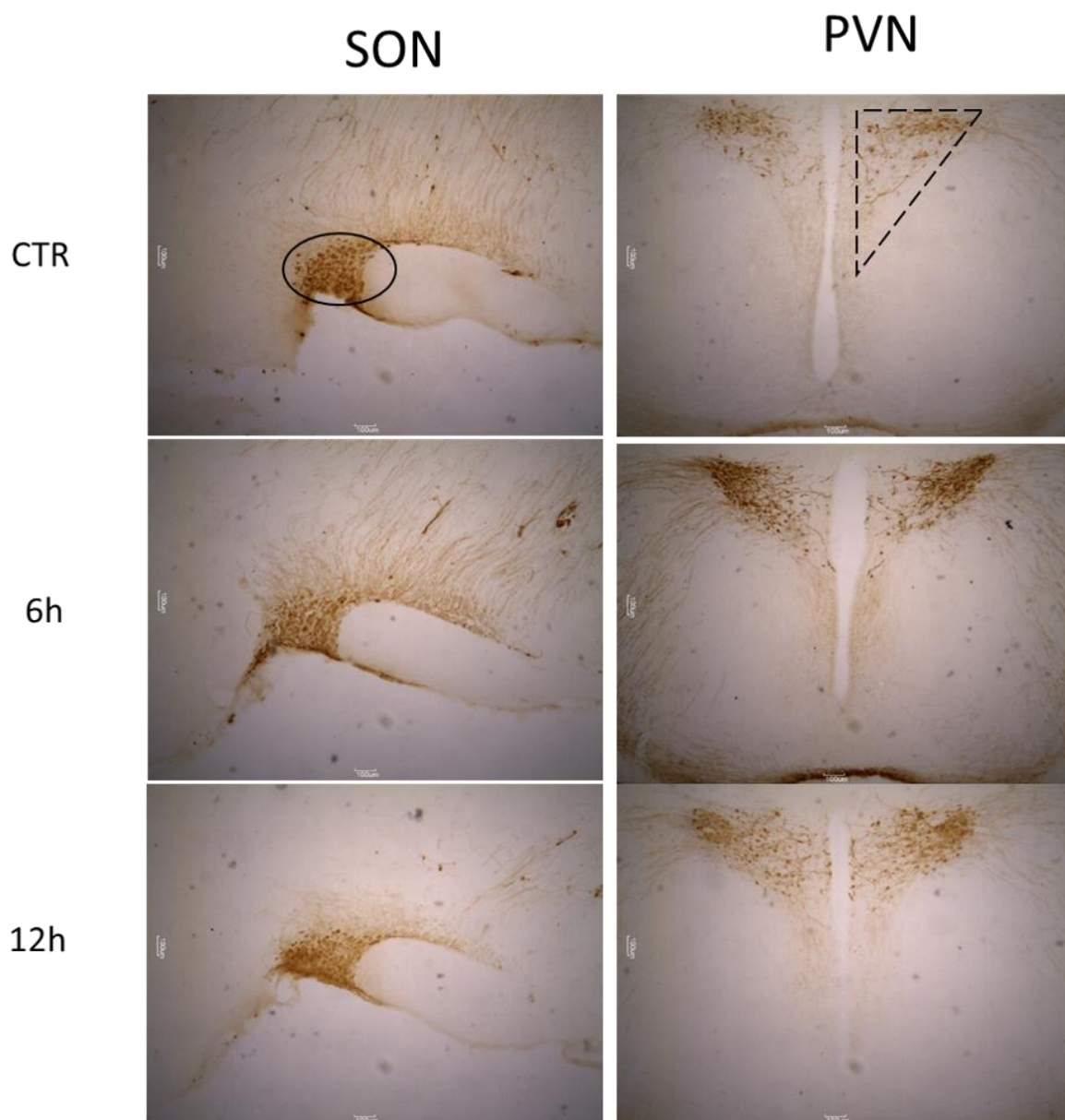
Fonte: A autora, 2020.

7.2 ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES PARA COPEPTINA

Analizando as fotomicrografias do SON e PVN (figura 12) de animais CTR e CLP, foram observadas imunomarcações positivas para coceptina (marcador indireto da AVP). Ao contrário da hipótese inicial, as imagens da imunohistoquímica evidenciam que nos tempos estudados (0, 6, 12 h) não houve depleção de AVP nos núcleos (SON e PVN), o que sugere não haver comprometimento a nível de síntese do peptídeo.

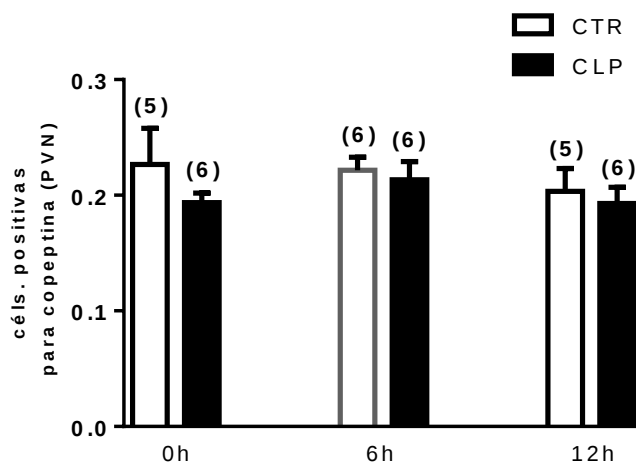
Entre os CTR e CLP, não foram encontradas diferenças na quantificação das imunomarcações de coceptina nos PVNs nos tempos estudados (figura 13). Analisando a expressão dos neurônios magnocelulares do SON, percebe-se que em 6h foi observado um aumento na expressão da coceptina no CTR e no CLP (figura 14). * $p < 0,05$; CTR 6h *versus* CTR 0h ** $p < 0,01$, CLP 6h *versus* CLP 0h.

Figura 12 – Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade para copeptina em secções coronais do SON (núcleo supraóptico) e PVN (núcleo paraventricular) de animais CTR (controle) e CLP (ligadura e punção cecal) (CLP 6h e CLP 12h). As linhas tracejadas demarcam a área do PVN e a linha contínua circunscreve o SON. As imagens foram obtidas por microscópio óptico. Magnificação de 40x. Escala: 100µm.



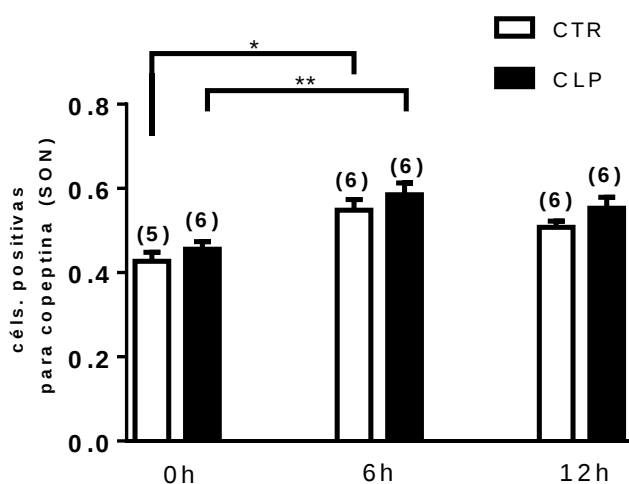
Fonte: A autora, 2020.

Figura 13 – Marcações imunorreativas para coceptina nos núcleos paraventriculares (PVN). CTR: controle; CLP: Ligação e punção cecal. O valor apresentado entre parênteses representa a quantidade de animais por grupo estudado. Os dados estão expressos em média (média $\pm$ EPM).



Fonte: A autora, 2020.

Figura 14 – Marcações imunorreativas para coceptina nos núcleos supraópticos (SON). CTR: controle; CLP: Ligação e punção cecal. O valor apresentado entre parênteses representa a quantidade de animais por grupo estudado. * $p < 0,05$; CTR 6h versus CTR 0h ** $p < 0,01$, CLP 6h versus CLP 0h. Os dados estão expressos em média (média $\pm$ EPM).



Fonte: A autora, 2020.

7.3 ANÁLISE DAS IMUNOMARCAÇÕES PARA HMGB1

Ao avaliarmos as imunomarcações para HMGB1 do SON de animais CTR e CLP, não foram encontradas diferenças entre os tempos estudados (0 e 6h) (figura 16). Entre os CTR e CLP, não foram encontradas diferenças na quantificação das imunomarcações de HMGB1 nos SONs nos tempos estudados (figura 15).

Figura 15 – Fotomicrografias ilustrando a imunorreatividade para HMGB1 em secções coronais do SON (núcleo supraóptico) de animais CTR (controle) e CLP (ligadura e punção cecal). As imagens foram obtidas por microscópio óptico. Magnificação de 100x. Escala: 100µm.

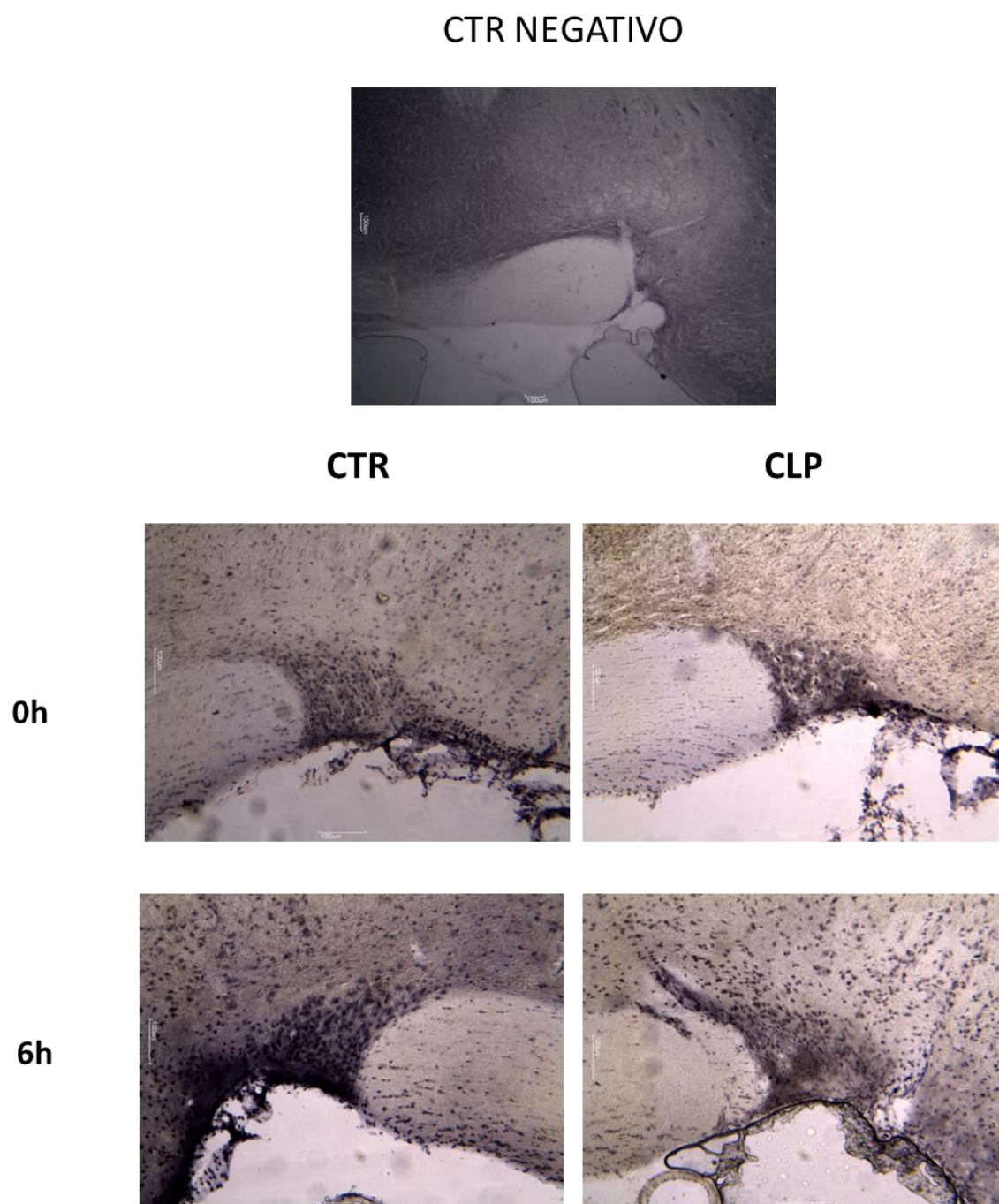
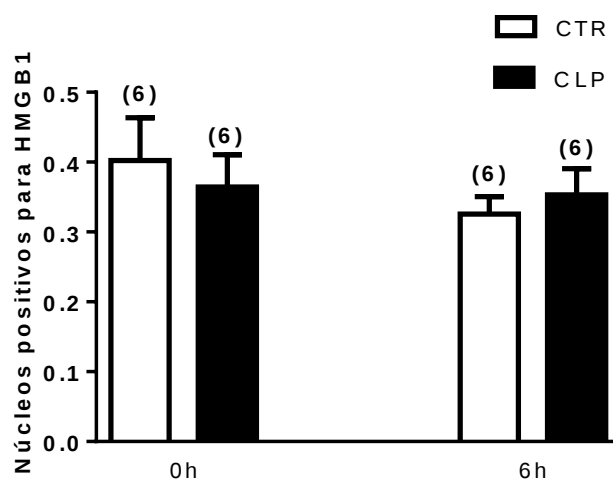


Figura 16 – Marcações imunorreativas para HMGB1 nos núcleos supraópticos (SON). CTR: controle; CLP: Ligação e punção cecal. O valor apresentado entre parênteses representa a quantidade de animais por grupo estudado. Os dados estão expressos em média (média $\pm$ EPM).



