

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AMANDA VALNIER STECKERT

AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS EM FASES INICIAIS E TARDIAS EM
RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2014

UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE
UNIDADE ACADÊMICA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

AMANDA VALNIER STECKERT

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS NEUROQUÍMICOS E
COMPORTAMENTAIS EM FASES INICIAIS E TARDIAS EM
RATOS SOBREVIVENTES À SEPSE**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Felipe Dal Pizzol
Coorientador: Prof. Dr. João Quevedo

CRICIÚMA, AGOSTO DE 2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

S811a Steckert, Amanda Valnier.

Avaliação de parâmetros neuroquímicos e comportamentais em fase iniciais e tardias em ratos sobreviventes à SEPSE / Amanda Valnier Steckert; orientador: Felipe Dal Pizzol, coorientador: João Quevedo. – Criciúma, SC : Ed. do Autor, 2014.

113 p: il. ; 21 cm.

Tese (Doutorado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, SC, 2014.

1. Septicemia. 2. Citocinas. 3. Estresse oxidativo. 4. Metabolismo energético. 5. Proteína quinase. I. Título.

CDD. 22ª ed. 616.944



UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria Nº 1.919 de 03.06.2005

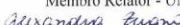
PARECER

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Tese de DOUTORADO apresentada pela candidata **Amanda Valmier Steckert** sob o título “**Avaliação de parâmetros neuroquímicos e comportamentais em fases iniciais e tardias em ratos sobreviventes à sepse**” para obtenção do grau de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela “**APROVAÇÃO**” da Tese, com conceito A.

Criciúma, SC, 18 de agosto de 2014.


Profa. Dra. **PATRICIA FERNANDA SCHUCK**
Membro Relator - UNESC


Profa. Dra. **ALEXANDRA IOPPI ZUGNO**
Membro interno - UNESC


Profa. Dra. **GISLAINE TEZZA REZIN**
Membro externo – UNISUL


Prof. Dr. **FRANCISCO GARCIA SORIANO**
Membro externo – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo


Prof. Dr. **Felipe Dal Pizzol**
Orientador


Prof. Dr. **Claudio Teodoro de Souza**
Coordenador do PPGCS

FOLHA INFORMATIVA

A tese foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional conforme normas constantes na Resolução n° 02/2013, propostas pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Este trabalho foi realizado nas instalações dos Laboratórios de Neurociências e de Fisiopatologia Experimental, ambos vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense e no Laboratório de Psiquiatria Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Aos meus pais, Selo e Zenir, por terem me dado o peixe, ensinando-me a pescar. Amor pleno, completo e absoluto!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Selso e Zenir, que mais do que me proporcionar uma boa infância e vida acadêmica, formaram os fundamentos do meu caráter e me apontaram o caminho do bem. Aos meus irmãos Charles, Fernando e Rafael; minhas cunhadas Joelma, Katiane e Edevalda e meus sobrinhos Nicolás e Sofia (amores da “TiAmanda”), obrigada por serem a minha referência para tudo e estarem presentes na minha vida de forma tão indispensável.

Ao professor Dr. Felipe Dal Pizzol, pela constante participação na minha formação acadêmica, desde a Iniciação Científica, no Mestrado e agora no Doutorado. Muitíssimo obrigada pela oportunidade e pelo aprendizado oriundo de um pesquisador admiravelmente completo!

Ao professor Dr. João Quevedo, que a essa altura é quase desnecessário dizer que ele tem a virtude de saber ser não só um grego entre os romanos, mas, também, um romano entre os gregos – quando necessário. Obrigada pela oportunidade e pela confiança em mim depositada durante todos esses anos!

Aos meus queridos colaboradores: Diogo Domingui (meu companheiro dos cafés), Felipe Ornell (parceiro de todas as horas), Francielle Mina (a “Periquitita”), Bruna Mendonça (o motivo das minhas melhores risadas), Dhébora Dall’Igna (meu docinho, amiga especial), Monique Michels (sempre gentil e solícita), Francieli Vuolo, Gabriela Ferreira (muitas caronas, infinitas risadas), Milena Silva, Júlia Vieira e aos professores Dr. Emilio Streck (o “Xuxa”), Dra. Clarissa Comim e Dra. Josiane Budni (pelo sorriso no rosto e disposição para esclarecer dúvidas e auxiliar sempre que necessário) que me ajudaram, de diversas maneiras, a dar forma a este estudo. Na UFRGS, agradeço à Gabriela Colpo, à Carolina Gubert e ao professor Dr. Flávio Kapczinski pela colaboração nos experimentos que fazem parte desta tese.

Aos integrantes dos laboratórios de Neurociências e de Fisiopatologia Experimental da UNESC, pelo companheirismo, pelas experiências compartilhadas durante esses anos e pelos vários momentos de descontração. Obrigada por fazerem dessa rotina algo muito mais produtivo e divertido!

Aos professores do PPGCS-UNESC, pela oportunidade de aprendizado e amizade formada, ainda que num convívio breve em alguma disciplina. Em especial, agradeço às professoras MSc Maria Júlia Angeloni, por me deixar vivenciar o papel de um professor, entrando em contato com tudo o que é exigido na docência universitária;

Dra. Patrícia Schuck (a “Pati”, como ela faz questão de ser chamada), por quem tenho enorme respeito e admiração; Dra. Alexandra Zugno (a “Cuca”), por todo o aprendizado e ótima convivência durante todos esses anos e Dra. Tatiana Barichello, pela oportunidade de continuar no ambiente acadêmico aprendendo ainda mais.

Aos órgãos de fomento (CAPES e UNESC), pela concessão da bolsa de estudos e pelo auxílio financeiro necessário a execução dos experimentos que compõem esta tese.

Aos amigos e demais familiares, pelo incentivo constante, pelos gestos de carinho e amizade e por não me deixarem desistir diante das dificuldades – e acreditem, foram muitas. Aqui, cabe um agradecimento especial à Chellen Nagel, por me encorajar em todos os aspectos da vida, à Bruna de Souza, por ser a irmã que o coração escolheu e à Samira Valvassori, por ser minha fonte inesgotável de aprendizado.

E, por tudo, agradeço a Deus.

Mais uma etapa foi concluída. Sei que ainda é só o começo...

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do Homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira.”

(Rui Barbosa)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar parâmetros neuroquímicos e comportamentais em fases iniciais e tardias em ratos submetidos ao modelo animal de sepse induzido por ligação e perfuração cecal. No experimento I, ratos Wistar machos (60 dias, 250-300g) foram divididos entre os grupos Sham (controle), Sepse 30 dias e Sepse 60 dias, com n=12. Após, foram retirados o córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex para análises dos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); conteúdo de grupos carbonila; atividade dos complexos I, II, II-III e IV da cadeia respiratória mitocondrial e da enzima creatina quinase (CK). O fluido cerebrospinal foi coletado para quantificação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6, com n=5. No experimento II, os animais foram divididos entre os grupos Sham, Sepse e Sepse+Butirato de sódio (SB) (24 horas e 10 dias), com n=12. Por meio de cirurgia estereotáxica, SB ou fluido cerebrospinal artificial foram injetados no ventrículo lateral cerebral dos animais. Em 24 horas e 10 dias após, foram retirados o córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex, para análise da atividade de histonas desacetilases (HDAC). O teste de esQUIVA inibitória foi realizado 10 dias após a indução de sepse. No experimento III, os animais foram divididos entre os grupos sham e sepse 24 horas e 10 dias, com n=5. Após, o hipocampo foi retirado para quantificação dos níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK por *Western blotting*. Os resultados do Experimento I mostraram um aumento nos níveis de IL-6 no grupo sepse (30 dias); aumento nos níveis de TNF- α no grupo sepse (60 dias); um aumento nos níveis de TBARS em córtex pré-frontal e uma diminuição destes níveis em hipocampo, estriado e córtex no grupo sepse (30 dias); uma diminuição do conteúdo de grupos carbonila em córtex pré-frontal e um aumento em estriado no grupo sepse (30 dias); uma diminuição nos níveis de TBARS em hipocampo no grupo sepse (60 dias); aumento do conteúdo de grupos carbonila em estriado no grupo sepse (60 dias). Também houve um aumento na atividade do complexo IV em hipocampo no grupo sepse (30 dias); uma diminuição na atividade do complexo I em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado no grupo sepse (60 dias) e nenhuma diferença estatística na atividade da CK entre as estruturas cerebrais analisadas. Todos os dados foram analisados comparando o grupo sepse (30 e 60 dias) com o grupo sham. Já os resultados do Experimento II mostraram uma diminuição no tempo de

latência nos animais do grupo sepse (10 dias) no teste de esquiva inibitória e a administração de SB reverteu o dano cognitivo observado nestes animais. Também foi observado um aumento na atividade de HDACs em hipocampo e córtex no grupo sepse (24 horas) e em córtex pré-frontal e hipocampo no grupo sepse (10 dias). Além disso, a administração de SB inibiu a atividade de HDACs em córtex pré-frontal e hipocampo dos animais do grupo sepse (10 dias). Todos os dados foram analisados comparando o grupo sepse (24 horas e 10 dias) com o grupo sham. Por fim, os resultados do Experimento III mostraram que não houve diferença significativa entre os grupos sham e sepse nos níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK em 24 horas e 10 dias após a sepse. Tomados em seu conjunto, os dados deste estudo podem contribuir para a compreensão do dano cognitivo observado em ratos sobreviventes à sepse, proporcionando novos conhecimentos que possam ter relevância clínica.

Palavras-chave: Citocinas; Dano oxidativo; Histonas desacetilases; Metabolismo energético; Proteínas MAPK; Sepse.

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate neurochemical and behavioral parameters in early and late phases in male Wistar rats (60 days old, 250-300g) subjected to an animal model of sepsis induced by cecal ligation and perforation. This work was divided in 3 steps: in the Experiment I, the animals were divided into groups Sham (control), Sepsis 30 days or Sepsis 60 days, with n=12. After, were dissected the prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cortex in order to evaluate thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) levels; carbonyl groups; activities of complexes I, II, II-III and IV of the mitochondrial respiratory chain and creatine kinase (CK). The cerebrospinal fluid was collected for quantification of TNF- α , IL-1 β and IL-6 cytokines, with n=5. In the Experiment II, the animals were divided into groups Sham, Sepsis and Sepsis+Sodium butyrate (SB), for (24 hours and 10 days), with n=12. SB or artificial cerebrospinal fluid were injected in the lateral ventricle in the brain of animals. After 24 hours or 10 days were dissected prefrontal cortex, hippocampus, striatum and cortex for histone deacetylase (HDAC) activity analysis. The inhibitory avoidance test was performed after 10 days of sepsis induction. In Experiment III, the animals were subjected to sham or sepsis 24 hours and 10 days, with n=5. After, the hippocampus was dissected for quantification of the phosphorylation levels of proteins ERK1/2, JNK1/2 and p38MAPK by Western blotting. The results of Experiment I showed increased levels of IL-6 in the sepsis group (30 days); increased levels of TNF- α in the sepsis group (60 days); increased levels of TBARS in the prefrontal cortex and decreased in the hippocampus, striatum and cortex in the sepsis group (30 days); decreased carbonyl groups in the prefrontal cortex and the striatum and increased in the sepsis group (30 days); decreased levels of TBARS in the hippocampus in the sepsis group (60 days); increased carbonyl groups in the striatum in sepsis group (60 days); increased complex IV activity in the hippocampus in the sepsis group (30 days); decreased complex I activity in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum in the sepsis group (60 days) and no statistical difference of CK activity in all analyzed brain structures. All data were analyzed by comparing the sepsis group (30 and 60 days) with the sham group. The results of Experiment II showed a decrease in latency in the animals of sepsis group (10 days) in the inhibitory avoidance test and the administration of SB reversed the cognitive damage observed in these animals. There was also an increase in

HDACs activity in hippocampus and cortex in the sepsis group (24 hours) and prefrontal cortex and hippocampus in sepsis group (10 days). Moreover, the administration of SB inhibited HDAC activity in the prefrontal cortex and hippocampus of animals from sepsis group (10 days). All data were analyzed by comparing the sepsis group (24 hours and 10 days) with the sham group. The results of Experiment III showed no statistical difference between the sham and sepsis groups on the levels of phosphorylation of proteins ERK1/2, JNK1/2 and p38MAPK in 24 hours and 10 days after sepsis induction. Taken together, the results of the present study may contribute for comprehending the cognitive damage observed in sepsis survivor rats, providing new insights that might have clinical relevance.

Keywords: Cytokines; Oxidative damage; Histone deacetylase; energetic metabolism; MAPK proteins; Sepsis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs).....	35
Figura 2 - Níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em 30 dias após a sepse	58
Figura 3 - Níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em 60 dias após a sepse.....	59
Figura 4 - Níveis de TBARS em 30 dias após a sepse.....	60
Figura 5 - Níveis de grupos carbonila em 30 dias após a sepse.....	60
Figura 6 - Níveis de TBARS em 60 dias após a sepse.....	61
Figura 7 - Níveis de grupos carbonila em 60 dias após a sepse.....	62
Figura 8 - Atividade do complexo I em 30 dias após a sepse.....	63
Figura 9 - Atividade do complexo II em 30 dias após a sepse.....	63
Figura 10 - Atividade do complexo II-III em 30 dias após a sepse.....	64
Figura 11 - Atividade do complexo IV em 30 dias após a sepse.....	64
Figura 12 - Atividade do complexo I em 60 dias após a sepse.....	65
Figura 13 - Atividade do complexo II em 60 dias após a sepse.....	66
Figura 14 - Atividade do complexo II-III em 60 dias após a sepse.....	66
Figura 15 - Atividade do complexo IV em 60 dias após a sepse.....	67
Figura 16 - Atividade da creatina quinase em 30 dias após a sepse.....	68
Figura 17 - Atividade da creatina quinase em 60 dias após a sepse.....	69
Figura 18 - Teste de esquiva inibitória em 10 dias após a sepse.....	70
Figura 19 - Atividade de histonas desacetilases em 24 horas após a sepse.....	71
Figura 20 - Atividade de histonas desacetilases em 10 dias após a sepse.....	71
Figura 21 (A e B) - Níveis de fosforilação da proteína ERK1/2 em 24 horas (A) e em 10 dias (B) após a sepse.....	73
Figura 22 (A e B) - Níveis de fosforilação da proteína JNK1/2 em 24 horas (A) e em 10 dias (B) após a sepse.....	74
Figura 23 (A e B) - Níveis de fosforilação da proteína p38MAPK em 24 horas (A) e em 10 dias (B) após a sepse.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS

- ACCP – Colégio Americano de Médicos do Tórax (do inglês *American College of Chest Physicians*)
- ACSF – Fluido cerebrospinal artificial (do inglês *artificial cerebrospinal fluid*)
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- ATP – Trifosfato de adenosina (do inglês *adenosine triphosphate*)
- BDNF – Fator neurotrófico derivado do cérebro (do inglês *brain-derived neurotrophic factor*)
- BHE – Barreira hematoencefálica
- BSA – Albumina bovina sérica (do inglês *bovine serum albumin*)
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais
- CK – Creatina quinase (do inglês *creatine kinase*)
- CLP – Ligação e perfuração cecal (do inglês *cecal ligation puncture*)
- CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
- DCIP – 2,6 diclorofenol-indofenol (do inglês *2,6-dichlorophenolindophenol*)
- DFX – Desferroxamina
- DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês *deoxyribonucleic acid*)
- DNPH – Dinitrofenilidrazina (do inglês *dinitrophenylhydrazine*)
- DO – Densidade óptica
- ERK – Proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares (do inglês *extracellular signal-regulated kinases*)
- ERO – Espécies reativas de oxigênio
- HAT – Histona acetiltransferase
- HDAC – Histona desacetilase
- HPA – Eixo hipotálamo-pituitário-adrenal
- IL-1 β – Interleucina-1 beta
- IL-6 – Interleucina 6
- IL-8 – Interleucina 8
- JNK – Proteínas quinases c-Jun NH₂-terminal (do inglês *c-Jun N-terminal kinases*)
- LPS – Lipopolissacarídeo
- MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno (do inglês *mitogen-activated protein kinase*)
- MAPKK – MAP quinase quinase (do inglês *MAP kinase kinase*)
- MAPKKK – MAP quinase quinase quinase (do inglês *MAP kinase kinase kinase*)
- MDA – Malondialdeído
- NAC – N-acetilcisteína

NF- κ B – Fator nuclear kappa B (do inglês *nuclear factor kappa B*)
NO – Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)
NOS – Óxido nítrico sintase (do inglês *nitric oxide synthase*)
p38MAPK – Proteínas quinases p38MAPK (do inglês *p38 mitogen-activated protein kinases*)
PAMP – Padrão molecular associado ao patógeno (do inglês *pathogen associated molecular patterns*)
PBS – Tampão fosfato salina (do inglês *phosphate buffered saline*)
SAPK – Proteína quinase ativada por estresse (do inglês *stress-activated protein kinase*)
SB – Butirato de sódio (do inglês *sodium butyrate*)
SCCM – Sociedade de Medicina Crítica (do inglês *Society of Critical Care Medicine*)
SDMOS – Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas
SNC – Sistema nervoso central
SPSS – do inglês *Statistical Package for the Social Science*
SRIS – Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TBARS – Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês *Thiobarbituric acid reactive substances*)
TLR – Receptores Toll-Like (do inglês *Toll-Like receptors*)
TMB – 3,3',5,5' - tetrametilbenzidina (do inglês *3,3',5,5' - tetramethylbenzidine*)
TNF- α – Fator de necrose tumoral (do inglês *tumoral necrosis factor*)
TSA – Tricostatina A
UTI – Unidade de terapia intensiva
VPA – Valproato de Sódio

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 Sepse: definição, aspectos epidemiológicos e etiológicos.....	23
1.2 Fisiopatologia da sepse.....	26
1.2.1 Envolvimento das citocinas na sepse.....	27
1.2.2 Alterações oxidativas e disfunção mitocondrial na sepse.....	29
1.2.3 Níveis de acetilação/desacetilação de histonas na sepse.....	32
1.2.4 Proteínas quinases ativadas por mitógeno na sepse.....	34
1.3 Sepse e sistema nervoso central.....	37
1.4 Modelos animais de sepse.....	40
1.5 Possibilidades terapêuticas da sepse.....	41
1.6 Justificativa.....	43
2 OBJETIVOS.....	44
2.1 Objetivo geral.....	44
2.2 Objetivos específicos.....	44
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
3.1 Animais.....	46
3.2 Desenho experimental.....	47
3.2.1 Experimento I.....	47
3.2.2 Experimento II.....	48
3.2.3 Experimento III.....	48
3.3 Indução de sepse.....	49
3.4 Cirurgia estereotáxica.....	50
3.5 Esquiva inibitória.....	51
3.6 Análises bioquímicas.....	52
3.6.1 Quantificação de citocinas.....	52
3.6.2 Medida de dano oxidativo em lipídios.....	53

3.6.3 Medida de dano oxidativo em proteínas.....	53
3.6.4 Atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial.....	54
3.6.5 Atividade da creatina quinase.....	55
3.6.6 Dosagem de proteínas.....	55
3.6.7 Atividade de histonas desacetilases.....	56
3.6.8 Quantificação de proteínas por <i>Western blotting</i>	56
3.7 Análise estatística.....	57
4 RESULTADOS.....	58
4.1 Experimento I.....	58
4.2 Experimento II.....	69
4.3 Experimento III.....	72
5 DISCUSSÃO.....	76
6 CONCLUSÃO.....	86
7 PERSPECTIVAS.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXO A.....	113

1 INTRODUÇÃO

1.1 SEPSE: DEFINIÇÃO, ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E ETIOLÓGICOS

Desde que Schottmueller (1914) estabeleceu pela primeira vez a relação direta entre a presença de micro-organismos na corrente sanguínea e o aparecimento de sinais e sintomas sistêmicos, muitos termos foram aplicados para definir a sepse. Na Grécia antiga, o termo *Pepse* era usado para indicar o processo de fermentação do vinho ou a digestão da comida, sugerindo, assim, vida boa e saúde. *Sepse* passou a ser designado para descrever casos em que havia putrefação e estava associado a doença e morte (Hanna, 2003).

