

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES
PRODUZIDAS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS COM
SEPSE.**

Natã Borges Costa

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Junho- 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES
PRODUZIDAS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS COM
SEPSE.**

Natã Borges Costa

Prof. Dr. Alexandre Antonio Vieira

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia,
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG

Junho – 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES
PRODUZIDAS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS COM
SEPSE.**

Natã Borges Costa

Prof. Dr. Alexandre Antonio Vieira

Homologado pela coordenação do Curso
de
Ciências Biológicas em 27/06/2017

Profa. Dra. Celine de Melo

Uberlândia – MG

Junho - 2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**TRATAMENTO COM ÔMEGA-3 NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES
PRODUZIDAS PELA ATIVAÇÃO DO QUIMIORREFLEXO EM RATOS COM
SEPSE.**

Natã Borges Costa

Aprovado pela Banca Examinadora em: 27/06/ 2017 Nota: 91

Prof. Dr. Alexandre Antonio Vieira

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia, 27 de Junho de 2017.

Agradecimentos

Primeiramente oferto os meus agradecimentos, aos meus pais Izailda Borges Costa e José Adilson Correia Costa, pela confiança e investimento dedicados a minha formação, assim como todo apoio oferecido nesses cinco anos. Agradeço a minha irmã Noemi Borges Costa pela parceria e auxílio nos momentos mais complexos, ao meu orientador Prof. Dr. Alexandre A. Vieira; a Ms. Léia Cardoso pelos auxílios em laboratório e por fim a todas, todes e todos os amigos que me incentivaram a chegar até aqui. Axé.

RESUMO

O sistema cardiovascular é imprescindível nos processos de controle da homeostase que inclui a manutenção das concentrações de gases no sangue (O_2 e CO_2). Distúrbios patológicos podem afetar esse controle, como exemplo, a sepse; que produz uma resposta inflamatória sistêmica. Em ratos, a sepse pode ser induzida por uma técnica conhecida como ligação e perfuração do ceco (CLP), que por sua vez abole as respostas cardiovasculares da ativação do quimiorreflexo. Admitindo o Ômega-3 como um ácido graxo importante e por ser imunorregulador em processos inflamatórios, o estudo tem como objetivo verificar se uma dieta rica em Ômega-3 poderia restaurar as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo em ratos submetidos à CLP. Ratos pós-desmame foram tratados por 60 dias com Ômega-3 (ou solução controle) tanto subcutaneamente quanto pelo método da gavagem [gv (infusão oral)]. Após 60 dias, artéria e veia femoral foram canuladas para registro dos parâmetros cardiovasculares e injeção de drogas, respectivamente. Alguns ratos foram submetidos à cirurgia CLP (indução da sepse) enquanto outros cirurgia fictícia (sem sepse). As respostas cardiovasculares do quimiorreflexo foram produzidas em ratos não anestesiados através da injeção endovenosa de Cianeto de potássio. Os resultados confirmaram que a sepse abole as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo e estas respostas não são recuperadas em ratos tratados cronicamente com Ômega-3. Além disso, os tratamentos com Ômega-3 em ratos sem sepse também atenuaram as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

Palavras-chave: Pressão arterial média, Quimiorreflexo, Sepse

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	1
1.1. Controle Cardiovascular e os receptores periféricos	1
1.2. Sepsenia	1
1.3. Quimiorreflexo e a sepsenia	3
1.4. Ômega-3	4
2. OBJETIVO	4
3.MATERIAIS E MÉTODOS	5
3.1. Animais	5
3.2. Gavagem	6
3.3. Cirurgia de ligação e perfuração do ceco (CLP)	7
3.4. Cirurgia Fictícia	7
3.5. Canulação de vasos para medida da pressão arterial e frequência cardíaca	7
3.6. Teste do quimiorreflexo	8
3.7. Protocolo experimental	8
3.8. Análise dos resultados	9
4- RESULTADOS E DISCUSSÕES	9
5-CONCLUSÃO	15
6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	16

1-INTRODUÇÃO

1.1. Controle Cardiovascular e os receptores periféricos

O sistema cardiovascular possui papel fundamental na regulação dos parâmetros fisiológicos e manutenção da vida. Um bom funcionamento do sistema e a manutenção de uma pressão arterial média (PAM), dentro de estreitas faixas de variação é importante para a homeostase do meio interno. A regulação da PAM é uma das funções mais complexas, que dependem de ações integradas do sistema cardiovascular, respiratório, renal, neural e endócrino (Brody et al., 1980). Neste sentido o sistema nervoso central (SNC) e os seus mecanismos de ajustes são capazes de regular e manter em níveis adequados a PAM a cada momento, ofertando assim, nutrientes para as células. Aferências dos receptores periféricos (pressorreceptores e quimiorreceptores arteriais) enviam informações para o SNC sobre como se encontram a PAM, a concentração de gases no sangue, como por exemplo, o oxigênio (O₂), o gás carbônico (CO₂) e o potencial hidrogeniônico (pH) do organismo; desencadeando respostas homeostáticas seja em situações normais ou durante quadros de desequilíbrio homeostático (Palkovits e Zaborsky, 1974).