Fonte: A autora, 2020.

8 DISCUSSÃO

A sepse continua sendo um desafio clínico prevalente, pois sua fisiopatologia é complexa e envolve múltiplos aspectos da interação entre os microrganismos infectantes e o hospedeiro.

Para investigar os complexos mecanismos moleculares da sepse, vários modelos experimentais foram desenvolvidos, sendo o mais utilizado o modelo de CLP. Ele é caracterizado pela sua simplicidade, reprodutibilidade e por proporcionar o controle do grau de contaminação bacteriana, através da escolha do calibre da agulha e do número de perfurações realizadas no ceco (HUBBARD; CHOUDHRY; SCHWACHA; KERBY *et al.*, 2005). Neste modelo, a sepse é originária de um foco infeccioso polimicrobiano dentro da cavidade abdominal, seguido de translocação bacteriana no compartimento sanguíneo, o que desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). Após a realização do CLP no animal, são produzidas respostas imunes, hemodinâmicas e bioquímicas semelhantes à sepse humana (WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980).

8.1 PERCENTUAL DE SOBREVIVÊNCIA

Neste trabalho os animais submetidos ao CLP apresentaram os sintomas descritos para sepse, tais como: letargia, pieloereção e secreção na área ocular, enquanto os animais do grupo controle permaneceram ativos nas gaiolas. A taxa de sobrevivência no grupo CLP-12h foi de 55%. Um percentual de sobrevivência em torno de 30% foi observado no grupo CLP-24h. Côrrea e cols. utilizaram o modelo de CLP, no qual eles realizaram vinte perfurações com agulha calibre 16G e encontraram uma taxa de sobrevivência em 24h (20%) Tendo em vista a baixa taxa de sobrevivência observada no presente estudo pode-se inferir que se trata de um modelo de sepse agressiva que se assemelha a trabalhos previamente descritos (CORREA; PANCOTO; DE OLIVEIRA-PELEGRIN; CARNIO *et al.*, 2007). Ademais a mortalidade encontrada neste estudo em 12h é similar a observada na clínica (50-

60%) em decorrência do choque séptico, tornando o modelo de CLP com duas perfurações, adequado para o desenvolvimento do estudo (MARTIN; BRUNKHORST; JANES; REINHART *et al.*, 2009).

8.2 DADOS BIOMIQUÍMICOS

Pacientes com infecções graves, grandes traumas ou doenças críticas frequentemente desenvolvem sinais clínicos e bioquímicos de disfunção de múltiplos órgãos, ainda que os órgãos afetados possam não ter sido diretamente danificados pelo insulto original (SINGER; DE SANTIS; VITALE; JEFFCOATE, 2004). Durante a sepse, a liberação de mediadores inflamatórios por células imunes inatas resultam na ativação da coagulação, vasodilatação, vazamento endotelial, rolagem e extravasamento de neutrófilos e mediadores inflamatórios para o espaço extravascular (ANGUS; VAN DER POLL, 2013).

Os animais do subgrupo 12h que foram submetidos ao CLP, apresentaram uma redução nas concentrações de albumina quando comparados aos animais CTR do mesmo subgrupo. No estudo de Fleck *et al.*, foram evidenciados resultados semelhantes aos obtidos neste estudo, pois as concentrações de albumina estavam reduzidas entre os pacientes com sepse (FLECK; HAWKER; WALLACE; RAINES *et al.*, 1985). É importante ressaltar o impacto clínico da hipoalbuminemia, pois ela está associada a maiores taxas de mortalidade. Reinhardt *et al.*, relataram mortalidade de 25% após trinta dias de uma concentração sérica de albumina menor que 34g/l, e a mortalidade aumentou para 62% quando a concentração caiu para 20g/l durante a hospitalização (FINFER; BELLOMO; MCEVOY; LO *et al.*, 2006; REINHARDT; MYSCOFSKI; WILKENS; DOBRIN *et al.*, 1980).

Níveis alterados de creatinina e ureia são frequentemente encontrados em pacientes com sepse, visto que, mudanças nas concentrações plasmáticas é uma das características da disfunção renal e/ou hipoperfusão tecidual (LIAW; CHEN; LAI; CHEN *et al.*, 2005). Ao analisar o perfil temporal da sepse em nosso estudo, verificamos que em 6h após o CLP temos aumento nas concentrações plasmáticas de creatinina e de ureia. Resultado semelhante foi encontrado no estudo de Pinto *et*

al., no qual os ratos submetidos ao CLP apresentaram valores de creatinina e ureia superiores aos encontrados nos animais controle. Neste mesmo estudo, também foi verificado que a depuração de creatinina no grupo CLP estava diminuída, confirmando a ocorrência de disfunção renal induzida por sepse. Portanto, os resultados de ureia e creatinina sugerem que nos tempos estudados existe disfunção renal.

Embora não tenha apresentado significado estatístico, em 12h houve uma redução nas concentrações de creatinina, apresentando um outro perfil para creatinina como descritos por alguns autores (WELLS; LIPMAN, 1997); (DOI; YUEN; EISNER; HU *et al.*, 2009); (LEELAHAVANICHKUL; SOUZA; STREET; HSU *et al.*, 2014). Singer e cols. descreveram que a sepse pode reduzir a produção de energia e a taxa metabólica por causa da liberação de mediadores hormonais e inflamatórios, levando a redução da produção muscular de creatinina (SINGER; DE SANTIS; VITALE; JEFFCOATE, 2004). No desenvolvimento da sepse ocorre falha na circulação e redução da perfusão capilar microvascular, que pode reduzir a liberação de creatinina muscular, conversão de creatina/creatinina no fígado e/ou liberação na circulação (PIPER; PITT-HYDE; LI; SIBBALD *et al.*, 1996).

No que concerne as concentrações de lactato, observou-se um aumento significativo em suas concentrações no grupo séptico em 6h. Tendo em vista que as concentrações de creatinina e ureia, assim como o lactato aumentaram simultaneamente, podemos inferir que já há a presença de disfunção orgânica.

O lactato tem se mostrado um biomarcador valioso para prognóstico da sepse, já que níveis elevados têm sido associados com alta mortalidade (HOWELL; DONNINO; CLARDY; TALMOR *et al.*, 2007; MIKKELSEN; MILTIADES; GAIESKI; GOYAL *et al.*, 2009; SHAPIRO; HOWELL; TALMOR; NATHANSON *et al.*, 2005). Neste sentido, um estudo avaliou 86 pacientes com choque séptico e verificou que a mortalidade hospitalar aguda foi significativamente maior em pacientes com nível sérico mais alto de lactato do que naqueles com níveis menores (LEE; KIM; KIM; JEONG *et al.*, 2015). Na hipóxia tecidual, o lactato é superproduzido pelo aumento da glicólise anaeróbica. A depuração do lactato ocorre tipicamente no fígado (60%), seguida pelo rim (30%) e, em menor grau, por outros órgãos (coração e músculo esquelético). A depuração do lactato não pode superar a produção de lactato e pode

piorar durante o estado crítico. O estado de choque séptico com disfunção hepática e lesão renal aguda eleva os níveis de lactato devido à diminuição da depuração de lactato (LEE; KIM; KIM; JEONG *et al.*, 2015).

8.3 SEPSE E VASOPRESSINA

A sepse é uma resposta inflamatória sistêmica resultante de uma interação complexa entre hospedeiro e agente infeccioso (BONE; BALK; CERRA; DELLINGER *et al.*, 1992; VINCENT; KORKUT, 2008) levando à produção e liberação excessivas de mediadores inflamatórios que podem direta ou indiretamente ativar o SNC, causando encefalopatia e afetando certas funções do corpo, incluindo a secreção hormonal (BERG; MOLLER; BAILEY, 2011; KOVACS, 2002; MCCANN; KIMURA; KARANTH; YU *et al.*, 2000; SEMMLER; OKULLA; SASTRE; DUMITRESCU-OZIMEK *et al.*, 2005; SHARSHAR; ANNANE; DE LA GRANDMAISON; BROULAND *et al.*, 2004).

Entre as alterações neuroendócrinas que ocorrem durante a sepse, a secreção bifásica da secreção de AVP tem sido extensivamente estudada e já foi descrita em humanos e modelos animais (LANDRY; LEVIN; GALLANT; ASHTON *et al.*, 1997; OLIVEIRA-PELEGRIN; RAVANELLI; BRANCO; ROCHA, 2009; SHARSHAR; BLANCHARD; PAILLARD; RAPHAEL *et al.*, 2003). Na fase inicial da sepse são observadas altas concentrações plasmáticas de AVP. No decorrer desse processo fisiopatológico, apesar da queda da volemia e da pressão arterial, a concentração de AVP permanece em valores basais (também denominada de secreção inadequada de AVP), o que contribui para hipotensão e choque cardiocirculatório. (CORREA; PANCOTO; DE OLIVEIRA-PELEGRIN; CARNIO *et al.*, 2007; GIUSTI-PAIVA; DE CASTRO; ANTUNES-RODRIGUES; CARNIO, 2002; KASTING; HOLLAND; PINTO, 1985; LANDRY; LEVIN; GALLANT; ASHTON *et al.*, 1997; SHARSHAR; BLANCHARD; PAILLARD; RAPHAEL *et al.*, 2003).

Uma hipótese para a secreção inadequada de AVP na fase tardia da sepse seria a redução da expressão gênica, que resultaria numa menor produção de AVP (OLIVEIRA-PELEGRIN; DE AZEVEDO; YAO; MURPHY *et al.*, 2010). Diante disso,

um dos objetivos desse trabalho foi investigar se durante o desenvolvimento da sepse experimental, a expressão proteica de AVP estaria comprometida.

Nesse estudo, nos diferentes tempos estudados (0, 6, 12h) não houve alterações na imunomarcção da coceptina (marcador indireto de AVP) no PVN. Resultado semelhante foi obtido por Sonnevile et.al, ao estudar o PVN de pacientes que morreram de choque séptico e não-séptico (SONNEVILLE; GUIDOUX; BARRETT; VILTART *et al.*, 2010). A imunohistoquímica do PVN não revelou diferença na expressão proteica de AVP entre os dois grupos. Deste modo, pode-se sugerir que a sepse não foi capaz de promover alteração na expressão proteica de AVP no PVN.

Ao analisar as imunomarcções no SON, foi visto que em 6h ocorreu um aumento significativo da expressão proteica de coceptina entre CTR 0 e 6h. O aumento de AVP apresentado pelo grupo CTR pode ser atribuído ao estresse da manipulação, ao dano cecal, e à ativação de osmorreceptores viscerais. Durante uma cirurgia abdominal, sem alterações de pressão sanguínea e osmolalidade, os estímulos nervosos gerados pela manipulação do peritônio são fatores importantes para o aumento da secreção de AVP, por via sistema autônomo (MELVILLE; FORSLING; FRIZIS; LEQUESNE, 1985)

De forma similar ao grupo controle os dados mostram um aumento significativo da imunomarcção para coceptina no SON entre os grupos CLP 0 e 6h, o que sugeririam um efeito temporal, contudo, entre os animais CLP e CTR 0 e 6h apresentam valores similares e, portanto, esse aumento foi decorrente do “estresse” cirúrgico.

Resultados publicados previamente mostraram que não houve diferenças na expressão de RNAm de AVP entre SON e PVN entre os grupos choque séptico experimental, mas revelou diferenças no conteúdo hormonal. O choque séptico foi associado com uma diminuição da expressão proteica de AVP na hipófise posterior e SON, e aumento da expressão proteica de AVP no PVN. Os autores sugeriram que a tradução do RNAm de AVP e/ou o transporte do peptídeo podem ser diferentemente regulados pelos neurônios magnocelulares do SON e PVN (SONNEVILLE; GUIDOUX; BARRETT; VILTART *et al.*, 2010).

Esses dados complementam os achados de Oliveira-Pelegrin e cols., no qual eles compararam alterações nas concentrações plasmáticas de AVP com mudanças encontradas no hipotálamo de animais submetidos ao CLP. Em ratos CLP, 24h após o estímulo, foi observado um aumento do conteúdo de AVP no SON e PVN, porém esse aumento não foi visto na hipófise posterior, sugerindo diminuição do transporte axonal (OLIVEIRA-PELEGRIN; RAVANELLI; BRANCO; ROCHA, 2009).

Na fase tardia da sepse, as concentrações de AVP assumem valores basais apesar da hipotensão persistente (CORREA; PANCOTO; DE OLIVEIRA-PELEGRIN; CARNIO *et al.*, 2007; LANDRY; LEVIN; GALLANT; ASHTON *et al.*, 1997; SHARSHAR; BLANCHARD; PAILLARD; RAPHAEL *et al.*, 2003). As causas dessa queda hormonal, apesar da hipotensão, não são totalmente claras.

Muitos estudos relatam um importante papel da interleucina-1 (IL-1), uma citocina pró-inflamatória, nas alterações neuroendócrinas associadas à sepse. Na fase tardia da sepse, as concentrações de IL-1, tanto periférica como central, estão aumentadas (DINARELLO, 2011; WAHAB; ATIKA; OLIVEIRA-PELEGRIN; ROCHA, 2013). Foi demonstrado que o bloqueio do receptor da IL-1 feito através da administração central de IL-1ra (antagonista do receptor) pode reverter muitas das respostas fisiopatológicas que ocorrem durante a sepse, entre elas a secreção inadequada de AVP durante a fase tardia (WAHAB; TAZINAFO; CARNIO; AGUILA *et al.*, 2015), sugerindo uma relação entre IL-1 e as concentrações de AVP.