Com base no *Consensus Conference of the American College of Chest Physicians and the Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM, 1992), em Levy e colaboradores (2003) e diante da necessidade de se uniformizar os termos relacionados à sepse, objetivando eliminar algumas nomenclaturas mal definidas, a sepse foi classificada como a tradução clínica da existência de um foco infeccioso desencadeador de uma resposta inflamatória sistêmica, sendo caracterizada por intensa inflamação e profuso dano tissular (Bone et al., 1992; Muckart e Bhagwanjee, 1997; Uptodate, 2006; Ulloa et al., 2009).

O termo síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) foi proposto para descrever a reação inflamatória desencadeada pelo organismo frente a qualquer agressão infecciosa ou não, o que a difere da sepse, que é produzida por micro-organismos infecciosos (Takala et al., 2002). A sepse severa, por sua vez, é a sepse associada

com disfunção orgânica, hipotensão ou hipoperfusão (Russel, 2006). Por outro lado, o choque séptico é caracterizado por sepse com hipotensão arterial persistente, mesmo depois de adequada reposição volêmica, associado com a redução da perfusão, acidose láctica, oligúria e alteração do estado mental (Ulloa et al., 2009).

Tais definições levam à interpretação de que as diversas entidades clínicas representam diferentes fases evolutivas de uma entidade patológica única, cuja evolução natural – se não contida – é a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos e sistemas (SDMOS), que se caracteriza pela presença de função orgânica alterada em pacientes sépticos seriamente doentes, na qual a homeostasia não é mantida (Hanna, 2003; Engel et al., 2007).

Entretanto, é muito difícil definir os limites entre infecção e sepse. É possível que estas duas entidades não tenham limites tão bem definidos conforme proposto: infecção é o processo relacionado à presença de micro-organismos, induzindo uma resposta localizada do hospedeiro ou sua presença em tecido normalmente estéril; sepse é a resposta sistêmica do hospedeiro à presença do micro-organismo. Para dificultar ainda mais, não são todos os pacientes que parecem estar sépticos demonstram alguma infecção. Porém, a introdução do termo SRIS objetivou criar um critério bastante sensível na captura desses pacientes (Vincent et al., 2006).

Embora tenha ocorrido um rápido progresso nos cuidados de saúde nas últimas décadas, a prevalência e a incidência de sepse têm aumentado ao longo dos últimos anos e continua sendo a maior ameaça à vida de pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) (Silva et al., 2004; Martin, 2012). Em países europeus desenvolvidos e em

desenvolvimento, a sepse pode ocorrer entre 6% a 30% dos pacientes das UTIs (Vincent et al., 2006). Nos Estados Unidos, a incidência de sepse é estimada em 751.000 casos por ano, sendo que a idade dos pacientes está diretamente relacionada à mortalidade (Angus et al., 2001). No Brasil, entretanto, os estudos epidemiológicos sobre a sepse ainda são escassos. Um estudo multicêntrico desenvolvido em cinco UTIs dos estados de Santa Catarina e São Paulo mostrou que a prevalência de sepse entre os pacientes internados na UTI foi de 16,7%. O mesmo estudo apontou uma incidência de 46,9% para sepse, 27,3% para sepse grave e 23% para choque séptico. Já as taxas de mortalidade foram de 33,9% para sepse, 46,9% para sepse grave e 52,3% para choque séptico (Carvalho e Trotta, 2003; Silva et al., 2004).

O aumento nas taxas de incidência e de mortalidade relacionadas à sepse está interligado aos avanços médicos obtidos nesse período em que o número de pacientes tratados tem aumentado (Carvalho e Trotta, 2003). Apesar disso, trata-se de uma condição clínica com curso heterogêneo e a razão para este fato está relacionada a diferentes fatores como o agente etiológico, origem do sítio da infecção, estado de competência imunológica do paciente, entre outros (Takala et al., 2002).

Em relação ao perfil bacteriano responsável pelos quadros de sepse, observou-se uma mudança nas últimas décadas, do ponto de vista epidemiológico. Entre 1960 e 1970, bactérias gram-negativas causavam a grande maioria dos quadros. A partir dos anos 1980, as bactérias gram-positivas também passaram a ter importância. Atualmente, a participação dos dois grupos bacterianos é similar (Bochud et al., 2001; Llewelyn e Cohen, 2001).

A identificação do sítio primário de infecção é ponto crítico no tratamento do paciente séptico (Tracey, 2010). Em 20 a 30% dos casos não é possível estabelecer o sítio de infecção, pois mesmo em pacientes em que um sítio é fortemente suspeito, grande parte apresenta culturas negativas. No entanto, a hemocultura positiva, que seria, em tese, prova irrefutável de infecção grave, aparece em apenas 30% dos pacientes com sepse (Matsuda et al., 2012).

O sítio de infecção pode ser identificado em 92% de um total de 2.803 pacientes sépticos, como observado em um estudo prospectivo de Bochud e colaboradores (2001). Nele, também se observou que a frequência de infecção foi de 36% no pulmão, 20% no sangue, 19% na cavidade abdominal, 13% no trato urinário, 7% na pele e em partes moles e 5% em outros sítios.

Contudo, é digno de nota que os dados acumulados na literatura, sobretudo a nacional, são restritos a estudos realizados em UTIs. A situação exata (dados clínicos e epidemiológicos) fora deste ambiente é ainda obscura.

1.2 FISIOPATOLOGIA DA SEPSE

O desenvolvimento de sepse após infecção não é determinado apenas pelo agente agressor, mas também por caracteres genéticos do indivíduo. Estes fatores combinados desencadeiam uma série de eventos imunológicos, metabólicos e hemodinâmicos que culmina com a sepse (Weighardt e Holzmann, 2007; Tracey, 2010; Martin, 2012).

A quebra de barreiras anatômicas ou a simples redução da capacidade imunológica de um indivíduo possibilita a invasão microbiana (bactérias, vírus ou fungos) de tecidos. Cada micro-organismo apresenta um caráter molecular próprio, denominado padrão molecular associado ao patógeno (PAMP) (Alberti et al., 2003; Hotchkiss e Nicholson, 2006; Hirota et al., 2012). Uma vez que invadem e multiplicam-se nos tecidos, esses patógenos são identificados pelas células dendríticas através de receptores que reconhecem padrões moleculares, sendo os mais conhecidos os receptores *Toll-Like* (TLR's). Uma vez identificados pelas células dendríticas – cuja função é apresentar antígeno aos linfócitos – é disparada a resposta imune adaptativa, com consequente liberação de citocinas, resultando em uma sequência de eventos bioquímicos e clínicos (Hanna, 2003; Weighardt e Holzmann, 2007; Matsuda et al., 2012).

1.2.1 Envolvimento das citocinas na sepse

O processo fisiopatológico da sepse inicia-se com a invasão ou infecção de um agente microbiano (bactérias, vírus ou fungos) (Sriskandan e Altmann, 2008). Na sepse pode ocorrer a liberação de endotoxinas, que são componentes da parede celular de bactérias (Lipopolissacarídeos (LPS) em Gram-negativas; ácido teicoico em Gram-positivas) que correspondem aos principais desencadeadores da cascata inflamatória (Alberti et al., 2003; Hanna, 2003).

As citocinas, por sua vez, são as protagonistas do emaranhado fisiopatológico da sepse. São peptídeos imunorreguladores pleomórficos produzidos pelo organismo, com atividades anti e

próinflamatórias (Wheeler e Bernard, 1999). Em resposta às endotoxinas, ocorre a liberação de inúmeras citocinas, tais como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e a interleucina-1 beta (IL-1 β), estimulando intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, como outras citocinas (IL-6, IL-8), fatores de complemento e espécies reativas de oxigênio (ERO) (Engel et al., 2007; Jean-Baptiste, 2007). Estes mediadores inflamatórios são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formando, assim, um ciclo vicioso. Concomitantemente, promovem vasodilatação sistêmica, contribuindo para a hipotensão refratária a vasoconstritores, hipoperfusão tecidual, estresse oxidativo e lesão tecidual e orgânica (Engel et al., 2007). Dessa forma, fica evidente que existe uma complexa interação desses componentes, pois são responsáveis por deflagrar a sepse e sua manutenção e, paradoxalmente, são também agentes que debelam o processo (Jean-Baptiste, 2007; Sriskandan e Altmann, 2008; Kasten et al., 2010; Ogiku et al., 2012).

Em animais, após a administração de LPS, a produção de TNF- α é ativada e pode ser rapidamente detectada no plasma (entre 60 e 90 minutos após a administração). Já a IL-1 β induz a produção e liberação de IL-6 (Ogiku et al., 2012). A IL-6, por sua vez, também é um marcador da gravidade da sepse, pois já foi descrito que níveis elevados de IL-6 e IL-8 são preditores no prognóstico da doença e estão associados com a disfunção de múltiplos órgãos e a mortalidade precoce e tardia (Bozza et al., 2007).

Os efeitos biológicos causados pela liberação de citocinas refletem no sistema nervoso central (SNC) como febre e ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) (Sharshar et al., 2010). As

interações recíprocas entre o SNC e o sistema imune são consideradas um dos componentes principais da resposta inflamatória à sepse, resultando em alterações nos sistemas neuroendócrino, autonômico e comportamental (Gordon et al., 2004; Sharshar et al., 2010). Neste contexto, foi demonstrado que pacientes sobreviventes à sepse apresentam um déficit cognitivo a longo prazo, incluindo alterações na memória, atenção, na concentração e/ou na perda global da função cognitiva (Granja et al., 2004; Hopkins et al., 2004; Jackson et al., 2004).

Estes achados, somados a inúmeros outros encontrados na literatura, demonstram a importância e o envolvimento das citocinas no processo fisiopatológico da sepse.

1.2.2 Alterações oxidativas e disfunção mitocondrial na sepse

Na sepse, o TNF- α *per se* é responsável pela produção excessiva de espécies reativas, além de ser um dos fatores desencadeadores da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que, somados, podem induzir o estresse oxidativo (Galley, 2011; Bozza et al., 2013). Dessa forma, quando existe um desequilíbrio entre a geração de ERO e as defesas antioxidantes, ocasionando um potencial dano oxidativo em todas as biomoléculas – incluindo lipídios, proteínas e o ácido desoxirribonucleico (DNA) – tem-se o estado conhecido como estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999; Dalle-Donne et al., 2006).

O alvo celular primário do estresse oxidativo pode variar conforme o tipo celular, as ERO geradas, o sítio de geração (intra ou

extracelular) e a proximidade do oxidante à estrutura celular. O ataque das ERO aos lipídios das membranas desencadeia um processo conhecido como lipoperoxidação, formando produtos secundários, incluindo o malondialdeído (MDA) (Urso e Clarkson, 2003). As ERO podem modificar a conformação química inicial dos ácidos graxos polinsaturados e, conseqüentemente, alterar a coesão, fluidez e permeabilidade das membranas e funções metabólicas das células (Chihuailaf et al., 2002). Por outro lado, a oxidação direta de proteínas por ERO produz derivados carbonilados altamente reativos, resultando na oxidação das cadeias laterais de diversos aminoácidos (Dalle-Donne et al., 2006). Adicionalmente, a quantificação dos níveis de proteínas carboniladas apresenta uma vantagem sobre os produtos da lipoperoxidação como marcador de dano oxidativo, pois as proteínas oxidadas geralmente são mais estáveis (Dalle-Donne et al., 2003).

Todas as células aeróbicas podem sofrer dano oxidativo. Porém, o cérebro é particularmente suscetível, pois utiliza altas taxas de oxigênio, quando comparado a outros órgãos, suas defesas antioxidantes são modestas, as mitocôndrias geram ânion superóxido, bem como as membranas neuronais são ricas em ácidos graxos polinsaturados. Dessa forma, os produtos da lipoperoxidação podem causar dano cerebral (Halliwell, 1987).

Além disso, o cérebro desenvolve uma intensa atividade metabólica, mas possui uma pequena reserva energética em relação ao grande consumo de glicose, existindo assim, uma necessidade contínua de substratos energéticos (Berg et al., 2004). Neste ambiente, a mitocôndria é a organela responsável pelos processos de respiração celular e síntese de trifosfato de adenosina (ATP). Em sua matriz estão

as enzimas envolvidas no ciclo de Krebs, à exceção da enzima succinato desidrogenase, que fica ligada à membrana interna, juntamente com os complexos enzimáticos envolvidos no transporte de elétrons e na fosforilação oxidativa (Devlin e Michelacci, 2003). Neste contexto, outro componente essencial ao metabolismo energético cerebral é a enzima creatina quinase (CK), a qual funciona como uma fonte auxiliar na produção de ATP, colaborando para o tamponamento energético celular (Crouser et al., 2004).

Diversos estudos em modelos animais *in vivo* e *in vitro* têm consistentemente relatado que as mitocôndrias são o principal alvo de lesões, tanto em órgãos sistêmicos quanto no SNC, durante a fase aguda da sepse (Davies et al., 2005; Berg et al., 2011). Também são demonstradas reduções significativas na atividade dos complexos I, III e IV da cadeia respiratória (Davies et al., 2005; Frost et al., 2005; Birden et al., 2012). Entretanto, uma redução na disponibilidade de energia no cérebro pode comprometer a síntese de neurotransmissores e lipídios (Di Donato, 2000). Uma deficiência no funcionamento normal da cadeia respiratória mitocondrial pode levar a uma rápida queda na produção de ATP, justificando a morte celular (Remick, 2007; Howell et al., 2011). Dessa forma, o metabolismo do oxigênio está comprometido na sepse e a reperfusão causa o aumento da produção de ERO e está associada ao estresse oxidativo, com consequente dano tecidual (Brealey et al., 2004).

Todavia, sabendo-se que o cérebro pode ser um dos primeiros órgãos afetados na sepse e que durante a resposta inflamatória, ERO são produzidas e iniciam a lipoperoxidação neste tecido, levando à disfunção mitocondrial e resultando na apoptose neuronal (Wilson e Young, 2003; Ebersoldt et al., 2007; Berg et al.,

2011; Birden et al., 2012). Dessa forma, torna-se cada vez mais evidente o possível envolvimento de danos oxidativos e de alterações energéticas na neurobiologia do dano cognitivo observado em ratos sépticos sobreviventes, assim como na fisiopatologia da sepse.

1.2.3 Níveis de acetilação/desacetilação de histonas na sepse

Outro componente que pode estar envolvido no cenário fisiopatológico da sepse é o controle dos níveis de acetilação/desacetilação de histonas. Inicialmente, as histonas foram consideradas componentes meramente estruturais, que reúnem uma grande quantidade de DNA genômico facilmente acomodada pelo núcleo das células. Porém, atualmente são reconhecidas pelo seu envolvimento na manutenção do equilíbrio dinâmico da cromatina (Margeron et al., 2005), atuando como uma matriz na qual o DNA se enovela (Drummond et al., 2005).

As caudas N-terminal das histonas estão sujeitas a uma variedade de modificações por ligações covalentes pós-traducionais (Peterson e Laniel, 2005). Algumas destas modificações estão associadas a genes ativos (acetilação), enquanto outras estão relacionadas tanto a genes ativos quanto a genes silenciosos (metilação) (Mellor, 2006). A acetilação – modificação mais extensivamente estudada – é controlada pela ação de duas enzimas: a histona acetiltransferase (HAT) e a histona desacetilase (HDAC), que influenciam na transcrição gênica por acrescentar (acetilação) ou remover (desacetilação), respectivamente, grupos acetil de um aminoácido ϵ -N-acetil-lisina em uma histona. Dessa forma, a acetilação

da histona está ligada à atividade transcrissional, enquanto a desacetilação está associada com a inativação da transcrissão gênica (Langley et al., 2005).

A desregulação e atividade aberrante de HAT e HDAC têm sido implicadas na oncogênese e também nos danos ao SNC (Kazantsev e Thompson, 2008). Langley e colaboradores (2005) demonstraram que o aumento da atividade de HDACs parece estar envolvido na disfunção e degeneração neuronal. A inibição de HDACs é considerada uma estratégia terapêutica para o câncer, visto que os inibidores destas enzimas podem agir em vários processos que estão desregulados em células neoplásicas (Drummond et al., 2005).

A diferenciação e a morte celular são os principais efeitos induzidos pelos inibidores de HDACs, tais como o valproato de sódio (VPA), a tricostatina A (TSA) e o butirato de sódio (SB). Estudos demonstraram que o SB pode induzir apoptose através da hiperacetilação de histonas (inibição de HDACs) (Gottlicher et al., 2001; Miller et al., 2003; Sun et al., 2008; Wu et al., 2008). Interessantemente, os inibidores de HDACs também regulam positivamente a expressão gênica implicada na programação epigenética associada à regulação do comportamento e da cognição (Kim et al., 2001; Li et al., 2009; Machado-Vieira et al., 2010). Adicionalmente, o envolvimento de mecanismos epigenéticos é sugerido em inúmeras doenças neurodegenerativas cerebrais, transtornos psiquiátricos e doenças inflamatórias (MacDonald e Roskams, 2009; Zhang e Meaney, 2010). Além disso, a organização da cromatina parece desempenhar um papel importante na regulação da expressão dos genes envolvidos no processo inflamatório (Pan et al., 2007).

Na sepse, pode ocorrer um desequilíbrio na acetilação de histonas e o uso de inibidores de HDACs pode reverter esta condição, reduzindo a liberação de TNF- α e IL-1 β , exercendo, portanto, efeito anti-inflamatório (Blanchard e Chipoy, 2005; Leoni et al., 2005; Li et al., 2009, 2011). Corroborando os achados acima, outros estudos utilizando modelos animais de sepse mostraram que SB e TSA diminuíram os níveis de TNF- α e IL-1 β e IL-6 (Cao et al., 2008; Li et al., 2009).