Os impulsos provenientes dos receptores periféricos são conduzidos pelos nervos vago e glossofaríngeo até o SNC, mais precisamente até o núcleo do trato solitário (NTS), área esta que está localizada dorsalmente no bulbo, onde estas aferências neurais fazem a primeira conexão sináptica, (Palkovits & Zaborsky, 1974). As informações provenientes dos receptores periféricos são distribuídas para diversas áreas do encéfalo, assim controlando o sistema cardiovascular e respiratório (Guertzeinstein & Silver, 1974; Blessing et al., 1981; Brown & Guyenet, 1984; Ross et al., 1984; Morrison et al. 1989; Guyenet, 1990; De Paula & Machado, 2001; Dampney et al., 2003).

1.2. Sepssemia

Apesar do bom funcionamento do sistema cardiovascular e respiratório contribuir para a manutenção da homeostase do meio interno, algumas alterações podem ocorrer sobre este mencionado sistema, levando a um grave distúrbio homeostático e colocando a vida em risco. Processos patológicos, como por exemplo a sepse, são conhecidos por prejudicarem o bom funcionamento do sistema cardiovascular e respiratório (Sayk et al., 2008; Giusti-Paiva & Santiago, 2010; Santiago et al., 2013).

A sepse é um conjunto de manifestações graves que ocorrem no organismo e são produzidas por uma infecção, causando uma resposta inflamatória sistêmica (RIS) que se não tratada corretamente pode determinar disfunção, falência de um ou mais órgãos, ou até mesmo a morte (Carvalho e Trotta, 2003). Importante, após a sepse ser instalada, os prejuízos podem ocorrer sobre vários órgãos e sistemas e dentre eles, um dos mais afetados é o sistema respiratório. Apontado nos índices de saúde pública, aproximadamente 17% de leitos em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) brasileiras são ocupados por pacientes com sepse grave (ILAS, 2010). O Instituto Latino Americano (ILAS), ainda traz estatísticas de que a taxa de mortalidade alcança a porcentagem de 55% nas UTIs nacionais, com gasto médio de 17 bilhões de reais por ano. Apesar de certo conhecimento da fisiopatologia desta doença, os seus altos índices de mortalidade ainda superam outras doenças como o infarto agudo do miocárdio e o câncer.

A sepse em laboratório pode ser induzida em ratos por uma cirurgia conhecida como ligação e perfuração do ceco (CLP) e este modelo de sepse é conhecido por mimetizar a sepse em humanos como aquela que pode ser causada pela apendicite e diverticulite (Witchterman et al., 1980; Giusti-Paiva & Santiago, 2010; Santiago et al., 2013; Stare et al., 2015).

Recentes resultados demonstraram que a sepse induzida pela cirurgia CLP produz um prejuízo na função ventilatória dos ratos e também uma diminuição nas respostas da ativação do quimiorreflexo (Santiago et al., 2013).

1.3. Quimiorreflexo e a sepsemia

Os quimiorreceptores periféricos são formados por células especializadas que estão localizadas na parede da aorta e na bifurcação das artérias carótida comum (Franchini & Krieger, 1992). Como acima mencionado, eles são responsáveis pelo controle contínuo da pressão parcial dos gases circulantes do sangue (O_2 e CO_2). Por exemplo, quando a pressão parcial de O_2 cai (principal estímulo) ou a pressão parcial de CO_2 aumenta, essas células são mais ativadas e as mesmas (via nervo vago sensitivo e glossofaríngeo) produzem um aumento na atividade do sistema nervoso autônomo (simpático e parassimpático). Esse aumento na atividade autonômica é importante pois promove ajustes cardiovasculares e respiratórios que em última análise, defendem o animal das alterações na pressão parcial dos gases, contribuindo para o controle da homeostase e a sobrevivência das células do organismo.

No trabalho acima citado (Santiago et al., 2013), para testar a atividade dos quimiorreceptores periféricos utilizou-se a injeção endovenosa (iv) de Cianeto de Potássio (KCN), conhecida por ser uma importante ferramenta usada em laboratórios que atua na ativação do quimiorreceptor periférico (Barros et al., 2002). Em ratos não anestesiados, a injeção iv de KCN produz respostas autonômicas de aumento da PAM, queda da frequência cardíaca (FC), aumento da frequência respiratória (taquipnéia), além do efeito comportamental típico exploratório (Haibara et al., 1995; Machado, 2001; Vieira et al., 2004). Importante, Santiago et al. (2013) em seus estudos mostraram que essas respostas autonômicas da ativação do quimiorreceptor periférico, que são constituídas por reflexos completamente independentes, foram abolidas em ratos após um período de 24 horas da cirurgia CLP.

Diante desses achados, questionamentos começaram a surgir, sobre o que poderia ter causado tais comprometimentos sobre o sistema cardiovascular e respiratório em ratos com

sepsis. Frisando que dentre as diferentes sugestões uma que merece destaque é o processo inflamatório, que é conhecido por estar em curso neste animal (Szabo et al., 2015).

1.4. Ômega-3

O ácido graxo poli-insaturado Ômega-3 é encontrado em alguns peixes e sementes e é conhecido por ser importante na saúde animal, contribuindo para a integridade e um bom funcionamento do sistema cardiovascular e SNC (Byelashov et al., 2015). Ademais, o Ômega-3 desempenha um importante papel imunorregulador na defesa do organismo contra uma alta ativação de processos inflamatórios. Lanza-Jacoby et al. (2001), mostrou que a infusão de óleo de peixe em ratos aumenta a capacidade do animal em sobreviver após um período de sepsis, que como acima citado, é conhecido pela intensa inflamação sistêmica. A questão que permanece é se a administração crônica do Ômega-3 em ratos poderia de alguma maneira melhorar ou mesmo defender o animal das modificações funcionais da ativação do quimiorreflexo que foram observadas em estudo anterior (Santiago et al., 2013).