Outro neuromodulador importante na regulação de AVP é o óxido nítrico (NO) (WAHAB; ATIKA; OLIVEIRA-PELEGRIN; ROCHA, 2013). A produção de NO é catalisada pela enzima NO sintase (NOS), sendo sintetizado por três isoformas de NOS: NOS endotelial, NOS neuronal e NOS induzida (NOSi) (WONG; BILLIAR, 1995). Na sepse ocorre uma produção excessiva de NO decorrente do aumento da expressão da NOSi. Corrêa e cols. demonstraram que no modelo de CLP há um aumento de AVP 6h após a cirurgia e retorno aos valores basais 24h depois. O bloqueio da NOSi com aminoguanidina, atenuou o aumento da concentração plasmática de AVP observado 6h após o CLP, contudo, não modificou a concentração de AVP em 24h (CORREA; PANCOTO; DE OLIVEIRA-PELEGRIN; CARNIO *et al.*, 2007). A hiperprodução do NO proveniente da NOSi pode contribuir

para várias alterações neuroendócrinas, porém não parece ter papel significativo no padrão bifásico de AVP.

Trabalhos postulam sobre um possível comprometimento do sistema hipotálamo-neurohipofisário durante a sepse (DEUTSCHMAN; RAJ; MCGUIRE; KELZ, 2013) (GIUSTI-PAIVA; BRIAN SANTIAGO, 2010) (YILMAN; ERENLER; BAYDIN, 2015). Nesse sentido, estudos prévios demonstraram comprometimento na ativação de neurônios magnocelulares, aumento de estresse oxidativo, que poderiam resultar em apoptose dos neurônios produtores de AVP (CORREA; PANCOTO; DE OLIVEIRA-PELEGRIN; CARNIO *et al.*, 2007; OLIVEIRA-PELEGRIN; BASSO; ROCHA, 2014; OLIVEIRA-PELEGRIN; BASSO; SOARES; MARTINEZ *et al.*, 2013). Neurônios em apoptose liberam seu conteúdo citosólico e nuclear podendo desencadear processos de morte celular das células vizinhas.

8.4 SEPSE E HMGB1

Em um contexto de lesão celular, ou quando a célula é exposta a agentes inflamatórios, a HMGB1 sai dos domínios do núcleo e ganha o ambiente extracelular (LI; YU; YANG, 2015). A HMGB1 então, liga-se a receptores como RAGE (do inglês, *Receptor for Advanced Glycation Endproduct*), TLR2 (do inglês, *Toll-like Receptor-2*) e TLR4 (do inglês, *Toll-like Receptor-4*). A ativação desses receptores promove ativação do NF- κ B (do inglês, *Nuclear Factor kappa B*) conhecido por amplificar a resposta pro-inflamatória das citocinas (HUNG; FANG; WANG; CHENG *et al.*, 2017).

No estudo de Wang *et al.*, os animais foram estimulados com LPS e após 8h, eles mostraram aumento nos níveis plasmáticos da HMGB1. Ao ser administrado um anticorpo contra a HMGB1 foi visto uma diminuição de 30% na letalidade, demonstrando que o aumento da HMGB-1 está associado com a severidade da sepse (WANG; WARD; SAMA, 2009).

Dessa forma objetivamos investigar a expressão da HMGB1 durante a sepse nos SONs. Nesse sentido, a hipótese seria que a sepse determinaria um aumento da expressão da HMGB1 levando ao desencadeamento do processo inflamatório e/ou apoptose e consequentemente possível comprometimento da síntese,

empacotamento e transporte de AVP. Li e cols. demonstraram que após o CLP, a morfologia cortical foi alterada e a expressão de HMGB1 foi aumentada nos núcleos dos neurônios corticais. Após o CLP, o HMGB1 foi translocado para o citoplasma, onde atuou como uma citocina pró-inflamatória tardia. Em contrapartida, após a administração do piruvato de etila (droga utilizada para inibir a liberação de HMGB-1) houve redução de dano cerebral associado com menores níveis de HMGB-1 citosólico, sugerindo que a HMGB-1 é mediadora da resposta inflamatória (LI; LI; QU; HUANG *et al.*, 2017). Ao contrário do observado por Li e cols., o presente estudo não encontrou diferença na imunomarcagem para HMGB1 entre animais CLP e CTR.

Em suma, nossos resultados mostram que os animais submetidos ao CLP não apresentam alteração na produção de coceptina (marcador indireto de AVP), bem como não encontramos diferença na expressão da HMGB-1 nos núcleos SONS em 6h.

9 CONCLUSÃO

Nos períodos (0, 6 e 12h) estudados em nosso modelo experimental, não encontramos evidências de que a expressão proteica de coceptina esteja comprometida durante a sepse. Do mesmo modo, ao analisarmos os SON não foram observadas modificações na expressão de HMGB1 sugerindo que esta proteína não está envolvida na modulação de AVP.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, E. New definitions for sepsis and septic shock: continuing evolution but with much still to be done. **Jama**, 315, n. 8, p. 757-759, 2016.
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe sepsis and septic shock. **N Engl J Med**, 369, n. 9, p. 840-851, Aug 29 2013.
- ANNANE, D.; TRABOLD, F.; SHARSHAR, T.; JARRIN, I. *et al.* Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach. **Am J Respir Crit Care Med**, 160, n. 2, p. 458-465, Aug 1999.
- ANTUNES-RODRIGUES, J.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L. L.; VALENCA, M. M. *et al.* Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, 84, n. 1, p. 169-208, Jan 2004.
- ARMSTRONG, W. E. Morphological and electrophysiological classification of hypothalamic supraoptic neurons. **Prog Neurobiol**, 47, n. 4-5, p. 291-339, Nov-Dec 1995.
- BAUMANN, G.; DINGMAN, J. F. Distribution, blood transport, and degradation of antidiuretic hormone in man. **J Clin Invest**, 57, n. 5, p. 1109-1116, May 1976.
- BERG, R. M.; MOLLER, K.; BAILEY, D. M. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. **J Cereb Blood Flow Metab**, 31, n. 7, p. 1532-1544, Jul 2011.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **J Leukoc Biol**, 81, n. 1, p. 1-5, Jan 2007.
- BONE, R. C.; BALK, R. A.; CERRA, F. B.; DELLINGER, R. P. *et al.* Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, 101, n. 6, p. 1644-1655, Jun 1992.
- BROWNSTEIN, M. J.; RUSSELL, J. T.; GAINER, H. Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones. **Science**, 207, n. 4429, p. 373-378, Jan 25 1980.
- BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nature reviews Drug discovery**, 4, n. 10, p. 854-865, 2005.

BURGDORFF, A. M.; BUCHER, M.; SCHUMANN, J. Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms. **J Int Med Res**, 46, n. 4, p. 1303-1310, Apr 2018.

CORREA, P. B.; PANCOTO, J. A.; DE OLIVEIRA-PELEGRI, G. R.; CARNIO, E. C. *et al.* Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, 183, n. 1-2, p. 17-25, Feb 2007.

DANESE, S.; VETRANO, S.; ZHANG, L.; POPLIS, V. A. *et al.* The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. **Blood**, 115, n. 6, p. 1121-1130, Feb 11 2010.

DARWISH, I.; LILES, W. C. Emerging therapeutic strategies to prevent infection-related microvascular endothelial activation and dysfunction. **Virulence**, 4, n. 6, p. 572-582, Aug 15 2013.

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

DEUTSCHMAN, C. S.; RAJ, N. R.; MCGUIRE, E. O.; KELZ, M. B. Orexinergic activity modulates altered vital signs and pituitary hormone secretion in experimental sepsis. **Crit Care Med**, 41, n. 11, p. e368-375, Nov 2013.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, 117, n. 14, p. 3720-3732, Apr 7 2011.

DOI, K.; YUEN, P. S.; EISNER, C.; HU, X. *et al.* Reduced production of creatinine limits its use as marker of kidney injury in sepsis. **J Am Soc Nephrol**, 20, n. 6, p. 1217-1221, Jun 2009.

DUNN, F. L.; BRENNAN, T. J.; NELSON, A. E.; ROBERTSON, G. L. The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. **The Journal of clinical investigation**, 52, n. 12, p. 3212-3219, 1973.

FIELDMAN, N. R.; FORSLING, M. L.; LE QUESNE, L. P. The effect of vasopressin on solute and water excretion during and after surgical operations. **Ann Surg**, 201, n. 3, p. 383-390, Mar 1985.

FINFER, S.; BELLOMO, R.; MCEVOY, S.; LO, S. K. *et al.* Effect of baseline serum albumin concentration on outcome of resuscitation with albumin or saline in patients in intensive care units: analysis of data from the saline versus albumin fluid evaluation (SAFE) study. **Bmj**, 333, n. 7577, p. 1044, Nov 18 2006.

FLECK, A.; HAWKER, F.; WALLACE, P.; RAINES, G. *et al.* Increased vascular permeability: a major cause of hypoalbuminaemia in disease and injury. **The Lancet**, 325, n. 8432, p. 781-784, 1985.

GARDELLA, S.; ANDREI, C.; FERRERA, D.; LOTTI, L. V. *et al.* The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. **EMBO reports**, 3, n. 10, p. 995-1001, 2002.

GHEORGHITA, V.; BARBU, A. E.; GHEORGHIU, M. L.; CARUNTU, F. A. Endocrine dysfunction in sepsis: a beneficial or deleterious host response? **Germes**, 5, n. 1, p. 17-25, Mar 2015.

GIUSTI-PAIVA, A.; BRIAN SANTIAGO, M. Neurohypophyseal dysfunction during septic shock. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Immune, Endocrine & Metabolic Disorders)**, 10, n. 3, p. 247-251, 2010.

GIUSTI-PAIVA, A.; DE CASTRO, M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; CARNIO, E. C. Inducible nitric oxide synthase pathway in the central nervous system and vasopressin release during experimental septic shock. **Crit Care Med**, 30, n. 6, p. 1306-1310, Jun 2002.

GIUSTI-PAIVA, A.; RUGINSK, S. G.; DE CASTRO, M.; ELIAS, L. L. K. *et al.* Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. **Neuroscience letters**, 346, n. 1-2, p. 21-24, 2003.

GOODWIN, G. H.; SANDERS, C.; JOHNS, E. W. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. **Eur J Biochem**, 38, n. 1, p. 14-19, Sep 21 1973.

HODGIN, K. E.; MOSS, M. The epidemiology of sepsis. **Curr Pharm Des**, 14, n. 19, p. 1833-1839, 2008.

HOWELL, M. D.; DONNINO, M.; CLARDY, P.; TALMOR, D. *et al.* Occult hypoperfusion and mortality in patients with suspected infection. **Intensive care medicine**, 33, n. 11, p. 1892-1899, 2007.

HUBBARD, W. J.; CHOUDHRY, M.; SCHWACHA, M. G.; KERBY, J. D. *et al.* Cecal ligation and puncture. **Shock**, 24 Suppl 1, p. 52-57, Dec 2005.

HUNG, Y. L.; FANG, S. H.; WANG, S. C.; CHENG, W. C. *et al.* Corylin protects LPS-induced sepsis and attenuates LPS-induced inflammatory response. **Sci Rep**, 7, p. 46299, Apr 11 2017.

ISHII, K. J.; KOYAMA, S.; NAKAGAWA, A.; COBAN, C. *et al.* Host innate immune receptors and beyond: making sense of microbial infections. **Cell Host Microbe**, 3, n. 6, p. 352-363, Jun 12 2008.

KANG, R.; CHEN, R.; ZHANG, Q.; HOU, W. *et al.* HMGB1 in health and disease. **Mol Aspects Med**, 40, p. 1-116, Dec 2014.

KASTING, J. F.; HOLLAND, H. D.; PINTO, J. P. Oxidant abundances in rainwater and the evolution of atmospheric oxygen. **J Geophys Res**, 90, n. D6, p. 10497-10510, Oct 20 1985.

KOVACS, K. J. Neurohypophyseal hormones in the integration of physiological responses to immune challenges. **Prog Brain Res**, 139, p. 127-146, 2002.

LAND, H.; SCHUTZ, G.; SCHMALE, H.; RICHTER, D. Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin-neurophysin II precursor. **Nature**, 295, n. 5847, p. 299-303, Jan 28 1982.

LANDRY, D. W.; LEVIN, H. R.; GALLANT, E. M.; ASHTON, R. C., Jr. *et al.* Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. **Circulation**, 95, n. 5, p. 1122-1125, Mar 4 1997.

LEE, S. M.; KIM, S. E.; KIM, E. B.; JEONG, H. J. *et al.* Lactate Clearance and Vasopressor Seem to Be Predictors for Mortality in Severe Sepsis Patients with Lactic Acidosis Supplementing Sodium Bicarbonate: A Retrospective Analysis. **PLoS One**, 10, n. 12, p. e0145181, 2015.

LEELAHAVANICHKUL, A.; SOUZA, A. C.; STREET, J. M.; HSU, V. *et al.* Comparison of serum creatinine and serum cystatin C as biomarkers to detect sepsis-induced acute kidney injury and to predict mortality in CD-1 mice. **Am J Physiol Renal Physiol**, 307, n. 8, p. F939-948, Oct 15 2014.

LEVI, M.; VAN DER POLL, T. Coagulation and sepsis. **Thromb Res**, 149, p. 38-44, Jan 2017.

LEVY, M. M.; FINK, M. P.; MARSHALL, J. C.; ABRAHAM, E. *et al.* 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Intensive Care Med**, 29, n. 4, p. 530-538, Apr 2003.

LI, Q.; YU, B.; YANG, P. Hypoxia-induced HMGB1 in wound tissues promotes the osteoblast cell proliferation via activating ERK/JNK signaling. **Int J Clin Exp Med**, 8, n. 9, p. 15087-15097, 2015.

LI, Y.; LI, X.; QU, Y.; HUANG, J. *et al.* Role of HMGB1 translocation to neuronal nucleus in rat model with septic brain injury. **Neurosci Lett**, 645, p. 90-96, Apr 3 2017.