Evidências da literatura têm demonstrado que há dano cognitivo, sobretudo em fase tardia, em ratos sobreviventes à sepse (Barichello et al., 2006; Comim et al., 2011). Entretanto, ainda não existem estudos publicados relacionando as alterações iniciais ou tardias na atividade de HDACs em cérebro de ratos sépticos sobreviventes e suas implicações no dano cognitivo tardio.

1.2.4 Proteínas quinases ativadas por mitógeno na sepse

Apesar dos conhecimentos atuais de alguns precursores celulares que modulam a lesão neuronal relacionados à inflamação, os mecanismos neurobiológicos que culminam em dano cognitivo não estão completamente estabelecidos. Neste contexto, as proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) constituem as vias mais importantes da transdução do sinal, da superfície celular ao núcleo. Elas estão implicadas na proliferação, diferenciação e morte celular (Sweatt, 2001).

As MAPKs constituem uma cascata em que cada membro ativa outro por fosforilação dos resíduos treonina e/ou tirosina (Waetzig

e Schreiber, 2003; Cuschieri e Maier, 2005). Na extremidade da cadeia encontram-se as MAPKs controles e a cascata clássica consiste da ativação de três proteínas quinases intracelulares, que se inicia quando o primeiro membro, MAPK quinase quinase (MAPKKK), é ativado. A MAPKKK é uma proteína quinase que fosforila e ativa MAPK quinase (MAPKK) e essa ativação é seguida pela ativação de uma MAPK específica. Dessa maneira, as MAPKs ativam numerosas proteínas quinases, proteínas nucleares e fatores de transcrição, levando a uma transdução do sinal (Figura 1) (Pearson e Prozialeck, 2001; Waetzig e Schreiber, 2003; Cuschieri e Maier, 2005).

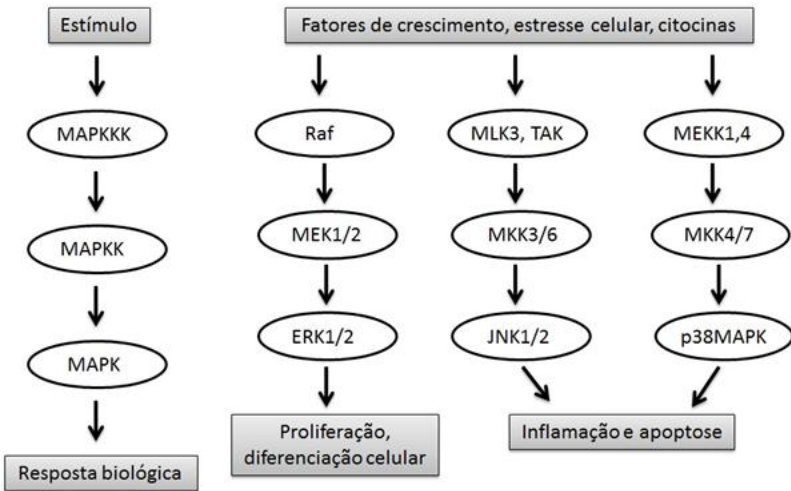


Figura 1: Proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) implicadas na proliferação, diferenciação celular, inflamação e apoptose. Adaptado de Jean-Baptiste (2007).

Segundo Pearson e Prozialeck (2001), as MAPKs são divididas em três grandes grupos: 1) proteínas quinases reguladas por

sinais extracelulares (ERK1/2); 2) proteínas quinases c-Jun NH2-terminal (JNK1/2) e 3) proteínas quinases p38MAPK. As MAPKs fosforilam e regulam um amplo espectro de substratos, incluindo fatores de transcrição, elementos do citoesqueleto e outras proteínas quinases, atuando como controladoras de processos complexos – embriogênese, diferenciação, proliferação e morte celular –, além dos fenômenos de plasticidade neural (Pearson e Prozialeck, 2001; Kanayama e Miyamoto, 2007). Juntamente com o NF- κ B, as MAPKs controlam a resposta celular ao estresse e à inflamação (Waetzig e Schreiber, 2003).

A ERK foi a primeira proteína da família das MAPKs a ser identificada, apresentando-se sob duas isoformas, ERK1 e ERK2. Esta proteína está envolvida na proliferação, transformação e diferenciação celular (Liu et al., 2007). Sua cascata é ativada por diferentes mitógenos, incluindo citocinas, insulina, hormônios e neurotransmissores, em resposta a endotoxinas, estresse oxidativo e aderência por células do sistema imune inato, como monócitos e macrófagos (Park et al., 2002; Lee et al., 2005).

A JNK foi identificada como uma proteína quinase ativada por estresse e por isso é também conhecida por proteína quinase ativada por estresse (SAPK). Ela é ativada por vários estímulos que também ativam a p38MAPK, como LPS, TNF- α , IL-1 β e radiação ultravioleta (Kyriakis e Avaruck, 2001). Embora os efeitos da JNK ainda não estejam bem compreendidos, esta desempenha um importante papel na expressão de TNF- α e óxido nítrico sintase (NOS) em macrófagos e monócitos e ainda, na proliferação de células T e produção de IL-2 (Lahti et al., 2003).

A p38MAPK é ativada, conforme supracitado, em resposta a estresses fisiológicos, LPS, exposição a raios ultravioleta, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento e participa na cascata de sinalização que controla respostas celulares a citocinas e estresses (Lahti et al., 2003). Adicionalmente, foi demonstrado que inibidores de p38MAPK aumentam a sobrevivência em modelo animal de sepse e diminuem os níveis de TNF- α em plasma de pacientes sépticos (Park et al., 2002; Lee et al., 2005).

Estes achados, aliados ao pouco entendimento sobre os níveis de fosforilação das proteínas quinases na sepse (em diferentes tempos), demonstram a necessidade de uma melhor compreensão sobre os alvos celulares que possam estar relacionados com o dano cognitivo apresentado pelos pacientes.

1.3 SEPSE E SISTEMA NERVOSO CENTRAL

A microcirculação cerebral é regulada pela barreira hematoencefálica (BHE), uma barreira física e metabólica localizada entre o tecido cerebral e o sangue, que impede a passagem e a troca de íons e moléculas orgânicas entre o plasma sanguíneo e o tecido nervoso, desempenhando um papel crucial na proteção do cérebro (Marchi et al., 2004; de Boer e Gaillard, 2007; Weiss et al., 2009). Ao contrário do endotélio presente em outros tecidos corporais, que possui a característica de permeabilidade, o que forma a BHE é contínuo (Ballabh et al., 2004), fazendo com que o dano endotelial acarretado por mediadores inflamatórios sejam cada vez mais implicados na disfunção da integridade desta barreira (Wassmer et al., 2006).

Na sepse e na SRIS, há alteração na permeabilidade da BHE e o processo inflamatório acaba afetando o SNC, causando mudanças nas funções fisiológicas cruciais à homeostase, levando à encefalopatia (Hotchkiss e Nicholson, 2006; Cauvi et al., 2012). Entretanto, cada vez mais se tem dado atenção à disfunção neurológica na sepse, tanto em sua fase aguda (encefalopatia), quanto em sua fase crônica (sequelas cognitivas em sobreviventes de sepse), tendo em vista que a ocorrência de encefalopatia está associada a maior mortalidade, maior permanência na UTI e maiores gastos com saúde (Wesley et al., 2004).

A encefalopatia séptica é considerada uma disfunção cerebral devida à sepse, podendo ocorrer em 8-70% dos pacientes sépticos, dependendo dos critérios de inclusão empregados, sendo a encefalopatia mais comum nas UTIs (Remick et al., 2007; Hayakawa et al., 2013). O conceito de encefalopatia séptica como uma entidade que não possa ser explicada pela disfunção, hipotensão ou pela hipóxia hepática ou renal é relativamente novo. Porém, já está claro que a sepse e suas reações podem ser associadas a um amplo espectro de danos e disfunções cerebrais (Papadopoulos et al., 2000).

Embora a fisiopatologia da encefalopatia séptica ainda não esteja bem determinada, parece ter origem multifatorial. Diversos fatores de risco têm sido descritos e podem ser categorizados, como a condição pré-existente do paciente (idade, história de depressão, doença hepática, doença renal), condição aguda do paciente (sobredose de drogas e febre) e fatores iatrogênicos ou ambientais (uso de sedativos, alimentação enteral e cateter venoso central) (Ebersoldt et al., 2007).

Um dos seus cenários fisiopatológicos é um processo inflamatório que inicia com ativação endotelial cerebral, que, devido às alterações na BHE, facilita a migração de leucócitos e mediadores inflamatórios no parênquima cerebral (Sharshar et al., 2010; Taccone et al., 2010). Os mediadores inflamatórios, portanto, são capazes de alterar o metabolismo celular, induzindo estresse oxidativo e disfunção mitocondrial, com consequentes alterações na neurotransmissão (serotoninérgica, adrenérgica e gabaérgica) e morte celular por apoptose (Sharshar et al., 2003; Messaris et al., 2004).

Além disso, as lesões cerebrais também podem aumentar a liberação de citocinas (Sharshar et al., 2010), visto que o TNF- α é um mediador chave produzido pelo cérebro durante a infecção e que está diretamente relacionado com o edema cerebral observado na sepse (Messaris et al., 2004). Neste contexto, foi relatado que fatores adicionais contribuem para este processo neuroinflamatório, tais como a liberação de aminoácidos excitatórios, hiperglicemia, exposição a agentes farmacológicos neurotóxicos, alterações na hemodinâmica e hipoxemia (Iacobone et al., 2009). De fato, Comim e colaboradores (2011) mostraram que, em um modelo animal de sepse, a produção de citocinas é um evento precoce e isto parece participar tanto da disfunção do SNC quanto das alterações na permeabilidade cerebral.

Em casos fatais de sepse, foi demonstrada a proliferação de astrócitos e microglia em córtex cerebral e múltiplas hemorragias na substância branca e disseminação de microabscessos (Jackson et al., 2004; Remick et al., 2007). Nos sobreviventes, foram observadas redução do fluxo sanguíneo cerebral e disfunção da BHE (Descamps et al., 2003; Russel, 2006). Além destas manifestações neurológicas

agudas observadas em pacientes criticamente enfermos, foi mostrado que sobreviventes de terapia intensiva, incluindo pacientes sépticos, apresentam disfunções cognitivas em longo prazo, incluindo alterações na memória, atenção, concentração e/ou perda global da função cognitiva (Angus et al., 2001; Hopkins et al., 2004; Hough e Curtis, 2005).

Neste contexto, o uso de modelos animais de sepse tem sido uma ferramenta para o avanço do conhecimento da fisiopatologia da sepse, bem como para o desenho de novas opções de tratamento (Messaris et al., 2004; Ritter et al., 2004; Barichello et al., 2006; Sun et al., 2008; Wu et al., 2008).

1.4 MODELOS ANIMAIS DE SEPSE

A sepse apresenta etiologia diversa, o que dificulta a aplicação de um modelo que cubra todos os aspectos desta. Por isso, torna-se importante a escolha do modelo a ser usado.

O modelo de ligação e perfuração cecal (CLP) é relevante, do ponto de vista clínico, por mimetizar diversos aspectos da sepse polimicrobiana em humanos (Fink e Heard, 1990). Este modelo tem sido cada vez mais útil para o estudo das alterações neurológicas agudas e crônicas da sepse (Barichello et al., 2005a; 2006; Howell et al., 2011).

Adicionalmente, existem alterações agudas no SNC destes animais que podem participar no desenvolvimento de encefalopatia, incluindo estresse oxidativo (Barichello et al., 2006). Está descrito na literatura que animais sobreviventes de CLP apresentam diversos déficits cognitivos, mimetizando as alterações cognitivas de

sobreviventes de sepse (Barichello et al., 2005a; b; 2007a). Este modelo também tem sido utilizado para avaliação de tratamentos experimentais e no entendimento da fisiopatologia destas alterações tardias (Barichello et al., 2007b; Tuon et al., 2007).

Foi demonstrado que ratos sobreviventes à sepse apresentavam um dano cognitivo em 10 e 30 dias após a indução por CLP (Barichello et al., 2005a; b, 2007), porém 60 dias após, não foram observados estes déficits (Tuon et al., 2008). O uso de N-acetilcisteína (NAC) e desferroxamina (DFX) associados (Barichello et al., 2007) e facilitadores da memória como epinefrina, glicose, naloxone e glicocorticoide para memória aversiva (Tuon et al., 2008) e antagonista da acetilcolinesterase para memória de habituação (Comim et al., 2008) foram hábeis em reverter este dano cognitivo observado.

Sendo assim, a utilização de um modelo animal, aliado ao pouco entendimento dos mecanismos fisiopatológicos, permite um estudo mais aprofundado sobre a relação entre alterações metabólicas e inflamação, fundamentais para a disfunção orgânica associada à sepse e alterações do SNC nas fases iniciais e tardias da sepse.

1.5 POSSIBILIDADES TERAPÊUTICAS DA SEPSE

Embora, nos últimos anos, tenha havido uma grande quantidade de investigações e de relatos sobre sepse, SRIS e síndromes correlatas e do indiscutível melhor entendimento sobre as suas respectivas fisiopatologias, a abordagem terapêutica inicial da sepse continua sendo predominantemente de suporte (Carvalho e Trotta, 2003).

O objetivo fundamental do tratamento do paciente séptico é a manutenção de um suporte metabólico e cardiorrespiratório que permita manter o paciente vivo até a sua recuperação integral (Dellinger et al., 2008). O controle definitivo do agente infeccioso é imperativo no tratamento e, para isso, a terapêutica é a administração de antibióticos, reposição de fluidos e agentes vasopressores, ventilação mecânica e controle da febre (Rivers et al., 2005).

Apesar de todos estes esforços, o resultado ainda é insuficiente, uma vez que a mortalidade pode chegar a 60%, mesmo com um investimento de 20 bilhões de dólares por ano (Angus et al., 2001). Os agentes que se ligam ou que neutralizam os componentes da parede celular bacteriana ou aqueles que modulam a resposta imediata do hospedeiro a esses produtos tóxicos não se mostraram muito válidos para o tratamento da sepse (Carvalho e Trotta, 2003). Por outro lado, a estratégia terapêutica de utilização de inibidores da NOS não está suficientemente testada em humanos e nenhuma correlação entre seus efeitos hemodinâmicos e a taxa de sobrevivência na sepse foi estabelecida (Rivers et al., 2001; Leentjens et al., 2012). Por isso, vem sendo desenvolvida uma terapêutica suplementar com diversos agentes, tais como insulinoterapia, anti-TNF- α e antioxidantes (Macarthur et al., 2000; Van den Berghe et al., 2001; Paterson et al., 2003; Ritter et al., 2004; Matsuda et al., 2012).

A sepse, portanto, é uma síndrome que pode acometer múltiplos sistemas orgânicos e o diagnóstico precoce atrelado ao controle inicial das manifestações clínicas tornam-se indispensáveis para melhorar o prognóstico desta (Fink e Heard, 1990; Reinhart e Karzai, 2001). Dessa forma, um melhor entendimento da fisiopatologia da sepse

através de trabalhos científicos pode fornecer dados preliminares e novos protocolos experimentais de tratamento, para serem posteriormente validados em ensaios clínicos e empregados na prática médica.

1.6 JUSTIFICATIVA

Considerando que sobreviventes sépticos (pacientes e modelos animais) apresentam déficit cognitivo e alterações neuroquímicas, especula-se que os parâmetros inflamatórios, oxidativos e de metabolismo energético, a atividade de HDACs e os níveis de fosforilação de proteínas MAPKs estejam envolvidos na fisiopatologia da sepse, sobretudo do dano cognitivo. Sendo assim, este estudo investigou tais parâmetros nas fases iniciais e tardias da sepse, objetivando contribuir na elucidação dos mecanismos bioquímicos responsáveis pelas alterações cognitivas presentes nesta condição clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar parâmetros neuroquímicos e comportamentais em fases iniciais e tardias em ratos submetidos ao modelo animal de sepse induzido por CLP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar os níveis das citocinas IL1 β , IL-6 e TNF- α no fluido cerebrospinal de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de sepse em 30 e 60 dias após a indução por CLP;
- 2) Avaliar os níveis de TBARS e a carbonilação de proteínas em córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de sepse em 30 e 60 dias após a indução por CLP;
- 3) Avaliar a atividade dos complexos enzimáticos (I, II, II-III e IV) da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial e a atividade da enzima CK em córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de sepse em 30 e 60 dias após a indução por CLP;
- 4) Avaliar os efeitos da administração de SB sobre a memória aversiva de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de sepse 10 dias após a indução por CLP;
- 5) Avaliar a atividade de histonas desacetilases após a administração de SB em córtex pré-frontal, hipocampo,

estriado e córtex de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de sepse em 24 horas e 10 dias após a indução por CLP;

- 6) Avaliar os níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK em hipocampo de ratos Wistar submetidos ao modelo animal de sepse em 24 horas e 10 dias após a indução por CLP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi realizado dentro das diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) para pesquisas utilizando animais. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (protocolo 01/2012) (anexo A). Todos os cuidados foram adotados para evitar ou minimizar o sofrimento dos animais durante os experimentos.

3.1 ANIMAIS

Para este estudo, foram utilizados ratos Wistar machos, adultos (60 dias), pesando 250-300g, procedentes do biotério da UNESC. Em cada caixa foram acondicionados no máximo cinco animais, com comida e água *ad libitum*, mantidos em ambiente com temperatura entre 18 e 22° C e umidade relativa entre 55 e 65%, num ciclo de 12 horas claro-escuro (7h às 19h). Os procedimentos cirúrgicos foram sempre realizados no período da manhã, com início às 8h.

O tamanho amostral baseou-se em estudos anteriores (Papadopoulos et al., 2000; Ritter et al., 2004) e o índice de mortalidade da sepse e da cirurgia estereotáxica foi de 20%. Este estudo utilizou um total de 140 para conseguir um tamanho amostral significativo, mesmo com a eventual perda de animal durante a execução dos experimentos. Utilizou-se o máximo de estruturas de um único animal para as análises bioquímicas, a fim de se reduzir a quantidade de animais utilizados.

Após os experimentos, os animais foram eutanasiados com o uso de guilhotina e sem anestesia, sob estrita obediência às Diretrizes para a Prática de Eutanásia (CONCEA, 2013). O descarte foi feito por acondicionamento em saco branco leitoso, identificados como “lixo infectante” e levados para um freezer de resíduos localizado no biotério desta instituição para a conservação até o momento da coleta por uma empresa terceirizada, para tratamento e disposição final, conforme RDC nº 306/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

3.2 DESENHO EXPERIMENTAL

Este estudo foi dividido em três fases experimentais – Experimento I, Experimento II e Experimento III.