A hipótese é a de que durante a fase inicial da sepsis, o primeiro sistema atingido na sua forma estrutural e funcional poderia ser o sistema respiratório refletindo em um prejuízo sistêmico (pois ocorreria diminuição na oferta de O_2 para as células e assim a morte das mesmas, além do acúmulo de CO_2). No caso do prejuízo funcional, a queda na resposta do quimiorreflexo seria um grave problema pois o animal não se defenderia do empobrecimento nas trocas gasosas e a evolução da sepsis para sepsis grave estaria acelerada.

2. OBJETIVO

Por especificamente este motivo, o objetivo do presente estudo foi verificar se uma dieta crônica e rica em Ômega-3 poderia restaurar as respostas cardiovasculares da ativação do quimiorreflexo em ratos com sepsis.

3-MATERIAIS E MÉTODOS

31. Animais

Foram utilizados ratos Wistar com 60 dias pós-desmame obtidos a partir do Biotério da Universidade Federal de Uberlândia (registro CEUA: 101/15) e mantidos no depositário da área de ciências fisiológicas (bloco 2A). Inicialmente, os animais foram alojados em caixas plásticas brancas (5 animais/caixa) numa sala com temperatura (23 ± 1 °C) e ciclo claro/escuro (12 horas cada) controlado. Os ratos foram distribuídos igualmente e aleatoriamente em dois grupos com 10 em cada, sendo experimental (GE) e controle (GC).

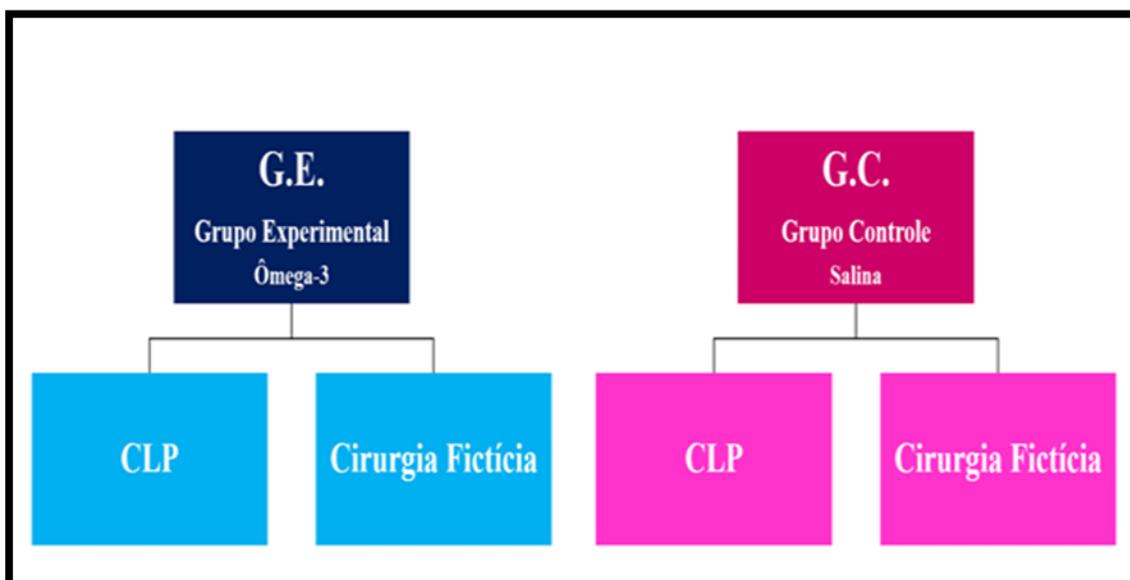


Figura 1: Divisão e subdivisão de cada grupo

Tanto o GE quanto o GC, os animais tiveram livre acesso à água e a ração comercial contendo 0,5% de sódio (Figura 1). O tratamento com Ômega-3 foi realizado através de injeções subcutâneas (sc) do composto adquirido comercialmente. O óleo foi administrado por 60 dias numa dose de 1 g/Kg de peso/dia imediatamente após o desmame. Importante, as cápsulas contendo Ômega-3 possuíam 1000 mg/ml e as doses foram corrigidas pesando os animais 3 vezes por semana (Lucena et al., 2015). No GC, as injeções sc foram de salina (0.1 ml/100 g de peso).

3.2. Gavagem

Interessante, após serem nutridos por 60 dias com Ômega-3 em método sc, os animais do GE, desenvolveram bolsas subcutâneas dorsais, em áreas próximas da aplicação, com a ocorrência do fato, após a conclusão dos experimentos, o material foi recolhido para análise, mostrando-se uma inflamação do tipo granulomatosa (Figura 2), admitindo-se uma mudança



Figura 2: Acúmulo de bolsa inflamatória lateral (seta) nos ratos que receberam injeção de ômega-3 subcutaneamente.

no protocolo da administração das substâncias. O protocolo adotado para os outros grupos de ratos foi o método de Gavagem [(gv) Braga et. al. 2007]. O tratamento com Ômega-3 passou a ser realizado através de uma agulha de Gavagem (aço inox BD-10) com diâmetro de 1,0 mm, esfera de 1,7 mm, raio de 40 mm e comprimento de 31 mm por via oral. O protocolo experimental foi o mesmo utilizado para os grupos que receberam injeções de Ômega-3 sc (figura 1). Importante, a alteração conferida à administração do GC obteve-se apenas na troca da salina por água de torneira.