LIAW, W. J.; CHEN, T. H.; LAI, Z. Z.; CHEN, S. J. *et al.* Effects of a membrane-permeable radical scavenger, Tempol, on intraperitoneal sepsis-induced organ injury in rats. **Shock**, 23, n. 1, p. 88-96, Jan 2005.

MACHADO, F. R.; CAVALCANTI, A. B.; BOZZA, F. A.; FERREIRA, E. M. *et al.* The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study. **Lancet Infect Dis**, 17, n. 11, p. 1180-1189, Nov 2017.

MARINI, J. J.; VINCENT, J.-L.; ANNANE, D. Critical care evidence—new directions. **Jama**, 313, n. 9, p. 893-894, 2015.

MARTIN, G.; BRUNKHORST, F. M.; JANES, J. M.; REINHART, K. *et al.* The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patient outcomes. **Critical care**, 13, n. 3, p. R103, 2009.

MAYBAUER, M. O.; MAYBAUER, D. M.; ENKHBAATAR, P.; TRABER, D. L. Physiology of the vasopressin receptors. **Best Pract Res Clin Anaesthesiol**, 22, n. 2, p. 253-263, Jun 2008.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, 5, n. 1, p. 4-11, 2014.

MCCANN, S. M.; KIMURA, M.; KARANTH, S.; YU, W. H. *et al.* The mechanism of action of cytokines to control the release of hypothalamic and pituitary hormones in infection. **Ann N Y Acad Sci**, 917, p. 4-18, 2000.

MCKINLEY, M. J.; BADOER, E.; VIVAS, L.; OLDFIELD, B. J. Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. **Brain Res Bull**, 37, n. 2, p. 131-137, 1995.

MCKINLEY, M. J.; BLAINE, E. H.; DENTON, D. A. Brain osmoreceptors, cerebrospinal fluid electrolyte composition and thirst. **Brain Res**, 70, n. 3, p. 532-537, Apr 26 1974.

MCKINLEY, M. J.; GERSTBERGER, R.; MATHAI, M. L.; OLDFIELD, B. J. *et al.* The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. **J Clin Neurosci**, 6, n. 4, p. 289-301, Jul 1999.

MECAWI ADE, S.; RUGINSK, S. G.; ELIAS, L. L.; VARANDA, W. A. *et al.* Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. **Compr Physiol**, 5, n. 3, p. 1465-1516, Jul 1 2015.

MELVILLE, R. J.; FORSLING, M. L.; FRIZIS, H. I.; LEQUESNE, L. P. Stimulus for vasopressin release during elective intra-abdominal operations. **Br J Surg**, 72, n. 12, p. 979-982, Dec 1985.

MIKKELSEN, M. E.; MILTIADES, A. N.; GAIESKI, D. F.; GOYAL, M. *et al.* Serum lactate is associated with mortality in severe sepsis independent of organ failure and shock. **Critical care medicine**, 37, n. 5, p. 1670-1677, 2009.

MORGENTHALER, N. G.; MULLER, B.; STRUCK, J.; BERGMANN, A. *et al.* Copeptin, a stable peptide of the arginine vasopressin precursor, is elevated in hemorrhagic and septic shock. **Shock**, 28, n. 2, p. 219-226, Aug 2007.

MORGENTHALER, N. G.; STRUCK, J.; ALONSO, C.; BERGMANN, A. Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin. **Clin Chem**, 52, n. 1, p. 112-119, Jan 2006.

MUTLU, G. M.; FACTOR, P. Role of vasopressin in the management of septic shock. **Intensive Care Med**, 30, n. 7, p. 1276-1291, Jul 2004.

NEMZEK, J. A.; XIAO, H.-Y.; MINARD, A. E.; BOLGOS, G. L. *et al.* Humane endpoints in shock research. **Shock**, 21, n. 1, p. 17-25, 2004.

O'CONNOR, K. A.; HANSEN, M. K.; PUGH, C. R.; DEAK, M. M. *et al.* Further characterization of high mobility group box 1 (HMGB1) as a proinflammatory cytokine: central nervous system effects. **Cytokine**, 24, n. 6, p. 254-265, 2003.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; BASSO, P. J.; ROCHA, M. J. Cellular bioenergetics changes in magnocellular neurons may affect copeptin expression in the late phase of sepsis. **J Neuroimmunol**, 267, n. 1-2, p. 28-34, Feb 15 2014.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; BASSO, P. J.; SOARES, A. S.; MARTINEZ, M. R. *et al.* Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, 258, n. 1-2, p. 10-16, May 15 2013.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; DE AZEVEDO, S. V.; YAO, S. T.; MURPHY, D. *et al.* Central NOS inhibition differentially affects vasopressin gene expression in hypothalamic nuclei in septic rats. **J Neuroimmunol**, 227, n. 1-2, p. 80-86, Oct 8 2010.

OLIVEIRA-PELEGRIN, G. R.; RAVANELLI, M. I.; BRANCO, L. G.; ROCHA, M. J. Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis. **Neuroimmunomodulation**, 16, n. 1, p. 45-53, Jan 2009.

OPAL, S. M.; VAN DER POLL, T. Endothelial barrier dysfunction in septic shock. **J Intern Med**, 277, n. 3, p. 277-293, Mar 2015.

PIPER, R. D.; PITT-HYDE, M.; LI, F.; SIBBALD, W. J. *et al.* Microcirculatory changes in rat skeletal muscle in sepsis. **Am J Respir Crit Care Med**, 154, n. 4 Pt 1, p. 931-937, Oct 1996.

REINHARDT, G. F.; MYSCOFSKI, J. W.; WILKENS, D. B.; DOBRIN, P. B. *et al.* Incidence and mortality of hypoalbuminemic patients in hospitalized veterans. **JPEN J Parenter Enteral Nutr**, 4, n. 4, p. 357-359, Jul-Aug 1980.

RHODES, A.; EVANS, L. E.; ALHAZZANI, W.; LEVY, M. M. *et al.* Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. **Intensive Care Med**, 43, n. 3, p. 304-377, Mar 2017.

RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nat Rev Immunol**, 8, n. 10, p. 776-787, Oct 2008.

RITTIRSCH, D.; HUBER-LANG, M. S.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc**, 4, n. 1, p. 31-36, 2009.

SALOMAO, R.; BRUNIALTI, M. K.; RAPOZO, M. M.; BAGGIO-ZAPPIA, G. L. *et al.* Bacterial sensing, cell signaling, and modulation of the immune response during sepsis. **Shock**, 38, n. 3, p. 227-242, Aug 2012.

SAWCHENKO, P.; SWANSON, L. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **Journal of Comparative Neurology**, 218, n. 2, p. 121-144, 1983.

SCHNAIDER, T. B.; SOUZA, C. d. Aspectos éticos da experimentação animal. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 53, n. 2, p. 278-285, 2003.

SEMMLER, A.; OKULLA, T.; SASTRE, M.; DUMITRESCU-OZIMEK, L. *et al.* Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. **J Chem Neuroanat**, 30, n. 2-3, p. 144-157, Oct 2005.

SEYMOUR, C. W.; LIU, V. X.; IWASHYNA, T. J.; BRUNKHORST, F. M. *et al.* Assessment of clinical criteria for sepsis: for the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, 315, n. 8, p. 762-774, 2016.

SHAPIRO, N. I.; HOWELL, M. D.; TALMOR, D.; NATHANSON, L. A. *et al.* Serum lactate as a predictor of mortality in emergency department patients with infection. **Annals of emergency medicine**, 45, n. 5, p. 524-528, 2005.

SHARE, L. Role of vasopressin in cardiovascular regulation. **Physiol Rev**, 68, n. 4, p. 1248-1284, Oct 1988.

SHARSHAR, T.; ANNANE, D.; DE LA GRANDMAISON, G. L.; BROULAND, J. P. *et al.* The neuropathology of septic shock. **Brain Pathol**, 14, n. 1, p. 21-33, Jan 2004.

SHARSHAR, T.; BLANCHARD, A.; PAILLARD, M.; RAPHAEL, J. C. *et al.* Circulating vasopressin levels in septic shock. **Crit Care Med**, 31, n. 6, p. 1752-1758, Jun 2003.

SHIMIZU, F.; KASAI, T.; TAKAMATA, A. Involvement of central angiotensin II type 1 receptors in LPS-induced systemic vasopressin release and blood pressure regulation in rats. **J Appl Physiol (1985)**, 106, n. 6, p. 1943-1948, Jun 2009.

SILVA, E.; PEDRO MDE, A.; SOGAYAR, A. C.; MOHOVIC, T. *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, 8, n. 4, p. R251-260, Aug 2004.

SINGER, M.; DE SANTIS, V.; VITALE, D.; JEFFCOATE, W. Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. **Lancet**, 364, n. 9433, p. 545-548, Aug 7-13 2004.

SINGER, M.; DEUTSCHMAN, C. S.; SEYMOUR, C. W.; SHANKAR-HARI, M. *et al.* The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). **Jama**, 315, n. 8, p. 801-810, Feb 23 2016.

SONNEVILLE, R.; GUIDOUX, C.; BARRETT, L.; VILTART, O. *et al.* Vasopressin synthesis by the magnocellular neurons is different in the supraoptic nucleus and in the paraventricular nucleus in human and experimental septic shock. **Brain Pathol**, 20, n. 3, p. 613-622, May 2010.

STEVENS, N. E.; CHAPMAN, M. J.; FRASER, C. K.; KUCHEL, T. R. *et al.* Therapeutic targeting of HMGB1 during experimental sepsis modulates the inflammatory cytokine profile to one associated with improved clinical outcomes. **Scientific reports**, 7, n. 1, p. 5850, 2017.

STRUCK, J.; MORGENTHALER, N. G.; BERGMANN, A. Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients. **Peptides**, 26, n. 12, p. 2500-2504, Dec 2005.

SWANSON, L.; SAWCHENKO, P. E. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Annual review of neuroscience**, 6, n. 1, p. 269-324, 1983.

TUON, L.; COMIM, C. M.; PETRONILHO, F.; BARICHELO, T. *et al.* Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. **Intensive Care Med**, 34, n. 9, p. 1724-1731, Sep 2008.

VAN DER POLL, T.; VAN DE VEERDONK, F. L.; SCICLUNA, B. P.; NETEA, M. G. The immunopathology of sepsis and potential therapeutic targets. **Nat Rev Immunol**, 17, n. 7, p. 407-420, Jul 2017.

VINCENT, J. L.; KORKUT, H. A. Defining sepsis. **Clin Chest Med**, 29, n. 4, p. 585-590, vii, Dec 2008.

WADE, C. E.; KEIL, L. C.; RAMSAY, D. J. Role of volume and osmolality in the control of plasma vasopressin in dehydrated dogs. **Neuroendocrinology**, 37, n. 5, p. 349-353, Nov 1983.

WAHAB, F.; ATIKA, B.; OLIVEIRA-PELEGRI, G. R.; ROCHA, M. J. Recent advances in the understanding of sepsis-induced alterations in the neuroendocrine system. **Endocr Metab Immune Disord Drug Targets**, 13, n. 4, p. 335-347, Dec 2013.

WAHAB, F.; TAZINAFO, L. F.; CARNIO, E. C.; AGUILA, F. A. *et al.* Interleukin-1 receptor antagonist decreases cerebrospinal fluid nitric oxide levels and increases vasopressin secretion in the late phase of sepsis in rats. **Endocrine**, 49, n. 1, p. 215-221, May 2015.

WANG, H.; WARD, M. F.; SAMA, A. E. Novel HMGB1-inhibiting therapeutic agents for experimental sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, 32, n. 4, p. 348, 2009.

WANG, H.; WARD, M. F.; SAMA, A. E. Targeting HMGB1 in the treatment of sepsis. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, 18, n. 3, p. 257-268, 2014.

WELLS, M.; LIPMAN, J. Measurements of glomerular filtration in the intensive care unit are only a rough guide to renal function. **S Afr J Surg**, 35, n. 1, p. 20-23, Feb 1997.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, 29, n. 2, p. 189-201, Aug 1980.

WONG, J. M.; BILLIAR, T. R. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. **Adv Pharmacol**, 34, p. 155-170, 1995.

YANG, H.; WANG, H.; ANDERSSON, U. Targeting inflammation driven by HMGB1. **Frontiers in Immunology**, 11, 2020.

YILMAN, M.; ERENLER, A. K.; BAYDIN, A. Copeptin: a diagnostic factor for critical patients. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 19, n. 16, p. 3030-3036, Aug 2015.

ZHANG, Q.; KANG, R.; ZEH, I., Herbert J; LOTZE, M. T. *et al.* DAMPs and autophagy: cellular adaptation to injury and unscheduled cell death. **Autophagy**, 9, n. 4, p. 451-458, 2013.

APÊNDICE A – ARTIGO DE REVISÃO
ARTIGO - VASOPRESSIN AND COCEPTIN RELEASE DURING SEPSIS AND
SEPTIC SHOCK.

Vasopressin and copeptin release during sepsis and septic shock

Dayane Aparecida Gomes¹; Raphaelle Lima de Almeida Beltrão¹; Flavio Monteiro de Oliveira Junior¹; José Carlos da Silva Junior¹; Eduarda Patrícia Carneiro de Arruda¹; Eduardo Carvalho Lira¹; Maria José Alves da Rocha²

¹ Department of Physiology and Pharmacology, Bioscience Center, Federal University of Pernambuco, Brazil

² Department of Basic and Oral Biology, School of Dentistry of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, Brazil

*Corresponding author:

Dayane Aparecida Gomes
Department of Physiology and Pharmacology
Bioscience Center
Federal University of Pernambuco
Avenue Prof Moraes Rego, 1235
50670-901 Recife/PE Brazil
e-mail: dayane.gomes@ufpe.br
Tel.: +55-81- 2126-8530

Highlights

- ✓ Clinical and experimental studies reported a biphasic response after the release of AVP during sepsis.
- ✓ Copeptin levels are associated with prognosis in septic patients.
- ✓ Copeptin appears to be a potential biomarker for sepsis and septic shock.