3.2.1 Experimento I

Este experimento teve como foco de estudo a determinação de parâmetros inflamatórios, oxidativos e metabólicos em ratos Wistar submetidos à sepse, em 30 e 60 dias após a indução por CLP.

Os animais foram submetidos à sham ou sepse 30 e 60 dias, com n=12 por grupo (Sham, Sepse 30 e Sepse 60). Após, os animais foram eutanasiados com o uso de guilhotina e o cérebro foi removido e dissecado em córtex pré-frontal (região mais frontal do córtex, relacionada à memória e emoção), hipocampo, estriado e córtex (região mais externa do cérebro, que interliga outros sistemas, com funções sensoriais e motoras) para posteriores análises bioquímicas. O

líquor de 15 animais (5 sham, 5 sepse 30 e 5 sepse 60 dias) escolhidos aleatoriamente foi retirado por estereotaxia, para posterior análise dos níveis de citocinas.

3.2.2 Experimento II

Este experimento teve como foco de estudo os efeitos da administração de SB sobre o dano cognitivo tardio (10 dias) e a atividade de HDACs em ratos Wistar submetidos à sepse, em 24 horas e 10 dias após a indução por CLP.

Os animais foram submetidos à sham ou sepse 24 horas e 10 dias, com n=12 por grupo, com seis grupos no total (Sham, Sepse e Sepse+SB – 24 horas e Sham, Sepse e Sepse+SB – 10 dias). Por meio de cirurgia estereotáxica, 5 µL de SB (inibidor de histonas desacetilases) ou fluido cerebrospinal artificial (ACSF) foram injetados no ventrículo lateral cerebral dos animais. Após, os animais foram eutanasiados com o uso de guilhotina e o cérebro foi removido e dissecado em córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex, para posterior análise bioquímica. O teste de esQUIVA inibitória foi realizado somente 10 dias após a indução de sepse.

3.2.3 Experimento III

Este experimento teve como foco de estudo a quantificação dos níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK por *Western blotting* em ratos Wistar submetidos à sepse, em 24 horas e 10 dias após a indução por CLP.

Os animais foram submetidos à sham ou sepse 24 horas e 10 dias, com n=05 por grupo. Após, os animais foram eutanasiados com o uso de guilhotina e o hipocampo foi retirado para posterior análise bioquímica.

3.3 INDUÇÃO DE SEPSE

A sepse intra-abdominal foi induzida usando a técnica de CLP, conforme previamente descrito por Fink e Heard (1990). Os ratos foram anestesiados intraperitonealmente (i.p) com uma mistura de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), sendo submetidos à laparotomia com incisão mediana abdominal. O ceco foi ligado logo abaixo da junção íleo-cecal com fio seda 3-0, mantendo assim, a continuidade intestinal. O ceco foi perfurado com uma agulha número 14 na face antimesentérica e foi gentilmente comprimido até a extrusão de conteúdo fecal. Os planos cirúrgicos foram fechados e os ratos foram observados na caixa de recuperação durante duas horas.

O grupo sepse recebeu “suporte básico” – salina (50 mL/kg) imediatamente e 12 horas após CLP, mais ceftriaxona (30 mg/kg) e clindamicina (25 mg/kg) – a cada seis horas, durante três dias. Como controle (Sham), foram utilizados animais submetidos à laparotomia, com manipulação do ceco, mas sem ligação ou perfuração. O grupo Sham recebeu somente salina (50 mL/kg), imediatamente e 12 horas após a cirurgia, e o volume de salina correspondeu à administração antibiótica ao grupo CLP.

Após o procedimento cirúrgico, todos os animais receberam uma injeção intramuscular (i.m) de 80 mg/kg de dipirona sódica para analgesia (Prado e Pontes, 2002).

3.4 CIRURGIA ESTEREOTÁXICA

Os animais foram anestesiados com uma injeção intramuscular de cetamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). No aparelho estereotáxico, a pele da região do crânio do rato foi removida para a implantação da cânula guia (27 gauge 9 mm) 1 mm acima do ventrículo lateral, de acordo com Paxinos e Watson (1986). A cânula foi colocada mediante as seguintes coordenadas: 0,9 mm posterior ao bregma; 1,5 mm lateral direita do bregma; sendo a cânula implantada à 3,3 mm de profundidade no ventrículo (Paxinos e Watson, 1986). A fixação da cânula foi feita com cimento acrílico, não tendo contato com a pele do animal, evitando dor e sofrimento.

O inibidor de HDACs usado neste estudo foi o butirato de sódio (SB, Sigma, St Louis, MO, USA). O SB foi dissolvido no ACSF e injetado num volume de 5 μ L, na dose de 10 mM, diretamente no ventrículo, logo após a implantação da cânula e antes da indução de sepse por CLP. Os grupos controles receberam ACSF intracerebral. A concentração de SB e o volume da administração foram escolhidos com base nos estudos prévios de Wang e colaboradores (2008) e Arent e colaboradores (2011).

3.5 ESQUIVA INIBITÓRIA

Os animais foram submetidos ao teste de esQUIVA inibitória, o qual avalia a memória aversiva, conforme previamente descrito por Roesler e colaboradores (1999).

O equipamento utilizado para o teste consiste em uma caixa de acrílico (50 x 25 x 25 cm), na qual o piso é formado por barras paralelas de metal (1 mm de diâmetro). Os espaços entre as barras medem 1 cm e a plataforma na parede esquerda do aparelho tem 7 cm de largura e 2,5 cm de altura.

A sessão treino foi realizada 10 dias após a indução de sepsE. Os animais foram gentilmente colocados sobre a plataforma e o tempo de latência – tempo que o animal levou para descer com as quatro patas da plataforma – foi cronometrado. Imediatamente após descer da plataforma (com as quatro patas), os animais receberam um choque de 0.4 mA, durante dois segundos. Após 24 horas da sessão treino, os animais foram submetidos à sessão teste, onde foram novamente colocados sobre a plataforma e o tempo de latência foi cronometrado (máximo 180 segundos), porém, sem a administração do choque. A latência é um parâmetro clássico de retenção de memória e o intervalo entre o treino e o teste foi de 24 horas para avaliar a memória de longa duração (Izquierdo et al., 1998; Roesler et al., 1999).

3.6 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

3.6.1 Quantificação de citocinas

Citocinas pró e anti-inflamatórias foram determinadas com o uso de kits comerciais (Peprotech[®] e Life Technologies[®]) por meio de amostras de líquido diluídas 10 vezes em tampão fosfato salina (PBS). Anticorpos de captura (13 mL, contendo 0,1% de azida sódica) foram diluídos em PBS, adicionados em cada poço da placa e incubados *overnight*, na temperatura de 4°C. Após este período, os poços foram lavados por quatro vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween 20 (Sigma, St Louis, MO, USA) em PBS, pH 7,2). Posteriormente, as placas foram bloqueadas com 200 μ L de solução de bloqueio (1% de albumina bovina sérica (BSA) em PBS, pH 7,2) e incubadas por quatro horas em temperatura ambiente. Após o término da incubação, os poços foram novamente lavados, conforme descrito anteriormente.

Após as lavagens, 100 μ L de amostras e/ou padrões diluídos previamente em solução padrão de diluição (0,05% de Tween 20; 0,1% de BSA em PBS, pH 7,2) foram adicionados aos poços. As placas foram cobertas e novamente incubadas *overnight* (a 4°C). Após este período, os poços foram lavados e adicionados 100 μ L dos anticorpos de detecção TNF- α , IL-1 β e IL-6, previamente diluídos em solução padrão de diluição. As placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente. Os poços foram lavados e após o processo de lavagem, 100 μ L do polímero esptreptavidina peroxidase (1:250, Sigma, St Louis, MO, USA) foram adicionados aos poços, sendo as placas

cobertas por papel alumínio e incubadas durante 30 minutos, em temperatura ambiente.

Após a incubação, os poços foram lavados cinco vezes com o tampão de lavagem e 100 μ L da solução substrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbenzidina, Sigma, St Louis, MO, USA) foram adicionados, seguido de incubação por mais 30 minutos em temperatura ambiente, evitando contato direto com a luz. A reação foi interrompida com a adição de 50 μ L de solução de ácido clorídrico 2N (HCl, Vetec) sobre os poços, reação esta caracterizada por mudança de coloração azulada para amarelada. Imediatamente após, as placas foram lidas em espectrofotômetro, utilizando filtro de 450 nm.

3.6.2 Medida de dano oxidativo a lipídios

Como índice de peroxidação lipídica foi medido os níveis de TBARS durante uma reação ácida aquecida, conforme previamente descrito por Draper e Hadley (1990). As amostras obtidas foram misturadas com ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico, fervidas por 30 minutos e após, a quantidade de TBARS foi determinada espectrofotometricamente na absorbância de 532 nm.

3.6.3 Medida de dano oxidativo a proteínas

O dano oxidativo em proteínas foi determinado pelos níveis de grupos carbonila, conforme previamente descrito por Levine e colaboradores (1990). As amostras obtidas foram precipitadas e as proteínas dissolvidas com dinitrofenilidrazina (DNPH). Os grupos

carbonila foram quantificados no espectrofotômetro na absorvância de 370 nm.

3.6.4 Atividade dos complexos enzimáticos da cadeia respiratória mitocondrial

A atividade do complexo I foi determinada de acordo com Cassina e Radi (1996) pela leitura da taxa de NADH-dependente da redução do ferricianeto a 420 nm.

A atividade do complexo II foi avaliada pelo método descrito por Fischer e colaboradores (1985), onde o meio de incubação foi constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), succinato de sódio (16 mM) e 2,6-dicloroindofenol (DCIP) (8 mM). Inicialmente foram pré-incubados com 40-80 mg de proteínas do homogeneizado, a 30°C, durante 20 minutos. Depois, foram adicionados ao meio 4 mM de azida sódica e 7 mM de rotenona e a reação se iniciou com adição de 40 M de DCIP. As absorvâncias foram registradas durante 5 minutos, a 600 nm.

A atividade do complexo II-III foi determinada de acordo com Fischer e colaboradores (1985), em que o meio de reação, constituído de fosfato de potássio (40 mM, pH 7,4), contendo succinato de sódio (16 mM), foi pré-incubado com 40-80 mg de proteínas do homogeneizado, a 30°C, durante 30 minutos. Em seguida, foram adicionados 4 mM de azida sódica e 7 mM de rotenona e a reação se iniciou pela adição de 0,6 mg/mL de citocromo *c*. As absorvâncias foram registradas durante 5 minutos, a 550 nm.

A atividade do complexo IV (citocromo *c* oxidase) foi determinada de acordo com Rustin e colaboradores (1994) onde o meio de incubação foi composto por tampão fosfato de potássio (10 mM, pH 7,0), dodecil-maltisídeo (0,6 mM) e 10-20 mg de proteínas (homogeneizado). A reação foi iniciada com a adição de 0,7 mg de citocromo *c* reduzido. A atividade do complexo IV foi medida a 25°C, durante dez minutos. A atividade da citocromo *c* oxidase foi medida pelo decréscimo na absorbância devido à oxidação de citocromo *c* previamente reduzido. As leituras foram feitas em 550 nm.

3.6.5 Atividade da CK

A atividade da CK foi determinada em homogeneizado de tecido (1:10, p/v) em solução salina. O homogeneizado foi centrifugado a 800 giros, durante 10 minutos e o sobrenadante foi armazenado na temperatura de -80°C para determinação da atividade enzimática.

O meio de incubação para dosagem da creatina quinase foi composto por fosfocreatina, ADP e glutatona reduzida. A formação de creatina foi medida por um método colorimétrico de acordo com Hughes e colaboradores (1962). As frações citosólica e mitocondrial da creatina quinase foram separadas por centrifugação (Ramirez e Jimenez, 2000).

3.6.6 Dosagem de proteínas

As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951) e a albumina bovina sérica (BSA) foi utilizada como padrão.

3.6.7 Atividade de histonas desacetilases

Os extratos nucleares para analisar a atividade de HDACs foram obtidos com o uso de kit (detecção fluorométrica), de acordo com as instruções do fabricante (Upstate, USA). Em seguida, 5 μL de extrato nuclear foram misturados com 5 μL de tampão substrato para análise de HDAC em uma placa com 384 poços e incubadas a 30°C, durante 45 minutos.

Concomitantemente, uma curva padrão foi preparada, com diferentes diluições de substrato desacetilase e controles positivo e negativo foram adicionadas à placa. Após, 10 μL de solução ativadora foram adicionados nos poços e a placa foi incubada em temperatura ambiente, durante 15 minutos. A leitura foi feita em leitor de fluorescência, com 360 nm para excitação e 460 nm para emissão. As proteínas totais foram determinadas pelo método de Lowry e colaboradores (1951).

3.6.8 Quantificação de proteínas por *Western blotting*

Foram analisados em amostras de hipocampo os níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK. Para tal análise, as proteínas foram isoladas através de eletroforese em SDS-PAGE e transferidas para nitrocelulose (Leal et al., 2002). As proteínas de interesse foram identificadas através do uso de anticorpos específicos anti- (ERK1/2 (fosforilada e total), JNK1/2 (fosforilada e total) e p38MAPK (fosforilada e total)) e quantificadas por densitometria das bandas (Leal et al., 2002, 2006). A revelação dos blottings foi realizada

através de ECL (anticorpo secundário ligado a peroxidase) e pela coloração usando NBT/BCIP (anticorpo secundário ligado a fosfatase alcalina).

As densidades ópticas (DOs) das bandas foram quantificadas utilizando o *software* Image Lab. Os níveis de fosforilação de ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK foram determinados pela razão entre a DO das bandas fosforiladas e DO das bandas totais.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises bioquímicas e de *Western blotting*, os dados foram expressos em média e desvio padrão e as diferenças entre os grupos experimentais foram determinadas pelo teste t de *Student* para amostras independentes. Os dados do teste de esquivia inibitória foram expressos em mediana e intervalo interquartil e as comparações entre os grupos experimentais foram feitas usando o teste U Mann-Whitney. Os grupos individuais foram analisados pelo teste Wilcoxon. Para a atividade de HDACs, os dados foram expressos em média e erro padrão da média, analisados pela análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo *post hoc* de LSD. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos em todas as análises.

Os programas utilizados foram *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) 20, *Statistica* 7, *GraphPad Prism* 5 e *Image Lab*.

4 RESULTADOS

4.1 EXPERIMENTO I

Em relação à quantificação de citocinas em líquido, os resultados deste estudo mostram que houve um aumento nos níveis de IL-6 ($p=0,005$) no grupo sepse (30 dias), quando comparado ao grupo sham (Figura 2) e um aumento nos níveis de TNF- α ($p=0,005$) no grupo sepse (60 dias), em relação ao grupo sham (Figura 3). Não houve alteração nos níveis das demais citocinas, em ambos os grupos sepse (30 e 60 dias), comparados ao grupo sham.

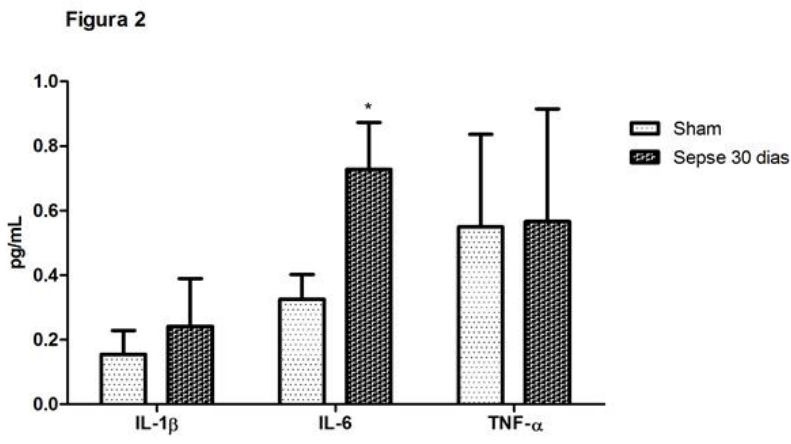


Figura 2: Níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em líquido de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 30 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p<0,05$.

Figura 3

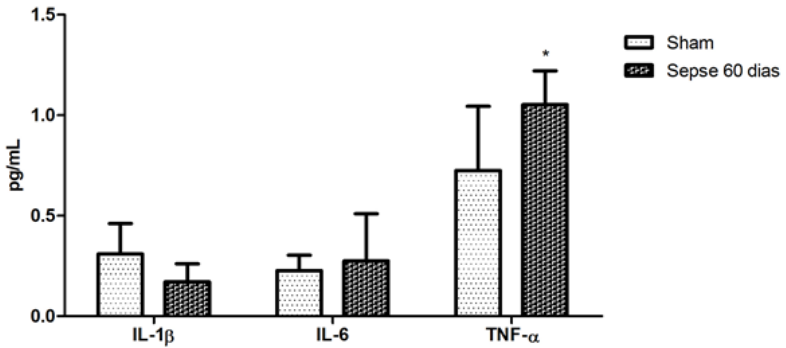


Figura 3: Níveis de citocinas (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) em líquido de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 60 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Em relação aos parâmetros de dano oxidativo avaliados neste estudo foi observado um aumento nos níveis de TBARS após 30 dias da indução de sepse (Figura 4) em córtex pré-frontal ($p=0,002$) e uma diminuição em hipocampo ($p=0,002$), estriado ($p=0,009$) e córtex ($p=0,009$) no grupo sepse, quando comparado ao grupo sham. A Figura 5 mostra uma diminuição dos grupos carbonila em córtex pré-frontal ($p=0,008$) e um aumento no estriado ($p=0,029$) no grupo sepse (30 dias) em relação ao grupo sham.