3.3. Cirurgia de ligação e perfuração do ceco (CLP)

Os ratos foram anestesiados com Ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (8 mg/kg de peso corporal). Após os ratos estarem completamente anestesiados, a região abdominal foi depilada e uma assepsia com álcool 70% foi feita para posterior incisão de aproximadamente 2,5 centímetros na porção inferior ao abdômen. Primeiramente foi cortada a camada da pele e em seguida a camada muscular. O ceco foi retirado da cavidade abdominal e a luz intestinal reduzida por uma ligação acima da válvula íleo-cecal, para evitar a interrupção do trânsito intestinal. Dez pontos em locais avasculares do ceco foram perfurados com uma agulha de 19 G, obtendo extravasamento de pequena quantidade do conteúdo cecal, após ligeira compressão. O ceco foi recolocado na cavidade abdominal e as incisões nas camadas fechadas com fio de Nylon (Santiago et al., 2013).

3.4. Cirurgia Fictícia

A cirurgia foi feita da mesma forma (ítem 3.3), exceto pela não realização da perfuração do ceco, de tal forma, que o órgão foi recolocado na cavidade abdominal seguido de sutura na camada da pele e muscular, com fio de Nylon (Santiago et al., 2013).

Importante, a subdivisão dos animais foi feita da seguinte maneira: Do grupo GE e GC 5 ratos tiveram a cirurgia CLP para indução da sepse e cinco tiveram cirurgia fictícia.

3.5. Canulação de vasos para medida da pressão arterial e frequência cardíaca

Imediatamente após a cirurgia CLP ou cirurgia fictícia, um tubo de polietileno PE 10 foi introduzido na artéria femoral dos ratos. O tubo PE 10 ainda estava conectado com um tubo de polietileno PE 50 que, conduzido subcutaneamente, foi exteriorizado pelo dorso do animal. A veia femoral também foi canulada com tubo de PE 10, conectado com PE 50 e exteriorizado pelo dorso do animal para injeção do KCN, no teste de quimiorreflexo (Vieira et

al., 2004). Após as cirurgias os animais foram colocados em caixas pequenas, individualmente, e tiveram livre acesso à água e a ração comercial.

No dia seguinte, o tubo PE 50 foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um sistema computadorizado de registro (Mac Lab/Power Lab) para o registro dos parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e teste do quimiorreflexo.

3.6. Teste do quimiorreflexo

O quimiorreflexo foi testado através da injeção endovenosa (iv) de Cianeto de potássio (KCN 40 µg/0,1 ml/rato). O KCN é conhecido por ser uma ferramenta importante para se testar o mecanismo quimiorreflexo em ratos não anestesiados (Machado, 2001; Barros et al., 2002; Santiago et al., 2013).

Importante, para alguns ratos, existiu a necessidade de se testar a cânula da veia e para isto foi injetado um agonista adrenérgico Alfa-1, a fenilefrina (5 µg/Kg/ml) bem como o doador de óxido nítrico Nitroprussiato de sódio [NPS (30 µg/Kg/ml)]. A fenilefrina uma vez injetada na veia causa aumento na PAM e como reflexo queda na FC e o NPS causa hipotensão com aumento reflexo da FC (Vieira et al., 2004).

3.7. Protocolo experimental

Respostas cardiovasculares produzidas pela ativação do quimiorreflexo em ratos tratados ou não com Ômega-3 subcutaneamente ou pelo método de gavagem e submetidos à cirurgia CLP ou cirurgia fictícia.

Vinte e quatro horas após a canulação da artéria e veia femoral (como acima descrito), os parâmetros cardiovasculares foram registrados nos ratos não anestesiados (sépticos ou não). Após aproximadamente 20 minutos de registro basal, foi injetado KCN (40 µg/0,1 ml/rato) iv

gavagem [G (+ 2 ± 0,8 mmHg e - 10 ± 5 bpm, barra verde)] em ratos com sepse (S). Importante notar um agravante, tanto o tratamento com Ômega-3 sc (+ 5 ± 3 mmHg e - 5 ± 2 bpm, barra pink) quanto o tratamento por gavagem [G (+ 20 ± 1 mmHg e - 80 ± 6 bpm, barra ciano)] também produziram abolição e atenuação, respectivamente das respostas do quimiorreflexo em ratos controles (C - sem sepse). Do grupo de ratos que estava recebendo gavagem, dois ratos foram retirados da administração de Ômega-3 por gavagem por 10 dias. Após esse período, foi testado o quimiorreflexo e observamos que as respostas apareceram normalmente [R (+ 40 ± 6 mmHg e - 200 ± 12 bpm, barra ciano escuro)]. Os resultados estão representados na figura 3.