ABSTRACT

Sepsis is defined as a potentially fatal organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. Despite tremendous progress in the medical sciences, sepsis remains one of the leading causes of morbidity and mortality worldwide. The host response to sepsis and septic shock involves changes in the immune, autonomic, and neuroendocrine systems. Regarding neuroendocrine changes, studies show an increase in plasma vasopressin (AVP) concentrations followed by a decline, which may be correlated with septic shock. AVP is a peptide hormone derived from a larger precursor (preprohormone), along with two peptides, neurophysin II and copeptin. AVP is synthesized in the hypothalamus, stored and released from the neurohypophysis into the bloodstream by a wide range of stimuli. The measurement of AVP has limitations due to its plasma instability and short half-life. Copeptin is a more stable peptide than AVP, and its immunoassay is feasible. The blood concentrations of copeptin mirror those of AVP in many physiological states; paradoxically, during sepsis-related organ dysfunction, an uncoupling between copeptin and AVP blood levels appears to happen. In this review, we focus on clinical and experimental studies that analyzed AVP and copeptin blood concentrations over time in septic patients. The findings suggest that AVP and copeptin behave similarly in the early stages of sepsis; however, we did not find a proportional decrease in copeptin concentrations as seen with AVP during septic shock. Copeptin levels were higher in nonsurvivors than in survivors, suggesting that copeptin may work as a marker of severity or sepsis-related organ dysfunction.

KEY WORDS: infection; organ dysfunction; hypothalamus; neurohypophysis; hormone secretion.

Abbreviations: ACTH, adrenocorticotrophic hormone; ADH, antidiuretic hormone; AP, area postrema; AV3V, anteroventral third ventricle region; AVP, vasopressin; CRH, Corticotrophin Releasing Hormone; CVO, circumventricular organs; HPA, hypothalamic-pituitary-adrenal; ICU, Intensive Care Unit; iNOS, induced nitric oxide synthase; Ma, magnocellular lateral; Me, intermediocellular; MRI, Magnetic resonance imaging; NH, neurohypophysis; NO, nitric oxide; NTS, nucleus tractus solitaries; OXT, oxytocin; Pa, parvocellular; PVN, paraventricular nuclei; RIA, radioimmunoassay; SHN, hypothalamic neurohypophyseal system; SON, supraoptic nuclei.

1. Introduction

In intensive care units, sepsis remains a challenging clinical condition, as it often results in multiple organ dysfunction followed by high morbidity and mortality rates [1]. Despite advances in modern healthcare, existing epidemiological studies suggest that sepsis remains a significant burden across all economic regions [2]. The pathophysiology of sepsis involves neuroendocrine changes that can be observed due to the secretion of vasopressin (AVP). AVP is an essential hormone for the regulation of water balance and blood pressure [3, 4]. The posterior pituitary is populated by axonal terminals of hypothalamic magnocellular neurons responsible for the secretion of AVP. The cellular bodies of these neurons are located in the supraoptic and paraventricular nuclei of the hypothalamus [3]. AVP is derived from a precursor protein, preprovasopressin, which consists of a signal peptide, AVP, neurophysin II, and copeptin [5]. Copeptin, the C-terminal part of the AVP precursor, is produced in conjunction with AVP in an equimolar ratio [6]. Several studies have reported that in early sepsis, AVP concentrations increase in response to falling blood pressure. However, in later phases of sepsis, plasma concentrations of AVP decline and even return to basal levels, despite a fall in blood pressure [7-10]. In the present manuscript, clinical studies are reviewed. The reader will notice that these clinical studies evaluated the concentrations of AVP and copeptin in cases of sepsis and septic shock. Therefore, this review presents data describing whether copeptin behaves similarly or differently than AVP and, most importantly, a discussion regarding copeptin's role as a biomarker.

2. Hypothalamic-Neurohypophyseal System

The hypothalamic-neurohypophyseal system (SHN) is located in the middle portion of the anterior hypothalamus. It is comprised of two paraventricular nuclei (PVN) on each side of the dorsolateral wall of the third ventricle, as well as two supraoptic nuclei (SON), both nuclei are responsible for the synthesis of AVP and oxytocin (OXT). The axons of these neurons form the hypothalamic-pituitary tract, which terminates in the neurohypophysis (NH). It is accepted that the SHN is part of a neural circuit with structures within the terminal lamina, which constitutes the

anterior wall of the third ventricle, and defines the anterior border of the hypothalamus [12].

The PVN contains both parvocellular (Pa) and magnocellular lateral (Ma) and intermediocellular (Me) regions. The Me mainly contains oxytocinergic neurons, and the Ma division consists largely of vasopressinergic neurons (Figure 1) [13, 14]. The SON is bilateral to the optic chiasm and only contain magnocellular neurons [13]. Magnocellular neurons are distributed according to their phenotypes: oxytocinergic neurons often meet anterodorsally, whereas AVP neurons are generally postventral [15].

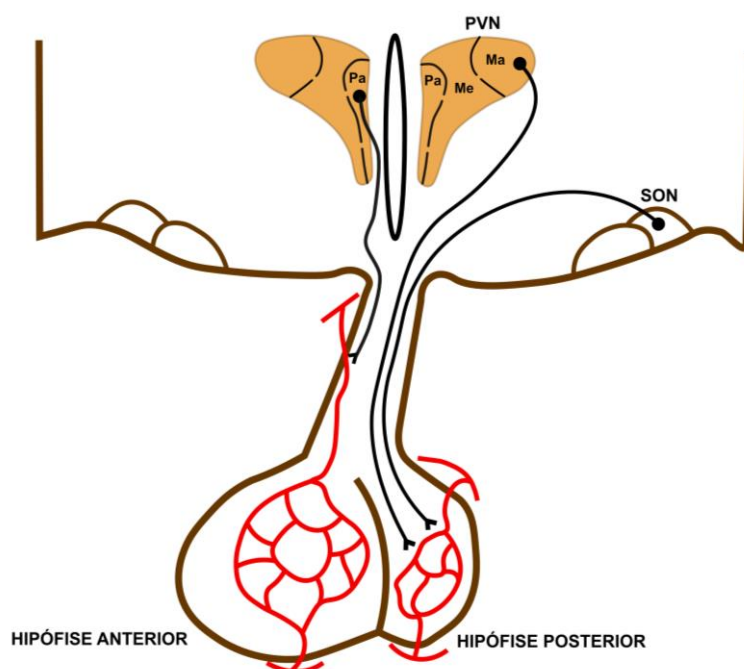


Figure 1. Subdivisions of the paraventricular nucleus: the parvocellular (Pa), posterior magnocellular lateral (Ma), and intermediocellular (Me) regions.

3. Vasopressin

AVP is also well known as antidiuretic hormone (ADH). AVP was first characterized in 1895 by Oliver [16], who described physiological actions of AVP on the cardiovascular system, showing that neurohypophyseal extracts had potent

vasoconstricting effects. Three decades later, the hormone was renamed ADH due to its effects in the collecting duct of the kidney, as ADH promotes water reabsorption.

AVP is a nonapeptide with a molecular mass of 1084 Daltons [17] synthesized by magnocellular neurons. It originates from a precursor peptide of 164 amino acids called preprovasopressin, which is formed by a signal peptide, AVP, neurophysin II and copeptin [5]. Preprovasopressin is stored in neurosecretory granules. The hormone precursor is then proteolytically processed to produce AVP, neurophysin II, and copeptin (Figure 2) [18].

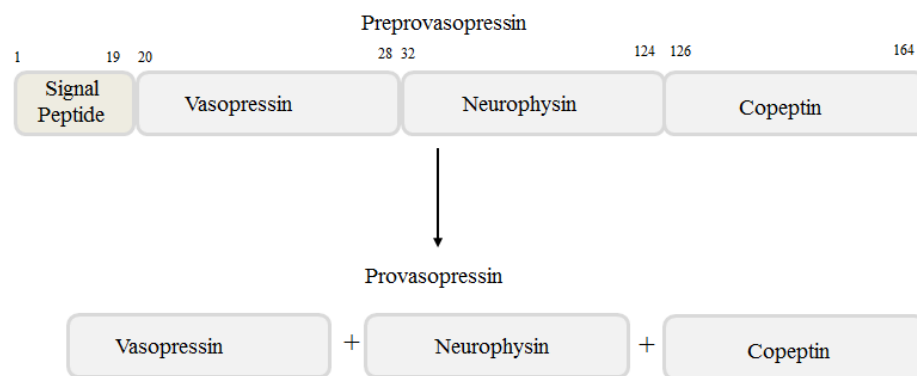


Figure 2: Schematic representation of the preprovasopressin peptide. The numbers indicate the amino acids of the human AVP protein.

Each magnocellular neuron has a single long axon that projects to the NH via the internal zone of the median eminence and the neural stalk. The vesicles are transported along the axons of these neurons to be stored in the axon terminals, where they will await signals to trigger their release into the blood. The depolarization of SON and/or PVN neurons leads to the propagation of action potentials in the axons of the hypothalamic-neurohypophyseal tract and further exocytosis of neurosecretory granules containing AVP. Usually, any stimulus for the release of AVP also increases the rate of synthesis and transportation of this peptide and ultimately maintains the hormone stock in the NH. In general, the complete process of AVP synthesis, transport, and storage in the NH takes approximately 1 to 2 hours [19].

Under normal conditions, the NH contains a large storage of AVP. In vitro studies suggest that under acute stimulation (e.g., 56 mM KCl), only 30% of the total

AVP in the NH can be released [20, 21]. Chronic stimulation, such as prolonged dehydration, generates a progressive depletion of AVP stock in the NH. When chronic stimulation persists, the release of AVP exceeds the synthesis and transport of AVP. Therefore, chronic stimulation is followed by a significant depletion of AVP stock.

AVP release is regulated mainly by blood osmolality variation (osmotic regulation) [11, 22]. In healthy and hydrated human, the osmotic threshold for AVP secretion ranges from 275 to 290 mOsmol/kg (mean of approximately 280 mOsmol/kg), and AVP levels range from 2 to 4 pg/ml. When plasma osmolality is below 280 mOsmol/kg, plasma AVP levels range from 0.5 to 2 pg/ml (less than 4 pg/ml) [23].

An important neural area that controls osmolality and AVP secretion is located in the anterior region of the hypothalamus, which includes the circumventricular organs (CVOs), the anteroventral third ventricle region (AV3V) and the area postrema (AP) and are mainly located around the third ventricle. The AV3V includes the ventral part of the MnPO and the OVLT. The OVLT and SFO were characterized as osmosensitive areas responsible for monitoring extracellular Na^+ concentrations in the central nervous system (Figure 3) [24, 25].

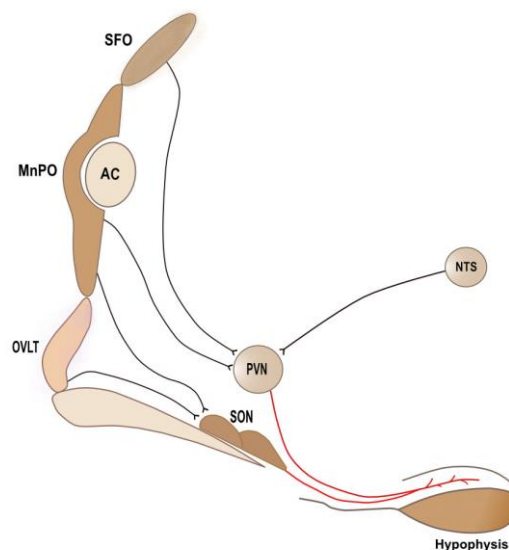


Figure 3. Schematic representations of the subfornical organ (SFO), median preoptic nucleus (MnPO), organum vasculosum lamina terminalis (OVLT) and efferent

projections to the paraventricular nucleus (PVN) and supraoptic nucleus (SON) and nucleus tractus solitarius (NTS).

Reductions in blood volume and pressure are also potent stimuli for AVP release. Receptors in the atrium and ventricles are sensitive to changes in blood volume, while those receptors in the aortic arch and carotid sinuses are sensitive to changes in blood pressure. Peripheral afferents are transmitted by vagal and glossopharyngeal nerves to the nucleus tractus solitarius (NTS) in the brainstem, from which postsynaptic pathways connect with magnocellular neurons of the SON and PVN [26, 27].

After its release into the bloodstream, AVP acts at the peripheral level through binding to three receptors: V1a, V1b, and V2 [28]. V1a receptors are primarily located in the smooth vascular musculature of the systemic circulation but also in the brain, liver, kidneys, and platelets. The stimulation of these receptors causes the release of intracellular calcium and the opening of the calcium channels, resulting in the contraction of the cell. V2 receptors are located principal cell of the kidney collecting duct. The stimulation of these receptors activates a G protein-coupled signaling cascade to recruit water channels (aquaporin type 2 channels) to the plasma membrane of cells of the collecting ducts [29].

V1b (or V3) receptors are found in the adenohypophysis as well as in others brains areas such as hypothalamus, amygdala, cerebellum hippocampus, cortex and thalamus [30]. The stimulation of V1b causes the release of adrenocorticotrophic hormone (ACTH). ACTH stimulates the synthesis and release of cortisol in the adrenal cortex as part of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis [31, 32].

4. Copeptin

Copeptin was isolated and described for the first time by Holwerda in 1972 as a glycopeptide from the NH of pigs [33]. Later, in 1975, copeptin was recognized as a component of neurosecretory vesicles [34].