Figura 4

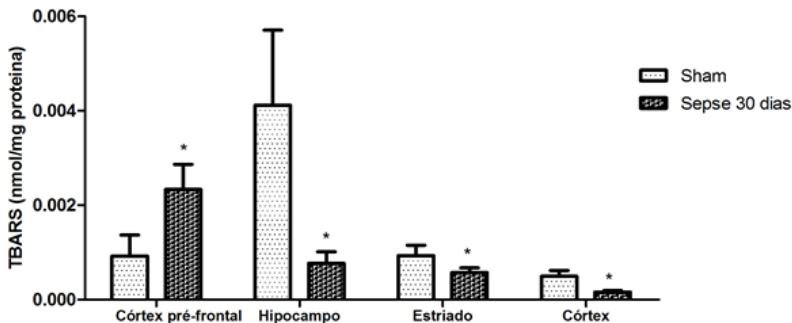


Figura 4: Níveis de TBARS no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 30 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Figura 5

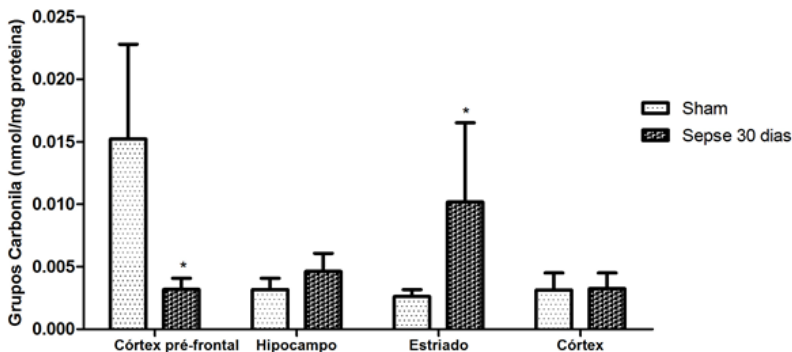


Figura 5: Níveis de grupos carbonila no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 30 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

As figuras 6 e 7 mostram, respectivamente, que em 60 dias após CLP houve uma diminuição dos níveis de TBARS em hipocampo ($p=0,005$) e um aumento de grupos carbonila em estriado ($p=0,012$) no grupo sepse, comparados ao grupo sham. Não foram observadas diferenças estatísticas nas demais estruturas cerebrais, em ambos os parâmetros oxidativos, no grupo sepse (60 dias), em relação ao grupo sham.

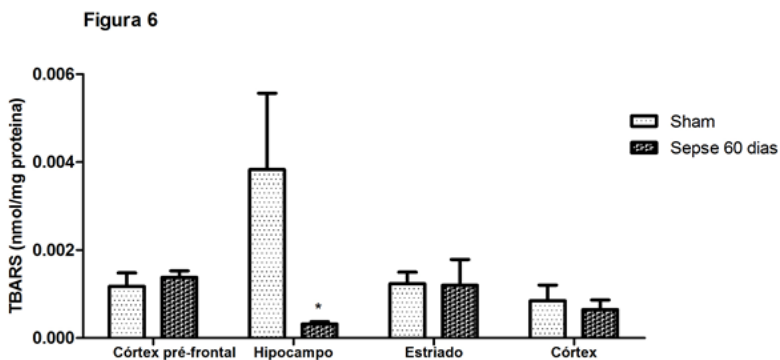


Figura 6: Níveis de TBARS no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 60 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p<0,05$.

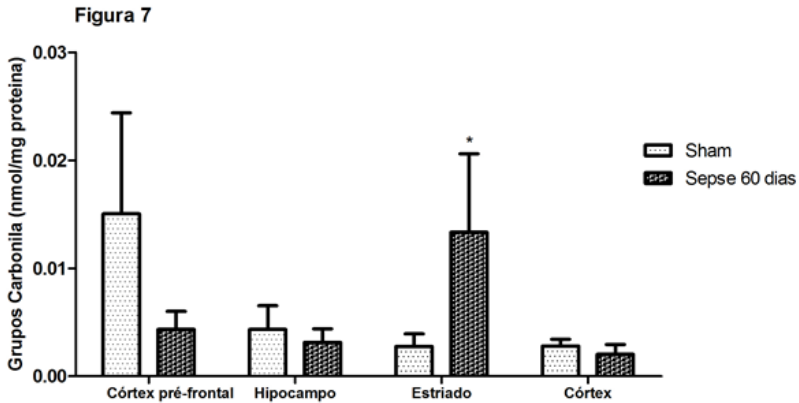


Figura 7: Níveis de grupos carbonila no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 60 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Referente à atividade dos complexos da cadeia transportadora de elétrons foi observado um aumento na atividade do complexo IV em hipocampo ($p=0,034$) no grupo sepse (30 dias), comparado ao grupo sham (Figura 11). As demais estruturas cerebrais não apresentaram diferença estatística na atividade dos complexos I, II, II-III no grupo sepse (30 dias), em relação ao grupo sham (Figuras 8, 9 e 10).

Figura 8

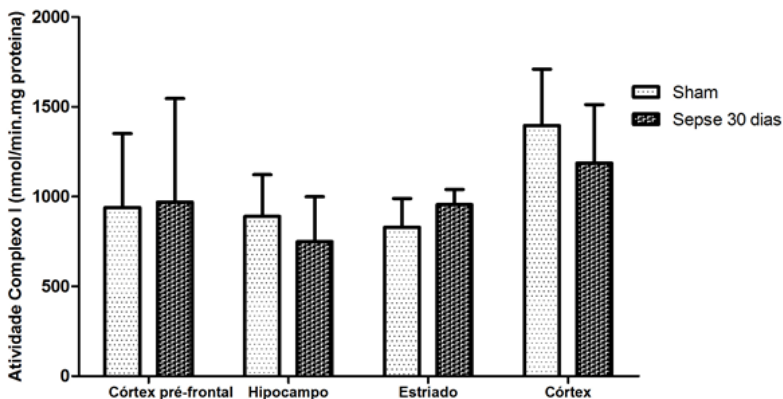


Figura 8: Atividade do complexo I no cérebro (córTEX pré-frontal, hipocampo, estriado e córTEX) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 30 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p<0,05$.

Figura 9

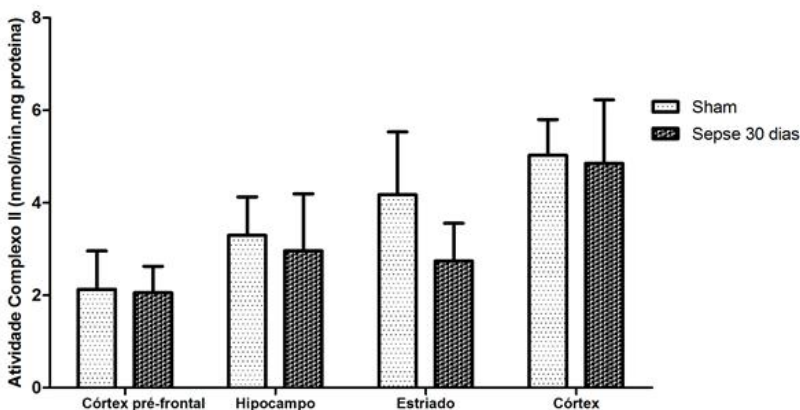


Figura 9: Atividade do complexo II no cérebro (córTEX pré-frontal, hipocampo, estriado e córTEX) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 30 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p<0,05$.

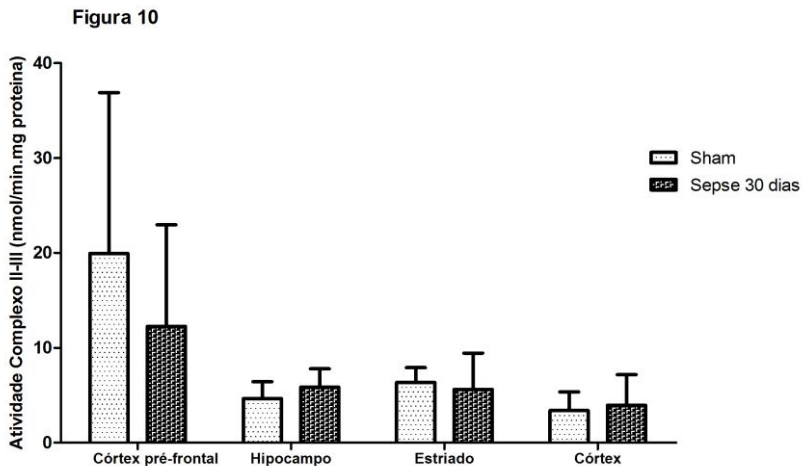


Figura 10: Atividade do complexo II-III no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 30 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

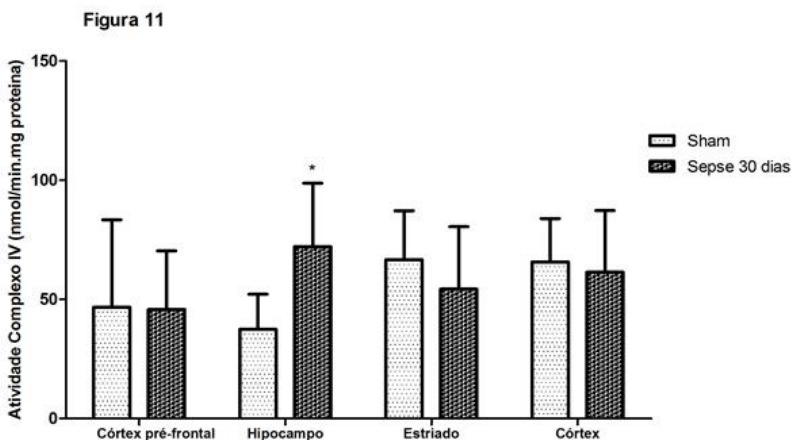


Figura 11: Atividade do complexo IV no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 30 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Entretanto, houve uma diminuição na atividade do complexo I em córtex pré-frontal ($p=0,038$), hipocampo ($p=0,016$) e estriado ($p=0,043$) no grupo sepse (60 dias), comparado ao grupo sham (Figura 12). A atividade dos complexos II, II-III e IV não apresentou diferença estatística, em todas as estruturas cerebrais analisadas, no grupo sepse (60 dias), em relação ao grupo sham (Figuras 13, 14 e 15).

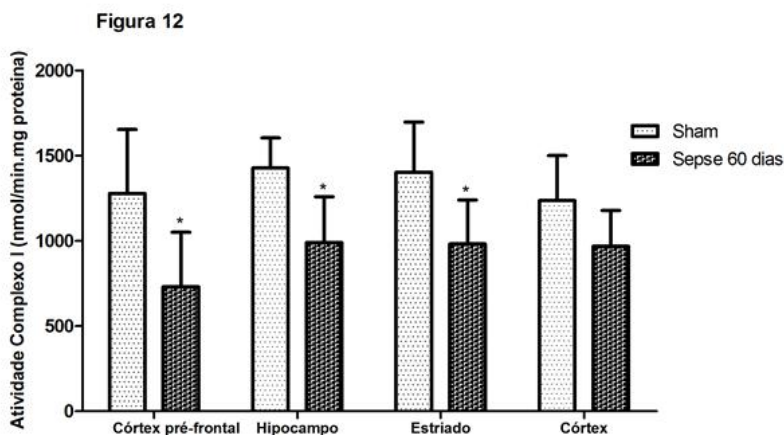


Figura 12: Atividade do complexo I no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 60 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p<0,05$.

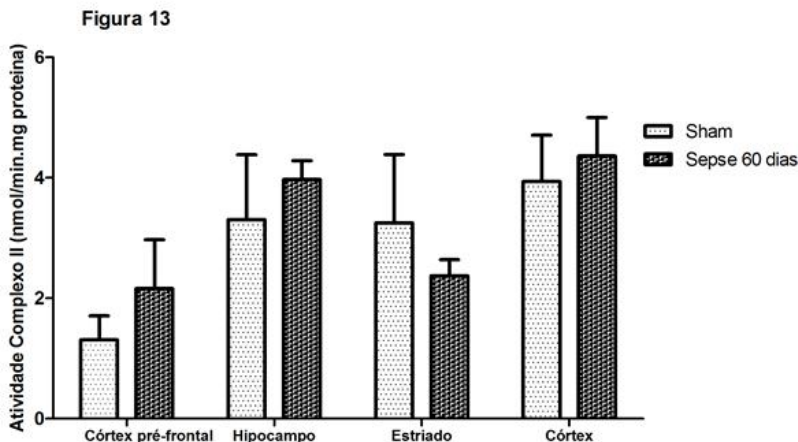


Figura 13: Atividade do complexo II no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 60 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

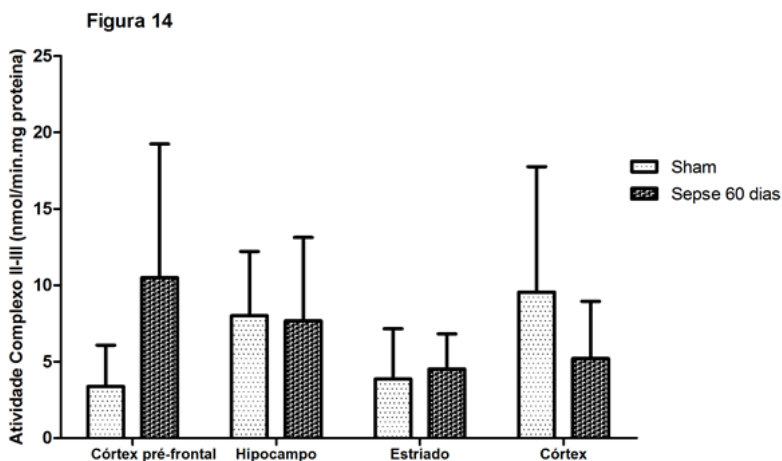


Figura 14: Atividade do complexo II-III no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 60 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Figura 15

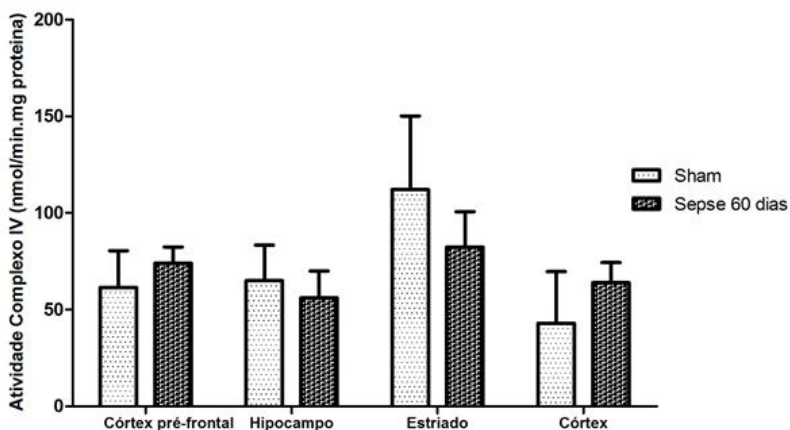


Figura 15: Atividade do complexo IV no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 60 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p<0,05$.

A atividade da CK avaliada neste estudo é demonstrada nas Figuras 16 e 17. Não houve diferença estatística na atividade da CK em todas as regiões cerebrais analisadas. Todos os dados foram analisados comparando o grupo sepse (30 e 60 dias) com o grupo sham.

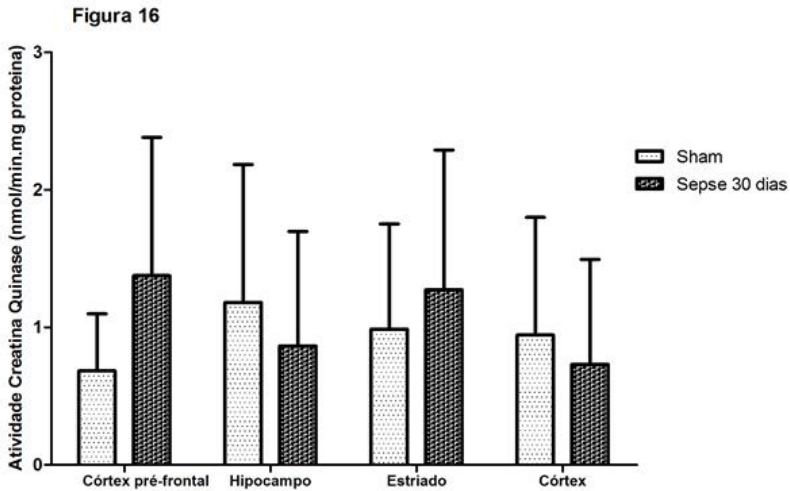


Figura 16: Atividade da creatina quinase no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 30 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média \pm desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

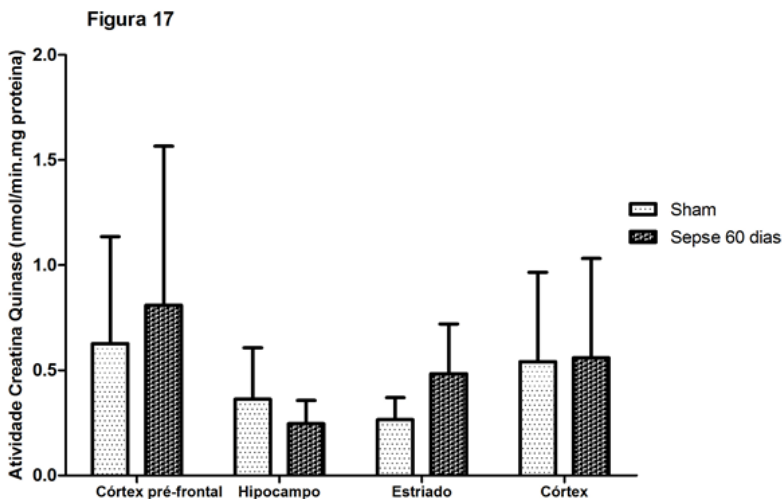


Figura 17: Atividade da creatina quinase no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 60 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). *Diferente de sham, Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

4.2 EXPERIMENTO II

A Figura 18 representa os resultados do teste de esQUIVA inibitória. Em 10 dias após a indução de sepse por CLP houve uma significativa diminuição no tempo de latência do grupo sepse ($p=0,002$), quando comparado ao grupo sham, indicando dano cognitivo nestes animais. Porém, a administração de SB foi capaz de reverter o dano na memória aversiva ($p=0,002$) observado no grupo sepse, aumentando o tempo de latência dos animais.

Figura 18

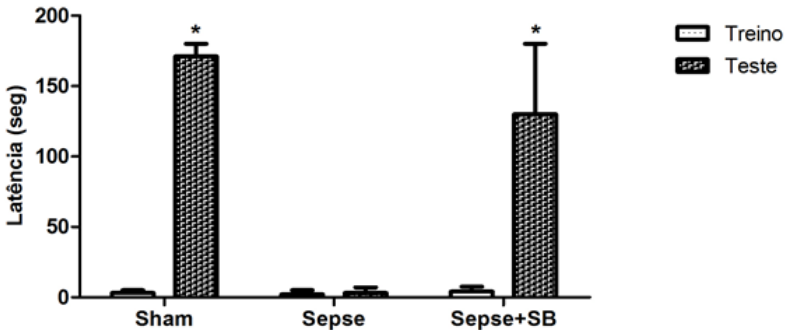


Figura 18: Teste de esquiwa inibitória. Os animais foram submetidos a sham ou sepsis por ligação e perfuração cecal (CLP). Em 10 dias após a indução de sepsis, foi realizado o treino dos animais no aparelho e 24 horas após, realizou-se o teste. Valores expressos como mediana±intervalo interquartil (n=12 por grupo). *Diferente do treino, $p<0,05$.