Os quimiorreceptores periféricos são ativados pelo KCN (Barros et al., 2002). A figura 4 representa o esquema sugerido para o aparecimento das respostas cardiovasculares produzidas pela injeção de KCN (modificado de Vieira, A.A. 2008). Projeções dos quimiorreceptores periféricos ascendem ao sistema nervoso central (SNC) e fazem a primeira sinapse na porção comissural do NTS (NTScom). A partir dessa primeira sinapse, duas vias são ativadas, uma simpato e outra parassimpato-excitatória ocasionando resposta pressora e bradicárdica, respectivamente. No esquema apresentado a resposta pressora produzida pela ativação dos quimiorreceptores periféricos envolve um complexo circuito entre áreas do tronco encefálico e áreas do hipotálamo, por exemplo o núcleo paraventricular (NPV), além da participação de áreas responsáveis pelo comportamento defensivo. Importante, esse aumento da atividade autonômica promove ajustes cardiovasculares e respiratórios que defende o animal contra o desbalanço na pressão parcial dos gases, contribuindo para a manutenção da homeostase.

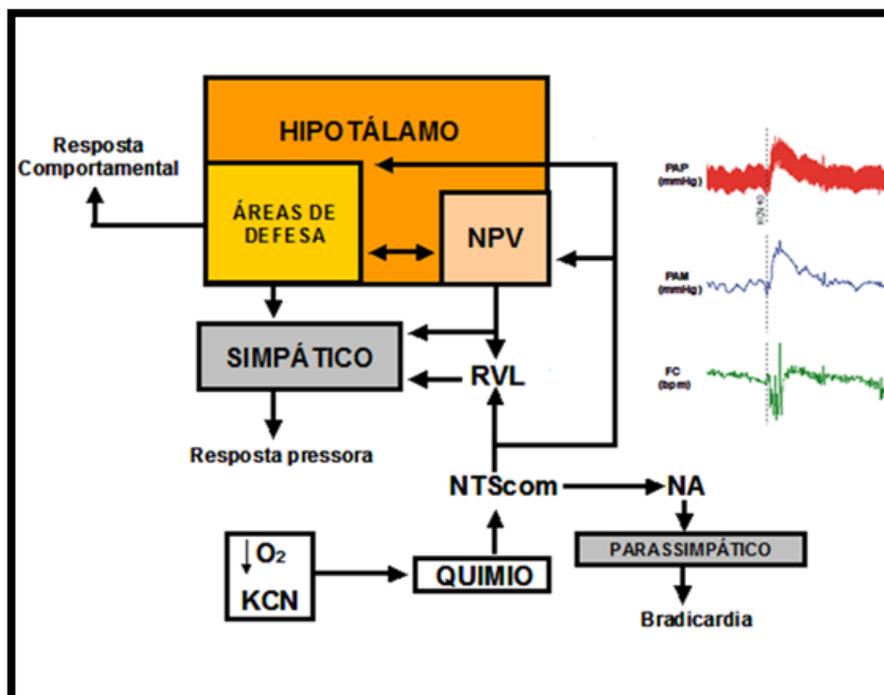


Figura 4: Esquema dos diferentes mecanismos que são ativados pelo quimiorreflexo.

Modificado de Vieira, A.A. 2008.

Os nossos resultados fortalecem dados anteriores mostrando que 24 horas após a sepse ser instalada pela cirurgia CLP, as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo são abolidas (Santiago et al., 2013). Os mecanismos pelo qual isto ocorre ainda não estão bem claros e pode envolver desde a liberação periférica ou central de óxido nítrico (Giusti-Paiva e Santiago, 2010) até atenuação de diferentes mecanismos centrais como o angiotensinérgico e vasopressinérgico (Landry et al., 1997; Corrêa et al., 2007; Giusti-Paiva e Santiago, 2010).

Uma outra sugestão para se tentar explicar a abolição das respostas cardiovasculares do quimiorreflexo é o efeito da inflamação nos diferentes processos fisiológicos. Por exemplo, após a sepse ser instalada pela cirurgia CLP, um aumento das citocinas e outros mediadores inflamatórios poderiam "agredir" o pulmão e/ou as próprias células dos quimiorreceptores periféricos prejudicando a atividade dos mesmos. Este último, os quimiorreceptores periféricos, estariam menos responsivos às alterações dos gases circulantes no sangue e não responderiam ao teste com KCN.

Por especificamente este motivo, o tratamento com Ômega-3 foi testado, isto porque o Ômega-3 é visto por ser uma substância que possui características imuno-moduladora e anti-inflamatória (Lanza-Jacoby et al., 2001). A hipótese inicial era de que o Ômega-3 poderia restaurar as respostas do KCN porém o que nós observamos foi totalmente diferente, ou seja, além do Ômega-3 não defender o animal em sepsis contra a destruição do quimiorreflexo, ele por si só, causou uma abolição destas respostas. A principal sugestão por ter ocorrido este resultado foi que o tratamento crônico com Ômega-3 causou um acúmulo de líquido no espaço subcutâneo, e com isto foi visto um desenvolvimento de inflamação tecidual (figura 2). Embora alguns estudos afirmem que a adesão do Ômega-3 resulta na supressão de citocinas pró-inflamatórias (Calder, 2002; Cavaglieri et al., 2003) o método utilizado, permitiu a afirmação de que, a administração da substância por via sc, poderia causar produção de citocinas pró-inflamatórias e a expressão de moléculas de adesão para sustentar o influxo de células, mostrando-se capaz de induzir uma inflamação crônica do tipo granulomatosa (Braga et al., 2007). Neste caso, a inflamação produzida pela injeção sc de Ômega-3 também foi capaz de abolir as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

Vale a pena ressaltar que tanto os ratos com sepsis quanto os controles que foram tratados com Ômega-3 sc também não exibiram respostas comportamentais, que são descritas (Haibara et al., 2002; Antunes et al., 2005) após a ativação do quimiorreflexo evidenciando talvez que o processo inflamatório poderia estar em curso. Este resultado foi importante e levanta questões sobre a possibilidade de outros tipos de inflamações sistêmicas poderem destruir a atividade dos quimiorreceptores periféricos e com isto colocar em risco a vida do animal.