Copeptin is derived from the 164-amino-acid precursor protein prepro-AVP. The amino acid sequences were first described in the bovine, porcine, and ovine NH [35] and later in humans and rats [36, 37]. Copeptin is a glycosylated peptide consisting of 39 amino acids with a central leucine-rich segment, which constitutes the C-

terminal portion of preprovasopressin [5]. Copeptin is coreleased with AVP in response to osmotic [38] and hemodynamic [28] stimuli and pathological conditions [39].

Recently, the half-life of this peptide was estimated to be 26 minutes, suggesting a 2-fold longer half-life in regard to AVP [38]. The median value in healthy controls was 4.1 to 4.2 pmol/L [28, 40]. The difference in copeptin levels between men and women is still unclear. Emerging research has shown higher copeptin levels in men than in women [38, 40, 41]; however, there are other authors who did not find significant differences between the levels of copeptin in either sex [28, 42].

5. Vasopressin and copeptin release in sepsis

Sepsis is a severe organ dysfunction caused by a dysregulated host response to infection. Septic shock is a subclass of sepsis in which the underlying circulatory and metabolic abnormalities are critical enough to substantially increase mortality [43, 44].

Septic shock should be defined as a subset of sepsis in which particularly profound circulatory, cellular, and metabolic abnormalities are associated with a greater risk of mortality than with sepsis alone.

The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3) has abolished SIRS as a clinical criterion for sepsis, and the terminology “severe sepsis” is no longer considered a subset of sepsis [43, 45]. Regardless of the changes in the definitions, sepsis and septic shock remain severe conditions associated with high morbidity and mortality in the Intensive Care Unit (ICU) worldwide [43, 46, 47], accounting for approximately 1400 deaths daily [48]. The septic shock mortality rate is approximately 50% according to some epidemiological studies [45, 49], and global mortality is still elevated, even in developed nations [49] (TABLE 1)

Table 1: New Definition and Diagnostic Criteria for Sepsis and Septic Shock from the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3).

Sepsis	Septic Shock
Sepsis is a syndrome shaped by pathogen factors and host factors with characteristics that evolve over time into an aberrant or non-homeostatic host response, as well as the presence of organ dysfunction	Persisting hypotension, with elevated lactate level, and a sustained need for vasopressor therapy
Diagnosis Criteria (≥ 2)[†]	Diagnosis Criteria
Respiratory rate ≥ 22 /min Altered mental status Systolic blood pressure ≤ 100 mm Hg	Mean arterial pressure < 65 mm Hg Vasopressor requirement Lactate level greater than 2 mmol/l (>18 mg/dl) in the absence of hypovolemia

[†] for the diagnosis of sepsis is necessary at least two or more criteria

Persistent hypotension caused mainly by vasodilation and relative hypovolemia is a crucial factor for death in patients with sepsis [46, 48]. Hypotension is due to vasodilation caused by an increased production of vasodilators, such as nitric oxide (NO). The increased amount of NO is a consequence of increased induced nitric oxide synthase) iNOS expression. The excess NO triggers the relaxation of vascular smooth muscle through the known NO–sGC–cGMP pathway [50]. Relative hypovolemia is common in septic shock due to capillary leakage and leads to intravascular volume depletion. As a result, there is a loss of protein-rich fluid from the intravascular space to the interstitial space. Relative hypovolemia causes sequential decreases in blood volume, venous return, ventricular filling, stroke volume, cardiac output, and arterial blood pressure [51].

At this stage, sepsis is marked by a hyperdynamic state, which is characterized by lowered intravascular volume, decreased vascular tone, microcirculatory dysfunction, and imbalance between oxygen delivery and demand (VO_2/DO_2 dependency) [46, 52]. To maintain appropriate oxygen delivery to the tissues, cardiac output rises to provide adequate blood pressure and organ perfusion in the face of reduced peripheral vascular resistance. Cardiac output is highly

elevated by increasing chronotropic and inotropic actions and by increasing venous return [53].

Despite the role of the autonomic nervous system in sepsis, humoral mechanisms also play an essential role in hypotension caused by this potentially life-threatening condition. Reduced afferent firings from arterial baroreceptors lead to the activation of neurons in the NTS and ventrolateral medullary (A1) catecholaminergic neurons. They both project to the hypothalamus and stimulate the magnocellular neurons in the SON and PVN to secrete AVP. PVN and SON might be continuously stimulated by decreased blood pressure, resulting in a rapid discharge of AVP from the NH to the circulation.

Patients with septic shock develop decreased vascular responsiveness to vasoconstrictors, which is mainly attributed to the desensitization or downregulation of vasoconstrictive receptors. This scenario is followed by severe hypotension and vasoplegia with low cardiac output and poor peripheral perfusion [46, 48].

The activation of the HPA axis is characterized by an increase in the secretion of cortisol by the adrenal cortex, generally proportional to the severity of stress [54]. During sepsis, two different patterns of pituitary response are observed. Initially, an acute, adaptive beneficial response is generated, that can be explained by the release of hormones from the stocks. This event may be directly induced by an increased release of CRH and ACTH or indirectly influenced by the inhibition of the HPA axis due to the actions of cortisol [55]. Subsequently, due to the persistence of microbial aggression, a chronic response is triggered, leading to the exhaustion of the neuroendocrine system [56], and may include adrenal insufficiency and AVP deficiency [7].

Clinical and experimental studies reported a biphasic response after the release of AVP during sepsis [7-9, 57, 58]. The initial phase of sepsis is characterized by an increase in the plasma levels of AVP as a response to the fall of arterial pressure. However, in the late phase of sepsis, AVP levels are decreased even with persistent [7, 8, 59].

Landry [59] reported a low plasma level of AVP in patients with vasodilatory septic shock (AVP averaged 3.1 ± 1.0 pg/ml. The authors introduced the terminology “inappropriately low” to refer to a very low level of AVP in the presence of low systolic

blood pressure. More recent research has reported similar results (AVP averaged 1.3 ± 0.9 pg/ml), and the term “inappropriately low” when referring to levels of AVPn was then defined as “vasopressin deficiency” [60].

The normal NH appears as a bright signal on magnetic resonance imaging (MRI) T1-weighted images [61]. The use of MRI in septic patients allowed the first report of the absence of the bright signal of the NH associated with low plasma AVP concentration (1.6 pg/ml).[57] After recovery from septic shock, both bright signal and plasma AVP levels (5.06 pg/ml) normalized, suggesting a depletion of the NH content of AVP in septic shock [60].

One hypothesis suggested that AVP deficiency might be an impairment in synthesis from AVP neurons. Sonnevile and colleagues [62] demonstrated that the expression of AVP is decreased in the SON but increased in the PVN in both humans and experimental models of septic shock. We recently showed a significant decrease in AVP gene expression in the PVN only in the early phase of sepsis (4 hours); however, in the SON, sepsis caused a reduction in the early and late phases [63]. The SON predominantly synthesizes AVP, and the PVN contributes 30% of total hormone production [64]. This finding might explain why the SON showed a significant reduction in the expression of AVP when compared to the PVN.

In prior studies, we found an increase in NO production induced by iNOS in the PVN and SON, which was associated with attenuated activation of magnocellular neurons [9, 65]. Additionally, sepsis induced decreased mitochondrial antiapoptotic proteins [66], which would dysregulate mitochondrial bioenergetics, causing oxidative stress and the activation of the intrinsic pathway of apoptosis.

Advances in the knowledge of AVP release in sepsis, especially in septic shock, have been limited, mainly due to difficulty in the measurement of AVP in patients in the ICU. AVP is unstable even at -20°C , undergoes a rapid degradation process, and is a very small peptide, making radioimmunoassay (RIA) sensitive and specific (accurate) in the measurement of AVP. However, it takes several days to obtain RIA results [67]. As mentioned before, septic shock is a critical condition associated with increased mortality, and a physician cannot wait 3-4 days for exam results to guide individual treatment decisions.

Alternatively, copeptin assays are currently available and validated.[40] Additionally, copeptin can be quantitatively analyzed using the BRAHMS KRYPTOR assay [68]. Copeptin remains stable *ex vivo* for several days in serum or plasma at room temperature [28, 40]. Unlike AVP, copeptin is simpler to determine [28] and may be detected from 50 μ L of plasma or serum within approximately 3h [28, 40, 42].

Several studies have suggested that copeptin might be a surrogate of AVP [28, 40, 42] under physiological conditions and in different pathologies. In hemorrhagic shock in baboons, the concentration of copeptin was 30 times higher than the values found in the control group. After receiving an infusion for the reestablishment of blood volume, these animals showed a decline in copeptin rates [40]. This response confirms the association of copeptin with events that disrupt the hemodynamic balance.

In the past ten years, several studies conducted in humans have suggested that copeptin is a promising biomarker for cardiovascular [69, 70], pulmonary [71, 72], hepatic [73], urinary, and gastrointestinal diseases [74, 75]. Furthermore, high blood copeptin levels have been associated with increased mortality [76, 77].

Copeptin has been shown to gradually increase in the different stages of sepsis (e.g., sepsis, severe sepsis, septic shock) [28, 78-80], reaching 171.5 pmol/L, 41 times higher than the value in healthy controls (4.1 pmol/L) [28, 80].

Studies that simultaneously evaluated AVP and copeptin demonstrated that the septic group had higher levels of AVP and copeptin than the control group, and the septic shock group presented higher levels of AVP and copeptin than patients with severe sepsis [28, 40, 79]. In contrast, Lesur [81] showed that the concentration of copeptin was higher in septic shock than in sepsis; however, this phenomenon was not seen in the AVP values (TABLE 2).

There are also data showing that mild to moderate stress conditions contribute to detectable changes in copeptin levels. Patients with gastric bleeding had higher copeptin concentrations than healthy patients [82]. In agreement with these studies, patients undergoing cardiac surgery also showed higher levels of copeptin than healthy controls but lower levels than patients who progressed to SIRS, sepsis, and septic shock [78, 83].

Recent studies have shown that plasma copeptin levels are associated with prognosis in septic patients. The evaluation of copeptin levels during the admission of patients to an emergency department demonstrated greater circulating levels of copeptin in nonsurvivors than in survivors of sepsis [80]. Similar results were also described in the same year by other researchers [83], suggesting a role of copeptin as a biomarker during sepsis and septic shock.

Table 2 Concentration of Copeptin

Author	Clinical characteristic	Nº patients	Copeptin (ranging)
STRUCK J 2005⁽¹⁷⁾	Health control	50	0.88 (0,3–18) pmol/l
	Septic shock	35	375.0 (59-1572) pmol/l
MORGENTHALER NG 2006⁽⁴⁰⁾	Health control	359	4.2 (1,0-13,8) pmol/l
	Sepsis	60	79.5 (10,6-228,0) pmol/l
JOCHBERGER S 2006⁽⁷⁹⁾	Health control	70	6.0 (3,0-6,0) pmol/l
	SIRS	36	88.0 (88,0-89,0) pmol/l
	Sepsis	25	52.0 (82,0-101,0) pmol/l
	After cardiac surgery	96	101.0 (30,0-52,0) pmol/l
	Health control	84	4.1 (1,0-13,8) pmol
MORGENTHALER NG 2007⁽²⁸⁾	SIRS	48	27.6 (2,3-297) pmol
	Sepsis	22	71.5 (8,5-504,0) pmol
	Severe Sepsis	15	73.6 pmol
	Septic Shock	16	171.5 pmol
	Day zero		
SELIGMAN R 2008⁽⁸⁰⁾	Sepsis	34	41,2 (17,2 - 65,9) pmol/l
	Severe Sepsis	21	64,8 (23,7 -105,9) pmol/l
	Septic Shock	16	84,2 (15,6 - 152,8) pmol/l
	Day 4		
	Sepsis	31	25,3 (2,1 - 48,5) pmol/l
	Severe Sepsis	20	68,7 (39,3 - 98,1) pmol/l
	Septic Shock	12	91,8 (35,9 - 144,7) pmol/l
	Healthy control	50	4.1 (1,0-13,8) pmol/l
ZHANG G 2014⁽⁸¹⁾	SIRS	83	27.6 (2,3-297,0) pmol/l
	Sepsis	186	50.0 (8,5-268) pmol/l
	Severe Sepsis	97	73.6 (15,3-317) pmol/l
	Septic Shock	95	171.5 (35,1-504) pmol/l
	Non-healthy control †	21	41.4 (±22,9) pmol/l
MARAVIC-STOJKOVICV, 2014⁽⁸⁴⁾	Cerebrovascular event	21	81.5 (±59,0) pmol/l

BATTISTA S 2016⁽⁸³⁾	Gastrointestinal bleeding ^{††}	15	70.1 (2.95-500.1) pmol/l
	SIRS ^{†††}	26	5.2 (1.25-117.8) pmol/l
	Sepsis	24	34.2 (7.9-220.1) pmol/l
	Severe Sepsis	25	61.8 (2.5-527.7) pmol/l
	Septic shock	15	128.7 (12.0-425.0) pmol/l
JEON K 2018⁽⁸⁵⁾	Septic shock	76	162 (107 -220) pg/ml

† Patients underwent a surgical procedure (under stress) †† Patient with hemorrhage
 ††† Systemic inflammatory response syndrome.

6. Conclusion

Numerous studies have shown biphasic AVP secretion, with increased release in sepsis followed by reduced plasma levels in septic shock. Bedside measurements of AVP in the intensive care units are rarely used in sepsis and septic shock, partly because the analysis of AVP in plasma and urine is conducted by RIA and takes 3-4 days. In septic shock, a few hours may represent the difference between life and death.