A atividade de HDACs é demonstrada nas Figuras 19 e 20. Foi observado um aumento na atividade de HDACs em hipocampo ($p=0,023$) e córtex ($p=0,026$) 24 horas após CLP em animais sépticos, quando comparado ao grupo sham (Figura 19). Nas demais estruturas cerebrais não houve diferença estatística entre os grupos. Em 10 dias após a indução de sepsis, foi observado um aumento na atividade de HDACs em córtex pré-frontal ($f=7,951$, $df=2$, $p=0,003$) e hipocampo ($f=6,617$, $df=2$, $p=0,006$) no grupo sepsis (10 dias), em comparação ao grupo sham. Entretanto, a administração de SB no grupo sepsis inibiu a atividade de HDACs em córtex pré-frontal e hipocampo (Figura 20).

Figura 19

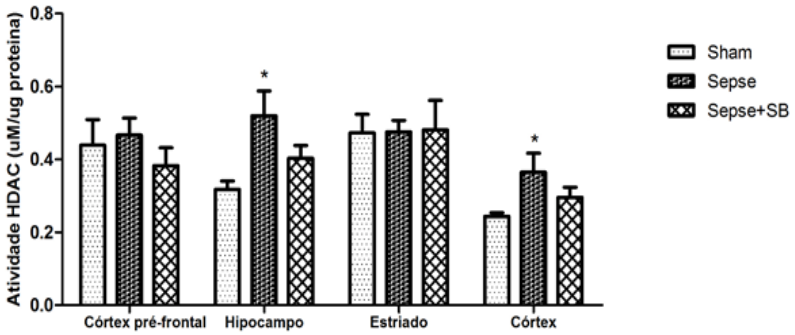


Figura 19: Microinjeção de Butirato de sódio (SB) no ventrículo lateral e atividade de histonas desacetilases no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 24 horas após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±erro padrão (n=7 por grupo). *Diferente de sham, #diferente de sepse, ANOVA de uma via, *post hoc* LSD, $p<0,05$.

Figura 20

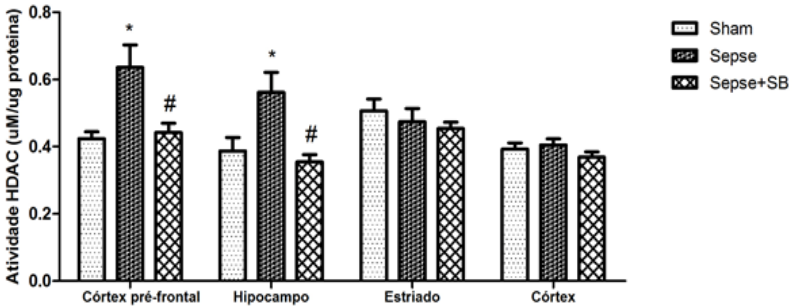


Figura 20: Microinjeção de Butirato de sódio (SB) no ventrículo lateral e atividade de histonas desacetilases no cérebro (córtex pré-frontal, hipocampo, estriado e córtex) de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 10 dias após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). Valores expressos como média±erro padrão (n=7 por grupo). *Diferente de sham, #diferente de sepse, ANOVA de uma via, *post hoc* LSD, $p<0,05$.

4.3 EXPERIMENTO III

Em relação aos níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK avaliados em 24 horas e 10 dias após a indução de sepse por CLP, os resultados do presente estudo indicam que não houve diferença estatística entre os grupos sham e sepse sobre os níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK em 24 horas (ERK1/2: $p=0,70$; JNK1/2: $p=0,95$; p38MAPK: $p=0,88$) e 10 dias (ERK1/2: $p=0,64$; JNK1/2: $p=0,81$; p38MAPK: $p=0,81$) após a indução de sepse por CLP (Figuras 21A, 21B, 22A, 22B, 23A e 23B).

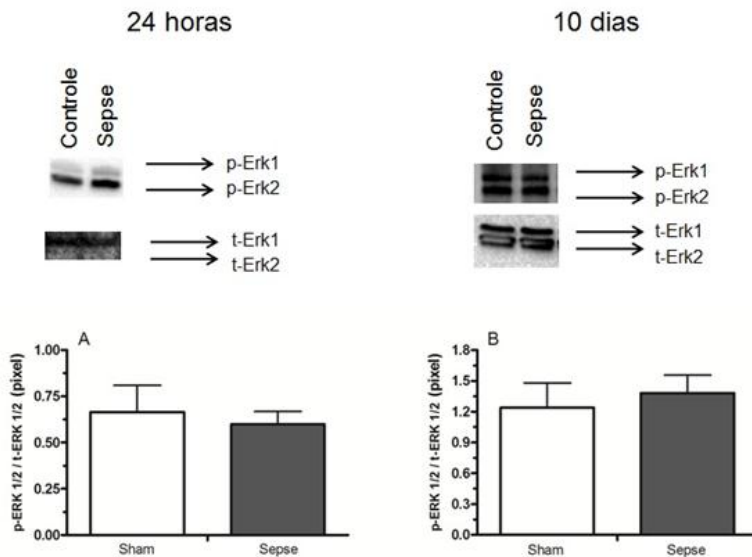


Figura 21 (A e B): Níveis de fosforilação da proteína ERK1/2 em hipocampo de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 24 horas (A) e 10 dias (B) após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). A parte superior da figura mostra o *Western blotting* representativo de ERK1/2. A parte inferior da figura representa uma análise quantitativa por densidade óptica de ERK1/2 fosforilada em relação à ERK1/2 total das mesmas variáveis experimentais descritas acima. Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

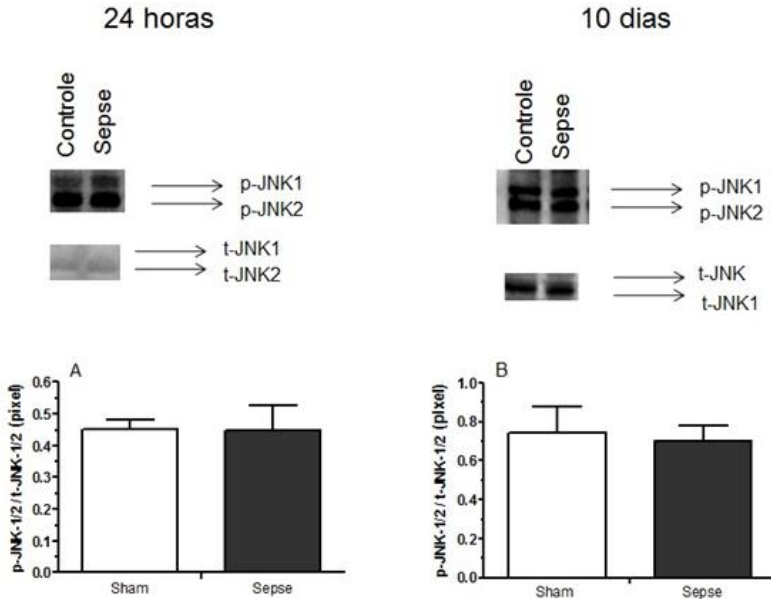


Figura 22 (A e B): Níveis de fosforilação da proteína JNK1/2 em hipocampo de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 24 horas (A) e 10 dias (B) após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). A parte superior da figura mostra o *Western blotting* representativo de JNK1/2. A parte inferior da figura representa uma análise quantitativa por densidade óptica de JNK1/2 fosforilada em relação à JNK1/2 total das mesmas variáveis experimentais descritas acima. Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

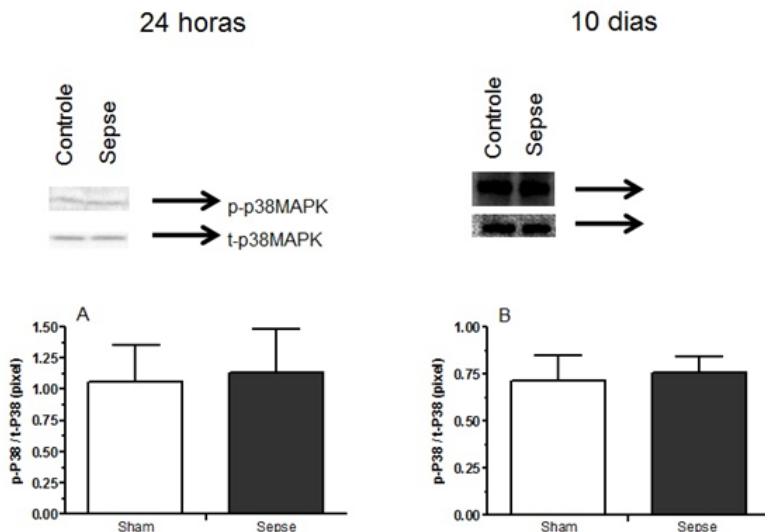


Figura 23 (A e B): Níveis de fosforilação da proteína p38MAPK em hipocampo de ratos Wistar sobreviventes à sepse em 24 horas (A) e 10 dias (B) após a indução por ligação e perfuração cecal (CLP). A parte superior da figura mostra o *Western blotting* representativo de p38MAPK. A parte inferior da figura representa uma análise quantitativa por densidade óptica de p38MAPK fosforilada em relação à p38MAPK total das mesmas variáveis experimentais descritas acima. Valores expressos como média±desvio padrão (n=5 por grupo). Teste t *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Os dados do Experimento I foram publicados na revista *Synapse* (DOI: 10.1002/syn.21686). Os resultados do Experimento II foram submetidos ao periódico *Journal of Neuroimmunology*. Os dados do Experimento III estão em fase de complementação para posterior submissão ao periódico.

5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi observado um aumento nos níveis de IL-6 no grupo sepse (30 dias) e de TNF- α no grupo sepse (60 dias) no líquor dos animais. Houve um aumento nos níveis de TBARS em córtex pré-frontal e uma diminuição destes níveis em hipocampo, estriado e córtex no grupo sepse (30 dias), bem como uma diminuição no conteúdo de grupos carbonila em córtex pré-frontal e um aumento em estriado no grupo sepse (30 dias). Também foi demonstrada uma diminuição nos níveis de TBARS em hipocampo no grupo sepse (60 dias) e um aumento no conteúdo de grupos carbonila em estriado no grupo sepse (60 dias). A atividade do complexo IV foi aumentada em hipocampo no grupo sepse (30 dias) e houve uma diminuição na atividade do complexo I em córtex pré-frontal, hipocampo e estriado no grupo sepse (60 dias). Nenhuma diferença significativa foi encontrada na atividade da CK em todas as estruturas cerebrais analisadas.

Adicionalmente, observou-se uma diminuição no tempo de latência nos animais do grupo sepse (10 dias) no teste de esQUIVA inibitória e a administração de SB reverteu o dano na memória aversiva observado nos animais sépticos (10 dias). Houve um aumento na atividade de HDACs em hipocampo e córtex no grupo sepse (24 horas) e em córtex pré-frontal e hipocampo no grupo sepse (10 dias). Além disso, a administração de SB inibiu a atividade de HDACs em córtex pré-frontal e hipocampo dos animais do grupo sepse (10 dias).

Foi observado também que não houve diferença estatística entre os grupos sham e sepse sobre os níveis de fosforilação das

proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK em hipocampo 24 horas e 10 dias após a indução de sepse por CLP.

Evidências na literatura têm demonstrado que as citocinas apresentam um importante papel na inflamação do SNC e que a liberação destas está aumentada em pacientes sépticos criticamente doentes (Rothwell et al., 2000; van den Berghe et al., 2001; Aly et al., 2006). De fato, o TNF- α e a IL-1 β parecem mediar a maioria dos distúrbios fisiológicos que ocorrem na sepse (Bauhofer et al., 2004). Já a IL-6 e a IL-8, intensificam e perpetuam a resposta inflamatória, podendo exercer um papel no reparo tecidual. Ainda, a IL-6, além de modular a função de linfócitos, ativar a coagulação e induzir a síntese de proteínas de fase aguda, apresenta propriedades pró e anti-inflamatórias, sendo, portanto, a citocina mais estudada (Ogiku et al., 2012; Cauvi et al., 2012). Interessantemente, a IL-6 pode regular negativamente a produção de TNF- α e IL-1 β , como verificado tanto em modelos animais quanto em cultura de células, o que pode ser bastante importante na limitação da reação inflamatória (Heinrich et al., 2003). Dessa forma, a inibição da liberação de TNF- α está associada ao aumento na suscetibilidade à infecção e o decréscimo dos níveis de IL-6 pode comprometer o recrutamento celular para o foco infeccioso, diminuindo a resposta do hospedeiro (Kasten et al., 2010; Ogiku et al., 2012).

Oberholzer e colaboradores (2011) indicam que os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 estão significativamente aumentados no fluido cefalorraquidiano de crianças com encefalopatia e são correlacionados com respostas neurológicas anormais, sugerindo efeitos deletérios sobre o tecido cerebral. Também foi verificado por Comim e colaboradores (2011) que os níveis de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-10) estão

aumentados em tecido cerebral de ratos em 6, 12 e 24 horas após a indução de sepse por CLP. Porém, 10 dias após, os níveis destas mesmas citocinas foram encontrados diminuídos.

No presente estudo, foi observado apenas um aumento nos níveis de IL-6 (30 dias) e de TNF- α (60 dias). É digno de nota que, nestes mesmos tempos, ratos sobreviventes à sepse apresentaram dano cognitivo em 10 e 30 dias, mas não em 60 dias após a indução (Tuon et al., 2008). Entretanto, as citocinas produzidas periféricamente em resposta a uma infecção podem agir sobre o cérebro, principalmente em sintomas comportamentais relacionados à sepse (Dantzer et al., 2008). Neste contexto, é possível que as citocinas produzidas durante a resposta séptica (30 e 60 dias) possam contribuir para o desenvolvimento do déficit cognitivo.

Dados de estudos clínicos e experimentais indicam que a sepse está associada com um aumento na produção de ERO, diminuição da capacidade antioxidante e acúmulo de marcadores de dano oxidativo (Boczkowski et al., 1999; Abd El-Gaward e Khalifa, 2001; Crouser et al., 2004; D'Avilla et al., 2008). Dessa forma, a resposta inflamatória na sepse é caracterizada pela liberação excessiva de citocinas, que poderia induzir estresse oxidativo, levando à disfunção mitocondrial, com consequente morte celular (Galley, 2011).

O cérebro é frequentemente exposto às ERO, devido ao seu alto consumo de oxigênio (Halliwell, 2006) e, durante a sepse, parece ser um dos primeiros órgãos afetados (Wilson, 2009; Comim et al., 2011). Os neurônios são as células mais dependentes de oxigênio dentre os tipos celulares do SNC (Berg et al., 2011) e a degeneração mitocondrial e apoptose têm sido observadas em diferentes regiões

cerebrais de pacientes sépticos e em modelos animais (Papadopoulos et al., 2000; Semmler et al., 2005; Barichello et al., 2007; Steckert et al., 2014).

Chuang e colaboradores (2012) demonstraram, experimentalmente, em ratos sépticos um aumento na produção de ânion superóxido (O_2^-) no tecido cerebral. Adicionalmente, níveis aumentados de óxido nítrico (NO) e de peroxinitrito ($ONOO^-$) no cérebro desempenham um papel crítico na função neuronal na sepse (Berg et al., 2011). Em duas horas após a administração de LPS foi observado um aumento na geração de ERO em cérebro de ratos (Abd El-Gaward e Khalifa, 2001). Além disso, utilizando um modelo animal induzido por CLP, Barichello e colaboradores (2006) demonstraram que o dano oxidativo cerebral ocorre em tempos iniciais da sepse. Estas alterações oxidativas persistem por até 10 dias após a indução da sepse (Comim et al., 2011).

Neste estudo, foi encontrado um aumento nos níveis de TBARS em córtex pré-frontal e um aumento de grupos carbonila em estriado no grupo sepse (30 dias), em relação ao grupo Sham. Em 60 dias após, houve somente um aumento de grupos carbonila em estriado. Considerando que estes resultados corroboram dados encontrados na literatura, um fato importante é que os neurônios, de todas as células do SNC, são particularmente suscetíveis ao dano oxidativo devido aos níveis reduzidos de antioxidantes. Entretanto, neste estudo não foi avaliada a atividade de enzimas antioxidantes, o que poderia ser uma limitação ao analisar os resultados encontrados.

Interessantemente, este estudo também mostrou uma diminuição no dano oxidativo a lipídios e proteínas nos grupos sepse (30

e 60 dias) em algumas regiões cerebrais. Considerando que a oxidação lipídica e a carbonilação proteica são amplamente utilizadas como biomarcadores do estresse oxidativo, representando um espectro de modificações oxidativas, a quantificação dos conteúdos de grupos carbonila apresenta uma vantagem sobre os produtos da lipoperoxidação, pois as proteínas oxidadas geralmente são mais estáveis (Dalle-Donne et al., 2003). A diminuição dos níveis de grupos carbonila demonstrada aqui pode se dever ao fato de que estes sofreram ação de proteossomos durante a fase tardia da sepse, não possível de se observar nas fases iniciais (modelo agudo) (Dalle-Donne et al., 2006).

O proteossomo está associado à eliminação de proteínas anormais (agregadas) e oxidadas, além de fazer parte de mecanismos celulares de defesa, controlando o dano oxidativo proteico (Ding et al., 2006; Farout e Friguet, 2006). A superprodução de proteínas anormais, excedendo a capacidade de degradação proteica, é um importante fator que leva à formação de agregados proteicos citotóxicos (Farout e Friguet, 2006). Um comprometimento na atividade dos proteossomos está diretamente ligado à senescência celular, o que levaria a uma capacidade diminuta em eliminar proteínas oxidadas (Torres et al., 2003). Hipotetiza-se que a sepse, na sua fase tardia, possa ter impedido este comprometimento e que estes tipos enzimáticos estejam funcionais, diminuindo os níveis de grupos carbonila encontrados neste trabalho.

O dano oxidativo mitocondrial na sepse é uma complexa série de eventos (Crouser, 2004). ERO, somadas à liberação exacerbada de uma variedade de mediadores inflamatórios, podem agir direta ou indiretamente sobre a função mitocondrial e a produção de ATP (James et al., 2002). Entretanto, a eficiência da fosforilação oxidativa

mitocondrial está comprometida na sepse, em parte, devido à lesão na membrana mitocondrial (Crouser et al., 2004). Consequentemente, os elétrons que normalmente fluiriam através da cadeia transportadora de elétrons são desviados para o ciclo da coenzima Q (transporte de elétrons no complexo III), gerando O_2^- (Crouser et al., 2004).

No presente trabalho foi demonstrado que a atividade do complexo I encontrou-se inibida 60 dias após a indução de sepse em algumas regiões cerebrais. Navarro e Boveris (2007) relataram que o aumento no dano oxidativo mitocondrial e na atividade da CK ocorreu quando os animais apresentaram sinais de disfunção no SNC. Sendo assim, é provável que a disfunção cerebral na sepse possa estar associada ao estresse oxidativo e que o aumento de citocinas inflamatórias pode levar à disfunção no complexo I, resultando no dano oxidativo e comprometendo a capacidade cognitiva. No entanto, cabe ressaltar que o quadro geral de disfunção mitocondrial na sepse é complexo. Possivelmente, grande parte dessa controvérsia pode estar associada a fatores como diferenças de modelo experimental, regiões cerebrais analisadas e o tempo de progressão da sepse.