Em um segundo teste experimental, o protocolo de administração foi modificado para a gavagem, a fim de evitar a inflamação tecidual acima mencionada e melhor observar a ação do Ômega-3 sobre as respostas da ativação dos quimiorreceptores periféricos. Os nossos

resultados mostraram que o tratamento com Ômega-3 por gavagem também não restaurou as respostas cardiovasculares do quimiorreceptor periférico. Além disto e ainda de forma alarmante, a gavagem com Ômega-3 em ratos controles (sem sepse) também atenuou de forma significativa as respostas do KCN. Ainda não estão bem claros os mecanismos pelo qual essa atenuação ocorreu pois esse protocolo aparentemente não ocasionou inflamação tecidual.

Os ácidos graxos poli-insaturados Ômega-3 provém da dieta a partir dos ácidos alfa-linolênico, pela ação de diferentes enzimas (Martins et al., 2006). Interessante, o Ômega-3, que é encontrado em alguns peixes e sementes é visto como necessário para processos metabólicos e manutenção da fisiologia da membrana celular como geração e propagação de atividade elétrica (Youdim et al. 2000; Yehuda et al., 2002). Uma das possíveis hipóteses seria a ação destes ácidos graxos em áreas do SNC que controlariam as respostas do quimiorreflexo, por exemplo no NTScom (figura 4).

Sinais que partem dos quimiorreceptores periféricos fazem a primeira sinapse no NTCcom antes de ativarem outras vias encefálicas que controlam a atividade neuro-humoral do sistema cardiovascular. No tronco encefálico, o NTScom está localizado acima do canal central, abaixo da área postrema e próximo ao quarto ventrículo. Lesões eletrolíticas do NTScom abolem as respostas pressora e bradicárdica produzidas pela ativação do quimiorreflexo com KCN em ratos acordados (Vieira et al., 2012). Uma das hipóteses seria de que o tratamento crônico com Ômega-3 estaria diminuindo a atividade do NTScom em resposta ao quimiorreflexo e assim contribuindo para a atenuação das respostas do KCN. Importante, sabe-se que o Ômega-3 pode produzir modificação no metabolismo mitocondrial com elevação de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células tumorais no cérebro (Leonelli et al., 2011). Neste trabalho citado, o Ômega-3 de forma benéfica desacelerou o crescimento tumoral, porém, em situações normais, o aumento de ROS poderia não ser

totalmente benéfico, principalmente se as áreas atingidas fossem importantes para o controle da atividade cardiovascular por exemplo, o NTScom e também outras envolvidas nestes mecanismos de ajuste do quimiorreflexo como o núcleo paraventricular do hipotálamo, área rostro ventrolateral do bulbo e núcleo ambíguo (figura 4).

Importante, nestes ratos controles (sem sepse) com gavagem de Ômega-3, as respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo foram atenuadas e não abolidas como ocorreu com Ômega-3 sc. Além disto, foi observado que o KCN produziu efeitos comportamentais (Haibara et al., 2002; Antunes et al., 2005) mais proeminentes sugerindo que o efeito comportamental dos ratos possa facilitar o aparecimento de algumas respostas cardiovasculares, como por exemplo a pressora.

Ainda de forma interessante, podemos pensar que não apenas as áreas acima mencionadas poderiam ter suas atividades atenuadas durante o tratamento crônico com Ômega-3 por gavagem mais também a própria atividade dos quimiorreceptores periféricos. Quando a pressão parcial de O_2 no sangue diminui, os quimiorreceptores periféricos, aórtico e carotídeo aumentam a frequência de potenciais de ação direcionadas para o tronco encefálico. A hipótese seria que se o problema estivesse ocorrendo diretamente nas células dos quimiorreceptores, a informação elétrica partiria com menor frequência destes quimiorreceptores e em última análise, as áreas do tronco encefálico não receberiam de maneira adequada as informações sobre a pressão parcial de O_2 .

Visto que o próprio Ômega-3 via gavagem estava atenuando as respostas do quimiorreflexo em ratos controles (sem sepse) nós resolvemos retirar alguns ratos do tratamento por 10 dias. Os nossos resultados sugerem que realmente algum mecanismo ativado pelo Ômega-3 estava causando a atenuação pois após a retirada, as respostas, pressora e bradicárdica do quimiorreflexo foram normais.

Os nossos resultados confirmaram que a sepse abole as respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo em ratos acordados (Santiago et al., 2013). Além disso, o tratamento crônico com Ômega-3 tanto subcutaneamente quanto via gavagem não restauraram essas respostas. No caso do tratamento subcutâneo, existe o fator da inflamação que foi causado (Braga et al., 2007), assim acreditamos que é inviável o modelo. Já o tratamento crônico via gavagem com Ômega-3, não causou inflamação, porém atenuou as respostas cardiovasculares do quimiorreflexo.