There is growing evidence that copeptin could be used as a surrogate marker for AVP secretion. Copeptin appears to be a potential biomarker for sepsis and septic shock. However, some parameters need to be established. First, it is crucial to define copeptin reference values in sepsis and septic shock. Second, poor knowledge about copeptin metabolism and degradation under physiological conditions as well as in the advanced stages of sepsis and shock represents another limiting factor in understanding whether copeptin is a surrogate for AVP and/or a biomarker.

Conflict of interest

The authors of the manuscript have no conflicts of interest to declare”.

Acknowledgments

Financial support from Fundacao de Amparo a Ciencia e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE, # APQ 0825-2.07/2014) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Finance Code 001) is gratefully acknowledged.

References

- [1] G. Martin, F.M. Brunkhorst, J.M. Janes, K. Reinhart, D.P. Sundin, K. Garnett, R. Beale, The international PROGRESS registry of patients with severe sepsis: drotrecogin alfa (activated) use and patient outcomes, *Critical care* 13(3) (2009) R103.
- [2] C. Fleischmann, A. Scherag, N.K. Adhikari, C.S. Hartog, T. Tsaganos, P. Schlattmann, D.C. Angus, K. Reinhart, Assessment of Global Incidence and Mortality of Hospital-treated Sepsis. Current Estimates and Limitations, *American journal of respiratory and critical care medicine* 193(3) (2016) 259-72.
- [3] G.L. Robertson, Antidiuretic hormone. Normal and disordered function, *Endocrinology and metabolism clinics of North America* 30(3) (2001) 671-94, vii.
- [4] H. Caldwell, W. Young, Oxytocin and vasopressin: genetics and behavioral implications, *Handbook of neurochemistry and molecular neurobiology: neuroactive proteins and peptides* (2006) 573-607.
- [5] H. Land, G. Schutz, H. Schmale, D. Richter, Nucleotide sequence of cloned cDNA encoding bovine arginine vasopressin-neurophysin II precursor, *Nature* 295(5847) (1982) 299-303.
- [6] D.R. Repaske, R. Medlej, E.K. Gultekin, M.R. Krishnamani, G. Halaby, J.W. Findling, J.A. Phillips, 3rd, Heterogeneity in clinical manifestation of autosomal dominant neurohypophyseal diabetes insipidus caused by a mutation encoding Ala-1-->Val in the signal peptide of the arginine vasopressin/neurophysin II/copeptin precursor, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82(1) (1997) 51-6.
- [7] T. Sharshar, A. Blanchard, M. Paillard, J.C. Raphael, P. Gajdos, D. Annane, Circulating vasopressin levels in septic shock, *Critical care medicine* 31(6) (2003) 1752-8.
- [8] G.R. Oliveira-Pelegrin, M.I. Ravanelli, L.G. Branco, M.J. Rocha, Thermoregulation and vasopressin secretion during polymicrobial sepsis, *Neuroimmunomodulation* 16(1) (2009) 45-53.
- [9] G.R. Oliveira-Pelegrin, P.J. Basso, A.S. Soares, M.R. Martinez, K.D. Riester, M.J. Rocha, Cleaved caspase-3 expression in hypothalamic magnocellular neurons may affect vasopressin secretion during experimental polymicrobial sepsis, *Journal of neuroimmunology* 258(1-2) (2013) 10-6.

- [10] F. Wahab, L.F. Tazinafo, E.C. Carnio, F.A. Aguila, M.E. Batalhao, M.J. Rocha, Interleukin-1 receptor antagonist decreases cerebrospinal fluid nitric oxide levels and increases vasopressin secretion in the late phase of sepsis in rats, *Endocrine* 49(1) (2015) 215-21.
- [11] F.L. Dunn, T.J. Brennan, A.E. Nelson, G.L. Robertson, The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat, *The Journal of clinical investigation* 52(12) (1973) 3212-3219.
- [12] M.J. Brownstein, J.T. Russell, H. Gainer, Synthesis, transport, and release of posterior pituitary hormones, *Science (New York, N.Y.)* 207(4429) (1980) 373-8.
- [13] J.Z. Kiss, J. Martos, M. Palkovits, Hypothalamic paraventricular nucleus: a quantitative analysis of cytoarchitectonic subdivisions in the rat, *The Journal of comparative neurology* 313(4) (1991) 563-73.
- [14] J. Chen, C.E. Gomez-Sanchez, A. Penman, P.J. May, E. Gomez-Sanchez, Expression of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors in preautonomic neurons of the rat paraventricular nucleus, *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 306(5) (2014) R328-40.
- [15] D.F. Swaab, C.W. Pool, F. Nijveldt, Immunofluorescence of vasopressin and oxytocin in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system, *Journal of neural transmission* 36(3-4) (1975) 195-215.
- [16] G. Oliver, E.A. Schafer, On the Physiological Action of Extracts of Pituitary Body and certain other Glandular Organs: Preliminary Communication, *The Journal of physiology* 18(3) (1895) 277-9.
- [17] J. Struck, N.G. Morgenthaler, A. Bergmann, Copeptin, a stable peptide derived from the vasopressin precursor, is elevated in serum of sepsis patients, *Peptides* 26(12) (2005) 2500-4.
- [18] G. Baumann, J.F. Dingman, Distribution, blood transport, and degradation of antidiuretic hormone in man, *The Journal of clinical investigation* 57(5) (1976) 1109-16.
- [19] A.H. Sklar, R.W. Schrier, Central nervous system mediators of vasopressin release, *Physiological reviews* 63(4) (1983) 1243-80.
- [20] J.J. Nordmann, J.F. Morris, Membrane retrieval at neurosecretory axon endings, *Nature* 261(5562) (1976) 723-5.

- [21] J.F. Morris, J.J. Nordmann, Membrane recapture after hormone release from nerve endings in the neural lobe of the rat pituitary gland, *Neuroscience* 5(3) (1980) 639-59.
- [22] C.E. Wade, L.C. Keil, D.J. Ramsay, Role of volume and osmolality in the control of plasma vasopressin in dehydrated dogs, *Neuroendocrinology* 37(5) (1983) 349-53.
- [23] A.W. Cowley, Jr., W.C. Cushman, E.W. Quillen, Jr., M.M. Skelton, H.G. Langford, Vasopressin elevation in essential hypertension and increased responsiveness to sodium intake, *Hypertension (Dallas, Tex. : 1979)* 3(3 Pt 2) (1981) 193-100.
- [24] M.J. McKinley, E.H. Blaine, D.A. Denton, Brain osmoreceptors, cerebrospinal fluid electrolyte composition and thirst, *Brain research* 70(3) (1974) 532-7.
- [25] M.J. McKinley, E. Badoer, L. Vivas, B.J. Oldfield, Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin, *Brain research bulletin* 37(2) (1995) 131-7.
- [26] L. Share, Role of vasopressin in cardiovascular regulation, *Physiological reviews* 68(4) (1988) 1248-84.
- [27] G. Feuerstein, R.L. Zerbe, A.L. Siren, The supraoptic nuclei in vasopressin and hemodynamic responses to hemorrhage in rats, *Neuroreport* 2(10) (1991) 612-4.
- [28] N.G. Morgenthaler, B. Muller, J. Struck, A. Bergmann, H. Redl, M. Christ-Crain, Copeptin, a stable peptide of the arginine vasopressin precursor, is elevated in hemorrhagic and septic shock, *Shock (Augusta, Ga.)* 28(2) (2007) 219-26.
- [29] J.H. Robben, N.V. Knoers, P.M. Deen, Regulation of the vasopressin V2 receptor by vasopressin in polarized renal collecting duct cells, *Molecular biology of the cell* 15(12) (2004) 5693-9.
- [30] F. Hernando, O. Schoots, S.J. Lolait, J.P. Burbach, Immunohistochemical localization of the vasopressin V1b receptor in the rat brain and pituitary gland: anatomical support for its involvement in the central effects of vasopressin, *Endocrinology* 142(4) (2001) 1659-68.
- [31] T. Tagawa, T. Imaizumi, T. Endo, M. Shiramoto, Y. Hirooka, S. Ando, A. Takeshita, Vasodilatory effect of arginine vasopressin is mediated by nitric oxide in human forearm vessels, *The Journal of clinical investigation* 92(3) (1993) 1483-90.

- [32] T. Tagawa, T. Imaizumi, M. Shiramoto, T. Endo, K. Hironaga, A. Takeshita, V2 receptor-mediated vasodilation in healthy humans, *Journal of cardiovascular pharmacology* 25(3) (1995) 387-92.
- [33] D.A. Holwerda, A glycopeptide from the posterior lobe of pig pituitaries. I. Isolation and characterization, *European journal of biochemistry* 28(3) (1972) 334-9.
- [34] C.W. Jones, R.W. Swann, A glycoprotein in the neurosecretory granules of the neurohypophysis, *The Journal of physiology* 245(2) (1975) 45p.
- [35] D.G. Smyth, D.E. Massey, A new glycopeptide in pig, ox and sheep pituitary, *Biochemical and biophysical research communications* 87(4) (1979) 1006-10.
- [36] N.G. Seidah, S. Benjannet, M. Chretien, The complete sequence of a novel human pituitary glycopeptide homologous to pig posterior pituitary glycopeptide, *Biochemical and biophysical research communications* 100(2) (1981) 901-7.
- [37] R. Ivell, D. Richter, Structure and comparison of the oxytocin and vasopressin genes from rat, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81(7) (1984) 2006-10.
- [38] W.K. Fenske, I. Schnyder, G. Koch, C. Walti, M. Pfister, P. Kopp, M. Fassnacht, K. Strauss, M. Christ-Crain, Release and Decay Kinetics of Copeptin vs AVP in Response to Osmotic Alterations in Healthy Volunteers, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 103(2) (2018) 505-513.
- [39] S. Zabarovskaja, C. Hage, A. Gabrielsen, L. Mellbin, L.H. Lund, Copeptin in Heart Failure, Post-Left Ventricular Assist Device and Post-Heart Transplantation, *Heart, lung & circulation* 26(2) (2017) 143-149.
- [40] N.G. Morgenthaler, J. Struck, C. Alonso, A. Bergmann, Assay for the measurement of copeptin, a stable peptide derived from the precursor of vasopressin, *Clinical chemistry* 52(1) (2006) 112-9.
- [41] R. Roussel, L. Fezeu, M. Marre, G. Velho, F. Fumeron, P. Jungers, O. Lantieri, B. Balkau, N. Bouby, L. Bankir, D.G. Bichet, Comparison between copeptin and vasopressin in a population from the community and in people with chronic kidney disease, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 99(12) (2014) 4656-63.
- [42] G. Szinnai, N.G. Morgenthaler, K. Berneis, J. Struck, B. Muller, U. Keller, M. Christ-Crain, Changes in plasma copeptin, the c-terminal portion of arginine

vasopressin during water deprivation and excess in healthy subjects, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 92(10) (2007) 3973-8.

[43] M. Singer, C.S. Deutschman, C.W. Seymour, M. Shankar-Hari, D. Annane, M. Bauer, R. Bellomo, G.R. Bernard, J.D. Chiche, C.M. Coopersmith, R.S. Hotchkiss, M.M. Levy, J.C. Marshall, G.S. Martin, S.M. Opal, G.D. Rubenfeld, T. van der Poll, J.L. Vincent, D.C. Angus, The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *Jama* 315(8) (2016) 801-10.

[44] M. Shankar-Hari, G.S. Phillips, M.L. Levy, C.W. Seymour, V.X. Liu, C.S. Deutschman, D.C. Angus, G.D. Rubenfeld, M. Singer, Developing a New Definition and Assessing New Clinical Criteria for Septic Shock: For the Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3), *Jama* 315(8) (2016) 775-87.

[45] A. Rhodes, L.E. Evans, W. Alhazzani, M.M. Levy, M. Antonelli, R. Ferrer, A. Kumar, J.E. Sevransky, C.L. Sprung, M.E. Nunnally, B. Rochwerf, G.D. Rubenfeld, D.C. Angus, D. Annane, R.J. Beale, G.J. Bellinghan, G.R. Bernard, J.D. Chiche, C. Coopersmith, D.P. De Backer, C.J. French, S. Fujishima, H. Gerlach, J.L. Hidalgo, S.M. Hollenberg, A.E. Jones, D.R. Karnad, R.M. Kleinpell, Y. Koh, T.C. Lisboa, F.R. Machado, J.J. Marini, J.C. Marshall, J.E. Mazuski, L.A. McIntyre, A.S. McLean, S. Mehta, R.P. Moreno, J. Myburgh, P. Navalesi, O. Nishida, T.M. Osborn, A. Perner, C.M. Plunkett, M. Ranieri, C.A. Schorr, M.A. Seckel, C.W. Seymour, L. Shieh, K.A. Shukri, S.Q. Simpson, M. Singer, B.T. Thompson, S.R. Townsend, T. Van der Poll, J.L. Vincent, W.J. Wiersinga, J.L. Zimmerman, R.P. Dellinger, Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016, *Intensive care medicine* 43(3) (2017) 304-377.

[46] D. Annane, F. Trabold, T. Sharshar, I. Jarrin, A.S. Blanc, J.C. Raphael, P. Gajdos, Inappropriate sympathetic activation at onset of septic shock: a spectral analysis approach, *American journal of respiratory and critical care medicine* 160(2) (1999) 458-65.

[47] M.M. Levy, M.P. Fink, J.C. Marshall, E. Abraham, D. Angus, D. Cook, J. Cohen, S.M. Opal, J.L. Vincent, G. Ramsay, 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference, *Intensive care medicine* 29(4) (2003) 530-8.