Dados relacionados à epigenética também foram analisados no presente estudo. A epigenética medeia diversos aspectos ambientais envolvidos na fisiopatologia de transtornos psiquiátricos e doenças inflamatórias (Rutten e Mill, 2009; Bierne et al., 2012). Adicionalmente, neurotrofinas como o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) e o fator de crescimento neural (NGF) desempenham um papel crucial na diferenciação, sobrevivência e crescimento neuronal e no controle da morte celular durante o desenvolvimento cerebral (Hashimoto et al., 2004; Bramham e Messaoudi, 2005). De modo

complementar, níveis de BDNF e o volume hipocampal foram encontrados diminuídos após a sepse (Duman e Monteggia, 2006; Comim et al., 2010).

Interessantemente, Wu e colaboradores (2008) demonstraram que inibidores de HDACs regulam positivamente a transcrição gênica de NGF e BDNF, protegendo neurônios dopaminérgicos. Estes mesmos autores também mostraram que o tratamento crônico com VPA reverteu os déficits cognitivos, possivelmente pela diminuição da inflamação e da apoptose no cérebro, assim como a ativação da via de sinalização BDNF-TrkB (Wu et al., 2013). O mesmo efeito foi demonstrado em modelos animais de lesão traumática e isquemia cerebral (Dash et al., 2010; Xuan et al., 2012). Além disso, o pré-tratamento com SB, VPA e TSA diminuiu a resposta inflamatória induzida por LPS e protegeu neurônios dopaminérgicos contra danos em culturas celulares (Chen et al., 2007).

No presente estudo, observou-se que a administração de SB reverteu a memória aversiva e inibiu a atividade de HDACs no pré-frontal e no hipocampo de ratos em 10 dias após a indução de sepse por CLP, sugerindo que a atividade de HDACs possa estar associada ao dano cognitivo. Estes resultados estão de acordo com a literatura, em que alguns autores indicam que as respostas inflamatórias e imunológicas evocadas pela sepse podem induzir disfunção cerebral, com consequente déficit de memória (Dal-Pizzol et al., 2010).

Embora doenças inflamatórias como a sepse possam induzir aumento na atividade de HDACs, diminuindo ou inativando a transcrição gênica (Fang et al., 2013; Wu et al., 2013), esta é a primeira demonstração de que a atividade de HDACs foi regulada positivamente

no cérebro em fase tardia da sepse. Todavia, a administração de SB reverteu esta condição somente em córtex pré-frontal e hipocampo (10 dias). Isso pode ser explicado, pelo menos em parte, em função de que regiões cerebrais podem responder diferentemente à sepse, devido aos subconjuntos heterogêneos de células. Porém, mesmo dentro de uma população homogênea de células, pode haver uma heterogeneidade em termos metabólicos e aspectos fisiológicos (Sims, 1991; Sonnewald et al., 1998).

Adicionalmente, foi descrito por Lovatel e colaboradores (2012) que os níveis de acetilação de histonas em hipocampo e córtex pré-frontal de ratos podem estar correlacionados com o desempenho da memória aversiva, suportando a ideia de que os mecanismos epigenéticos, especialmente os relacionados com a modulação do estado de acetilação, podem estar envolvidos no déficit cognitivo. Neste contexto, os inibidores de HDACs são alternativas farmacológicas que demonstraram uma melhora nas funções cognitivas e na regulação da plasticidade neuronal, atuando como neuroprotetores em modelos animais de doenças inflamatórias, neurodegenerativas e de isquemia (Kilgore et al., 2010; Ryu et al., 2011).

Outro resultado observado no presente estudo foi em relação às MAPKs. As MAPKs são uma família de proteínas sinalizadoras que são ativadas em resposta a estímulos extracelulares, sendo composta pelas proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK (Bodles e Barger, 2005). A atividade da ERK1/2 está envolvida na proliferação, diferenciação e sobrevivência celular, enquanto a JNK1/2 e a p38MAPK estão associadas à apoptose (Kanayama et al., 2010).

Estudos têm consistentemente demonstrado que, em hipocampo, a ativação de MAPK pode ocorrer em resposta ao glutamato, através da ativação de receptores NMDA e AMPA, estresse oxidativo, fatores de crescimento, citocinas ou pela ativação de outras proteínas quinases (Jerusalinsky et al., 1992; Sweatt, 2001; Runchel et al., 2011). Consequentemente, a modificação na regulação das MAPKs está associada, em muitos casos, com processos prejudiciais, incluindo perda da espinha dendrítica, morte celular e comprometimento da memória e aprendizado (Kim e Choi, 2010). Por conseguinte, a alteração das vias de sinalização ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK por neurotoxinas pode implicar em importantes disfunções no SNC (Sanderson e Dell'Acqua, 2011).

Neste contexto, recentemente foi demonstrado que inflamação crônica cerebral induzida por LPS em ratos diminuiu a plasticidade sináptica e aumentou a fosforilação de MAPKs (p38 e ERK1/2) em hipocampo, levando a déficits cognitivos observados em doenças inflamatórias e neurodegenerativas (Ma et al., 2014). Adicionalmente, Wang e colaboradores (2012) realizaram a análise da via de sinalização da inflamação por *Western blotting* em células RAW264.7 incubadas com LPS (12 e 24 horas) e observaram um aumento dos níveis de fosforilação de ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK no grupo LPS, comparados ao grupo controle, em 12 e 24 horas. Já Yang e colaboradores (2008) observaram que a exposição de cardiomiócitos neonatais em plasma séptico aumentou os níveis de fosforilação de ERK1/2 e p38MAPK entre 5-120 minutos da avaliação. Ainda, estudos indicando o envolvimento de ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK na regulação de mediadores inflamatórios podem ser encontrados na

literatura (Kaminska, 2005; Waetzig et al., 2005). A via de sinalização da JNK1/2 foi encontrada ativada em cultura de células microgliais após a estimulação com LPS, levando a expressão de TNF- α (Waetzig et al., 2005).

Entretanto, os resultados do presente estudo não mostraram diferenças significativas para os níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK em hipocampo de ratos submetidos à sepse induzida por CLP. Este trabalho, talvez não tenha avaliado o tempo suficiente para detectar estes aumentos na fosforilação, necessitando de estudos complementares. Porém, não se pode descartar um possível envolvimento destas proteínas no dano cognitivo observado na sepse, assim como na sua fisiopatologia geral.

O presente trabalho sugere que a neuroinflamação, juntamente com a disfunção mitocondrial e o estresse oxidativo possa estar associada ao déficit cognitivo observado na sepse, principalmente na sua fase tardia. Em outros processos neurodegenerativos (como doenças de Alzheimer e Parkinson, esclerose múltipla e esclerose lateral amiotrófica), apesar de terem fatores desencadeantes distintos, uma vez iniciada a ativação microglial, leva à amplificação da resposta inflamatória e produção de mediadores neurotóxicos, assim como na sepse.

6 CONCLUSÃO

As alterações neuroquímicas encontradas neste estudo podem contribuir para a compreensão do dano cognitivo observado em ratos sobreviventes à sepse. Além disso, demonstrou-se que a administração de SB foi capaz de reverter o déficit na memória aversiva dos animais sépticos. Por fim, a sepse não alterou os níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK no hipocampo, nos tempos avaliados.

6.1 PERSPECTIVAS

Pretende-se dar continuidade ao estudo por meio da avaliação da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase em fase tardia (30 e 60 dias), além da avaliação dos níveis de fosforilação das proteínas ERK1/2, JNK1/2 e p38MAPK em hipocampo, em diferentes tempos (30 min, 1h, 4h e 12h) após a indução por CLP, permitindo uma maior compreensão da fisiopatologia do dano cognitivo na sepse.

REFERÊNCIAS

Alberti C, Brun-Buisson C, Goodman SV, Guidici D, Granton J, Moreno R, Smithies M, Thomas O, Artigas A, Le Gall JR, European Sepsis Group. Influence of systemic inflammatory response syndrome and sepsis on outcome of critically ill patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 168:77-84.

Aly H, Khashaba MT, El-Ayouty M, El-Sayed O, Hasanein BM. IL-1beta, IL-6 and TNF-alpha and outcomes of neonatal hypoxic ischemic encephalopathy. *Brain Dev.* 2006; 28:178-82.

American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference, Chicago. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest.* 1991; 101(6):1644-55.

Angus DC, Musthafa AA, Clermont G, Griffin MF, Linde-Zwirble WT, Dremsizov TT, Pinsky MR. Quality-adjusted survival in the first year after the acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 163:1389-94.

Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis.* 2004; 16(1):1-13.

Barichello T, Fortunato JJ, Vitali AM, Feier G, Reinke A, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Oxidative variables in the rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2006; 34:886-9.

Barichello T, Machado RA, Constantino L, Valvassori SS, Réus GZ, Martins MR, Petronilho F, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Crit Care Med.* 2007b; 35:2186–90.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Constantino LS, Machado RA, Valvassori SS, Moreira JC, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Behavioral deficits in sepsis-surviving rats induced by cecal ligation and perforation. *Braz J Med Biol Res.* 2007a; 40:831-7.

Barichello T, Martins MR, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Long-term cognitive impairment in sepsis survivors. *Crit Care Med.* 2005b; 33:1671.

Barichello T, Martins R, Reinke A, Feier G, Ritter C, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Cognitive Impairment in sepsis survivors from cecal ligation and perforation. *Crit Care Med.* 2005a; 33:221-3.

Bauhofer A, Schwarting RK, Koster M, Schmitt A, Lorenz W, Pawlak CR. Sickness behavior of rats with abdominal sepsis can be improved by antibiotic and G-CSF prophylaxis in clinic modeling randomized trials. *Inflamm Res.* 2004; 53:697–705.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Bioquímica* 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2004.

Berg RMG, Moller K, Bailey DM. Neuro-oxidative-nitrosative stress in sepsis. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011; 31:1532–44.

Bierne H, Hamon M, Cossart P. Epigenetics and Bacterial Infections. *Cold Spring Harb. Perspect Med.* 2012; 2(12):a010272.

Birden E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense. *WAO J.* 2012; 5(1):9–19.

Blanchard F, Chipoy C. Histone deacetylase inhibitors: new drugs for the treatment of inflammatory diseases? *Drug Discov Today.* 2005; 10(3):197–04.

Bochud P, Glauser MP, Calandra T. Antibiotics in sepsis. *Intensive Care Med.* 2001; 27(1):S33-S48.

Bodles AM, Barger SW. Secreted beta-amyloid precursor protein activates microglia via JNK and p38-MAPK. *Neurobiol Aging.* 2005; 26:9-16.

Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM Consensus Conference on Sepsis and Organ Failure. *Chest.* 1992; 101(6):1481-3.

Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care.* 2007; 11(2):R49.

Bozza FA, D'Avila JC, Ritter C, Sonnevile R, Sharshar T, Dal-Pizzol F. Bioenergetics, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the pathophysiology of septic encephalopathy. *Shock.* 2013; 1:10-6.

Bramham CR, Messaoudi E. BDNF function in adult synaptic plasticity: the synaptic consolidation hypothesis. *Prog Neurobiol.* 2005; 76(2):99-125.

Brealey D, Karyampudi S, Jacques T, Novelli M, Stidwill R, Taylor V, Smolenski RT, Singer M. Mitochondrial dysfunction in a

long-term rodent model of sepsis and organ failure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2004; 286:491–7.

Cao W, Bao C, Padalko E, Lowenstein CJ. Acetylation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 inhibits Toll-like receptor signaling. *J Exp Med.* 2008; 205(6): 1491–1503.

Carvalho PRA, Trotta EA. Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse. *J Pediatr.* 2003; 79.

Cassina A, Radi R. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxynitrite on mitochondrial electron transport. *Arch Biochem Biophys.* 1996; 328:309-16.

Cauvi DM, Song D, Vazquez DE, Hawisher D, Bermudez JA, Williams MR, Bickler S, Coimbra R, De Maio A. A period of irreversible therapeutic intervention during sepsis correlates with a phase of innate immune dysfunction. *J Biol Chem.* 2012; 287(24):19804-15.

Chen PS, Wang CC, Bortner CD, Peng GS, Wu X, Pang H, Lu RB, Gean PW, Chuang DM, Hong JS. Valproic acid and other histone deacetylase inhibitors induce microglial apoptosis and attenuate lipopolysaccharide-induced dopaminergic neurotoxicity. *Neuroscience.* 2007; 149: 203–12.

Chihuaulaf RH, Contreras PA, Wittwer FG. Pathogenesis of oxidative stress: consequences and evaluation in animal health. *Vet Med.* 2002; 33(3):265-83.

Chuang YC, Tsai JL, Chang AY, Chan JY, Liou CW, Chan SH. Dysfunction of the mitochondrial respiratory chain in the rostral

ventrolateral medulla during experimental endotoxemia in the rat. *J Biomed Sci.* 2012; 9(6 Pt 1):542-8.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LS, Felisberto F, Petronilho F, Rezin GT, Scaini G, Daufembach JF, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Alterations in inflammatory mediators, oxidative stress parameters and energetic metabolism in the brain of sepsis survivor rats. *Neurochem Res.* 2011; 36(2):304-11.

Comim CM, Rezin GT, Scaini G, Di-Pietro PB, Cardoso MR, Petronilho FC, Ritter C, Streck EL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Mitochondrial respiratory chain and creatine kinase activities in rat brain after sepsis induced by cecal ligation and perforation. *Mitochondrion.* 2008; 8(4):313-8.

Comim CM, Cassol-Jr OJ, Constantino LC, Petronilho F, Constantino LS, Stertz L, Kapczinski F, Barichello T, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Depressive-like parameters in sepsis survivor rats. *Neurotox Res.* 2010; 17(3):279-86.

Crouser ED, Julian MW, Huff JE, Joshi MS, Bauer JA, Gadd ME, Wewers MD, Pfeiffer DR. Abnormal permeability of inner and outer mitochondrial membranes contributes independently to mitochondrial dysfunction in the liver during acute endotoxemia. *Crit Care Med.* 2004; 32:478-88.

Cuschieri J, Maier RV. Mitogen-activated protein kinase (MAPK). *Crit Care Med.* 2005; 33:S417-S419.

Dalle-Donne I, Aldini G, Carini M, Colombo R, Rossi R, Milzani A. Protein carbonylation, cellular dysfunction and disease progression. *J Cell Mol Med.* 2006; 10 (2):389-406.

Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 2003; 329: 23-38.

Dal-Pizzol F, Ritter C, Cassol-Jr OJ, Rezin GT, Petronilho F, Zugno AI, Quevedo J, Streck EL. Oxidative mechanisms of brain dysfunction during sepsis. *Neurochem Res.* 2010; 35:1–12.

Dantzer R, O'Connor JC, Freund GG, Johnson RW, Kelley KW. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9:46–56.

Dash PK, Orsi SA, Zhang M, Grill RJ, Pati S, Zhao J, Moore AN. Valproate administered after traumatic brain injury provides neuroprotection and improves cognitive function in rats. *Plos One.* 2010; 30:5(6),e11383.

Davies NA, Brealey DA, Stidwill R, Singer M, Svistunenko DA, Cooper CE. Nitrosyl heme production compared in endotoxemic and hemorrhagic shock. *Free Radic Biol Med.* 2005; 38:41–9.

de Boer AG, Gaillard PJ. Drug targeting to the brain. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007; 47:323-55.

Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS,

Zimmerman JL, Vincent JL. Surviving sepsis campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Intensive Care Med.* 2008; 34(1):17-60.

Descamps L, Coisne C, Dehouck B, Cecchelli R, Torpier G. Protective effect of glial cells against lipopolysaccharide-mediated blood barrier injury. *Glia.* 2003; 42:46–58.

Devlin TM, Michelacci YM. *Manual de bioquímica: com correlações clínicas.* São Paulo: Edgard Blücher, 2003.

Di Donato S. Disorders related to mitochondrial membranes: pathology of the respiratory chain and neurodegeneration. *J Inherit Metab Dis.* 2000; 23:247-63.

Ding Q, Dimayuga E, Keller JN. Proteasome regulation of oxidative stress in aging and age-related diseases of the CNS. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8:163–72.

Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186:421–31.

Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005; 45:495-28.

Duman RS, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders. *Biol Psychiatry.* 2006; 59(12), 1116-27.

Ebersoldt M, Sharshar T, Annane D. Sepsis-associated delirium. *Intensive Care Med.* 2007; 33:941–50.

Engel C, Brunkhorst FM, Bone HG, Brunkhorst R, Gerlach H, Grond S, Gruendling M, Huhle G, Jaschinski U, John S, Mayer K, Oppert M, Olthoff D, Quintel M, Ragaller M, Rossaint R, Stuber F, Weiler N, Welte T, Bogatsch H, Hartog C, Loeffler M, Reinhart K. Epidemiology of sepsis in Germany: results from a national prospective multicenter study. *Intensive Care Med.* 2007; 33:606-18.

Fang J, Lian Y, Xie K, Cai S, Wen P. Epigenetic modulation of neuronal apoptosis and cognitive functions in sepsis-associated encephalopathy. *Neurol Sci.* 2013; 35(2):283-8.

Farout L, Friguet B. Proteasome function in aging and oxidative stress: Implications in protein maintenance failure. *Antioxid Redox Signal.* 2006; 8:205–16.

Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res.* 1990; 49:186-96.

Fischer JC, Jansen AJ. Differential investigation of the capacity of succinate oxidation in human skeletal muscle. *Clin Chim Acta.* 1985; 153:23-6.

Frost M, Wang Q, Moncada S, Singer M. Hypoxia accelerates nitric oxide-dependent inhibition of mitochondrial complex I in activated macrophages. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288:394–400.

Galley HF. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. *Br J Anaesth.* 2011; 107(1):57–4.

Gordon SM, Jackson JC, Ely EW, Burger C, Hopkins RO. Clinical identification of cognitive impairment in ICU survivors: insights for intensivists. *Intensive Care Med.* 2004; 30:1997-08.

Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Coco FLO, Nervi C, Pelicci PG, Heinzel T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.* 2001; 20:6969–78.

Granja C, Dias C, Costa-Pereira A, Sarmiento A. Quality of life of survivors from severe sepsis and septic shock may be similar to that of others who survive critical illness. *Crit Care.* 2004; 8:91-8.

Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd. Oxford, London, 1999.

Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J.* 1987; 1:358-64.

Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem.* 2006; 97:1634–58.

Hanna N. Sepsis and septic shock. *Top Emerg Med.* 2003; 25(2):158-65.

Hashimoto K, Shimizu E, Iyo M. Critical role of brain-derived neurotrophic factor in mood disorders. *Brain Res Rev.* 2004; 45(2), 104-14.