Se a atenuação do mecanismo quimiorreflexo pelo Ômega-3, no caso da gavagem é benéfica ou não, ainda é motivo de discussão. Isto porque, em nosso cotidiano as respostas do quimiorreceptor periférico nos servem como mecanismos de alerta e defesa contra potenciais mudanças nas pressões parciais dos gases circulantes. Neste caso, um prejuízo nestas respostas que deveriam ser rápidas poderiam colocar a vida em risco. Por outro lado, algumas patologias como apneia obstrutiva do sono são conhecidas por causarem cronicamente hipertensão pelo fato de existir uma alta atividade dos quimiorreceptores periféricos e atividade simpática. No caso particular da apneia, alguns poderiam levantar a hipótese de que o tratamento com Ômega-3 causaria uma diminuição na atividade do quimiorreceptor e conseqüentemente na pressão arterial. Neste caso, mais estudos são necessários para se avaliar esta hipótese.

5-CONCLUSÃO

O tratamento com Ômega-3 não restaura as respostas da ativação do quimiorreflexo que são abolidas durante a sepse.

6-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANTUNES, V.R., BONAGAMBA, L.G. e MACHADO, B.H. Hemodynamic and respiratory responses to microinjection of ATP into the intermediate and caudal NTS of awake rats. *Brain Res.*, 1032(1-2):85-93, 2005.

BARROS, R.C.H., BONAGAMBA, L.G.H., OKAMOTO-CANESIN, R., DE OLIVEIRA, M., BRANCO, L.G.S e MACHADO, B.H. Cardiovascular responses to chemoreflex activation with potassium cyanide or hypoxic hypoxia in awake rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, 97(2):110-115, 2002.

BLESSING, W.W., GOODCHILD, A.K., DAMPNEY, R.A. e CHALMERS, J.P. Cell groups in the lower brain stem of the rabbit projecting to the spinal cord, with special reference to catecholamine-containing neurons. *Brain Res.*, 221(1):35-55, 1981.

BRAGA, D.K., OLIVEIRA, F.M., SILVA, A.C., DA SILVA, G., MURADAS, R.F., GUSMÃO, L.J. e MARTINS, T. Modulação da inflamação por Ômega -3/6. *Salusvita*, 27(3): 275-282, 2007.

BRODY, M.J. e JOHNSON, A.K. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension, In: L. Martini, W.F. Ganong (Eds.), *Frontiers in Neuroendocrinology*, Vol. 6, Raven Press, New York, pp. 249-292, 1980.

BROWN, D.L. e GUYENET, P.G. Cardiovascular neurons of brainstem with projections to spinal cord. *Am. J. Physiol.*, 247:R1009-R1016, 1984.

BYELASHOV, O.A., SINCLAIR A.J. e KAUR, G. Dietary sources, current intakes, and nutritional role of omega-3 docosapentaenoic acid. *Lipid Technol* 27: 79-82, 2015.

CALDER, P.C. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc. Nutr. Soc.*, 61:345-358, 2002.

CARVALHO, P.R.A e TROTTA, E.A. Advances in sepsis diagnosis and treatment. *Journal Pediat.* 70(Supl.2): S195-S2014, 2003.

CAVAGLIERI, C.R., NISHIYAMA, A., FERNANDES, L.C., CURI, R., MILES, E.A. e CALDER, P.C. Differential effects of short-chain fatty acids on proliferation and production of pro-and anti-inflammatory cytokines by cultured lymphocytes. *Life Sci.*, 73:1683-1690, 2003.

CORRÊA, P.B.F., TRÉS PANCOTO, J.A., De OLIVEIRA-PELEGRIM, G.R., CÁRNIO, E.C. e ROCHA, M.J.A. Participation of iNOS-derived NO in hypothalamic activation and vasopressin release during polymicrobial sepsis. *Journal of Neuroimmunology*, 183:17-25, 2007.

DAMPNEY, R.A.L., HORIUCHI, J., TAGAWA, T., FONTES, M.A.P., POTTS, D. e POISON, J.W. Medullary and supramedullary mechanisms regulating sympathetic vasomotor tone. *Acta Physiol. Scand.*, 177:209-218, 2003.

DE PAULA, P.M. e MACHADO, B.H. Changes in regional vascular resistance in response to microinjection of L-glutamate into different antero-posterior coordinates of the RVLM in awake rats. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 87:301-309, 2001.

FRANCHINI, K.G. e KRIEGER, E.M. Carotid chemoreceptors influence arterial pressure in intact and aortic-denervated rats. *Am J Physiol.*, 262(4 Pt 2):R677-83, 1992.

GIUSTI-PAIVA, A. e SANTIAGO, M.B. Neurohypophyseal dysfunction during septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 10, 247-51, 2010.

GUERTZEINSTEIN, P.G. e SILVER, A. Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J. Physiol.*, 242:489-503, 1974.

GUYENET, P.G. Role of the ventral medulla oblongata in blood pressure regulation. In *Central Regulation of Autonomic Functions*. A.D. Loewy & K.M. Spyer, Eds.:145-167. Oxford University Press. New York, 1990.