- [48] A.M. Burgdorff, M. Bucher, J. Schumann, Vasoplegia in patients with sepsis and septic shock: pathways and mechanisms, *The Journal of international medical research* 46(4) (2018) 1303-1310.
- [49] F.R. Machado, A.B. Cavalcanti, F.A. Bozza, E.M. Ferreira, F.S. Angotti Carrara, J.L. Sousa, N. Caixeta, R. Salomao, D.C. Angus, L.C. Pontes Azevedo, The epidemiology of sepsis in Brazilian intensive care units (the Sepsis PREvalence Assessment Database, SPREAD): an observational study, *The Lancet. Infectious diseases* 17(11) (2017) 1180-1189.
- [50] A. Cauwels, Nitric oxide in shock, *Kidney international* 72(5) (2007) 557-65.
- [51] T. Standl, T. Annecke, I. Cascorbi, A.R. Heller, A. Sabashnikov, W. Teske, The Nomenclature, Definition and Distinction of Types of Shock, *Deutsches Arzteblatt international* 115(45) (2018) 757-768.
- [52] E. Antonucci, E. Fiaccadori, K. Donadello, F.S. Taccone, F. Franchi, S. Scolletta, Myocardial depression in sepsis: from pathogenesis to clinical manifestations and treatment, *Journal of critical care* 29(4) (2014) 500-11.
- [53] J.D. Young, The heart and circulation in severe sepsis, *British journal of anaesthesia* 93(1) (2004) 114-20.
- [54] R. Khardori, D. Castillo, Endocrine and metabolic changes during sepsis: an update, *The Medical clinics of North America* 96(6) (2012) 1095-105.
- [55] F. Wahab, B. Atika, G.R. Oliveira-Pelegrin, M.J. Rocha, Recent advances in the understanding of sepsis-induced alterations in the neuroendocrine system, *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 13(4) (2013) 335-47.
- [56] G. Van den Berghe, F. de Zegher, R.C. Baxter, J.D. Veldhuis, P. Wouters, M. Schetz, C. Verwaest, E. Van der Vorst, P. Lauwers, R. Bouillon, C.Y. Bowers, Neuroendocrinology of prolonged critical illness: effects of exogenous thyrotropin-releasing hormone and its combination with growth hormone secretagogues, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 83(2) (1998) 309-19.
- [57] T. Sharshar, R. Carlier, A. Blanchard, A. Feydy, F. Gray, M. Paillard, J.C. Raphael, P. Gajdos, D. Annane, Depletion of neurohypophyseal content of vasopressin in septic shock, *Critical care medicine* 30(3) (2002) 497-500.
- [58] J.A. Pancoto, P.B. Correa, G.R. Oliveira-Pelegrin, M.J. Rocha, Autonomic dysfunction in experimental sepsis induced by cecal ligation and puncture, *Autonomic neuroscience : basic & clinical* 138(1-2) (2008) 57-63.

- [59] D.W. Landry, H.R. Levin, E.M. Gallant, R.C. Ashton, Jr., S. Seo, D. D'Alessandro, M.C. Oz, J.A. Oliver, Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock, *Circulation* 95(5) (1997) 1122-5.
- [60] B.M. Patel, D.R. Chittock, J.A. Russell, K.R. Walley, Beneficial effects of short-term vasopressin infusion during severe septic shock, *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists* 96(3) (2002) 576-582.
- [61] I. Fujisawa, K. Uokawa, N. Horii, N. Murakami, N. Azuma, S. Furuto-Kato, K. Yamashita, S. Nakao, N. Kageyama, Bright pituitary stalk on MR T1-weighted image: damming up phenomenon of the neurosecretory granules, *Endocrine journal* 49(2) (2002) 165-73.
- [62] R. Sonnevile, C. Guidoux, L. Barrett, O. Viltart, V. Mattot, A. Polito, S. Siami, G.L. de la Grandmaison, A. Blanchard, M. Singer, D. Annane, F. Gray, J.P. Brouland, T. Sharshar, Vasopressin synthesis by the magnocellular neurons is different in the supraoptic nucleus and in the paraventricular nucleus in human and experimental septic shock, *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 20(3) (2010) 613-22.
- [63] N.N. Santos-Junior, C.H.R. Catalao, L.H.A. Costa, A.O. Souza, C.M.D. Mota, L.C. Alberici, L.G.S. Branco, M.J.A. Rocha, Experimental sepsis induces sustained inflammation and acetylcholinesterase activity impairment in the hypothalamus, *Journal of neuroimmunology* 324 (2018) 143-148.
- [64] P. Sawchenko, L. Swanson, The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat, *Journal of Comparative Neurology* 218(2) (1983) 121-144.
- [65] P.B. Correa, J.A. Pancoto, G.R. de Oliveira-Pelegrin, E.C. Carnio, M.J. Rocha, Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis, *Journal of neuroimmunology* 183(1-2) (2007) 17-25.
- [66] L.H.A. da Costa, N. Junior, C.H.R. Catalao, T. Sharshar, F. Chretien, M.J.A. da Rocha, Vasopressin Impairment During Sepsis Is Associated with Hypothalamic Intrinsic Apoptotic Pathway and Microglial Activation, *Molecular neurobiology* 54(7) (2017) 5526-5533.
- [67] C.H. Coelho, T.F. Martins, G.R. Oliveira-Pelegrin, M.J.A. da Rocha, Inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity does not alter vasopressin secretion in septic rats, *Pituitary* 20(3) (2017) 333-339.

- [68] J. Gille, J. Schmidt, T. Kremer, A. Sablotzki, Evaluation of MR-proANP and copeptin for sepsis diagnosis after burn injury, *Journal of critical care* 52 (2019) 149-155.
- [69] K.M. Goode, R. Nicholls, P. Pellicori, A.L. Clark, J.G. Cleland, The in vitro stability of novel cardiovascular and sepsis biomarkers at ambient temperature, *Clinical chemistry and laboratory medicine* 52(6) (2014) 911-8.
- [70] W.A. Keshk, D.H. Zineldeen, Y.A. El-Heneedy, A.A. Ghali, Thrombomodulin, alarmin signaling, and copeptin: cross-talk between obesity and acute ischemic stroke initiation and severity in Egyptians, *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 39(6) (2018) 1093-1104.
- [71] S. Kruger, S. Ewig, J. Kunde, O. Hartmann, N. Suttorp, T. Welte, Pro-atrial natriuretic peptide and pro-vasopressin for predicting short-term and long-term survival in community-acquired pneumonia: results from the German Competence Network CAPNETZ, *Thorax* 65(3) (2010) 208-14.
- [72] L. Boeck, J.B. Soriano, M. Brusse-Keizer, F. Blasi, K. Kostikas, W. Boersma, B. Milenkovic, R. Louis, A. Lacoma, R. Djamin, J. Aerts, A. Torres, G. Rohde, T. Welte, P. Martinez-Camblor, J. Rakic, A. Scherr, M. Koller, J. van der Palen, J.M. Marin, I. Alfageme, P. Almagro, C. Casanova, C. Esteban, J.J. Soler-Cataluna, J.P. de-Torres, M. Miravittles, B.R. Celli, M. Tamm, D. Stolz, Prognostic assessment in COPD without lung function: the B-AE-D indices, *The European respiratory journal* 47(6) (2016) 1635-44.
- [73] J.P. Moreno, E. Grandclement, E. Monnet, B. Clerc, A. Agin, J.P. Cervoni, C. Richou, C. Vanlemmens, S. Dritsas, G. Dumoulin, V. Di Martino, T. Thevenot, Plasma copeptin, a possible prognostic marker in cirrhosis, *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver* 33(6) (2013) 843-51.
- [74] A. Masajtis-Zagajewska, I. Kurnatowska, M. Wajdlich, M. Nowicki, Utility of copeptin and standard inflammatory markers in the diagnostics of upper and lower urinary tract infections, *BMC urology* 15 (2015) 67.
- [75] F.E. Garcia-Arroyo, E. Tapia, M.G. Blas-Marron, G. Gonzaga, O. Silverio, M. Cristobal, H. Osorio, A.S. Arellano-Buendia, C. Zazueta, O.E. Aparicio-Trejo, J.G. Reyes-Garcia, J. Pedraza-Chaverri, V. Soto, C. Roncal-Jimenez, R.J. Johnson, L.G.

Sanchez-Lozada, Vasopressin Mediates the Renal Damage Induced by Limited Fructose Rehydration in Recurrently Dehydrated Rats, *International journal of biological sciences* 13(8) (2017) 961-975.

[76] B. Muller, N. Morgenthaler, D. Stolz, P. Schuetz, C. Muller, R. Bingisser, A. Bergmann, M. Tamm, M. Christ-Crain, Circulating levels of copeptin, a novel biomarker, in lower respiratory tract infections, *European journal of clinical investigation* 37(2) (2007) 145-52.

[77] J. Curbelo, S. Luquero Bueno, J.M. Galvan-Roman, M. Ortega-Gomez, O. Rajas, G. Fernandez-Jimenez, L. Vega-Piris, F. Rodriguez-Salvanes, B. Arnalich, A. Diaz, R. Costa, H. de la Fuente, A. Lancho, C. Suarez, J. Ancochea, J. Aspa, Inflammation biomarkers in blood as mortality predictors in community-acquired pneumonia admitted patients: Importance of comparison with neutrophil count percentage or neutrophil-lymphocyte ratio, *PloS one* 12(3) (2017) e0173947.

[78] S. Jochberger, N.G. Morgenthaler, V.D. Mayr, G. Luckner, V. Wenzel, H. Ulmer, S. Schwarz, W.R. Hasibeder, B.E. Friesenecker, M.W. Dunser, Copeptin and arginine vasopressin concentrations in critically ill patients, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 91(11) (2006) 4381-6.

[79] R. Seligman, J. Papassotiriou, N.G. Morgenthaler, M. Meisner, P.J. Teixeira, Copeptin, a novel prognostic biomarker in ventilator-associated pneumonia, *Critical care (London, England)* 12(1) (2008) R11.

[80] Q. Zhang, G. Dong, X. Zhao, M. Wang, C.S. Li, Prognostic significance of hypothalamic-pituitary-adrenal axis hormones in early sepsis: a study performed in the emergency department, *Intensive care medicine* 40(10) (2014) 1499-508.

[81] O. Lesur, J.-F. Roussy, F. Chagnon, N. Gallo-Payet, R. Dumaine, P. Sarret, A. Chraïbi, L. Chouinard, B. Hogue, Proven infection-related sepsis induces a differential stress response early after ICU admission, *Critical Care* 14(4) (2010) R131.

[82] S. Battista, U. Audisio, C. Galluzzo, M. Maggiorotto, M. Masoero, D. Forno, E. Pizzolato, M. Ulla, M. Lucchiari, A. Vitale, Assessment of diagnostic and prognostic role of copeptin in the clinical setting of sepsis, *BioMed research international* 2016 (2016).

- [83] V. Maravic-Stojkovic, L.J. Lausevic-Vuk, M. Obradovic, P. Jovanovic, S. Tanaskovic, B. Stojkovic, R.E. Isenovic, D.J. Radak, Copeptin level after carotid endarterectomy and perioperative stroke, *Angiology* 65(2) (2014) 122-9.
- [84] K. Jeon, J.U. Song, C.R. Chung, J.H. Yang, G.Y. Suh, Incidence of hypotension according to the discontinuation order of vasopressors in the management of septic shock: a prospective randomized trial (DOVSS), *Critical care (London, England)* 22(1) (2018) 131.

ANEXO A – COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

18/08/2020

Gmail - Track your recent Co-Authored submission to PEPTIDES



Raphaelle Beltrão <beltrao85@gmail.com>

Track your recent Co-Authored submission to PEPTIDES

1 mensagem

Peptides <eesserver@eesmail.elsevier.com>
Responder a: Peptides <peptides@elsevier.com>
Para: beltrao85@gmail.com

19 de julho de 2020 02:09

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. Raphaelle Almeida Beltrão,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Peptides
Title: Vasopressin and copeptin release during sepsis and septic shock
Corresponding Author: Dayane Gomes
Co-Authors: Raphaelle L Almeida Beltrão, Master; Flavio Monteiro de Oliveira Junior O Junior, Master; José Carlos C da Silva Junior, Master Student; Eduarda Patrícia P Carneiro de Arruda, Undergraduate student; Eduardo C Lira, PhD; Maria José J Alves da Rocha, PhD

To be kept informed of the status of your submission, register or log in (if you already have an Elsevier profile).

Register here: [https://ees.elsevier.com/peptides/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Raphaelle&lname=Almeida Beltrão&email=beltrao85@gmail.com](https://ees.elsevier.com/peptides/default.asp?acw=&pg=preRegistration.asp&user=coauthor&fname=Raphaelle&lname=Almeida%20Beltrao&email=beltrao85@gmail.com)

Or log in: <https://ees.elsevier.com/peptides/default.asp?acw=&pg=login.asp&email=beltrao85@gmail.com>

If you did not co-author this submission, please do not follow the above link but instead contact the Corresponding Author of this submission at dayane.gomes@ufpe.br; dayanejooh@gmail.com.

Thank you,

Peptides

ANEXO B - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 16 de setembro de 2014.

Ofício nº 53/14

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE

Para: **Profª. Dayane Aparecida Gomes**
Departamento de Fisiologia e Farmacologia – CCB
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.016535/2014-28

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Caracterização da HMGB1 (High Mobility group Box-1) no Eixo Hipotálamo-Neurohipofisário e sua relação com a secreção de vasopressina na sepse experimental"**.

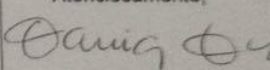
Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Fisiologia e Farmacologia; Animal: rato; Linhagem: Wistar; Idade: 40 dias; Peso: 200-250g; Sexo: machos; Número total de animais previsto no protocolo: 96.

Atenciosamente,





Profª Tania Rieger
Presidente do CEUA/CCB-UFPE
SIAPE 2306924

CCB: Integrar para desenvolver