Hayakawa M, Gando S, Ieko M, Honma Y, Homma T, Yanagida Y, Kubota N, Uegaki S, Sawamura A, Asakura H. Massive amounts of tissue factor induce fibrinogenolysis without tissue hypoperfusion in rats. *Shock.* 2013; 39(6):514-9.

Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J.* 2003; 374:1–20.

Hirota K, Ahlfors H, Duarte JH, Stockinger B. Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17-producing cells. *EMBO Rep.* 2012; 13(2):113-20.

Hopkins RO, Weaver LK, Chan KJ, Orme Jr JF. Quality of life, emotional, and cognitive function following acute respiratory distress syndrome. *J Int Neuropsychol Soc.* 2004; 10:1005–17.

Hotchkiss RS, Nicholson DW. Apoptosis and caspases regulate death and inflammation in sepsis. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6(11): 813–22.

Hough CL, Curtis JR. Long-term sequelae of critical illness: memories and health-related quality of life. *Crit Care Med.* 2005; 9:145-6.

Howell MD, Talmor D, Schuetz P, Hunziker S, Jones AE, Shapiro NI. Proof of principle: the predisposition, infection, response, organ failure sepsis staging system. *Crit Care Med.* 2011; 39(2): 322–7.

Hughes BP. A method for estimation of serum creatine kinase and its use in comparing creatine kinase and aldolase activity in normal and pathologic sera. *Clin Chim Acta.* 1962; 7:597-604.

Iacobone E, Bailly-Salin J, Polito A, Friedman D, Stevens RD, Sharshar T. Sepsis associated encephalopathy and its differential diagnosis. *Crit Care Med.* 2009; 37(10Suppl):S331-6.

Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, De Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Mechanisms for memory types differ. *Nature*. 1998; 18:6686- 96.

Jackson JC, Gordon SM, Ely EW, Burger C, Hopkins RO. Research issues in the evaluation of cognitive impairment in intensive care unit survivors. *Intensive Care Med*. 2004; 30:2009-16.

James AM, Murphy MP. How mitochondrial damage affects cell function. *J Biomed Sci*. 2002; 9:475–87.

Jean-Baptiste E. Cellular mechanisms in sepsis. *J Intensive Care Med*. 2007; 22(2):63-72.

Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy – from molecular mechanisms to therapeutic benefits. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1754:253–62.

Kanayama A, Miyamoto Y. Apoptosis triggered by phagocytosis-related oxidative stress through FLIPS down-regulation and JNK activation. *J Leukoc Biol*. 2007; 82(5):1344-52.

Kasten KR, Tschöp J, Adediran SG, Hindleman DA, Caldwell CC. T cells are potent early mediators of the host response to sepsis. *Shock*. 2010; 34(4):327-36.

Kazantsev AG, Thompson LM. Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nat Rev Drug Discov*. 2008; 7:854-68.

Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Henning KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, Rumbaugh G. Inhibitors of class 1 histone deacetylases

reverse contextual memory deficits in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology*. 2010; 35:870–80.

Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*. 2001; 7:437.

Kyriakis JM, Avaruck J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev*. 2001; 81: 807-69.

Lahti A, Jalonen U, Kankaanranta H, Moilanen E. c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor anthra(1,9-cd)pyrazol-6(2H)-one reduces inducible nitricoxide synthase expression by destabilizing mRNA in activated macro phages. *Mol Pharmacol*. 2003; 64:308-15.

Langley B, Gensert JM, Beal MF, Ratan RR. Remodeling chromatin and stress resistance in the central nervous system: histone deacetylase inhibitors as novel and broadly effective neuroprotective agents. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord*. 2005; 4:41-50.

Leal RB, Cordova FM, Lynn H, Bobrovskaya L, Dunkley PR. Lead-stimulate p38MAPK-dependent Hsp27 phosphorylation. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002; 178:44-51.

Leal RB, Ribeiro SJ, Posser T, Cordova FM, Rigon AP, Zaniboni-Filho E, Bains ACD. Modulation of ERK1/2 and p38MAPK by lead in the cerebellum of Brazilian catfish *Rhamdia quelen*. *Aquatic Toxicol*. 2006; 77:98-104.

Lee MR, Dominguez C. MAP kinase p38 inhibitors: Clinical results and an intimate look at their interactions with p38alpha protein. *Curr Med Chem.* 2005; 12:2979.

Leentjens J, Kox M, Koch RM, Preijers F, Joosten LA, van der Hoeven JG, Netea G, Pickkers P. Reversal of immunoparalysis in humans in vivo: a double-blind, placebo-controlled, randomized pilot study. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012; 186(9):838-45.

Leoni F, Fossati G, Lewis EC, Lee JK, Pagani P, Modena D, Moras ML, Pozzi P, Reznikov LL, Siegmund B, Fantuzzi G, Dinarello CA, Mascagni P. The histone deacetylase inhibitor ITF2357 reduces production of proinflammatory cytokines in vitro and systemic inflammation in vivo. *Molecular Med.* 2005; 11(1-12):1-15.

Levine RL, Garland D, Oliver CN, Amici A, Climent I, Lenz AG, Ahn BW, Shaltiel S, Stadman ER. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 1990; 186:464-78.

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vicent JL, Ramsay G, SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS.

2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003; 31(4):1250-6.

Li Y, Alam HB. Modulation of acetylation: creating a pro-survival and anti-inflammatory phenotype in lethal hemorrhagic and septic shock. *J Biomed Biotechnol.* 2011; 523481.

Li Y, Liu B, Zhao H, Sailhamer EA, Fukudome EY, Zhang X, Kheirbek T, Finkelstein RA, Velmahos GC, deMoya M, Hales

CA, Alam HB. Protective effect of suberoylanilide hydroxamic acid against lps-induced septic shock in rodents. *Shock*. 2009; 32(5):517–23.

Liu Y, Shepherd EG, Nelin LD. MAPK phosphatases—regulating the immune response. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:202–12.

Llewelyn M, Cohen J. Diagnosis of infection in sepsis. *Intensive Care Med*. 2001; 27(1):S10-S33.

Lovatel GA, Bertoldi K, Elsner VR, Vanzella C, Moysés FS, Spindler C, Funck VR, Pereira LM, de Oliveira CV, Oliveira MS, Netto CA, Siqueira IR. Time-dependent effects of treadmill exercise on aversive memory and cyclooxygenase pathway function. *Neurobiol Learn Mem*. 2012; 98:182–7.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265-7.

Macarthur H, Westfall TC, Riley DP, Misko TP, Salvemini D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97(17):9753-8.

MacDonald JL, Roskams AJ. Epigenetic regulation of nervous system development by DNA methylation and histone deacetylation. *Prog Neurobiol*. 2009; 88:170–83.

Machado-Vieira M, Ibrahim L, Zarate Jr, CA. Histone deacetylases and mood disorders: epigenetic programming in gene-environment interactions. *CNS Neurosci Ther*. 2010; 17(6):699-704.

Marchi N, Cavaglia M, Fazio V, Bhudia S, Hallene K, Janigro D. Peripheral markers of blood-brain barrier damage. *Clin Chim Acta*. 2004; 342(1-2):1-12.

Margeron R, Trojer P, Reinberg D. The key to development: interpreting the histone code? *Curr Opin Genet Dev*. 2005; 15:163-76.

Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2012; 10(6):701-6.

Matsuda A, Jacob A, Wu R, Aziz M, Yang WL, Matsutani T, Suzuki H, Furukawa K, Uchida E, Wang P. Novel therapeutic targets for sepsis: regulation of exaggerated inflammatory responses. *J Nippon Med Sch*. 2012; 79(1):4-18.

Mellor J. Dynamic nucleosomes and gene transcription. *Trends Genet*. 2006; 22(6):320-9.

Messarlis E, Memos N, Chatzigianni E, Konstadoulakis MM, Menenakos E, Katsaragakis S, Voumvourakis C, Androulakis G. Time-dependent mitochondrial-mediated programmed neuronal cell death prolongs survival in sepsis. *Crit Care Med*. 2004; 32(8):1764-70.

Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem*. 2003; 46:5097-5116.

Muckart DJ, Bhagwanjee S. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference. Definitions of the systemic inflammatory response syndrome and allied disorders in relation to critically injured patients. *Critical Care Med*. 1997; 25(11):1789-95.

Navarro A, Boveris A. The mitochondrial energy transduction system and the aging process. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007; 292:670–86.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock*. 2011; 16:83–96.

Ogiku M, Kono H, Hara M, Tsuchiya M, Fujii H. Interleukin-17A Plays a Pivotal Role in Polymicrobial Sepsis According to Studies Using IL-17A Knockout Mice. *J Surg Res*. 2012; 174(1): 142–9.

Pan LN, Lu J, Huang B. HDAC inhibitors: a potential new category of anti-tumor agents. *Cell Mol Immunol*. 2007; 4:337–43.

Papadopoulos MC, Davies DC, Moss RF, Tighe D, Bennett ED. Pathophysiology of septic encephalopathy: a review. *Crit Care Med*. 2000; 28:3019-24.

Park JM, Greten FR, Li ZW, Karin M. Macrophage apoptosis by anthrax lethal factor through p38 MAP kinase inhibition. *Science*. 2002; 297:2048–51.

Paterson RL, Galley HF, Webster NR. The effect of N-acetylcysteine on nuclear factor-kappa B activation, interleukin-6, interleukin-8, and intercellular adhesion molecule-1 expression in patients with sepsis. *Crit Care Med*. 2003; 31(11):2574-8.

Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego. 1986.

Pearson CA, Prozialeck WC. E-Cadherin, beta-Catenin and cadmium carcinogenesis. *Med Hypotheses*. 2001; 56:573-81.

Peterson CL, Laniel MA. Histones and histone modifications. *Curr Biol*. 2005; 14(4):546-51.

Ramirez O, Jimenez E. Opposite transitions of chick brain catalytically active cytosolic creatine kinase isoenzymes during development. *Int J Dev Neurosci*. 2000; 18:815-23.

Reinhart K, Karzai W. Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med*. 2001; 29:121-5.

Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol*. 2007; 170(5): 1435-44.

Ritter C, Andrades M, Reinke A, Moreira JCF, Dal-Pizzol F. Drug intervention trials in sepsis. *Lancet*. 2004; 364:498.

Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*. 2001; 345:1368-77.

Rivers EP, McIntyre L, Morro DC, Rivers KK. Early and innovative interventions for severe sepsis and septic shock: taking advantage of a window of opportunity. *Assoc Med J*. 2005; 173(9):1054-65.

Roesler R, Vianna MR, de-Paris F, Quevedo J. Memory-Enhancing Treatments Do Not Reverse The Impairment of Inhibitory Avoidance Retention Induced by NMDA Receptor Blockade. *Neurobiol Learn Mem*. 1999; 72:252-8.

Rothwell NJ, Luheshi GN. Interleukin 1 in the brain: biology, pathology and therapeutic target. *Trends Neurosci.* 2000; 23:618–25.

Russel JA. Management of sepsis. *N Engl J Med.* 2006; 355(16):1699-713.

Rustin P, Munnich A. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta.* 1994; 228:35-51.

Rutten BP, Mill J. Epigenetic mediation of environmental influences in major psychotic disorders. *Schizophr Bull.* 2009; 35:1045–56.

Ryu SH, Kang K, Yoo T, Joe CO, Chung JH. Transcriptional repression of repeat-derived transcripts correlates with histone hypoacetylation at repetitive DNA elements in aged mice brain. *Exp Gerontol.* 2011; 46:811–8.

Schottmueller H. Wesen und behandlung der sepsis. *Inn Med.* 1914; 31:257-80.

Semmler A, Okulla T, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Heneka MT. Systemic inflammation induces apoptosis with variable vulnerability of different brain regions. *J Chem Neuroanat.* 2005; 30:144–57.

Sharshar T, Gray F, Lorin de la Grandmaison G, Hopkinson NS, Ross E, Dorandeu A, et al. Apoptosis of neurons in cardiovascular autonomic centres triggered by inducible nitric oxide synthase after death from septic shock. *Lancet.* 2003; 362(9398):1799-805.

Sharshar T, Polito A, Chęcinski A, Stevens RD. Septic-associated encephalopathy everything starts at a microlevel. *Crit Care*. 2010; 14(5):199.

Silva E, Pedro M de A, Sogayar ACB, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J; de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E, Brazilian Sepsis Epidemiological Study. *Crit Care*. 2004; 8(4): 251-60.

Sims DE. Recent advances in pericyte biology — implications for health and disease. *Can J Cardiol*. 1991; 7:431–43.

Sonnewald U, Hertz L, Schousboe A. Mitochondrial heterogeneity in the brain at the cellular level. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1998; 8:231–7.

Sriskandan S, Altmann DM. The immunology of sepsis. *J Pathol*. 2008; 214(2):211-23.

Steckert AV, de Castro AA, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Sepsis in the central nervous system and antioxidant strategies with N-acetylcysteine, vitamins and statins. *Curr Neurovasc Res*. 2014; 11(1):83-90.

Sun J, Wang L, Jiang B, Hui B, Ly Z, Ma L. The effects of sodium butyrate, an inhibitor of histone deacetylase, on the cocaine- and sucrose-maintained self-administration in rats. *Neurosci Lett*. 2008; 441:72–6.

Sweatt JD. Memory mechanisms: the yin and yang of protein phosphorylation. *Curr Biol*. 2001; 11:391-4.

Taccone FS, Su F, Pierrakos C, He X, James S, Dewitte O, Vicent JL, De Backer D. Cerebral microcirculation is impaired during sepsis: an experimental study. *Crit Care*. 2010; 14(4):R140.

Takala A, Nupponen I, Kylanpaa-Back ML, Repo H. Markers of inflammation in sepsis. *Ann Med*. 2002; 34:614-23.

Torres C, Francis MK, Lorenzini A, Tresini M, Cristofalo VJ. Metabolic stabilization of MAP kinase phosphatase-2 in senescence of human fibroblasts. *Exp Cell Res*. 2003; 290(2):195-206.

Tracey KJ. Understanding immunity requires more than immunology. *Nat Immunol*. 2010; 11(7): 561–4.

Tuon L, Comim CM, Antunes MM, Constantino LS, Machado RA, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Imipramine reverses the depressive symptoms in sepsis survivor rats. *Intensive Care Med*. 2007; 33:2165-7.

Tuon L, Comim CM, Petronilho F, Barichello T, Izquierdo I, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Time-dependent behavioral recovery after sepsis in rats. *Intensive Care Med*. 2008; 34:1724–31.

Ulloa L, Brunner M, Ramos L, Deitch EA. Scientific and clinical challenges in sepsis. *Curr Pharm Des*. 2009; 15(16): 1918–35.

Uptodate, disponível em
www.utdol.com/utd/content/topic.do?topickey=ccmed/96937view=outline.

Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology*. 2003; 189:41-54.

van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, Verwaest C, Bruyninckx F, Schetz M, Vlasselaers D, Ferdinande P, Lauwers P, Bouillon R. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. *N Engl J Med.* 2001; 345(19):1359-67.

Vincent JL, Sakr Y, Sprung CL, Ranieri VM, Reinhart K, Gerlach H, Moreno R, Carlet J, Le gall JR, Payen D, Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients Investigators. Sepsis in European intensive care units: results of the SOAP study. *Crit Care Med.* 2006; 34(2): 344-53.

Waetzig GH, Schreiber S. Review article: mitogen-activated protein kinases in chronic intestinal inflammation - targeting ancient pathways to treat modern diseases. *Aliment Pharmacol Ther.* 2003; 18:17-32.

Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK. , 2005. C-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia.* 2005; 50:235–46.

Wang D, Wang Z, Tian B, Li X, Li S, Tian Y. Two hour exposure to sodium butyrate sensitizes bladder cancer to anticancer drugs. *Int J Urol.* 2008; 15:435–41.

Wang Y, Lu S, Li X, Du N, Sun Y, Xing J, Pan X, Chen B, Miao Z. The lipid-bound apolipoprotein A-I cysteine mutant(N74C) inhibits the activation of NF- κ B, JNK and p38 in endotoxemic mice and RAW264.7 cells. *Plos One.* 2012; 7(12):e51327.

Wassmer SC, Combes V, Candal FJ, Juhan-Vague I, Grau GE. Platelets potentiate brain endothelial alterations induced by *Plasmodium falciparum*. *Infect Immun*. 2006; 74(1):645-53.

Weighardt H, Holzmann B. Role of Toll-like receptor responses for sepsis pathogenesis. *Immunobiology*. 2007; 212(9-10):715–22.

Weiss N, Miller F, Cazaubon S, Couraud PO. The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788(4):842-57.

Wesley Ely E, Shintani A, Truman B, Speroff T, Gordon SM, Harrell FE, Inouye SK, Bernard GR, Dittus RS. Delirium as a predictor of mortality in mechanically ventilated patients in the Intensive Care Unit. *JAMA*. 2004; 291:1753-62.

Wilson JX, Young GB. Progress in clinical neurosciences: sepsis-associated encephalopathy: evolving concepts. *Can J Neurol Sci*. 2003; 30:98.

Wilson JX. Mechanism of action of vitamin C in sepsis: ascorbate modulates redox signaling in endothelium. *Biofactors*. 2009; 35:5–13.

Wu J, Dong L, Zhang M, Jia M, Zhang G, Qiu L, Ji M, Yang J. Class I histone deacetylase inhibitor valproic Acid reverses cognitive deficits in a mouse model of septic encephalopathy. *Neurochem Res*. 2013; 38(11):2440-9.

Wu X, Chen PS, Dallas S, Wilson B, Block ML, Wang CC, Kinyamu H, Lu N, Gao X, Leng Y, Chuang DM, Zhang W, Lu RD, Hong JS. Histone deacetylase inhibitors up-regulate astrocyte GDNF

and BDNF gene transcription and protect dopaminergic neurons. *Int J Neuropsychopharmacol.* 2008; 11(8):1123-34.

Xuan A, Long D, Li J, Ji W, Hong L, Zhang M, Zhang W. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia rats. *Life Sci.* 2012; 90(11-12):463-8.

Zhang TY, Meaney MJ. Epigenetics and the environmental regulation of the genome and its function. *Annu Rev Psychol.* 2010; 61:439–66.

ANEXO A



Universidade do Extremo Sul Catarinense UNESC
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA



Resolução

A Comissão de Ética no Uso de Animais, reconhecido pela Resolução n. 02/2011/Câmara Propex de acordo com a Lei Federal 11.794, analisou o projeto abaixo.

Protocolo: 01/2012

Professor:

JOÃO QUEVEDO

Título: "Alterações tardias em sistema nervoso central de ratos submetidos à sepsis".
"Late alterations in central nervous system of rats subject to sepsis".

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicado a CEUA. Os membros da CEUA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Para demais dúvidas contatar a CEUA.
www.unesc.net/propex/ceua.

Criciúma, 29 de fevereiro de 2012.


Jairo José Zocche
Coordenador do CEUA