HAIBARA, A.S., COLOMBARI, E., CHIANCA, D.A.JR., BONAGAMBA, L.G.H. e MACHADO, B.H. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor responses of chemoreflex. *Am. J. Physiol.* 269 (Heart Circ. Physiol., 38):H1421-H1427, 1995.

HAIBARA, A.S., TAMASHIRO, E., OLIVAN, M.V., BONAGAMBA, L.G e MACHADO, B.H. Involvement of parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Autonon. Neurosci.*, 101(1-2):60-67, 2002.

ILAS - Implementação da campanha sobrevivendo a sepse pelo Instituto Latino Americano
Disponível em: www.sepsisnet.org/PDF/SSC_Participe.pdf. Acesso em 05 jan. 2017 às 10:46.

LANDRY, D.W., LEVIN, H.R., GALLANT, E.M., ASHTON Jr, R.C., SEO, S. D'ALESSANDRO, D., OZ, M.C. e OLIVER, J.A. Vasopressin deficiency contributes to the vasodilation of septic shock. *Circulation*, 95:1122-1125, 1997.

LANZA-JACOBY, S., FLYNN, J.T. e MILLER, S. Parenteral supplementation with a fish-oil emulsion prolongs survival and improves rat lymphocytes function during sepsis. *Nutrition* 17: 112-6, 2001.

LEONELLI, M., GRACINO, M.F.R. e BRITTO, L.R.G. TRP channels, omega-3 fatty acids, and oxidative stress in neurodegeneration from the cell membrane to intracellular cross-links. *Braz J Med Biol Res.*, 44(11):1088-1096, 2011.

LUCENA, C.F., ROMA, L.P., GRACIANO, M.F., VERAS, K., CURI, D. e CARPINELLI, A.R. Ômega-3 supplementation improves pancreatic islet redox status: in vivo and in vitro studies. *Pancreas*, 44: 287-95, 2015.

MACHADO, B. H. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann. New York Acad. Sci.*, 940:179-196, 2001.

MARTIN, C.L., De ALMEIDA, V.V., RUIZ, M.R., VISENTAINER, J.E.L., MATSHISHITA, M., De SOUZA, N.E. e VISENTAINER, J.V. Ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 e ômega-6: Importância e ocorrência em alimentos. *Ver. Nutr.*, 19(6):761-770, 2006.

MORRISON, S.F., CALLAWAY, J., MILNER, T. e REIS, D.J. Glutamate in the spinal sympathetic intermediolateral nucleus: Localization by light and electron microscopy. *Brain Res.*, 503:5-15, 1989.

PALKOVITS, M. e ZABORSKY, L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarii: Afferent and efferent neuronal connections in relation to the baroreceptor reflex arch. *Prog. Brain Res.*, 47:9-34, 1974.

ROSS, C.A., RUGGIERO, D.A., PARK, D.H., JOH, T.H., SVED, A.F., FERNANDEZ-PARDAL, J., SAAVEDRA, J.M. e REIS, D.J. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: Effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate and plasma catecholamines and vasopressina. *J. Neurosci.*, 4:474-494, 1984.

SANTIAGO, M.B., VIEIRA, A.A. e GIUSTI-PAIVA, A. Impaired chemoreflex sensitivity during septic shock induced by cecal ligation and perforation. *Canadian Journal Physiol. Pharmacol.*, 91(12):1107-1111, 2013.

SAYK F., VIETHEER, A., SCHAAF, B., WELLHOENER, P., WEITZ, G., LEHNERT, H. e DODT, C. Endotoxemia causes central downregulation of sympathetic vasomotor tone in healthy humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 295, R891-8, 2008.

STARE, J., SIAMI, S., TRUDEL, E., PRAGER-KHOUTORSKY, M., SHARSHAR, T. e BOURQUE, C.W. Effects of peritoneal sepsis on rat central osmoregulatory neurons mediating thirst and vasopressin release. *J Neurosci.*, 35:12188-97, 2015.

SZABO, P.A., ANANTHA, R.V., SHALER, C.R., McORMICK, J.K. e HAERYFAR, S.M. CD1d-and MR1-Restricted T cells in Sepsis. *Front Immunol.*, 6:1-23, 2015.

VIEIRA, A.A., DE LUCA JR, L.A., COLOMBARI, D.S.A., COLOMBARI, E. e MENANI, J.V. Cardiovascular responses to microinjections of L-glutamate into the NTS in AV3V-lesioned rats. *Brain Res.*, 1025:106-112, 2004.

VIEIRA, A.A., DE LUCA JR, L.A., COLOMBARI, E., COLOMBARI, D.S.A. e MENANI, J.V. Commissural NTS lesions enhance the pressor response to central adrenergic and cholinergic activation. *Neurosc. Letter.*, 521(1):31-6, 2012.

WICHTERMAN, K.S., BAUE, A.E. e CHAUDRY, I.H. Sepsis and septic shock— a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.*, 29:189–201, 1980.

YEHUDA, S., RABINOVITZ, S., CARASSO, R.L. e MOSTOFSKY, D.I. The role of polyunsaturated fatty acids in restoring the aging neuronal membrane. *Neurobiol Aging*, 23(5):843-53, 2002.

YOU DIM, K.A., MARTIN, A. e JOSEPH, J.A. Essential fatty acids and the brain: possible health implications. *Int J Dev Neurosc.*, 18(4/5):383-99, 2000.